

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
FACULTAD DE MEDICINA



Hospital Universitari i Politècnic La Fe

Programa: 3139-Doctorado en Medicina

TESIS DOCTORAL

**VALOR PRONÓSTICO DE LA PRESENCIA DE  
UN COMPONENTE TUMORAL  
INDIFERENCIADO (“TUMOR BUDDING”) EN  
PACIENTES CON CARCINOMA VESICAL  
MÚSCULO-INVASIVO.**

Memoria presentada por Laura Lorenzo Soriano, para aspirar al título de Doctor en Medicina por la Universidad de València, bajo la dirección del Dr. David Ramos Soler.

Julio, 2018



El Dr. David Ramos Soler, Profesor Titular del Departamento de Patología de la Universitat de València y Jefe de Sección del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari i Politècnic La Fe,

CERTIFICA:

Que Laura Lorenzo Soriano ha realizado el trabajo: “Valor pronóstico de la presencia de un componente tumoral indiferenciado (“tumor budding”) en pacientes con carcinoma vesical músculo-invasivo”, para obtener el título de Doctor en Medicina, bajo mi dirección.

Dicho trabajo reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa como tesis doctoral.

Y para que así conste, expido la presente certificación, en València a 12 de Julio de 2018.

Fdo. Dr. David Ramos Soler.



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera dedicar estas palabras a todas aquellas personas que de una manera u otra han participado en el desarrollo de esta tesis. Sin su ayuda y apoyo no hubiera sido posible que mi esfuerzo personal viera la luz.

Al Dr. David Ramos, porque sin su labor este proyecto no se hubiera podido llevar a cabo. Él ha sido el promotor, incentivador y supervisor continuo de este trabajo. Gracias por todo lo que me has enseñado, por encontrar siempre un hueco para atenderme y trabajar conmigo y por tu entusiasmo y motivación infinitos. Siempre te estaré agradecida.

Al Dr. Guzmán Ordaz, por haber aportado a este trabajo sus conocimientos de estadística, por resolver todas mis dudas y por sus valiosos consejos.

Al Dr. Jose Luis Pontones, por su colaboración en este proyecto, por su apoyo constante y por haberme aportado tantos conocimientos durante mi formación en la urología.

A Soraya Hernández, porque sin su labor en el laboratorio de Anatomía Patológica este trabajo no se hubiera podido realizar.

A mis compañeros de residencia y a mis adjuntos del Servicio de Urología, especialmente al Dr. Salvador Arlandis, por resolverme muchas dudas y por aportar su visión crítica a este trabajo.

A Fran, mi compañero en la vida, por su paciencia, su amor y su comprensión. Gracias por permitirme dedicar tantas horas a lo que tanto me gusta.

A mis padres, por su amor, su educación y su apoyo incondicional.





# ÍNDICE

---



<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>19</b>
1. Definición de “tumor budding” .....	21
2. “Tumor budding” en el carcinoma colorectal.....	23
3. Significación clínica para cáncer de colon y recto .....	26
4. “Tumor budding” y “transición epitelio-mesénquima” .....	34
5. Metodología para la evaluación del “tumor budding” .....	40
6. Valor pronóstico del “tumor budding” en otros tumores.....	49
7. “Tumor budding” y cáncer vesical.....	54
8. Paralelismo entre “tumor budding” y otros conceptos: patrón infiltrativo en vejiga y grados de Gleason del carcinoma de próstata.....	57
9. Carcinoma vesical músculo-invasivo.....	61
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>71</b>
1. Hipótesis.....	73
2. Objetivos.....	74
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>77</b>
1. Diseño del estudio.....	79
2. Proceso de diagnóstico y tratamiento en el carcinoma vesical músculo-invasivo.....	80
3. Seguimiento de los pacientes.....	84
4. Selección de pacientes.....	85
5. Variables evaluadas.....	87
6. Metodología.....	90
6.1. Selección de la laminilla más representativa.....	90
6.2. Aplicación de técnicas inmunohistoquímicas.....	91
6.2.1. Principios básicos.....	91

6.2.2. Anticuerpos monoclonales.....	93
6.2.3. Recuperación antigénica, técnica inmunoenzimática indirecta y sistema de visualización.....	97
6.2.4. Protocolo de inmunohistoquímica aplicado.....	99
7. Evaluación del “tumor budding” .....	104
8. Evaluación de otros factores pronósticos anatomopatológicos.....	110
9. Análisis estadístico.....	112
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>117</b>
1. Tamaño muestral.....	119
2. Análisis descriptivo.....	120
3. Punto de corte en la cuantificación del “tumor budding” .....	130
4. Análisis bivalente.....	132
5. Análisis multivariante.....	135
5.1. Análisis multivariante para mortalidad cáncer-específica.....	135
5.2. Análisis multivariante para supervivencia libre de progresión.....	137
5.3. Comparación de los modelos predictores según la metodología de recuento.....	139
6. Modelo predictivo para mortalidad.....	140
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>143</b>
1. “Tumor budding” en cáncer vesical.....	145
2. Aplicabilidad a la práctica clínica.....	154
3. Justificación de la metodología aplicada.....	159
4. Limitaciones de nuestro estudio.....	163
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>167</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>173</b>

## ABREVIATURAS

---



AJCC: American Joint Committee on Cancer

AUC: Area under curve (área bajo la curva)

BOE: Boletín oficial del estado

CCR: Carcinoma colorectal

CIS: Carcinoma in situ

CK: Citoqueratina

CVMI: Carcinoma vesical músculo-invasivo

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

ESMO: European Society for Medical Oncology

FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor

H&E: Hematoxilina y Eosina

HR: Hazard Ratio

IBCNC: International Bladder Cancer Nomogram Consortium

IC95%: Intervalo de Confianza al 95%

MCE: Mortalidad cáncer específica

MMPs: Metaloproteinasas de matriz

OR: Odd Ratio

PBS: Phosphate buffered saline (tampón fosfato salino)

QT: Quimioterapia

RR: Riesgo relativo



RTU: Resección transuretral

SCE: Supervivencia cáncer específica

SG: Supervivencia global

SLP: Supervivencia libre de progresión

SLR: Supervivencia libre de recidiva

TB: Tumor budding

TC: Tomografía computerizada

TEM: Transición epitelio-mesénquima

TNM: Tumor-Nodes-Metastasis

UICC: Union for International Cancer Control

uPA: Activador de plasminógeno urocinasa

uPAR: Receptor del activador de plasminógeno urocinasa



# INTRODUCCIÓN

---



## ***1. Definición de “tumor budding”***

“Tumor budding” (TB) es un concepto histopatológico consistente en la presencia de células tumorales aisladas o en pequeños grupos de hasta 4 células tumorales (“buds”), localizadas en el estroma a nivel del frente invasor de un tumor<sup>1</sup> (figura 1). Este fenómeno fue descrito por primera vez por Imai en 1954,<sup>2</sup> como un proceso de germinación focal o “sprouting” a nivel del margen tumoral invasor y que tendría relación con un crecimiento tumoral acelerado. Posteriormente, otros autores también centraron su atención en este hallazgo morfológico, viendo en él un proceso que suponía “el desprendimiento” de células tumorales aisladas o en pequeños grupos desde el margen tumoral, para su posterior migración a través del estroma circundante.<sup>3-5</sup> Por tanto, “tumor budding” pasó a considerarse la representación morfológica de la adquisición de capacidad invasora por parte de las células tumorales y así, el punto de partida para el desarrollo de futuras metástasis.

