



Universidad
Francisco de Vitoria
UFV Madrid
*Escuela Internacional
de Doctorado*

**PREDICTORES MORFOLÓGICOS PARA LA
IDENTIFICACIÓN PRECOZ DE PÉRDIDA DE
EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS MISMATCH
REPAIR**

Eduardo Sobrino Reig

Directores:

Yasmina Martín Martínez

Jesús Isidoro García González

DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA, MEDICINA Y CIENCIAS BIOSANITARIAS

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Madrid 2023

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar dando las gracias a mis directores, Yasmina y Jesús. Yasmina gracias por todos tus consejos y apoyo, gracias por enseñarme a investigar, siempre con paciencia y cariño y por ofrecerme un espacio para poder cometer mis errores y así poder aprender de ellos. Jesús por confiar en mí y ofrecerme la oportunidad de hacer tesis y gracias por tu orientación y perspectiva clínica.

Gracias a todo el servicio de Anatomía patológica del Hospital Universitario de Móstoles, en especial a mi tutora Telma Meizoso por ofrecerme esta oportunidad.

Gracias a Maite Iriondo y David Delgado por su dedicación y paciencia.

Gracias a mi mujer, Carmen por ser la mejor mujer del mundo, por confiar en mi hasta cuando yo no confiaba, por ser mi “cheerleader” en todo momento y estar siempre allí.
QTUDG.

Gracias a mis dos hijas, María y Carmen por iluminarme cada día con vuestras risas y vuestra forma de ser, siendo como sois capaces de sacarme una sonrisa cada momento.
Os adoro. Sed muy felices. QTUVG.

No podría olvidarme de mis padres, que desde pequeño me transmitieron la ilusión por aprender y experimentar. Gracias mamá por estar siempre a mi lado, por darme confianza desde pequeño repitiéndome todos los días “Tú puedes” y gracias por decirme que la tesis estaba muy bien, aunque todos sabemos que no entendías nada. Gracias papá por tu apoyo incondicional y creer siempre en mí.

Eduardo Sobrino Reig

No puedo terminar sin dar las gracias a mis abuelos, Pina y Pepe, por confiar siempre en mí. Y a todas las personas que directa o indirectamente han estado a mi lado para que pudiera realizar este proyecto.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	XIII
PUBLICACIONES.....	XVII
RESUMEN / ABSTRACT	XXI
INTRODUCCIÓN	1
1. Carcinoma urotelial.....	3
2. Estudio histológico.....	9
2.1. Histología normal del tejido urotelial	9
2.2. Histología del carcinoma urotelial	10
3. Diagnóstico de carcinoma urotelial	12
3.1. Historia clínica del paciente.....	12
3.2. Pruebas complementarias	14
4. Carcinogénesis en el carcinoma del tracto urinario	16
5. Síndrome de Lynch.....	20
5.1. Historia del síndrome de Lynch	21
5.2. Tumores uroteliales y mutación de los genes MMR	23
5.3. Identificación precoz y diagnóstico de pacientes con mutación de los genes MMR.....	25
5.4. Vigilancia a los pacientes con mutación de las proteínas MMR	29
5.5. Tratamiento	30
5.6. Consejo genético	32

6. Clasificación molecular del carcinoma urotelial	33
6.1. Tratamiento del carcinoma urotelial según la clasificación molecular de la TCGA.....	36
6.2. Relación entre la clasificación molecular y la presencia de tumores con mutaciones en las proteínas MMR.....	37
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	39
MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
1. Obtención de la muestra	47
2. Información recogida.....	48
2.1. Información clínica.....	48
2.2. Características histológicas.....	50
2.3. Procesamiento de la muestra para el estudio histológico	50
2.4. Estudio histológico.....	53
3. Tissue microarray.....	65
4. Inmunohistoquímica	67
4.1. Estudio IHQ de las proteínas MMR.....	71
4.2. Estudio IHQ de los grupos moleculares	72
4.2.1. Grupo basal.....	72
4.2.2. Grupo luminal	72
4.2.3. Grupo luminal papilar	73
4.2.4. Grupo luminal infiltrante	74
4.2.5. Grupo neural.....	75

5. Estudio estadístico.....	76
RESULTADOS	77
1. Estudio descriptivo	79
1.1. Características de la población	79
1.2. Características del tumor.....	81
1.2.1. Patrón histológico.....	81
1.2.2. Grado tumoral	82
1.2.3. Patrón de crecimiento	83
1.2.4. Infiltra la lámina propia	84
1.2.5. Grado de infiltración	84
1.2.6. Linfocitosis	85
1.2.7. Necrosis tumoral.....	86
1.2.8. Nucleolo	86
1.2.9. Invasión linfocascular y perineural	87
1.3. Grupo molecular	87
1.4. Pérdida de expresión de proteínas MMR.....	88
1.5. Recidiva tumoral	89
2. Estudio comparativo.....	90
2.1. Estudio de tumores con pérdida de expresión de proteínas MMR en comparación con tumores con expresión completa de proteínas MMR.....	90
2.2. Estudio de tumores según su tipo molecular	93
2.2.1. Grupo basal.....	94
2.2.2. Grupo luminal	97
2.2.3. Grupo luminal papilar	99

2.2.4. Grupo luminal infiltrante	102
2.2.5. Grupo neural.....	104
2.3. Comparación entre la presencia de los diferentes grupos moleculares con la histología presentada	107
2.4. Relación entre los grupos moleculares y el grado de infiltración que presentan.....	109
2.5. Relación entre los grupos moleculares y la presencia de tumores con pérdida de expresión de proteínas MMR.....	112
2.6. Gravedad evolutiva	113
DISCUSIÓN	115
1. Prevalencia del carcinoma urotelial en la población de Móstoles.....	117
2. Estudio de la presencia de mutaciones de las proteínas MMR	120
3. Recidivas y mortalidad en los pacientes con pérdida de expresión de las proteínas MMR.....	132
4. Screening en los pacientes con pérdida de expresión de las proteínas MMR.....	132
5. Relación entre los pacientes con pérdida de expresión de las proteínas MMR y la clasificación molecular de la TCGA.....	133
6. Clasificación molecular mediante el uso del estudio morfológico.....	134
6.1. Grupo basal	135
6.2. Grupo luminal.....	136
6.3. Grupo luminal papilar.....	137
6.4. Grupo luminal infiltrante.....	138
6.5. Grupo neural.....	138
CONCLUSIONES	141

ANEXO I	147
ANEXO II	157
BIBLIOGRAFÍA	159

ABREVIATURAS

IHQ: inmunohistoquímica

5-ALA: 5 aminolevulínico

MMR: Mismatch repair

hMLH1: MutL Protein Homolog 1

hMSH2: MutL Protein Homolog 2

hMSH3: MutL Protein Homolog 3

hMSH6: MutL Protein Homolog 6

hPMS1: Postmeiotic Segregation Increased 1

hPMS2: Postmeiotic Segregation Increased 2

Sd.: Síndrome

HNPCC: Carcinoma colorrectal hereditario no polipoide.

PD-1: Punto de control inmunitario de muerte programada 1

CTLA4: Vías de la proteína 4 asociadas a los linfocitos T citotóxicos

NAC: Quimioterapia neoadyuvante estándar

FGFR: Receptores del factor de crecimiento fibroblástico

TCGA: The Cancer genome atlas

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

OMS: Organización mundial de la salud

H&E: hematoxilina y eosina

N.S.: no significativo

n.e.s.: no estadísticamente significativo

CNIO: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

TMA: Tissue microarrays

CGA: Campo de gran aumento

PUBLICACIONES

La investigación de esta Tesis Doctoral ha dado como resultado el siguiente artículo de investigación:

Sobrino-Reig E, Meizoso T, García J, Varillas-Delgado D, Martin YB. Morphological predictors for microsatellite instability in urothelial carcinoma. *Diagn Pathol.* 2021 Nov 20;16(1):106. doi: 10.1186/s13000-021-01168-2. PMID: 34801034; PMCID: PMC8606048. (Ver anexo I)

RESUMEN / ABSTRACT

Introducción

El cáncer es una patología que afecta gravemente al ser humano, eso ha hecho que sea una de las más estudiadas en la actualidad. Se sabe que hay muchas causas que inducen la carcinogénesis entre ellas, la vía de inestabilidad de microsatélites. La inestabilidad de microsatélites se produce debido a una serie de mutaciones en los genes de reparación de errores de emparejamiento del ADN (genes Mismatch repair), que pueden afectar a las células germinales pudiendo padecer diferentes síndromes, cuyos pacientes se caracterizan por presentar un mayor riesgo de desarrollar múltiples cánceres y a edades más tempranas que la población general. Para el estudio de los genes Mismatch repair, se puede realizar un estudio indirecto de las proteínas codificadas por los genes Mismatch repair mediante técnicas inmunohistoquímicas. Aunque la relación entre la inestabilidad de microsatélites y los carcinomas uroteliales ha sido ampliamente estudiada, su evaluación no se realiza actualmente en el análisis de los carcinomas uroteliales.

Métodos

En este estudio se analizaron 139 tumores uroteliales, incluyendo tanto las características clínicas de los pacientes como las características histológicas de los tumores.

Se estudió la expresión de proteínas Mismatch repair mediante un estudio inmunohistoquímico de 139 carcinomas uroteliales y se evaluaron sus características

clínico-patológicas. Identificamos que el 10,3% (13 pacientes) de los carcinomas uroteliales presentaban pérdida de expresión de la proteína Mismatch repair (9 MLH1; 5 MSH2; 2 MSH6 2; PMS2; n = 139).

Posteriormente, se clasificaron los 139 tumores uroteliales siguiendo la clasificación molecular TCGA. Para ello se realizó un detallado estudio inmunohistoquímico.

Resultados

Tras el estudio de los resultados, se confirmó que la población estudiada presentaba unas características similares a las presentadas por la población general.

Al estudiar la relación entre los tumores uroteliales y la pérdida de expresión de las proteínas Mismatch repair, los resultados sugieren que estos tumores ocurren con mayor frecuencia en el sexo masculino, se localizan con mayor frecuencia en vejiga o uréteres, y presentan un grado tumoral alto con un patrón histológico papilar que no infiltra la lámina propia o, en el caso de tumores infiltrantes, que infiltre tejidos perivesicales.

Conclusiones

Tras realizar el estudio, se puede considerar que nuestra serie es representativa de los carcinomas uroteliales, ya que las variables estudiadas se ajustan, en líneas generales, a

las presentadas por la población general y presentan tendencias habituales de los tumores uroteliales.

En el estudio de los tumores uroteliales con pérdida de expresión de las proteínas Mismatch repair, se observó, que los pacientes que cumplían una serie de características clínicas e histológicas, sexo masculino, tumores localizados con mayor frecuencia en vejiga o uréteres, y que presentan un grado tumoral alto con un patrón histológico papilar limitados a la lámina propia o, en el caso de tumores infiltrantes, que infiltran tejidos perivesicales, tenían alta probabilidad de presentar pérdida de expresión de la proteína Mismatch repair, y se ha considerado que estos pacientes deben ser sometidos a técnicas inmunohistoquímicas y moleculares para un diagnóstico completo. Por tanto, proponemos la evaluación de las características clínico-patológicas identificadas en el presente estudio para ser aplicadas como guía de cribado, con el fin de ayudar a los médicos a decidir qué casos deben someterse a pruebas adicionales.

Introduction

Cancer is a disease that seriously affects humans, which has made it one of the most pathology studied nowadays. It is known that there are many causes that induce carcinogenesis including the microsatellite instability pathway. Microsatellite instability occurs due to a series of mutations in DNA mismatch repair genes, which can affect germ cells. This increases the risk of developing multiple cancers compared to the general population. The loss of Mismatch repair protein is usually determined by immunohistochemical studies. Although the relationship between microsatellite instability and urothelial carcinomas has been extensively studied, its evaluation is not currently performed in the analysis of urothelial carcinomas.

Methods

In this study, 139 urothelial tumors were analyzed, including the clinical characteristics of the patient and the histological characteristics of the tumor.

In turn, the expression of Mismatch repair proteins was studied by means of an immunohistochemical study of 139 urothelial carcinomas and their clinical-pathological characteristics were evaluated. We identified that 10.3% (13 patients) of the urothelial carcinomas had loss of Mismatch repair protein expression (9 MLH1; 5 MSH2; 2 MSH6; 2 PMS2; n = 139).

Subsequently, the 139 urothelial tumors were classified following the TCGA molecular classification. For this, a detailed immunohistochemical study was carried out.

Results

After studying the results, it was confirmed that the population studied presented characteristics similar to those presented by the general population.

When studying the relationship between urothelial tumors and the loss of expression of Mismatch repair proteins, the results suggest that these tumors occur more frequently in males, are more frequently located in the bladder or ureters, and present a high tumor grade with a Papillary histological pattern that does not infiltrate the lamina propria or, in the case of infiltrating tumors, it infiltrates perivesical tissues.

Conclusions

After carrying out the study, it can be considered that our series is representative of urothelial carcinomas, since the variables studied are adjusted, in general, to those presented by the general population and present habitual tendencies of urothelial tumors.

In the study of urothelial tumors with loss of Mismatch repair protein expression, it was observed that patients who met a series of clinical and histological characteristics, male sex, tumors located more frequently in the bladder or ureters, and who presented a high tumor grade with a papillary histological pattern limited to the lamina propria or, in the case of infiltrating tumors, infiltrating perivesical tissues, had a higher probability of presenting loss of Mismatch repair protein expression, and it has been considered that these patients should undergo immunohistochemical techniques and molecular for a

correct diagnosis. Therefore, we propose the evaluation of the clinicopathological characteristics identified in the present study to be applied as a screening guide, in order to help physicians, decide which cases should undergo additional tests.

INTRODUCCIÓN

1. CARCINOMA UROTELIAL

El cáncer, es un grave problema de salud pública. En la actualidad una de cada tres mujeres y uno de cada dos varones van a desarrollar un tumor a lo largo de su vida. Se ha observado un aumento de la prevalencia debido al aumento de la edad de la población y de la esperanza de vida (Siegel et al., 2012).

El carcinoma urotelial presenta a nivel europeo una incidencia estimada, para el año 2020 de 203.983 casos (Figura 1) y en España de 18.512 casos (Figura 2), siendo tanto en Europa como en España, el quinto en frecuencia (Global cancer observatoy, 2022). Por lo general, la prevalencia de carcinoma urotelial en países desarrollados es aproximadamente seis veces superiores que en países en vías de desarrollo. (Steven C Campbell et al., 2018). Estas diferencias podrían deberse al aumento de la edad, la presencia de tóxicos ambientales, junto la adopción de estilos de vida asociados al cáncer como son el tabaco, la escasa actividad física y una la dieta inadecuada (Jemal et al., 2011).

Estimated number of new cases in 2020, Europe, both sexes, all ages (excl. NMSC)

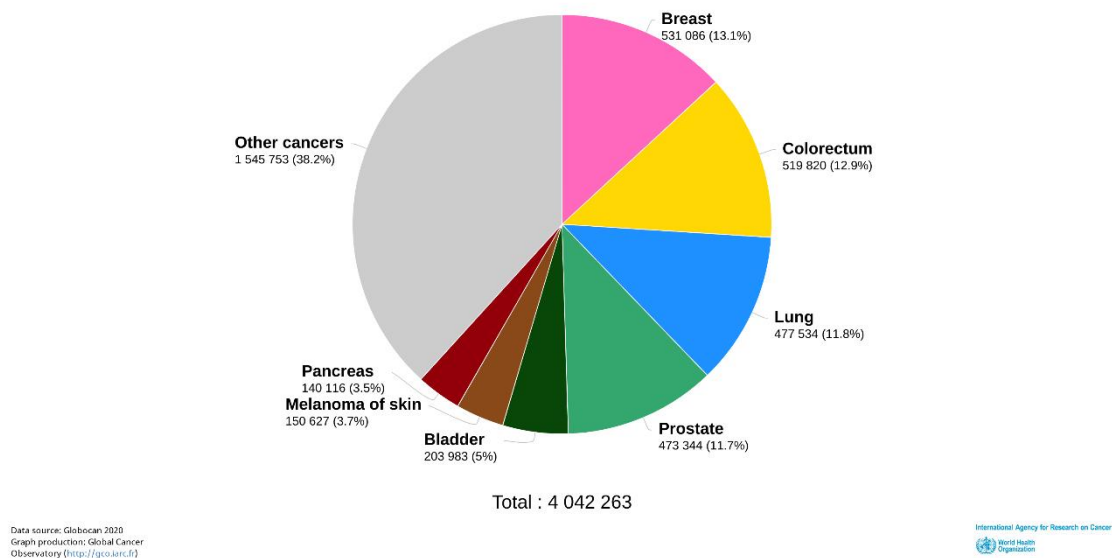


Figura 1. Incidencia estimada de los tumores más frecuentes a nivel europeo en el año 2020 (ambos sexos) (Global cancer observatoy, 2022).

Estimated number of new cases in 2020, Spain, both sexes, all ages (excl. NMSC)

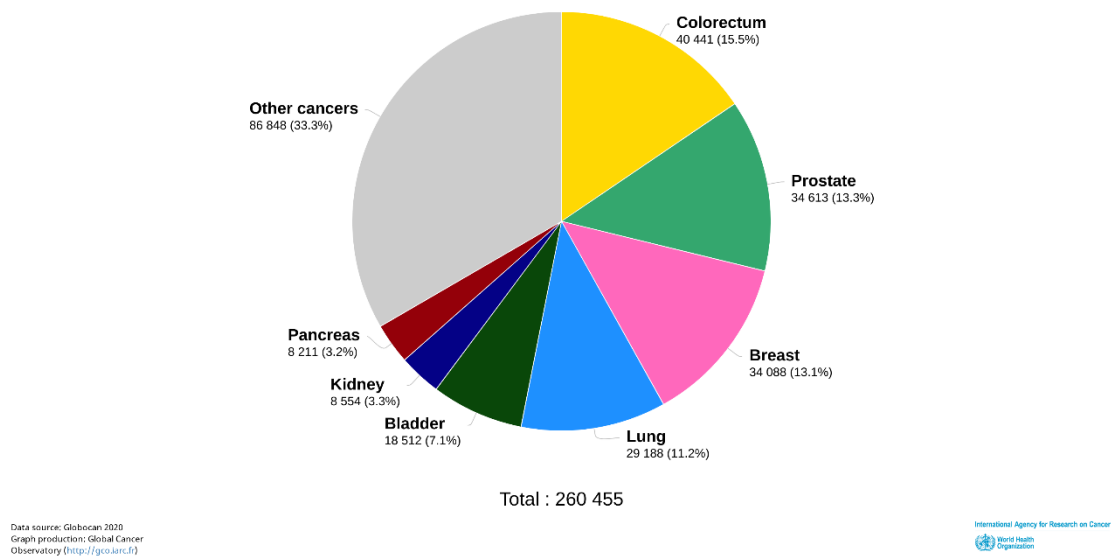


Figura 2. Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en España en el año 2020 (ambos sexos) (Global cancer observatoy, 2022)

La media de edad a la que se diagnostica el carcinoma urotelial es de 65-70 años (Inamura and Kentaro, 2018). Es muy excepcional en niños y adolescentes, tan solo un 0.1 % de los tumores se diagnostica en menores de 20 años (Surgeons, 2020).

Al estudiar la incidencia vemos que la raza blanca, presenta una mayor tendencia a padecer carcinoma urotelial seguida de la negra, asiática y por último en los indios americanos (Surgeons, 2020). Se ha evidenciado una incidencia muy superior en la raza blanca en comparación con la raza negra (Greenlee RT1 et al., 2000) (aproximadamente una incidencia 100% superior en varones y un 50% superior en mujeres). Puesto que ambas razas comparten los mismos carcinógenos ambientales, se puede descartar una hipótesis racial. Hay estudios que establecen que dicha diferencia se debe a polimorfismos genéticos en enzimas metabólicas como la N-acetiltransferasa y la S-transferasa 1.

En España, la Sociedad Española de Oncología Médica (Sociedad Española de Oncología Médica, 2021), estima que el carcinoma urotelial presentará una incidencia de 20.613 personas. De estas, 16.578 son varones y 4.035 son mujeres. Si valoramos su prevalencia, vemos que también es alta, en 5 años, se estima que en España en 2.020 será de 14.134 mujeres (Figura 3) y de 62.462 varones (Figura 4).

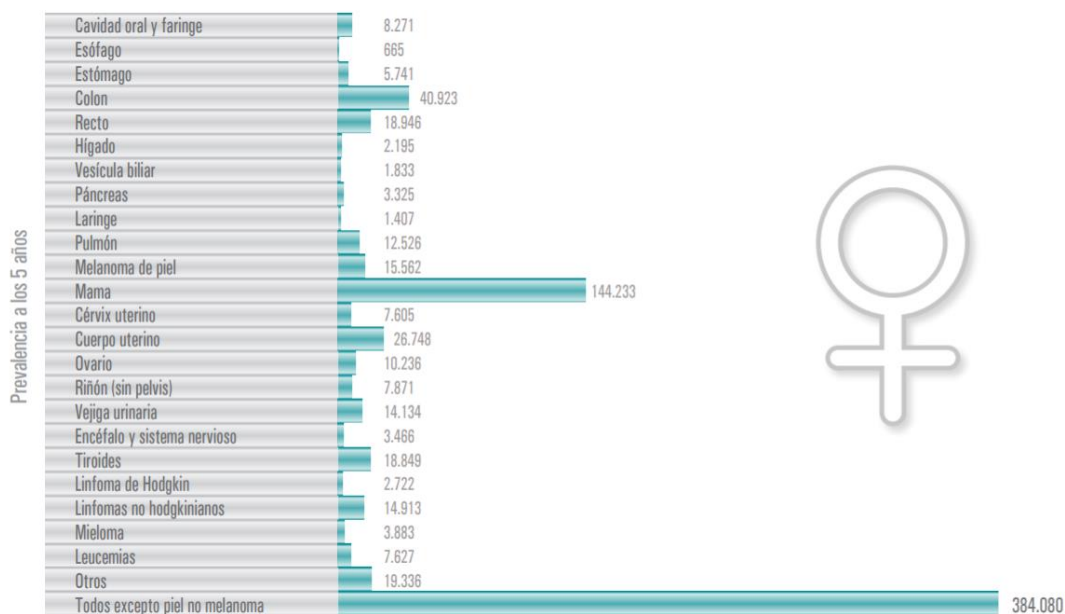


Figura 3. Estimación de la prevalencia de tumores en varones en España para el año 2020 (prevalencia a los 5 años) (Sociedad Española de Oncología Médica, 2021). Gráfico: REDECAN, 2021.

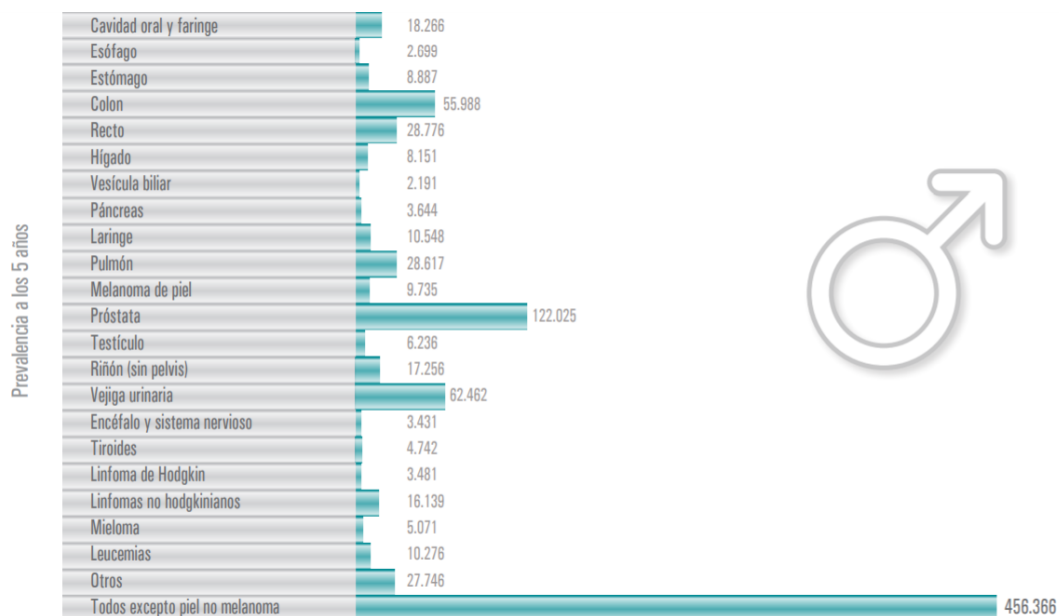


Figura 4. Estimación de la prevalencia de tumores en mujeres en España para el año 2020 (prevalencia a los 5 años) (Sociedad Española de Oncología Médica, 2021). Gráfico: REDECAN, 2021.

Al valorar la supervivencia, vemos que existe una gran horquilla, identificándose una tasa de supervivencia a los 5 años de entre un 40% y un 80%. Esto se debe a que la tasa de supervivencia está altamente relacionada con la infiltración tumoral (Moch et al., 2016).

La supervivencia a 5 años en el caso de los tumores no infiltrantes es del 90%, tumores que infiltran la lámina propia presentan una tasa de supervivencia del 75%. Los tumores que infiltran la capa muscular presentan una supervivencia a los 5 años del 50%. Los tumores que infiltran tejidos perivesicales o a la próstata, útero o vagina presentan una supervivencia del 20%. Los tumores que infiltran a nivel de la pared pélvica, pared abdominal o presentan metástasis a distancia presentan una tasa de supervivencia entre un 5% y un 10% (Harper et al., 2017; Parakh R, 2019).

En España, la tasa de supervivencia a 5 años entre 2000 y 2007 fue del 68,60%, cifra que es muy similar a la observada en 2014 (70,28%) y a su vez similar a la observada en ese mismo periodo a nivel europeo (69,41%) (Figura 5) (Sant et al., 2009; Rossi et al., 2015).

Tipo Tumoral	Próstata	Pulmón	Colon-recto	Vejiga urinaria	Cav. oral y Faringe	Estómago	Linfomas no Hodkin	Hígado	Laringe	Riñón	Todos
Dinamarca	69,23	9,42	52,73	72,53	38,70	15,62	62,53	3,69	56,08	45,74	47,29
Finlandia	90,05	9,65	58,73	75,94	46,87	23,68	56,88	8,37	59,80	57,26	59,72
Islandia	82,40	13,24	65,64	75,44			68,84		82,13	60,31	60,35
Noruega	83,41	11,95	58,69	75,71	45,19	21,78	61,79		66,08	56,50	56,71
Suecia	87,46	12,55	59,26	75,23	44,36	19,91	62,92	10,07	66,95	58,97	64,82
Irlanda	85,50	10,01	52,51	74,34	37,80	20,30	61,57	13,94	57,05	49,39	53,1
Inglaterra	80,26	7,98	51,30	74,21	42,61	16,38	54,82	8,51	63,24	47,08	46,91
Irlanda del Norte	83,33	10,50	52,62	78,48	48,46	16,84	54,63	10,3	75,47	47,94	47,68
Escocia	78,83	7,98	53,08	52,82	38,71	14,77	58,34	8,07	62,10	46,23	42,98
Gales	78,03	7,86	49,97	73,46	41,50	16,52	53,93	9,47	59,43	48,99	47,28
Austria	90,19	14,88	60,76	77,56	37,13	30,23	59,67	11,90	57,78	71,87	59,43
Bélgica	89,51	14,25	61,26	72,29	36,41	27,33	63,72	16,46	58,30	61,74	56,69
Francia	88,82	13,07	57,76	58,06	30,97	24,44	63,85	12,69	52,78	63,55	54,51
Alemania	89,29	14,46	60,95	73,95	39,33	30,52	61,26	13,43	59,89	69,65	56,18
Suiza	86,62	14,17	61,93	73,52	39,27	29,31	63,24	12,10	60,73	62,28	56,34
Holanda	83,25	13,03	58,21	54,56	44,24	19,35	57,28	10,00	69,32	52,63	49,79
Croacia	71,17	14,37	48,04	70,02	30,44	18,94	43,96	9,89	51,12	57,50	40,01
Italia	88,39	13,24	59,51	78,49	40,47	30,53	60,90	16,07	68,86	66,69	52,9
Malta	84,95	8,36	58,91	78,77	40,83	19,46	41,20			47,47	47,51
Portugal	89,23	9,60	56,55	72,55	30,38	29,26	52,84	11,46	48,45	64,14	52,11
Eslovenia	74,29	10,06	51,92	64,42	30,44	25,32	51,52	3,37	62,24	55,30	41,96
España	84,59	10,06	56,42	70,29	34,62	24,19	58,19	14,45	59,46	57,48	48,88
Bulgaria	50,51	5,47	41,55	60,41	15,17	10,60	32,84	3,21	41,47	38,72	29,84
República Checa	78,06	10,46	50,22	70,68	36,38	21,04	55,87	5,65	49,93	59,62	46,4
Estonia	72,80	10,42	48,17	65,54	19,09	21,69	47,16		49,08	55,52	39,92
Letonia	65,60	10,45	40,24	55,39	15,33	19,21	43,69		40,22	55,09	35,39
Lituania	82,84	8,02	45,40	59,88	13,85	22,03	44,88	7,43	44,43	56,11	42,97
Polonia	66,56	12,93	44,91	60,76	29,09	13,62	39,83	6,17	53,01	52,66	34,66
Eslovaquia	65,30	9,40	48,13	64,39	21,34	18,83	44,69	6,04	43,64	56,52	38,19
EUROPA	83,36	11,97	55,79	69,41	36,37	23,74	57,16	11,46	58,99	59,78	50,34

Fuente: Proyectos EUROCARE-4 y EUROCARE-5, y Red Española de Registros de Cáncer

Figura 5. Tasa de supervivencia relativa a 5 años de cáncer ajustada por edad para 10 tipos tumorales, en los países de la Unión Europea (2000-2007) ((Galceran et al., 2014)

España ocupa un lugar muy elevado en el ranking europeo de mortalidad por los carcinomas uroteliales, aunque como en el resto de los países europeos, las tasas de mortalidad han descendido en los últimos años (Ferlay et al., 2010). Según Josep María Borrás et al. en su estudio (Borrás MJ. et al., 2009), propone que dicha disminución de la mortalidad se debe, en parte, a la disminución de la prevalencia del consumo de tabaco en los hombres españoles, así como una caída de la exposición laboral a ciertos carcinógenos.

2. ESTUDIO HISTOLÓGICO

2.1. Histología normal del tejido urotelial

El tejido urotelial (Chaux A., 2019) está tapizado por unas 5-7 capas de células de espesor. La capa superficial está construida por células superficiales (llamadas también células umbrella), que se caracterizan por ser grandes y elongadas con un citoplasma eosinófilo y frecuentemente binucleadas. Las células intermedias son cúbicas o columnares bajas, con bordes bien definidos y citoplasma anfofílico, rico en glucógeno; los núcleos están dispuestos regularmente, la cromatina es finamente granular y es poco frecuente encontrar mitosis. La capa basal está constituida por células más cilíndricas, algunas presentan surcos nucleares longitudinales y se encuentra sobre la lámina basal (Figura 6).

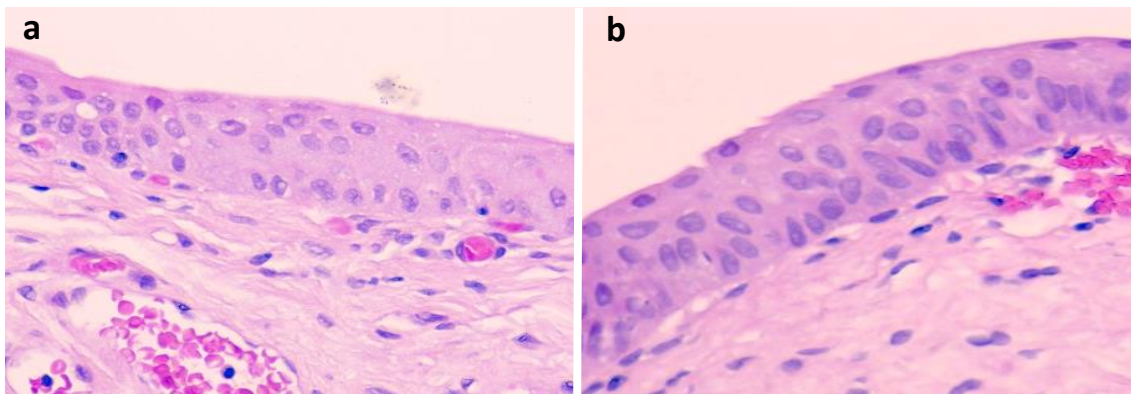


Figura 6. Mucosa urotelial sin alteraciones histológicas significativas (a y b) Ampliación a y b 20x

2.2. Histología del carcinoma urotelial

Cuando se producen una serie de mutaciones genéticas en las células, estas generan una serie de cambios en su fenotipo, perdiendo su capacidad de diferenciación o especialización y proliferan activamente, adquiriendo una serie de características atípicas.

Al producirse cambios en su fenotipo, se pueden observar diferentes patrones histológicos. Los patrones histológicos permiten clasificar los tumores mediante el estudio microscópico, estos se determinarán basándose tanto en las características fenotípicas de las células como en las características arquitecturales del tumor (Figura 7).

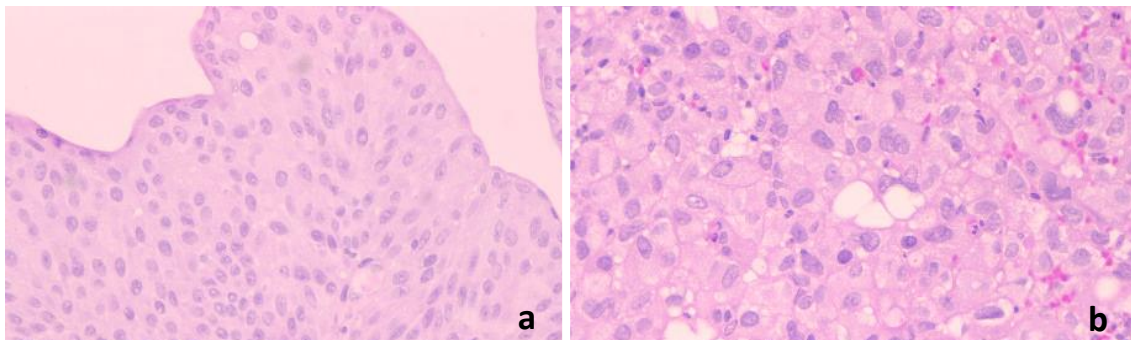


Figura 7. Carcinoma urotelial (a y b). Ampliación a: 20X; b: 60X

Existen varios patrones histológicos del carcinoma de vejiga dentro de la “WHO Classification of Tumours of Urinary System” (Moch et al., 2016). Los patrones histológicos más comunes del carcinoma del tracto urinario, son el carcinoma urotelial papilar/sólido (Picazo et al., 2007) que afecta entre un 90-80% de los carcinomas en los países industrializados. (Moch et al., 2016).

El 10% de los carcinomas uroteliales presentan diferenciación glandular o epidermoide, siendo una característica más común en los tumores de alto grado e invasivos, aunque puede darse en tumores bien diferenciados (Blanco Jiménez E et al., 2003).

Los carcinomas uroteliales con diferenciación epidermoide, están directamente relacionados por la infección por *S. Haematobium*. Se ha comprobado que los países donde *S. Haematobium* es endémico, se puede identificar dicho patrón hasta en un 72% de los carcinomas uroteliales. En contraposición, en los países donde *S. Haematobium* no es endémico, los carcinomas uroteliales con diferenciación epidermoide solo están presentes en aproximadamente un 10-5% de los carcinomas uroteliales (Lamm et al., 1992; Antoni et al., 2017).

El estudio histológico, permite gradar estos tumores, siendo más agresivos cuanto mayor sea el grado; es decir, cuanto menos diferenciadas estén las células. En el caso de los carcinomas uroteliales, la mayoría de ellos presentan tumores de bajo grado en el momento del diagnóstico (60%) (Parakh R, 2019). Esta proporción varía según el grado de infiltración, por ejemplo, si analizamos los tumores que infiltran la lámina propia, la mayoría de autores concuerdan que los tumores de alto grado son mayoritarios (Torti et al., 1987; Kaubisch et al., 1991).

Otra de las características que se valora en el estudio histológico es el nivel de infiltración que presenta el tumor. La presentación más frecuente de los carcinomas uroteliales en el momento del diagnóstico es en aproximadamente un 70-80% de los casos, de tumores uroteliales no musculo invasivos (Parakh R, 2019).

3. DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA UROTELIAL

3.1. Historia clínica del paciente

Una completa historia del paciente es útil y obligatoria. En dicha anamnesis se le pregunta al paciente sobre su historia clínica, con el objetivo de hacer un diagnóstico diferencial.

- ✓ Edad
- ✓ Género
- ✓ Alergias conocidas
- ✓ Antecedentes médicos
- ✓ Antecedentes quirúrgicos
- ✓ Antecedentes familiares de patología urinaria u otra patología tumoral
- ✓ Hábitos tóxicos (tabaco, alcohol...)

Al realizar la historia clínica se debe de examinar y evaluar los diferentes signos y síntomas que puedan padecer dichos pacientes. La hematuria que generalmente suele ser de carácter intermitente, es el signo más frecuente en los pacientes que padecen carcinoma urotelial (Cummings et al., 1992). Se ha identificado que los pacientes que presentan hematuria visible se asocian, con mayor frecuencia, con tumores de mayor grado que los que presentan una hematuria no visible (Ramírez D et al., 2016). Otro de los síntomas más frecuentes, son los síntomas irritativos que suelen ser más frecuentes en tumores in situ de localización cervical o de tumores infiltrantes (Hudson and Herr, 1995), así como el dolor lumbar secundario a la obstrucción de los uréteres, edema de

miembros inferiores, presencia de masa ocupante de espacio, anorexia y pérdida de peso (Messing et al., 2004). (Figura 8).

SÍNTOMAS CLÍNICOS MÁS FRECUENTES DEL CÁNCER DE VEJIGA (%)	
Hematuria	77-87
Hematuria durante tratamiento anticoagulante	4.5
Dolor vesical	4-21
Disuria	7.5-10
Polaquiritia	4-5
Pérdida de peso	<1
Metástasis	<1

Figura 8. Síntomas clínicos más frecuentes del carcinoma urotelial (Pavone-Macaluso M et al., 2020)

El examen físico completo es esencial y nos servirá para realizar un diagnóstico diferencial entre diferentes patologías urológicas, aunque muchas veces es de baja utilidad para el diagnóstico de carcinoma, pero de gran utilidad para descartar patologías urológicas.

