



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

**Sottotipi immunoistochimici molecolari del
carcinoma vescicale: valore diagnostico,
prognostico e predittivo.**

Relatore: Chiar.mo
Prof. Rodolfo Montironi

Tesi di Laurea di:
Alberto Chierigo

Correlatore:
Dott.ssa Roberta Mazzucchelli

A.A. 2019/2020

Indice

RIASSUNTO	3
INTRODUZIONE	6
CLASSIFICAZIONE DEI CARCINOMI UROTELIALI NON MUSCOLO INVASIVI	7
Lesioni piatte.....	7
Lesioni papillari	8
ETEROGENEITÀ NEL GRADO DEL CARCINOMA UROTELIALE PAPILLARE	13
STADIAZIONE DEI CARCINOMI UROTELIALI NON MUSCOLO INVASIVI	14
Sotto categorie per il pT1	17
ORIGINE E CARATTERISTICHE MOLECOLARI DEL CARCINOMA UROTELIALE	20
Origine del carcinoma vescicale	21
Evoluzione del concetto dell'origine del carcinoma vescicale	22
Cellula di origine e l'effetto campo	23
Caratteristiche molecolari del carcinoma vescicale e caratterizzazione immunoistochimica.....	25
SCOPO DELLO STUDIO	27
MATERIALI E METODI.....	28
Casi e caratteristiche cliniche.....	28
Immunoistochimica e valutazione semiquantitativa	29
Analisi statistica	30
RISULTATI	32
DISCUSSIONE.....	47
BIBLIOGRAFIA.....	51

RIASSUNTO

Più del 90% dei carcinomi della vescica nei paesi industrializzati è di tipo uroteliale e la maggior parte, circa il 70-80%, delle neoplasie uroteliali è non muscolo invasivo alla prima diagnosi. Le neoplasie non invasive possono essere distinte in due categorie separate: piatte e papillari. Il 70-75% è di tipo papillare e più del 50% è di basso grado. Le neoplasie uroteliali non muscolo invasive nel 50-70% dei casi recidivano, mentre nel 15-25% progrediscono ad uno stadio più alto. Le neoplasie papillari non muscolo invasive possono presentare eterogeneità sia dal punto di vista istologico che nella prognosi. L'origine della neoplasia uroteliale della vescica rimane ancora incerta, tuttavia analisi istologiche e molecolari della struttura dell'urotelio, costituito da cellule basali, intermedie e luminale, hanno fornito importanti indizi sulla cancerogenesi delle neoplasie vescicali papillari e non papillari e sulla loro intrinseca eterogeneità.

Il modello di cancerogenesi attualmente più accreditato prevede un iniziale 'field effect' su tipi differenti di cellule uroprogenitrici con espansione cellulare guidata da geni precursori (FR) diversi, alcuni innescano l'espansione di cellule progenitrici intermedie portando allo sviluppo di carcinomi papillari di tipo luminale, altri guidano l'espansione delle cellule progenitrici basali portando allo sviluppo di carcinomi di tipo basale. Virtualmente tutte le neoplasie papillari di basso grado superficiali sono di tipo luminale, il 50% delle neoplasie invasive evolve da preesistenti lesioni papillari che sono di tipo luminale ma che diventano di alto grado perdendo i geni di soppressione tumorale come PTEN, PT53 e RB1, mentre il restante 50% dei tumori presenta un fenotipo basale.

L'introduzione di tecnologie capaci di catalogare l'intero genoma, i pattern di espressione del mRNA e le alterazioni del DNA in una certa neoplasia ha permesso di approfondire la conoscenza dell'eterogeneità delle neoplasie vescicali, mettendo in evidenza sottotipi

molecolari, con pattern di espressione genica basale, luminale e con caratteristiche intermedie, all'interno di carcinomi vescicali muscolo invasivi e non muscolo invasivi.

Diversi studi sono stati effettuati per identificare dei marker immunoistochimici da utilizzare come surrogato per classificare il carcinoma della vescica muscolo invasivo nei sottotipi molecolari basale, luminale e in quelli con caratteristiche intermedie.

Il nostro studio si è proposto di determinare lo stato di espressione immunoistochimico nei carcinomi papillari vescicali non muscolo invasivi, utilizzando CK20 e CK5/6 come surrogato dei fenotipi luminale e basale. Inoltre, abbiamo indagato le differenze tra i sottotipi immunoistochimici molecolari ottenuti e la sopravvivenza libera da recidiva, libera da progressione e la sopravvivenza tumore-specifica nelle neoplasie vescicali non muscolo invasive.

Lo studio si basa su una serie di 147 pazienti con tumori primitivi della vescica non muscolo invasivi trattati tra il 2003 ed il 2015. L'età media dei pazienti alla diagnosi era di 66,88 anni (range 29-93). Di questi 147 casi, 110 pazienti avevano un carcinoma papillare non invasivo (pTa), di questi 95 erano di basso grado e 15 di alto grado, i restanti 37 casi erano carcinomi di alto grado infiltranti il connettivo sotto epiteliale (pT1). Il follow-up dei pazienti ha avuto una durata di 76 mesi.

Utilizzando i marker CK20 e CK 5/6 abbiamo potuto suddividere i nostri casi in quattro sottotipi: luminale, basale, misto e negativo. Di seguito abbiamo posto in relazione i sottotipi immunoistochimici molecolari individuati con la sopravvivenza libera da recidiva, libera da progressione e tumore-specifica, ottenendo per il sottotipo luminale, nei carcinomi uroteliali papillari di alto grado in stadio sia pTa che pT1, un valore predittivo di maggiore aggressività, mentre il sottotipo misto è risultato il meno aggressivo.

Quindi l'espressione immunoistochimica dei marker CK20-CK5/6 potrebbe essere usata per classificare i carcinomi vescicali non muscolo invasivi in sottotipi molecolari con diversa prognosi.

Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per indagare la correlazione tra i sottotipi molecolari dei carcinomi vescicali non muscolo invasivi e la risposta alla terapia e per sviluppare pienamente il potenziale di questa classificazione e la sua introduzione nella pratica clinica.

INTRODUZIONE

Il carcinoma della vescica è la 9° neoplasia maligna diagnosticata nel mondo. Più del 90% dei carcinomi della vescica nei paesi industrializzati è di tipo uroteliale e la maggior parte, circa il 70-80%, delle neoplasie uroteliali è non muscolo invasiva alla prima diagnosi^{1,2}. Queste possono essere distinte in due categorie separate: piatte e papillari, sulla base del loro pattern di crescita in relazione alla superficie uroteliale della mucosa circostante. Questi due tipi di lesione possono presentarsi separatamente o in combinazione.

Approssimativamente il 70-75% delle neoplasie non muscolo invasive è di tipo papillare e più del 50% è di basso grado^{3,4,5}.

Le neoplasie uroteliali non muscolo invasive nel 50-70% dei casi recidivano, mentre nel 15-25% progrediscono ad uno stadio più alto⁶. I pazienti con neoplasie uroteliali non muscolo invasive richiedono uno stretto follow-up e ciò causa un aumento di spesa per il sistema sanitario^{7,8,9}.

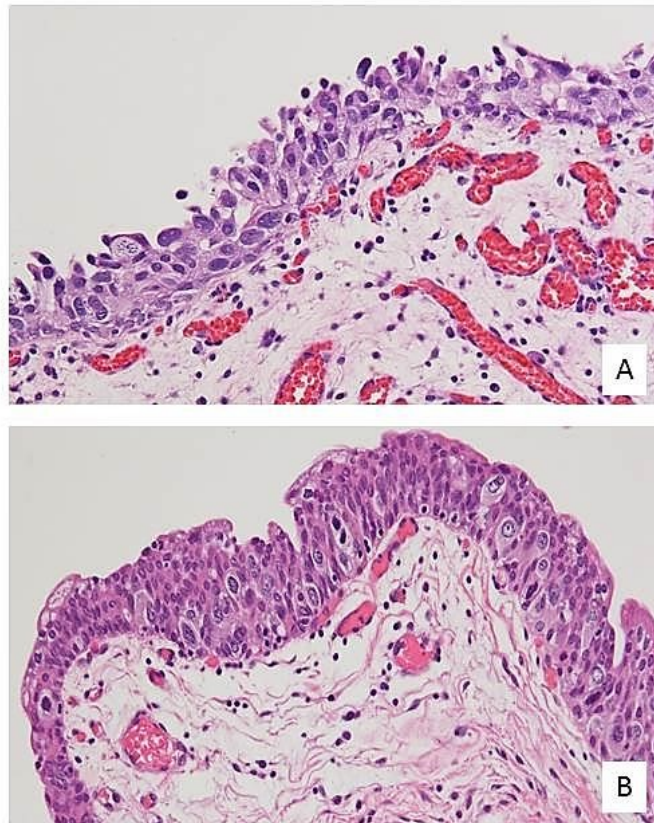
CLASSIFICAZIONE DEI CARCINOMI UROTELIALI NON MUSCOLO INVASIVI

Lesioni piatte

Carcinoma uroteliale in situ (CIS). Neoplasia priva di architettura papillare, costituita da cellule pleomorfe francamente atipiche con estensione limitata all'urotelio. Le cellule perdono il loro normale orientamento o polarità e presentano nuclei ipercromatici, con nucleoli prominenti. Si possono osservare mitosi in tutti gli strati.

Il carcinoma uroteliale in situ possiede delle varianti morfologiche che non ne modificano la prognosi ma sono utili al fine della diagnosi istologica: piccole cellule, grandi cellule, denudato e pagetoide¹⁰ (Figura 1A e B).

Figura 1. Carcinoma uroteliale in situ (A); carcinoma uroteliale in situ di tipo pagetoide (B).



Il carcinoma in situ è spesso multifocale e può presentarsi come tale nella vescica, ma anche nel tratto urinario superiore e nell'uretra¹¹.

Dal punto di vista clinico il carcinoma uroteliale in situ può essere classificato come: tumore primario se isolato in assenza di un precedente o concomitante tumore papillare e in assenza di un precedente CIS; tumore secondario se individuato durante il follow-up di pazienti con un precedente tumore non CIS; tumore sincro quando si osserva simultaneamente a ogni altro tumore uroteliale nella vescica¹².

Lesioni papillari

I carcinomi uroteliali papillari sono le neoplasie non muscolo invasive di più frequente riscontro. Il primo sistema di 'grading' largamente accettato per le neoplasie uroteliali papillari è stato quello introdotto nel 1973 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) che divideva i tumori uroteliali papillari in 4 categorie: papilloma, carcinoma di grado 1, carcinoma di grado 2 e carcinoma di grado 3¹³. Il grado istologico si basava sul grado di anaplasia presente definito come: incremento della cellularità, affollamento nucleare, perdita della polarità cellulare, mancanza di differenziazione dalla base alla superficie, polimorfismo nucleare, dimensioni irregolari delle cellule, variazioni nella forma e nel pattern cromatinico dei nuclei e presenza di mitosi. I tumori di grado 1 possedevano il minimo grado di anaplasia compatibile con la diagnosi di malignità, i tumori di grado 3 avevano il più severo grado di anaplasia e i tumori di grado 2 avevano un grado di anaplasia intermedio.

Per oltre due decenni questa classificazione è stata utilizzata e considerata di riferimento dai patologi, urologi ed oncologi in tutto il mondo. Agli inizi degli anni '90 sono emerse alcune criticità che hanno reso necessaria una rivalutazione dell'approccio a questa classificazione:

- 1) Alcuni gruppi di ricerca espressero delle perplessità nel chiamare carcinomi delle neoplasie papillari di grado 1;
- 2) L'uso di terapia endovesicale come pratica standard nel trattamento di tumori papillari non invasivi di alto rischio richiedeva che i tumori di alto rischio fossero identificati;
- 3) La classificazione del WHO 1973 era criticata per l'imprecisione dei criteri istologici, portando molti patologi a creare cinque gruppi di gradi anziché tre (1, 1-2, 2, 2-3 e 3) con l'effetto di confondere i clinici.

Nel 1998 l'ISUP (International Society of Urological Pathology) in associazione con l'OMS ha proposto di modificare il sistema di classificazione delle neoplasie non invasive sia piatte che papillari, soprattutto riguardo alle neoplasie papillari¹⁴. Questa proposta fu accettata definitivamente nel 2004 con la sua pubblicazione nel 'WHO Blue book' e attualmente mantenuta nella 4° edizione del 'WHO Blue book' del 2016¹⁵ (Tabella 1).

Il sistema di classificazione introdotto nel 2004 divide i tumori papillari uroteliali in: neoplasia papillare uroteliale a basso potenziale di malignità (PUNLMP), carcinoma uroteliale papillare di basso grado e carcinoma uroteliale papillare di alto grado.

Per le neoplasie uroteliali papillari il sistema di classificazione dell'OMS 2004-2016 richiede la valutazione del livello di disordine architetturale e citologico a basso e medio ingrandimento (100x e 200x). Definendo il disordine architetturale come anomalie nell'orientamento delle cellule tra loro e la membrana basale delle papille, mentre definisce il disordine citologico come anomalie relative alla dimensione e forma nucleare e le caratteristiche della cromatina^{14,16} (Tabella 2).

Neoplasia uroteliale papillare a basso potenziale di malignità (PUNLMP).

Queste lesioni in parte, se non completamente, corrispondono ad una parte dei carcinomi uroteliali papillari di grado 1 secondo la classificazione del OMS 1973. La lesione consiste di delicate papille che mostrano poca o nessuna fusione, il rivestimento uroteliale appare iperplastico per l'aumento del numero degli strati dell'epitelio, con minime irregolarità architetturali e polarità conservata. Dal punto di vista citologico questa neoplasia presenta nuclei lievemente ingranditi e più affollati rispetto all'urotelio normale, con nucleoli assenti o incospicui e cromatina uniforme. Le mitosi sono rare e quando presenti sono limitate allo strato basale⁶ (Figura 2A).

Alcuni studi hanno dimostrato che la PUNLMP ha una prognosi più favorevole rispetto al carcinoma uroteliale papillare di basso grado, con un basso rischio di recidiva oltre a una minor probabilità di progredire a diverso grado o stadio^{17,18,19,20,21,22,23,24,25,26}.

Carcinoma uroteliale papillare di basso grado.

Molte di queste lesioni sarebbero state in parte considerate di grado 1 e in parte (circa il 70%) di grado 2 secondo la classificazione del OMS 1973.

La lesione è caratterizzata da papille delicate ed estesamente ramificate che appaiono relativamente ordinate a basso ingrandimento anche se un minimo grado di fusione può essere presente, a maggior ingrandimento si identificano un certo grado di perdita di polarità cellulare così come modesta irregolarità e pleomorfismo nucleare, la cromatina rimane fine e i nucleoli piccoli. Le mitosi possono essere presenti o meno, ma di solito non sono atipiche e possono essere presenti anche lontane dallo strato basale²⁷ (Figura 2B).

Il carcinoma uroteliale papillare di basso grado ha un tasso di recidiva e di progressione ad un più alto stadio più alto della PUNLMP, mentre nei confronti del carcinoma uroteliale papillare di alto grado presenta un tasso di recidiva simile ma un tasso di progressione ad un più alto

stadio significativamente più basso^{20,28,29,30}. Per questo tipo di neoplasia è stato riportato in letteratura un tasso di recidiva media del 50% e un tasso medio di progressione del 10%³¹.