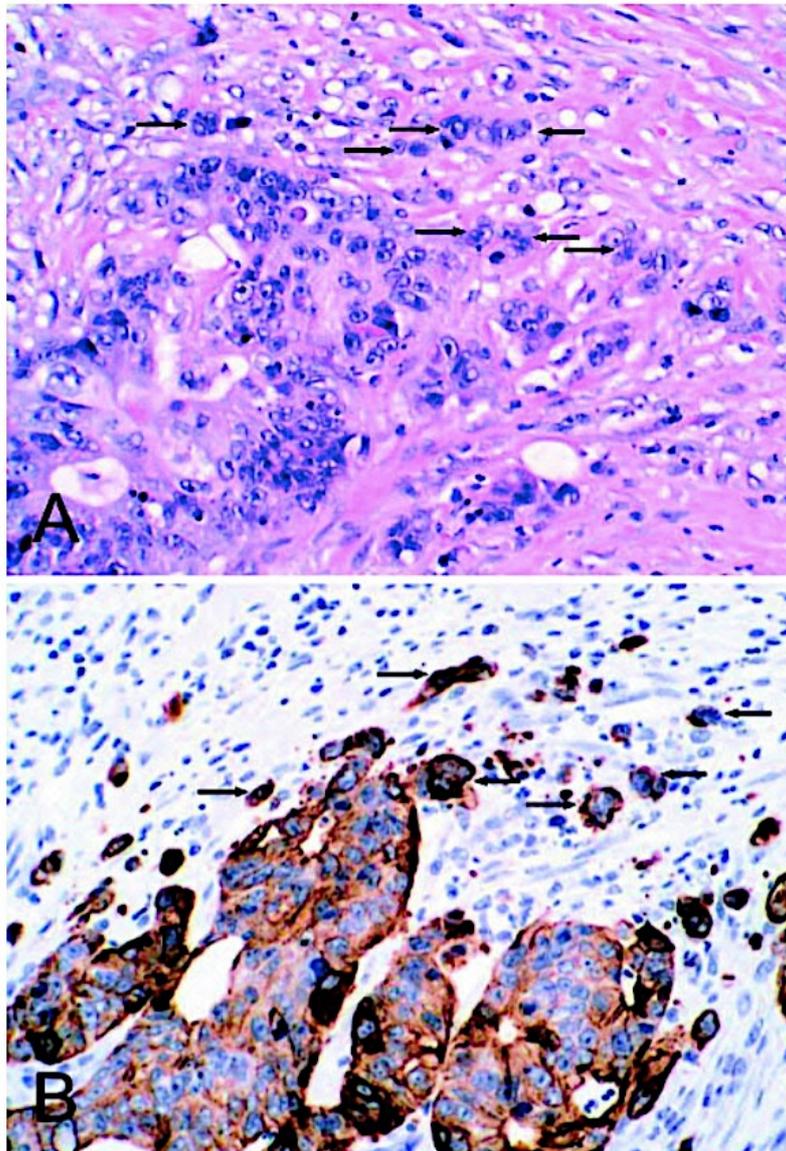


FIGURA 1. Visualización al microscopio de abundante TB en el frente tumoral de carcinoma de colon con H&E (A) y con citoqueratina (B).  
*Reproducido de Ueno et al.<sup>6</sup>, con permiso.*

## ***2. “Tumor budding” en el carcinoma colorectal***

El carcinoma colorectal (CCR) representa el modelo tumoral donde el TB ha sido estudiado con mayor amplitud y profundidad. De hecho, en la actualidad es reconocido como factor predictor independiente de mal pronóstico con categoría IIB para CCR de acuerdo con la “Union for International Cancer Control” (UICC)<sup>7</sup> y con las guías de consenso de la “European Society for Medical Oncology” (ESMO).<sup>8</sup>

Son múltiples los estudios en los que se ha demostrado el carácter pronóstico del TB en el CCR. Así, el hallazgo de niveles elevados de TB se ha correlacionado con un riesgo aumentado de recurrencia,<sup>6,9-12</sup> tanto local<sup>13-14</sup> como a distancia.<sup>14</sup> Consecuentemente, una densidad elevada de TB en CCR también se ha correlacionado con menor supervivencia libre de enfermedad a los 5 años<sup>15</sup> y menor supervivencia global (SG) a los 5 años<sup>4,6,9,11,16,17</sup> y a los 10 años.<sup>4,17</sup> Además, el TB también se ha relacionado con la presencia de otros factores de mal pronóstico. De este modo, niveles elevados de TB se han asociado a la presencia de

un estadio tumoral superior,<sup>18,19</sup> a niveles mayores de T<sup>6,10,19,20</sup> y N<sup>6,16</sup> de la clasificación TNM, y a un grado superior en la clasificación de Dukes;<sup>4,6</sup> a indiferenciación tumoral,<sup>4</sup> a un patrón de crecimiento infiltrante;<sup>19,21,22</sup> a invasión linfática,<sup>4,6,10,16,22</sup> venosa,<sup>4,6,9,10,13,16,18,22</sup> y perineural;<sup>4,16</sup> y a la presencia de metástasis ganglionar<sup>9-11,19-21,23</sup> y a distancia.<sup>11</sup> Además, en el CCR metastásico, niveles elevados de TB se han asociado con la ausencia de respuesta a terapias anti-EGFR.<sup>15</sup> Y en cáncer de recto, se ha relacionado la presencia de TB con fracaso al tratamiento neoadyuvante con radioquimioterapia.<sup>24-26</sup>

En una revisión sistemática realizada por Rogers et al.<sup>27</sup> en la que se incluyeron 7821 pacientes procedentes de 34 estudios, se concluyó que el TB estaba significativamente asociado a la presencia de ganglios linfáticos positivos (OR 4.94, IC95% 3.96-6.17,  $p < 0.00001$ ); a riesgo elevado de desarrollar recurrencia (OR 5.50, IC95% 3.64-8.29,  $p < 0.00001$ ) y a una mortalidad cáncer específica (MCE) a los 5 años superior (OR 4.51, IC95% 2.55-7.99,  $p < 0.00001$ ) (figura 2).