- ✓ En la exploración física, se buscarán signos de infección urológica como fiebre, edema u otros signos como puño-percusión.
- ✓ Examen del introito vaginal, valorando la presencia de prolapsos de órganos pélvicos, tono y trofismo vaginal, escapes de orina al esfuerzo...
- ✓ Examen del escroto, valorando masas, varicocele, hidrocele....
- ✓ Examen prostático mediante un tacto rectal valorando tamaño, consistencia...

3.2. Pruebas complementarias

Existen una serie de pruebas complementarias que nos ayudaran en el diagnóstico de los carcinomas uroteliales.

En el estudio de sedimento de la orina se valora la presencia o ausencia de microhematuria, leucocituria o bacteriuria, así como el pH de la orina. Según el estudio de Wakui y Shiigai (Wakui and Shiigai, 2000) se ha comprobado que el análisis del sedimento de orina puede no aportar gran información; puesto que solo, resulta de utilidad en los casos hematuria macrohematuria, ya que en los casos de microhematuria (96% de las hematurias asintomáticas) no se asocia al riesgo de padecer carcinoma vesical.

Las técnicas de estudio por imagen, suponen una gran herramienta de gran valor, tanto para el diagnóstico como para su estadiaje. De las que destacamos:

- ✓ **Ecografía abdominal:** Es una prueba de gran interés para la visualización ecográfica de las estructuras urológicas. Esta técnica presenta una sensibilidad de hasta el 98% siendo tamaño dependiente (PR, 1989). Se identificó que, en tumores menores de 5 mm presenta una sensibilidad del 38%, para tumores que miden entre 5 a 10 mm presenta una sensibilidad del 82% y aquellos tumores que miden más de 10 mm presenta una sensibilidad cercana al 100%. Esta técnica presenta dificultades, tanto para valorar el número de lesiones, la localización, aspecto morfológico o incluso su estadiaje (Fernández González I et al., 2000).

A su vez, existen otras múltiples técnicas ecográficas para el diagnóstico de estos tumores, como la ecografía transvaginal o ecografía transrectal pero dichas técnicas son de baja aplicación en la clínica diaria.

- ✓ **Urografía por Tomografía Computarizada:** es un examen por imágenes para examinar las vías urinarias, incluidos los riñones, la vejiga y los uréteres, que transportan la orina desde los riñones hasta la vejiga. Es de gran utilidad para la estadificación de los tumores.

El estudio citológico es una técnica no invasiva, adecuada para el cribado, diagnóstico y seguimiento de los carcinomas uroteliales. Esta técnica comenzó en la década de 1940, Papanicolau y Marshal realizaron un examen citológico en el sedimento de orina con el fin de buscar células cancerosas (Hoque et al., 2006).

El estudio citológico resulta de gran utilidad en tumores de alto grado, así lo demuestran Murphy et al. en su estudio (Murphy WM et al., 1986) determinan que la citología obtenida por micción resulta positiva en el 10% de los tumores de bajo grado y hasta en un 90% en los tumores de alto grado. Al valorar los carcinomas in situ, al tratarse de tumores de alto grado, es capaz de diagnosticar el 80-90% de los casos tumorales.

La cistoscopia es una exploración endoscópica, que se realiza mediante el uso de un cistoscopio (rígido o flexible) y permite la visualización del interior de la uretra y de la vejiga y de esta forma valorar parámetros de morfología tumoral y localización. En el mismo procedimiento, si se considera preciso, se realiza una biopsia superficial para su

posterior estudio. Se puede realizar una cistoscopia de fluorescencia mediante una instilación de 5-ALA (5 aminolevulínico).

En la actualidad se considera la técnica “Gold estándar” para la detección de carcinoma urotelial. Esta técnica ofrece una sensibilidad del 98% en la detección de lesiones malignas de vejiga (Fernández González I et al., 2000). Mediante esta prueba se puede obtener una exhaustiva descripción del tumor, tanto de la localización, morfología, tamaño y número. En la mayoría de los casos, el aspecto macroscópico se correlaciona con el grado tumoral, los tumores de bajo grado suelen presentar papilar finas y una mucosa circundante normal, mientras que los tumores de alto grado presentan una papila mamelonada con una base de implantación amplia. Los carcinomas in situ, presentan una lesión aterciopelada, plana e hiperémica (Lee et al., 2008).

La resección transuretral, es una técnica importante a nivel diagnóstico y como tratamiento puesto que permite evaluar tanto al patrón arquitectural, el grado citológico como el estadiaje tumoral y, por lo tanto, aporta una valiosa información pronóstica para el paciente. Consiste en realizar una resección del tejido neoformado.

4. CARCINOGENÉISIS EN EL CARCINOMA DEL TRACTO URINARIO

Se han descrito múltiples causas que inducen la carcinogénesis del tracto urinario, las cuales llevan a mutaciones en genes esenciales para el mantenimiento de la fidelidad genética y control del ciclo celular (Daneshmand, 2017). La mayor causa de mutaciones de estos genes está relacionada con el estilo de vida, condiciones alimentarias y

exposición a tóxicos (principalmente el tabaco), que influyen en la proliferación de algunos tipos de cánceres (Daneshmand S, 2017; Steven C Campbell et al., 2018). También se han encontrado involucrados factores genéticos primarios entre los que destacan la vía de inestabilidad cromosómica y la vía de inestabilidad de microsatélites (Morales et al., 2006).

El sustrato genético de la inestabilidad de microsatélites, se debe a un defecto en los genes del sistema de reparación del ADN, conocidos como Mismatch repair (MMR), que se asocian a inestabilidad de microsatélites (Morales et al., 2006). La inestabilidad de microsatélites es determinada por un fallo en los mecanismos de reparación de errores de la duplicación del DNA y, por lo tanto, una acumulación acelerada e indiscriminada de mutaciones en los nucleótidos mediante inserciones o deleciones (Roa S et al., 2003; Joost P et al., 2015).

Los microsatélites son secuencias altamente repetitivas de nucleótidos (que van de dos a seis bases de nucleótidos) que se repiten de forma consecutiva, en tándem y existen en el ADN en condiciones normales. Dichas secuencias se encuentran en regiones no codificantes del ADN (Morales et al., 2006). Durante la replicación del ADN, se pueden producir una serie de mutaciones que habitualmente son reparadas por los genes MMR (Jover and Payá, 2003; Roa S et al., 2003).

Los genes MMR, codifican las proteínas MMR. Las proteínas MMR proporcionan a las células un alto nivel de protección frente a las mutaciones en la replicación de ADN. Está compuesto por una familia de proteínas, codificadas por los genes hMSH2, hMSH3,

hMSH6, hMLH1, hPMS1 y hPMS2 (García-Tello et al., 2014; Joost P et al., 2015). Entre ellas, forman complejos heterodímeros. Los más abundantes y primeros en actuar son el hMutS α , que está formado por hMSH2-hMSH6 y el hMutL α , formado por hMLH1-hPMS2 (Jover and Payá, 2003; Mechoso et al., 2016).

Durante la replicación, el ADN es muy propenso a desalinearse o aparearse incorrectamente, por causa de un fenómeno conocido como deslizamiento de las hebras (slippage) (Roa S et al., 2003). Como resultado de este deslizamiento, se producen deleciones o inserciones en las secuencias de microsatélites, que son muy eficazmente corregidas por el mecanismo de reparación de errores por deslizamiento mediante las proteínas codificadas por el conjunto de genes MMR. De esta forma, las proteínas MMR identifiquen el error del DNA y lo repara (Joost P et al., 2015; Mechoso et al., 2016).

Si se inactivan por cualquier mecanismo (deleción, mutación o metilación) (Jover and Payá, 2003; Rouprêt et al., 2008) en ambas copias de alguno de estos genes MMR, no se podrían reparar los errores durante la replicación, lo que permitiría la aparición de un fenómeno mutador y, por lo tanto, la acumulación de mutaciones, lo que dará lugar a un fenómeno llamado inestabilidad de microsatélites (Rouprêt et al., 2008).

Se ha estudiado (Esparza et al., 2002) que la heredabilidad de uno o varios de estos genes mutados en uno de los alelos conlleva una predisposición genética a padecer diferentes patologías asociadas a la mutación de los genes MMR. Eso significa que, si el alelo correspondiente al ya mutado y heredado sufre también algún tipo de afectación molecular, determinará que la proteína codificada por dicho gen no sea normal. Si esta

proteína mutada participa en la corrección de errores de replicación de DNA en el momento de la replicación, esta se llevará a cabo con errores.

Existen una serie de síndrome asociados a la mutación de los genes MMR. Dichos síndromes están asociadas a mutaciones germinales en los genes de reparación de bases desapareadas del DNA en el conjunto de genes Mismatch repair (MMR) (Harper et al., 2017; Pradere et al., 2017)

- ✓ **Síndrome de Lynch:** Es el síndrome que con más frecuencia se asocia a pacientes con mutaciones de los genes MMR, presenta una herencia autosómica dominante. Los pacientes con este síndrome poseen una mutación hereditaria en la línea germinal de uno o varios genes MMR. Alrededor del 78% de estos individuos desarrollaran cáncer a una edad media relativamente temprana, aproximadamente antes de los 42 años.
- ✓ **Síndrome de Muir-Torre:** Es un síndrome que presenta una herencia autosómica dominante con alto grado de penetrancia y una expresibilidad variable. Los pacientes que padecen este síndrome tienen una mayor probabilidad de padecer tumores de glándulas sebáceas de la piel y tumores viscerales, actualmente se asocian a carcinoma colorrectal no asociado a poliposis. Se han identificado mutaciones en la línea germinal de los genes hMSH2 y hMLH1.
- ✓ **Síndrome de Turcot:** Síndrome hereditario que cursa con el desarrollo de neoplasia malignas en el sistema nervioso central y carcinomas colorrectales asociados a poliposis. En cuanto al patrón de herencia, se han identificado dos variantes: la

primera se debe a una mutación germinal en los genes MMR, presentando una herencia autosómica recesiva y la segunda se debe una serie de mutaciones en el gen APC que presenta una herencia autosómica dominante.

5. SÍNDROME DE LYNCH

El síndrome de Lynch es un síndrome que presenta una herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta, multitumoral, que se asocia a familias con un aumento de riesgo a padecer cierto tipo de cánceres (carcinoma colorrectal, urinario, endometrial, ovarios, estómago, intestino delgado, cerebro y las glándulas sebáceas cutáneas) a edades más tempranas que el resto de la población general (Sjödahl et al., 2013; Peltomäki, 2014). Estos pacientes presentan un aumento de riesgo de padecer carcinoma urotelial del 2,9% de la población normal al 28% (Moch et al., 2016).

La carcinogénesis en estos pacientes se debe a una acumulación de mutaciones en marco de lectura somático (células diploides) en las regiones donde se sitúan los genes que poseen la función de controlar el crecimiento y la apoptosis (Roa S et al., 2003; Morales et al., 2006; Joost P et al., 2015; Moch et al., 2016).

Múltiples estudios de genética molecular han observado que, entre un 1,8 y un 28% del total de carcinomas uroteliales se pueden identificar mutaciones en los genes MMR (Morales et al., 2006; Joost P et al., 2015; Moch et al., 2016; Harper et al., 2017; Pradere et al., 2017; Ju et al., 2018; Metcalfe et al., 2018; Urakami et al., 2018).

5.1. Historia del síndrome de Lynch

En 1895, una mujer que trabajaba de costurera informó angustiada de que varios miembros de su familia, durante varias generaciones, habían muerto por padecer cáncer y ella temía que pudiera padecer dicha enfermedad. Aldred Scott Warthin, MD, PhD, presidente del Departamento de Patología de la Universidad de Michigan en Ann Arbor (Warthin, 1913), realizó un estudio estadístico completo a los 10 miembros de su familia; 2 tenían cánceres uterinos, 2 tenían cánceres de estómago y uno tenía un "cáncer abdominal".

Los descendientes de los 5 familiares estudiados que padecían cáncer, también padecieron múltiples cánceres. Al analizar a los familiares que no padecían cáncer se vio que ninguno de sus hijos había desarrollado esta enfermedad. Warthin concluyó que podría haber, al menos en este caso, una predisposición familiar al cáncer. La familia era de origen germano y había emigrado a América antes de la guerra civil americana; Warthin los llamó "Familia G" (Figuras 9 y 10) (Boland and Lynch, 2013). Finalmente, la costurera, padeció cáncer de endometrio y murió de esta enfermedad tal y como predijo.



Figura 9. Fotografía del fundador inmigrante de la “Familia G”. Tuvo 10 hijos, 6 de los cuales desarrollaron cáncer. Murió en 1856 a los 60 años, de cáncer. En la tercera generación, había 70 descendientes, 33 de los cuales habían desarrollado cáncer (Warthin, 1913).

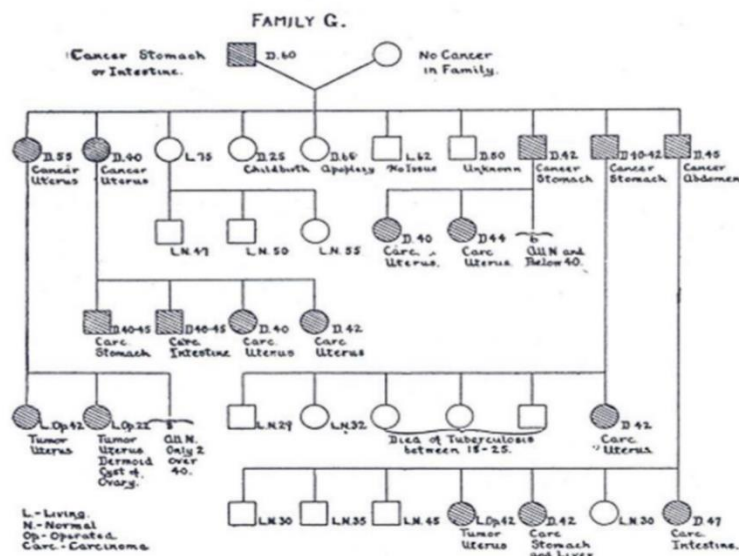


Figura 10. Árbol genealógico de la “Familia G” utilizado por Warthin, en su artículo seminal en Arch Int Med, 1913 (Warthin, 1913).

Posteriormente, se realizaron estudios esporádicos de esta enfermedad, de la Clínica Mayo de 1941 (Bargen, et al., 1941), Inglaterra en 1956 (Savage, 1956), así como diversas localizaciones en la década de 1960 (KLUGE, 1964; AURE and NILSSON, 1965; Glidzic and Petrovic, 1968).

Henry T. Lynch, MD, informó de la existencia de varias familias con patrones similares en 1966-1967 (Lynch et al., 1966; Lynch and Krush, 1967; Lynch et al., 1967).

Más tarde, en 1971, se publicó un manuscrito "Cancer Family 'G' Revisited" (Lynch and Krush, 1971) tras estudiar a más de 650 sujetos de la familia G de los cuales 95 padecieron o padecen cáncer de inicio temprano. Reconoció la naturaleza autosómica dominante de la herencia y lo llamó "Síndrome de cáncer familiar".

5.2. Tumores uroteliales con mutación de los genes MMR

Los carcinomas uroteliales que presentan los pacientes con mutación de los genes MMR, en la mayoría de casos, cumplen una serie de características en común tanto a nivel de presentación clínica como a nivel de estudio histológico. Y, por supuesto, a nivel genético.

Los carcinomas uroteliales en pacientes con mutación de los genes MMR se presentan preferentemente en la vejiga, seguido de uréteres y por último pelvis renal (Joost P et al., 2015; Sjö Dahl, 2018). Aunque otros autores (Harper et al., 2017) identifican en su estudio que la localización más frecuente son los uréteres seguidos de la vejiga.

Los pacientes con mutación de los genes MMR presentaron tumores entre los 36 y los 90 años (Joost P et al., 2015; Harper et al., 2017; Metcalfe et al., 2018; Sjö Dahl, 2018). Al valorar el género vemos que, en la gran mayoría de estudios, la mayor parte de pacientes con mutación de los genes MMR son varones (Joost P et al., 2015; Ju et al., 2018).

Al evaluar los patrones histológicos, el patrón papilar es el predominante, siendo en la mayoría de los casos, de alto grado tumoral, sin presencia de un marcado pleomorfismo nuclear (Joost P et al., 2015; Harper et al., 2017). Se presentan mayoritariamente como tumores que no infiltran la muscular propia, aunque se pueden encontrar en cualquier estadiaje tumoral. Se evidencia la presencia de linfocitosis intratumoral observándose más de 20 linfocitos por 10 CGA (campo de gran aumento) (Catto et al., 2003; Skeldon et al., 2013; Harper et al., 2017; Ju et al., 2018).

En el estudio publicado por Urakami et al. (Urakami et al., 2018) hay cierta discordancia en relación a algunos de los datos observados en los estudios anteriormente citados, puesto que, según este autor, dichos tumores son más frecuentes en mujeres, presentando un patrón de bajo grado citológico, aunque tal y como dicen el resto de autores, los tumores en la mayoría de casos no infiltran la muscular propia. En el estudio de Urakami et al. (Urakami et al., 2018), ninguno de los pacientes presentó un tumor con patrón arquitectural de tipo sólido, ni linfocitosis intratumoral.

Las mutaciones en los genes MMR que más frecuentemente se producen en estos pacientes, ocurren principalmente en los genes MLH1 o MSH2 y con menor frecuencia en los genes PMS2 y MSH6 (Skeldon et al., 2013; Ju et al., 2018; Urakami et al., 2018).

Por esta razón, al valorar las características histológicas de estos tumores, nos damos cuenta del escaso número de estudios existentes y la discrepancia de datos que existe en este momento por lo que se considera conveniente realizar un estudio más exhaustivo sobre este tema.

5.3. Identificación precoz y diagnóstico de pacientes con mutación de los genes MMR

Es importante la identificación precoz y diagnóstico de pacientes con mutación de los genes MMR, con el objetivo de disminuir la morbilidad y la mortalidad. Para ello se han elaborado diferentes métodos de cribado.

Podemos encontrar tres niveles de evaluación para ayudarnos a diagnosticar a los pacientes con mutación de los genes MMR, evaluando los datos clínicos del paciente, realizando técnicas inmunohistoquímicas para el estudio de las proteínas MMR, PCR (reacción en cadena de la polimerasa) o realizando un estudio genético:

Criterios clínicos: en 1991 se crearon los criterios de Ámsterdam (Vasen et al., 1991), mediante los cuales, utilizando los datos personales y una breve historia de antecedentes familiares, se podía determinar qué individuos presentaban un mayor

riesgo de experimentar un cáncer de colon por inestabilidad de microsatélites y, por lo tanto, recomendándose realizar un estudio de ellos. Los criterios de Ámsterdam solo son válidos para el carcinoma colorrectal, por lo que en 1999 se propusieron los criterios de Ámsterdam II (Vasen et al., 1999) (Tabla 1) que son más sensibles e incorporan carcinomas de intestino delgado, carcinomas endometriales y carcinomas de tracto urotelial. Este tipo de screening resulta muy simple de realizar, fácilmente aplicable y no invasivo. Presenta una baja sensibilidad y por lo tanto resulta insuficiente, observándose que casi uno de cada tres pacientes permanece sin diagnosticar. En contraposición, solo del 50 al 60 % de los pacientes que cumplan los criterios de Ámsterdam presentaban dicha mutación (Chintalacheruvu et al., 2017).

A su vez en 1997 se realizaron las Pautas de Bethesda, revisadas en 2002 (Umar et al., 2004), y son de gran ayuda para el diagnóstico precoz de estos pacientes. Estas pautas presentan una pobre especificidad, pero una alta sensibilidad (Tabla 1).

Existen otros criterios propuestos por la Sociedad Japonesa de Investigación para el Cáncer de Colon y Recto (Fujita et al., 1996; Bermejo, et al., 2004), aunque en España estos criterios no se usan en la práctica clínica.

Criterios de Ámsterdam II (todos los criterios deben estar presentes)	Criterios de Bethesda (se debe de cumplir al menos un criterio)
Al menos tres miembros de la familia con cánceres del espectro estrecho HNPCC	Cáncer colorrectal antes de los 50 años.
Al menos uno de estos tres debe ser un pariente de primer grado	Segundo cáncer colorrectal sincrónico o un cáncer colorrectal metacrónico (independientemente de la edad)
Participación de al menos dos generaciones.	Segundo cáncer del amplio espectro de HNPCC (independientemente de la edad)
Al menos un cáncer antes de los 50 años.	Hallazgos patológicos que muestran inestabilidad de microsatélites a la edad <60
Sin antecedentes de adenomatosis colónica familiar	Cáncer colorrectal con al menos un familiar de primer grado que presenta un cáncer del amplio espectro de HNPCC antes de los 50 años
	Cáncer colorrectal con al menos dos familiares de primer grado que presentan un cáncer del amplio espectro de HNPCC (independientemente de la edad)

Tabla 1. Criterios de Ámsterdam II: (buena especificidad, pero poca sensibilidad) y Criterios de Bethesda (pobre especificidad, pero buena sensibilidad) (Tecklenburg J et al., 2019).

Estudio del tejido tumoral: Son las primeras pruebas que se realizarán. En caso de que exista tejido y este sea viable, se puede realizar técnicas de inmunohistoquímica o PCR. Mediante las técnicas de inmunohistoquímica, se estudia la presencia de mutación en las proteínas producidas por los genes MMR (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2) y mediante la técnica de PCR se evalúa los cambios en la longitud de los genes MMR. En el caso de pérdida de la expresión de la proteína o alteración en la longitud de los genes MMR se recomienda realizar un estudio genético.

Molina Burgos et al. proponen en su artículo realizar un estudio de inestabilidad de microsatélites en células exfoliadas del sedimento urinario. Un estudio inmunohistoquímico de las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 proporciona un diagnóstico precoz y no invasivo (Molina Burgos et al.,2003). El estudio IHQ de las proteínas MMR en las células exfoliadas del sedimento urinario ofrece una sensibilidad de hasta un 93% (Kohlmann and Gruber, 2004).

Estudio genético: Para dicho estudio se realiza un examen molecular, con el fin de buscar mutaciones en los genes, utilizando para ello células no cancerosas. El diagnóstico del Síndrome de Lynch se confirma mediante el estudio genético de la línea germinal. En muchos casos, el estudio inmunohistoquímico es de utilidad para indicar qué genes hay que estudiar.

Todos los pacientes que cumplan los criterios de Ámsterdam o Bethesda y de los que exista tumor disponible, se realizará en el departamento de Anatomía Patológica, un estudio inmunohistoquímico de las proteínas codificadas por los genes MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2. De esta forma se podrá identificar si dichas las proteínas presentan falta de expresión nuclear (Navarro et al., 2012).

Actualmente, los estudios genéticos de mutaciones en la línea germinal son laboriosos y costosos y debido, a que los recursos son limitados, resulta importante realizar una selección de los pacientes que vamos a estudiar.

5.4. Vigilancia a los pacientes con mutación de las proteínas MMR

Debido a la alta probabilidad que presentan los pacientes con mutaciones de los genes MMR a padecer diversos cánceres, así como una alta tasa de recurrencia, se recomienda iniciar el cribado de forma más precoz que en la población general y un estricto seguimiento (Pradere et al., 2017). Dichas recomendaciones están indicadas para pacientes con mutación de los genes MMR y pacientes con alto riesgo de padecer mutación de los genes MMR.

- ✓ **Recomendaciones para prevenir el carcinoma colorrectal o realizar un diagnóstico precoz** (Pradere et al., 2017; Tecklenburg J et al., 2019); se recomienda una colonoscopia anual o bianual comenzando entre los 20-25 años o 2-5 años antes de la edad más temprana de diagnóstico de carcinoma colorrectal en la familia si, hubiera un diagnóstico antes de los 25 años.
- ✓ **Recomendaciones para prevenir el cáncer de endometrio y ovario o realizar un diagnóstico precoz**; se recomienda un examen pélvico, una biopsia endometrial y una ecografía transvaginal anual a partir de los 30-35 años. La histerectomía y la salpingoforectomía bilateral deben recomendarse a las mujeres con mutación de los genes MMR que hayan satisfecho su deseo gestacional o a la edad de 40 años (Giardiello et al., 2014).
- ✓ **Recomendaciones para prevenir los cánceres del tracto urinario o realizar un diagnóstico precoz**; se recomienda realizar anualmente un análisis urinario y una

citología combinada con imágenes (ecografía o cistoscopia) (Myrhøj et al., 2008) a partir de los 30-35 años (Tiwari et al., 2016).

- ✓ **Recomendaciones para prevenir el cáncer gástrico o realizar un diagnóstico precoz;** se recomienda una esofagogastroduodenoscopia (EGD) con una biopsia gástrica del antro a los 30-35 años con tratamiento para la infección por *Helicobacter pylori* cuando se encuentre. Posteriormente, la vigilancia cada 2-3 años en función de los factores de riesgo individuales del paciente (Giardiello et al., 2014; Tecklenburg J et al., 2019).
- ✓ **Recomendaciones para prevenir los tumores sebáceos o realizar un diagnóstico precoz;** no existen claras recomendaciones, aunque los pacientes con mutación de los genes MMR y sus familiares deben recibir exámenes dermatológicos regulares (South et al., 2008).
- ✓ **Para prevenir el resto de cánceres** (no relacionados con mutación de los genes MMR), no se recomienda una vigilancia de rutina más allá de las recomendadas para la población general.

5.5. Tratamiento

En la actualidad, el tratamiento individualizado está cada día más presente en la práctica clínica con el fin de ofrecer la mejor alternativa terapéutica según el tipo de mutación que presenta el tumor. Existen estudios y varias líneas de investigación centradas en pacientes con mutación de los genes MMR. Dichos estudios proponen:

- ✓ El uso de derivados del cisplatino para el tratamiento quimioterápico en los pacientes con mutación de los genes MMR. Hollande et al. (C. et al., 2014) encontró un beneficio de la quimioterapia adyuvante de cisplatino para pacientes con carcinoma urotelial de alto riesgo localmente avanzado combinado con síndrome de Lynch en comparación con pacientes con tumores esporádicos.
- ✓ Tratamientos mediante el uso de anticuerpos contra CTLA4 y PD-1 o sus ligandos asociados. Está dando buena respuesta clínica a pacientes con mutación de los genes MMR (Overman et al., 2017).

Los puntos de control inmunitarios de muerte programada 1 (PD-1) y las vías de la proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos (CTLA4) son sistemas de retroalimentación negativa que reprimen las respuestas inmunitarias citotóxicas de las células T.

Estos tumores presentan altas tasas de mutaciones debido a la producción de proteínas inmunogénicas mutantes, asociadas con un infiltrado linfocítico (Overman et al., 2018). La inmunogenicidad podría deberse a la generación de una gran cantidad de neoantígenos como resultado de la deficiencia en los genes MMR (más de 20 veces superior que en tumores sin deficiencia en los genes MMR), lo que desencadena una respuesta inmune significativa (Järvinen et al., 2000).

- ✓ En el caso de mujeres con mutación de los genes MMR y carcinoma de endometrio, se han visto posibles beneficios preventivos en el uso de hormonas exógenas. En el estudio (Dashti et al., 2015) se vio una asociación ente el uso de anticonceptivos

hormonales durante 1 año o más con la reducción significativa de carcinoma de endometrio en mujeres con mutación de los genes MMR.

- ✓ El uso de 600 mg/día de aspirina junto con 30 g día de almidón (Burn et al., 2008) demostraron que a largo plazo disminuye de manera marcada la incidencia de carcinoma colorrectal y de cualquier cáncer asociado a la mutación de los genes MMR. En la actualidad la dosis ideal y la duración del tratamiento aún no están definidas (Burn et al., 2011). Existe un estudio en curso, CaPP3 Spain (Navarrabiomed) (Burn et al., 2013; MacRae, 2019) en el cual se están administrando diferentes dosis de aspirina (100 mg/día, 300 mg/día o 600 mg/día) en un ensayo prospectivo, aleatorizado de pacientes con mutación de los genes MMR.

En la actualidad, se están valorando los beneficios, para la prevención del cáncer, del ibuprofeno, suplementos de calcio y el uso de multivitaminas en personas con mutación de los genes MMR, aunque tales intervenciones no deben considerarse estandarizadas puesto que aún se necesitan ensayos clínicos (Ait Ouakrim et al., 2015; Chau et al., 2016).

5.6. Consejo genético

Es recomendable realizar una consulta con el Servicio de Genética del Hospital con el fin de realizar una valoración de riesgo de los tumores asociados con el IMS así como riesgos familiares (Valenzuela et al., 2002). Se ha visto que solo una pequeña parte de los pacientes derivados a consejo genético, acuden a la consulta. Se cree que es debido a

que los pacientes infravaloran los riesgos o debido a la ansiedad que produce conocer la realidad (Babjuk et al., 2011).

6. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CARCINOMA UROTELIAL

El carcinoma urotelial es un subtipo de cáncer muy heterogéneo tanto a nivel clínico-patológico como molecular. Debido a esta heterogeneidad, se ha estudiado la expresión del genoma y se han realizado estudios de perfil molecular, con el fin de establecer subgrupos intrínsecos que estén asociados a características moleculares específicas, pronósticas y de esta forma poder ofrecer mejores terapias y tratamientos.

En los últimos años el estudio molecular está en auge y, por ello está en constante avance, gracias a las mejoras técnicas y la implicación de los científicos (Bernardo et al., 2019).

Inicialmente se definieron 3 subtipos moleculares (Sjödahl et al., 2012): tipo urotelial, tipo genéticamente inestable y tipo carcinoma de células escamosas. Las investigaciones fueron avanzando (Choi et al., 2014; Damrauer et al., 2014; Weinstein et al., 2014) y la caracterización molecular integral, permitió una categorización en subtipos que estaban asociados a características clínicopatológicas. Y en 2015 se estableció un consenso en el que se definió un subgrupo basal-escamosos (Lerner et al., 2016). En 2017, Robertson et al. publicaron un estudio (Robertson et al., 2017) en el cual actualizan la clasificación de la TCGA basándose en los nuevos estudios moleculares y proponen la subdivisión en los grupos: luminal, luminal papilar, luminal infiltrante, neural y basal-escamosos.

Al valorar todos los subtipos y diversas clasificaciones, vemos que no existen grandes discrepancias en lo referente al grupo neural o neuroendocrino y el basal-escamoso. Sin embargo, al valorar el grupo luminal vemos que no existe un consenso. Para la realización de nuestra investigación utilizaremos la clasificación propuesta por Robertson et al. (Robertson et al., 2017) puesto que consideramos aporta más información para un correcto tratamiento individualizado de los grupos.

La clasificación de la TCGA consiste en un agrupamiento imparcial en 5 grupos valorando los datos del ARN secuencial (Figura 11) (Robertson et al., 2017; Inamura and Kentaro, 2018).

✓ **Subtipo luminal (60%):** este subgrupo mostraba una expresión para la uroplakina y marcadores de diferenciación urotelial, aunque existen diferencias en la pureza que sugieren la subcategorización en tres subgrupos:

- **El subtipo luminal-papilar (35%)** se caracteriza por una morfología papilar. Con altas tasas de supervivencia global. Presenta baja carga de mutaciones, bajos niveles de hipermetilación. Estos tumores expresan altos niveles de ERBB2 (HER2).
- **El subtipo luminal infiltrado (19%)** tiene la pureza tumoral más baja y está asociado a mayores tasas de quimio-resistencia. Se caracteriza por la presencia de infiltrados linfocitarios. Estos tumores expresan altamente los marcadores EMT (TWIST1) y moderadamente expresan marcadores inmunes.

- El **subtipo luminal (6%)** expresa altos niveles de uroplaquinas (UPK1A y UPK2) y muestra un fenotipo de célula paraguas. Esto sugiere que dichos tumores derivan de células intermedias.
- ✓ **Subtipo basal-escamoso (35%)**: corresponde al subtipo basal previamente definido, que se asocia con la diferenciación de células escamosas y la expresión de queratina basal. Este subtipo se encuentra predominantemente en mujeres y expresa altos niveles de marcadores basales (CK 5/6). Este subtipo frecuentemente tiene una puntuación CIS alta, pérdida de señalización SHH y presencia de mutaciones TP53.
- ✓ **Subtipo neuronal (5%)**. En la mayoría de los casos, no presenta morfología neuroendocrina. Este subtipo expresa altos niveles de genes neuroendocrinos y neuronales (SOX2). Posee una alta tasa de proliferación. Se considera el subgrupo con peores resultados clínicos.

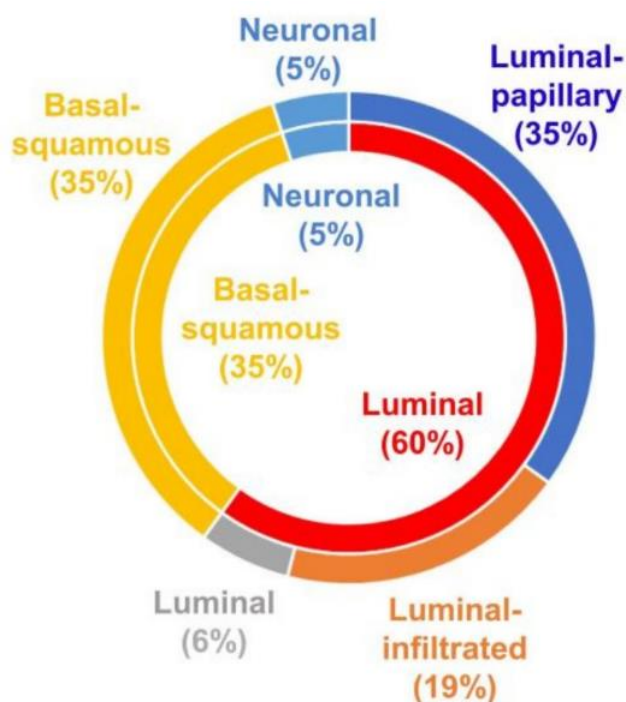


Figura 11. Los subtipos basados en mRNA de cáncer de vejiga músculo-invasivo por TCGA (The Cancer Genome Atlas) (Inamura and Kentaro, 2018).

6.1. Tratamiento del carcinoma urotelial según la clasificación molecular de la TCGA

En la actualidad, el tratamiento con cisplatino es el tratamiento de primera elección para los carcinomas uroteliales avanzados o metastásicos. Con estos nuevos estudios se está evidenciado la heterogeneidad molecular de los carcinomas uroteliales y con ello se ha comprobado que resulta esencial poseer diversas respuestas terapéuticas (Figura 12) (Shah et al., 2011; Robertson et al., 2017; Inamura and Kentaro, 2018; Sjödaahl, 2018).

- ✓ El **subtipo papilar luminal** presenta escasa respuesta NAC (Quimioterapia neoadyuvante estándar). Por lo que se recomienda el tratamiento con inhibidores de FGFR o cisplatino sin NAC.

- ✓ **El subtipo luminal infiltrativo** resulta muy sensible al tratamiento con atezolizumab, por lo tanto, se aconseja el tratamiento con inhibidores inmunológicos.
- ✓ **El subtipo luminal**, en la actualidad no existe ninguna recomendación respecto al tratamiento.
- ✓ **Basal escamoso** presenta una buena respuesta al tratamiento con NAC.
- ✓ **Neural** los estudios sugieren un tratamiento con etopósido más cisplatino.

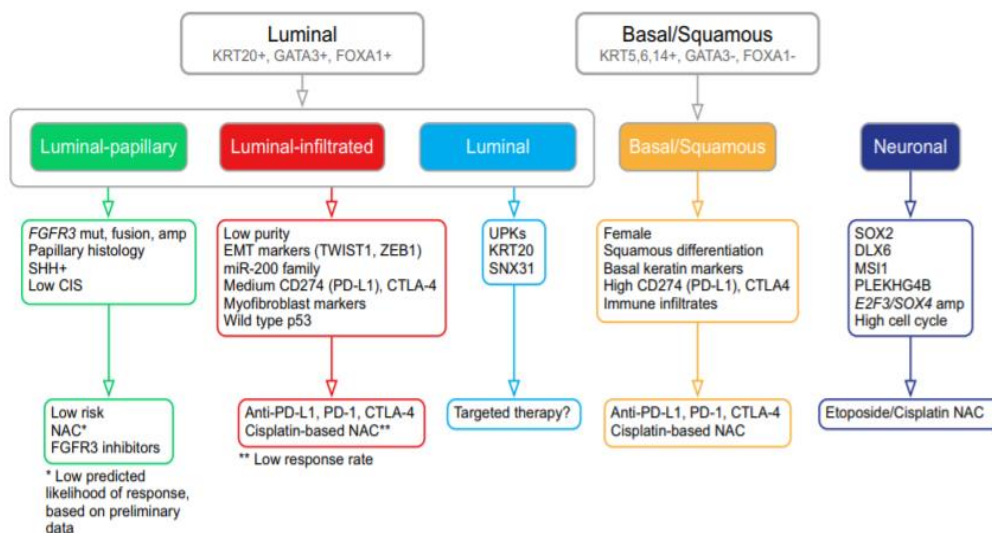


Figura 12. Esquema de propuesta terapéutica según la nueva clasificación de la TCGA para el manejo de los pacientes. (Inamura and Kentaro, 2018)

6.2. Relación entre la clasificación molecular y la presencia de tumores con mutaciones en las proteínas MMR

En el estudio de Therkildsen Eriksson et al. (Eriksson et al., 2018) se identifica una relación entre las alteraciones moleculares basándose en la clasificación de la TCGA y pacientes con mutación de los genes MMR. En su estudio, se incluyeron 41 pacientes con mutación de los genes MMR y presencia de carcinoma urotelial, 34 de los cuales

presentaban mutaciones moleculares propias del grupo luminal y 6 del grupo basal-escamoso.

En la actualidad, existen escasos estudios que evalúen la relación entre la clasificación molecular de la TCGA y la presencia de carcinomas uroteliales con presencia de mutaciones en las proteínas MMR. Debido a la falta de estudios, se considera esencial abordar este tema con el fin de poder ofrecer un tratamiento individualizado a los pacientes.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

En la actualidad, para realizar el estudio de las proteínas MMR, se debe obtener y estudiar, al menos un corte de hematoxilina eosina y 4 cortes histológicos teñidos con las tinciones inmunohistoquímicas (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2).