Carcinoma uroteliale papillare di alto grado.

Tutte le neoplasie di grado 3 e parte (circa il 30%) delle neoplasie di grado 2 secondo la classificazione OMS 1973 appartengono attualmente a questa categoria. Questo tipo di neoplasia è caratterizzata da papille che possono essere fuse, dando alla neoplasia un'apparenza solida esofitica. Lo spessore dell'urotelio è variabile e il disordine cellulare, la variazione di forma e di dimensione dei nuclei e il pleomorfismo nucleare sono già visibili a basso ingrandimento. La cromatina è azzollata ed irregolarmente distribuita e i nucleoli sono irregolari ed evidenti. Le mitosi sono numerose, in tutti gli strati dell'urotelio e talora sono atipiche (Figura 2C).

Questi tumori spesso sono associati a malattia invasiva all'epoca della diagnosi³², e complessivamente presentano un tasso di progressione, cioè di evoluzione a carcinoma invasivo, che va dal 15-40%.

Tabella 1. Corrispondenza tra i carcinomi uroteliali papillari classificazione OMS 1973 e OMS 2004-2016

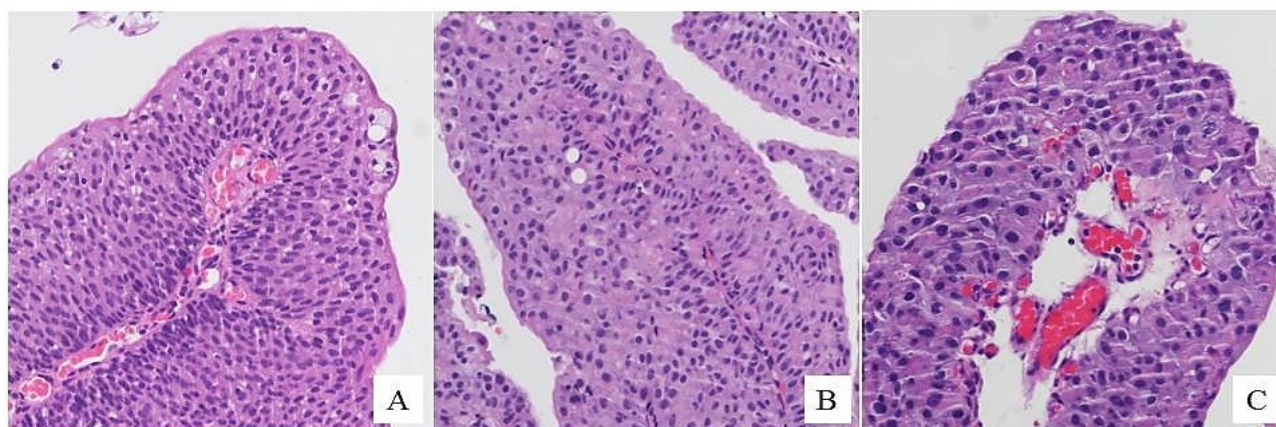
OMS 1973	OMS 2004-2016
Grado 1	PUN-LMP
Grado 2	Basso Grado
Grado 3	Alto Grado

Tabella 2. Caratteristiche morfologiche: PUNLMP, carcinoma uroteliale papillare di basso grado e carcinoma uroteliale papillare di alto grado.

	PUNLMP	Carcinoma papillare di basso grado	Carcinoma papillare di alto grado
Architettura			
Papille	Delicate, poco o non fuse	Delicate e ramificate Minimo grado di fusione	Ramificate e fuse
Organizzazione cellulare	Polarità identica al normale Spessore aumentato rispetto al normale	Prevalentemente ordinate, malgrado minimi affollamenti e minima perdita di polarità. Spessore variabile. Coese.	Prevalentemente disordinate, con frequente perdita di polarità. Spessore variabile. Spesso non coese.
Citologia			
Dimensioni nucleari	Possono essere uniformemente ingranditi	Ingranditi, di dimensioni variabili	Ingranditi, di dimensioni variabili
Forma nucleare	Allungata, rotonda-ovale, uniforme	Rotonda-ovale. Minime variazioni di forma e contorno	Pleomorfismo moderato-severo
Cromatina nucleare	Fine	Lievi variazioni intra/intercellulari	Variazioni marcate sia intra/intercellulari, con ipercromasia
Nucleoli	Assenti o incospicui*	Piccoli	Irregolari e evidenti
Mitosi	Rare, basali	Occasionalmente in tutti gli strati	Di solito frequenti, in tutti gli strati
Cellule cupoliformi	Presenti	Solitamente presenti	Possono essere assenti

*Se presenti, sono piccoli e regolari e non accompagnati ad altre caratteristiche del carcinoma di alto grado.

Figura 2. Neoplasia uroteliale papillare a basso potenziale di malignità (A); carcinoma uroteliale papillare di basso grado (B); carcinoma uroteliale papillare di alto grado (C).



ETEROGENEITÀ NEL GRADO DEL CARCINOMA UROTELIALE PAPILLARE

L'eterogeneità nel grado è una caratteristica dei carcinomi uroteliali papillari, attualmente l'approccio più utilizzato per graduare queste neoplasie si basa sulla componente di più alto grado presente. Alcuni autori sostengono che potrebbe essere utilizzato un cut-off del 5% per classificare la neoplasia come di alto grado³³. In uno studio è stato osservato che tumori con componente di alto grado fino al 10% hanno un comportamento clinico come le neoplasie di basso grado³⁴. Poiché non c'è nessun consenso tra gli esperti su quale sia la quantità minima di neoplasia di alto grado necessaria per la diagnosi di carcinoma uroteliale papillare di alto grado, appare prudente indicare comunque la proporzione della componente di alto grado presente nella lesione. Ci sono alcune evidenze che carcinomi uroteliali papillari di alto grado puri, cioè totalmente di alto grado, siano più aggressivi di quelli misti, ossia con componente di basso e di alto grado³⁵.

STADIAZIONE DEI CARCINOMI UROTELIALI NON MUSCOLO INVASIVI

Lo stadio patologico è un fattore determinante per la prognosi e la gestione del cancro della vescica. Come in tutti gli organi cavi lo stadio tumorale (T) nella vescica è definito dalla infiltrazione neoplastica nei vari strati della parete.

I carcinomi vescicali non muscolo invasivi (NMIBC), in accordo al sistema di classificazione ‘Tumor, Node, Metastasis’ (TNM)³⁶, costituiscono un gruppo di neoplasie che comprende i tumori papillari di basso e alto grado confinati alla mucosa senza invadere la lamina propria (Ta), tumori piatti di alto grado o carcinoma in situ (CIS) classificato come Tis e i tumori che infiltrano il connettivo sotto epiteliale della lamina propria posta oltre la membrana basale ma non la tonaca muscolare propria (T1).

La diagnosi dipende dalla cistoscopia e dalla valutazione istologica del tessuto vescicale ottenuto attraverso la resezione transuretrale della vescica (TURV) per i tumori papillari o attraverso multiple biopsie vescicali in caso di carcinoma in situ³⁷.

Il rischio sia di recidiva che di progressione può essere stimato per il singolo paziente utilizzando il sistema di punteggio EORTC per mezzo del quale i pazienti sono stratificati a basso rischio, a rischio intermedio o ad alto rischio e ciò è fondamentale per raccomandare una terapia adiuvante³⁷ (Tabella 3).

Tabella 3. Gruppi di rischio secondo EORTC.

Gruppi di rischio	Caratteristiche
Tumori a basso rischio	Tumore primario, solitario, <3 cm, Ta (PUNLMP, carcinomi uroteliali papillari di basso grado), no CIS
Tumore a rischio intermedio	Tutti i tumori che non rientrano nelle due categorie adiacenti
Tumore ad alto rischio	Ognuna delle seguenti caratteristiche: T1 Carcinomi uroteliali papillari di alto grado CIS Tumori Ta di basso grado multipli, recidivi e > 3 cm

La valutazione della categoria patologica del tumore (pT) è cruciale per la gestione della neoplasia vescicale e la consapevolezza delle implicazioni cliniche è utile per i patologi. La diagnosi di infiltrazione della tonaca muscolare propria nella TURV determina la scelta di una terapia più aggressiva, come la cistectomia radicale, la chemioterapia neoadiuvante o la radio-chemioterapia^{38,39}. Anche per i tumori che infiltrano la lamina propria (pT1) e con altre caratteristiche di alto rischio può essere presa in considerazione la chirurgia radicale^{40,41}.

Nei casi in cui la resezione iniziale è incompleta, cioè non è presente la tonaca muscolare propria, o si hanno carcinomi papillari ad alto rischio e di alto grado non infiltranti la lamina propria (pTa) o se viene individuato un tumore pT1 è raccomandata la re-TURV.

Diverse problematiche inerenti sia a fattori non anatomici, come frammentazione e artefatti del tessuto (TURV), che a fattori isto-anatomici possono rendere complicata l'interpretazione dello stadio.

In primo luogo sono necessari dei criteri rigorosi nel valutare l'invasione della lamina propria (connettivo sotto epiteliale) al fine di distinguere un carcinoma uroteliale papillare in stadio pTa da uno in stadio pT1. I punti chiave da prendere in considerazione sono: la valutazione dell'interfaccia urotelio-stroma, l'aspetto morfologico della membrana basale, le caratteristiche dell'epitelio infiltrante e la conseguente modificazione dello stroma.

I tumori papillari non invasivi (pTa) mostrano un'interfaccia urotelio-stromale regolare con membrana basale continua. Al contrario, nei tumori papillari infiltranti la lamina propria (pT1), l'infiltrazione stromale è caratterizzata da singole cellule o nidi di cellule tumorali con disposizione irregolare e privi di membrana basale, con possibile differenziazione paradossa; in alcuni casi il fronte di infiltrazione può avere un'estensione digitiforme. Inoltre, anche se non sempre, si può osservare una reazione fibrosa, infiammazione o modificazione mixoide dello stroma. L'infiltrazione tumorale non sempre è presente alla base della lesione, ma si può osservare nell'asse fibro-vascolare⁴².

Sono stati riportati comportamenti eterogenei all'interno del gruppo di carcinomi in stadio pT1 sia per quanto riguarda la recidiva che la progressione verso un carcinoma muscolo invasivo^{43,44,45,46,47}, pertanto suddividere in sotto categorie i tumori in stadio pT1 sarebbe di aiuto nello stratificare queste neoplasie. Nel 2016 l'8° edizione AJCC, pur riconoscendo che non vi è ancora un metodo ottimizzato per la suddivisione in sotto categorie dei carcinomi pT1, raccomanda fortemente di fare dei tentativi⁴⁸. Ciò è stato anche richiesto dall'Associazione Europea di Urologia (AEU)¹⁶ e, più recentemente, l'ICCR ('International Collaboration on Cancer Reporting') ha suggerito di utilizzare o la profondità o la dimensione dell'infiltrazione o utilizzare la muscolaris mucosae per sotto categorizzare la neoplasie pT1⁴⁹.

Sotto categorie per il pT1

Il metodo da utilizzare al fine di sotto classificare le neoplasie pT1 rimane da standardizzare.

Nell'ultimo decennio diversi patologi hanno cercato di formulare dei criteri istologici per suddividere in sotto categorie i carcinomi pT1.

Sotto categorie isto-anatomiche.

L'approccio più studiato è l'utilizzo della muscolaris mucosae (MM) e/o del plesso vascolare come punti di riferimento^{50,51,52,53,54}. La MM è posta in corrispondenza della metà superiore della lamina propria e forma uno strato riconoscibile, anche se non è evidente allo stesso modo in tutte regioni della vescica, essa è più evidente verso la cupola e meno nel trigono, per questo motivo il plesso vascolare, situato pressoché allo stesso livello della MM, è stato proposto come surrogato della MM quando questa non è riconoscibile (Figura 3)⁵⁰.

È stata proposta inizialmente una suddivisione in tre livelli del pT1 considerando la MM e il plesso vascolare: pT1a per infiltrazione neoplastica della lamina propria al di sopra della MM/plesso vascolare, pT1b per infiltrazione che raggiunge lo stesso livello della MM/ plesso venoso e pT1c al di sotto di questo riferimento isto-anatomico⁵⁵.

Altri studi hanno proposto una suddivisione a due livelli, più seguita, pT1a con infiltrazione al di sopra della MM/plesso venoso e pT1b per l'infiltrazione al di sotto della MM/plesso venoso^{56,57,58,59}.

Questo metodo presenta comunque delle difficoltà di attuazione, almeno in parte dovute alla variazione strutturale della lamina propria.

Sotto categorie per approssimazione.

Approcci meno oggettivi nella sotto categorizzazione delle neoplasie pT1 sono stati proposti, ad esempio l'infiltrazione focale o multifocale o la percentuale di infiltrazione del tumore (rapporto tra la componente infiltrante e l'intero tumore)⁶⁰.

Sotto categorie micrometriche.

Un approccio promettente per la sotto classificazione delle neoplasie pT1 è quello di utilizzare un cut-off di 0,5 mm misurando a partire dalla membrana basale, come proposto da Van der Aa e collaboratori⁶¹. Lo stadio pT1 era quindi suddiviso in: pT1m (microinvasivo), se l'infiltrazione neoplastica della lamina propria era minore e/o uguale a 0,5 mm, e pT1e (esteso) sia se l'infiltrazione della lamina propria era superiore a 0,5 mm, sia in caso di infiltrazione multifocale (> 1 focus). Diversi studi hanno applicato questo tipo di approccio, evidenziando una maggiore riproducibilità nel valutare la sotto classificazione rispetto all'approccio isto-anatomico^{61,62,63,64,65,66}. Inoltre, nella maggior parte degli studi, questo tipo di metodo si è dimostrato essere un fattore predittivo indipendente per recidiva, progressione e morte per malattia nei tumori T1 > 0,5 mm.