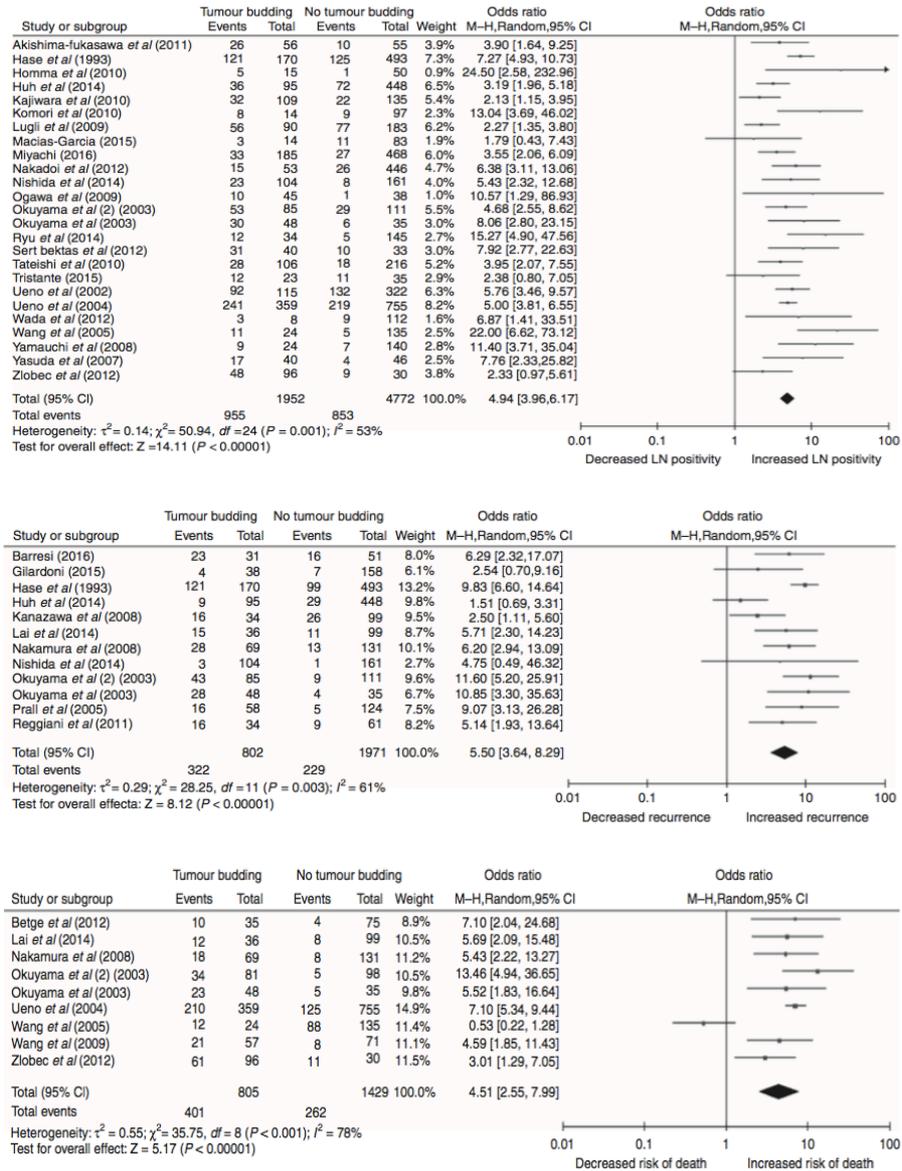


FIGURA 2. Resultado del metanálisis de Rogers et al.<sup>27</sup>, en el que se encontró asociación entre la presencia de TB y afectación ganglionar, recurrencia local y a distancia y riesgo de muerte a 5 años, en cáncer de colon. *Reproducido de Rogers et al.<sup>27</sup>, con permiso.*

### ***3. Significación clínica para cáncer de colon y recto***

El factor pronóstico más importante para el CCR continúa siendo el estadio determinado por la clasificación TNM (tumor-adenopatías-metástasis) de la UICC/AJCC.<sup>28</sup> El pronóstico y la actitud terapéutica van a depender de ello en gran medida, sin embargo, un sustancial número de tumores clasificados como de bajo riesgo según el estadio TNM presentan una evolución desfavorable.<sup>29</sup> Por ello, el papel que suponen otros factores predictores como la invasión linfática y venosa, el grado tumoral, la invasión perineural, la configuración del borde tumoral, la inestabilidad de microsatélites o el TB, es de gran relevancia para la toma de decisiones terapéuticas.<sup>30</sup>

Como ejemplo de ello, en 2004 Ueno et al.<sup>31</sup> propusieron un nuevo sistema de estadificación pronóstico para cáncer de recto. En este nuevo nomograma incluyeron tres variables pronósticas: la profundidad tumoral (afectación extramural), el número de ganglios afectados y el grado de TB. Ellos defendieron este nuevo sistema de

gradación dado que su capacidad para predecir la supervivencia a 5 años era superior que la de la gradación TNM o la de la clasificación Dukes.

El impacto adverso en el pronóstico que supone la presencia de TB se ha objetivado en CCR tanto en estadios tempranos como avanzados:

*-“Tumor budding” en estadios tempranos del CCR*

El CCR estadio I de la AJCC/UICC (pT1/2; pN0, M0) es comúnmente identificado mediante estudio anatomopatológico tras la resección endoscópica de un pólipo malignizado. Aunque la mayoría de los pacientes no precisan tratamiento adicional tras la polipectomía endoscópica, hasta un 17% pueden presentar micrometástasis en los ganglios regionales en el momento de la resección.<sup>32,33</sup> Es en estos casos donde ciertos factores histomorfológicos son necesarios para identificar pacientes candidatos a un tratamiento adicional. En un reciente metanálisis que incluía 4510 pacientes pT1 procedentes de 23 estudios,<sup>32</sup> se objetivó que la presencia de TB de alto grado se asociaba de manera

significativa a la presencia de adenopatías (OR 7.74, IC95% 4.47-13.39,  $p < 0.001$ ); superando el riesgo relativo de otros factores adversos como la profundidad de la invasión submucosa  $> 1$  mm (OR 3.87, IC95% 1.5-10,  $p = 0.005$ ), la invasión linfática (OR 4.81, IC95% 3.14-7.37,  $p < 0.0001$ ) o una pobre diferenciación tumoral (OR 5.60, IC95% 2.90-10.82,  $p < 0.0001$ ). Otro metanálisis que incluía 17 trabajos con 3621 pacientes encontró resultados similares,<sup>34</sup> determinando como factores de riesgo para afectación adenopática en pacientes pT1: invasión linfática (RR 5.1, IC95% 4.0-6.8), invasión submucosa de al menos 1 mm (RR 5.2, IC95% 1.8-15.4), TB (RR 5.1, IC95% 3.6-7.3) y escasa diferenciación histológica (RR 4.8, IC95% 3.3-6.9).

Por tanto, actualmente la valoración del TB es importante en estadios tempranos del CCR, ya que según las guías europeas, tras la resección endoscópica del CCR en estadio I, se considera indicada una resección intestinal segmentaria en caso de presencia de alguno de los siguientes factores de riesgo: grado tumoral  $> 2$ , invasión de la submucosa, invasión linfática o venosa, margen de resección menor de 1 mm, presencia de TB o carcinoma invasivo en

un pólipo sésil.<sup>8</sup>

*-“Tumor budding” en estadio II*

El estadio II de la AJCC/UICC (pT3/4, pN0, M0) engloba a un grupo heterogéneo de pacientes, con supervivencia a los 5 años variable desde 66.5% (estadio IIA) hasta 37.3% (estadio IIC).<sup>35</sup> Esto contrasta con la supervivencia observada a 5 años del 73.1% (estadio IIIA) y del 46.3% (estadio IIIC) para pacientes con adenopatías positivas.<sup>36</sup> Según esto, claramente algunos pacientes del estadio II presentan peor pronóstico que otros pacientes del estadio III, debido a la presencia de micrometástasis que pasan clínicamente desapercibidas en el momento del diagnóstico. Por ello, la identificación de estos pacientes en estadio II con elevado riesgo de recurrencia, a través de factores de riesgo anatomopatológicos adicionales, es importante con el fin de aportar en dichos pacientes terapias adyuvantes y un seguimiento más estrecho.