Si se pudiera realizar un sistema de cribado basándonos en los cortes teñidos con hematoxilina-eosina, únicamente se tendrían que realizar técnicas IHQ a aquellos pacientes con alta sospecha de mutación de las proteínas MMR. De esta manera, no sería necesario la realización de pruebas IHQ complementarias a los pacientes con baja sospecha de mutación de las proteínas MMR.

La realización de un sistema de cribado supondría un ahorro económico y un ahorro en el tiempo de trabajo empleado, tanto del patólogo como del equipo de técnicos de Anatomía Patológica. Actualmente, para realizar un cribado de mutación de las proteínas MMR, es necesario un tiempo mínimo de cuatro o cinco días y, posteriormente, un estudio detallado de todos los cortes histológicos que como mínimo ascenderían a 5 preparaciones. Este estudio supone un gasto material de 105,56 euros por caso, teniendo en cuenta que el precio de hematoxilina-eosina es de 3,72 euros y el precio de una tinción mediante inmunohistoquímica asciende a 25,46 euros por cristal y tinción. Al que hay que añadir el gasto de personal. Precios oficiales del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) en el año 2020.

Por lo tanto, un sistema de cribado de las proteínas MMR en los tumores uroteliales, supondría obtener un diagnóstico en un menor tiempo y con un menor coste económico.

El objetivo principal de este estudio es identificar pacientes con carcinomas uroteliales que presenten pérdida de la expresión de una o varias proteínas MMR. Se propone utilizar las características histológicas del tumor y los datos clínicos del paciente como guía para clasificar a los pacientes en “alto” o “bajo riesgo de presentar pérdida de expresión de la proteína MMR” como primera aproximación, para acotar el número de pacientes que se someten a pruebas adicionales. En este sentido, solo los pacientes clasificados como “alto riesgo de presentar pérdida de expresión de la proteína MMR” continuarían con el estudio inmunohistoquímico de las proteínas MMR. Este sistema permitiría a todos los pacientes recibir un correcto cribado con un único corte histológico teñido con Hematoxilina - eosina (H&E).

Al realizar una correlación clínico-histológica con técnicas de rutina de un laboratorio de Anatomía Patológica, se podría clasificar a estos pacientes de una forma más práctica y eficiente con el fin de intentar disminuir la morbimortalidad de los mismos, ofreciendo un tratamiento más adecuado en cada situación.

Además, a través del estudio en el cáncer del carcinoma urotelial, se otorgará al servicio de Anatomía Patológica una mayor eficiencia en el diagnóstico de estos pacientes. Se evaluará si presenta alto o bajo riesgo de presentar mutación en una o varias proteínas

MMR a nivel tumoral, sin necesidad de aumentar el volumen ni carga laboral, ofreciendo un estudio más detallado del paciente ofreciendo un informe más integral.

Objetivos específicos:

1. Realizar un sistema de cribado que permita clasificar a los pacientes en “alto” o “bajo riesgo de presentar pérdida de expresión de la proteína MMR”, mediante el estudio de una serie de características histológicas del tumor y los datos clínicos del paciente, mediante el uso de técnicas de rutina de un laboratorio de Anatomía Patológica (H&E).
2. Identificar, si existe, una relación entre la clasificación molecular de la TCGA y las características histológicas de los tumores uroteliales y los datos clínicos de los pacientes. La clasificación tumoral mediante el estudio de los datos clínicos e histológicos de los tumores supondría una forma rápida y eficaz de cribado y posteriormente podría permitir ofrecer a los pacientes, un tratamiento personalizado basándonos en la clasificación molecular.
3. Identificar, si existe, una relación entre los pacientes que se han clasificado como alto riesgo de presentar pérdida de expresión de la proteína MMR y la clasificación molecular de la TCGA basándonos en el estudio de Robertson et al. en el que clasifican los tumores uroteliales en: basal, luminal papilar, luminal, luminal infiltrativo y neuronal.

En el caso de que se pudiese identificar una relación, supondría una gran ventaja en el momento de ofrecer al paciente un tratamiento individualizado, puesto que no

todos los carcinomas uroteliales tienen la misma respuesta a los tratamientos, supervivencia ni morbilidad y, por lo tanto, nos podríamos anticipar al comportamiento biológico y ofrecer un tratamiento más específico con mejores resultados.

4. Determinar si la pérdida de expresión de las proteínas MMR está relacionada con la supervivencia de los pacientes a 5 años. A su vez, se evaluará si estos pacientes identificados como pacientes con alto riesgo de presentar pérdida de expresión de las proteínas MMR, presentan una supervivencia mayor o menor respecto al resto de pacientes diagnosticados de carcinoma urotelial.
5. Evaluar si, los datos obtenidos tras el estudio de las características histológicas del tumor y los datos clínicos del paciente en la población de Móstoles (Comunidad de Madrid) se pueden extrapolar a los obtenidos tanto en España como en otras regiones industrializadas a nivel global.
6. Una vez se dispongan de los datos obtenidos y analizados, se contactará con el Servicio de Oncología con el fin de darles a conocer sus nombres y número de historia clínica los pacientes que presenten altas probabilidades de presentar pérdida de expresión de las proteínas MMR y se realizará una reunión multidisciplinar con el fin de evaluar la realización de pruebas complementarias y si fuera preciso incluirlos en los protocolos de screening.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Se realiza un estudio mediante la revisión de casos de carcinoma urotelial del tracto genitourinario. Se han estudiado 200 casos obtenidos mediante resección transuretral y codificados como “Carcinoma urotelial” código M81203, diagnosticados por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Móstoles desde enero de 2013 hasta junio de 2014.

De los 200 casos estudiados, se han seleccionado 139, valorando que se cumplieran los criterios de inclusión establecidos: cualquier sección tumoral codificada como “Carcinoma urotelial” código M81203, aceptando cualquier localización, estadio y con disponibilidad de material. De la misma forma se han excluido 61 casos teniendo en cuenta los criterios de exclusión; sección tumoral codificado como “Carcinoma urotelial” cuyas muestras midan menos de 0,3 cm de tamaño máximo, puesto que se consideró adecuado que en ningún caso se pudiera agotar el tejido tumoral almacenado, pensando que pueda serle de utilidad en un futuro a los pacientes. De la misma manera, también se van a excluir aquellos tumores con grandes áreas de necrosis (tumor necrótico).

Todas las muestras han sido estudiadas de forma individual, se valoró una serie de parámetros clínicos de los pacientes e histológicos y IHQ de los tumores y, mediante un estudio estadístico, se determinó si dichos parámetros sirven para identificar si existen alteraciones en las proteínas codificadas por los genes MMR de reparación del ADN.

Todas las muestras utilizadas para la elaboración de esta investigación han sido estudiadas por el doctorando (E. Sobrino-Reig) tanto los cortes por hematoxilina-eosina como las técnicas IHQ utilizadas. Se confirma el diagnóstico histológico mediante un

doble ciego por un patólogo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Móstoles (Madrid, España).

Todos los datos utilizados y obtenidos han sido codificados y tratados de forma anónima durante el estudio.

El estudio cuenta con la aprobación del comité de investigación del Hospital Universitario de Móstoles (Anexo II).

Todos los gastos generados en el procedimiento de realización de esta investigación han sido cubiertos por el doctorando.

2. INFORMACIÓN RECOGIDA

Se recogió información clínica de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio.

Todos los datos se codificaron, otorgándole un número a cada uno de los pacientes incluidos en el estudio con el fin de garantizar el anonimato de todos ellos.

2.1. Información clínica

Una vez seleccionados los pacientes que forman parte del estudio, se ha valorado una serie de datos clínicos claves para la investigación:

- ✓ **Género** de paciente: se clasificó en dos grupos, masculino y femenino.

- ✓ **Edad** del paciente en el momento del diagnóstico: se clasificaron en 5 grupos:
 - Grupo 1: 0-49 años.
 - Grupo 2: 50-59 años.
 - Grupo 3: 60-69 años.
 - Grupo 4: 70-79 años
 - Grupo 5: 80-99 años

- ✓ **Recaída** a 5 años: se evaluó si el paciente ha sufrido una recaída de su tumor durante los 5 primeros años después de su diagnóstico. Se valoró el tiempo libre sin tumor y el grado tumoral que presenta en el momento de la recaída.

- ✓ **Supervivencia** a 5 años: se estudió si durante los 5 primeros años después del diagnóstico y tratamiento realizado en cada caso, el paciente ha fallecido y se dejó constancia del año en el que falleció.

- ✓ **Localización** del tumor: clasificándolos en tres grupos según sea la localización inicial del tumor:
 - Grupo 1: tumores localizados en vejiga.
 - Grupo 2: tumores localizados en uretra.
 - Grupo 3: tumores localizados en uréteres.

Se ha asumido que todos los pacientes incluidos en el estudio han recibido el tratamiento adecuado para su tumor y estadio tumoral, según el protocolo establecido, y a su vez, se asumió que todos los pacientes han cumplido todos los controles y se les ha realizado todas las pruebas necesarias, según su tumor y su estadiaje tumoral, que marca el protocolo.

2.2. Características histológicas

Para el estudio histológico, se recogió tejido tumoral de los pacientes incluidos en el estudio. El tejido tumoral está conservado en parafina y almacenado en el archivo del Hospital Universitario de Móstoles. El tejido tumoral fue fijado en formol al 30 %, durante al menos, un total de 24 horas y posteriormente embebido en parafina.

2.3. Procesamiento de la muestra para el estudio histológico

Protocolo para la inclusión en parafina (este proceso se realizará en un procesador automático, LOGOone de Amerine (Figura 13), a una temperatura entre los 62 y 63°C):

1. Incluir los bloques en formol al 30% durante 50 min.
2. Incluir los bloques en alcohol a 70º durante 1 hora, repetir procedimiento 2 veces.
3. Incluir los bloques en alcohol a 97º durante 1 hora, repetir procedimiento 2 veces.
4. Incluir los bloques en alcohol absoluto durante 1 hora, repetir procedimiento 2 veces.
5. Incluir los bloques en xilol durante 1 hora, repetir procedimiento 3 veces.
6. Incluir los bloques en parafina durante 1 hora, repetir procedimiento 3 veces.

Tras la inclusión en parafina de los bloques, se realizaron los bloques usando el dispensador “Tissue-Tek TEC6” del laboratorio SAKURA (Figura 14).

A partir de las muestras de tejido incluidas en parafina se realizó las tinciones de hematoxilina eosina y las técnicas de inmunohistoquímica.



Figura 13. LOGOone del laboratorio Amerine



Figura 14. “Tissue-Tek TEC6” del laboratorio SAKURA Hematoxilina eosina:

La tinción de hematoxilina-eosina se realizó mediante el siguiente protocolo:

1. Realizar secciones de entre 2 y 6 micrómetros.
2. Incubar los cortes histológicos a 70º durante 1 hora.
3. Sumergir la muestra en Xilol (con el objetivo de desparafinar) durante 2 minutos.
Repetir el procedimiento dos veces.
4. Hidratar la muestra con etanol en dos fases.
 - a. Primera fase con etanol absoluto durante 2 minutos.
 - b. Segunda fase con etanol al 95% durante 2 minutos.
5. Lavar la muestra con agua destilada durante 2 minutos.
6. Sumergir la muestra en hematoxilina de Mayer durante 15 minutos.
7. Lavar la muestra con agua destilada durante 2 minutos.
8. Sumergir la muestra en eosina durante 2 minutos.
9. Lavar la muestra con etanol al 70% durante 2 minutos.
10. Deshidratar la muestra siguiendo el siguiente protocolo:
 - a. Sumergir la muestra en etanol al 70º, repetir procedimiento 3 veces.
 - b. Sumergir la muestra en etanol al 97º, repetir procedimiento 3 veces.
 - c. Sumergir la muestra en etanol absoluto, repetir procedimiento 3 veces.
 - d. Sumergir la muestra en xilol, repetir procedimiento 3 veces.

2.4. Estudio histológico

Los cortes histológicos teñidos con hematoxilina eosina, fueron examinados por el doctorando (E. Sobrino-Reig), sin acceso a los datos del informe original y basándonos en los siguientes criterios histológicos para evaluar los tumores:

Patrón histológico: El patrón histológico es de gran utilidad para pronosticar una posible progresión y el pronóstico tumoral. Se ha visto que los tumores uroteliales con diferenciación glandular o epidermoide, presentan mayoritariamente tumores de alto grado y con mayor grado de infiltración tumoral (Blanco Jiménez E, Bocardo Fajardo G, 2003). Los tumores vesicales de tipo adenocarcinoma o sarcomatoide presentan un pronóstico más desfavorable que los carcinomas uroteliales (Messing et al.,2004).

Los tumores se clasificaron según el patrón histológico que presentaban, clasificando el carcinoma urotelial según los siguientes subtipos (Figura 15):

- ✓ **Carcinoma urotelial papilar:** presenta finos ejes fibrovasculares revestidos por tejido urotelial neoplásico de espesor variable, pueden presentar extensas ramificaciones. Las células neoplásicas presentan anomalías en tamaño, forma y cromatina nuclear y anomalías en la orientación celular (Moch et al., 2016).

- ✓ **Carcinoma urotelial con nidos sólidos:** presenta una arquitectura en nidos pequeños e irregulares o formando túbulos abortivos. A veces, los nidos se anastomosan, dando imágenes de cordones o trabéculas (Moch et al., 2016).

- ✓ **Carcinoma urotelial mixto:** carcinoma urotelial en el que se encuentra más de un patrón puro. El carcinoma urotelial con diferenciación epidermoide no será valorado dentro de esta clasificación, considerándolo como una entidad propia (Wasco et al., 2007; Moch et al., 2016).

- ✓ **Carcinoma urotelial con diferenciación epidermoide:** Carcinoma urotelial con presencia de nidos de epitelio escamoso maligno, caracterizado por células poligonales y evidencia de queratinización o puenteo intercelular. Se puede identificar la presencia de disqueratosis y perlas corneales (Moch et al., 2016).

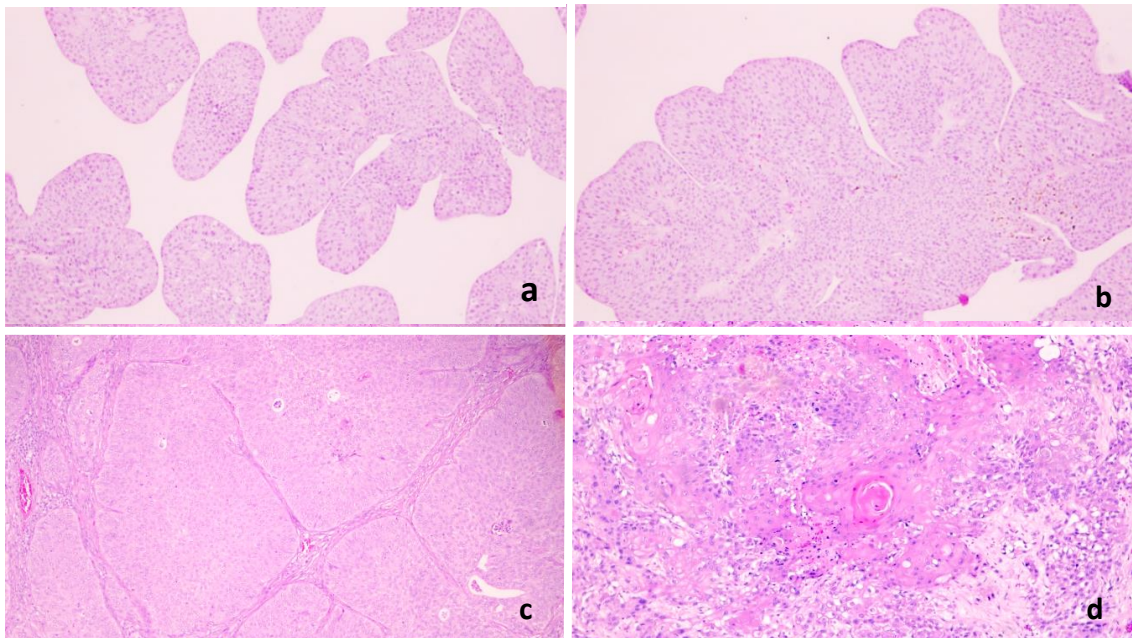


Figura 15. Carcinoma urotelial de patón histológico papilar (a y b). Carcinoma urotelial de patón histológico en nidos sólidos (c). Carcinoma urotelial con diferenciación epidermoide (d). Ampliación a-b: 10x, c y d: 20 x.

✓ **Presencia de nucléolo:** Se examinó la presencia o ausencia de nucléolo en los núcleos y, en los casos positivos se clasificó según su intensidad. Para ello se codificaron en tres grupos (Figura 16).

- G0: no se identifica nucléolo o poco evidente.
- G+: se identifica nucléolo evidente con un aumento de 400x.
- G++: se identifica nucléolo evidente con un aumento de 200x.

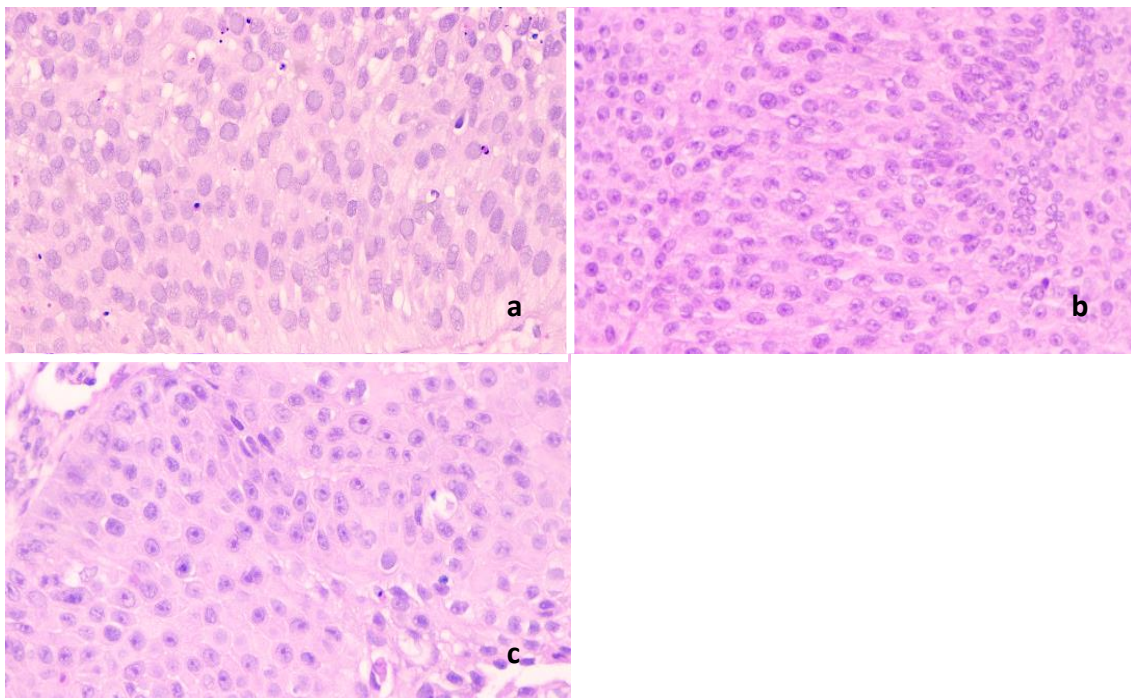


Figura 16. Carcinoma urotelial con nucleolo poco visible (G0) (a). Carcinoma urotelial con presencia de nucleolo visible a un aumento de 400x (G+) (b). Carcinoma urotelial con presencia de nucleolo visible a un aumento de 200x (G++) (c). Ampliación a-c: 40x.

✓ **Necrosis tumoral o apoptosis evidente:** Los tumores se evaluaron para detectar presencia o ausencia de necrosis. Si la necrosis estaba presente en un foco de menos del 10%, se valoró como negativo. Las áreas geográficas grandes de necrosis (como

tumor necrótico) no se incluyeron. Se clasificó en dos grupos, con presencia de necrosis tumoral y/o apoptosis o sin presencia.

✓ **Grado histológico:** Los tumores recibieron un solo grado de diferenciación (alto o bajo) según los criterios incluidos en la “Organización Mundial de la Salud / Sociedad Internacional de Patología Urológica” (Moch et al., 2016). Este criterio ha sido respaldado por el "Manual de estadificación del AJCC" (AJCC Cancer Staging Manual, 2017) (Figura 17).

- Bajo grado: células cohesivas caracterizadas por leves cambios nucleares que focalmente incluye un apiñamiento nuclear irregular y ligera hiperchromasia. Los nucléolos pueden ser prominentes y las figuras mitóticas ocasionales.
- Alto grado: atipia citológica severa, prominente desorden celular, con pérdida de la polaridad y la cohesividad. Las células tumorales tienden a ser grandes y pleomórficas, con un citoplasma abundante, aunque algunas son pequeñas con un alto ratio núcleo-citoplasma. Los nucléolos son grandes y prominentes en algunas células y pueden ser múltiples.

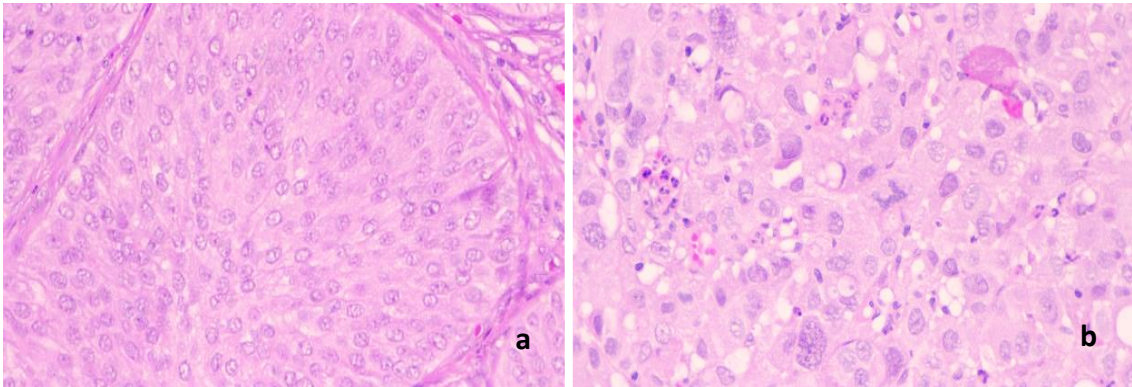


Figura 17. Carcinoma urotelial de bajo grado (a). Carcinoma urotelial de alto grado (b). Ampliación a: 20x; b: 40x

- ✓ **Patrón de crecimiento:** en el estudio histológico se evaluó el patrón de crecimiento que está presente en cada uno de los tumores y para ello se establecieron dos grupos (Figura 18). El primero formado por tumores que presentan un patrón de crecimiento de características exofíticas, los cuales presentan un crecimiento hacia el exterior, es decir, hacia la vejiga o hacia las luces tubulares en el caso de localizarse a nivel del uréter o la uretra. El segundo grupo, configurado por los tumores de un patrón de crecimiento de características endofíticas, incluyendo en este grupo, aquellos tumores que presentan un crecimiento hacia el corión.

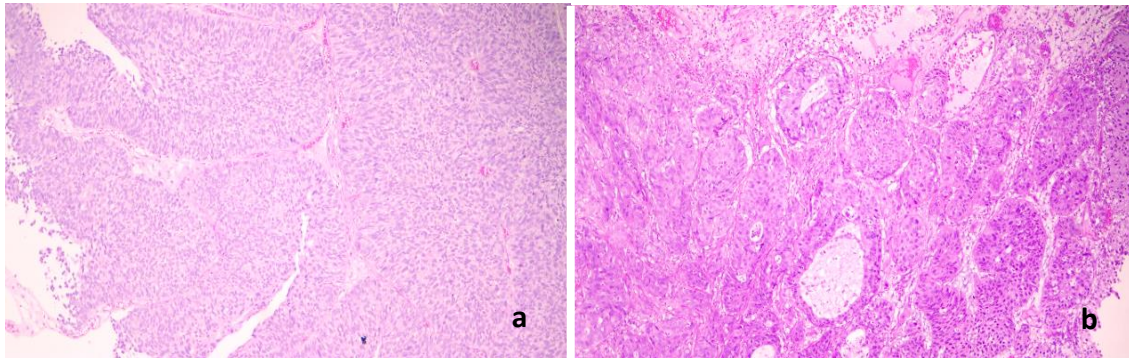


Figura 18. Carcinoma urotelial con patrón de creciente exofítico (a). Carcinoma urotelial con patrón de crecimiento endofítico (b). Ampliación a y b: 20x

- ✓ **Infiltración de la lámina basal:** La invasión de la lámina propia se caracteriza por la presencia de células uroteliales neoplásicas dentro de la lámina propia (tejido conectivo que se encuentra entre el urotelial y el músculo detrusor) en forma de nidos, racimos o como células sueltas, a menudo asociada con una marcada retracción por artefacto. Otra característica de la invasión tumoral, aunque no siempre está presente, es una respuesta del estroma de tipo inflamatorio o desmoplásico asociada a la neoplasia. En los carcinomas papilares de bajo grado, se puede observar dentro de la lámina propia grandes nidos redondeados de urotelial con empalizada y rodeados por estroma de apariencia normal. Esto representa un patrón de crecimiento invertido de los carcinomas no invasivos (Kaubisch et al., 1991; Cummings et al., 1992; Hudson and Herr, 1995).

- ✓ **Invasión perineural:** Se estudió los nervios y perineuro con el fin de evaluar la presencia de carcinoma urotelial dentro del perineuro, dentro del nervio, rodeando al nervio o invadiendo tejido gangliónico. Se establecieron dos grupos, el primer

grupo configurado por los tumores que no presentan dicha invasión y el segundo grupo formado por los tumores que sí presentan dicha invasión. (Figura 19). Se ha visto que la presencia de invasión perineural está relacionada con la presencia de metástasis a distancia (Mari A & et al., 2018).

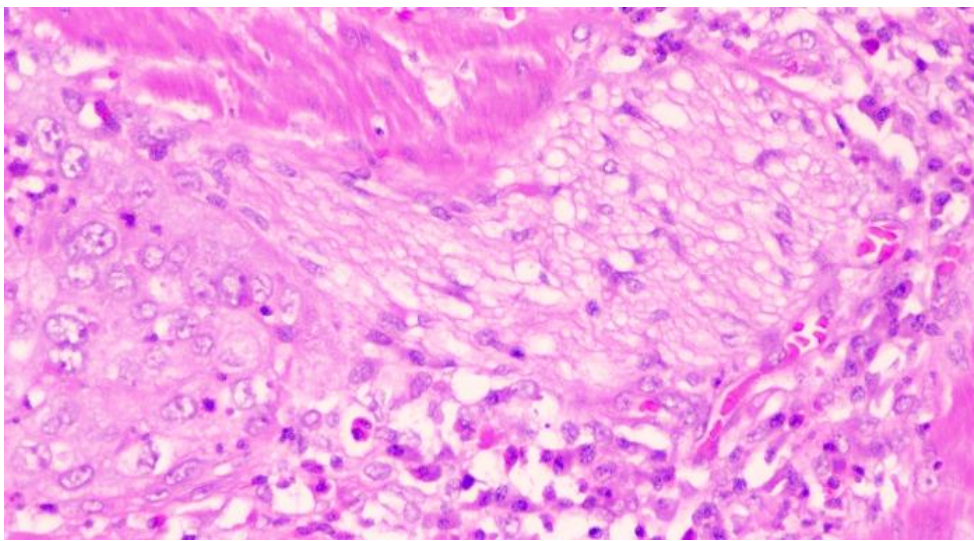


Figura 19. Carcinoma urotelial con invasión perineural Ampliación: 20x

- ✓ **Invasión linfo-vascular:** Se estudió los vasos linfáticos y sanguíneos y se valoró la presencia de celularidad urotelial tumoral en su interior. Se clasificó en dos grupos, el primer grupo en el que no se evidencia invasión en los vasos linfáticos ni en los vasos sanguíneos y otro grupo en el que sí se pueden identificar. (Figura 20). Al igual que la invasión perineural, la invasión linfo-vascular está relacionada directamente con la presencia de metástasis a distancia (Mari A & et al., 2018).

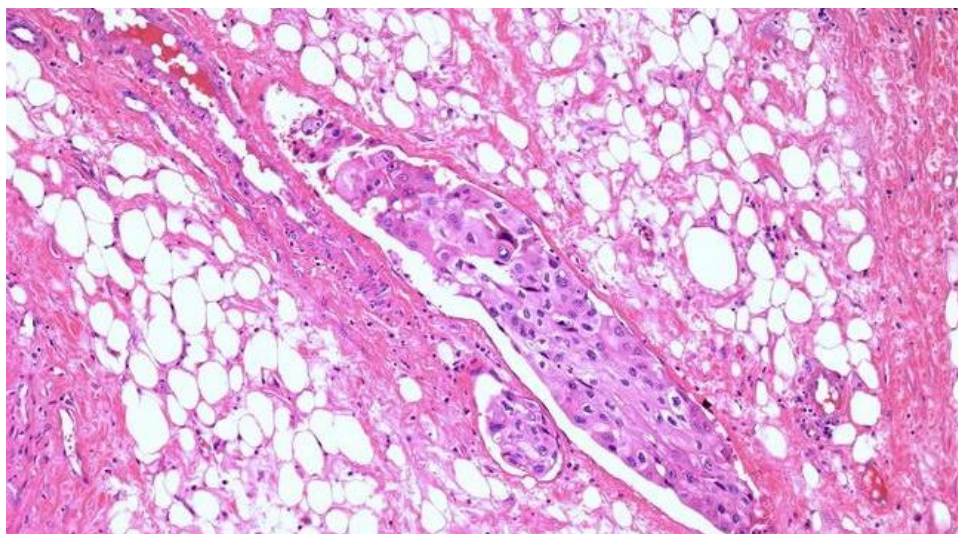


Figura 20. Carcinoma urotelial de alto grado dentro de los vasos en la grasa perivesical. Ampliación: 10x

- ✓ **Estadificación del tumor:** Se usaron los valores publicados en “Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Carcinoma of the Urinary Bladder” the 8th Edition, AJCC Staging Manual, Junio 2017 (AJCC Cancer Staging Manual, 2017). Este protocolo divide los tumores, según el nivel de infiltración (Tabla 2 y figura 21).

ESTADIO	DEFINICIÓN
Ta	Carcinoma papilar no invasivo
Tis	Carcinoma urotelial in situ “tumor flat”
T1	Tumor que invade la lámina propia <i>Tejido conectivo que hay entre el urotelial y el musculo detrusor</i>
T2	Tumor que invade la muscular propia <i>Gruesos haces de musculo detrusor</i>
T3	Tumor que invade tejido perivesical <i>Tejido adiposo profundo a la muscular propia</i> T3a: Invasión microscópica. T3b: Invasión macroscópica.
T4	Tumor que invade directamente otros órganos

Tabla 2. Clasificación de los tumores según el grado de invasión.

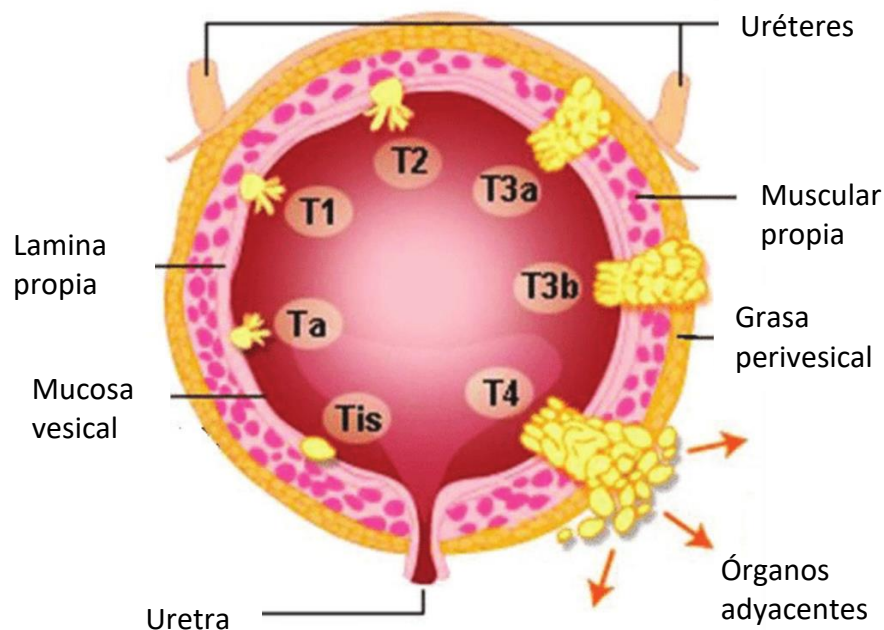


Figura 21. Estadaje del carcinoma vesical. (Shah, Amishi & Lemke, 2018)

✓ **Presencia de linfocitos intratumoral:** Se estudió, a nivel tumoral, el porcentaje de celularidad linfocitaria en diez campos de gran aumento, considerando preferentemente las áreas con mayor presencia de linfocitos (hot-spot) y se clasificaron en tres bloques (Figura 22 a-c). Se tuvo especial cuidado en no contar células apoptóticas.

- L0: No existe infiltrado linfocitario, menor del 5%.
- L1: Evidencia de infiltrado linfocitario mínimo, entre el 5 y el 15%.
- L2: Presencia de infiltrado linfocitario evidente mayor del 15%.

✓ **Presencia de linfocitos peritumoral:** Se estudió, en el estroma peritumoral, el porcentaje de celularidad linfocitaria, en diez campos de gran aumento, considerando preferentemente las áreas con mayor presencia de linfocitos (hot-

spot) y se clasificaron en tres bloques (Figura 22 d-f). Se tuvo especial cuidado en no contar células apoptóticas.

- P0: No existe infiltrado linfocitario, menor del 5%.
- P1: Evidencia de infiltrado linfocitario mínimo, entre el 5 y el 15%.
- P2: Presencia de infiltrado linfocitario evidente mayor del 15%.

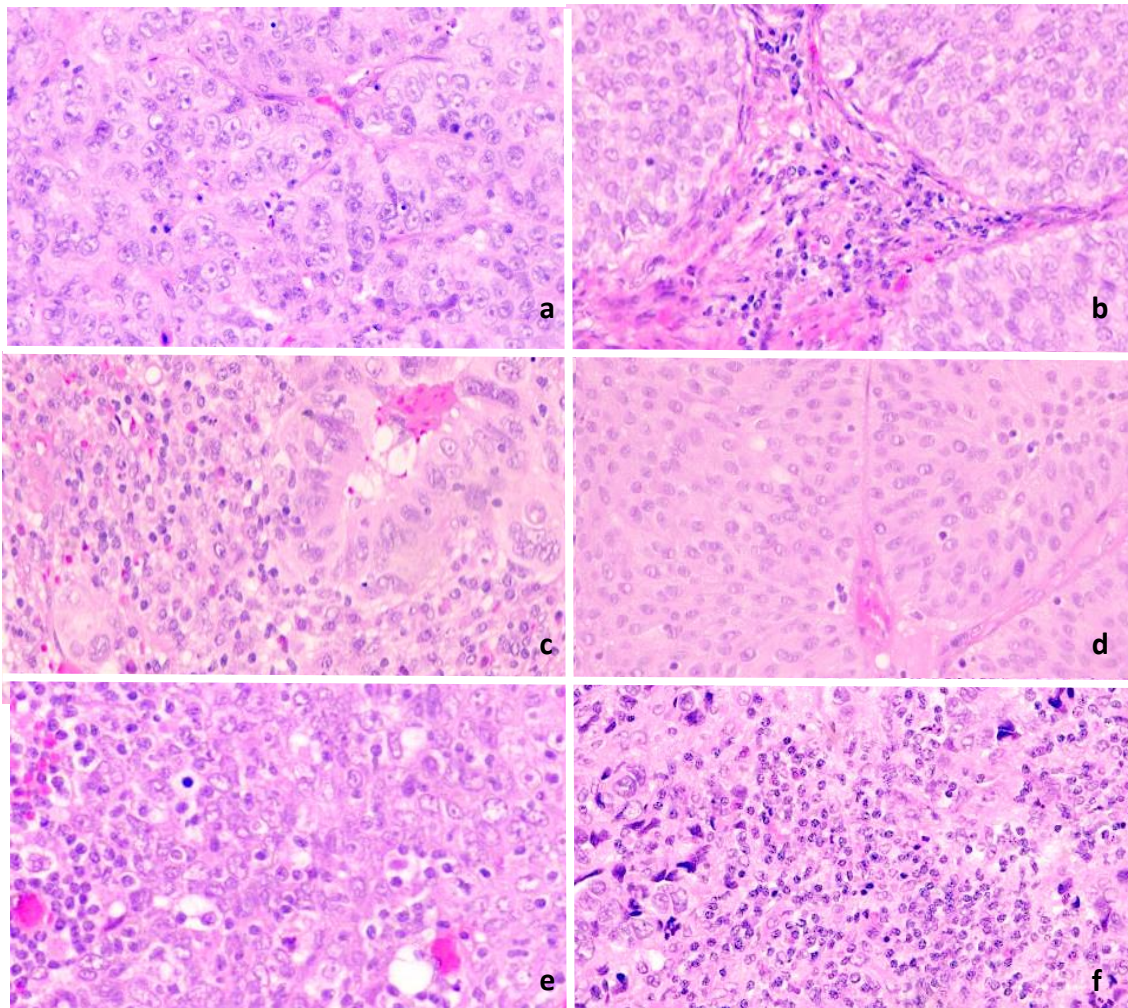


Figura 22. Carcinoma urotelial con presencia de un infiltrado linfocitario peritumoral inferior al 5% (L0) (a). Carcinoma urotelial con presencia de un infiltrado linfocitario peritumoral entre 5-15% (L1) (b). Carcinoma urotelial con presencia de un infiltrado linfocitario peritumoral mayor del 15% (L2) (c). Carcinoma urotelial con presencia de un infiltrado linfocitario intratumoral inferior al 5% (P0) (d). Carcinoma urotelial con presencia de un infiltrado linfocitario intratumoral entre 5-15% (P1) (e). Carcinoma urotelial con presencia de un infiltrado linfocitario intratumoral mayor del 15% (P2) (f). Ampliación a-f: 40x

3. TISSUE MICROARRAY

Para la realización del Tissue microarray del tejido, que se hizo posteriormente al estudio histológico, se emplearon las mismas muestras de tejido previamente estudiadas.