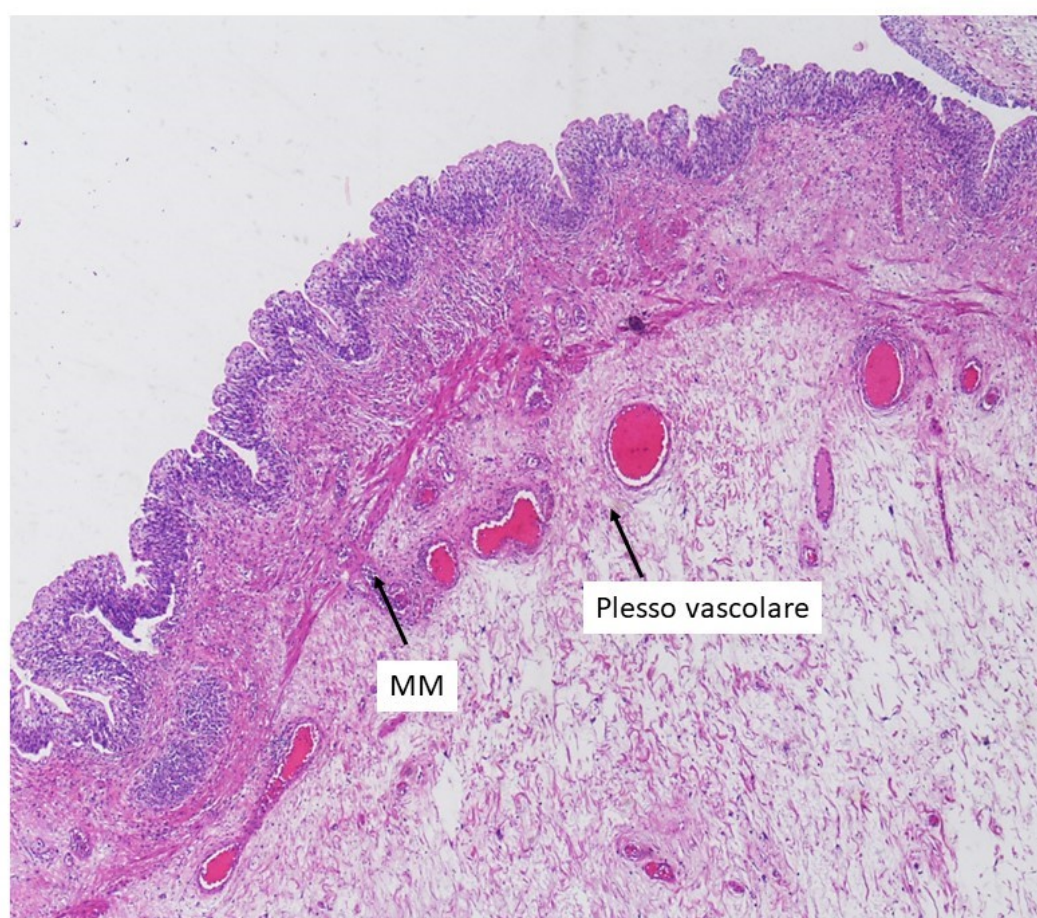
Altri cut-off.

Altri cut-off sono stati presi in considerazione sempre considerando la profondità di infiltrazione. Alcuni autori hanno proposto di suddividere lo stadio pT1 in base all'infiltrazione minore o uguale a 1 mm o maggiore di 1 mm. I risultati ottenuti utilizzando come cut-off 1 mm sono comparabili a quelli ottenuti con il cut-off di 0,5 mm, evidenziando un maggior rischio di recidiva, progressione e mortalità cancro-specifica. Questo cut-off inoltre è più pratico da utilizzare⁶⁴.

Brimo e collaboratori hanno evidenziato che la profondità di infiltrazione di 3 mm e un diametro di infiltrazione di 6 mm correlano meglio con la prognosi⁶⁷.

Altri autori, tenendo conto della frammentazione del materiale a seguito di TURV, hanno evidenziato che la lunghezza complessiva dell'infiltrazione tumorale maggiore o minore di 5 mm si correla con il tempo di recidiva a 6 mesi⁶⁰.

Figura 3. Disposizione della muscolaris mucosae (MM) e del plesso vascolare nella lamina propria.



ORIGINE E CARATTERISTICHE MOLECOLARI DEL CARCINOMA UROTELIALE

L'origine del cancro vescicale rimane ancora incerta, tuttavia analisi istologiche e molecolari della struttura dell'urotelio hanno fornito importanti indizi.

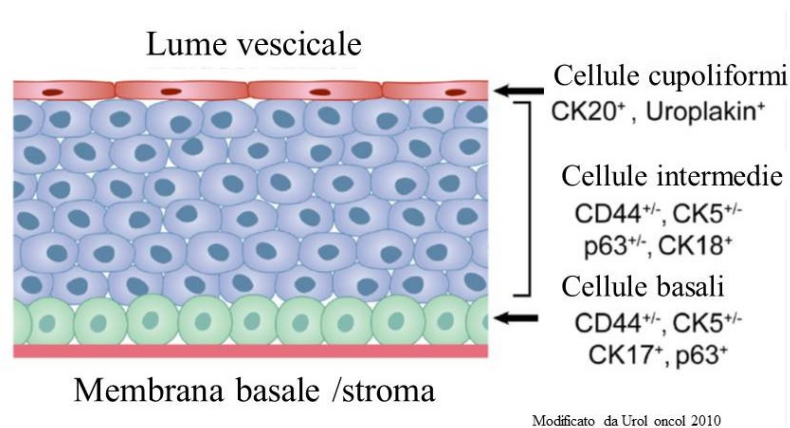
L'urotelio è composto da tre diversi tipi di cellule distinte in base al loro livello di differenziazione⁶⁸ (Figura 4).

1) Le cellule basali, adiacenti alla membrana basale, sono le meno differenziate ed esprimono le citocheratine basali (CK5/6 e CK 14)⁶⁹, molecole di ancoraggio alla superficie, come il recettore per la laminina e la $\beta 4$ integrina^{69,70} e il recettore dell'acido ialuronico (CD44)⁷¹. È generalmente considerato che a livello di questo strato di cellule risiedano cellule staminali o uroprogenitrici con la capacità di automanersi⁷².

2) Le cellule intermedie poste tra lo stato basale e luminale mostrano una moderata differenziazione ed esprimono CK 18, CD44 e CK 5/6 a livelli ridotti⁷². La capacità proliferante di questo tipo di cellule è limitata ed è simile alle cellule parzialmente specializzate di altri tessuti.

3) Le cellule di superficie o luminali sono cellule differenziate in modo terminale ed esprimono CK 20 e uroplachina⁷³.

Figura 4. Composizione e differenziazione dell'urotelio normale.

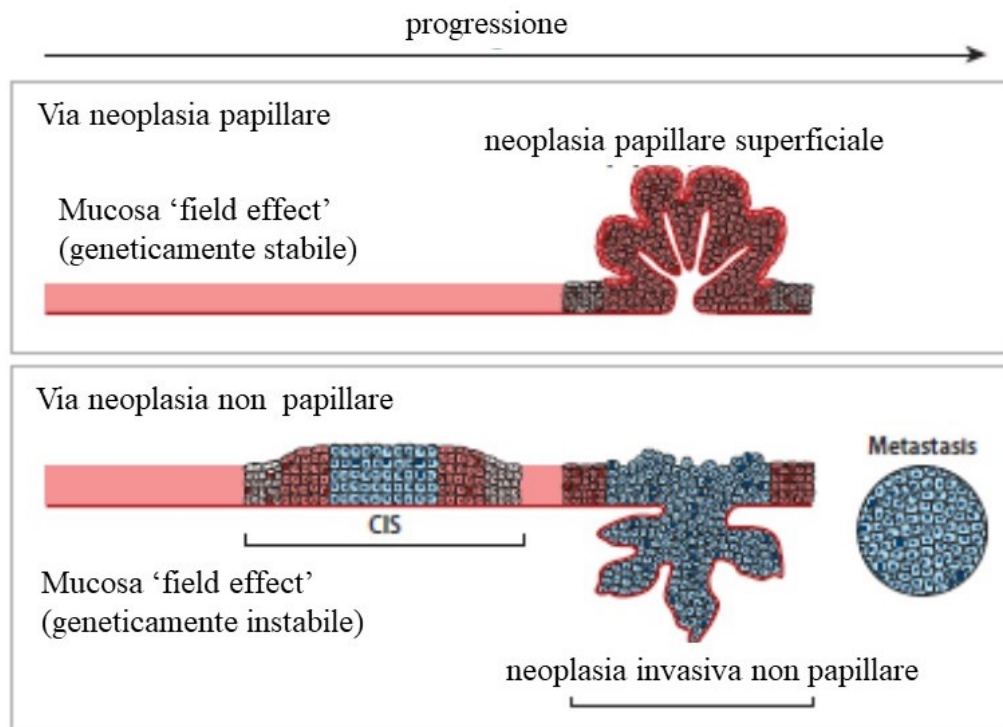


Origine del carcinoma vescicale

Inizialmente, sulla base di osservazioni patologiche e cliniche si era sviluppato il concetto di doppia via di cancerogenesi per le neoplasie vescicali papillari e non papillari. Studi svolti negli anni '60 e '70, caratterizzati dalla mappatura istologica dell'intera vescica, contribuirono a documentare che entrambe le forme di neoplasia vescicale si sviluppavano su una diffusa modificazione iperplastica della mucosa. Questo ha fornito il fondamento per il concetto di un'origine comune delle due forme di carcinoma vescicale a partire da uno stesso 'field effect' (effetto di campo). In questo scenario, eventi secondari erano considerati responsabili per la dicotomia delle due vie⁷⁴ (Figura 5).

Dati più recenti indicano che gli eventi iniziali nelle due vie sono differenti da principio e che le due forme di carcinoma vescicale originano da distinte cellule uroprogenitrici^{75,76,77}.

Figura 5. Rappresentazione grafica della doppia via come concetto iniziale dell'origine del carcinoma vescicale.



Evoluzione del concetto dell'origine del carcinoma vescicale

Studi molecolari su tessuti umani e modelli animali hanno fornito la conferma che i tumori papillari e non papillari si possono sviluppare attraverso due distinti meccanismi. La mutazione del gene ras attivo sembra essere alla base dell'insorgenza dei carcinomi papillari, mentre l'inattivazione delle vie di p53 e RB1 induce la sequenza dall'origine del carcinoma in situ alla progressione a neoplasia non papillare invasiva⁷⁸.

È stato inoltre osservato che la perdita di p53 in uno stato di mutazione dell'H-ras induce tumori papillari di basso e alto grado senza innescare la capacità infiltrativa, ciò suggerisce che eventi genetici complessi aggiuntivi siano necessari per determinare un fenotipo pienamente aggressivo e invasivo^{78,79}.

L'identificazione della mutazione dell'FGFR3 in più del 50% dei carcinomi papillari superficiali suggerisce un ruolo guida dell'asse FGFR3/ras nella via delle neoplasie papillari⁸⁰, mentre l'amplificazione e la sovra-espressione di MDM2 così come la delezione CDKN2A sono fattori che contribuiscono alla perdita di funzione di p53 e RB1 e l'origine del carcinoma in situ e la sua progressione⁷⁹.

Cellula di origine e l'effetto campo

Diversi studi hanno fornito l'evidenza che la cellula uroprogenitrice o cellula staminale è la probabile sorgente del cancro vescicale^{69,70,71}. Le cellule staminali cancerose, come la loro controparte benigna, sono anche regolate attraverso le interazioni con le cellule stromali e i componenti della matrice extracellulare. La via di segnalazione paracrina, essenziale per l'embriogenesi, è un regolatore chiave sia per le cellule staminali benigne che per le cellule staminali cancerose e coinvolge varie ed importanti vie oncogenetiche. Diversi gruppi di studio hanno riportato che le cellule staminali uroteliali sia cancerose che normali hanno un fenotipo che ricapitola quello delle cellule uroteliali basali^{82,83}.

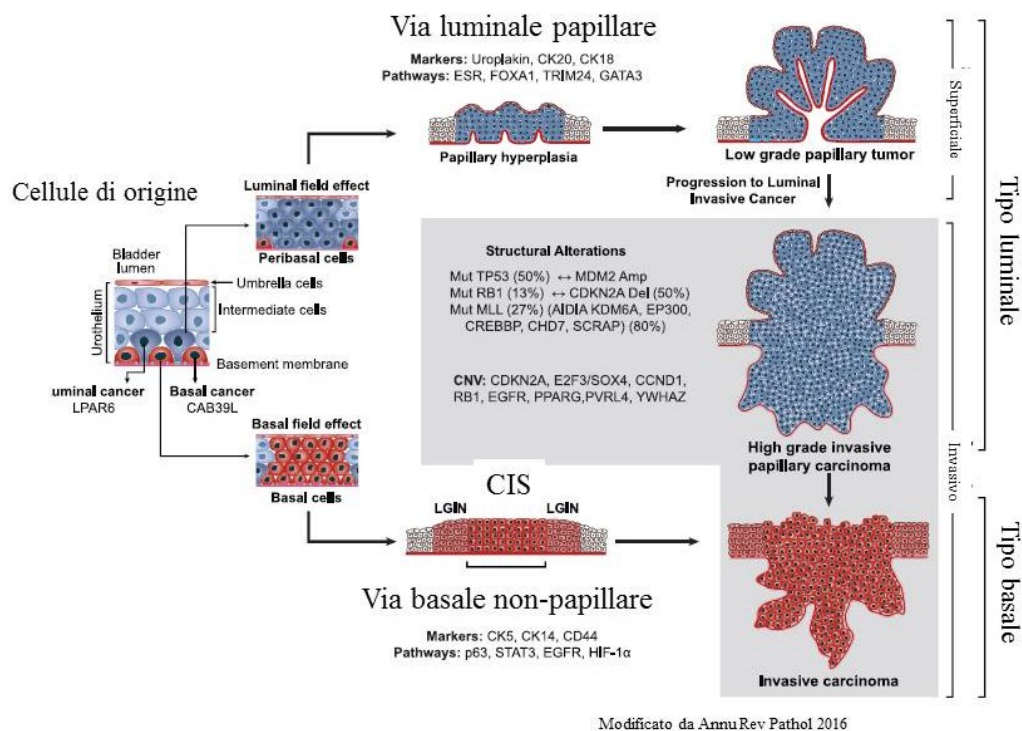
L'effetto campo o 'field effect' è ritenuto di fondamentale importanza nella cancerogenesi vescicale, portando le alterazioni che giocano un ruolo essenziale nell'iniziazione del carcinoma vescicale. Dall'analisi mappata dell'intero organo è stato osservato che l'iniziale espansione clonale di cellule uroteliali preneoplastiche prende origine dalla delezione di una megabase di DNA vicina al gene RB1 sulla regione cromosomica 13q14. Questo tipo di alterazione è stato osservato non solo nell'urotelio neoplastico, ma anche nell'urotelio apparentemente normale, solo che in quest'ultimo il soppressore tumorale RB1 non era né ipermetilato né mutato, suggerendo che altri geni alternativi in questa regione, definiti geni precursori (FR), siano la causa dell'espansione clonale della neoplasia. Cinque geni FR (ITM2B, LPAR6, MLNR, CAB39L e ARL11) sono stati identificati come potenziali

iniziatori della cancerogenesi vescicale. Questi geni FR agiscono sulla disfunzione del gene RB1⁸⁴. La disregolazione dei geni FR può essere l'alterazione molecolare iniziale associata con il 'field effect', mentre la disfunzione del gene RB1 può essere un evento successivo associato con lo sviluppo del carcinoma uroteliale della vescica⁸⁴.

Alterazioni genetiche simili sono state individuate sia nei carcinomi uroteliali papillari che non papillari, suggerendo che potrebbero condividere un'origine comune, e che eventi secondari sarebbero responsabili per la divergenza delle due vie per i carcinomi papillari e non papillari.

D'altro canto, studi più recenti hanno dimostrato che geni bersaglio a valle di queste regioni sono differenti nelle due forme di carcinogenesi vescicale^{85,86,87} e che quindi le due forme, carcinomi papillari e non papillari, originano da due differenti cellule uroprogenitrici (Figura 6).

Figura 6. Modello di sviluppo delle neoplasie vescicali luminali e basali da distinte cellule uroprogenitrici.