La importancia de la presencia de TB en pacientes en estadio II ha sido reconocida de manera creciente en los últimos años como

factor de riesgo adicional, basándose en una serie de estudios retrospectivos bien diseñados.<sup>13,17,21,36-39</sup> Así, en el estudio de Nakamura et al.<sup>17</sup>, la tasa de supervivencia en pacientes con estadio II y TB de alto grado no presentó diferencias estadísticamente significativas a la supervivencia de pacientes en estadio III. Por otra parte, Okayuma et al.<sup>12,40</sup>, en sus trabajos en pacientes pT3 en estadio II y III concluyeron que el TB fue el único factor predictor en el análisis multivariante asociado a supervivencia reducida y con un valor pronóstico superior que la presencia de adenopatías positivas. Además, la presencia de TB en estadio II se asoció a la presencia de otros factores de riesgos morfológicos como la invasión linfática y venosa, un mayor grado tumoral y un margen tumoral infiltrativo.<sup>13,17,21,36-39</sup>

Por todo ello, ya que la administración de quimioterapia adyuvante en estadio II no está indicada de manera rutinaria, sino sólo en pacientes con factores de riesgo (obtención de menos de 12 ganglios linfáticos, pobre diferenciación tumoral, invasión linfática, venosa o perineural; presentación tumoral con obstrucción o perforación y estadio pT4);<sup>8</sup> algunos autores han sugerido la

presencia de TB como otro factor de gran utilidad para definir un subgrupo de pacientes en estadio II que se beneficiaría de ella.<sup>4,12,17,21,40</sup>

*-“Tumor budding” en los estadios III y IV*

En los estadios III (pT3/4, N+, M0) y IV (M+) de la AJCC/UICC, el valor pronóstico del TB ha sido menos estudiado. Hase et al.<sup>4</sup> observaron peor pronóstico en CCR estadio III con TB de alto grado. Del mismo modo, Choi et al.<sup>41</sup> estudiaron a 103 pacientes con cáncer rectal en estadio III, donde el TB también resultó factor de mal pronóstico independiente. Por otro lado, en pacientes con CCR metastásico, Zlobec et al.<sup>15</sup> observaron que la presencia de TB se asoció con una escasa respuesta a la terapia con anti-EGFR. A pesar de que estos resultados apuntan a que el TB también puede ser de utilidad en la práctica clínica en estadios avanzados, se requiere de más estudios con cohortes más amplias para poder consolidar el papel del TB en estos escenarios.

*-“Tumor budding” en biopsias preoperatorias*

La toma de biopsias en el CCR primario es un paso imprescindible

para poder llevar a cabo una correcta confirmación diagnóstica. La valoración de la existencia de TB en estas biopsias preoperatorias ha demostrado ser de interés ya que se ha relacionado con la existencia de metástasis ganglionares y a distancia,<sup>22,42</sup> y se ha asociado con ausencia de respuesta a quimioterapia neoadyuvante y con peores tasas de supervivencia en el cáncer de recto.<sup>25</sup> Dado que con frecuencia el margen de invasión tumoral no puede ser objetivado en la muestra recogida mediante biopsia endoscópica, en estos casos se ha realizado una evaluación del TB intratumoral, es decir, localizado dentro del tumor y no en el frente invasor (figura 3). En varios estudios, niveles elevados de TB intratumoral han demostrado correlacionarse con niveles elevados de TB peritumoral, y al igual que éste, correlacionarse con estadios tumorales superiores, invasión venosa y linfática, metástasis adenopáticas y a distancia, y supervivencia reducida.<sup>22,25,42</sup> Por tanto, el TB intratumoral también representa un factor predictor de mal pronóstico para CCR.

En muchos casos, la muestra de tejido aportada por la biopsia endoscópica es superficial y ciertas características como la

profundidad tumoral, la invasión linfovascular o perineural o la configuración del borde tumoral no son valorables. Es en esta situación donde la evaluación del TB intratumoral puede permitir estratificar a los pacientes con mal pronóstico desde el momento del diagnóstico inicial. Ello sería de gran utilidad en la identificación de pacientes que podrían beneficiarse de terapias neoadyuvantes preoperatorias.<sup>25</sup>

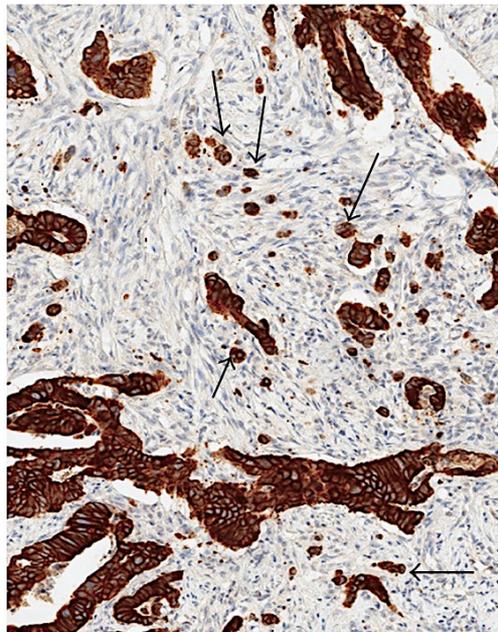


FIGURA 3. Presencia de "buds" intratumorales, en el cuerpo central del tumor en cáncer de recto. *Reproducido de Zlobec et al.<sup>43</sup>, con permiso.*

#### ***4. “Tumor budding” y “transición epitelio-mesénquima”***

El TB es considerado un fenómeno dinámico, que representa la primera etapa en el proceso de la metástasis tumoral, es decir, la adquisición por parte de ciertas células tumorales de la capacidad para desprenderse del tumor principal y migrar a través de la matriz extracelular en busca de estructuras vasculares, y de este modo dar lugar a metástasis ganglionares y a distancia. De ahí el significado de TB como tumor “incipiente” o “en ciernes”.