El Tissue microarray (TMA) de tejido es una técnica desarrollada en los 80 por la investigadora H. Battifora (Battifora, 1986) y mejorada en 1998 por J. Kononen et al. (Kononen et al., 1998). Mediante esta técnica se permite el estudio y el análisis simultáneo de un número de proteínas, ADN o ARN mediante hibridación in situ e inmunohistoquímica. Esta técnica nos proporciona un método eficaz y eficiente para el estudio de alteraciones genéticas, de expresión del ADN y /o pérdida de proteínas en estudio donde el número de pacientes sea alto.

Para la realización de esta técnica, primero se realizó un estudio de las preparaciones teñidas con hematoxilina eosina, en las cuales se marcaron con bolígrafos indelebles (azul y verde) las partes más representativas de cada caso. Una vez realizada dicha selección en la preparación, se marcaron en los bloques de parafina dichas áreas. Posteriormente se llevaron dichos bloques de parafina al departamento de Histopathology Core Unit del CNIO. De cada una de las marcas seleccionadas se transfirió un cilindro de tumor de un 1 mm de diámetro máximo a un bloque llamado recepto. De esta forma, se realizaron dos Tissue microarray: uno con las regiones marcadas con tinta azul y otro con las regiones marcadas con tinta verde. A su vez, se incorporaron cilindros de tejido adenoideo sin alteraciones patológicas con el fin de que sirva de control para las técnicas utilizadas.

Por lo tanto, al realizar esta técnica, podemos asegurar que podemos analizar todos los tumores tantas veces como secciones del Tissue microarray de tejido se realicen.

En cada Tissue microarray de tejido se incluyeron un total de 139 muestras de tejido tumoral, cada tumor está representado con dos núcleos tumorales de 1 mm, a su vez, se incluyeron 2 muestras de tejido de control (tejido de amígdalas) (con el fin de añadir un control externo a técnica de IHQ utilizadas).

Se practicaron secciones entre 2 y 5 μm de los bloques Tissue microarray, se desparafinaron y se tiñeron con hematoxilina eosina (siguiendo el mismo protocolo desarrollado antes) para verificar una correcta construcción de los bloques y la representatividad de todos los casos. Una vez verificado, se realizaron secciones entre 2 y 5 μm para realizar las técnicas IHQ.



Figura 23. Tissue microarray. Bloques y cristales

Para que la técnica de TMA sea considerada correcta, deberá presentar los siguientes criterios de calidad:

- ✓ Todos los tumores muestreados deben estar presentes en las secciones o al menos en un porcentaje mayor del 90%.
- ✓ Los cilindros, una vez seccionados, deben estar intactos. En caso de no poder ser así, se recomienda que al menos presenten un 50% del caso.
- ✓ Cuando el número de casos perdidos fuese superior a 10 se recomienda repetir el “Tissue microarray”.

4. INMUNOHISTOQUÍMICA

Las técnicas IHQ, con los anticuerpos seleccionados se realizaron en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Móstoles y en el CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas).

Las técnicas IHQ se realizaron mediante el método estreptavidina-biotina-peroxidasa modificada con diaminobencidina como cromógeno y se contrasta con hematoxilina. En las técnicas IHQ se pone en contacto un anticuerpo seleccionado (anticuerpo a estudio), el cual se une a un antígeno específico del tumor. Una vez que se ha realizado la unión antígeno-anticuerpo, se añade un cromógeno que se une al anticuerpo haciendo visible esta unión, ofreciendo un sistema altamente sensible y específico para la detección de anomalías moleculares.

Para realizar las técnicas inmunohistoquímicas se realiza el siguiente protocolo:

1. Se realizarán cortes con el micrótopo de un grosor de 2-5 μ de los bloques de TMA.
2. Se dejará en la estufa durante una hora a 60°C.
3. Recuperación antigénica:
 - 3.1. Preparar una solución de recuperación con ENVISION (mr) y agua destilada a una concentración 1:50.
 - 3.2. Llenar los tanques Fill Pt Link con 1,5 l.
 - 3.3. Calentar la solución en los tanques Fill PT Link a 60°C.
 - 3.4. Sumergir las secciones de los tejidos montadas en parafina, fijadas en parafina, en el precalentado de la solución recuperación de Envision en los tanques Fill PT link e incubar durante 20-40 minutos a 97°C. El tiempo de incubación variara según el anticuerpo que se use.
 - 3.5. Dejar que los portaobjetos se enfríen en el PT link a 65°C.
 - 3.6. Extraiga el portaobjetos del Autostainer del tanque PT link e inmediatamente sumergirlo en la estación de enjuague de PT link a temperatura ambiental, dicha estación de enjuague la habremos llenado antes con EnvisiónTM FLEX wash Buffer diluida en agua destilada en una a concentración 1:20.
 - 3.7. Dejar los portaobjetos a temperatura ambiente con EnvisionTM wash buffer diluido durante 1-5 minutos.
4. Incluir los portaobjetos en la maquina AutostainerLINK 48 donde se procederá con la tinción. Las secciones no se deben secar durante el procedimiento de la tinción inmunohistoquímica.

- 4.1. Cubrir la muestra con “Flex peróxido Block” durante 5 minutos.
 - 4.2. Cubrir la muestra con el anticuerpo deseado. El tiempo variará según el anticuerpo usado, entre los 15 y 40 min.
 - 4.3. Cubrir la muestra con FLEX/HRP durante 20 minutos.
 - 4.4. Cubrir la muestra con FLKEX DAE + sub-cromo para teñir el anticuerpo.
 - 4.5. Cubrir la muestra con FLEX Hematoxylin para ofrecer contraste.
5. Después de la tinción se recomienda realizar el proceso de deshidratación, limpieza y montaje permanente.
- 5.1. Sumergir la muestra en etanol al 70º, repetir procedimiento 3 veces.
 - 5.2. Sumergir la muestra en etanol al 97º, repetir procedimiento 3 veces.
 - 5.3. Sumergir la muestra en etanol absoluto, repetir procedimiento 3 veces.
 - 5.4. Sumergir la muestra en xilol, repetir procedimiento 3 veces.
 - 5.5. Colocar el cubreobjetos y para ello se usará DPX.

La elección de los marcadores para el estudio de inmunohistoquímica se llevó a cabo mediante dos criterios:

- ✓ Tomando como referencia los datos descritos en la literatura
- ✓ En relación con la implicación de las proteínas MMR en el carcinoma urotelial.

Los anticuerpos que se han utilizado para el estudio IHQ son:

Anticuerpo	Tipo	Clon	Tinción	Anticuerpo
C.erbB2	Anticuerpo monoclonal de ratón y conejo.	LSAB2	Nuclear	DAKO, Glostrup, Dinamarca.
Uroplakina C3	Anticuerpo monoclonal de ratón.	UPK1A	Citoplasmática	DAKO, Glostrup, Dinamarca.
SOX2	Anticuerpo monoclonal de ratón.	SOX2	Nuclear	DAKO, Glostrup, Dinamarca.
P53	Anticuerpo monoclonal de ratón.	DAK-p53	Nuclear	DAKO, Glostrup, Dinamarca.
P63	Anticuerpo monoclonal de ratón.	DAK-p63	Nuclear	DAKO, Glostrup, Dinamarca.
Cytokeratina 20 (CK20)	Anticuerpo monoclonal de ratón.	Ks20.8	Citoplasmática	DAKO, Glostrup, Dinamarca.
MutL Proytein Homolog 1 (MLH1)	Anticuerpo monoclonal de ratón.	ES05	Nuclear	DAKO, Glostrup, Dinamarca.
MutS Proytein Homolog 2 (MSH2)	Anticuerpo monoclonal de ratón.	FE11	Nuclear	DAKO, Glostrup, Dinamarca.
MutS Proytein Homolog 6 (MSH6)	Anticuerpo monoclonal de ratón.	EP49	Nuclear	DAKO, Glostrup, Dinamarca.
Postmeiotic Segregation Increased 2 (PMS2)	Anticuerpo monoclonal de conejo.	EP51	Nuclear	DAKO, Glostrup, Dinamarca.

Tabla 3. Anticuerpos IHQ utilizadas en el estudio.

4.1. Estudio IHQ de las proteínas MMR

La pérdida de expresión de proteínas MMR está directamente relacionada con la posibilidad de presentar mutación de las proteínas MMR.

Para el estudio de la pérdida de expresión de proteínas MMR se evaluó la presencia de las proteínas que codifican los genes MHL1, MSH2, MSH6 y PMS2, mediante las técnicas de inmunohistoquímica. Se consideran no mutados aquellos tumores que conserven tinción nuclear débil o intensa ya sea difuso o focal y mutados aquellos tumores que pierdan dicha tinción nuclear y, por consiguiente, se considerará como mutados aquellos tumores que no expresen tinción nuclear para este anticuerpo (Figura 24).

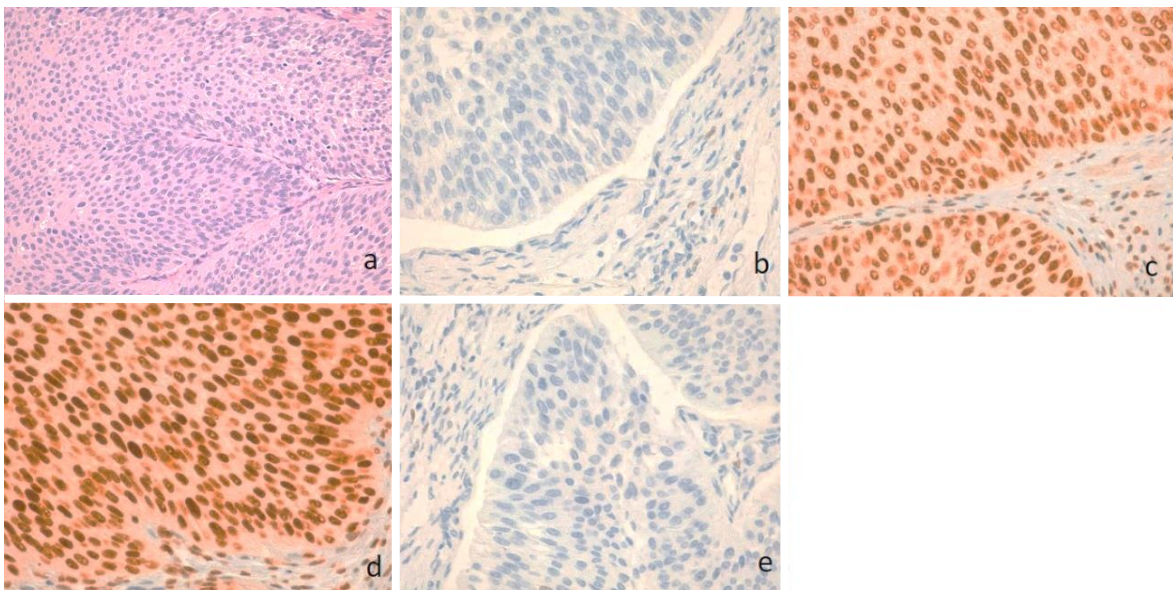


Figura 24. Carcinoma urotelial teñido con H&E (a). Carcinoma urotelial con ausencia de inmunotinción nuclear para MLH1 (b). Carcinoma urotelial con expresión nuclear no mutada para PMS2 (c). Carcinoma urotelial con expresión nuclear no mutada para MSH6 (d). Carcinoma urotelial con ausencia de inmunotinción nuclear para MSH2 (e). Ampliación: (a) 20x; (b-e) 40x.

4.2. Estudio IHQ de los grupos moleculares

4.2.1. Grupo basal

Para identificar a los tumores del grupo basal se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para el anticuerpo P63. Se evaluó el porcentaje de células que presentaban tinción nuclear moderada o intensa de la siguiente manera: 0 = sin reactividad; 1 = menos del 10% de núcleos de células cancerosas positivas; 2 = 10-25% positivo; 3 = 25-50% positivo, 4 = 50-75% positivo; 5 = 75-90% positivo; y 6 => 90% de núcleos de células tumorales positivas. Se consideró negativo a los grupos 0, 1 y 2 y se consideró positivo a los grupos 3, 4, 5 y 6 (Ud Din, Qureshi and Mansoor, 2011).

4.2.2. Grupo luminal

Para identificar los tumores del grupo molecular luminal, realizamos dos técnicas de inmunohistoquímica, el anticuerpo Uroplakina C3 y el anticuerpo Cytokeratina 20. Ambas tinciones expresan una tinción intensa de membrana y citoplasmática de las células paraguas, en condiciones habituales y tinción intensa de membrana y citoplasmática, en tumores uroteliales de tipo molecular luminal. Consideramos positivas aquellas tinciones en las que el tumor presente ambas tinciones intensas de membrana y citoplasmática en más de un 50% de las células tumorales (Figura 25).

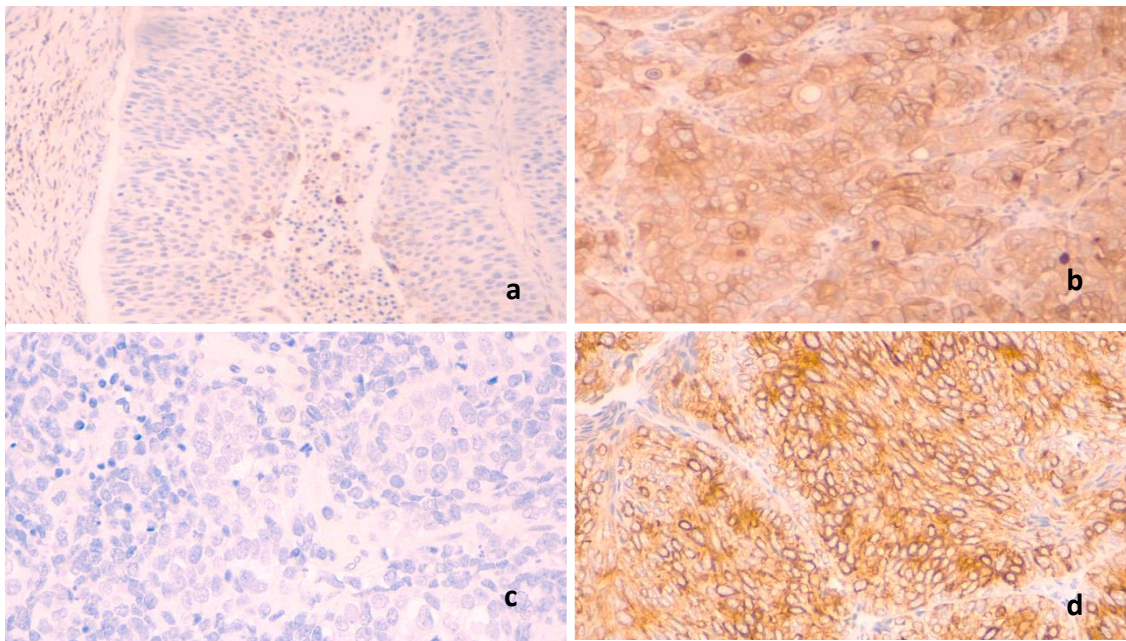


Figura 25. Carcinoma urotelial uroplakina negativo (a). Carcinoma urotelial uroplakina positivo (b). Carcinoma urotelial cytokeratina 20 negativo (c). Carcinoma urotelial cytokeratina 20 positivo (d). Ampliación: (a) 20x; (b-d) 40x

4.2.3. Grupo luminal papilar

Para poder identificar a los pacientes del grupo luminal papilar se realizó una tinción inmunohistoquímica, para el anticuerpo c.erbB2. Para evaluar su positividad a este anticuerpo, se utilizó el Score del “College of American Pathologist guideline” (Wolff et al., 2007) el cual clasifico como 0 (sin tinción), 1+ (tinción de membrana incompleta), 2+ (tinción de membrana completa pero débil en > 10% de células) y 3+ (tinción intensa de la membrana en > 30% de las células). Se consideraron positivas para el estudio aquellas que presentaron una positividad 2+ o 3+ (Ching et al., 2011) (Figura 26).

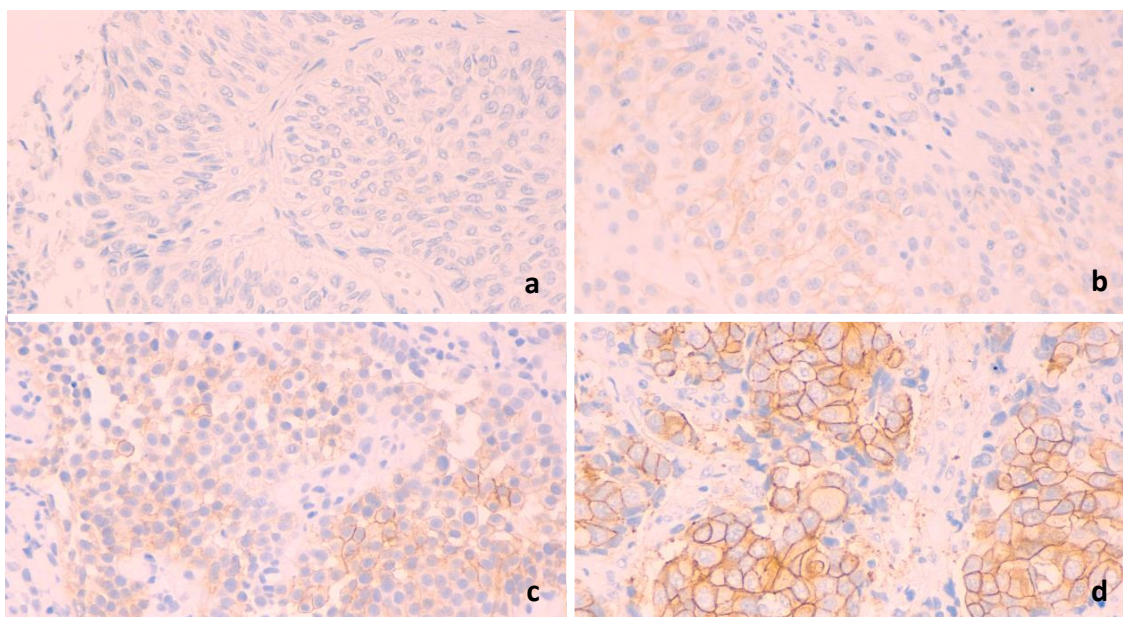


Figura 26. Carcinoma urotelial sin tinción para c.erbB2 (a). Carcinoma urotelial con tinción débil e incompleta para c.erbB2 (b). Carcinoma urotelial con tinción completa pero débil para c.erbB2 (c). Carcinoma urotelial con tinción completa e intensa para c.erbB2 (d). Ampliación: (a) 20x; (b-d) 40x

4.2.4. Grupo luminal infiltrante

Para poder identificar los tumores del grupo molecular luminal infiltrante, vamos a realizar una tinción inmunohistoquímica para el anticuerpo p53. Consideramos positivos aquellos tumores que presentan una tinción wild type (wild type: aquellos que presenten tinción nuclear intensa entre un 1% y un 10%) para la p53. Consideramos mutados aquellos que no presenten tinción en ninguna de sus células o tengan una sobreexpresión de la tinción (>10%) (Figura 27).

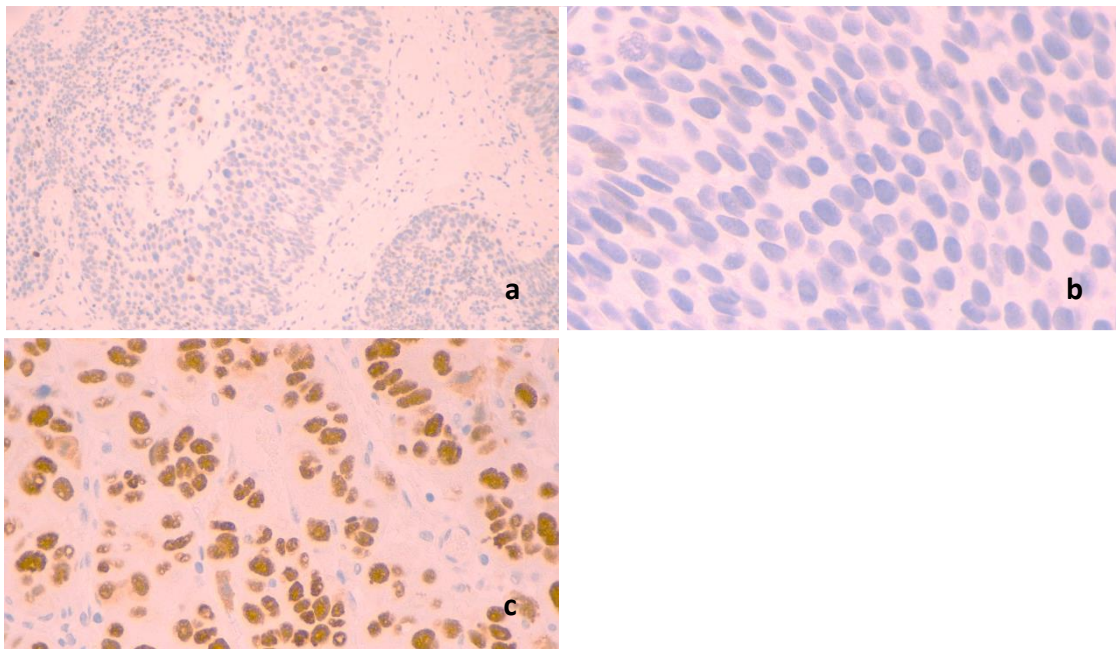


Figura 27. Carcinoma urotelial con tinción “wild type” (aquellos que presenten tinción nuclear intensa entre un 1% y un 10%) para p53 (a). Carcinoma urotelial con tinción aberrante para p53 (b). Carcinoma urotelial con sobreexpresión para la tinción p53 (c). Ampliación: (a) 20x; (b-d) 40x

4.2.5. Grupo neural

Para poder reconocer los tumores que cumplan las características moleculares con el fin de poder identificarse dentro del grupo molecular neural, realizamos una tinción inmunohistoquímica para el anticuerpo SOX2. Consideraremos positivas aquellas que presenten tinción nuclear, moderada o intensa en más de un 30% de las células (Figura 28).

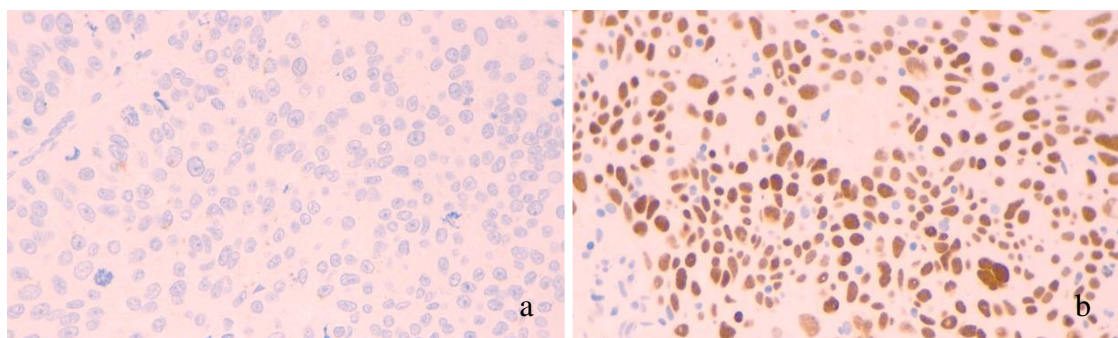


Figura 28. Carcinoma urotelial sin tinción para SOX2 (a). Carcinoma urotelial con tinción nuclear intensa para SOX2 (b). Ampliación: (a-b) 40x

5. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Se realizó análisis estadístico mediante el paquete SPSS 21.0® para Windows ((IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp).

Se expresaron las variables categóricas mediante frecuencias y tantos por ciento. Se realizó inferencia estadística mediante la prueba Chi-cuadrado para análisis de variables cualitativas. Para determinar qué carácter estaba asociado a una distribución inesperada se calcularon los residuos estandarizados a partir de la diferencia entre los valores observados y los esperados. En resumen, dentro de cada variable de estudio, se consideró que una característica presentaba una distribución estadísticamente diferente del valor esperado cuando su distribución era $>$ o $<$ el valor crítico de la puntuación Z (es decir, 1.96). Se estudió mediante curva de supervivencia de Kaplan-Meier para comprobar la incidencia de mortalidad de los pacientes que portaron diferentes mutaciones en los genes de pérdida de expresión de proteínas MMR.

Se tomaron resultados estadísticamente significativos aquellos con valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

1.1. Características de la población

En este estudio, se han incluido un total de 139 pacientes, los cuales han sido diagnosticados como “Carcinoma de células transicionales” código M81203, entre el 1 de enero de 2013 y 1 del junio de 2014. Todos los pacientes fueron diagnosticados en el Hospital Universitario de Móstoles.

Si valoramos la distribución de los pacientes en relación a su género, vemos que, del total de casos, 45 eran varones y 94 eran mujeres. El número de casos fue mayor en mujeres que en hombres (67,6% versus 32,4%) (Figura 29).

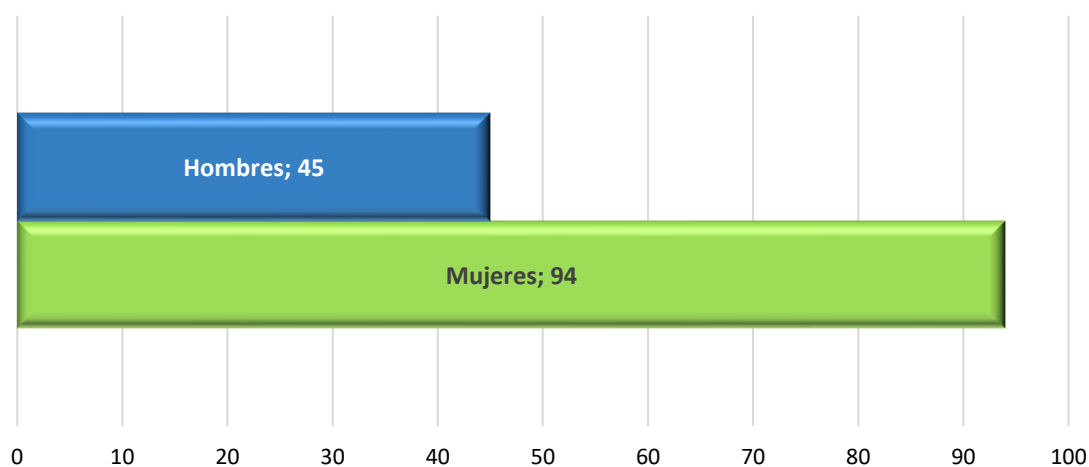


Figura 29. Distribución por sexos en frecuencia. La barra verde representa a las mujeres, siendo un total de 94. La barra azul representa el total de varones, siendo 45.

Los pacientes del estudio presentan una edad comprendida entre los 28 y los 92 años. Se ha recodificado la edad realizando grupos de edad. De esta forma se ha podido observar que, la mayoría de pacientes se sitúan en la franja de entre los 60 y 69 años y

también se ha observado, que la prevalencia en pacientes jóvenes es menor en comparación con los grupos de mayor edad (Figura 30).

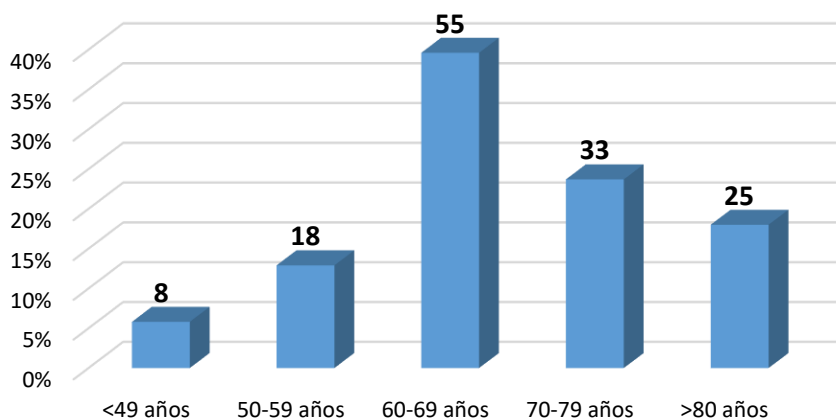


Figura 30. Frecuencia de edades en los pacientes a estudio. Hay 8 pacientes con edades inferiores o iguales a 49 años, 18 pacientes con una edad entre los 50 y 59 años, 55 pacientes con una edad entre los 60 y 69 años, 33 pacientes con una edad entre los 70 y 79 años y 25 pacientes mayores de 80 años.

La localización más frecuente, en el momento del diagnóstico, fue la vejiga. Se han identificado que un 93,5% de los tumores (n=103) se localizaban en la vejiga en el momento del diagnóstico, un 4,3% se localizaban en la uretra (n=6) y un 2,3% se localizaban en uno de los uréteres (n=3) (Figura 31).

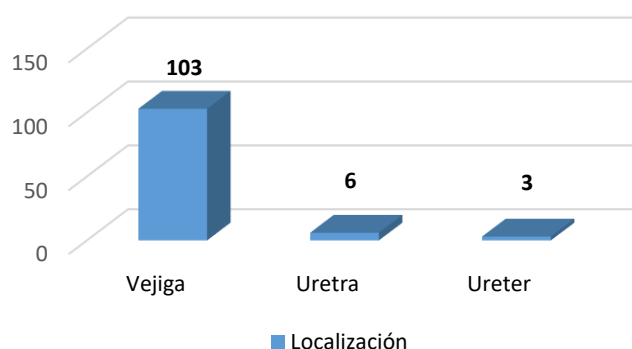


Figura 31. Frecuencia de localización del tumor. 103 pacientes presentaban el tumor en la vejiga, 6 pacientes presentaban el tumor la uretra y 3 de ellos en el uréter.

1.2. Características del tumor

Tanto la progresión tumoral como la recidiva, están muy relacionados con múltiples factores histopatológicos. Entre estos factores cabe destacar el patrón histológico, el estadiaje tumoral, el grado tumoral, la morfología del tumor, presencia o ausencia de invasión linfovascular o perineural, características moleculares y la presencia de linfocitosis tumoral.

Por esta razón, es necesario que el patólogo haga un exhaustivo examen de la biopsia con el fin de evaluar todos los parámetros.

1.2.1. Patrón histológico

El tipo histológico más frecuente fue el de carcinoma de células uroteliales con patrón histológico papilar localizado en 79 pacientes (56.83%). El segundo tipo histológico en frecuencia es el carcinoma urotelial de patrón histológico mixto (patrón sólido y patrón papilar), 39 pacientes (28.05%). El tercero en frecuencia fue el carcinoma urotelial de patrón histológico sólido, 18 pacientes (12.94%). Y, por último, el carcinoma urotelial con diferenciación epidermoide, 3 pacientes (2.15%). No se identificaron otro tipo de patrones histológicos ni diferenciaciones en los tumores estudiados (Figura 32).

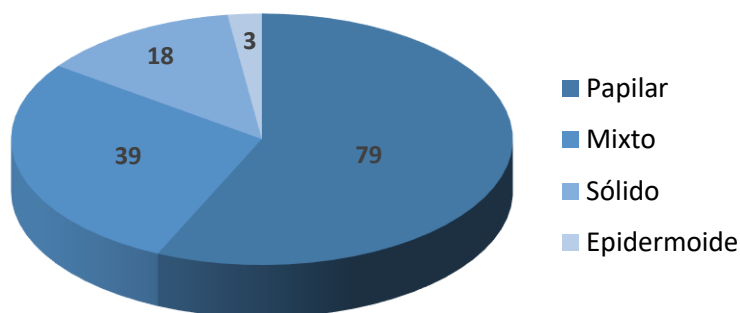


Figura 32. Frecuencia de resultados histológicos de los tumores. Se identificaron 79 paciente que presentaron un tumor urotelial con patrón histológico papilar, 39 pacientes que presentan tumor con el patrón histológico mixto, 18 pacientes que presentaban tumor de histológico sólido y 3 pacientes con tumor de patrón histológico con diferenciación epidermoide (3 pacientes).

1.2.2. Grado tumoral

El grado tumoral está directamente relacionado con la pérdida de la diferenciación celular y, por tanto, con la agresividad tumoral. Se puede afirmar que, a mayor grado tumoral, mayor será la agresividad tumoral (Parakh R, 2019). Los tumores uroteliales de alto grado presentan un riesgo de recaída tumoral del 60% (Millán-Rodríguez et al., 2000).

Según el grado de diferenciación celular, se clasificaron los tumores en bajo y alto grado; basándonos en los criterios de clasificación incluidos en la "Organización Mundial de la Salud / Sociedad Internacional de Patología Urológica" (Moch et al., 2016) y respaldados por el "Manual de estadificación del AJCC" (AJCC Cancer Staging Manual, 2017).

La mayoría de tumores presentaban tumores de alto grado identificándose 80 casos (59,6%). Solo 59 de los pacientes del estudio presentaron tumores de bajo grado (42,2%) (Figura 33).

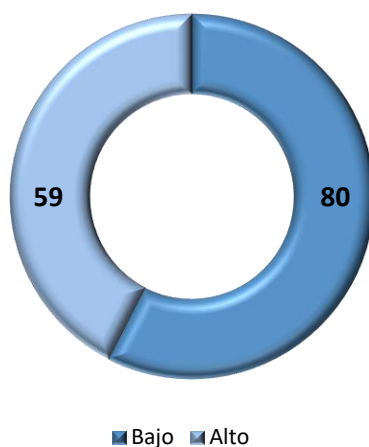


Figura 33. Frecuencia de los resultados de grado tumoral. El color azul oscuro representa a los pacientes con tumores de alto grado. El color azul claro a los tumores de bajo grado.

1.2.3. Patrón de crecimiento

Se evaluó el patrón arquitectural de crecimiento que presentaba el tumor. Se dividió en tumores de crecimiento de características exofíticas (incluyendo en este grupo aquellos tumores que presentan un crecimiento hacia el exterior, es decir a la vejiga o la luz del uréter o la uretra) o de crecimiento de características endofíticas (incluyendo en este grupo aquellos tumores que presentan un crecimiento hacia el corión).

En nuestro estudio, el patrón de crecimiento exofítico es más predominante (119 de los pacientes, 85,6%), que el patrón de crecimiento endofítico (20 pacientes, 14,4%).

1.2.4. Infiltra la lámina propia

Consideraremos lámina propia al tejido conectivo que se encuentra entre el urotelial y el musculo depresor.

Se estudió si los tumores presentaban o no infiltración de la lámina propia. 49 pacientes presentaban un tumor que no infiltraba la lámina propia y 90 pacientes presentaban un tumor que sí infiltraba la lámina propia.

1.2.5. Grado de infiltración

El grado de infiltración es, junto con la afectación ganglionar y la presencia o no de metástasis, uno de los parámetros utilizados para establecer el estadiaje tumoral.

El grado de infiltración tumoral se valoró siguiendo los criterios de clasificación incluidos en la "Organización Mundial de la Salud / Sociedad Internacional de Patología Urológica" (Moch et al., 2016) y respaldados por el "Manual de estadificación del AJCC" (AJCC Cancer Staging Manual, 2017) y se estadificaron los pacientes.

La mayoría de los tumores examinados presentaban estadios tumorales no infiltrantes o infiltrantes limitados a la lámina propia. En muy pocos casos se identificaron pacientes con tumores que infiltraran estructuras más profundas (Figura 34).

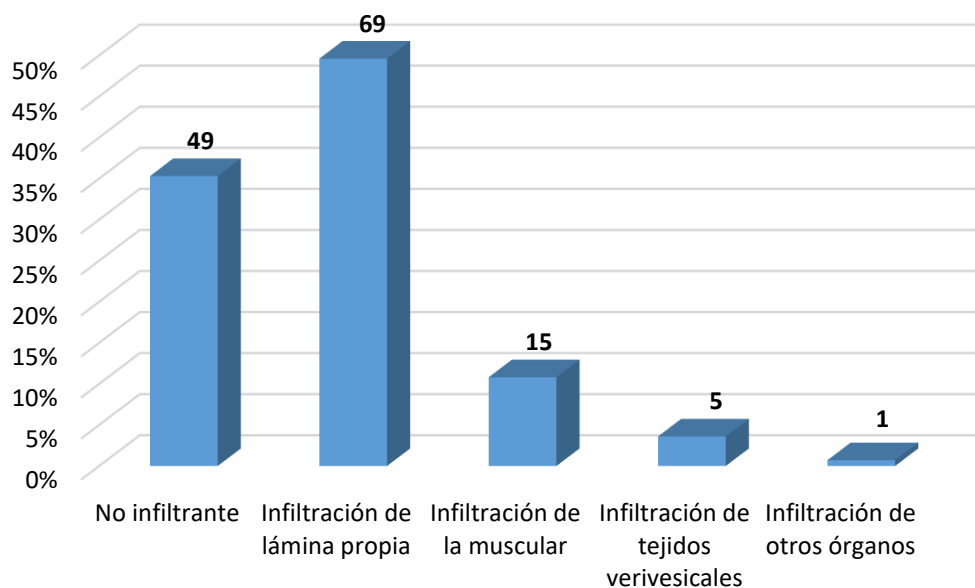


Figura 34. Frecuencia de grado de infiltración ocurridos en los tumores del estudio. 49 pacientes presentaron tumores no infiltrantes en el momento del diagnóstico, 69 pacientes presentaron tumores infiltrantes limitados a la lámina propia, 15 pacientes tumores infiltrantes limitados a la muscular, 5 pacientes con tumores que infiltran tejido perivesicales y 1 paciente con metástasis a distancia.

1.2.6. Linfocitosis

A nivel tumoral, se identificó, que en la mayoría de tumores no se identifican o se identifican muy pocos linfocitos (119 pacientes, 85.61%). Solo en un pequeño número de tumores se encontró un porcentaje de linfocitos moderado (14 pacientes, 10.07%) o alto (6 pacientes, 4.31%) a nivel tumoral.

A nivel peritumoral se identificó que, la mayoría de tumores no presentan o presentaban muy pocos linfocitos en los alrededores del tumor, siendo evidente en 65 pacientes (46.76%). Se identificó que 47 pacientes (33.81%) presentaban leve-moderada o moderada cantidad de linfocitos, y, por último, en solo 27 pacientes (19.42%) se encontró un alto porcentaje de linfocitos en los alrededores del tumor.