Questo modello⁸⁸ propone un iniziale ‘field effect’ su tipi differenti di cellule uroprogenitrici. L’espansione cellulare è guidata da geni precursori (FR) diversi, alcuni innescano l’espansione di cellule progenitrici intermedie portando allo sviluppo di carcinomi papillari luminali, altri guidano l’espansione delle cellule progenitrici basali portando allo sviluppo di cancro basale. Virtualmente tutte le neoplasie papillari di basso grado superficiali sono di tipo luminale, il 50% delle neoplasie invasive evolve da preesistenti lesioni papillari che sono di tipo luminale ma che diventano di alto grado perdendo i geni di soppressione tumorale come PTEN, PT53 e RB1, mentre il restante 50% dei tumori presenta un fenotipo basale^{88,89}.

Caratteristiche molecolari del carcinoma vescicale e caratterizzazione immunoistochimica

L’introduzione di tecnologie capaci di catalogare l’intero genoma, i pattern di espressione del mRNA e le alterazioni del DNA in una certa neoplasia ha permesso di approfondire la conoscenza dell’eterogeneità delle neoplasie.

I primi studi sono stati effettuati sul cancro della mammella, dove il profilo di espressione dell’mRNA dell’intero genoma è stato utilizzato per identificare i sottotipi molecolari della neoplasia mammaria⁹⁰. Un approccio simile è stato applicato per indagare l’eterogeneità molecolare del carcinoma vescicale.

Inizialmente, si era evidenziato come i carcinomi non muscolo invasivi e quelli muscolo invasivi potessero facilmente essere distinti sulla base del loro differente profilo di genomico⁹¹. Successivamente sono stati individuati sottotipi molecolari all’interno di carcinomi vescicali superficiali e muscolo invasivi⁹².

Più recentemente tre gruppi di ricerca^{93,94,95} hanno utilizzato il profilo di espressione dell’mRNA dell’intero genoma per identificare sottotipi intrinseci al carcinoma della vescica muscolo invasivo. Questi tre gruppi di studio osservarono un numero differente di sottotipi di

neoplasia vescicale muscolo invasiva, ma tutti e tre i gruppi hanno riconosciuto che i sottotipi molecolari osservati contenevano pattern di espressione genica basale, luminale e altri sottotipi con caratteristiche intermedie^{93,95}.

Diversi studi^{96,97,98} sono stati effettuati per identificare dei marker immunoistochimici capaci di rendere più agevole la classificazione molecolare dei carcinomi vescicali invasivi.

Dadhania e collaboratori hanno utilizzato GATA 3, CK20, CK18, Uroplachina II, Ciclina D1, ERBB2 per identificare i carcinomi uroteliali luminali e CK5/6, CK14 e p63 per i carcinomi uroteliali di tipo basale e p16, BCL2, actina muscolo liscio, miosina, calponina e desmina per il sottotipo p53-like⁹⁶.

Sijodahl e collaboratori hanno identificato quattro sottotipi di carcinoma uroteliale invasivo: UroA, UroB, geneticamente instabile e carcinoma a cellule squamose-like e hanno utilizzato un pannello di marker immunoistochimici quali FGFR3, p63, ERBB2, CCNB1, CK5, CK14, EGFR, E-caderina, P-caderina e Ki67 per tentare di discriminare i vari sottotipi⁹⁸.

Un altro gruppo di studio ha individuato per i carcinomi in stadio T1 tre sottotipi di carcinoma uroteliale: Urobasale, geneticamente instabile e carcinoma a cellule squamose-like ed hanno tentato una validazione immunoistochimica della classificazione molecolare utilizzando marker come FGFR3, p63, ERBB2, CCNB1 e CK5⁹⁷. Le stesse indagini immunoistochimiche sono state svolte anche su carcinomi uroteliali delle alte vie escrettrici utilizzando inizialmente un pannello di marker ampio costituito da CK5, CD44, EGFR, CK20, p63, GATA 3 e FOXA1 capace di individuare un sottotipo basale ed un sottotipo luminale. Questi autori sono riusciti a ricavare due marcatori, ossia CK5 e CK20, da utilizzare come surrogato per classificare le neoplasie studiate, individuando quattro sottogruppi differenti dal punto di vista prognostico⁹⁹.

SCOPO DELLO STUDIO

Questo studio si è proposto di:

- determinare lo stato di espressione immunoistochimico nei carcinomi papillari vescicali non muscolo invasivi, utilizzando due marcatori CK20 e CK5/6 come surrogato dei fenotipi luminale e basale.
- indagare le differenze tra i sottotipi immunoistochimici molecolari, ottenuti utilizzando i due marcatori, e la sopravvivenza libera da recidiva, libera da progressione e sopravvivenza tumore-specifica nel carcinoma della vescica non muscolo invasivo.

MATERIALI E METODI

Casi e caratteristiche cliniche

Lo studio si basa su una serie di 147 pazienti con tumori primitivi della vescica trattati tra il 2003 ed il 2015 con resezione transuretrale completa della vescica. L'età media dei pazienti alla diagnosi era di 66,88 anni (range 29-93), 17 erano di sesso femminile e 130 di sesso maschile.

Di questi 147 casi 110 pazienti avevano un carcinoma papillare non invasivo (pTa), di questi 95 erano di basso grado e 15 di alto grado, i restanti 37 casi erano carcinomi di alto grado infiltranti il connettivo sotto epiteliale (pT1).

Il grado e lo stadio di tutti i tumori primitivi e le loro recidive sono stati rivalutati e assegnati in base alla revisione WHO/AJCC/TNM del 2016¹⁰⁰.

I pazienti con carcinoma pT1 sono stati sottoposti ad una seconda resezione transuretrale della vescica per escludere una malattia in stadio pT2, cioè infiltrante la tonaca muscolare propria. Ai pazienti con carcinoma di alto grado è stata somministrata una terapia adiuvante endovesicale con BCG (Bacillus Calmette-Guerin). Il follow-up dei pazienti (numero di mesi dal primo intervento fino alla cistoscopia più recente, ultima visita o decesso) ha avuto una durata di 76 mesi (range 6-120). La recidiva di malattia è stata definita come la prima ripresa di malattia nella vescica indipendentemente dallo stadio tumorale. La progressione dello stadio tumorale è stata definita come una transizione a qualsiasi stadio più alto, nel caso dei tumori pTa allo stadio pT1, pT2 fino a pT4 e nei tumori pT1 allo stadio pT2 fino al pT4, o alla comparsa di metastasi. Come durata della sopravvivenza è stato considerato il periodo di tempo tra la diagnosi ed il decesso. La morte tumore-correlata è stata considerata quando causata dal carcinoma della vescica.

Immunoistochimica e valutazione semiquantitativa

Tutti i campioni erano fissati in formalina tamponata al 10% e processati ed inclusi in paraffina. Per ciascun tumore è stato selezionato un blocco rappresentativo dal quale sono state ottenute sezioni dello spessore di 4 µm su cui è stata effettuata la colorazione immunoistochimica.

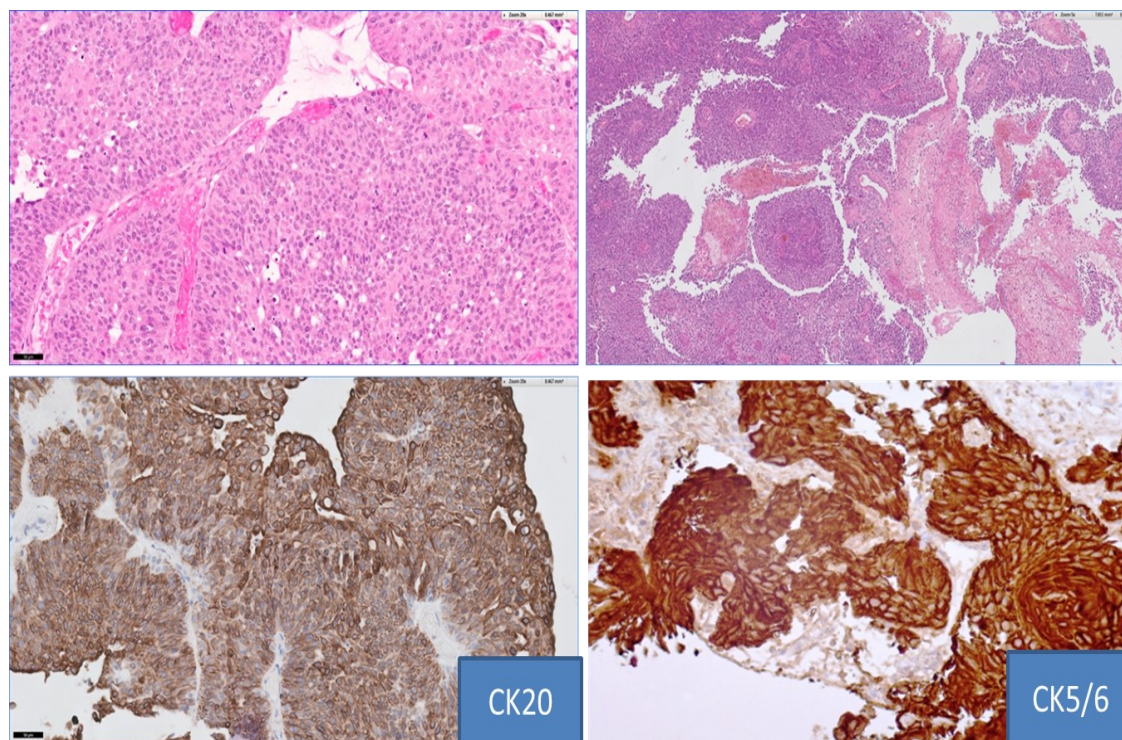
Le sezioni sono state deparaffinate con xilene, reidratate con alcoli graduati, poi lavate con PBS (soluzione salina tamponata con fosfato). Per lo smascheramento degli antigeni le sezioni sono state bollite in 10 mM di tampone citrato a pH 6.0. Successivamente le sezioni sono state incubate con anticorpi monoclonali primari di topo: CK20 (Ks20 .8, prediluito; DAKO, Carpinteria, CA) e CK5/6 (D5/ 16B4, 1:50; Cell Marque, Rocklin, CA), contemporaneamente sono stati utilizzati controlli positivi e negativi.

Le colorazioni immunoistochimiche sono state effettuate utilizzando il sistema EnVision (DakoCytomation, Denmark) per 30 min a temperatura ambiente con substrato cromogeno di diaminobenzidina (0.6 mg/ml in TRIS salino, pH 7.6 con 12 ml 30% di perossido di idrogeno). Le sezioni sono state poi contro colorate con ematossilina di Mayer.

Le sezioni colorate in immunoistochimica sono state valutate utilizzando un microscopio ottico Zeiss Scope A1 (Jena, Germania). Su ciascuna sezione la medesima area è stata esaminata utilizzando una griglia graduata di 1 cm² posta nell'oculare del microscopio. Un pattern immunoistochimico negativo è stato assegnato ai casi che mostravano o nessuna cellula immunocolorata o rare e singole cellule colorate (< 1%) distribuite casualmente (sia nei casi con CK20 che in quelli con CK5/6) o rare e cellule singole (< 1%) nella parte basale delle papille (per CK5/6). Un pattern immunoistochimico positivo era assegnato quando erano presenti molteplici cellule positive negli strati più basali delle papille con elevata intensità di colorazione. In questo modo sono stati individuati quattro pattern di espressione

immunoistochimica: negativo (CK20–, CK5/6–), misto (CK20+, CK5/6+), basale (CK20–, CK5/6+), luminale (CK20+, CK5/6–) (Figura 7).

Figura 7. Colorazioni ematossilina-eosina e immunoistochimica per CK20 e CK 5/6.



Analisi statistica

L'analisi della sopravvivenza libera da recidiva, libera da progressione, e tumore-specifica con riferimento ai quattro pattern di espressione immunoistochimica nel carcinoma della vescica non muscolo invasivo è stata condotta mediante il metodo di Kaplan-Meier e la significatività delle differenze tra i gruppi è stata determinata usando il log-rank test. Gli hazard-ratio sono stati calcolati con intervalli di confidenza del 95% utilizzando la regressione di Cox, ed in tutti i calcoli, un valore p minore o uguale a 0.05 è stato considerato indicativo di una differenza statisticamente significativa.

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando la versione 24.0 per i Software Windows® dello Statistical Package for Social Sciences (IBM® SPSS® Statistics, Armonk, NY, USA).

RISULTATI

L'età media dei pazienti alla diagnosi nei 147 casi era di 66.88 anni (range 29-93). Centodieci casi (74,8%) erano di stadio Ta e 37 (25,2%) T1. Novantacinque casi (64,6%) erano carcinomi papillari di basso grado non invasivi (Ta), mentre 37 pazienti (25,2%) avevano un carcinoma di alto grado T1. Le dimensioni del tumore variavano da 1 a 8 cm (con una media di cm 3,27), cinquantuno pazienti (34,7%) avevano un tumore < 3 cm, mentre i restanti 96 avevano un tumore di dimensione maggiore o uguale a 3 cm (65,3%).

La valutazione del sottotipo immunoistochimico molecolare ha individuato 89 casi (60,5%) negativi (CK20- e CK5/6-), 6 casi (4,1%) di tipo misto, cioè che esprimono (CK20+ e CK5/6 +), 20 casi (13,6%) di tipo basale (CK20- e CK5/6 +) e 32 casi (21,8%) di tipo luminale (CK20+ e CK5/6).

Le caratteristiche clinico-patologiche dei 147 pazienti ed il sottotipo immunoistochimico molecolare sono riportate nella Tabella 4.

Tabella 4. Caratteristiche cliniche.

Caratteristiche Cliniche	Età		Sesso		Dimensione tumore (cm)		Stadio tumore		Grado tumore		Sottotipo IHC molecolare			
	<70	≥70	F	M	<3	≥3	Ta	T1	LH	HG	Negativo	Misto	Basale	Luminale
Totale casi 147 (%)	83 (56,5)	64 (43,5)	17 (11,6)	130 (88,4)	51 (34,7)	96 (65,3)	110 (74,8)	37 (25,2)	95 (86,4)	52 (13,6)	89 (60,5%)	6 (4,1)	20 (13,6)	32 (21,8)
LH: low grade, basso grado; HG: high grade, alto grado; IHC: immunoistochimico														

Le varie caratteristiche cliniche, l'età dei pazienti, le dimensioni tumorali, lo stadio ed il grado tumorale dei 147 casi sono stati posti in relazione con la sopravvivenza libera da recidiva, con la sopravvivenza libera da progressione e con la sopravvivenza tumore-specifica. I risultati ottenuti, mostrati nella Tabella 5, indicano che l'età del paziente era associata solo con la sopravvivenza tumore-specifica (p significativa 0,013), mentre lo stadio ed il grado tumorale erano associati sia con la sopravvivenza libera da recidiva (p significativa rispettivamente di 0,006 e <0,001) che con la sopravvivenza libera da progressione e con quella tumore-specifica (p significativa < 0,001).