Muchos autores han visto en el TB el reflejo de un fenómeno conocido como “transición epitelio-mesénquima” (TEM),<sup>44-46</sup> el cual implica un conjunto de eventos celulares que permite la conversión de células epiteliales en células migratorias o mesenquimales. Este evento sucede durante la embriogénesis y se mantiene silente en la etapa adulta de los organismos, no obstante puede ser reactivada en procesos como la cicatrización de las heridas, la fibrosis tisular o la invasión tumoral. Inicialmente las células epiteliales se encuentran unidas entre sí por uniones

adherentes conformadas por proteínas como E-Cadherina, cateninas o anillos de actina. Además, las uniones adherentes están asociadas a complejos de polaridad ápico-basal. Durante la TEM, se reprime la transcripción de los genes que codifican para los componentes de las uniones adherentes y se pierde la polaridad ápico-basal de la célula. A su vez, la célula sufre cambios en el citoesqueleto que promueven una constricción apical en la célula y desorganización de la membrana basal. Por otra parte, la célula adquiere la capacidad para remodelar la matriz extracelular e incrementa su resistencia a la apoptosis.<sup>47,48</sup>

Del mismo modo, el fenotipo de las células que conforman el TB se caracteriza por ser compatible con el de una célula en movimiento, con pérdida de las proteínas que permiten la adherencia entre membranas y las uniones intercelulares, y con adquisición de microfilamentos citoplasmáticos que dotan a la célula de motilidad.<sup>49</sup>

A nivel molecular, uno de los principales hallazgos en las células del TB o “buds” es la pérdida de expresión de la proteína **E-cadherina**, la cual actúa como receptor de adhesión transmembrana.<sup>44-46,50-52</sup> De hecho, la pérdida de expresión de E-cadherina en el CCR se ha asociado a peor supervivencia.<sup>53</sup> Otro hallazgo característico e importante en estas células es la translocación nuclear de la proteína **β-cadherina** desde la membrana, lo cual conlleva la activación de genes que desencadenan la producción de múltiples moléculas que intervienen en el proceso de TEM.<sup>44,46,51,53,54</sup>

La pérdida de las características epiteliales de las células tumorales es paralela a la ganancia de características mesenquimales, y por lo tanto, migratorias. Así, se produce un aumento en la expresión de proteínas como **N-cadherina**, **fibronectina**, **actina** y **vimentina**, que dan lugar a la pérdida de la polaridad celular y le permiten interactuar con la matriz extracelular y emitir lamelipodios y filopodios.<sup>45,46,53,55</sup> La migración e invasión también se ven favorecidas por el incremento de la producción de **proteasas extracelulares** como metaloproteinasas de matriz (MMPs),

activador de plasminógeno urocinasa (uPA) y receptor del activador de plasminógeno urocinasa (uPAR); las cuales degradan las proteínas del estroma y remodelan la matriz extracelular.<sup>56,57</sup> Una parte importante de los complejos procesos que intervienen en la TEM son regulados por tres familias de factores de transcripción: SNAIL, ZEB y TWIST. Las **proteínas SNAIL** van a eliminar uniones intercelulares e inducir cambios en el citoesqueleto.<sup>58-60</sup> Las **proteínas ZEB** (previamente conocidas como SIP) van a ser represoras de marcadores epiteliales como E-cadherina e inductoras de la expresión de vimentina o MMPs.<sup>61-64</sup> Y las **proteínas TWIST1 y TWIST2** inducen la expresión de marcadores mesenquimales como fibronectina y N-cadherina.<sup>62,65</sup> Además, las células del TB también han sido caracterizadas por su resistencia aumentada a los estímulos apoptóticos, a quimioterápicos y a la agresión inmunológica, gracias a la reducción de la expresión de **caspasas**<sup>66</sup> y de la proteína inhibitoria **Raf-kinasa**.<sup>67</sup>

Por otro lado, las células del TB han demostrado presentar una expresión muy reducida de **Ki-67**, en contraste con la expresión elevada de este marcador en las células del tumor principal. Por

tanto, estas células pasan de presentar una proliferación elevada a una proliferación reducida o nula,<sup>45,66,68</sup> convirtiéndose en células quiescentes, destinadas principalmente a la migración (figura 4).

Las modificaciones moleculares comentadas son las más relevantes en el proceso de evolución fenotípica que sufren las células del TB. Sin embargo, en dicho proceso intervienen multitud de rutas moleculares cuyo abordaje no es objeto de este trabajo (figura 5), pero cuyo estudio ha suscitado gran interés y son muchos los trabajos dedicados al estudio de las moléculas implicadas, con el fin de desarrollar nuevas terapias dirigidas específicamente a ellas, en la fase más precoz de la diseminación metastásica tumoral.

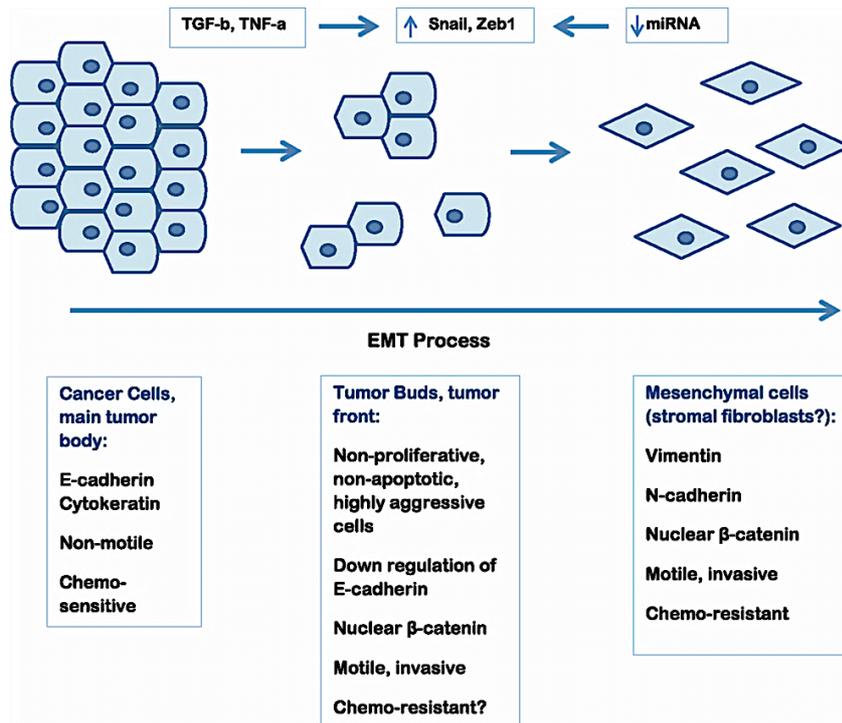


FIGURA 4. Representación esquemática del proceso TEM. Las células tumorales se van individualizando progresivamente, a la vez que van adquiriendo movilidad y se transforman en células de mayor agresividad. *Reproducido de Karamitopoulou et al.<sup>69</sup>, con permiso.*