1.2.7. Necrosis tumoral

La presencia de necrosis a nivel tumoral suele estar presente en los tumores con alta actividad mitótica, vascularización y agresividad tumoral. Tras el estudio histológico, se identificó que en 74 tumores se observaban áreas con necrosis a nivel tumoral (53,2%).

1.2.8. Nucleolo

Al igual que como ocurre con la necrosis, se ha visto que la mayoría de tumores con presencia de nucleolo marcado presentan alto grado tumoral. Al valorar los criterios para gradar el tumor, vemos que la presencia de nucleolo evidente es uno de los criterios para clasificarlo como tumor de alto grado (AJCC Cancer Staging Manual, 2017). En el estudio histológico, la mayoría de las células tumorales no presentaban nucléolo o el nucléolo era poco evidente, siendo así en un 53.95% tumores (75). El 22.30% de los tumores (31) presentaban nucléolo evidente con un aumento de 400x y el 23.74% de los tumores (33) presentaban nucléolo evidente con un aumento de 200x (Figura 35).

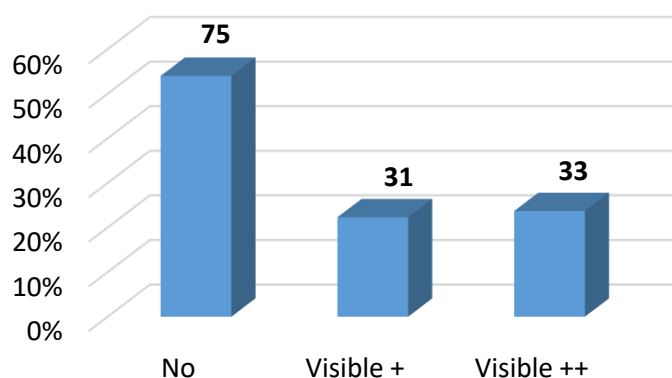


Figura 35. Frecuencia de presencia de nucléolo. 75 pacientes presentaban tumores sin presencia de nucléolo o poco evidente, 31 presentan nucléolo evidente con un aumento de 40x y 33 presentaron nucléolo evidente con un aumento de 200x.

1.2.9. Invasión linfovascular y perineural

En el estudio de los cortes histológicos, la presencia de invasión linfovascular es rara y poco presente, identificándose en tan solo 3 casos (2,2%). En dicho estudio, no se identificó la presencia de invasión neural o perineural en ninguno de los pacientes.

1.3. Grupo molecular

Tras el estudio de las técnicas IHQ, se ha observado que, el grupo más frecuente es el grupo basal con 47 pacientes (33.81%) seguido del grupo luminal con 44 pacientes (31.65%). El tercero en frecuencia coincidió, el grupo luminal infiltrante, 20 pacientes (14.38%), con el grupo luminal papilar, 20 pacientes (14.38%) y para terminar el grupo neural con 8 pacientes (5.75%) (Figura 36).

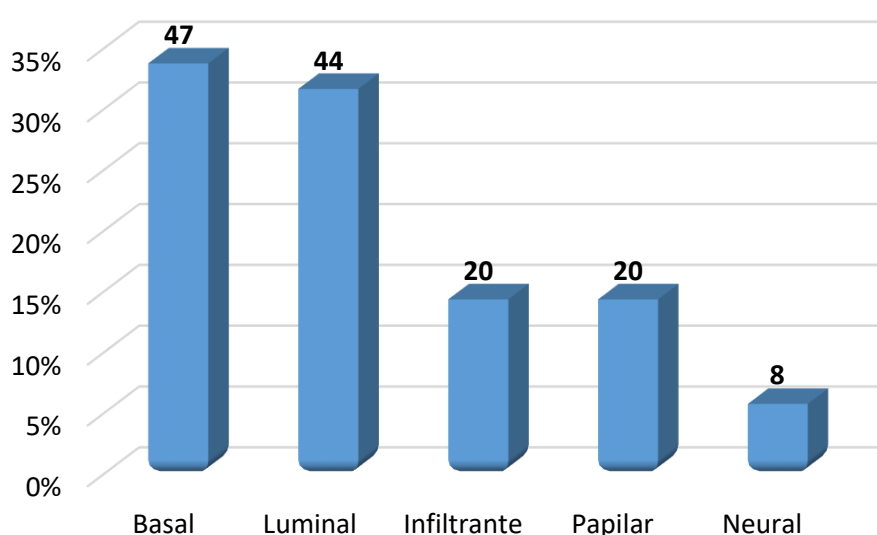


Figura 36. Frecuencia de los diferentes grupos tumorales presentados en los pacientes. 47 tumores presentan un subgrupo molecular basal. 44 tumores presentan un subgrupo molecular luminal. 20 tumores presentan un subgrupo molecular luminal-infiltrante. 20 tumores presentan un subgrupo molecular luminal-papilar. 8 tumores presentan un subgrupo molecular neural.

1.4. Pérdida de expresión de proteínas MMR

Mediante el estudio de las técnicas IHQ, 13 de los pacientes (9,4%) presentaban pérdida de expresión de una o más proteínas MMR (Tabla 4).

	PMS2	MLH1	MSH2	MSH6
Paciente 1	+		+	
Paciente 2	+			
Paciente 3	+		+	
Paciente 4	+			
Paciente 5	+			
Paciente 6		+	+	
Paciente 7	+			
Paciente 8	+			
Paciente 9		+	+	+
Paciente 10	+		+	
Paciente 11		+	+	
Paciente 12	+			+
Paciente 13			+	

Tabla 4. Pacientes con pérdida de expresión de las proteínas MMR (+ indica la presencia de pérdida de expresión de las proteínas mediante IHQ)

1.5. Recidiva tumoral

Se estudió a los pacientes de forma retrospectiva, los 5 años posteriores al diagnóstico inicial del tumor. El 40.3% (56) de los pacientes, presentaron recidivas a pesar de recibir el tratamiento adecuado para el tumor y nivel de infiltración.

2. ESTUDIO COMPARATIVO

2.1. Estudio de tumores con pérdida de expresión de proteínas MMR en comparación con tumores con expresión completa de proteínas MMR

Para realizar esta comparativa se dividieron los pacientes en dos grupos. Uno de ellos está formado por pacientes con tumores que presentan pérdida de expresión de proteínas MMR (en cualquiera de las proteínas implicados en el estudio) y el otro grupo, está formado por pacientes con tumores que presentan expresión integra de proteínas MMR. Al realizar esta división, se identificaron 13 (10.31%) pacientes con tumores que presentaban pérdida de expresión de proteínas MMR y 126 (89.69%) con expresión integra de proteínas MMR.

Comparamos los parámetros estudiados en el apartado anterior en pacientes con tumores que presentan pérdida de expresión de proteínas MMR y en pacientes cuyos tumores no presentan dicha pérdida de expresión de proteínas MMR.

La finalidad de este estudio comparativo es identificar diferencias estadísticamente significativas que serán de utilidad para diferenciar ambos grupos.

En las tablas presentadas a partir de este punto, se va a expresar de la siguiente manera; las dos primeras columnas van a expresar las características estudiadas (la primera indica el factor estudiado y la segunda la clasificación de dicho factor), la tercera columna hace referencia a los pacientes con pérdida de expresión de una o varias de las proteínas MMR, la cuarta columna hace referencia a los pacientes que no presentan falta de expresión de las proteínas MMR y la quinta ofrece el “p valor”. Para este estudio,

se ha realizado una inferencia estadística mediante la prueba Chi-cuadrado, evaluando cada factor estudiado. En los casos en los que la “p valor” fuera inferior 0.05, se indicara mediante unas flechas la tendencia estadística, comparando los pacientes que presentan falta de expresión para las proteínas MMR y los que no presentan falta de expresión para las proteínas MMR (↑ con tendencia estadística hacia arriba. ↓ con tendencia estadística hacia abajo). En los casos en los que la tendencia estadística sea entre diferentes subclasificaciones de un mismo factor se indicará el “p valor” entre paréntesis, realizando una inferencia estadística mediante la prueba Chi-cuadrado, entre los pacientes que sí presentan pérdida de expresión para las proteínas MMR y los pacientes que no presentan pérdida de expresión de las proteínas MMR.

Factor	Pérdida de expresión de proteínas MMR			
	Si (n=13)	No (n=126)	p valor	
Edades	<49 años	0.00%	6.30%	0.795
	50-59 años	15.40%	12.70%	
	60-69 años	46.20%	38.90%	
	70-79 años	15.40%	24.60%	
	>80 años	23.10%	17.50%	
Sexo	Hombre	76.90% ↑	27.80% ↓	<0.001
	Mujer	23.10% ↓	72.20% ↑	
Localización	Vejiga	95.20%	76.90%	0.001
	Uretra	2.40% ↓	23.10% ↑	
	Uréter	2.40%	0.00%	
Histología	Papilar	69.20%	55.60%	0.663
	Mixto	15.40%	29.40%	
	Solido	15.40%	12.70%	
	Epidermoide	0.00%	2.40%	

		Pérdida de expresión de proteínas MMR		
Factor		Si (n=13)	No (n=126)	p valor
Estadaje	No infiltración (pTa)	53.80% ↑	33.30% ↓	0.006 (pT1)
	Infiltración de lámina propia (pT1)	7.70% ↓	54.00% ↑	0.025 (pT2), <0.001(pT3)
	Infiltración de músculo (pT2)	15.40%	10.30%	0.037 (pT3)
	Infiltra. de tejidos perivesicales (pT3)	23.10%	1.60%	0.064
	Infiltración de otros órganos (pT4)	0.00%	0.80%	0.832
Grado tumoral	Bajo	46.20%	42.10%	0.776
	Alto	53.80%	57.90%	
Necrosis tumoral evidente	Si	30.80%	55.60%	0.088
	No	69.20%	44.40%	
Crecimiento tumoral	Endofítico	23.10%	13.50%	0.349
	Exofítico	76.90%	86.50%	
Invasión linfo-vascular	Si	7.70%	1.60%	0.149
	No	92.30%	98.40%	
Invasión neural	Si	0.00%	0.00%	1.000
	No	100.00%	100.00%	
Nucleolo evidente	No	76.90%	51.60%	0.195
	Si +	15.40%	23.00%	
	Si ++	7.70%	25.40%	
Linfocitos peritumorales	0-5%	55.30%	44.40%	0.211
	6-30%	39.10%	35.70%	
	>30%	12.80%	19.80%	
Linfocitos intratumorales	0-5%	92.30%	84.90%	0.387
	6-20%	0.00%	11.10%	
	>20%	7.70%	4.00%	

Tabla 5. Correlación entre presencia de mutación o no en microsatélites con parámetros de influencia en los diferentes tumores En los casos en los que la “p valor” fuera inferior 0.05, se indicara mediante unas fechas la significación estadística. ↑ con significación estadística hacia arriba. ↓ con significación estadística hacia abajo.

En ambos grupos tumorales, el patrón histológico predominante es el patrón papilar. El grado tumoral más frecuente en ambos grupos es el de alto grado. Presentando un crecimiento de características exofíticas. Ambos grupos presentaban los tumores más frecuentemente en la década de los 60-69 años.

Al valorar la frecuencia por géneros, se vio que el grupo con pérdida de expresión de proteínas MMR presentaba un mayor porcentaje de varones (76.90%) *versus* el otro grupo (27.80%) ($p < 0.001$).

La vejiga es la localización más común y casi exclusiva en el grupo de pacientes con pérdida de expresión de proteínas MMR (95%) frente al otro grupo (76.90%) ($p < 0.001$).

Si analizamos la existencia de infiltración tumoral en la lámina propia, no se observaron diferencias estadísticamente significativas; aunque se objetivó que, en los pacientes estudiados con pérdida de expresión de proteínas MMR, es más frecuente que el tumor no infiltre la lámina propia (56.8%) *versus* los tumores sin pérdida de expresión de proteínas MMR, donde este grupo es el menos significativo (33,3%) (N.S.)

Al estudiar el estadiaje tumoral, nos basamos en los criterios de clasificación incluidos en la "Organización Mundial de la Salud / Sociedad Internacional de Patología Urológica" (Moch et al., 2016) y respaldados por el "Manual de estadificación del AJCC" (AJCC Cancer Staging Manual, 2017) y se identificó que un alto porcentaje de tumores con pérdida de expresión de proteínas MMR presentaban el tumor en estadio T3 (tumor que infiltra los tejidos perivesicales) (23.10%) en cambio los tumores sin pérdida de

expresión de proteínas MMR presentan mayoritariamente tumores infiltrantes limitados a la lámina propia (54.00%) ($p < 0.001$).

En el resto de parámetros comparados entre los carcinomas uroteliales con pérdida de expresión de las proteínas MMR y los que no presentan dicha pérdida no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas.

2.2. Estudio de tumores según su tipo molecular

Según la clasificación molecular que presentó Robertson en su artículo (Robertson et al., 2017), se han dividido los tumores en 5 grupos basándonos en el patrón de tinción inmunohistoquímico. Una vez subclasificados estos tumores, comparamos los parámetros histológicos estudiados con la finalidad de encontrar similitudes y diferencias.

2.2.1. Grupo basal

Para este estudio comparativo, se realizaron dos grupos. Uno formado por tumores del grupo molecular basal y otro por el resto de tumores que no corresponden a este grupo (grupos luminal, luminal-infiltrante, luminal- papilar y neural). Se identificaron 37 tumores del grupo basal (26,6%) y 102 (73.6%) tumores que no pertenecen a este grupo.

Factor	Grupo tumoral basal			
	Si (n=37)	No (n=102)	p valor	
Edades	<49 años	5.40%	5.90%	0.771
	50-59 años	13.50%	12.70%	
	60-69 años	32.40%	42.20%	
	70-79 años	24.30%	23.50%	
	>80 años	24.30%	15.70%	
Sexo	Hombre	29.70%	33.30%	0.688
	Mujer	70.30%	66.70%	
Localización	Vejiga	94.60%	93.10%	0.827
	Uretra	2.70%	4.90%	
	Uréter	2.70%	2.00%	
Histología	Papilar	5.40% ↓	75.50% ↑	<0.001 (M), <0.001 (S)
	Mixto	73.00% ↑	11.80% ↓	0.016 (E)
	Solido	21.6%	9.80%	0.126
	Epidermoide	0.00%	2.90%	0.736
Infiltración	No infiltración (pTa)	24.30%	39.20%	0.243
	Infiltración de lámina propia (pT1)	54.10%	48.00%	0.025 (pT2), <0.001(pT3)
	Infiltración de músculo (pT2)	18.90%	7.80%	0.037 (pT3)
	Infiltra. de tejidos perivesicales (pT3)	2.70%	3.90%	N.S.
	Infiltración de otros órganos (pT4)	0.00%	1.00%	N.S.
Grado tumoral	Bajo	16.20% ↓	52.00% ↑	<0.001
	Alto	83.80% ↑	48.00% ↓	
Necrosis tumoral evidente	Si	70.30% ↑	47.10% ↓	0.015
	No	29.70% ↓	52.90% ↑	
Crecimiento tumoral	Endofítico	16.20%	13.70%	0.712
	Exofítico	83.80%	86.30%	
Invasión linfo-vascular	Si	0.00%	2.90%	0.292
	No	100.00%	97.10%	
Invasión neural	Si	0.00%	0.00%	1.000
	No	100.00%	100.00%	

Factor	Grupo tumoral basal		p valor	
	Si (n=37)	No (n=102)		
Nucleolo evidente	No	45.90%	56.90%	0.007 (S++)
	Si +	10.80%	26.50%	0.002
	Si ++	43.20% ↑	16.70% ↓	
Linfocitos peritumorales	0-5%	37.80%	50.00%	
	6-30%	40.50%	31.40%	0.436
	>30%	21.70%	18.60%	
Linfocitos intratumorales	0-5%	81.10%	87.30%	
	6-20%	8.10%	10.80%	0.073
	>20%	10.80% ↑	2.00% ↓	

Tabla 6. Correlación entre presencia de grupo tumoral basal con parámetros relevantes. En los casos en los que la “p valor” fuera inferior 0.05, se indicara mediante unas fechas la significación estadística. ↑ con significación estadística hacia arriba. ↓ con significación estadística hacia abajo.

Los tumores del grupo basal presentaron carcinoma urotelial con patrón mixto (73%) y sólido (21.6%) en mayor proporción que el grupo no basal, el cual presentaba en su mayoría de casos un patrón papilar (75,50%) ($p < 0.001$).

Al analizar el grado tumoral, los tumores del grupo basal, presentaban frecuentemente tumores de alto grado (83,80%) *versus* los tumores que son del grupo no basal (48,00%) ($p < 0.001$).

Al estudiar la necrosis tumoral, se ha identificado que los tumores del grupo basal no presentan necrosis en la mayoría de los casos (70.30%) al contrario de lo que ocurre en con los tumores del grupo no basal, en el cual los tumores sin necrosis son porcentualmente menos predominantes (47.10%) ($p < 0.015$)

El grupo basal presentaba en una mayor proporción de tumores con nucléolo evidente con poco aumento 43.20%, en comparación con el grupo no basal que solo se identificó en un 16.70% de los tumores ($p < 0.002$).

En el resto de variables estudiadas no se identifican diferencias estadísticamente significativas.

2.2.2. Grupo luminal

En este apartado vamos a realizar un estudio comparativo entre los tumores del grupo molecular luminal y los tumores que no configuran dicho grupo (grupos basal, luminal-infiltrante, luminal-papilar y neural).

Tras el estudio IHQ se ha observado que 13 (9,3%) de los 139 tumores pertenecen al grupo tumoral luminal.

Factor	Grupo tumoral luminal		p valor	
	Si (n=13)	No (n=126)		
Edades	<49 años	7.70%	5.60%	0.526
	50-59 años	15.40%	12.70%	
	60-69 años	46.20%	38.90%	
	70-79 años	30.80%	23.00%	
	>80 años	0.00%	18.80%	
Sexo	Hombre	7.70% ↓	34.90% ↑	0.046
	Mujer	92.30%	65.10%	
Localización	Vejiga	100.00%	92.90%	0.609
	Uretra	0.00%	4.80%	
	Uréter	0.00%	2.30%	

Factor		Grupo tumoral luminal		p valor
		Si (n=13)	No (n=126)	
Histología	Papilar	84.60%	54.00%	0.197
	Mixto	7.70% ↓	30.20% ↑	
	Solido	7.70%	13.50%	
	Epidermoide	0.00%	2.40%	
Infiltración	No infiltración (pTa)	46.20%	34.10%	0.609
	Infiltración de lámina propia (pT1)	53.80%	49.20%	
	Infiltración de músculo (pT2)	0.00%	11.90%	
	Infiltra. de tejidos perivesicales (pT3)	0.00%	4.00%	
	Infiltración de otros órganos (pT4)	0.00%	0.80%	
Grado tumoral	Bajo	53.80%	41.30%	0.382
	Alto	46.20%	58.70%	
Necrosis tumoral evidente	Si	53.80%	53.20%	0.963
	No	46.20%	43.80%	
Crecimiento tumoral	Endofítico	7.70%	15.10%	0.470
	Exofítico	92.30%	84.90%	
Invasión linfo-vascular	Si	0.00%	2.40%	0.574
	No	100.00%	97.60%	
Invasión neural	Si	0.00%	0.00%	1.000
	No	100.00%	100.00%	
Nucleolo evidente	No	53.80%	54.00%	0.643
	Si +	30.80%	21.40%	
	Si ++	15.40%	24.60%	
Linfocitos peritumorales	0-5%	30.80%	48.40%	0.272
	6-30%	53.80%	31.70%	
	>30%	15.40%	19.80%	
Linfocitos intratumorales	0-5%	92.30%	84.90%	0.679
	6-20%	7.70%	10.30%	
	>20%	0.00%	4.80%	

Tabla 7. Correlación entre presencia de grupo tumoral luminal con parámetros de influencia. En los casos en los que la “p valor” fuera inferior 0.05, se indicara mediante unas fechas la significación estadística. ↑ con significación estadística hacia arriba. ↓ con significación estadística hacia abajo.

Se han podido ver diferencias estadísticamente significativas en el estudio del género de los pacientes, observándose que casi la totalidad de pacientes con tumores del grupo luminal corresponden a mujeres (92.30%) presentándose solo un 7.7% en varones, en comparación con los tumores del grupo no luminal donde la proporción de pacientes varones es del 34.90% ($p=0.046$)

El resto de parámetros son similares, sin evidenciarse diferencias estadísticamente significativas.

2.2.3. Grupo luminal papilar

En este apartado vamos a realizar un estudio comparativo entre los tumores del grupo molecular luminal papilar y el resto de tumores que no forman parte de este grupo, al igual que hicimos con los otros grupos tumorales (grupos basal, luminal, luminal-infiltrante y neural). Se identificaron 45 tumores del grupo tumoral luminal papilar (32.3%) y 94 (67.7%) tumores que no correspondieron al grupo tumoral luminal.

Factor	Grupo tumoral luminal papilar		p valor	
	Si (n=45)	No (n=94)		
Edades	<49 años	2.20%	7.40%	0.304
	50-59 años	13.30%	12.80%	
	60-69 años	31.10%	43.60%	
	70-79 años	31.10%	20.20%	
	>80 años	22.20%	16.00%	

Factor		Grupo tumoral luminal papilar		p valor
		Si (n=45)	No (n=94)	
Sexo	Hombre	40.00%	28.70%	0.184
	Mujer	60.00%	71.30%	
Localización	Vejiga	100.0%	90.40%	0.100
	Uretra	0.00%	6.40%	
	Uréter	0.00%	3.20%	
Histología	Papilar	91.10%	40.40%	0.362
	Mixto	2.20%	40.40%	
	Solido	6.70%	16.0%	
	Epidermoide	0.00%	3.20%	
Infiltración	No infiltración (pTa)	60.00%	23.40%	0.734
	Infiltración de lámina propia (pT1)	37.80%	55.30%	
	Infiltración de músculo (pT2)	2.20%	14.90%	
	Infiltra. de tejidos perivesicales (pT3)	0.00%	5.30%	
	Infiltración de otros órganos (pT4)	0.00%	1.10%	
Grado tumoral	Bajo	71.10%	28.70%	<0.001
	Alto	28.90%	71.30%	
Necrosis tumoral evidente	Si	42.20%	58.20%	0.072
	No	57.80%	41.80%	
Crecimiento tumoral	Endofítico	6.70%	18.10%	0.073
	Exofítico	93.30%	81.90%	
Invasión linfo-vascular	Si	0.00%	3.20%	0.226
	No	100.00%	96.80%	
Invasión neural	Si	0.00%	0.00%	1.000
	No	100.00%	100.00%	
Nucleolo evidente	No	68.90%	46.80%	0.252
	Si +	22.20%	22.30%	
	Si ++	8.90%	30.90%	
Linfocitos peritumorales	0-5%	46.70%	46.80%	0.992
	6-30%	33.30%	34.00%	
	>30%	20.00%	19.10%	

Factor		Grupo tumoral luminal papilar		p valor
		Si (n=45)	No (n=94)	
Linfocitos intratumorales	0-5%	86.70%	85.10%	0.685
	6-20%	11.10%	9.60%	
	>20%	2.20%	5.30%	

Tabla 8. Correlación entre presencia de grupo tumoral luminal con parámetros relevantes. En los casos en los que la “p valor” fuera inferior 0.05, se indicara mediante unas flechas la significación estadística. ↑ con significación estadística hacia arriba. ↓ con significación estadística hacia abajo.

En el estudio de las variables histológicas entre ambos grupos, los tumores del grupo luminal papilar y tumores del grupo no luminal papilar, se han identificado diferencias estadísticamente significativas.

Los tumores del grupo luminal papilar presentan en la mayoría de casos (91.10%) un patrón histológico papilar, en comparación con los tumores del grupo no luminal papilar que solo lo presentaban en 40.40% (N.S.).

Los tumores del grupo luminal papilar no suelen presentar infiltración de la lámina propia (60%) en comparación con los tumores del grupo tumoral no luminal papilar en los que la mayoría de estos tumores si la presentan (76.60%) ($p < 0.001$).

El grupo luminal papilar está formado en su mayoría por tumores que presentan bajo grado tumoral, en comparación con el otro grupo (71.10% vs. 28.70%) ($p < 0.001$).

2.2.4. Grupo luminal infiltrante

Al igual que en los casos anteriores, realizamos una comparación entre dos grupos formados por tumores luminal infiltrantes y otro en el que engloba el resto de tumores (grupos basal, luminal, luminal- papilar y neural).

Tras el estudio IHQ se han identificado 31 tumores pertenecen al grupo tumoral luminal infiltrante (22.3%) y 108 (87.7%) tumores no pertenecen a dicho grupo.

Factor		Grupo tumoral luminal infiltrante		p valor
		Si (n=31)	No (n=108)	
Edades	<49 años	9.70%	4.60%	0.140
	50-59 años	12.90%	13.00%	
	60-69 años	54.80%	35.22%	
	70-79 años	12.90%	26.90%	
	>80 años	9.70%	20.40%	
Sexo	Hombre	32.30%	66.70%	0.988
	Mujer	32.40%	66.6%	
Localización	Vejiga	80.60%	97.20%	<0.001 (Ur)
	Uretra	16.10%	0.90%	0.153
	Uréter	3.20%	1.90%	0.621
Histología	Papilar	61.30%	55.60%	0.784
	Mixto	25.80%	28.70%	
	Solido	12.90%	13.00%	
	Epidermoide	0.00%	2.80%	

Factor		Grupo tumoral luminal infiltrante		p valor
		Si (n=31)	No (n=108)	
Infiltración	No infiltración (pTa)	16.10% ↓	40.70% ↑	0.016 (pT1), 0.003 (pT3)
	Infiltración de lámina propia (pT1)	64.50%	45.40%	
	Infiltración de músculo (pT2)	9.70%	11.10%	0.364
	Infiltra. de tejidos perivesicales (pT3)	9.70%	1.90%	0.142
	Infiltración de otros órganos (pT4)	0.00%	0.90%	0.852
Grado tumoral	Bajo	38.70%	43.50%	0.633
	Alto	61.30%	56.50%	
Necrosis tumoral evidente	Si	48.40%	51.60%	0.539
	No	51.60%	48.40%	
Crecimiento tumoral	Endofítico	16.10%	14.90%	0.754
	Exofítico	83.90%	86.10%	
Invasión linfo-vascular	Si	3.20%	1.90%	0.643
	No	96.80%	98.10%	
Invasión neural	Si	0.00%	0.00%	1.000
	No	100.00%	100.00%	
Nucleolo evidente	No	48.40%	55.60%	0.588
	Si +	29.00%	20.40%	
	Si ++	22.60%	24.00%	
Linfocitos peritumorales	0-5%	64.50%	41.70%	0.068
	6-30%	19.40%	38.00%	
	>30%	16.10%	20.40%	
Linfocitos intratumorales	0-5%	90.30%	84.30%	0.400
	6-20%	9.70%	10.20%	
	>20%	0.00%	5.60%	

Tabla 9. Correlación entre presencia de grupo tumoral luminal infiltrante con parámetros relevantes. En los casos en los que la “p valor” fuera inferior 0.05, se indicara mediante unas flechas la significación estadística. ↑ con significación estadística hacia arriba. ↓ con significación estadística hacia abajo.

En el estudio de localización en el momento del diagnóstico, se observó que, los tumores del grupo luminal infiltrante, porcentualmente se localizan más predominantes a nivel de la uretra (16.1%) en comparación con los tumores del grupo no luminal infiltrante (0.9%) donde el porcentaje de casos es menor ($p=0.011$).

Los tumores del grupo luminal infiltrante presentaban en un 83.90%, infiltración de la lámina propia frente al 59.30% de los tumores del grupo no luminal infiltrante ($p<0.011$).

En el estudio de la infiltración tumoral, se observó que los tumores del grupo tumoral luminal infiltrante presentaron en un 9.7% de los casos, infiltración a tejido perivesicales en comparación con los tumores del grupo no luminal infiltrante en los que solo se identificó en un 1.7% ($p=0.035$). En el resto de parámetros estudiados no se identificaron diferencias estadísticamente significativas.

2.2.5. Grupo neural

El último grupo molecular estudiado es el grupo neural. Vamos a realizar una comparativa entre los tumores que pertenecen a este grupo y el resto de tumores (grupos basal, luminal, luminal-infiltrante y luminal- papilar).

Mediante el estudio IHQ se han identificado un total de 13 (9,3%) de tumores, que pertenecen al grupo tumoral neural.

Factor	Grupo tumoral neural			
	Si (n=13)	No (n=126)	p valor	
Edades	<49 años	7.70%	5.60%	0.881
	50-59 años	7.70%	13.50%	
	60-69 años	46.20%	38.90%	
	70-79 años	15.40%	24.60%	
	>80 años	23.10%	17.50%	
Sexo	Hombre	38.50%	31.70%	0.622
	Mujer	61.50%	68.30%	
Localización	Vejiga	92.30%	93.70%	0.265
	Uretra	0.00%	4.80%	
	Uréter	7.70%	1.60%	
Histología	Papilar	46.20%	57.90%	<0.001 (E)
	Mixto	15.40%	29.40%	<0.001 (E)
	Solido	15.40%	12.70%	0.001
	Epidermoide	23.10%	0.00%	0.001
Infiltración	No infiltración (pTa)	15.40% ↓	37.30% ↑	0.009 (pT3) <0.001(pT4)
	Infiltración de lámina propia (pT1)	38.50% ↓	50.80% ↑	0.028 (pT3), 0.001 (pT4)
	Infiltración de músculo (pT2)	30.80%	8.70%	0.153
	Infiltra. de tejidos perivesicales (pT3)	7.70%	3.20%	0.567
	Infiltración de otros órganos (pT4)	7.70%	0.00%	0.632
Grado tumoral	Bajo	15.40% ↓	45.20% ↑	0.038
	Alto	84.60% ↑	54.80% ↓	
Necrosis tumoral evidente	Si	53.80%	53.20%	0.963
	No	46.20%	46.80%	
Crecimiento tumoral	Endofítico	38.50% ↑	11.90% ↓	0.009
	Exofítico	61.50%	88.10%	
Invasión linfo-vascular	Si	15.40% ↑	0.80% ↓	0.001
	No	84.60%	99.20%	
Invasión neural	Si	0.00%	0.00%	1.000
	No	100.00%	100.00%	

		Grupo tumoral neural		
Factor		Si (n=13)	No (n=126)	p valor
Nucleolo evidente	No	38.50%	55.60%	0.497
	Si +	30.80%	21.40%	
	Si ++	30.80%	23.00%	
Linfocitos peritumorales	0-5%	46.20%	46.80%	0.933
	6-30%	30.80%	34.10%	
	>30%	23.10%	19.10%	
Linfocitos intratumorales	0-5%	76.90%	86.50%	0.635
	6-20%	15.40%	9.50%	
	>20%	7.70%	4.00%	

Tabla 10. Correlación entre presencia de grupo tumoral neural con parámetros de influencia. En los casos en los que la “p valor” fuera inferior 0.05, se indicara mediante unas fechas la significación estadística. ↑ con significación estadística hacia arriba. ↓ con significación estadística hacia abajo.

El grupo tumoral neural presenta un alto porcentaje de carcinoma urotelial con diferenciación epidermoide (23.10%), diferenciación que no se observa en el resto de tumores del grupo no neural 0% ($p < 0.001$).

Los tumores del grupo neural presentan mayores grados de infiltración que el resto de tumores del grupo tumoral no neural, identificándose un porcentaje del 7.7% de tumores que infiltran a otros órganos frente al 0% del grupo no neural ($p = 0.001$).

En el estudio histológico, se observa que un alto porcentaje de los tumores del grupo neural presentan un crecimiento endofítico (38.50%) en comparación con el otro grupo (11.90%) ($p = 0.009$).

A la hora de evaluar la invasión linfovascular, se evidencia que los tumores del grupo neural presentan en mayor proporción invasión linfovascular (15.50%) en comparación con los tumores del grupo no neural (0.80%) ($p=0.001$).

En el resto de parámetros, no se identifican otras diferencias estadísticamente significativas.

2.3. Comparación entre la presencia de los diferentes grupos moleculares con la histología presentada

En la figura 40 se visualiza la distribución de los patrones histológicos según los grupos moleculares. Si realizamos un análisis de comparación intragrupo concluimos que:

- ✓ **El grupo basal** está compuesto mayoritariamente por tumores uroteliales de patrón mixto (73%). Identificándose un pequeño porcentaje de tumores de patrón sólido (21.6%) y papilar (5.40%). No se identifica ningún tumor con diferenciación epidermoide.
- ✓ **El grupo luminal** está casi íntegramente constituido por tumores uroteliales de patrón papilar (84.60%), indicándose de manera aislada tumores de patrón sólido (7.70%) y mixto (7.70%). No se identifican tumores con diferenciación epidermoide.
- ✓ **El grupo luminal infiltrante** presenta mayor variedad, presentando mayoritariamente tumores uroteliales con patrón papilar (61.30%) pero a su vez también presenta tumores con patrón mixto (25.80%) y sólido (12.90%). Ninguno de los tumores del grupo luminal infiltrante presenta diferenciación epidermoide.

- ✓ **El grupo luminal papilar** está constituido mayoritariamente por tumores uroteliales de patrón papilar (91.10%) con presencia focal del tumor con patrón mixto (2.2%) y patrón sólido (6.70%). Al igual que el resto de grupo descritos, este tampoco presenta tumores con diferenciación epidermoide.
- ✓ **El grupo neural**, es el único grupo que presenta tumores uroteliales con diferenciación epidermoide, constituyendo el 23,10% de los tumores de este grupo. El resto de tumores de este grupo presentan patrón papilar (46.20%), sólido (15.40%) o mixto (15.40%).

Si realizamos un análisis intergrupos observamos que,

- ✓ Identificamos **tumores con patrón papilar** en todos los grupos moleculares, siendo más frecuentes en los tumores del grupo luminal (constituido por los subgrupos luminal (84.60%), luminal infiltrantes (61.30%) y luminal papilar (91.10%)), y relativamente poco frecuente en el grupo basal.
- ✓ **Los tumores de patrón mixto**, los podemos encontrar en todos los grupos tumorales, siendo más frecuentes en el grupo basal (73%) y menos en el subgrupo luminal (2.2%)
- ✓ **Los tumores de patrón sólido** son tumores de distribución relativamente similar entre los grupos tumorales. Siendo ligeramente mayor en el grupo basal (21.60%) y ligeramente menor en el subgrupo luminal (7.70%).
- ✓ **Los tumores uroteliales** con diferenciación epidermoide se agrupan únicamente en el grupo neural (23.20%), no estando presentes en el resto de grupos moleculares.

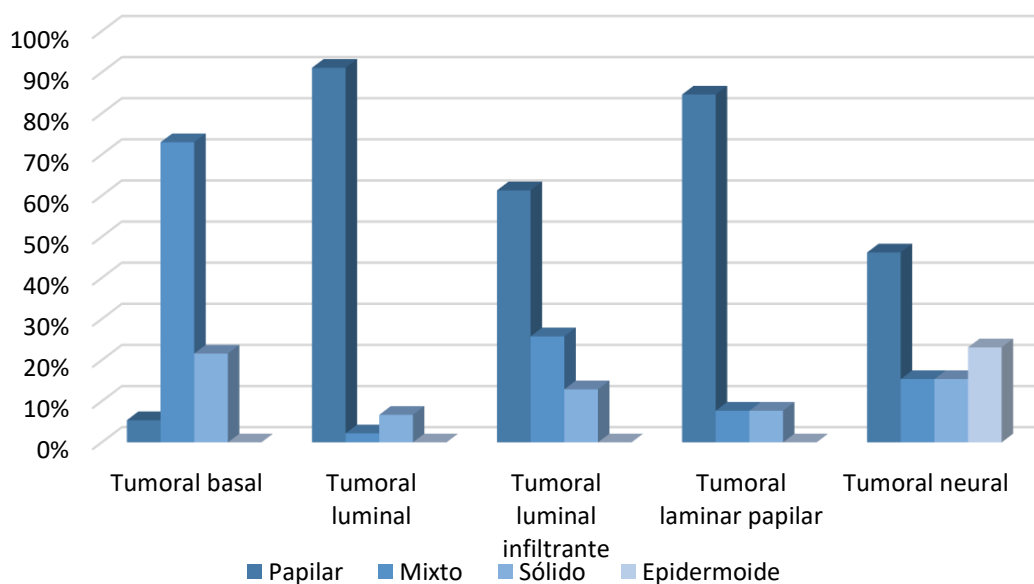


Figura 40. Frecuencias entre la presencia de los diferentes grupos tumorales con la histología presentada.

2.4. Relación entre los grupos moleculares y el grado de infiltración que presentan

En la Figura 41 se visualiza la distribución de los patrones de infiltración tumoral según los grupos moleculares.

Se realiza un análisis intragrupo en el que observamos que:

- ✓ **El grupo basal** está compuesto mayoritariamente por tumores cuya infiltración se limita a la lámina propia (54.10%) aunque también identificamos tumores no infiltrantes (24.30%) y tumores con infiltración muscular (18.90%). Se observa un mínimo porcentaje de tumores que infiltran tejido perivesicales (2.70%)

- ✓ **El grupo luminal** están compuesto únicamente por tumores que no infiltran la muscular propia. Este grupo está constituido únicamente por tumores no infiltrantes (46,20%) y tumores con infiltración limitada a la lámina propia (53.80%).
- ✓ **El grupo luminal infiltrante** está compuesto mayoritariamente por tumores infiltrantes (83.90%), de los cuales 64.50% se limita a la lamina propia, 9.70% infiltra la muscular y 9.70% infiltra tejidos perivesicales.
- ✓ **El grupo luminal papilar**, está compuesto mayoritariamente por tumores infiltrantes (60%) o tumores infiltrantes limitados a la lámina propia (37.80%), identificándose de manera esporádica tumores con infiltración a la muscular (2.20%)
- ✓ **El grupo neural** está compuesto principalmente por tumores infiltrantes (84.60%) siendo el único grupo con presencia de tumores con infiltración a otros órganos (7.7%).

Al realizar un análisis intergrupo vemos que:

- ✓ **Los tumores no infiltrantes** están presentes en todos los grupos, siendo más frecuente en los tumores del grupo luminal (46.20%) y luminal papilar (60%).
- ✓ **Los tumores con infiltración limitada a la lámina propia** presentan una distribución en todos los grupos, sin identificarse un claro predominio en ninguno de ellos.
- ✓ **Los tumores con infiltración limitada a la muscular** se pueden encontrar en el grupo basal (18.90%), grupo luminal infiltrante (9.70%) y en el grupo neural (30.80%) en el que son más predominantes. De manera focal podemos encontrar algún tumor en el grupo luminal papilar.