Le dimensioni tumorali erano associate con la sopravvivenza libera da recidiva e con la sopravvivenza tumore-specifica (p significativa 0,034 e 0,028 rispettivamente), ma non con la sopravvivenza libera da progressione (p non significativa) (Tabella 5).

Tabella 5. Variabili cliniche e analisi statistica della sopravvivenza.

Variabile	Totale N=147 (%)	Sopravvivenza libera da recidiva N=74 (%)		Sopravvivenza libera da progressione N=120 (%)		Sopravvivenza tumore-specifica N=127 (%)	
			<i>p</i> value*		<i>p</i> value*		<i>p</i> value*
Età (anni)			0.691		0.150		0.013
<70	83 (56.5)	39 (47.0)		70 (84.3)		76 (91.6)	
≥70	64 (43.5)	35 (54.7)		50 (78.8)		51 (79.7)	
Genere			0.424		0.062		0.112
Femmina	17 (11.6)	8 (47.1)		17 (100)		17 (100)	
Maschio	130 (88.4)	66 (50.8)		103 (79.2)		110 (84.6)	
Dimensioni del tumore (cm)			0.034		0.162		0.028
<3	51 (34.7)	31 (60.8)		44 (86.3)		48 (94.1)	
≥3	96 (65.3)	43 (44.8)		76 (79.2)		79 (82.3)	
Stadio			0.006		<0,001		<0,001
Ta	110 (74.8)	61 (55.5)		100 (90.9)		103 (93.6)	
T1	37 (25.2)	13 (35.1)		20 (54.1)		24 (64.9)	
Grado			<0.001		<0,001		<0,001
LG	95 (86.4)	57 (60.0)		89 (93.7)		91 (95.8)	
HG	52 (13.6)	17 (32.7)		31 (59.6)		36 (69.3)	
*Log-Rank Test; Et� media: 66.88; Dimensioni medie del tumore cm: 3,27 ± 1,56 (1-8) follow-up (mesi): 76.							

Successivamente anche il sottotipo immunoistochimico molecolare   stato posto in relazione con la sopravvivenza libera da recidiva, libera da progressione, e tumore-specifica, evidenziando come il sottotipo luminale, similmente agli altri classici fattori predittivi quali la dimensione del tumore, lo stadio ed il grado, era predittivo di tumori pi  aggressivi, mentre il sottotipo misto individua tumori meno aggressivi (Figure 8, 9 e 10).

Figura 8. Sopravvivenza libera da recidiva nei NMIBC in base al sottotipo IHC molecolare.

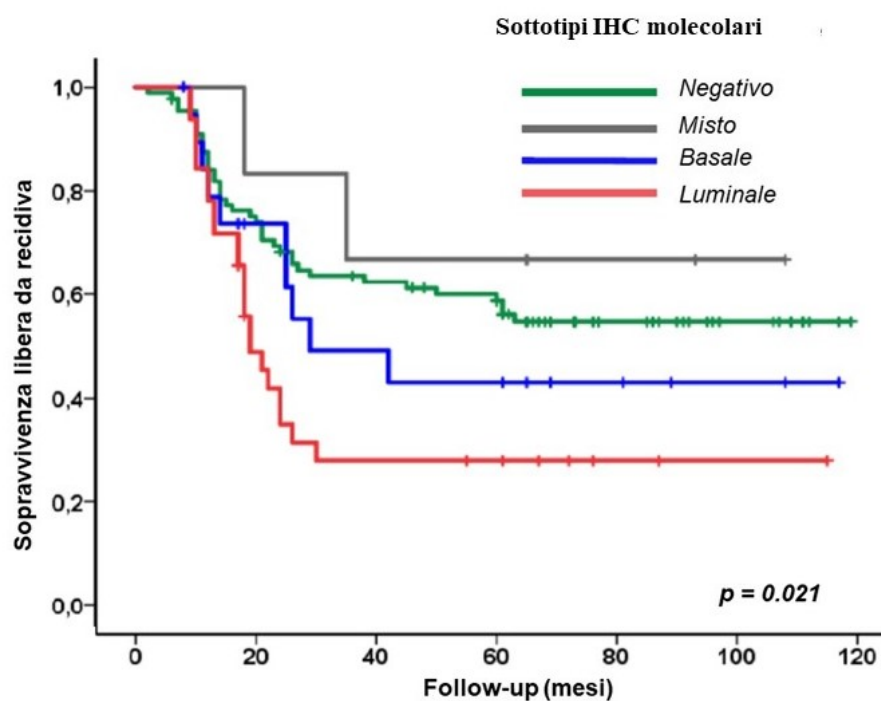


Figura 9. Sopravvivenza libera da progressione nei NMIBC in base al sottotipo IHC molecolare.

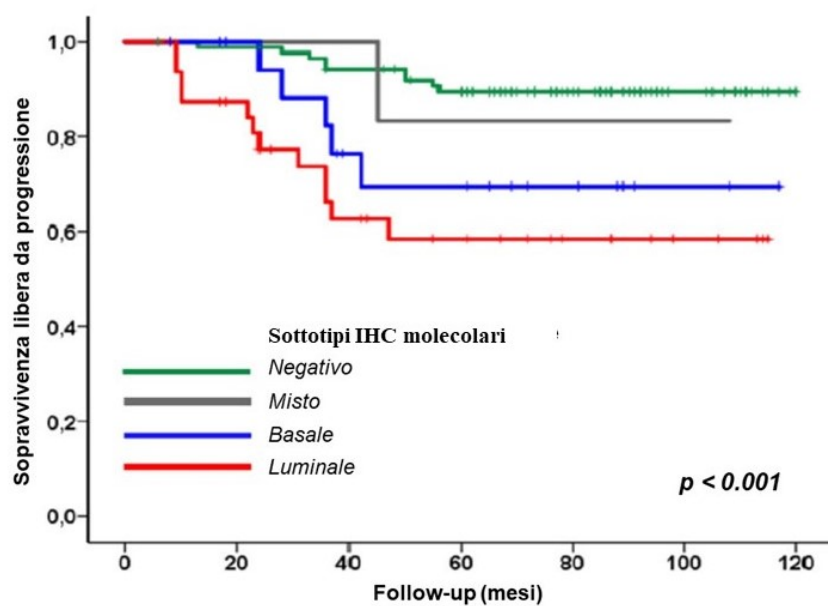
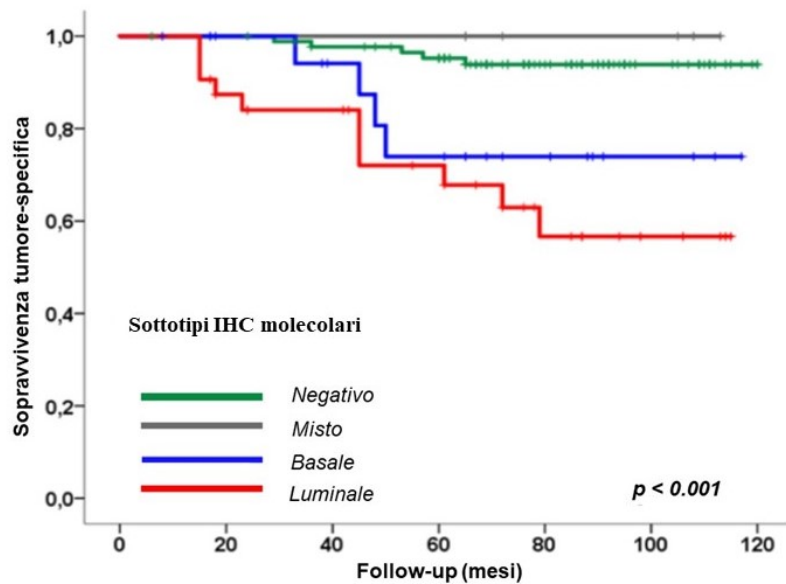


Figura 10. Sopravvivenza tumore-specifica nei NMIBC in base al sottotipo IHC molecolare.



Di seguito sono stati considerati i pazienti con carcinomi papillari non invasivi di basso grado in stadio Ta e quelli di alto grado in stadio Ta e successivamente i pazienti con tumori di alto grado in stadio T1.

Per quanto riguarda l'analisi della sopravvivenza nei carcinomi papillari di basso grado non infiltranti (stadio Ta) relativa al sottotipo immunoistochimico molecolare si è evidenziato che valori di significatività si raggiungevano per la sopravvivenza libera da progressione ($p = 0,005$) e per la sopravvivenza tumore-specifica ($p < 0,001$) (Tabella 6), quindi il sottotipo immunoistochimico molecolare aveva valore predittivo, con le neoplasie a sottotipo immunoistochimico molecolare basale più aggressive e quelle con sottotipo misto meno aggressive (Tabella 6, Figure 11, 12 e 13).

Tabella 6. Analisi della sopravvivenza nei pazienti con carcinoma della vescica TaLG in base al sottotipo immunoistochimico molecolare.

Sottotipo	Totale	RFS	<i>p</i> value*	PFS	<i>p</i> value*	CSS	<i>p</i> value*
IHC molecolare	Ta LG N=95 (%)	N=57 (%)		N=89 (%)		N=91 (%)	
			<i>0.183</i>		<i>0.005</i>		<i><0,001</i>
Negativo	66 (69.5)	43 (65.2)		63 (95.5)		64 (97.0)	
Misto	3 (3.2)	2 (66.7)		3 (100)		3 (100)	
Basale	5 (5.3)	2 (40.0)		3 (60.0)		3 (60.0)	
Luminale	21 (22.1)	10 (47.6)		20 (95.2)		21 (100)	
* Log-Rank Test; RFS: sopravvivenza libera da recidiva; RSF: sopravvivenza libera da progressione; CSS: sopravvivenza tumore-specifica; IHC: immunoistochimico							

Figura 11. Sopravvivenza libera da progressione nei NMIBC Ta di basso grado in base al sottotipo ICH molecolare.

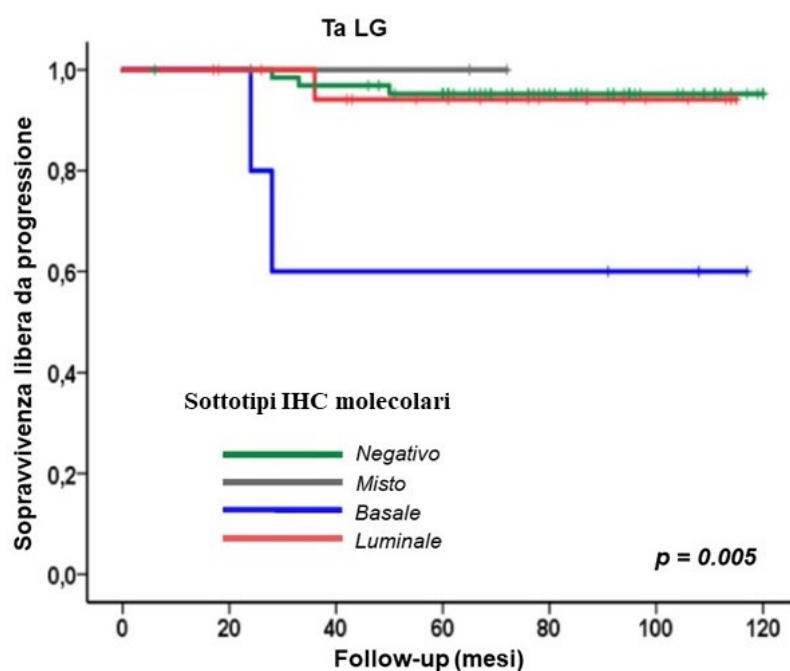


Figura 12. Sopravvivenza libera da recidiva nei NMIBC Ta di basso grado in base al sottotipo IHC molecolare.

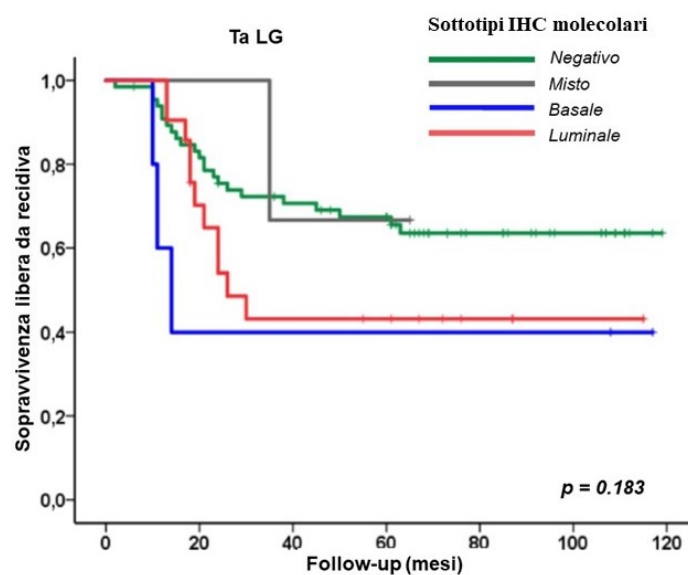
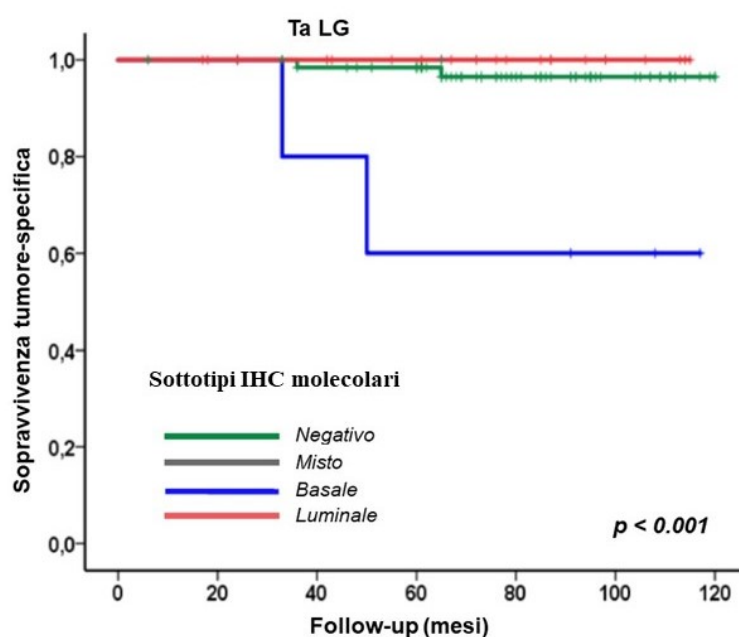


Figura 13. Sopravvivenza tumore-specifica nei NMIBC Ta di basso grado in base al sottotipo IHC molecolare.



Per quanto concerne i tumori non invasivi (stadio Ta) di alto grado l'analisi della sopravvivenza in base al sottotipo immunoistochimico molecolare ha evidenziato valori di p significativi per tutti i tre tipi di sopravvivenza presi in considerazione: sopravvivenza libera da recidiva, sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza libera tumore-specifica, come indicato nella Tabella 7.

Nel caso dei carcinomi papillari non invasivi (stadio pTa) di alto grado rispetto a quelli di basso grado il sottotipo immunoistochimico molecolare luminale è risultato più aggressivo, mentre il sottotipo misto rimane predittivo di minor aggressività (Tabella 7, Figure 14, 15 e 16).