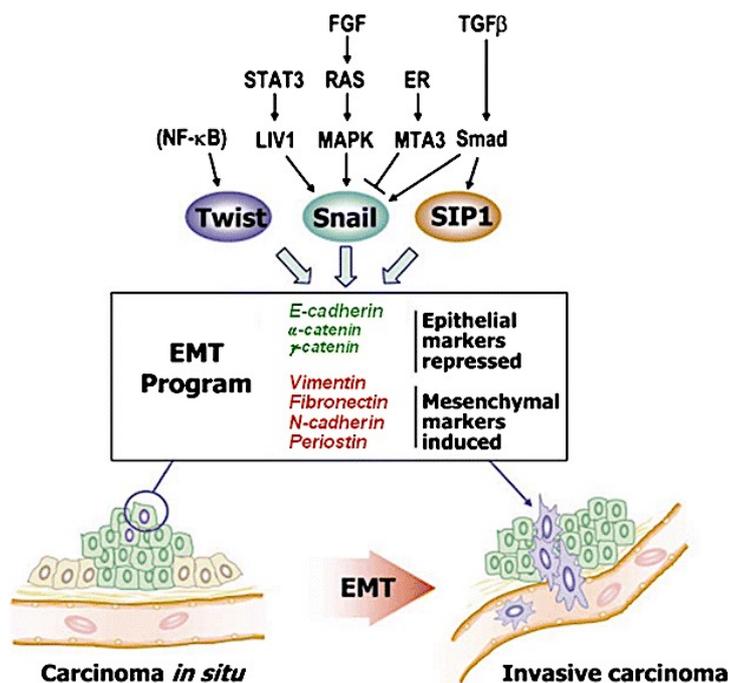


FIGURA 5. Mediadores en el proceso TEM. Se trata de un proceso de gran complejidad en el que intervienen multitud de moléculas mediadoras. *Reproducido desde Kang et al.<sup>70</sup>, con permiso de Elsevier.*

## 5. Metodología para la evaluación del “tumor budding”

A pesar de que el TB ha demostrado ser un importante factor predictor en CCR, todavía no se encuentra plenamente incorporado en los protocolos diagnósticos de muchos centros. Ello se debe fundamentalmente a la considerable variabilidad existente en la

literatura en cuanto a los aspectos relativos a su metodología: definición de TB, técnica a aplicar para su correcta identificación, evaluación de su densidad y punto de corte para estratificación del riesgo. Un aspecto sobre el cuál sí hay unanimidad es la necesidad de seleccionar el bloque tisular óptimo, es decir, es conveniente revisar todas las laminillas de una pieza quirúrgica con H&E para seleccionar la que contenga mayor densidad de TB, y evitar así una evaluación errónea sobre todo en aquellos casos con distribución heterogénea.

#### *-Definición de “tumor budding”*

El número de células que puede contener un nido celular para poder ser considerado como “bud” ha variado para los diversos autores. Así, Morodomi et al.<sup>3</sup> definieron TB como células tumorales indiferenciadas y aisladas o en agrupaciones de  $\geq 5$  células, y algunos autores como Okuyama et al.<sup>12</sup> siguieron esta definición. Otros autores como Prall et al.<sup>14</sup>, Zlobec et al.<sup>15</sup> o Koelzer et al.<sup>71</sup> fijaron el punto de corte en  $\leq 5$  células. Y otros como Ueno et al.<sup>4</sup>, sin embargo redujeron el número a  $\leq 4$  células. A pesar de ser un punto de corte arbitrario,  $\leq 4$  células ha sido la definición más

empleada.<sup>6,9,15,16,21,22,36,41,72</sup>

*-Técnica para una adecuada identificación*

Aunque el TB puede identificarse de manera correcta mediante H&E, existen ciertas situaciones en las que su valoración puede verse dificultada: presencia de abundante infiltrado inflamatorio a nivel del frente invasor, lo que puede hacer difícil la distinción entre “buds” y linfocitos o histiocitos activados; la presencia de abundante reacción estromal en el frente invasor, la presencia de glándulas tumorales fragmentadas o en caso de fragmentación tumoral debido a abundante matriz mucinosa.<sup>73</sup> Para evitar una identificación errónea del TB, en multitud de estudios se han empleado técnicas de inmunohistoquímica (sobre todo anticuerpos anti-citoqueratinas), por su capacidad para facilitar la identificación del TB frente a H&E.<sup>20,74-77</sup> Además, algunos estudios han encontrado una reproducibilidad interobservador superior para las técnicas de inmunohistoquímica que para H&E.<sup>77,78</sup> A pesar de ello, la conclusión de varios artículos de revisión es que el valor pronóstico del TB se mantiene invariable, independientemente del empleo de H&E o técnicas de inmunohistoquímica.<sup>27,74,75,79</sup> Sin

embargo, aunque las recomendaciones actuales se decantan por la valoración con H&E por motivos de coste-efectividad,<sup>1</sup> hay que tener muy presente que en los escenarios comentados de difícil valoración y también en caso de patólogos poco experimentados, el uso de técnicas de inmunohistoquímica puede ser indispensable.

#### *-Metodología de evaluación*

En la literatura podemos encontrar múltiples métodos de valoración (figura 6). Se han descrito métodos cualitativos basados en la percepción subjetiva como el de Hase et al.<sup>4</sup>, que clasificaban el TB según nulo/leve vs. moderado/severo; o el de Nakamura et al.<sup>80</sup> que lo categorizaban como nulo, leve (si abarcaba < 1/3 del margen tumoral), moderado (entre 1/3 y 2/3 del margen tumoral) o severo (> 2/3 del frente tumoral). Los más empleados han sido los métodos cuantitativos o basados en el recuento de “buds”. Dentro de estos encontramos el método de Ueno et al. de 2002,<sup>5</sup> que se basaba en el recuento dentro de la zona con mayor densidad de TB, en un único campo con un área de 0.385 mm<sup>2</sup> y con una consecuente estratificación en bajo grado (< 10 “buds”) y alto grado ( $\geq$  10 “buds”). Posteriormente, en 2004 Ueno et al.<sup>31</sup> realizaron una

modificación del método anterior consistente en el recuento en un campo más amplio (área de 0.785 mm<sup>2</sup>) y clasificándolo como negativo (< 5 “buds”) o positivo ( $\geq$  5 “buds”). Por su parte, Wang et al.<sup>21</sup> seleccionaban los 5 campos de gran aumento con mayor densidad de TB, y lo clasificaba en “alto” si la media del recuento de los 5 campos era  $\geq$  1 y “bajo” si era cero.

Los dos métodos más utilizados en la actualidad son el de “10 campos de gran aumento” (“10 CGA”),<sup>19,39</sup> y el de “1 campo de gran aumento” (“1 CGA”).<sup>42</sup> En el método de “10 CGA” se evalúa en primer lugar el frente invasor a bajo aumento (x4-x10) y se identifican las áreas con mayor densidad de TB, para a continuación contabilizar los “buds” de 10 CGA (x40) en esas áreas y calcular la media. Este método es útil para la valoración de piezas de resección en CCR, sin embargo para la valoración de pólipos malignos y de biopsias preoperatorias donde el tejido es limitado, este método no es aplicable y se recurre al método de “1 CGA”. En este caso, también se valora a bajo aumento la zona de mayor densidad de TB, y a gran aumento se contabiliza la cantidad de “buds” existentes en un único CGA, también llamado “hot-spot”.