- ✓ **Los tumores con infiltración a tejidos perivesicales** se identifican en los grupos basal (2.70%), luminal infiltrante (9.70%) y neural (7.70%) pero no los encontramos en los grupos luminal ni luminal papilar.
- ✓ **Los tumores con infiltración a otros órganos** solo están presentes en el grupo neural (7.70%). El resto de grupos no presentan tumores con estas características.

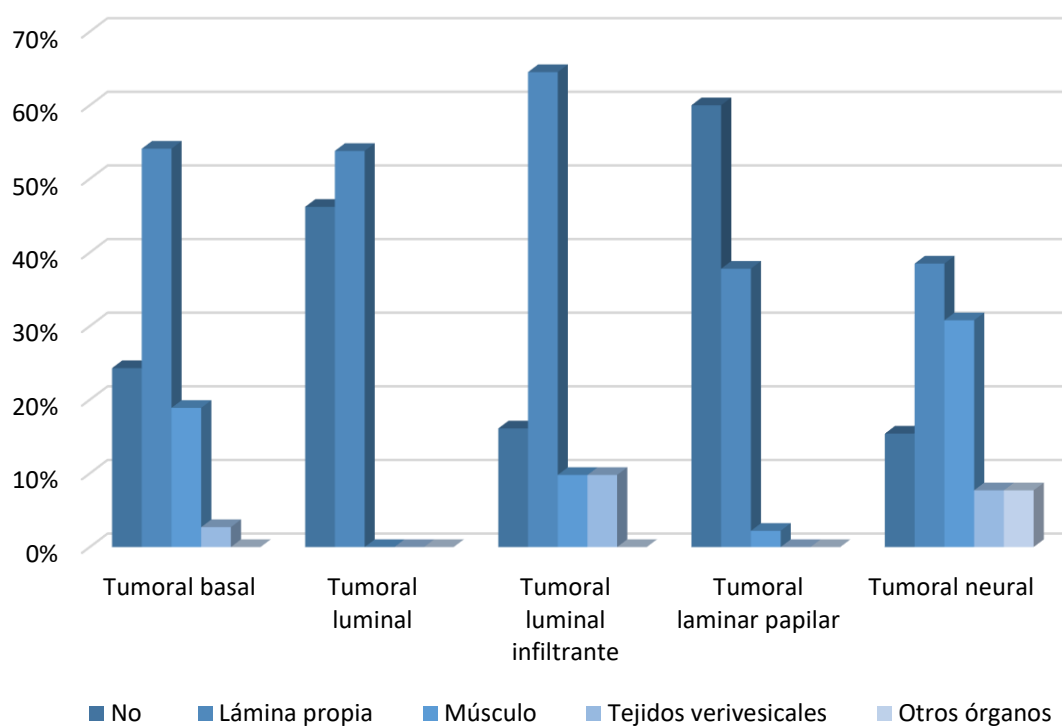


Figura 41. Frecuencias entre la presencia de los diferentes grupos tumorales con la infiltración que induce.

2.5. Relación entre los grupos moleculares y la presencia de tumores con pérdida de expresión de proteínas MMR

		Pérdida de expresión de proteínas MMR		
		No mutado, n (%)	Mutado, n (%)	p valor
Tumoral basal	No, n (%)	86 (70.6)	13 (100.0)	0.023
	Si, n (%)	37 (29.4) ↑	0 (0.0) ↓	
Tumoral luminal	No, n (%)	86 (68.3)	8 (61.5)	0.622
	Si, n (%)	40 (31.7)	5 (38.5)	
Tumoral luminal infiltrante	No, n (%)	102 (81.0) ↑	6 (46.2) ↓	0.004
	Si, n (%)	24 (19.0) ↓	7 (53.8) ↑	
Tumoral laminar papilar	No, n (%)	113 (89.3)	13 (100.0)	0.224
	Si, n (%)	13 (10.3)	0 (0.0)	
Tumoral neural	No, n (%)	114 (90.5)	12 (92.3)	0.829
	Si, n (%)	12 (9.5)	1 (7.7)	

Tabla 11. Relación en la presencia de tumores con pérdida de expresión de proteínas MMR en los diferentes grupos moleculares de la TCGA. En los casos en los que la “p valor” fuera inferior 0.05, se indicara mediante unas fechas la significación estadística. ↑ con significación estadística hacia arriba. ↓ con significación estadística hacia abajo.

Se estudió si existe una correlación entre la clasificación molecular y la presencia de tumores con pérdida de expresión de proteínas MMR (Tabla 11), identificándose los siguientes resultados:

- ✓ **El grupo basal:** está constituido por 37 tumores, de los cuales ninguno presentó pérdida de expresión de proteínas MMR, con resultados no estadísticamente significativos.

- ✓ **El grupo luminal:** el grupo luminal está constituido por 40 tumores, de los cuales 5 presentaron pérdida de expresión de proteínas MMR, lo que significa que el 38.5% de los tumores con pérdida de expresión de proteínas MMR pertenece al grupo luminal, con resultados no estadísticamente significativos.
- ✓ **El grupo luminal infiltrante:** al evaluar los porcentajes del estudio se vio, que un 46.2% de los tumores de este grupo no presentaron pérdida de expresión de proteínas MMR, frente al 53.8 que si lo presentaban ($p=0.004$).
- ✓ **El grupo luminal papilar:** Se evidenció la ausencia de tumores de este grupo que presentaban pérdida de expresión de proteínas MMR, con resultados no estadísticamente significativos.
- ✓ **El grupo neural:** en el estudio de este grupo se identificó, que solo uno de los tumores presentaba pérdida de expresión de proteínas MMR, con resultados no estadísticamente significativos.

Con estos datos, podemos determinar, que los grupos moleculares que presentan tumores con pérdida de expresión de proteínas MMR son los grupos luminal, luminal infiltrante y neural (siendo este último de manera focal y por lo tanto de difícil interpretación). El resto de grupos moleculares (basal y luminal papilar) no presentan tumores con pérdida de expresión de las proteínas MMR.

2.6. Gravedad evolutiva

Evaluamos si existe alguna relación entre la presencia de tumores con pérdida de expresión de proteínas MMR con el pronóstico.

		Pérdida de expresión de proteínas MMR		
		Si	No	p valor
Muerte	Si	0.00%	8.70%	0.267
	No	100.00%	91.30%	
Recidivas a 5 años	Si	38.50%	40.50%	0.888
	No	61.50%	59.50%	

Tabla 12. Correlación entre presencia de tumores con pérdida de expresión de proteínas MMR con parámetros de gravedad evolutiva.

Para ello se realizaron dos grupos, el primero formado por los pacientes que presentaban tumores con pérdida de expresión de proteínas MMR y el segundo formado por el resto de pacientes.

Al evaluar la presencia de recidivas durante los 5 primeros años, no se vieron diferencias estadísticamente significativas. Lo mismo ocurre, al examinar los datos de pacientes fallecidos durante los primeros 5 años desde el diagnóstico.

DISCUSIÓN

1. PREVALENCIA DEL CARCINOMA UROTELIAL EN LA POBLACIÓN DE MÓSTOLES

Los carcinomas uroteliales son la quinta neoplasia más frecuente a nivel europeo y también la quinta si miramos los datos de España (Global cancer observatory, 2022). El carcinoma urotelial es un carcinoma que presenta, tanto en España como a nivel mundial una alta incidencia y una alta prevalencia (Josep María Borrás Andrés, 2009; Bray et al., 2018)

Se ha realizado un estudio de las variables clínico-patológicas en un número limitado de pacientes, procedentes del Hospital Universitario de Móstoles (Área VIII de Madrid), con el fin de comprobar que las características estudiadas en esta población se ajustan a las características descritas en la población general.

Al valorar los datos clínicos, vemos múltiples similitudes y diferencias entre la población general y la población estudiada de Móstoles.

La población de Móstoles presenta múltiples semejanzas a los resultados visto en la población general. La mayor parte de los pacientes diagnosticados de carcinoma urotelial presentan una edad media de entre 60 y 70 años (Inamura and Kentaro, 2018) siendo la vejiga la localización más frecuente, seguida de la uretra, y por último uréter como localización esporádica. En el estudio histológico presentan más frecuentemente un patrón histológico papilar, (Picazo et al., 2007) con un patrón de crecimiento predominante exofítico (Picazo et al., 2007) y en la mayoría de los casos, los tumores uroteliales son no músculo invasivos (Parakh R, 2019) con una baja presencia de

linfocitos intratumorales y linfocitos peritumorales y la invasión linfovascular y/o perineural es excepcional (Moch et al., 2016).

A su vez también se ven algunas diferencias al comparar la población de Móstoles con la población general. En la población de Móstoles, la mayor parte de los pacientes diagnosticados son mujeres. Si comparamos este dato con el de la población general y la población española vemos que el tumor urotelial es más frecuente en varones (Moch et al., 2016; Médica, 2019; Jointly issued by the American Cancer Society (ACS), the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), the North American Association of Central Cancer Registries (NAACCR), 2021). Esta diferencia se podría atribuir a las características de la población estudiada, puesto que nuestra población de Móstoles mayor de 60 años, está constituida en su mayoría por mujeres (Móstoles, 2021).

En el estudio del grado tumoral, la población de Móstoles presenta, en poco más de la mitad de casos, carcinomas uroteliales de alto grado. Al comparar este dato, vemos que en el estudio de Parack R et al. (Parakh R, 2019) la mayor parte de los tumores estudiados, son tumores de bajo grado, pero vemos a su vez que esta proporción varía según el nivel de infiltración. Por ejemplo, en tumores T1, la mayoría de autores concuerdan que los tumores de alto grado son mayoritarios (Torti et al., 1987; Kaubisch et al., 1991).

Se estudia la falta de expresión de las proteínas MMR mediante el uso de técnicas IHQ. De los 142 pacientes estudiados, se identificaron 13 pacientes (9,4%) con falta de expresión en las proteínas MMR. Si lo comparamos con la literatura, vemos que los resultados oscilan entre el 1,8% y el 28%, lo cual supone un rango muy amplio (Morales et al., 2006; Joost P et al., 2015; Moch et al., 2016; Harper et al., 2017; Pradere et al.,

2017; Ju et al., 2018; Metcalfe et al., 2018; Urakami et al., 2018). Nuestros resultados se asemejan a los publicados en el estudio realizado por Harper et al. (Harper et al., 2017). Aunque resulta muy difícil realizar una correcta comparación debido a la amplia horquilla de datos, nuestros resultados son proporcionales a los de la población mundial.

Cuando analizamos la clasificación molecular de la TCGA mediante el estudio por IHQ, no se observan diferencias llamativas entre la población de Móstoles y los datos aportados por otros estudios respecto a la población de América del norte y Japón (Robertson et al., 2017; Inamura and Kentaro, 2018).

- ✓ El grupo molecular basal en la población de Móstoles corresponde a un 33.81%, en la población general a un 35%.
- ✓ El grupo molecular luminal papilar en la población de Móstoles corresponde a un 31,65%, en la población general a un 35%.
- ✓ El grupo molecular luminal infiltrante en la población de Móstoles corresponde a un 14.38%, en la población general a un 19%.
- ✓ El grupo molecular luminal en la población de Móstoles corresponde a un 14.38%, en la población general a un 6%.
- ✓ El grupo molecular neural en la población de Móstoles corresponde a un 5.75%, en la población general a un 5%.

Como se puede ver al comparar los resultados, ambos presentan unos porcentajes similares, y por lo tanto podemos objetivar que las pequeñas variaciones en los porcentajes se deben a características propias de la población.

Por todo lo anteriormente expuesto, podemos considerar que nuestra serie es representativa, ya que las variables estudiadas se ajustan, en líneas generales, a las presentadas por la población general y presentan tendencias habituales de los tumores uroteliales.

2. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE MUTACIONES DE LAS PROTEÍNAS MMR

Los genes MMR son una serie de nucleótidos polimórficos, repetidos en tándem repartidos por en el genoma (Morales et al.,2006). La misión de estos genes (Castro-Mujica et al., 2018) es ofrecer protección frente a mutaciones en la replicación del ADN, reparando los errores que se pueden producir durante la replicación del ADN y, de esta forma, evita que se acumulen. Una inactivación de uno o varios de estos genes haría que no se corrigieran los errores producidos en la replicación y se acumularía de forma acelerada mutaciones en los nucleótidos (García-Tello et al., 2014; Joost P et al., 2015).

Existen varios mecanismos que inactivan la expresión de los genes MMR. Esta inactivación se puede deber a una mutación en dichos genes en todas las células del organismo tanto germinales como somáticas o se puede producir una mutación puntual en un porcentaje de células, sin afectar a la totalidad de las células del organismo y, por último, se puede producir a causa de una metilación de uno de esos genes (Peltomäki, 2014). La mutación puntual y la metilación de uno de los genes, no supondrían un aumento del riesgo de padecer tumores en otras localizaciones a edades más tempranas que la población general.

La epigenética está cada día más presente en los artículos de investigación (Andrés et al., 2013; Peltomäki, 2014; Joost P et al., 2015; Castro-Mujica et al., 2018). La epigenética estudia los diferentes mecanismos celulares que producen variaciones en la expresión genética sin que esto afecte a la secuencia del ADN. Uno de estos métodos es la modificación de la transcripción de la cromátida mediante la modificación de histonas. Para ello, se utilizan los miRNA (micro-RNAs) y la metilación. Este proceso de metilación es un proceso reversible que consiste en la introducción o eliminación de un grupo metilo (-CH₃) en las citosinas presentes en dinucleótidos CpG en el genoma (Andrés et al., 2013).

La metilación del DNA es un mecanismo destinado a la protección de la integridad del genoma, el mantenimiento de patrones de expresión específicos de cada tejido o la definición de la impronta genética (Bird, 2002; Esteller, 2005; Sánchez-Carbayo, 2012). La distribución de los patrones de metilación es propia de cada tejido y es determinada durante el desarrollo embrionario, un ejemplo muy conocido de este fenómeno, sería la inactivación del cromosoma X (Bird, 2002). Se ha visto que, en algunas ocasiones, este mecanismo de metilación puede relacionarse con la activación de uno o varios protooncogenes (Esteller, 2007).

Para el estudio de los genes MMR, es esencial diferenciar si existe mutación o metilación de dichos genes. Actualmente, múltiples autores (Kohlmann et al., 2004; Buza et al., 2016; Castro-Mujica et al., 2018) establecen que el estudio de las proteínas MMR mediante el uso de la IHQ es lo primero que se debe realizar a los pacientes ya que ofrece una sensibilidad del 93% (Kohlmann et al., 2004). De esta forma, se clasifican los

pacientes según tengan altas o bajas probabilidades de presentar una mutación en los genes MMR. Una vez identificados a los pacientes con alto riesgo, es recomendable realizar un estudio molecular con el fin de realizar un diagnóstico de confirmación.

Varios autores (Rouprêt et al., 2008; Skeldon et al., 2013; Ju et al., 2018) recomiendan el estudio de las proteínas MMR en pacientes con carcinoma urotelial, pero actualmente en la mayoría de Servicios de Anatomía Patológica no se están realizando técnicas IHQ a todos los pacientes debido al gasto de tiempo y recursos que supondría. En este estudio, se propone clasificar e identificar a los pacientes con alto riesgo de presentar falta de expresión de las proteínas MMR mediante el estudio IHQ de los tumores uroteliales. Una vez clasificados los tumores como alto o bajo riesgo a presentar falta de expresión de las proteínas MMR mediante el estudio de los datos clínicos y de las características histológicas, se realizarán las técnicas IHQ a los pacientes de alto grado. De esta forma, se estudiará a todos los pacientes, y se optimizarán tanto los recursos económicos, como de personal.

Lo primero que hemos realizado en este estudio, son técnicas IHQ para las proteínas MMR, con el fin de poder identificar la falta de expresión de las proteínas MMR. Para ello se han seleccionado dos áreas de cada tumor, realizando dos Tissue microarrays, cada una con diferentes áreas de cada uno de los tumores. Se realizaron técnicas de IHQ para las proteínas MMR en cada una de los Tissue microarrays de tejido. Se consideraron carcinomas uroteliales con pérdida de expresión de las proteínas MMR por IHQ, aquellos tumores que presentaban la mencionada pérdida en los dos Tissue microarrays. El número y las áreas de ubicación de cada tumor para los estudios IHQ son apropiados.

Christoph Fraune et al., 2020 (Fraune et al., 2020) han demostrado que los tumores uroteliales muestran una completa homogeneidad de las alteraciones de la proteína MMR y después de resecciones secuenciales no observaron cambios notables en el estado de la 4 MMR proteínas.

El estudio IHQ para la expresión de las proteínas MMR mostró una pérdida de expresión en 13 tumores. La mayor parte de los cuales presentaban una pérdida de expresión de la proteína MLH1, seguido de MSH2 y PMS2 en la misma proporción y por último en frecuencia se sitúan la pérdida de expresión de la proteína MSH6. En los estudios (Skeldon et al., 2013; Peltomäki, 2014; Joost P et al., 2015; Harper et al., 2017; Urakami et al., 2018) que existen en la actualidad vemos que los genes que presentan mutación más frecuentemente son los genes MLH1 y MSH2 y los genes que presentan mutación con menor frecuencia son PMS2 y PMS6. Al comparar los estudios que existen y el nuestro, se observamos un ligero aumento de los casos que presentan pérdida de expresión de la proteína PMS2, consideremos esta diferencia propia de nuestra población.

Durante la investigación, todas las técnicas de IHQ utilizadas tenían un control externo y un control interno. Se ha visto que alguno de los tumores presentaba patrones inusuales de expresión de las proteínas MMR, identificándose por ejemplo, pacientes con pérdida aislada de PMS2. Se ha descrito con anterioridad la expresión de patrones inusuales en el carcinoma colorrectal que pueden causar confusión (Chen, Swanson et al., 2017). En un estudio de Dudley et al (Dudley et al., 2015), aproximadamente el 24% de los pacientes con tumores con pérdida aislada de la expresión de PMS2 tienen una

mutación en el gen MLH1. En el estudio realizado por Jinru Shia et al (Shia et al., 2013), evalúan la pérdida de MSH6 junto con MLH1 y PMS2. Proponen que podría deberse a la hipermetilación del promotor MLH1 que causa la pérdida de expresión de las proteínas MLH1 / PMS2. Los tumores con mutaciones en los genes MLH1 / PMS2 son propensos a mutaciones somáticas en el gen MSH6, lo que da como resultado una tinción IHQ para la proteína MSH6 significativamente reducida. La falta de expresión de IHC para PMS2 / MSH2 y MSH6 es una de las expresiones inusuales de las proteínas MMR. Podría deberse a una mutación de la línea germinal de MSH2 (que causa la ausencia de MSH2 / MSH6) junto con la hipermetilación somática de MLH1 (que causa la ausencia de PMS2). La baja incidencia en la literatura nos invita a realizar un estudio retrospectivo.

Posteriormente, se han analizado las características clínicas e histológicas estudiadas. Hemos identificado diferencias entre aquellos pacientes que presentaban falta de expresión de las proteínas codificadas por alguno de los genes (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2) mediante el uso de IHQ y los que sí presentaban dicha expresión.

La mayor parte de los pacientes con pérdida de expresión de las proteínas MMR son hombres, presentando 7 veces más riesgo que las mujeres. Al comparar estos resultados con los resultados publicados por otros autores (Joost P et al., 2015; Harper et al., 2017; Ju et al., 2018), vemos que objetivan datos similares.

Al valorar la localización en el momento del diagnóstico, vemos que los tumores se encuentran más frecuentemente localizados en vejiga y uréteres. Al revisar la literatura vemos que la localización más frecuente es la vejiga seguido de los uréteres (Joost P et

al., 2015; Sjö Dahl, 2018). En contraposición con los estudios de Harper et al. (Harper et al., 2017) en el que identifica que la localización más frecuente son los uréteres seguido de la vejiga y el estudio de Ju et al. (Ju et al., 2018) en el cual la mayor parte de sus pacientes presentan con mayor frecuencia tumores a nivel de la pelvis renal. Estas diferencias las consideramos propias de la población estudiada y directamente relacionadas con el bajo número de pacientes que presentan todos los estudios; el estudio realizado por Ju et al. cuenta con 11 casos con falta de expresión de una o varias de las proteínas MMR, el estudio de Harper et al. cuenta con 14 casos y el estudio de Jooster et al. cuenta con 52 casos.

En el estudio del grado de infiltración tumoral en el momento del diagnóstico, los tumores que no infiltran la lámina propia presentan 9.8 veces más riesgo de presentar inestabilidad de microsatélites al compararlo con los pacientes que presentan infiltración de la lámina propia. Lo mismo ocurre con los tumores que infiltran tejido perivesicales que presentan 102 veces más riesgo de presentar inestabilidad de microsatélites. Harper et al. (Harper et al., 2017) identifica que la mayor proporción de pacientes con presentan tumores en estadio pT3, seguido de pTa.

En el análisis del patrón histológico, se han identificado diferencias no estadísticamente significativas, identificando que el patrón histológico predominante es el papilar, seguido del sólido y del mixto, pero en una proporción menor. Ninguno de los pacientes con inestabilidad presentaba una diferenciación epidermoide. Al comparar los datos con los obtenidos por Joost et al. (Joost P et al., 2015) y Harper et al. (Harper et al., 2017) observamos que la mayoría de los pacientes estudiados presentan un patrón papilar, y

en el caso del estudio de Harper et al. (Harper et al., 2017), se identificó dos pacientes con patrón papilar invertido.

Al valorar la distribución por edades no encontramos diferencias, siendo nula la presencia de tumores en pacientes menores de 49 años. Por lo que podemos afirmar que los tumores uroteliales con falta de expresión de las proteínas MMR, se dan entre los 50 y los 92 años. Al analizar los estudios existentes (Joost P et al., 2015; Harper et al., 2017; Ju et al., 2018), vemos que todos ellos comparten las mismas franjas de edades, con ligeras variaciones, que son comprensibles debido al bajo número de pacientes estudiados y de las diferentes poblaciones.

En el estudio de la presencia de linfocitos intratumorales, no se han encontrado diferencias entre los dos grupos. Se ha podido comprobar que los tumores con pérdida de expresión de las proteínas MMR y los pacientes sin pérdida de expresión presentan en la mayoría de casos, una baja proporción de linfocitos (0-5%, por CGA). Ju et al. (Ju et al., 2018) en su estudio, identifica que un 50% presentan una baja proporción de linfocitos intratumorales (1-19 linfocitos por 10 CGA) y el otro 50% presentan abundantes linfocitos intratumorales (30 o más linfocitos por 10 CGA). Esta diferencia puede deberse al diseño del estudio, puesto que en el nuestro se valoró la presencia de linfocitos intratumoral en un campo (hot-spot), técnica de conteo de linfocitos utilizada en la práctica diaria (Arriola et al., 2019), y en el estudio de Ju et al. contabilizan el número de linfocitos que hay en 10 CGA, por esta razón los resultados no son comparables.

Al valorar la necrosis tumoral, no hemos obtenido diferencias significativas, aunque se ha visto que la mayor parte de tumores con pérdida de expresión de las proteínas MMR presentan necrosis tumoral, al contrario de lo que ocurre en los tumores sin inestabilidad de microsatélites en los que la mayor parte de los tumores no presentan necrosis. No es posible realizar una comparativa puesto que no se han encontrado otras series que realicen un estudio de necrosis tumoral en tumores uroteliales en pacientes con falta de expresión de proteínas MMR mediante estudio IHQ.

En el estudio del grado tumoral, no se identifica diferencias estadísticamente significativas, siendo ligeramente mayor los tumores de alto grado tumoral. Al comparar los datos obtenidos con la literatura vemos que todos los grupos de tumores con pérdida de expresión de las proteínas MMR, presentan tumores de alto grado en la mayoría de los casos (Joost P et al., 2015; Harper et al., 2017; Ju et al., 2018).

A su vez se han encontrado diferencias con otros autores. Urakami et al. (Urakami et al., 2018) analizan en su estudio que dichos tumores son más frecuentes en mujeres, localizados más frecuentemente en los uréteres, que presentan un patrón papilar invertido de bajo grado citológico, presentaban en la mayoría de los casos estadios pTa o pT1. Las diferencias que encontramos a nivel del género, patrón y grado tumoral, se podrían deber a una diferencia poblacional, puesto que este estudio se realizó en Tokio, Japón. Estas diferencias entre la población europea con la asiática se pueden ver en otros tumores como el carcinoma epidermoide de pulmón, el cual, en Europa se presenta más frecuentemente en varones y en Asia su incidencia es más frecuente en mujeres (Cheng et al., 2016).

Al valorar los resultados, vemos que los pacientes con pérdida de expresión de las proteínas MMR presentan una serie de características propias y por lo tanto estas características nos servirán para poder identificarlos. Los pacientes que cumplan todos los criterios de riesgo se les considerarán pacientes con alto riesgo de presentar pérdida de expresión de las proteínas MMR. De esta forma, todos los pacientes varones con un tumor localizado en vejiga o uréteres en el momento del diagnóstico, de alto grado con patrón histológico papilar que no infiltra la lámina propia o, en el caso de tumores infiltrantes, que la infiltre hasta tejidos perivesicales, los vamos a considerar pacientes con altas probabilidades de presentar inestabilidad de microsatélites.

La identificación de los tumores con pérdida de expresión de las proteínas MMR en carcinomas uroteliales mediante el estudio histológico acompañado de datos de la historia clínica proporciona una herramienta de detección precoz para la clasificación de pacientes y, de esta forma, podemos realizar un cribado rápido y sin que ello suponga un aumento significativo de la carga de trabajo. De este mismo modo, se evidencia que tanto el estudio histopatológico como los datos clínicos de manera independiente, no son suficientes para lograr discriminar de manera fiable. Por lo que podemos confirmar que es imprescindible una integración adecuada de ambos datos.

Una vez clasificados los pacientes con mayor probabilidad de presentar pérdida de expresión de las proteínas MMR, se les deben realizar técnicas inmunohistoquímicas para confirmar la pérdida de expresión de las proteínas MMR. Este sistema de clasificación favorece la disminución de peticiones de técnicas inmunohistoquímicas, ya que, únicamente se realizarán dichas técnicas a aquellos pacientes con sospecha clínica

de inestabilidad de microsatélites basándose en los criterios de Ámsterdam y los de Bethesda o a los que cumplan las características histológicas y clínicas anteriormente mencionadas. En el caso de que no expresen uno o varios de los marcadores inmunohistoquímicos, se realizará un estudio molecular (Figura 42).

Después de determinar el estado de las proteínas MMR utilizando una de las técnicas de IHC, los tumores que presenten ausencia de expresión de una o más proteínas MMR se clasificará como dMMR (Chen, Swanson and Frankel, 2017). El estudio molecular más utilizado es el panel Bethesda, el cual consta de cinco repeticiones de microsatélites, incluidas 2 repeticiones de mononucleótidos (BAT25 y BAT26) y 3 repeticiones de dinucleótidos (D2S123, D5S346 y D17S250) (Boland et al., 1998). Los microsatélites que demuestran al menos dos alelos alterados (desplazamiento) se definen como H-MSI (se consideran como inestabilidad de microsatélites). El L-MSI se define como la detección de un único microsatélite alterado (desplazado) (Boland et al., 1998; Chen, Swanson and Frankel, 2017).

Este estudio abre un camino para futuras investigaciones. Se propone realizar un estudio molecular de los genes MMR y un estudio de PD-L1. Una vez obtenido los resultados, realizar una comparación de las características clínicas e histológicas de los pacientes con la finalidad de observar si el estudio de dichas características proporciona información suficiente para clasificar a los pacientes. Debido al pequeño tamaño de la mayoría de las muestras (en su mayoría obtenidas por resección transuretral), se considera importante no agotar la muestra de pacientes que participaron en el estudio.

Al realizar este sistema de cribado, podremos identificar un mayor número de pacientes con pérdida de expresión de las proteínas MMR de forma precoz, sin que esto suponga un aumento del coste económico y personal, al reducir el número de pruebas solicitadas, y a la larga, un diagnóstico temprano de los pacientes con alteraciones moleculares, lo que supondría una disminución en la morbimortalidad.

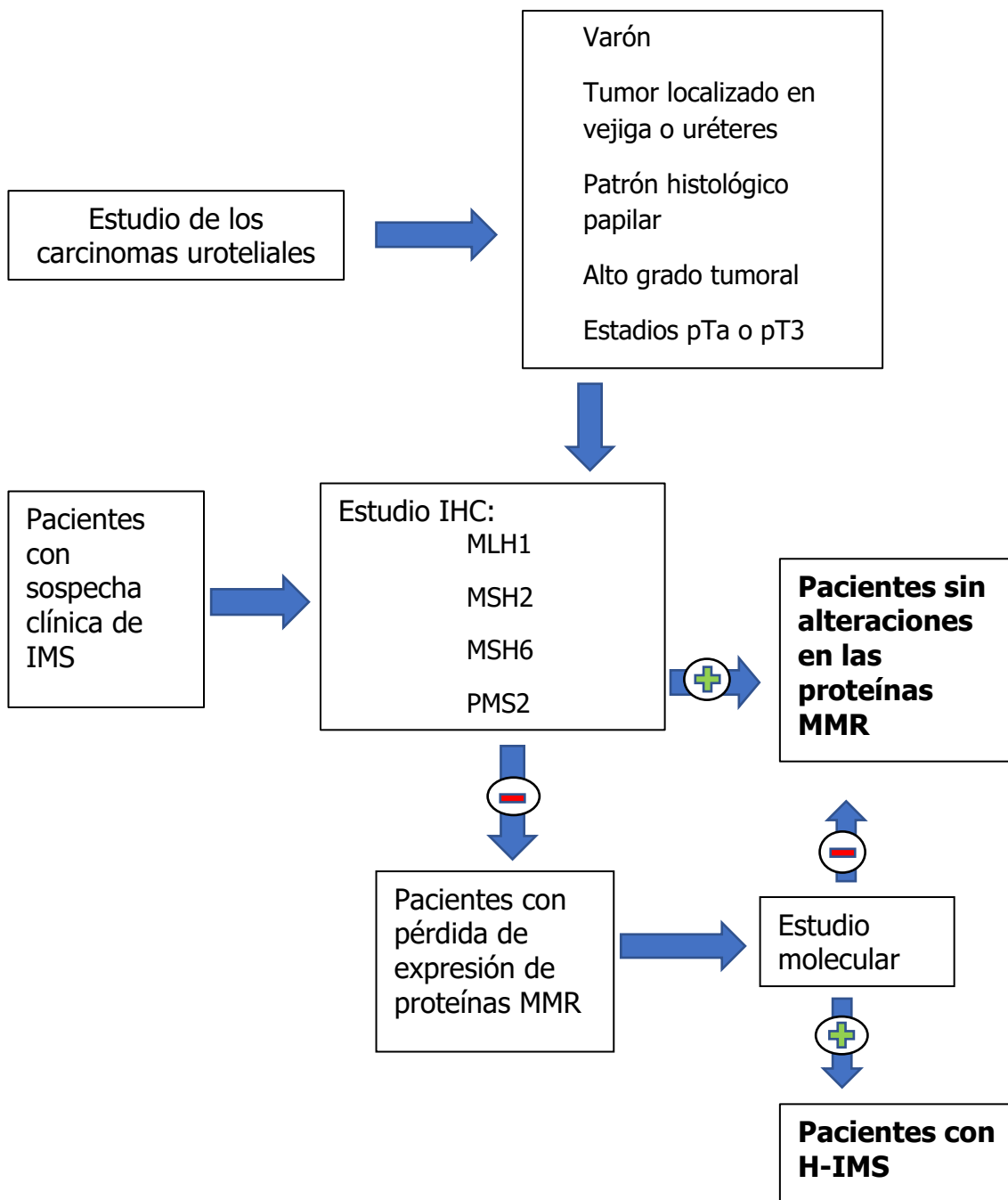


Figura 42. Protocolo para la identificación de los pacientes que presentan carcinoma urotelial con pérdida de expresión de las proteínas MMR.

3. RECIDIVAS Y MORTALIDAD EN LOS PACIENTES CON PÉRDIDA DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS MMR

Se valoró, si existe alguna relación entre los tumores uroteliales con pérdida de expresión de las proteínas MMR y la presencia de recidivas durante los 5 primeros años después del momento del diagnóstico y no se identificó una relación estadísticamente significativa. Lo mismo ocurrió al valorar la mortalidad durante 5 años desde el momento del diagnóstico, no se vio una relación estadística. En ambos grupos, se evidenció, que las mayores tasas de recidivas y de mortalidad se producían en los primeros 20 meses desde el momento del diagnóstico (n.e.s.).

4. SCREENING EN LOS PACIENTES CON PÉRDIDA DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS MMR

Los pacientes con falta de expresión de las proteínas MMR mediante IHQ presentan una mayor probabilidad de presentar una mutación en los genes MMR, por lo que es recomendable identificarles para que se les realice un estricto seguimiento multidisciplinar (Harper et al., 2017; Pradere et al., 2017).

Una vez hemos obtenido y, posteriormente analizado los datos, descodificamos los datos personales de los pacientes que no presentaban inmunoreactividad de una o varias de proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PLM2. Con el permiso que nos ha otorgado el Hospital Universitario de Móstoles, se ha estudiado su historia médica y hemos visto que la mayor parte de estos pacientes están en seguimiento por el servicio de digestivo

y tienen varias biopsias mediante colonoscopia, las cuales han sido diagnosticadas como “adenoma tubular con displasia de bajo grado” o “adenoma tubular con displasia de alto grado” ambas lesiones son precursores de adenocarcinoma de colon (Moreira, 2012).

Es esencial realizar un seguimiento de los pacientes con falta de expresión de las proteínas MMR, de forma que puedan recibir un diagnóstico precoz y presenten una menor morbimortalidad. Por esta razón, se mantuvo una reunión con el Servicio de Oncología del Hospital Universitario de Móstoles, otorgando todos los nombres, número de historia clínica, antecedentes y la pérdida de expresión de las proteínas MMR y se valoró, de forma personalizada, la necesidad de una cita en el Servicio de Oncología.

5. RELACIÓN ENTRE LOS PACIENTES CON PÉRDIDA DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS MMR Y LA CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LA TCGA

Se ha valorado la relación que existe entre la clasificación molecular de la TCGA y la pérdida de expresión de las proteínas MMR de los carcinomas uroteliales. Se ha identificado, que 12 de los 13 pacientes con pérdida de expresión de las proteínas MMR pertenecen a los grupos moleculares luminares (grupo luminal y grupo luminal infiltrante) y solo un paciente pertenece al grupo molecular neural.

Al comparar estos datos con la literatura, son muy pocos los estudios que valoran estos datos. Eriksson et al. (Eriksson et al., 2018), en su publicación evidenció que la mayor parte de sus pacientes con mutación de las proteínas MMR pertenecían al grupo molecular luminal y un pequeño porcentaje al grupo basal-escamoso.

Al valorar la distribución y, teniendo en cuenta el bajo número de tumores con pérdida de expresión de las proteínas MMR, resulta difícil realizar una comparativa. Observamos que tanto en nuestro estudio como en el realizado por Eriksson et al. la gran totalidad de los tumores estudiados pertenecen al grupo molecular luminal.

Este análisis proporciona una información muy relevante a la hora de individualizar el tratamiento, pero debe de utilizarse con cautela debido a los escasos artículos de investigación que actualmente existen sobre esta relación y al bajo número de pacientes estudiado. Por dichas razones y por la importancia que supone para los pacientes la elección del mejor tratamiento dependiendo de las características tumorales, considero que sería un tema de interés para futuras investigaciones.

6. CLASIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE EL USO DEL ESTUDIO MORFOLÓGICO

La clasificación molecular de los tumores uroteliales es cada día más importante puesto que se permite ofrecer a los pacientes un tratamiento individualizado según las características propias de cada tumor y, de esta forma, reducir la morbimortalidad (Dashti et al., 2015; Robertson et al., 2017; Inamura and Kentaro, 2018; Sjö Dahl, 2018).

Para realizar esta clasificación, nos basamos en los criterios de la TCGA (Robertson et al., 2017), para lo que se recomienda realizar un estudio molecular y con ello identificar las mutaciones que presenta. Debido a la dificultad que presenta esta técnica, tanto a nivel técnico como de interpretación y el elevado coste que requiere, diversos investigadores

utilizan las técnicas de IHQ para realizar dicha clasificación (Pradere et al., 2017; Eriksson et al., 2018; Inamura and Kentaro, 2018; Sjödaahl, 2018).

Al realizar una comparativa con los estudios realizados por otros investigadores, nos encontramos con una dificultad, el rápido avance de la investigación molecular, en 2012 existían 3 grupos moleculares (Sjödaahl et al., 2013), al realizar esta investigación se los estudios clasificaban los tumores en 5 grupos moleculares (Robertson et al., 2017) y en la actualidad hay autores que hablan de 6 grupos moleculares (Tan et al., 2019). Debido a esta razón existen un bajo número de series y documentos de investigación.

Durante la realización de este estudio se ha tratado de identificar características, clínicas e histológicas, entre los diferentes grupos moleculares con el fin de identificar un patrón, y de esta forma poder clasificar los tumores sin necesitar de usar costosas técnicas moleculares ni inmunohistoquímicas, usando únicamente el estudio microscópico y la historia clínica.

6.1. Grupo basal

Los tumores clasificados como tumores del grupo basal se caracterizan por presentar predominantemente un patrón histológico mixto, siendo 3,17 veces más frecuente que el patrón papilar y 5,24 veces más frecuente que el patrón histológico con diferenciación epidermoide. En el estudio de la infiltración tumoral, se identifica que la mayoría de tumores presentaban infiltración de la lámina propia y gran parte de ellos estaba limitada a la lámina propia. Al evaluar el grado, vemos que los tumores del grupo

molecular basal presentan tumores de alto grado con una frecuencia 1,48 veces mayor. Este grupo tumoral presenta una frecuencia 2,64 veces mayor de tener necrosis. Al valorar la distribución por géneros, vemos que este grupo está constituido predominantemente por mujeres, aunque no se identifican diferencias estadísticamente significativas entre este grupo y el resto de grupos. En el estudio de la linfocitosis intratumoral, identificamos una tendencia estadística.