Tabella 7. Analisi della sopravvivenza in pazienti con carcinoma della vescica TaHG in base al sottotipo immunoistochimico molecolare.

Sottotipo	Totale	RFS	<i>p</i> value*	PFS	<i>p</i> value*	CSS	<i>p</i> value*
IHC molecolare	Ta HG N=15 (%)	N=4 (%)		N=13 (%)		N=12 (%)	
			<i>0,004</i>		<i><0,001</i>		<i><0,001</i>
Negativo	6 (40)	0 (0.0)		5 (83.3)		6 (100)	
Misto	1 (6.7)	1 (100)		1 (100)		1 (100)	
Basale	6 (40)	3 (50.0)		5 (83.3)		5 (83.3)	
Luminale	2 (13.3)	0 (0.0)		0 (0.0)		0 (0.0)	
* Log-Rank Test; RSF: sopravvivenza libera da recidiva; RSF: sopravvivenza libera da progressione; CSS: sopravvivenza tumore-specifica							

Figura 14. Sopravvivenza libera da recidiva nei NMIBC Ta di alto grado in base al sottotipo IHC molecolare.

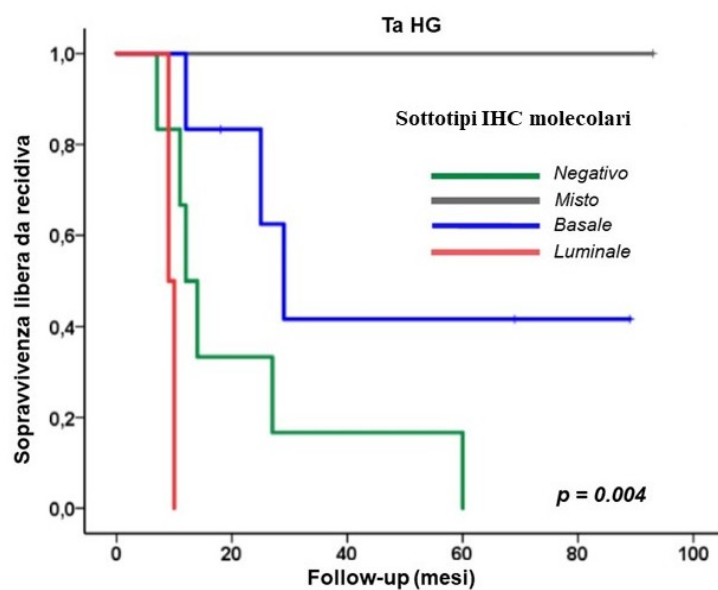


Figura 15. Sopravvivenza libera da progressione nei NMIBC Ta di alto grado in base al sottotipo IHC molecolare.

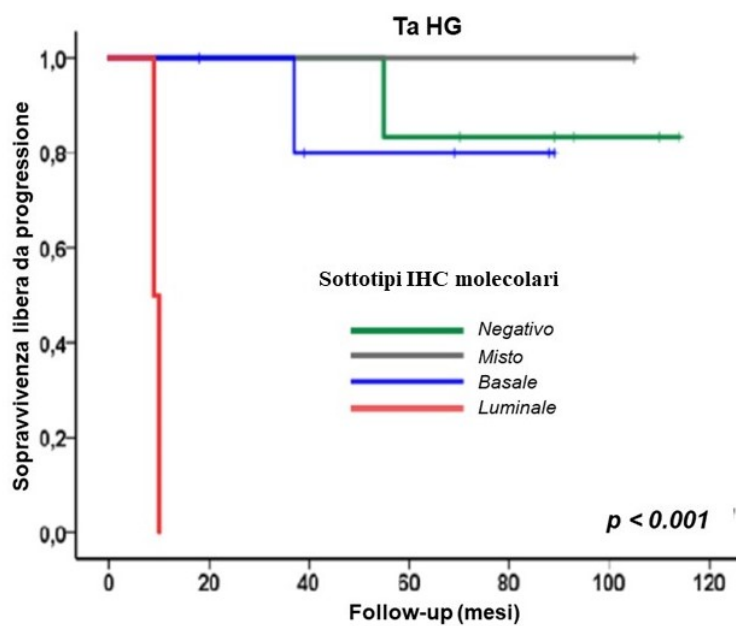
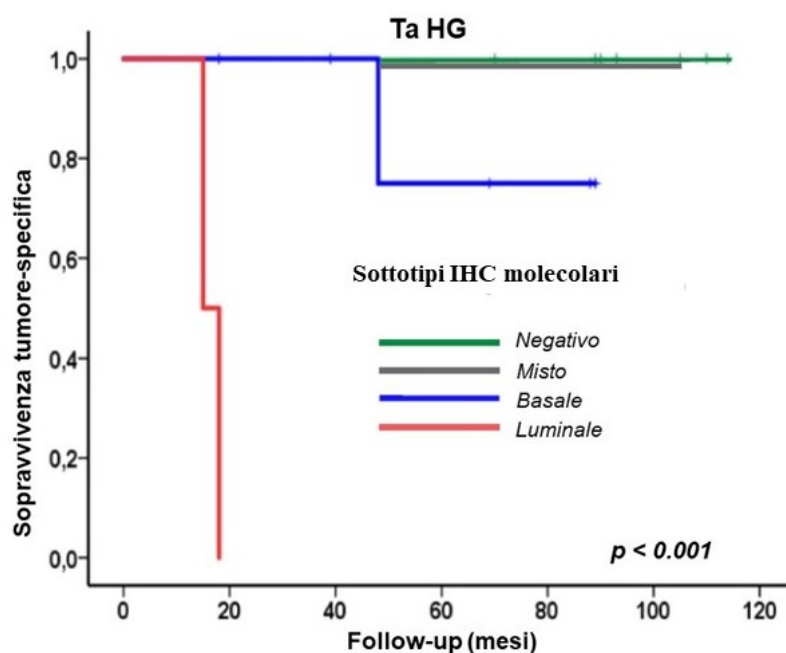


Figura 16. Sopravvivenza tumore-specifica nei NMIBC Ta di alto grado in base al sottotipo IHC molecolare.



I tumori in stadio T1 di alto grado, sulla base del sottotipo immunoistochimico molecolare, sono risultati avere dei valori p significativi sia per la sopravvivenza libera da recidiva sia per la sopravvivenza libera da progressione sia per la sopravvivenza libera tumore-specifica (Tabella 8). Da notare che come per i carcinomi di alto grado non invasivi (Ta) il sottotipo luminale è risultato più aggressivo mentre sempre il sottotipo misto è risultato il meno aggressivo (Figure 17, 18 e 19).

Tabella 8. Analisi della sopravvivenza in pazienti con carcinoma T1HG in base al sottotipo immunoistochimico molecolare.

Sottotipo	Totale	RFS	<i>p</i> value*	PFS	<i>p</i> value*	CSS	<i>p</i> value*
IHC molecolare	T1 HG N=37 (%)	N=13 (%)		N=20 (%)		N=24 (%)	
			<i>0,015</i>		<i><0,001</i>		<i><0,001</i>
Negativo	17 (45.9)	7 (41.2)		12 (70.6)		14 (82.4)	
Misto	2 (5.4)	1 (50.0)		1 (50.0)		2 (100)	
Basale	9 (24.3)	5 (55.6)		7 (77,8)		8 (88.9)	
Luminale	9 (24.3)	0 (0.0)		0 (0.0)		0 (0.0)	
* Log-Rank Test; RSF: sopravvivenza libera da recidiva; RSF: sopravvivenza libera da progressione; CSS: sopravvivenza tumore-specifica; IHC: immunoistochimico.							

Figura 17. Sopravvivenza libera da recidiva nei NMIBC T1 di alto grado in base al sottotipo IHC molecolare.

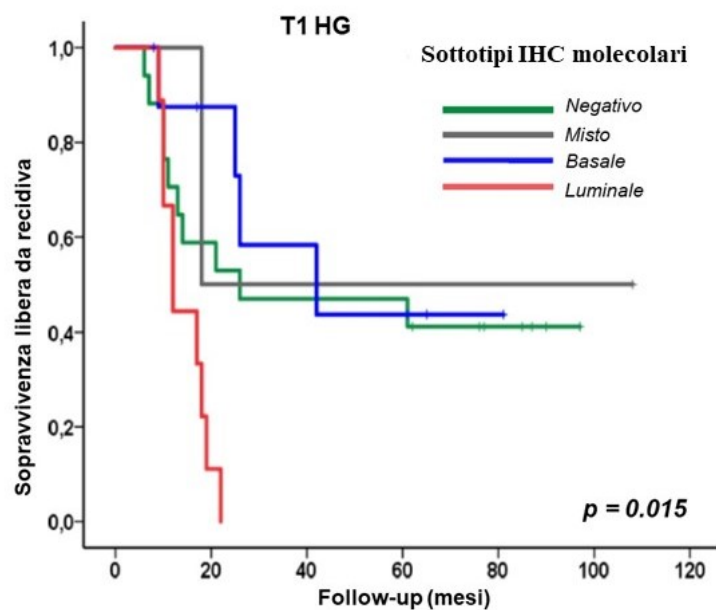


Figura 18. Sopravvivenza libera da progressione nei NMIBC T1 di alto grado in base al sottotipo IHC molecolare.

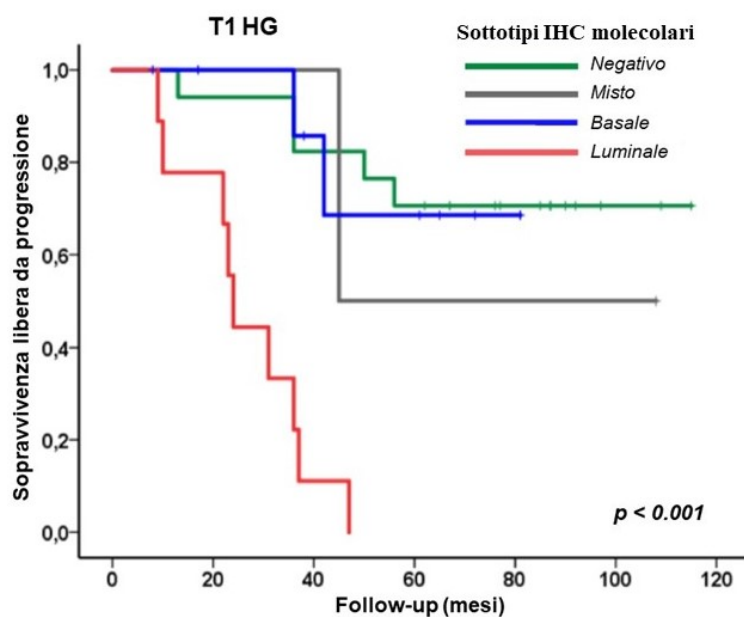
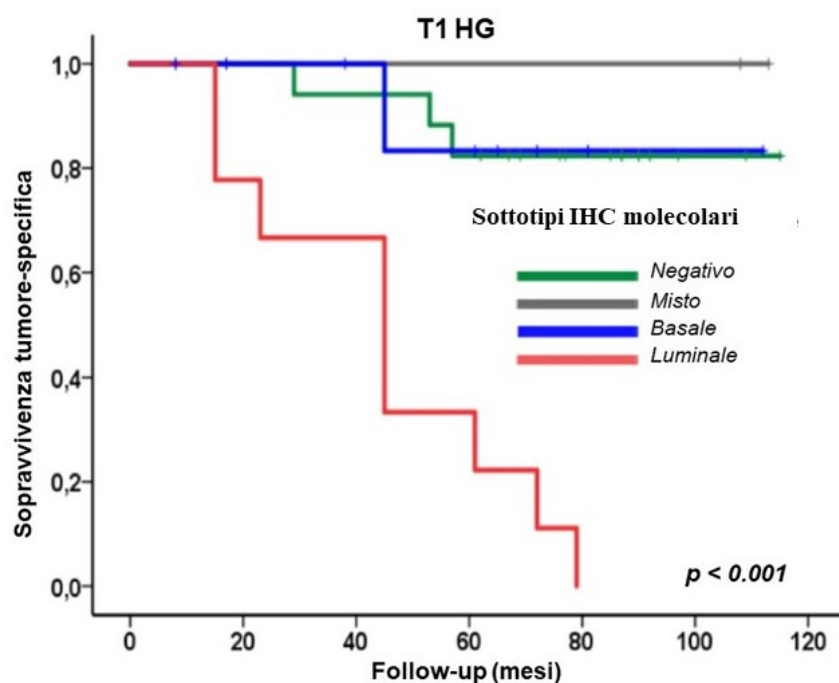


Figura 19. Sopravvivenza tumore-specifica nei NMIBC T1 di alto grado in base al sottotipo IHC molecolare.



Successivamente, utilizzando l'analisi multivariata di Cox sulla nostra serie di pazienti con neoplasia non muscolo invasiva (Ta e T1) della vescica, il grado istologico della neoplasia e il sottotipo immunoistochimico molecolare sono stati identificati come fattori predittivi indipendenti della sopravvivenza libera da recidiva, libera da progressione e tumore-specifica, con l'alto grado istologico ed il sottotipo immunoistochimico molecolare luminale associati a neoplasie più aggressive (Tabella 9).

Tabella 9. Analisi multivariata della sopravvivenza dei pazienti con carcinoma della vescica non muscolo invasivo (Ta/T1).

Variabile	Sopravvivenza libera da recidiva N=74		Sopravvivenza libera da progressione N=120		Sopravvivenza tumore-specifica N=127	
	<i>p</i> value**	<i>Hazard Ratio (CI</i> <i>95%)</i>	<i>p</i> value**	<i>Hazard Ratio (CI</i> <i>95%)</i>	<i>p</i> value**	<i>Hazard Ratio (CI</i> <i>95%)</i>
Età (anni) <70* ≥70	----	----	----	----	0.010	Riferimento 3.428 (1.345 - 8.741)
Dimensioni del tumore (cm) <3* ≥3	0.099	Riferimento 1.578 (0.918 - 2.713)	----	----	0.493	Riferimento 1.570 (0.432 - 5.702)
Stadio Ta* T1	0.143	Riferimento 0.563 (0.261 - 1.215)	0.676	Riferimento 1.278 (0.404 - 4.043)	0.985	Riferimento 1.013 (0.263 - 3.906)
Grado LG* HG	< 0.001	Riferimento 3.005 (1.820 - 4.962)	< 0.001	Riferimento 11.575 (4.411 - 30.379)	< 0.001	Riferimento 9.604 (3.130 - 29.471)
Sottotipo IHC molecolare Negativo *	0.004	Riferimento	< 0.001	Riferimento	0.001	Riferimento
Misto	0.286	0.459 (0.110 - 1.917)	0.990	0.987 (0.125 - 7.818)	0.983	----
Basale	0.402	0,730 (0.349 - 1.526)	0.555	1.396 (0.461 - 4.223)	0.186	2.474 (0.647 – 9.462)
Luminale	0.002	2.307 (1.350 - 3.943)	<0.001	8.142 (3.259 - 20.340)	<0.001	9.036 (3.090 - 26.420)
* categoria di riferimento / denominatore della comparazione nella regressione di Cox ** p value - ottenuto con il Wald test della regressione di Cox, IC (95%) – Intervallo di confidenza 95% per HR						

DISCUSSIONE

Recenti studi hanno suggerito che i carcinomi della vescica muscolo invasivi possono essere suddivisi in sottotipi molecolari intrinseci: luminale e basale^{92,95,98,101}. I tumori luminali hanno un profilo di espressione simile agli strati intermedio/superficiale dell'urotelio, mentre i tumori basali mostrano un profilo di espressione simile allo strato basale dell'urotelio⁹⁶.