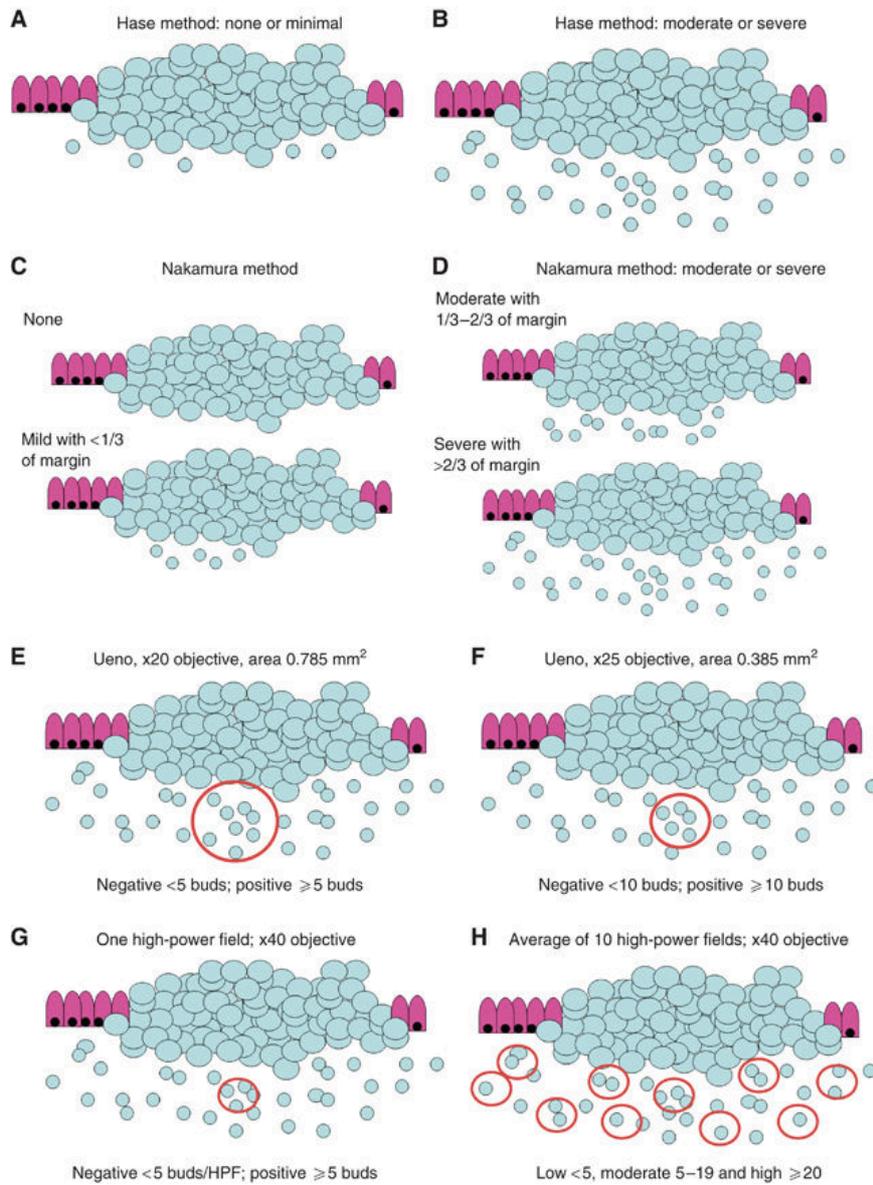


FIGURA 6. Representación de los “scoring systems” para TB propuestos por Hase et al, 1993 (A,B); Nakamura et al, 2005 (C,D); Ueno et al, 2002 (E,F); 1 CGA (G) y la media de 10 CGA (H). *Reproducido de Lugli et al.<sup>81</sup>, con permiso.*

Son varios los trabajos que concluyen que los métodos de evaluación cuantitativos son altamente reproducibles,<sup>19,39,71</sup> mientras que los métodos cualitativos presentan una pobre reproducibilidad interobservador.<sup>39</sup> Con respecto a los métodos cuantitativos, la puntuación obtenida en la evaluación del TB tanto con el empleo del método “10 CGA” como de “1 CGA” se ha correlacionado de manera independiente con peor supervivencia cáncer-específica (SCE);<sup>19,39</sup> sin embargo el método que ha demostrado mayor reproducibilidad interobservador ha sido el método “10 CGA”,<sup>19,39,71</sup> dado que es improbable que diferentes patólogos seleccionen un “hot-spot” idéntico. A pesar de ello, en la reciente reunión de consenso acerca de la metodología a emplear para el estudio del TB,<sup>1</sup> se ha establecido que el método indicado sea “1 CGA”, con el fin de evitar que el empleo de un recuento en múltiples campos pueda “diluir” la media final, sobre todo en casos con TB muy focalizado en una zona del frente tumoral, pero recomiendan una revisión exhaustiva a lo largo de todo el margen invasor antes de llevar a cabo el recuento en el “hot-spot”.

*-Punto de corte (“Cut-off”)*

Otra de las variables con amplia heterogeneidad en la literatura es el punto de corte empleado para estratificar el TB en grupos de riesgo. Así, muchos trabajos han fijado este punto de corte en 10 “buds”,<sup>5,9,19,20,37</sup> basándose en las diferencias encontradas en cuanto a supervivencia en las curvas Kaplan-Meier de ambos grupos ( $\leq 10$  “buds” vs.  $> 10$  “buds”). Otros trabajos han empleado un “cut-off” de 9 “buds”.<sup>6,82,83</sup> Por otro lado, hay grupos que se han basado en un sistema con tres niveles de riesgo como la “Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum”<sup>84</sup>: 0-4 “buds”: “low budding”, 5-9 “buds”: “intermediate budding” y  $\geq 10$  “buds”: “high budding”. Sin embargo, algunos trabajos recientemente han planteado la utilización de una escala continua frente a la categorización en grupos de riesgo, demostrando una mayor precisión en cuanto al riesgo pronóstico.<sup>39,71,85</sup> Mediante el empleo de una escala continua se evitan limitaciones sujetas a la categorización, por ejemplo, el comportamiento biológico de un tumor con un recuento de 9 “buds” no debe ser muy diferente de un tumor con 11 “buds”, sin embargo con un sistema de categorización en grupos de riesgo según un

punto de corte de 10 “buds”, el primero se consideraría de bajo riesgo y el segundo de alto riesgo.

Por todo lo comentado, se evidencia que la heterogeneidad en la metodología descrita en la literatura para el estudio del TB es inmensa. Y esta es la razón fundamental que explica el hecho de que todavía no sea evaluado de manera rutinaria en el estudio anatomopatológico del CCR, y de que su implantación en las guías clínicas y protocolos de CCR aún no sea completa. Por este motivo, en abril de 2016 se llevó a cabo en Berlín una conferencia para establecer una metodología para el estudio del TB en CCR, estandarizada a nivel internacional.<sup>1</sup>

Por otra parte, se ha de resaltar algo tan llamativo como es el hecho de que a pesar de la gran diversidad metodológica existente para el TB, su carácter pronóstico en CCR se ha mantenido de manera consistente en los diferentes estudios, lo cuál demuestra la robustez de su valor pronóstico independiente.

## ***6. Valor pronóstico del “tumor budding” en otros tumores***

El CCR es el carcinoma en el que el TB ha sido estudiado de manera más profunda y extensa, y es con diferencia en el que su valor pronóstico está más consolidado. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un interés creciente por el papel que puede suponer el TB en otros tumores diferentes al CCR.