Al comparar estos datos con los obtenidos en otros estudios vemos similitudes y diferencias. Tanto en nuestro estudio como en los estudios de Robertson et al. (Robertson et al., 2017) y Inamura et al. (Inamura and Kentaro, 2018). Este grupo molecular está formado mayoritariamente por mujeres, con tendencia a la linfocitosis intratumoral. Identificamos diferencias al valorar el patrón histológico, llama la atención que en su estudio estos tumores presentan una diferenciación epidermoide y en nuestro estudio ninguno de los tumores con diferenciación epidermoide pertenece a este grupo. Esta diferencia podría deberse a las características propias de la población estudiada.

6.2. Grupo luminal

En el estudio histológico de este grupo tumoral, podemos identificar que los tumores que lo componen son poco agresivos. Estos tumores presentan en la mayoría de casos, un patrón histológico papilar. Presentan infiltración en la lámina propia 0,20 veces mayor respecto a los pacientes que no presentan infiltración de la lámina propia, no se observan tumores con infiltraciones a musculo, tejidos perivesicales ni otros órganos. La

mayor parte de estos tumores presentan un bajo grado tumoral. Estos tumores presentan ausencia de nucléolo.

Al compáralos con otros estudios (Robertson et al., 2017; Inamura and Kentaro, 2018), vemos que ambos presentan una incidencia similar y características propias de tumores de baja agresividad.

6.3. Grupo luminal papilar

Al igual que ocurre con el grupo luminal, el grupo luminal papilar está constituido por tumores poco agresivos. Al estudiar el grupo molecular luminal papilar, es más frecuente en varones que en mujeres siendo 1,22 veces mayor. El patrón histológico predominante en este grupo es el patrón papilar, identificándose ocasionales tumores con patrón mixto y sólido y la mayoría de tumores que configuran este grupo son de bajo grado. Al valorar el grado de infiltración, la mayoría de tumores presentan tumores que no infiltran la lámina propia o tumores infiltrantes limitados a la lámina propia.

Tal y como vemos al comparar los datos obtenidos con los estudios publicados (Inamura and Kentaro, 2018; Sjödaahl, 2018), todas las poblaciones presentan características en comunes, como son, patrón histológico papilar y bajo grado de malignidad.

6.4. Grupo luminal infiltrante

El grupo tumoral molecular luminal infiltrante se presenta 4,85 más frecuentemente en uretra frente a vejiga. En el estudio del patrón histológico, presenta mayoritariamente tumores con un patrón papilar pero también se pueden identificar, en menor proporción tumores con patrón mixto y sólido. Al valorar la infiltración tumoral, se ha comprobado que presentaban 3,58 más frecuentemente infiltración de la lámina propia que los tumores que no pertenecen a este grupo. Al valorar la presencia de linfocitos peritumorales no se identificó una diferencia estadísticamente significativa, pero se comprobó una tendencia estadística entre la presencia de linfocitos peritumorales y los tumores del grupo luminal infiltrante.

Al comparar con los estudios (Inamura and Kentaro, 2018; Sjö Dahl et al., 2019) vemos, ciertas similitudes puesto que, ambos se dan en una porción similar y se caracterizan por la presencia de infiltrado linfocitario.

6.5. Grupo neural

El grupo neural, está constituido por tumores con mayor grado de agresividad. Los tumores uroteliales del grupo molecular neural se caracterizan porque es el único grupo tumoral que presenta un patrón histológico con diferenciación epidermoide. Al valorar la infiltración tumoral este grupo tumoral presenta tumores no infiltrativos e infiltrativos y dentro de los infiltrativos presenta tumores que infiltran limitándose a la lámina propia, al musculo, a los tejidos perivesicales y a otros órganos. Es el único de los grupos

que presenta tumores que infiltran a otros órganos. La mayoría de estos tumores presentan alto grado tumoral.

Al igual que ocurre en el estudio (Sjödahl et al., 2013; Robertson et al., 2017; Inamura and Kentaro, 2018), identificamos que nuestro estudio presenta una incidencia similar y tras estudio microscópico, los tumores de este grupo se caracterizan por presentar un alto grado de malignidad.

Una vez valorados las similitudes intragrupo y las diferencias intergrupo se han podido identificar una serie de patrones en alguno de los grupos moleculares como, por ejemplo, se observa que el grupo basal presenta predominantemente un patrón histológico mixto, el grupo molecular neural observamos tumores de alto grado tumoral o los tumores del grupo luminal presentan características histológicas de bajo grado.

CONCLUSIONES

1. El estudio de los carcinomas uroteliales de la población de Móstoles, basado en las características clínicas e histológicas, confirma que la población de Móstoles se puede considerar representativa de los carcinomas uroteliales, ya que las variables estudiadas se ajustan, en líneas generales, a las presentadas por la población mundial y presentan tendencias habituales de los tumores uroteliales.
2. La combinación de datos clínicos y características histopatológicas puede permitir la identificación precoz de pacientes con alto riesgo de presentar pérdida de expresión de la proteína MMR.
3. Los pacientes de sexo masculino, con tumores localizados en vejiga o uréteres en el momento del diagnóstico con patrón histológico papilar que no infiltra la lámina propia o, en el caso de tumores infiltrantes, que infiltra tejidos perivesicales, presentan alta probabilidad de exhibir pérdida de expresión de las proteínas MMR mediante estudio IHQ.
4. La evaluación de las características clínico-patológicas de los carcinomas uroteliales, puede ser aplicada como un protocolo válido de cribado. Este protocolo se propone como una herramienta rentable que puede ayudar al diagnóstico precoz de pacientes con pérdida de expresión de la proteína MMR, reduciendo la morbimortalidad sin que implique un aumento de trabajo para el patólogo y los técnicos de laboratorio.

5. La recívida tumoral y de mortalidad durante los 5 primeros años después del diagnóstico en pacientes con pérdida de expresión de proteínas MMR mediante IHQ no presentan una diferencia estadísticamente significativa con los pacientes que presentan expresión íntegra de las proteínas MMR.
6. La utilización de una combinación de datos clínicos y características histopatológicas no permite clasificar los tumores uroteliales según la clasificación de la TCGA.
7. Existe una relación entre la clasificación molecular de la TCGA y los tumores con pérdida de expresión de las proteínas MMR. La mayoría de los tumores con pérdida de expresión de las proteínas MMR pertenecían a los grupos moleculares luminales (subgrupo luminal y luminal infiltrante) y solo uno de los tumores al grupo neural no identificándose casos pertenecientes a los grupos basal y luminal papilar.
8. Los hallazgos de pérdida de expresión de las proteínas MMR mediante el estudio IHQ, nos permiten alertar a los pacientes de la posibilidad de padecer otros tumores y, de esta forma, poder realizar un diagnóstico precoz. Se valoró de forma individual, junto con el Servicio de Oncología del Hospital Universitario de Móstoles, la necesidad de realizar un seguimiento de los pacientes.

ANEXOS

ANEXO I

Sobrino-Reig et al. *Diagnostic Pathology* (2021) 16:106
<https://doi.org/10.1186/s13000-021-01168-2>

Diagnostic Pathology

RESEARCH

Open Access

Morphological predictors for microsatellite instability in urothelial carcinoma



Eduardo Sobrino-Reig¹, Telma Meizoso^{2,3}, Jesús García^{2,3}, David Varillas-Delgado⁴ and Yasmina B. Martín^{3*}

Abstract

Introduction: Microsatellite instability occurs due to a series of mutations in the DNA pairing error repair (Mismatch repair; MMR) genes, which can affect germ cells as occurs in Lynch syndrome, whose patients are at high risk of developing multiple cancers. The loss of MMR protein is commonly determined by immunohistochemical studies. Although the relation between microsatellite instability and urothelial carcinomas has been widely studied, its evaluation is not currently performed in the analysis of urothelial carcinomas.

Methods: In this study, the microsatellite status of 139 urothelial carcinomas was analyzed and their clinicopathological characteristics were evaluated. We identified that 10.3% (13 patients) of urothelial carcinomas had loss of MMR protein expression (9 MLH1; 5 MSH2; 2 PMS2; 2 PSH6; $n = 139$).

Results: Results suggest that these tumors occur more frequently in males, are more frequently located in the bladder or ureters, and present a high tumor grade with a papillary histological pattern that does not infiltrate the lamina propria or, in the case of infiltrating tumors, that grows into perivesical tissues.

Conclusions: We identified patients with the aforementioned tumor characteristics as patients with a high probability of presenting loss of MMR protein expression, and consider that only these patients should undergo further immunohistochemical and molecular techniques for proper diagnosis. Therefore, we propose that the clinicopathological characteristics found in the present study could become possible markers to determine which cases should undergo additional tests.

Keywords: Cancer, Mismatch repair, Immunohistochemistry, Screening protocol, Tissue microarray

Introduction

Cancer stands as one of the leading public health issues of our times. Currently, one in three women and one in two men will develop a tumor during their lifetime. The increase in cancer prevalence has been related to the aging and growth of the population and improvements in life expectancy [1].

Urothelial carcinoma is the twelfth most common cancer worldwide [2], and the fifth most common cancer in Spain [3]. Estimates indicate a global incidence of 573,278 new cases per year, which cause approximately

212,536 annual deaths [2]. The incidence of urothelial carcinoma in Spain is estimated in 21,093 people per year [3].

Previous molecular genetic studies have shown a relationship between urothelial carcinomas and microsatellite instability (MSI). Namely, between 1.1 and 28% of urothelial carcinomas present MSI [4–14]. MSI is caused by mutations in the genes of the DNA repair system, known as Mismatch repair (MMR) [11], which fail to repair DNA duplication errors. This leads to an accelerated and indiscriminate accumulation of mutations in nucleotides through insertions or deletions [5, 15]. Moreover, germline mutations in DNA mismatch repair genes predispose to several gastrointestinal, urologic, gynecologic, and skin tumors at younger ages, also known

* Correspondence: y.martin.prof@ufv.es

³Facultad de Medicina, Universidad Francisco de Vitoria, 28223, Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

as Lynch syndrome [6]. Carcinogenesis in patients with Lynch syndrome is due to an accumulation of somatic reading frame mutations within microsatellite regions in genes that control growth and apoptosis [4, 5, 11, 15].

The first test to examine the loss of MMR proteins is immunohistochemistry (IHC), which is currently only recommended for colorectal [16–19] and endometrial carcinomas [20–22]. This technique is not performed in urothelial carcinomas, although its relationship with MSI has been widely studied [9]. In fact, urothelial carcinomas with MSI highly benefit from adjuvant cisplatin-based chemotherapy [23], as well as the use of antibodies against CTLA4 and PD-1 [24]. Patients with urothelial carcinomas with identified MSI could also benefit from prophylactic treatment based on the use of Acetylsalicylic acid [25, 26], hormone replacement therapy [27], ibuprofen or calcium supplements [28, 29]. The importance of identifying patients with urothelial carcinomas with MSI is becoming more and more evident, as the clinical differences require specific treatments for better prognosis. Therefore, pathologists have an increasingly relevant role in the care of these patients [30].

Several authors, such as Ju [9], Joost [5] and Harper [8] and collaborators, have shown a correlation between the clinical and histological characteristics of urothelial carcinomas and the presence of MSI. Urothelial carcinomas with MSI are usually high-grade papillary tumors without the presence of marked nuclear pleomorphism, in stages pTa or pT1, with the presence of intratumoral lymphocytosis (20 lymphocytes per 10 HPF). They occur more frequently in men between 36 and 90 years of age and are mainly located in the bladder, although they can be found in any location lined by urothelial mucosa.

The aim of this study is to identify patients with urothelial carcinomas with presence loss of MMR protein expression. Although it is already known that carrying out an IHC and molecular study would allow the diagnosis of all patients, the economic cost is too high. Therefore, we propose to use the histological characteristics of the tumor and the clinical data of the patient as a guide to classify patients as “high” or “low risk of presenting loss of MMR protein expression” as a first approach to narrow down the number of patients that are submitted to take additional tests. In this sense, only patients classified as “high risk of presenting loss of MMR protein expression” would continue with *polymerase chain reaction* (PCR) analysis. This system would allow all patients to receive a correct screening with a single histological section stained with Hematoxylin - eosin (H&E).

Materials and methods

Study design and case selection

An observational study was carried out by reviewing cases of urothelial carcinoma. Clinical data, histological sections and

IHC stains of urothelial tumors from the University Hospital of Móstoles, (Madrid, Spain) were used.

During January 2013 to 2014, 139 consecutive cases with urothelial carcinoma, which had been diagnosed by the Pathological Anatomy Service of the University Hospital of Móstoles, were selected (Fig. 1). Based on previously performed studies [5, 6, 11], a Type II error of 20% (80% power) with the sample size of 139 patients was supposed to provide enough statistical power according to previous studies [5, 6, 9, 11].

All the data used and obtained were coded and treated anonymously throughout the study. The study was approved by the Research Committee of the University Hospital of Móstoles, (Madrid, Spain) (No. org / int 005/2018).

Inclusion and exclusion criteria

To avoid bias in the selection of cases, samples from patients with a tumor coded as “urothelial carcinoma” were included in the study, accepting any location or stage with available material. Urothelial carcinoma samples smaller than 0.3 cm in size were excluded from the study to avoid consuming the entire sample. They may be relevant for future studies. In the same way, tumors with large geographic areas of necrosis (necrotic tumor) were not included.

Clinical analysis

Patients were classified according to their gender (male or female), age (in 5 groups: Group 1: 0–49 years; Group 2: 50–59 years; Group 3: 60–69 years; Group 4: 70–79 years Group 5: 80–99 years) and tumor location at the time of diagnosis (bladder, urethra and ureters).

Pathologic analysis

Tumors were analyzed in blind conditions by a single pathologist. A representative block of urothelial carcinoma was received from the Anatomic Pathology Service of the University Hospital of Móstoles, and sections stained with hematoxylin and eosin-stained (H&E) were prepared. The H&E sections were reviewed, and the following histological criteria were used to evaluate the tumors:

Histology of the tumor

The tumors were classified according to the histological pattern they presented, classifying the urothelial carcinoma according to the following subtypes:

- Urothelial carcinoma with solid nests: presents an architecture in small and irregular nests or forming abortive tubules. Sometimes the nests anastomose, giving images of cords or trabeculae [4].
- Papillary urothelial carcinoma: presents fine fibrovascular axes lined by neoplastic urothelial

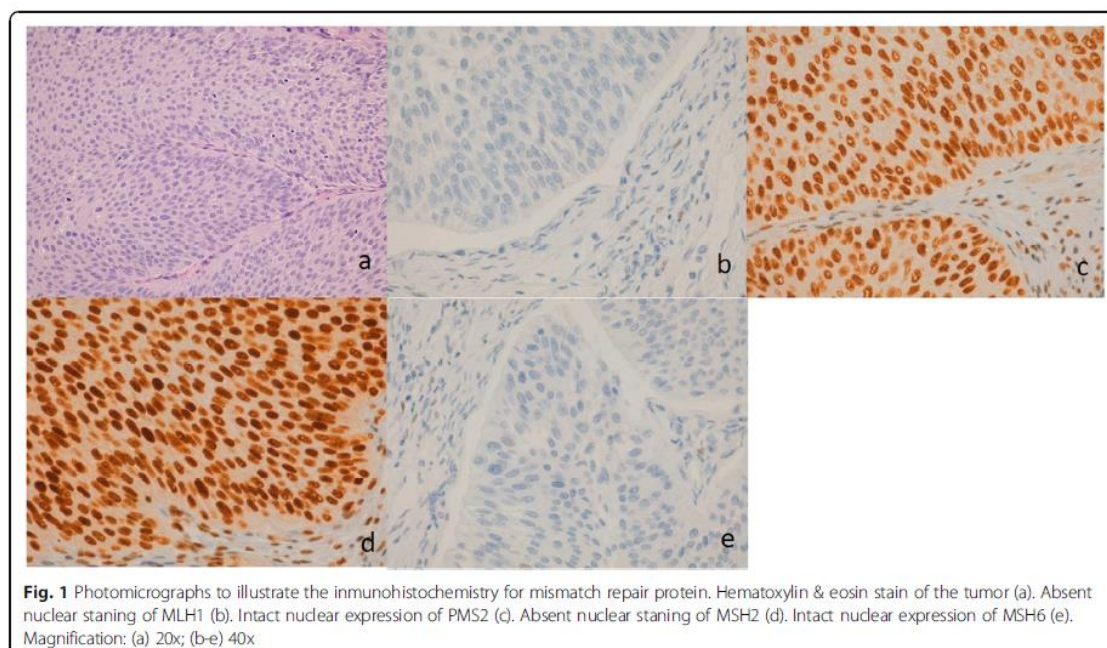


Fig. 1 Photomicrographs to illustrate the immunohistochemistry for mismatch repair protein. Hematoxylin & eosin stain of the tumor (a). Absent nuclear staining of MLH1 (b). Intact nuclear expression of PMS2 (c). Absent nuclear staining of MSH2 (d). Intact nuclear expression of MSH6 (e). Magnification: (a) 20x; (b-e) 40x

tissue of variable thickness, they can present extensive ramifications. Neoplastic cells present abnormalities in size, shape, and nuclear chromatin and abnormalities in cell orientation [4].

- Mixed urothelial carcinoma: Urothelial carcinoma in which more than one pure pattern is found. Urothelial carcinoma with squamous differentiation will not be assessed within this classification, considering them as an own entity [4, 31].
- Urothelial carcinoma with squamous differentiation: Urothelial carcinoma with the presence of nests of malignant squamous epithelium, characterized by polygonal cells and evidence of keratinization or intercellular bridging. The presence of dyskeratosis and corneal pearls can be identified [4].

Classification of tumor staging

The classification was conducted according to the “Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Carcinoma of the Urinary Bladder” the 8th Edition, AJCC Staging Manual, June 2017 [32] (Table 1).

Histologic grade

The tumors received a single grade of differentiation (high or low) according to the criteria included in the “The World Health Organization/International Society of Urological Pathology” [33] This criteria has been endorsed by the “AJCC Staging Manual” [32] for standardized cancer.

Tumor necrosis or evident apoptosis

Tumors were evaluated for the presence or absence of necrosis. The tumor was classified as negative if the focus of necrosis was less than 10%.

Samples were classified into two groups: with or without tumor necrosis or apoptosis.

Presence of nucleolus

The presence or absence of nucleolus in the nuclei was examined. When a nucleolus was identified, it was classified according to its intensity. Samples were classified in three groups defined as follows: G0: nucleolus is not identified or not evident; G+: evident nucleolus is

Table 1 Tumor classification according to the grade of invasion as defined in [32]

Stage	Definition
Ta	Papillary noninvasive carcinoma.
Tis	Flat urothelial carcinoma in situ.
T1	Tumor invades lamina propria. <i>Connective tissue between the urothelium and the detrusor muscle.</i>
T2	Tumor invades muscularis propria. <i>Thick bundles of detrusor muscle.</i>
T3	Tumor invades perivesical tissue. <i>Adipose tissue beyond muscularis propria.</i> T3a: microscopic invasion. T3b: macroscopic invasion.
T4	Tumor invades other organs.

identified at 400x magnification; G++: obvious nucleolus is identified at 200x magnification.

Growth pattern

The growth pattern of the tumor was examined, and two groups were established: "Growth pattern with exophytic characteristics", for tumors which show an outward growth, that is, towards the bladder or towards the tubular lumens in the case of tumors located at the level of the ureter or urethra; and "growth pattern of endophytic characteristics", which included tumors that grow towards the chorion.

Lymphovascular invasion

The presence of tumor urothelial cellularity inside lymphatic and blood vessels was examined. They were classified into two groups: a first group for tumors in which there is no evidence of invasion in the lymphatic vessels or blood vessels, and a second group in which lymphovascular invasion can be identified.

Perineural invasion

When studying the nerves, the presence of urothelial carcinoma was observed in different locations, such as within the perineurium, within the nerve, surrounding the nerve or invading ganglionic tissue. Tumors were classified in two groups, according to whether perineural invasion was present or absent.

Presence of peritumoral lymphocytes

The percentage of lymphocyte cellularity in five high-power fields was analyzed in the peritumoral stroma, preferably considering the areas with more lymphocytes (hot-spot). Tumors were classified in three blocks: Block P0: there is no lymphocytic infiltrate, less than 5%. Block P1: evidence of minimal lymphocytic infiltrate, between 5 and 15%. Block P2: presence of evident lymphocytic infiltrate, greater than 15%.

Presence of intratumoral lymphocytes

At the tumor level, the percentage of lymphocyte cellularity in five high-magnification fields of each sample was studied, preferably considering the areas that had more lymphocytes (hot-spot). Apoptotic cells were not counted. Classification was designed in three blocks: Block L0: there is no lymphocytic infiltrate, less than 5%; Block L1: evidence of minimal lymphocytic infiltrate, between 5 and 15%; Block L2: presence of evident lymphocytic infiltrate, greater than 15%.

Microsatellite analyses

Two tissue microarrays were performed on the studied samples, including the most representative parts of the tumor. The construction of the tissue microarrays was

carried out in the Histopathology Unit of the Spanish National Cancer Research Center (CNIO), Madrid. A total of 139 tumor tissue samples were included, each tumor is represented with two 1 mm tumor cores, in turn, 2 control tissue samples (tonsil tissue) were included in each tissue microarray. Sections between 2 and 5 μm of the tissue microarray blocks were made. Sections were deparaffinized and stained with H&E to verify the correct construction of the blocks and the representation of all cases, we consider representative, if it includes more than 200 tumor cells. Once the blocks were verified, sections between 2 and 5 μm were made to perform the immunohistochemical (IHC) techniques. The IHC techniques, were performed using antibodies against MutL Protein Homolog 1 (MLH1), MutL Protein Homolog 2 (MSH2), MutL Protein Homolog 6 (MSH6), and Postmeiotic Segregation Increased 2 (PMS2). IHC hybridizations analyses were conducted at the Department of Anatomic Pathology of the University Hospital of Móstoles and at CNIO (Fig. 1).

After determining the status of the MMR proteins using one of the IHC techniques, the absence of expression of one or more MMR proteins will be classified as dMMR. To classify patients as high-grade microsatellite instability (MSI-H), it must be performed using a PCR-based analysis in which two to five microsatellite tumor foci are identified [19, 34].

Taking as a reference the studies carried out in colorectal carcinoma, depending on the lack of expression of each of the MMRs, the IHC study can predict the probability that the patient has Lynch syndrome or is a sporadic tumor and recommends a series of molecular studies, which will be of great interest for future research:

The loss of isolated nuclear expression of MLH1/PMS2 or the loss of MLH1 and PMS2, may be due to the methylation of the MLH1 promoter and / or the BRAF mutation (for tumors with this lack of IHC staining, direct tests of hypermethylation of the MLH1 promoter and / or BRAF V600E mutational analysis; both the absence of MLH1 methylation and the BRAF V600E mutation suggest the possibility of Lynch syndrome and therefore sequencing and / or germline deletion / duplication tests may be indicated) [19, 35].

Loss of MSH2 and MSH6 nuclear expression or isolated loss of MSH6 or PMS2 nuclear expression predicts a high probability of Lynch syndrome (large germline deletion / duplication and / or sequencing tests may be indicated) [19, 36].

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS 21.0* package for Windows (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY:

IBM Corp). Categorical variables were expressed by frequencies and percentages. Statistical inference was made using the Chi-square test for analysis of nominal variables, Mann-Whitney U test for comparison of ordinal variables and binary logistic regression for predictor variables, carrying out multivariate back-step analysis to define models. Results were considered statistically significant at a P -value < 0.05 .

Results

Tumor and patient characteristics from the population sample of Móstoles

The demographic and clinicopathologic data of the 139 patients diagnosed with urothelial carcinoma are shown in Table 2. The average age at diagnosis was between 60 and 70 years. Diagnosis was slightly more frequent in women than men. The most common location of the tumor was the bladder (93.5%), followed by the urethra and ureter (4.3 and 2.3%, respectively).

The microscopic study identified that the patients studied from the population of Móstoles presented in most cases a papillary histological pattern (79 patients out of 139), with a predominant exophytic growth of high tumor grade with necrosis and the presence of nucleolus in 46.1% of the cases. These tumors had a low presence of intratumoral lymphocytes and peritumoral lymphocytes. The study of the degree of tumor infiltration showed that in more than half of the cases the urothelial tumors were non-muscle invasive. Vascular invasion was identified in only 1 of the cases and perineural invasion in none of the samples studied.

MMR protein expression study

After analyzing the characteristics of the tumors and confirming that they present similar characteristics to the general population, we divided tumor samples into two groups. The first group included patients with loss of MMR protein expression (no identified immunoreactivity in any of the genes involved in the study) and the other group included patients who did not present alterations at this level. Tumor sample classification resulted in the identification of 13 patients (10.3%) who presented loss of MMR protein expression and 126 (89.7%) who did not present MSI (Table 3).

Results from the association analysis between patient/tumor factors and the presence or absence of loss of MMR protein expression are shown in Table 4. When assessing the frequency of mutation between patient genders, it was observed that loss of MMR protein expression was statistically more frequent in men (22.2%) compared to women (3.2%), showing a risk of loss of MMR protein expression in men with an Odd Ratio (OR) of 6963 (95% CI: 2.014–24.069; $p < 0.001$).

Table 2 Patient and tumor characteristics of 139 patients diagnosed with "urothelial carcinoma"

Characteristic		% (N)
Age	< 49 years	5.7 (8)
	50–59 years	12.9 (18)
	60–69 years	39.6 (55)
	70–79 years	23. (33)
	> 80 years	18.0 (25)
Sex	Male	67.6 (94)
	Female	32.4 (45)
Localization	Bladder	93.5 (103)
	Urethra	4.3 (6)
	Ureter	2.3 (3)
Histology of the tumor	Papillary	56.8 (79)
	Mixed	28. (39)
	Solid	12.9 (18)
	Urothelial carcinoma with squamous differentiation	2.2 (3)
Classification of tumor staging	No infiltration	35. (49)
	Infiltration of lamina propria	49.6 (69)
	Infiltration of muscle	10.8 (15)
	Infiltration of perivesical tissue	3.6 (5)
	Infiltration of other organs	0.7 (1)
Histologic grade	Low	59.6 (80)
	High	42.2 (59)
Tumor necrosis or evident apoptosis	Yes	53.3 (74)
	No	46.7 (65)
Growth pattern	Endophytic	14.4 (20)
	Exophytic	85.6 (119)
Presence of nucleolus	No	54.0 (75)
	Yes +	22.3 (31)
	Yes ++	23.7 (33)
Lymphovascular invasion	Yes	2.2 (3)
	No	97.8 (136)
Neural invasion	Yes	0 (0)
	No	100 (139)
Presence of peritumoral lymphocytes	0–5%	46.8 (65)
	6–30%	33.2 (47)
	> 30%	20.0 (27)
Presence of intratumoral lymphocytes	0–5%	85.6 (119)
	6–20%	10.1 (14)
	> 20%	4.3 (6)

Table 3 Patients with loss of MMR protein expression (+ indicates presence of loss of MMR protein expression by IHC)

	MLH1	PMS2	MSH2	MSH6
Patient 1	+		+	
Patient 2	+			
Patient 3	+		+	
Patient 4	+			
Patient 5	+			
Patient 6		+	+	+
Patient 7	+			
Patient 8	+			
Patient 9		+	+	+
Patient 10	+		+	
Patient 11			+	
Patient 12	+	+		+
Patient 13			+	

The age categories did not show statistical differences regarding loss of MMR protein expression. No loss of MMR protein expression was observed in patients under 49 years of age, whereas the rest of the age categories showed instability percentages between 6.1 and 12.0% ($p = 0.795$).

The ureters were statistically significantly the most common location in which loss of MMR protein expression was present, with 50% of the cases showing loss of MMR protein expression in this location (95% CI: 2137–67,380; $p = 0.001$). The OR risk of presenting loss of MMR protein expression in the ureters was 12,000 times the risk of presenting loss of MMR protein expression in the bladder or urethra.

Regarding tumor infiltration in the lamina propria, no statistically significant differences ($p = 0.141$) were observed between loss of MMR protein expression and the presence (6.9%) or absence (14.9%) of infiltration.

The study of the degree of tumor infiltration based on the tumor staging guidelines from “AJCC Staging Manual” [32] showed statistical differences between the risk of presenting loss of MMR protein expression between patients with tumors that do not infiltrate the lamina propria (pTa) and those patients with tumors that infiltrate the lamina propria (pT1), with an OR of 9.857 (95% CI: 1.253–77.575; $p = 0.006$). An OR of 102.00 (95% CI: 7.103–1464.69; $p < 0.001$) of presenting loss of MMR protein expression was found in patients with tumors that cause infiltration to perivesical tissues (pT3) compared to patients with tumors whose infiltration is limited to the lamina propria (pT1).

The most frequent tumor grade in both groups (presence and absence of loss of MMR protein expression) was “high grade”. No statistical differences were observed

between presenting a high (8.8%) or low grade (10.2%) within the loss of MMR protein expression group ($p = 0.776$). Similarly, no statistical differences were observed within the loss of MMR protein expression group between tumor growth with endophytic characteristics (8.4%) and growth with exophytic characteristics (15.0%) ($p = 0.349$).

The rest of the parameters evaluated did not present statistically significant differences between carcinomas with and without loss of MMR protein expression (Table 4).

Discussion

The histopathological identification of different phenotypic characteristics is correlated with a molecular classification, which is how classical surgical pathology can be linked with newer molecular analysis techniques [37, 38]. In our study, we demonstrated that urothelial carcinomas with potential loss of MMR protein expression can be identified by evaluating histopathological and clinical data of the patients.

The analysis of the clinical and histological characteristics of our tumors and their comparison with the general population [4, 7, 39, 40], suggested that our series is representative of urothelial carcinomas. This is because the variables studied presented the usual trends of urothelial tumors found in the general population.

Our research showed that 10.3% of urothelial carcinomas presented loss of MMR proteins expression, which were identified using IHC. Results showed that the loss of MMR protein expression most frequently occurs due to mutations in MLH1, followed by MSH2, PMS2 and MSH6. These results are in accordance with previous studies [5, 8–10, 41].

In our study sample, patients that presented urothelial carcinoma with loss of MMR protein expression, identified by IHC, apparently sporadic, were more frequently men and tumors were located in most cases at the level of the ureters and bladder. The histological study showed that these neoplastic proliferations presented a papillary pattern of high tumor grade that in most cases did not infiltrate the lamina propria or, in the case of infiltrating tumors, produced an infiltration into perivesical tissues.

Previous studies by Joost [5], Harper [8] and Ju [9] validate and expand our findings. These authors observed that patients with potential MSI have several characteristics in common. They are usually high-grade papillary tumors without the presence of marked nuclear pleomorphism in stages pTa or pT1, although they can be found in any tumor stage [5, 8, 9]. They are tumors that occur mainly in the ureters and bladder, although they can be found in any location lined by urothelial mucosa [5, 9]. Regarding the age of diagnosis, tumors with MSI occur more frequently in patients between 36 and 90 years old. This is in line with the results from our study,

Table 4 Correlation between the presence or absence of loss of MMR protein expression with parameters of influence in the different tumors

Factor	Loss of MMR protein expression		P-value	
	Yes	No		
Age	< 49 years	0.0%	100.0%	N.S.
	50–59 years	11.1%	88.9%	
	60–69 years	10.9%	89.1%	
	70–79 years	6.1%	93.9%	
	> 80 years	12.0%	88.0%	
Sex	Male	22.2%	77.8%	< 0.001
	Female	3.2%	96.8%	
Localization	Bladder	7.7%	92.3%	0.001
	Urethra	0.0%	100.0%	
	Ureter	50%	50%	
Histology of the tumor	Papillary	11.5%	88.5%	N.S.
	Mixed	5.3%	94.7%	
	Solid	11.8%	88.2%	
	Urothelial carcinoma with squamous differentiation	0.0%	100.0%	
Classification of tumor staging	No infiltration	14.3%	85.7%	0.006 (LP)
	Infiltration of lamina propia	1.4%	98.6%	< 0.001 (TP)
	Infiltration of muscle	13.3%	86.7%	N.S.
	Infiltration of perivesical tissue	40.0%	60.0%	N.S.
	Infiltration of other organs	0.0%	100.0%	N.S.
Histologic grade	Low	10.2%	89.8%	N.S.
	High	8.8%	91.2%	
Tumor necrosis or evident apoptosis.	Yes	5.4%	94.6%	0.088
	No	13.8%	86.2%	
Growth pattern	Endophytic	8.4%	91.6%	N.S.
	Exophytic	15.0%	85.0%	
Presence of nucleolus	No	13.3%	86.7%	N.S.
	Yes +	6.5%	93.5%	
	Yes ++	3.0%	97.0%	
Lymphovascular invasion	Yes	33.3%	66.7%	N.S.
	No	8.8%	91.2%	
Neural invasion	Yes	9.4%	90.6%	N.S.
	No	9.4%	90.6%	
Presence of peritumoral lymphocytes	0–5%	55.30%	44.40%	N.S.
	6–30%	39.10%	35.70%	
	> 30%	12.80%	19.80%	
Presence of intratumoral lymphocytes	0–5%	92.30%	84.90%	N.S.
	6–20%	0.00%	11.10%	
	> 20%	7.70%	4.00%	

N.S. No statistical significance

in which more than 61.5% of our patients presented tumors in stages pTa or pT1. The next most frequent tumor stage was pT3, which could be due to a late

diagnosis of our patients, which led to a more advanced tumor stage. In relation to the presence of intratumoral lymphocytosis, our results differed from the study by Ju

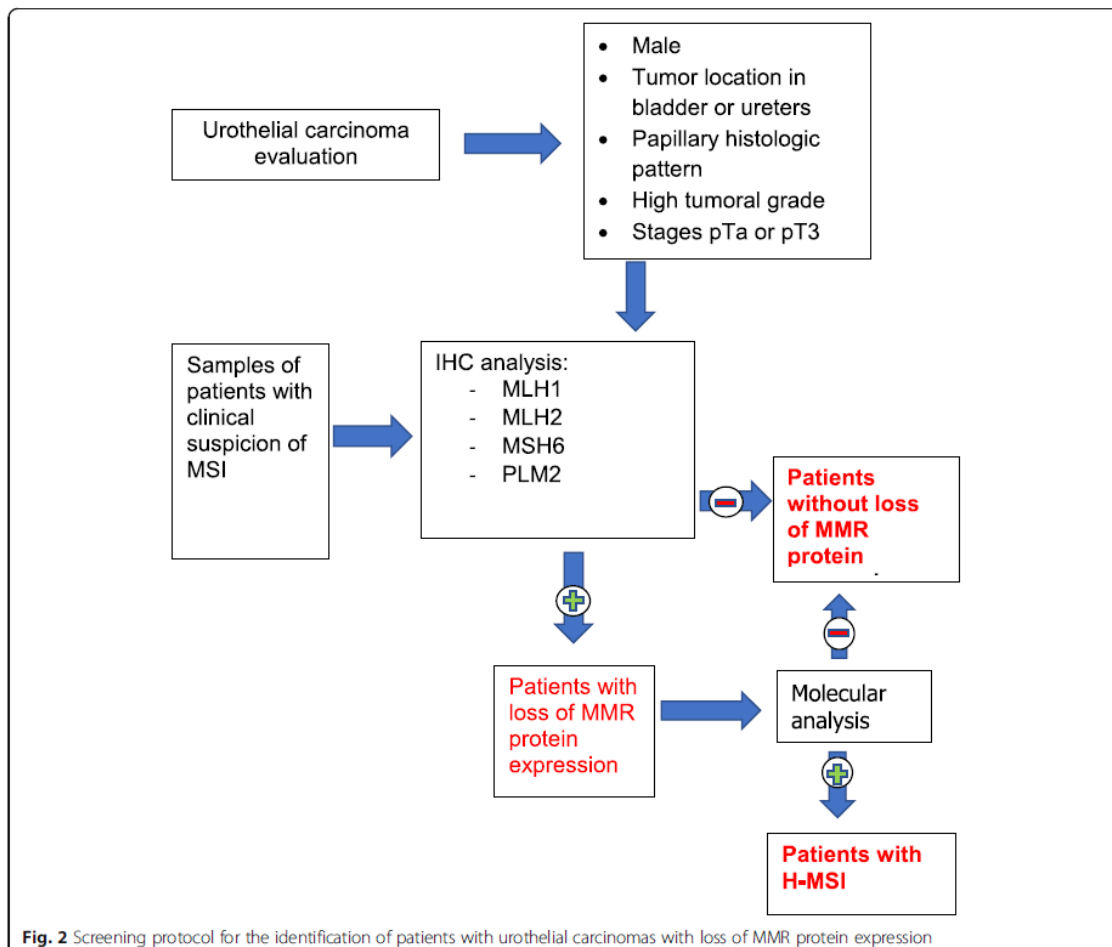
et al. [9]. The authors observed 20 lymphocytes per 10 HPF, whereas in our study very few patients presented intratumoral lymphocytes. This difference may be due to the design of the study, since we assessed intratumoral lymphocytosis in a hot-spot field, whereas Ju and collaborators counted the number of lymphocytes in 10 HPF. This difference in the design limits the comparison of results from the different studies.

On the other hand, we found differences in our results compared to previous studies. Urakami et al. [10] observed that tumors with MSI were more frequent in women, presented an inverted papillary pattern of low cytological grade and were diagnosed more frequently at pTa or pT1 stages. Our results differ at the gender, tumor pattern and grade levels. These differences may be due to the diversity of the population sample used, as Urakami et al. conducted their research in Tokyo, Japan. Dissimilarities between the European and Asian populations have

been previously reported in other tumors, such as the squamous cell carcinoma of the lung, whose incidence in Europe is more frequent in men, whereas in Asia it occurs more frequently in women [42].

Our study highlights that the identification of loss of MMR protein expression in urothelial carcinomas using a combination of histology data together with the clinical data of patients may provide an early detection tool for patient classification, and thus, a rapid tool for screening. It is also evidenced that evaluating histopathological and clinical data independently are not reliable enough to discriminate those patients with a higher probability of presenting loss of MMR protein expression. In this sense, we propose a protocol which integrates both data for patient classification (Fig. 2).

This study opens a way for future research, in which a comparison of the clinical and histological characteristics of patients who do not present IHC staining of one



or more MMR proteins and the result of their PCR tests can be made together with the study for PD-L1. Due to the small size of most of the samples (mostly obtained by transurethral resection), it is considered important not to exhaust the sample of patients who participated in the study.