Diversi studi hanno suggerito l'esistenza di classi molecolari nel carcinoma uroteliale con capacità differente di progressione seguendo differenti vie. Sono stati individuati 3 classi molecolari, i tumori a basso rischio (classe 1) erano caratterizzati da mutazioni del FGFR3 (fibroblast growth factor receptor-3), quelli di classe 2 ad alto rischio presentavano frequenti alterazioni di TP53 ed ERBB2 e mutazioni correlate ad APOBEC e quelli di classe 3 mostravano caratteristiche 'basal-like'¹⁰².

Alcuni gruppi di studio hanno preso in considerazione il profilo trascrizionale dei carcinomi vescicali muscolo invasivi, identificando diversi sottotipi molecolari, altri studi hanno associato a indagini trascrizionali e molecolari a indagini immunoistochimiche^{96,97,98}.

In uno studio condotto da Dadhania e collaboratori su TMA (tissue microarray), l'espressione immunoistochimica di due marcatori GATA 3 e CK 5/6 era stata sufficiente ad identificare rispettivamente il sottotipo luminale e basale del carcinoma della vescica con un'accuratezza del 90%, gli stessi autori indicano la necessità di studi in più larga scala per confermare la capacità classificativa di questi marker⁹⁶.

Recentemente, in un altro studio, Patschan e collaboratori⁹⁷ hanno identificato differenze nella sopravvivenza libera da progressione in pazienti con carcinomi uroteliali in stadio T1 sia con analisi univariata che multivariata, classificando i tumori in sottotipo urobasale, genomicamente instabile e carcinoma squamocellulare-like utilizzando vari marcatori immunoistochimici.

In un altro studio, condotto su carcinomi uroteliali della via escrettrice superiore, l'espressione immunoistochimica di marcatori quali CK5 e CK20 aveva identificato carcinomi uroteliali rispettivamente di tipo basale e luminale, quest'ultimo con peggiore sopravvivenza tumore-specifica⁹⁹.

Il nostro studio aveva l'obiettivo, seguendo lo studio sui carcinomi delle vie escrettrici superiori, di convalidare quanto proposto di Choi e collaboratori¹⁰³ riguardo l'utilizzo di CK20 e CK5 come surrogato immunoistochimico per la distinzione tra sottotipi luminale e basale, e quindi di stabilire il suo potenziale impiego nella routine diagnostica. La differenza con quanto riportato da Choi e collaboratori¹⁰³ sta nel fatto che essi avevano incluso nel loro studio anche carcinomi della vescica muscolo invasivi. I nostri risultati mostrano un'associazione tra i sottotipi luminale e basale e l'aggressività del carcinoma vescicale non muscolo invasivo, confermando che l'espressione immunoistochimica di CK20-CK5/6 può essere usata per classificare i sottotipi molecolari, e questo è a sostegno del potenziale valore prognostico del grado fenotipico molecolare anche nel carcinoma della vescica non muscolo invasivo.

Mentre recentemente un sistema classificativo, che divide i carcinomi uroteliali in luminale e basale, a cui viene assegnata una prognosi peggiore ma una migliore risposta alla chemioterapia^{104,105}, è stato pubblicato per i carcinomi vescicali muscolo invasivi^{84,103,106}, pochi studi hanno assegnato un ruolo all'immunoistochimica nella terapia del carcinoma della vescica non muscolo invasivo.

Il nostro studio ha seguito un razionale analogo, considerando i tumori della vescica non muscolo invasivi (Ta e T1), che di norma vengono sottoposti alla stessa terapia. Nel nostro studio abbiamo evidenziato l'esistenza di sottotipi immunoistochimici molecolari caratteristici, con la maggior parte dei casi (60.5%) con sottotipo negativo e a seguire sottotipi luminale (22%), basale (14%) e misto nel 4% dei casi.

È interessante notare che dalla nostra analisi multivariata è emerso che il sottotipo immunoistochimico molecolare luminale è un fattore predittivo indipendente di tumori più aggressivi nell'ambito dei carcinomi non muscolo invasivi, come osservato dalla sua associazione con la sopravvivenza libera da recidiva, libera da progressione, e tumore-specifica, con hazard ratio rispettivamente di 2.3, 8.1, e 9.0.

Questi risultati sono simili a quelli riportati da Breyer e collaboratori in uno studio centrato sull'analisi dell'espressione dell'mRNA di KRT 5 e KRT 20 per i carcinomi della vescica pT1¹⁰⁷. Inoltre, abbiamo osservato che la forza statistica del sottotipo immunoistochimico molecolare è simile a quella di altri parametri istopatologici classici, tra cui le dimensioni del tumore e il grado o lo stadio. Nella nostra serie i tumori con sottotipo immunoistochimico molecolare negativo o misto sono risultati meno aggressivi. Inoltre, il nostro studio ha dimostrato che il sottotipo immunoistochimico molecolare è predittivo della sopravvivenza libera da recidiva, libera da progressione, e tumore-specifica nei pazienti con carcinoma uroteliale di alto grado Ta e T1, con il sottotipo luminale che risulta essere più aggressivo ed il sottotipo misto meno aggressivo. Pertanto, se validato nel carcinoma vescicale non muscolo invasivo, il sottotipo immunoistochimico molecolare potrebbe essere di aiuto nella stratificazione prognostica dei pazienti.

Nel nostro studio non è stato affrontato in modo specifico il problema della risposta alla terapia sulla base dei sotto tipi luminale e basale, poiché tutti i casi di carcinoma vescicale Ta T1 di alto grado sono stati trattati con instillazioni endovesicali di BCG (bacillo di Calmette-Guerin), come da linee guida.

Comunque, considerando che nel carcinoma vescicale muscolo invasivo il fenotipo luminale è ritenuto chemio-resistente ed il fenotipo basale chemio-sensibile e che dai dati ottenuti dal TCGA (The Cancer Genome Atlas) sempre sul carcinoma della vescica muscolo invasivo i casi luminali mostrano una risposta limitata all'immunoterapia sistemica⁹³, il nostro risultato

può suggerire che i tumori con sottotipo basale possano essere più responsivi agli odierni protocolli di instillazione endovesicale con bacillo di Calmette-Guerin. Tutto ciò necessita di essere confermato in studi prospettici più ampi.

Nel nostro studio sono presi in considerazione i carcinomi vescicali uroteliali convenzionali in stadio Ta e T1 e non le possibili varianti istopatologiche, che meriterebbero uno studio a parte.

In conclusione il nostro studio dimostra che è possibile determinare il sottotipo immunoistochimico molecolare dei carcinomi vescicali non muscolo invasivi (Ta, T1) utilizzando due marcatori immunoistochimici CK20 e CK5/6 e che è possibile suddividere i pazienti con carcinoma della vescica non muscolo invasivo in categorie prognostiche potenzialmente predittive come luminale, basale, misto e negativo, aggiungendo così ulteriori informazioni ai parametri istopatologici classici come le dimensioni della neoplasia, lo stadio ed il grado.

Si rendono comunque necessari ulteriori studi per sviluppare pienamente il potenziale di questa classificazione e la sua introduzione nella pratica clinica.

BIBLIOGRAFIA

1. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends. *Eur Urol*. 2017; 71: 96–108.
2. Pasin E, Josephson DY, Mitra AP, Cote RJ, Stein JP. Superficial bladder cancer: an update on etiology, molecular development, classification, and natural history. *Rev Urol*. 2008; 10: 31–43.
3. Gårdmark T, Bladström A, Hellsten S, Malmström PU, Members Of The Swedish National Bladder Cancer Registry. Analysis of clinical characteristics, management and survival of patients with Ta T1 bladder tumours in Sweden between 1997 and 2001. *Scand J Urol Nephrol*. 2006; 40: 276–82.
4. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*. 2005; 66 Suppl 1: 4–34.
5. Miñana B, Cózar JM, Palou J, Unda Urzaiz M, Medina-Lopez RA, Subirá Ríos J, et al. Bladder cancer in Spain 2011: population based study. *J Urol*. 2014; 191: 323–8.
6. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE. World Health Organization Classification of tumours. Tumours of the urinary system and male genital organs. 2016. pp 77–135.
7. Holmang S, Hedelin H, Anderstrom C, Johansson SL. The relationship among multiple recurrences, progression and prognosis of patients with stages Ta and T1 transitional cell cancer of the bladder followed for at least 20 years. *J Urol*. 1995; 153: 1823–7.
8. Larsson P, Wijkstrom H, Thorstenson A, Adolfsson J, Norming U, Wiklund P, et al. A population-based study of 538 patients with newly detected urinary bladder neoplasms followed during 5 years. *Scand J Urol Nephrol*. 2003; 37: 195–201.
9. Sievert KD, Amend B, Nagele U, Schilling D, Bedke J, Horstmann M, et al. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J Urol*. 2009; 27: 295–300.

10. Amin MB, Young RH. Intraepithelial lesions of the urinary bladder with a discussion of the histogenesis of urothelial neoplasia. *Semin. Diagn. Pathol.* 1997; 14; 84–97.
11. Sylvester, R.J., van der Meijden A, Witjes JA, Jakse G, Nonomura N, Cheng C, et al. High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. *Urology.* 2005; 66: 90.
12. Lamm D, Herr H, Jakse G, Kuroda M, Mostofi FK, Okajima E, et al. Updated concepts and treatment of carcinoma in situ. *Urol Oncol.* 1998; 4: 130.
13. Mostofi FK, Sobin LH. Histologic typing of urinary bladder tumors. Geneva: World Health Organization, 1973.
14. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization / International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am. J. Surg. Pathol.* 1998; 22: 1435–1448.
15. Kvikstad V, Mangrud OM, Gudlaugsson E, Dalen I, Espeland H, Baak JPA, et al. Prognostic value and reproducibility of different microscopic characteristics in the WHO grading systems for pTa and pT1 urinary bladder urothelial carcinomas. *Diagnostic Pathology.* 2019; 14: 90.
16. Amin MB, McKenney JK, Paner GP, Hansel DE, Grignon DJ, Montironi R, et al; International Consultation on Urologic Disease-European Association of Urology Consultation on Bladder Cancer 2012. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Pathology. *Eur Urol.* 2013; 63: 16–35.
17. Alsheikh A, Mohamedali Z, Jones E, Masterson J, Gilks CB; World/Health Organization/International Society of Urologic Pathology. Comparison of the WHO/ISUP classification and cytokeratin 20 expression in predicting the behavior of low-grade papillary urothelial tumors. *Mod Pathol.* 2001; 14: 267–72.

18. Campbell PA, Conrad RJ, Campbell CM, Nicol DL, MacTaggart P. Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential: reliability of diagnosis and outcome. *BJU Int.* 2004; 93: 1228–31.
19. Desai S, Lim SD, Jimenez RE, Chun T, Keane TE, McKenney JK, et al. Relationship of cytokeratin 20 and CD44 protein expression with WHO/ISUP grade in pTa and pT1 papillary urothelial neoplasia. *Mod Pathol.* 2000; 13: 1315–23.
20. Fujii Y, Kawakami S, Koga F, Nemoto T, Kihara K. Long-term outcome of bladder papillary urothelial neoplasms of low malignant potential. *BJU Int.* 2003; 92: 559–62.
21. Herr HW, Donat SM, Reuter VE. Management of low-grade papillary bladder tumors. *J Urol.* 2007; 178: 1201–5.
22. Holmäng S, Andius P, Hedelin H, Wester K, Busch C, Johansson SL. Stage progression in Ta papillary urothelial tumors: relationship to grade, immunohistochemical expression of tumor markers, mitotic frequency and DNA ploidy. *J Urol.* 2001; 165: 1124–30.
23. Holmäng S, Hedelin H, Anderström C, Holmberg E, Busch C, Johansson SL. Recurrence and progression in low grade papillary urothelial tumors. *J Urol.* 1999; 162: 702–7.
24. Pan CC, Chang YH, Chen KK, Yu HJ, Sun CH, Ho DM. Prognostic significance of the 2004 WHO/ISUP classification for prediction of recurrence, progression, and cancer-specific mortality of non-muscle-invasive urothelial tumors of the urinary bladder: a clinicopathologic study of 1,515 cases. *Am J Clin Pathol.* 2010; 133: 788–95.
25. Pich A, Chiusa L, Formiconi A, Galliano D, Bortolin P, Navone R. Biologic differences between noninvasive papillary urothelial neoplasms of low malignant potential and low-grade (grade 1) papillary carcinomas of the bladder. *Am J Surg Pathol.* 2001; 25: 1528–33.
26. Samaratunga H, Makarov DV, Epstein JI. Comparison of WHO/ISUP and WHO classification of noninvasive papillary urothelial neoplasms for risk of progression. *Urology.* 2002; 60: 315–9.

27. Hansel DE, Amin MB, Comperat E, Cote RJ, Knüchel R, Montironi R, et al. A contemporary update on pathology standards for bladder cancer: transurethral resection and radical cystectomy specimens. *Eur Urol.* 2013; 63: 321–32.
28. Alvarez-Kindelan J, Lopez-Beltran A, Anglada-Curado F, Moreno Arcas P, Carazo Carazo JL, Regueiro López JC, et al. Clinico-pathologic differences between bladder neoplasms with low malignant potential and low-grade carcinomas. *Actas Urol. Esp.* 2001; 25: 645–650.
29. Yin H, Leong AS-Y. Histologic grading of noninvasive papillary urothelial tumors: validation of the 1998 WHO / ISUP system by immunophenotyping and follow up. *Am. J. Clin. Pathol.* 2004; 121: 679–687.
30. Samaratunga H, Makarov DV, Epstein JI. Comparison of WHO / ISUP and WHO classification of noninvasive papillary urothelial neoplasms for risk of progression. *Urology.* 2002; 60: 315–319.
31. Lopez-Beltran A, Montironi R. Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification. *Eur. Urol.* 2004; 46: 170–176.
32. Van Rhijn BW, Zuiverloon TC, Vis AN, Radvanyi F, van Leenders GJ, Ooms BC, et al. Molecular grade (FGFR3/MIB-1) and EORTC risk scores are predictive in primary non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 2010; 58: 433-41.
33. May M, Brookman-Amisshah S, Roigas J, Hartmann A, Störkel S, Kristiansen G, et al. Prognostic accuracy of individual uropathologists in noninvasive urinary bladder carcinoma: a multicentre study comparing the 1973 and 2004 World Health Organisation classifications. *Eur Urol.* 2010; 57: 850–8.
34. Gofrit ON, Pizov G, Shapiro A, Duvdevani M, Yutkin V, Landau EH, et al. Mixed high and low grade bladder tumors--are they clinically high or low grade? *J Urol.* 2014; 191: 1693–6.