According to this protocol, once the patients with the highest probability of presenting loss of MMR protein expression have been identified, they should undergo immunohistochemical techniques for MMR protein expression evaluation. This screening reduces the number of requests for IHC techniques, since IHC will only be performed on those patients with clinical suspicion or those who meet the aforementioned histological and clinical characteristics. If patients do not express any of the IHC markers, a molecular study would be carried out. The advantages of using this screening system could include an early detection of patients with loss of MMR protein expression, a reduction of economic costs as fewer IHC tests would be conducted, and, in the long term, a reduction of the morbidity and mortality of patients.

Conclusion

There is wide evidence that urothelial carcinomas present loss of MMR protein expression. In our study, the prevalence of urothelial carcinomas with loss of MMR protein expression was 10.3%. The combination of clinical data and histopathological characteristics may allow early identification of patients with high risk of presenting loss of MMR protein expression. Our study identified that these patients as male, with a tumor located in the bladder or ureters at the time of diagnosis, with a papillary histological pattern that does not infiltrate the lamina propria or, in the case of infiltrating tumors, that infiltrates perivesical tissues. We propose the evaluation of the clinicopathological characteristics identified in the present study to be applied as a screening guide, to help practitioners decide which cases should undergo additional tests. This protocol is proposed as a cost-effective tool that may help early diagnosis of patients with loss of MMR protein expression, reducing morbidity and mortality without implying an increase in work for the pathologist and laboratory technicians.

Abbreviations

MMR: Mismatch repair; MSI: Microsatellite instability; IHC: Immunohistochemistry; HPF: High-power field; H&E: Hematoxylin – eosin; PCR: *polymerase chain reaction*; MLH1: MutL. Proytein Homolog 1; MSH2: MutL. Proytein Homolog 2; MSH6: MutL. Proytein Homolog 6; PMS2: Postmeiotic Segregation Increased 2

Acknowledgments

The authors would like to thank the Pathological Anatomy Department of the University Hospital of Móstoles and the Spanish National Cancer Research Center for their assistance.

Authors' contributions

ES wrote the manuscript. TM and YM reviewed the case. DV, JG, TM, YM, and ES conducted the pathology study, contributed to the diagnosis, and provided helpful comments. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Funding

None.

Availability of data and materials

Not applicable.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Author details

¹Hospital Universitario del Tajo, Aranjuez, Madrid, Spain. ²Hospital Universitario de Móstoles, Móstoles, Madrid, Spain. ³Facultad de Medicina, Universidad Francisco de Vitoria, 28223, Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain. ⁴Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Francisco de Vitoria, Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain.

Received: 14 June 2021 Accepted: 8 November 2021

Published online: 20 November 2021

References

1. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics. *CA Cancer J Clin.* 2012;62(4):–241. <https://doi.org/10.3322/caac.21149>.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3):209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
3. Galceran J, Amejjide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Rojas D, et al. Cancer incidence in Spain. *Clin Transl Oncol.* 2015;19(7):825. <https://doi.org/10.1007/s12094-016-1607-9>.
4. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO classification of Tumours of the urinary system and male genital organs—part a: renal, penile, and testicular Tumours. *Eur Urol.* 2016;70(1): 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.029>.
5. Joost P, Therkildsen C, Dominguez-Valentin M, Jönsson M, Nilbert M. Urinary tract Cancer in lynch syndrome; increased risk in carriers of MSH2 mutations. *Urology.* 2015;86(6):1212–7. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2015.08.018>.
6. Pradere B, Lotan Y, Roupret M. Lynch syndrome in upper tract urothelial carcinoma: significance, screening, and surveillance. *Curr Opin Urol.* 2017; 27(1):48–55. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000340>.
7. Metcalfe MJ, Petros FG, Rao P, Mork ME, Xiao L, Broadbent RR, et al. Universal Point of Care Testing for Lynch Syndrome in Patients with Upper Tract Urothelial Carcinoma. *J Urol.* 2018;199(1):60–5.
8. Harper HL, McKenney JK, Heald B, Stephenson A, Campbell SC, Plessec T, et al. Upper tract urothelial carcinomas: frequency of association with mismatch repair protein loss and lynch syndrome. *Mod Pathol.* 2017;30(1): 146–56. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.171>.
9. Ju JY, Mills AM, Mahadevan MS, Fan J, Culp SH, Thomas MH, et al. Universal Lynch Syndrome Screening Should be Performed in All Upper Tract Urothelial Carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2018;42(11):1549–55.
10. Urakami S, Inoshita N, Oka S, Miyama Y, Nomura S, Arai M, et al. Clinicopathological characteristics of patients with upper urinary tract urothelial cancer with loss of immunohistochemical expression of the DNA mismatch repair proteins in universal screening. *Int J Urol.* 2018;25(2):151–6. <https://doi.org/10.1111/iju.13481>.

11. Morales Cristina PMA. Inestabilidad de microsatélites: papel diagnóstico e implicaciones pronósticas. *GH Contin*. 2006;5(1):18–22. [https://doi.org/10.1016/S1578-1550\(06\)74271-1](https://doi.org/10.1016/S1578-1550(06)74271-1).
12. Lindner AK, Schachtner G, Tulchiner G, Thurnher M, Untergasser G, Obrist P, et al. Lynch syndrome: its impact on urothelial carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2):1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms22020531>.
13. Fraune C, Simon R, Hube-Magg C, Makrypidi-Fraune G, Kähler C, Kluth M, et al. MMR deficiency in urothelial carcinoma of the bladder presents with temporal and spatial homogeneity throughout the tumor mass. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2020;38(5):488–95. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2019.12.012>.
14. Eriksson P, Therikildsen C, Höglund M, Jönsson M, Sjö Dahl G, Nilbert M, et al. Molecular subtype classification of urothelial carcinoma in Lynch syndrome. *Eur Urol Suppl*. 2018;12(8):1286–95.
15. Roa SJ, Araya OJC, Villaseca HMA, Roa EJ, Correa P. Inestabilidad microsatelital y pérdida de la heterocigocidad en lesiones neoplásicas y preneoplásicas gástricas. *Rev Med Chil*. 2003;131(11). <https://doi.org/10.4067/S0034-98872003001100001>.
16. Kawakami H, Zaanan A, Sinicrope FA. Microsatellite Instability Testing and Its Role in the Management of Colorectal Cancer. *HH5 Public Access*. 2016; 16(7):1–14. <https://doi.org/10.1007/s11864-015-0348-2>.
17. Chintalacheruvu LM, Shaw T, Buddam A, Diab O, Kassim T, Mukherjee S, et al. Major hereditary gastrointestinal cancer syndromes: a narrative review. *J Gastrointest Liver Dis*. 2017;26(2):157–63. <https://doi.org/10.15403/jgld.2014.11.21.262.maj>.
18. Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(5):591–604.
19. Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(5):591–604.
20. Chen W, Swanson BJ, Frankel WL. Molecular genetics of microsatellite-unstable colorectal cancer for pathologists. *Diagn Pathol* [internet]. 2017; 12(1):24. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13000-017-0613-8>.
21. Modica I, Soslow RA, Black D, Tornos C, Kauff N, Shia J. Utility of Immunohistochemistry in Predicting Microsatellite Instability in Endometrial Carcinoma. 2007;31(5):744–51. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000213428.61374.06>.
22. Hashmi AA, Mudassir G, Hashmi RN, Irfan M, Asif H, Khan EY, et al. Microsatellite instability in endometrial carcinoma by immunohistochemistry, association with clinical and histopathologic parameters. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(9):2601–6. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.9.2601>.
23. Clarke BA, Cooper K, Path FRC. Identifying Lynch Syndrome in Patients With Endometrial Carcinoma : Shortcomings of Morphologic and Clinical Schemas. 2012;19(4):231–8. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e31825c6b76>.
24. Laguna MP. Re: hereditary-like urothelial carcinomas of the upper urinary tract benefit more from adjuvant cisplatin-based chemotherapy after radical nephroureterectomy than do sporadic tumours. *J Urol*. 2015;193(1):72. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.10.016>.
25. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz HJ, Morse MA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2017;18(9):1182–91. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30422-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30422-9).
26. Burn J, Bishop DT, Mecklin JP, Macrae F, Möslin G, Olschwang S, et al. Effect of aspirin or resistant starch on colorectal neoplasia in the Lynch syndrome. *N Engl J Med*. 2008.
27. Movahedi M, Bishop DT, Macrae F, Mecklin JP, Moeslein G, Olschwang S, et al. Obesity, aspirin, and risk of colorectal cancer in carriers of hereditary colorectal cancer: a prospective investigation in the CAPP2 study. *J Clin Oncol*. 2015;33(31):3591–7. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.9952>.
28. Dashti SG, Chau R, Ouakrim DA, Buchanan DD, Clendenning M, Young JP, et al. Female hormonal factors and the risk of endometrial cancer in Lynch syndrome. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2015;314(1):61–71.
29. Chau R, Dashti SG, Ouakrim DA, Buchanan DD, Clendenning M, Rosty C, et al. Multivitamin, calcium and folic acid supplements and the risk of colorectal cancer in Lynch syndrome. *Int J Epidemiol*. 2016;45(3):940–53.
30. Ait Ouakrim D, Dashti SG, Chau R, Buchanan DD, Clendenning M, Rosty C, et al. Aspirin, ibuprofen, and the Risk of Colorectal Cancer in Lynch Syndrome. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(9):dju170.
31. Shia J, Holck S, Depetris G, Greenon JK, Klimstra DS. Lynch syndrome-associated neoplasms: a discussion on histopathology and immunohistochemistry. *Familial Cancer*. 2013;12(2):241–60. <https://doi.org/10.1007/s10689-013-9612-4>.
32. Wasco MJ, Daignault S, Zhang Y, Kunju LP, Kinnaman M, Braun T, et al. Urothelial carcinoma with divergent histologic differentiation (mixed histologic features) predicts the presence of locally advanced bladder cancer when detected at transurethral resection. *Urology*. 2007;70(1):69–74. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2007.03.033>.
33. Cancer Staging Manual AJCC. *AJCC Cancer Staging Manual*; 2017.
34. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK, Committee TBCC. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology Consensus Classification of Urothelial (Transitional Cell) Neoplasms of the Urinary Bladder. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 1998;22(12) Available from: https://journals.lww.com/ajsp/Fulltext/1998/12000/The_World_Health_Organization_International.1.aspx. Accessed May 2021.
35. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58(22):5248–57.
36. Dudley B, Brand RE, Thull D, Bahary N, Nikiforova MN, Pai RK. Germline MLH1 mutations are frequently identified in lynch syndrome patients with colorectal and endometrial carcinoma demonstrating isolated loss of PMS2 Immunohistochemical expression. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(8):1114–20. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000425>.
37. Pearlman R, Haraldsdottir S, de la Chapelle A, Jonasson JG, Liyanarachchi S, Frankel WL, et al. Clinical characteristics of patients with colorectal cancer with double somatic mismatch repair mutations compared with lynch syndrome. *J Med Genet*. 2019;56(7):462–70. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105698>.
38. Jass JR. Towards a molecular classification of colorectal cancer. *Int J Color Dis*. 1999;14(4-5):194–200. <https://doi.org/10.1007/s003840050211>.
39. Weinstein JN, Akbani R, Broom BM, Wang W, RGW V, McConkey D, et al. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 2014;507(7492):315–22.
40. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2012; 62(1):29. <https://doi.org/10.3322/caac.20138>.
41. IARC. IA for R on CWHO. In: *GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012: Globocan*; 2012. <https://a.csjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.3322/caac.21262>. Accessed May 2021.
42. Catto JWF, Azzouzi AR, Amira N, Rehman I, Feeley KM, Cross SS, et al. Distinct patterns of microsatellite instability are seen in tumours of the urinary tract. *Oncogene*. 2003;22(54):8699–706.
43. Cheng TYD, Cramb SM, Baade PD, Youlden DR, Nwogu C, Reid ME. The international epidemiology of lung cancer: latest trends, disparities, and tumor characteristics. *J Thorac Oncol*. 2016;11(10):1653–71. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.05.021>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



ANEXO II



INFORME DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN

D. David Marrupe González

Presidente de la Comisión de Investigación del Hospital Universitario de Móstoles

CERTIFICA:

Que esta Comisión ha evaluado el proyecto de investigación,

Titulado:

"Predictores morfológicos para la inestabilidad de microsatélites en el carcinoma urotelial" con nº reg/int 005/2018, cuyo investigador principal es D. Eduardo Sobrino Reig, y considera que se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del proyecto en relación con los objetivos del estudio.

Esta Comisión aprueba que dicho estudio pueda ser realizado en este Centro Hospitalario,

Lo que firmo en Móstoles a 17 de diciembre de 2018.

C/ Río Júcar s/n 28935 Móstoles-Madrid Tl. 91 664 86 00 www.madrid.org/hospitalmostoles

Fdo. David Marrupe González

Fumar perjudica su salud y la de los que le rodean
Está prohibido fumar en los centros sanitarios (Ley 42/2010). Hospitales sin Humo



BIBLIOGRAFÍA

(REDECAN), R. E. de R. de C. (2021) LA PREVALENCIA DEL CÁNCER EN ESPAÑA A 31-12-2020.

Ait Ouakrim, D. et al. (2015) 'Aspirin, Ibuprofen, and the Risk of Colorectal Cancer in Lynch Syndrome', *Journal of the National Cancer Institute*. doi: 10.1093/jnci/djv170.

AJCC. Cancer Staging Manual (2017) *AJCC Cancer Staging Manual*. doi: 10.1007/978-3-319-40618-3.

Andrés, G. et al. (2013) 'The study of DNA methylation in urological cancer: Present and future', *Actas Urológicas Españolas (English Edition)*. doi: 10.1016/j.acuroe.2013.03.001.

Antoni, S. et al. (2017) 'Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends', *European Urology*. doi: 10.1016/j.eururo.2016.06.010.

Arriola, A. G. P. et al. (2019) 'PD-L1 Expression Reveals Significant Association with Squamous Differentiation in Upper Tract Urothelial Carcinoma', *American Journal of Clinical Pathology*. doi: 10.1093/ajcp/aqz002.

Aure, J. C. and Nilsson, S. (1965) 'FAMILIAL DISPOSITION OF CANCER OF THE GASTROINTESTINAL TRACT.', *Acta chirurgica Scandinavica*.

Babjuk, M. et al. (2011) 'EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update', *European Urology*. doi: 10.1016/j.eururo.2011.03.017.

Bargen, J. A., Mayo, C. W. and Giffin, L. A. (1941) 'Familial trends in human cancer', *Journal of Heredity*. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a104955.

Battifora, H. (1986) 'Methods in laboratory investigation. The multitumor (sausage) tissue block: Novel method for immunohistochemical antibody testing', *Laboratory Investigation*.

Bermejo, J. L., Büchner, F. L. and Hemminki, K. (2004) 'Familial risk of endometrial cancer after exclusion of families that fulfilled Amsterdam, Japanese or Bethesda criteria for HNPCC', *Annals of Oncology*. doi: 10.1093/annonc/mdh135.

Bernardo, C. et al. (2019) 'Molecular pathology of the luminal class of urothelial tumors', *The Journal of Pathology*. doi: 10.1002/path.5318.

Bird, A. (2002) 'DNA methylation patterns and epigenetic memory', *Genes and Development*. doi: 10.1101/gad.947102.

Blanco Jiménez E, Bocardo Fajardo G, M. M. Z. (2003) Etiología, historia natural y clínica de los tumores vesicales malignos. In: *Tratado de oncología urológica*. Resel Estevez.

Boland, C. R. et al. (1998) 'A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer.', *Cancer research*. United States, 58(22), pp. 5248–5257.

Boland, C. R. and Lynch, H. T. (2013) 'The history of Lynch syndrome.', *Familial cancer*. doi: 10.1007/s10689-013-9637-8.

Bray, F. et al. (2018) 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. doi: 10.3322/caac.21492.

Burn, J. et al. (2008) 'Effect of aspirin or resistant starch on colorectal neoplasia in the Lynch syndrome', *New England Journal of Medicine*. doi: 10.1056/NEJMoa0801297.

Burn, J. et al. (2011) 'Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: An analysis from the CAPP2 randomised controlled trial', *The Lancet*. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61049-0.

Burn, J., Mathers, J. C. and Bishop, D. T. (2013) 'Chemoprevention in Lynch syndrome', *Familial Cancer*. doi: 10.1007/s10689-013-9650-y.

Buza, N., Ziai, J. and Hui, P. (2016) 'Mismatch repair deficiency testing in clinical practice', Expert Review of Molecular Diagnostics. doi: 10.1586/14737159.2016.1156533.

C., H. et al. (2014) 'Hereditary-like urothelial carcinomas of the upper urinary tract benefit more from adjuvant cisplatin-based chemotherapy after radical nephroureterectomy than do sporadic tumours', BJU International.

Castro-Mujica, M. D. C. and Barletta-Carrillo, C. (2018) 'Síndrome de Lynch: aspectos genéticos, clínicos y diagnósticos', Revista de gastroenterología del Perú : organo oficial de la Sociedad de Gastroenterología del Perú.

Catto, J. W. F. et al. (2003) 'Distinct patterns of microsatellite instability are seen in tumours of the urinary tract', Oncogene. doi: 10.1038/sj.onc.1206964.

Chau, R. et al. (2016) 'Multivitamin, calcium and folic acid supplements and the risk of colorectal cancer in Lynch syndrome', International Journal of Epidemiology. doi: 10.1093/ije/dyw036.

Chaux A. (2019) Normal histology., PathologyOutlines.com. Available at: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/bladderhistology.html>. (Accessed: 13 November 2019).

Chen, W., Swanson, B. J. and Frankel, W. L. (2017) 'Molecular genetics of microsatellite-unstable colorectal cancer for pathologists', Diagnostic Pathology, 12(1), p. 24. doi: 10.1186/s13000-017-0613-8.

Cheng, T. Y. D. et al. (2016) 'The international epidemiology of lung cancer: Latest trends, disparities, and tumor characteristics', Journal of Thoracic Oncology. doi: 10.1016/j.jtho.2016.05.021.

Ching, C. B. et al. (2011) 'HER2 gene amplification occurs frequently in the micropapillary variant of urothelial carcinoma: Analysis by dual-color in situ hybridization', Modern Pathology. doi: 10.1038/modpathol.2011.69.

Chintalacheruvu, L. M. et al. (2017) 'Major hereditary gastrointestinal cancer syndromes: A narrative review', *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. doi: 10.15403/jgld.2014.1121.262.maj.

Choi, W. et al. (2014) 'Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy', *Cancer Cell*. doi: 10.1016/j.ccr.2014.01.009.

Cummings, K. B., Barone, J. G. and Ward, W. S. (1992) 'Diagnosis and staging of bladder cancer', *Urologic Clinics of North America*. doi: 10.22328/2079-5343-2017-4-16-24.

D., F. et al. (1996) 'Evaluation of c-RAS oncogene product (p21) in superficial bladder cancer', *European Urology*.

Damrauer, J. S. et al. (2014) 'Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1318376111.

Daneshmand, S. (2017) 'Epidemiology and risk factors of urothelial (transitional cell) carcinoma of the bladder', *Wolters Kluwer*.

Dashti, S. G. et al. (2015) 'Female hormonal factors and the risk of endometrial cancer in Lynch syndrome', *JAMA - Journal of the American Medical Association*. doi: 10.1001/jama.2015.6789.

Dudley, B. et al. (2015) 'Germline MLH1 Mutations Are Frequently Identified in Lynch Syndrome Patients With Colorectal and Endometrial Carcinoma Demonstrating Isolated Loss of PMS2 Immunohistochemical Expression.', *The American journal of surgical pathology*. United States, 39(8), pp. 1114–1120. doi: 10.1097/PAS.0000000000000425.

Eriksson, P. et al. (2018) 'Molecular subtype classification of urothelial carcinoma in Lynch syndrome', *European Urology Supplements*. doi: 10.1016/S1569-9056(18)31896-7.

- Esparza et al.** (2002) 'El fenotipo de inestabilidad de microsatelites (MIN) revela un patrón específico de mutaciones durante la carcinogénesis del colon', *Revista de Diagnostico Biologico*.
- Esteller, M.** (2005) 'Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095832.
- Esteller, M.** (2007) 'Epigenetic gene silencing in cancer: The DNA hypermethylome', *Human Molecular Genetics*. doi: 10.1093/hmg/ddm018.
- Ferlay, J. et al.** (2010) 'Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008', *International Journal of Cancer*. doi: 10.1002/ijc.25516.
- Fernández-Navarro, P. et al.** (2021) 'Atlas of Cancer Mortality in Portugal and Spain 2003–2012', National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge (Portugal) and National Institute of Health Carlos III (Spain).
- Fernández González I, Moreno Santurino A, Llanes González L, B. S. A.** (2000) *Métodos diagnosticos del cáncer vesical*. Edited by R. Estevez.
- Fraune, C. et al.** (2020) 'MMR deficiency in urothelial carcinoma of the bladder presents with temporal and spatial homogeneity throughout the tumor mass', *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 38(5), pp. 488–495. doi: 10.1016/j.urolonc.2019.12.012.
- Fujita, S. et al.** (1996) 'Prognosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and the role of Japanese criteria for HNPCC', *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 26(5), pp. 351–355. doi: 10.1093/oxfordjournals.jjco.a023244.
- Galceran, J. et al.** (2014) 'Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en españa y su situación en europa', *Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN)*. doi: 10.1002/ajmg.a.37352.

García-Tello, A. et al. (2014) 'Genes reparadores del ADN y pronóstico en formas esporádicas de carcinoma urotelial del tracto urinario superior', *Actas Urologicas Espanolas*. doi: 10.1016/j.acuro.2014.03.010.

Giardiello, F. M. et al. (2014) 'Guidelines on genetic evaluation and management of lynch syndrome: A consensus statement by the US multi-society task force on colorectal cancer', *American Journal of Gastroenterology*. doi: 10.1038/ajg.2014.186.

Glidzic, V. and Petrovic, G. (1968) 'Observations sur le caractère héréditaire des cancers du colon.', *Bulletin du Cancer*.

Global cancer observatoy (2022) *Globocam 2020*. Available at: <https://gco.iarc.fr> (Accessed: 22 February 2022).

Greenlee RT1, Murray T, Bolden S, W. P. (2000) 'Cancer statistics, 2000.', *CA Cancer J Clin.*, Jan-Feb (50(1)), pp. 7–33.

Harper, H. L. et al. (2017) 'Upper tract urothelial carcinomas: Frequency of association with mismatch repair protein loss and lynch syndrome', *Modern Pathology*. doi: 10.1038/modpathol.2016.171.

Hoque, M. O. et al. (2006) 'Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection', *Journal of the National Cancer Institute*. doi: 10.1093/jnci/djj265.

Hudson, M. A. and Herr, H. W. (1995) 'Carcinoma in Situ of the Bladder', *The Journal of Urology*. doi: 10.1016/S0022-5347(01)67650-X.

Inamura, K. and Kentaro (2018) 'Bladder Cancer: New Insights into Its Molecular Pathology', *Cancers*. doi: 10.3390/cancers10040100.

Järvinen, H. J. et al. (2000) 'Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer', *Gastroenterology*. doi: 10.1016/S0016-5085(00)70168-5.

Jemal, A. et al. (2011) 'Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011';, Ca Cancer J Clin. doi: 10.3322/caac.20107.Available.

Jointly issued by the American Cancer Society (ACS), the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), the North American Association of Central Cancer Registries (NAACCR), and the N. C. I. (NCI) (2021) Annual Report to the Nation on the Status of Cancer. Available at: <https://seer.cancer.gov/> (Accessed: 20 March 2021).

Joost P, Therkildsen C, Dominguez-Valentin M, Jönsson M, N. M. (2015) 'Urinary Tract Cancer in Lynch Syndrome; Increased Risk in Carriers of MSH2 Mutations.', Urology.

Borras, MJ, et al. (2009) Estrategia en Cáncer del Sistema Nacional de Salud, Ministerio de Sanidad. Available at: <https://www.mscbs.gob.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/pdf/ActualizacionEstrategiaCancer.pdf> (Accessed: 16 October 2020).

Jover, R. and Payá, A. (2003) 'Inestabilidad de microsatélites en el cáncer colorrectal: Concepto, métodos de detección y utilidad clínica', Gastroenterología y Hepatología. doi: 10.1157/13055138.

Ju, J. Y. et al. (2018) 'Universal Lynch Syndrome Screening Should be Performed in All Upper Tract Urothelial Carcinomas', American Journal of Surgical Pathology. doi: 10.1097/PAS.0000000000001141.

Kaubisch, S. et al. (1991) 'Stage T1 bladder cancer: Grade is the primary determinant for risk of muscle invasion', Journal of Urology. doi: 10.1016/S0022-5347(17)37706-6.

Kluge, T. (1964) 'FAMILIAL CANCER OF THE COLON.', Acta chirurgica Scandinavica.

Kohlmann, W. and Gruber, S. B. (2004) Lynch Syndrome. 2004 Feb 5 [Updated 2018 Apr 12]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019., GeneReviews(®).

Kononen, J. et al. (1998) 'Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens', *Nature Medicine*. doi: 10.1038/nm0798-844.

Lamm, D. L. et al. (1992) 'Current perspectives on diagnosis and treatment of superficial bladder cancer', *Urology*. doi: 10.1016/0090-4295(92)90202-8.

Lee, C. S. D., Yoon, C. Y. and Witjes, J. A. (2008) 'The past, present and future of cystoscopy: The fusion of cystoscopy and novel imaging technology', *BJU International*. doi: 10.1111/j.1464-410X.2008.07964.x.

Lerner, S. P. et al. (2016) 'Bladder cancer molecular taxonomy: Summary from a consensus meeting', in *Bladder Cancer*. doi: 10.3233/BLC-150037.

Lynch, H. T. et al. (1966) 'Hereditary Factors in Cancer: Study of Two Large Midwestern Kindreds', *Archives of Internal Medicine*. doi: 10.1001/archinte.1966.03870080050009.

Lynch, H. T. and Krush, A. J. (1967) 'Heredity and adenocarcinoma of the colon.', *Gastroenterology*. doi: 10.1016/s0016-5085(19)34179-4.

Lynch, H. T. and Krush, A. J. (1971) 'Cancer family "G" revisited: 1895-1970', *Cancer*. doi: 10.1002/1097-0142(197106)27:6<1505:AID-CNCR2820270635>3.0.CO;2-L.

Lynch, H. T., Krush, A. J. and Larsen, A. L. (1967) 'Heredity and multiple primary malignant neoplasms: six cancer families.', *The American journal of the medical sciences*. doi: 10.1097/00000441-196709000-00007.

MacRae, F. (2019) 'CaPP3 and risk management of familial colorectal cancer', *Twin Research and Human Genetics*. doi: 10.1017/thg.2019.80.

Mari A. & et al. (2018) 'Cáncer de vejiga: en un metanálisis, la invasión linfovascular pronostica la recurrencia después de la cistectomía radical', *Urol Oncol*, april.

- Mechoso et al.** (2016) 'Inestabilidad de microsatelites: aplicaciones al diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer colorectal', Instituto de Genética Médica. Hospital italiano.
- Médica, S. E. de O.** (2019) 'Las cifras del Cáncer en España 2019', Sociedad Española de Oncología Médica.
- Messing; Edward M; Patrick C. Walsh, M. E. et al.** (2004) Tumores uroteliales del tracto urinario. 8a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Metcalfe, M. J. et al.** (2018) 'Universal Point of Care Testing for Lynch Syndrome in Patients with Upper Tract Urothelial Carcinoma', Journal of Urology. doi: 10.1016/j.juro.2017.08.002.
- Millán-Rodríguez, F. et al.** (2000) 'Primary superficial bladder cancer risk groups according to progression, mortality and recurrence', Journal of Urology. doi: 10.1016/S0022-5347(05)67280-1.
- Moch, H. et al.** (2016) 'The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours', European Urology. doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.029.
- Molina Burgos, R; Millán Salvador, J.M.; Oltra Soler, J.S.; Jiménez Cruz, J. F.** (2003) 'Análisis de microsatelites en células exfoliadas del sedimento urinario. Su utilidad para la detección de cáncer vesical. Estudio comparativo con citología urinaria.', Actas Urológicas Españolas.
- Morales, Cristina Peinado, M. A.** (2006) 'Inestabilidad de microsatelites: papel diagnóstico e implicaciones pronósticas', GH CONTINUADA.
- Moreira, L.** (2012) 'Update on colorectal cancer precursor lesions', Gastroenterología y Hepatología. doi: 10.1016/S0210-5705(12)70038-9.

Móstoles, A. de (2021) Estadísticas del Municipio 2020. Available at: https://www.mostoles.es/SEDE_ELECTRONICA/es/informacion-administrativa/estadisticas-municipio.ficheros/880769-Piramide de Población total de Móstoles 01-01-2019.pdf (Accessed: 2 February 2020).

Murphy WM, Emerson LD, Chandler RW, Murphy WM, Emerson LD, Chandler RW, Moinuddin SM, S. M. (1986) 'Flow cytometry versus urinary cytology in the evaluation of patients with bladder cancer.', *J Urol*, Oct (43), pp. 155–61.

Myrhøj, T., Andersen, M. B. and Bernstein, I. (2008) 'Screening for urinary tract cancer with urine cytology in Lynch syndrome and familial colorectal cancer', *Familial Cancer*. doi: 10.1007/s10689-008-9193-9.

Navarro, S. et al. (2012) 'Recomendación para la determinación de biomarcadores en el carcinoma colorrectal. Consenso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica', *Revista Espanola de Patologia*. doi: 10.1016/j.patol.2012.05.001.

Overman, M. J. et al. (2017) 'Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study', *The Lancet Oncology*. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30422-9.

Overman, M. J. et al. (2018) 'Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high metastatic colorectal cancer', *Journal of Clinical Oncology*. doi: 10.1200/JCO.2017.76.9901.

Parakh R, R. M. (2019) Urothelial carcinoma-invasive., *PathologyOutlines.com*. Available at: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/bladderurothelialinvasivegen.html>. (Accessed: 16 November 2019).

- 'Pavone-Macaluso M, Caramia M, Pavone C.** Tumores vesicales: manifestaciones clínicas. En: Vicente J, Chéchile G, Salvador J. Tumores vesicales superficiales. Madrid. Acción Médica, S.A.;2000. 63-6' (2020) in.
- Peltomäki, P.** (2014) 'Epigenetic mechanisms in the pathogenesis of Lynch syndrome', *Clinical Genetics*. doi: 10.1111/cge.12349.
- Picazo, M. L., Regajo, R. M. and González-Peramato, P.** (2007) 'Variantes histológicas del carcinoma urotelial con implicaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas', *Actas Urologicas Espanolas*. doi: 10.1016/S0210-4806(07)73762-2.
- PR, M.** (1989) 'Transabdominal ultrasound surveillance for bladder cancer', *Urol Clin North Am*, Nov (16(4)), p. 553.
- Pradere, B., Lotan, Y. and Roupret, M.** (2017) 'Lynch syndrome in upper tract urothelial carcinoma: Significance, screening, and surveillance', *Current Opinion in Urology*. doi: 10.1097/MOU.0000000000000340.
- Ramirez D, gupta A. Canter D, et al** (2016) 'Microscopic hematuria at yime of diagnosis is associated with lower disease stage in patients with newly diagnosis bladder cancer', *BJU International*, 117, pp. 783–9.
- Roa S, J. C. et al.** (2003) 'Inestabilidad microsatelital y pérdida de la heterocigocidad en lesiones neoplásicas y preneoplásicas gástricas', *Revista Médica de Chile*. doi: 10.4067/S0034-98872003001100001.
- Robertson, A. G. et al.** (2017) 'Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.007.
- Rossi, S. et al.** (2015) 'The EURO CARE-5 study on cancer survival in Europe 1999-2007: Database, quality checks and statistical analysis methods', *European Journal of Cancer*. doi: 10.1016/j.ejca.2015.08.001.

Rouprêt, M. et al. (2008) 'Upper Urinary Tract Urothelial Cell Carcinomas and Other Urological Malignancies Involved in the Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) Tumor Spectrum', *European Urology*. doi: 10.1016/j.eururo.2008.08.008.

Sánchez-Carbayo, M. (2012) 'Hypermethylation in bladder cancer: Biological pathways and translational applications', *Tumor Biology*. doi: 10.1007/s13277-011-0310-2.

Sant, M. et al. (2009) 'EUROCORE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary', *European Journal of Cancer*. doi: 10.1016/j.ejca.2008.11.018.

Savage, D. (1956) 'A Family History of Uterine and Gastro-Intestinal Cancer', *British Medical Journal*. doi: 10.1136/bmj.2.4988.341.

Shah, Amishi & Lemke, E. (2018) 'Advances in the Management of Patients With Urothelial Carcinomas of the Bladder.', *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology.*, 9, pp. 316–320.

Shah, J. B., McConkey, D. J. and Dinney, C. P. N. (2011) 'New strategies in muscle-invasive bladder cancer: On the road to personalized medicine', *Clinical Cancer Research*. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2770.

Shia, J. et al. (2013) 'Secondary mutation in a coding mononucleotide tract in MSH6 causes loss of immunoexpression of MSH6 in colorectal carcinomas with MLH1/PMS2 deficiency', *Modern Pathology*, 26(1), pp. 131–138. doi: 10.1038/modpathol.2012.138.

Siegel, R. et al. (2012) 'Cancer treatment and survivorship statistics, 2012', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. doi: 10.3322/caac.21149.

Sjödahl, G. et al. (2012) 'A molecular taxonomy for urothelial carcinoma', *Clinical Cancer Research*. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0077-T.

Sjödahl, G. et al. (2013) 'Toward a molecular pathologic classification of urothelial carcinoma', *American Journal of Pathology*. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.05.013.

- Sjödahl, G.** (2018) 'Molecular subtype profiling of urothelial carcinoma using a subtype-specific immunohistochemistry panel', in *Methods in Molecular Biology*. doi: 10.1007/978-1-4939-7234-0_5.
- Sjödahl, G. et al.** (2019) 'Molecular profiling in muscle-invasive bladder cancer: more than the sum of its parts', *Journal of Pathology*. doi: 10.1002/path.5230.
- Skeldon, S. C. et al.** (2013) 'Patients with Lynch syndrome mismatch repair gene mutations are at higher risk for not only upper tract urothelial cancer but also bladder cancer.', *Eur Urol*. doi: 10.1016/j.eururo.2012.07.047.
- Sociedad Española de Oncología Médica** (2021) *Las cifras del cáncer en España*.
- South, C. D. et al.** (2008) 'The frequency of Muir-Torre syndrome among Lynch syndrome families', *Journal of the National Cancer Institute*. doi: 10.1093/jnci/djm291.
- Steven C Campbell, Seth P Lerner, Joann G Elmore, J. A. M.** (2018) 'Screening for bladder cancer', Wolters Kluwer.
- Surgeons, A. C. of** (2020) *National Cancer Database*. Available at: <http://www.facs.org/cancer/ncdb> (Accessed: 20 September 2020).
- Tan, T. Z. et al.** (2019) 'Molecular Subtypes of Urothelial Bladder Cancer: Results from a Meta-cohort Analysis of 2411 Tumors', *European Urology*. doi: 10.1016/j.eururo.2018.08.027.
- Tecklenburg J. et al.** (2019) 'Current recommendations for surveillance, risk reduction and therapy in Lynch syndrome patients.', *Z Gastroenterol.*, Nov, pp. 1309–1320. doi: 10.1055/a-1008-9827.
- Tiwari, A. K., Roy, H. K. and Lynch, H. T.** (2016) 'Lynch syndrome in the 21st century: Clinical perspectives', *QJM*. doi: 10.1093/qjmed/hcv137.

Torti, F. M. et al. (1987) 'Superficial bladder cancer: The primacy of grade in the development of invasive disease', *Journal of Clinical Oncology*. doi: 10.1200/JCO.1987.5.1.125.

Ud Din, N., Qureshi, A. and Mansoor, S. (2011) 'Utility of p63 immunohistochemical stain in differentiating urothelial carcinomas from adenocarcinomas of prostate', *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. doi: 10.4103/0377-4929.77326.

Umar, A. et al. (2004) 'Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability', *Journal of the National Cancer Institute*. doi: 10.1093/jnci/djh034.

Urakami, S. et al. (2018) 'Clinicopathological characteristics of patients with upper urinary tract urothelial cancer with loss of immunohistochemical expression of the DNA mismatch repair proteins in universal screening', *International Journal of Urology*. doi: 10.1111/iju.13481.

Valenzuela, M. T. et al. (2002) 'Assessing the use of p16INK4a promoter gene methylation in serum for detection of bladder cancer', *European Urology*. doi: 10.1016/S0302-2838(02)00468-2.

Vasen, H. F. A. et al. (1991) 'The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC)', *Diseases of the Colon and Rectum*. doi: 10.1007/bf02053699.

Vasen, H. F. A. et al. (1999) 'New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC', in *Gastroenterology*. doi: 10.1016/S0016-5085(99)70510-X.

Wakui, M. and Shiigai, T. (2000) 'Urinary tract cancer screening through analysis of urinary red blood cell volume distribution', *International Journal of Urology*. doi: 10.1046/j.1442-2042.2000.00184.x.

- Warthin, A. S.** (1913) 'Heredity with reference to carcinoma: As shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the university of michigan, 1895-1913', *Archives of Internal Medicine*. doi: 10.1001/archinte.1913.00070050063006.
- Wasco, M. J. et al.** (2007) 'Urothelial carcinoma with divergent histologic differentiation (mixed histologic features) predicts the presence of locally advanced bladder cancer when detected at transurethral resection.', *Urology*. United States, 70(1), pp. 69–74. doi: 10.1016/j.urology.2007.03.033.
- Weinstein, J. N. et al.** (2014) 'Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma', *Nature*. doi: 10.1038/nature12965.
- Wolff, A. C. et al.** (2007) 'American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer', *Journal of Clinical Oncology*. doi: 10.1200/JCO.2006.09.2775.
- Wu, Xiaomo et al.** 'Application of PD-1 Blockade in Cancer Immunotherapy', *Computational and structural biotechnology journal* vol. 17 661-674. 23 May. 2019, doi: 10.1016/j.csbj.2019.03.006.
- Zhang, X. K. et al.** (2015) 'Tumor necrosis predicts poor clinical outcomes in patients with node-negative upper urinary tract urothelial carcinoma', *Japanese Journal of Clinical Oncology*. doi: 10.1093/jjco/hyv127.