35. Amin MB, Smith SC, Reuter VE, Epstein JI, Grignon DJ, Hansel DE, et al. Update for the practicing pathologist: The International Consultation On Urologic Disease-European association of urology consultation on bladder cancer. *Mod Pathol*. 2015; 28: 612–30.
36. TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 8th edn., G.M. Brierley JD, Wittekind C, Editor. 2017, Wiley-Blackwell and UICC: New York, USA.
37. Babjuk M, Burger M, Compérat EM, Gontero P, Mostafid AH, Palou J, et al. European Association of Urology Guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (TaT1 and Carcinoma in situ) - 2019 Update. *Eur Urol*. 2019; 76: 639-657.
38. Witjes JA, Comperat E, Cowan NC, De Santis M, Gakis G, Lebre T, et al. EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *Eur Urol*. 2014; 65: 778-92.
39. Milowsky MI, Rumble RB, Booth CM, Gilligan T, Eapen LJ, Hauke RJ, et al. Guideline on muscle-invasive and metastatic bladder cancer (European Association of Urology guideline): American Society of Clinical Oncology Clinical practice guideline endorsement. *J Clin Oncol*. 2016; 34: 1945-52.
40. Babjuk M, Bohle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat EM, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: Update 2016. *Eur Urol*. 2017; 71: 447-61.
41. Chang SS, Boorjian SA, Chou R, Clark PE, Daneshmand S, Konety BR, et al. Diagnosis and treatment of non-muscle invasive bladder cancer: AUA/SUO guideline. *J Urol*. 2016; 196: 1021-9.
42. Raspollini MR, Montironi R, Mazzucchelli R, Cimadamore A, Cheng L, Lopez-Beltran A. pT1 high-grade bladder cancer: histologic criteria, pitfalls in the assessment of invasion, and substaging. *Virchows Arch*. 2020 (in print).

43. Sylvester RJ, Van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage TaT1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol.* 2006; 49: 466-477.
44. Emiliozzi P, Pansadoro A, Pansadoro V. The optimal management of T1G3 bladder cancer. *BJU Int.* 2008; 102: 1265-1273.
45. Esrig D, Freeman JA, Stein JP, Skinner DG. Early cystectomy for clinical stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Semin. Urol. Oncol.* 1997; 15: 154-160.
46. Kulkarni GS, Hakenberg OW, Gschwend JE, Thalmann G, Kassouf W, Kamat A, et al. An updated critical analysis of the treatment strategy for newly diagnosed high-grade T1 (previously T1G3) bladder cancer. *Eur Urol.* 2010; 57: 60-70.
47. Martin-Doyle W, Leow JJ, Orsola A, Chang SL, Bellmunt J. Improving selection criteria for early cystectomy in high-grade t1 bladder cancer: a meta-analysis of 15,215 patients. *J Clin Oncol.* 2015; 33: 643-650.
48. Bochner BH, Hansel DE, Efsthathiou JA, et al. Urinary bladder. In Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al. (eds). *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th edn. Springer, Chicago. 2016. pp 757-765.
49. Compérat E, Srigley JR, Brimo F, Delahunt B, Koch M, Lopez-Beltran A, et al. Dataset for the reporting of carcinoma of the bladder-cystectomy, cystoprostatectomy and diverticulectomy specimens: recommendations from the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR). *Virchows Arch.* 2020; 476: 521-534.
50. Paner GP, Ro JY, Wojcik EM, Venkataraman G, Datta MW, Amin MB. Further characterization of the muscle layers and lamina propria of the urinary bladder by systematic histologic mapping: implications for pathologic staging of invasive urothelial carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2007; 31: 1420-9.

51. Dixon JS, Gosling JA. Histology and fine structure of the muscularis mucosae of the human urinary bladder. *J Anat.* 1983; 136: 265-71.
52. Ro JY, Ayala AG, el-Naggar A. Muscularis mucosa of urinary bladder. Importance for staging and treatment. *Am J Surg Pathol.* 1987; 11: 668-73.
53. Weaver MG, Abdul-Karim FW. The prevalence and character of the muscularis mucosae of the human urinary bladder. *Histopathology.* 1990; 17: 563-6.
54. Vakar-Lopez F, Shen SS, Zhang S, Tamboli P, Ayala AG, Ro JY. Muscularis mucosae of the urinary bladder revisited with emphasis on its hyperplastic patterns: a study of a large series of cystectomy specimens. *Ann Diagn Pathol.* 2007; 11: 395-401.
55. Younes M, Sussman J, True LD. The usefulness of the level of the muscularis mucosae in the staging of invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer.* 1990; 66: 543-8.
56. Cheng L, Neumann RM, Weaver AL, Spotts BE, Bostwick DG. Predicting cancer progression in patients with stage T1 bladder carcinoma. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 3182-7.
57. Brimo F, Wu C, Zeizafoun N, Tanguay S, Aprikian A, Mansure JJ, et al. Prognostic factors in T1 bladder urothelial carcinoma: the value of recording millimetric depth of invasion, diameter of invasive carcinoma, and muscularis mucosa invasion. *Hum Pathol.* 2013; 44: 95-102.
58. Roupret M, Seisen T, Comperat E, Larré S, Mazerolles C, Gobet F, et al. Prognostic interest in discriminating muscularis mucosa invasion (T1a vs T1b) in nonmuscle invasive bladder carcinoma: French national multicenter study with central pathology review. *J Urol.* 2013; 189: 2069-76.
59. Orsola A, Werner L, de Torres I, Martin-Doyle W4, Raventos CX5, Lozano F, et al. Reexamining treatment of high-grade T1 bladder cancer according to depth of lamina propria invasion: a prospective trial of 200 patients. *Br J Cancer.* 2015; 112: 468-74.

60. Hu Z, Mudaliar K, Quek ML, Paner GP, Barkan GA. Measuring the dimension of invasive component in pT1 urothelial carcinoma in transurethral resection specimens can predict time to recurrence. *Ann Diagn Pathol*. 2014; 18: 49-52.
61. Van der Aa MN, van Leenders GJ, Steyerberg EW, van Rhijn BW, Jöbsis AC, Zwarthoff EC, et al. A new system for substaging pT1 papillary bladder cancer: a prognostic evaluation. *Hum Pathol*. 2005; 36: 981-6.
62. Bertz S, Denzinger S, Otto W, Wieland WF, Stoeck R, Hofstaedter F, et al. Substaging by estimating the size of invasive tumour can improve risk stratification in pT1 urothelial bladder cancer-evaluation of a large hospital-based single-centre series. *Histopathology*. 2011; 59: 722-32.
63. Van Rhijn BW, van der Kwast TH, Alkhateeb SS, Fleshner NE, van Leenders GJ, Bostrom PJ, et al. A new and highly prognostic system to discern T1 bladder cancer substage. *Eur Urol*. 2012; 61: 378-84.
64. Chang WC, Chang YH, Pan CC. Prognostic significance in substaging of T1 urinary bladder urothelial carcinoma on transurethral resection. *Am J Surg Pathol*. 2012; 36: 454-61.
65. DE Marco V, Cerruto MA, D'Elia C, Brunelli M, Otte O, Minja A, et al. Prognostic role of substaging in T1G3 transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Mol Clin Oncol*. 2014; 2: 575-80.
66. Patriarca C, Hurle R, Moschini M, Freschi M, Colombo P, Colecchia M, et al. Usefulness of pT1 substaging in papillary urothelial bladder carcinoma. *Diagn Pathol*. 2016; 11: 6.
67. Brimo F, Wu C, Zeizafoun N, Tanguay S, Aprikian A, Mansure JJ, et al. Prognostic factors in T1 bladder urothelial carcinoma: the value of recording millimetric depth of invasion, diameter of invasive carcinoma, and muscularis mucosa invasion. *Hum Pathol*. 2013; 44: 95-102.

68. McConkey DJ, Lee S, Choi W, Tran M, Majewski T, Lee S, et al. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Urol Oncol*. 2010; 28: 429-440.
69. Kurzrock EA, Lieu DK, Degraffenried LA, Chan CW, Isseroff RR. Label-retaining cells of the bladder: candidate urothelial stem cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 294: F1415–F1421.
70. He X, Marchionni L, Hansel DE, Yu W, Sood A, Yang J, et al. Differentiation of a highly tumorigenic basal cell compartment in urothelial carcinoma. *Stem Cells*. 2009; 27: 1487–1495.
71. Chan KS, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, et al. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumorinitiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 14016–14021.
72. Brandt WD, Matsui W, Rosenberg JE, He X, Ling S, Schaeffer EM, et al. Urothelial carcinoma: stem cells on the edge. *Cancer Metastasis Rev*. 2009; 28: 291–304.
73. Farsund T. Cell kinetics of mouse urinary bladder epithelium, II: changes in proliferation and nuclear DNA content during necrosis regeneration, and hyperplasia caused by a single dose of cyclophosphamide. *Virchows Arch B Cell Pathol*. 1976; 21 :279–298.
74. Koss LG. Mapping of the urinary bladder: its impact on the concepts of bladder cancer. *Hum. Pathol*. 1979; 10: 533–48.
75. Van Batavia J, Yamany T, Molotkov A, Dan H, Mansukhani M, Batourina E, et al. Bladder cancers arise from distinct urothelial sub-populations. *Nat. Cell Biol*. 2014; 16: 982–91.
76. Shin K, Lim A, Odegaard JI, Honeycutt JD, Kawano S, Hsieh MH, et al. Cellular origin of bladder neoplasia and tissue dynamics of its progression to invasive carcinoma. *Nat. Cell Biol*. 2014; 16: 469–78.

77. Shin K, Lim A, Zhao C, Sahoo D, Pan Y, Spiekerkoetter E, et al. Hedgehog signaling restrains bladder cancer progression by eliciting stromal production of urothelial differentiation factors. *Cancer Cell*. 2014; 26: 521–33.
78. Zhang ZT, Pak J, Shapiro E, Sun TT, Wu XR. Urothelium-specific expression of an oncogene in transgenic mice induced the formation of carcinoma in situ and invasive transitional cell carcinoma. *Cancer Res*. 1999; 59: 3512–17.
79. Puzio-Kuter AM, Castillo-Martin M, Kinkade CW, Wang X, Shen TH, Matos T, et al. Inactivation of p53 and PTEN promotes invasive bladder cancer. *Genes Dev*. 2009; 23: 675–80.
80. Knowles MA. Role of FGFR3 in urothelial cell carcinoma: biomarker and potential therapeutic target. *World J. Urol*. 2007; 25: 581–93.
81. He X, Marchionni L, Hansel DE, Yu W, Sood A, Yang j, et al. Differentiation of a highly tumorigenic basal cell compartment in urothelial carcinoma. *Stem Cells*. 2009; 27: 1487–1495.
82. Osborn SL, Kurzrock EA. Production of urothelium from pluripotent stem cells for regenerative applications. *Curr. Urol. Rep*. 2015; 16: 466.
83. Dancik GM, Owens CR, Iczkowski KA, Theodorescu D. A cell of origin gene signature indicates human bladder cancer has distinct cellular progenitors. *Stem Cells*. 2014; 32: 974–82.
84. Charles C. Guo, Bogdan Czerniak. Bladder Cancer in the Genomic Era. *Arch Pathol Lab Med*. 2019; 143: 695–704.
85. McConkey DJ, Lee S, Choi W, Tran M, Majewski T, Lee S, et al. Molecular genetics of bladder cancer: emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Urol Oncol*. 2010; 28: 429–440.

86. Kim JH, Tuziak T, Hu L, Wang Z, Bondaruk J, Kim M, et al. Alterations in transcription clusters underlie development of bladder cancer along papillary and nonpapillary pathways. *Lab Invest.* 2005; 85: 532–549.
87. Spiess PE, Czerniak B. Dual-track pathway of bladder carcinogenesis: practical implications. *Arch Pathol Lab Med.* 2006; 130: 844–852.
88. Czerniak B, Dinney C, McConkey D. Origins of bladder cancer. *Annu Rev Pathol.* 2016; 11: 149–174.
89. Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, et al. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111: 3110–3115.
90. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; 406: 747–52.
91. Blaveri E, Simko JP, Korkola JE, Brewer JL, Baehner F, Mehta K, et al. Bladder cancer outcome and subtype classification by gene expression. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 4044–55.
92. Sjodahl G, Lauss M, Lovgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S, et al. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18: 3377–86.
93. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature.* 2014; 507: 315–22.
94. Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, et al. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *PNAS.* 2014; 111: 3110–15.
95. Choi W, Czerniak B, Ochoa A, Su X, Siefker-Radtke A, Dinney C, et al. Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nat. Rev. Urol.* 2014; 11: 400–10.

96. Dadhania V, Zhang M, Zhang L, Bondaruk J, Majewski T, Siefker-Radtke A, et al. Meta-Analysis of the Luminal and Basal Subtypes of Bladder Cancer and the Identification of Signature Immunohistochemical Markers for Clinical Use. *EBioMedicine*. 2016; 12: 105–117.
97. Patschan O, Sjöndahl G, Chebil G, Lövgren K, Lauss M, Gudjonsson S, et al. A Molecular Pathologic Framework for Risk Stratification of Stage T1 Urothelial Carcinoma. *Eur Urol*. 2015; 68: 824–832.
98. Sjöndahl G, Lövgren K, Lauss M, Patschan O, Gudjonsson S, Chebil G, et al. Toward a Molecular Pathologic Classification of Urothelial Carcinoma. *Am J Pathol*. 2013; 183: 681–691.
99. Sikic D, Keck B, Wach S, Taubert H, Wullich B, Goebell PJ, et al. Immunohistochemical subtyping using CK20 and CK5 can identify urothelial carcinomas of the upper urinary tract with a poor prognosis. *PLoS One*. 2017; 12: e0179602.
100. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*. 2016; 70: 106–119.
101. Sjöndahl G, Jackson CL, Bartlett JMS, Siemens DR, Berman DM. Molecular profiling in muscle-invasive bladder cancer: more than the sum of its parts. *J Pathol*. 2019; 247: 563–573.
102. Hedegaard J, Lamy P, Nordentoft I, Algaba F, Høyer S, Ulhøi BP, et al. Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell*. 2016; 30: 27–42.
103. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell*. 2014; 25: 152–165.
104. Choi W, Ochoa A, McConkey DJ, Aine M, Höglund M, Kim WY, et al. Genetic Alterations in the Molecular Subtypes of Bladder Cancer: Illustration in the Cancer Genome Atlas Dataset. *Eur Urol*. 2017; 72: 354–365.

105. McConkey DJ, Choi W, Dinney CPN. New insights into subtypes of invasive bladder cancer: considerations of the clinician. *Eur Urol*. 2014; 66: 609-610.
106. Sjö Dahl G, Jackson Chelsea L, Bartlett J, Robert SD, Berman David M. Molecular profiling in muscle invasive bladder cancer: more than the sum of its parts. *J Pathol*. 2019; 247: 563–573.
107. Breyer J, Wirtz RM, Otto W, Erben P, Kriegmair MC, Stoeck R, et al. In stage pT1 non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC), high KRT20 and low KRT5 mRNA expression identify the luminal subtype and predict recurrence and survival. *Virchows Arch* 2017; 470: 267–274.