Así, uno de los carcinomas donde encontramos más trabajos en relación con el TB es el **carcinoma de esófago**. Roh et al.<sup>86</sup> publicaron el primer trabajo de TB en cáncer de esófago escamoso, en el cuál encontraron relación entre TB de alto grado (con un “cut-off” de 5 “buds”) y el tamaño tumoral, el estadio pT, la invasión vascular y perineural, los márgenes de resección y el estadio tumoral ( $p < 0.05$ ); además de con las tasas de supervivencia a 3 años ( $p = 0.004$ ). Posteriormente, encontramos la publicación de múltiples estudios con resultados similares en cuanto al valor pronóstico del TB en cáncer de esófago, tanto en tumores escamosos<sup>87-92</sup> como en adenocarcinomas,<sup>92-94</sup> y con independencia

del estadio tumoral. En un reciente metanálisis que incluyó 11 estudios retrospectivos, se concluyó que el TB es un factor predictor independiente de mal pronóstico para supervivencia en el cáncer de esófago, con un RR de 2.07 (IC95% 1.22-3.52;  $p = 0.017$ ).<sup>95</sup>

Algo menos estudiado que en el cáncer de esófago, en el **cáncer de estómago** encontramos varios artículos que analizan la significancia pronóstica del TB. En este caso, en el trabajo de Olsen et al.<sup>96</sup>, los pacientes con adenocarcinoma gástrico y niveles elevados de TB se asociaron con mayor grado y estadio tumoral ( $p = 0.002$  y  $p < 0.001$ ) y con mayores tasas de recurrencia tumoral ( $p = 0.007$ ). En el trabajo de Gulluoglu et al.<sup>97</sup>, el TB fue el único factor pronóstico independiente relacionado con la presencia de afectación linfática en carcinomas gástricos pT1. Y en el trabajo de Che et al.<sup>98</sup>, la presencia de TB resultó factor de mal pronóstico independiente para supervivencia en el adenocarcinoma gástrico, con una HR = 1.568 (IC95% 1.044-2.354;  $p = 0.03$ ).

Otra localización donde el TB ha suscitado gran interés es en los **tumores de cabeza y cuello**, es decir los tumores de boca, faringe, laringe y nasosinusales.<sup>99</sup> De este modo, Luo et al.<sup>100</sup> demostraron en el carcinoma nasofaríngeo una elevada correlación entre la densidad del TB y el estadio T ( $p = 0.008$ ), la presencia de afectación ganglionar ( $p < 0.001$ ), la invasión linfática ( $p < 0.001$ ), la invasión venosa ( $p = 0.029$ ) y la supervivencia (HR 4.17; IC95% 1.856-9.372;  $p = 0.001$ ). Por su parte, Sarioglu et al.<sup>101</sup> observaron que el TB suponía un marcador pronóstico de metástasis a distancia ( $p = 0.044$ ) en el carcinoma escamoso laríngeo. Sin embargo, dentro de este grupo de tumores, el cáncer en el cual una posible relación con el TB se ha estudiado de manera más amplia es el tumor de lengua y boca. De este modo, en la literatura encontramos multitud de trabajos sobre este tipo de carcinomas,<sup>102-107</sup> donde el TB ha demostrado comportarse como factor predictor de mal pronóstico, con asociación con afectación ganglionar, recurrencia tumoral y supervivencia reducida. El escenario donde el TB parece tener más relevancia es en el tumor bucal en estadios tempranos, es decir, T1/2N0, ya que en estos casos el porcentaje de afectación ganglionar oculta a nivel cervical es muy elevado, en torno al 20-

40%,<sup>103</sup> y dado que el TB se comporta como predictor de estas adenopatías ocultas, su utilidad en la práctica clínica está comenzando a ser muy relevante.

El **cáncer de mama** es otro de los tumores en los que se ha evaluado el TB. Liang et al.<sup>108</sup> asociaron el TB de alta densidad con la presencia de invasión linfovascular ( $p = 0.001$ ), mayor tamaño tumoral ( $p = 0.014$ ) y peor supervivencia (HR 4.275, IC95% 2.299-7.949;  $p < 0.001$ ). En el trabajo de Salhia et al.<sup>109</sup>, el TB se asoció a invasión venosa ( $p = 0.006$ ), linfática ( $p \leq 0.015$ ) y a afectación ganglionar ( $p \leq 0.03$ ). Y más recientemente, Li et al.<sup>110</sup> publicaron resultados similares a los anteriores.

Encontramos otros tumores en los que también se ha comenzado a estudiar el valor pronóstico del TB, sin embargo el volumen de trabajos publicados es más reducido. Uno de estos tumores es el **carcinoma de páncreas**, donde el TB también ha demostrado comportarse como factor pronóstico adverso independiente,<sup>111,112</sup> con una HR (IC95%): 3.65 (2.1-6.4),  $p < 0.0001$ ; en el trabajo de Karamitopoulou et al.<sup>111</sup> Similares resultados han sido encontrados

en el **carcinoma de pulmón**, donde el TB ha sido definido como factor de agresividad y predictor de mal pronóstico tanto en adenocarcinomas<sup>113,114</sup> como en carcinomas escamosos.<sup>115,116</sup>

En el **carcinoma de cérvix**, los trabajos en relación al TB son muy limitados y centrados en estadios tempranos. En el artículo de Satabongkoch et al.<sup>117</sup> que incluyeron 129 pacientes, los pacientes con alto grado de TB mostraron una supervivencia inferior a aquellos con bajo grado ( $p = 0.031$ ), sin embargo, en el análisis multivariante el TB no resultó factor predictor independiente. Por el contrario, en el trabajo de Huang et al.<sup>118</sup>, con 643 pacientes, el TB de alto grado sí se definió como factor predictor independiente para supervivencia del cáncer de cérvix (HR 2.868; IC95%: 1.509-5.451;  $p = 0.001$ ).

Por último, el TB también ha sido caracterizado como factor de mal pronóstico en el adenocarcinoma de la **ampolla de Vater**,<sup>119</sup> en el carcinoma escamoso del **conducto auditivo**<sup>120</sup> y con el carcinoma escamoso **cutáneo**.<sup>121-123</sup>

Cabe destacar que si revisamos la metodología empleada para el estudio del TB en los diferentes tumores comentados, nos encontramos que la heterogeneidad observada en los trabajos sobre CCR se presenta de la misma manera en el resto de modelos tumorales.

## ***7. “Tumor budding” y cáncer vesical***

A pesar de que el valor pronóstico del TB ya ha sido evidenciado en una gran cantidad de carcinomas de origen muy diverso, la situación que encontramos en el caso del carcinoma de vejiga es muy diferente. Se puede decir que el TB se encuentra prácticamente inexplorado en este carcinoma. De hecho, la literatura en cuanto a la relación del TB y el carcinoma vesical se limita a un único trabajo de reciente publicación. Sin embargo, sí que encontramos bastantes trabajos que estudian los cambios moleculares asociados al proceso TEM en el cáncer de vejiga, el cuál ha sido relacionado íntimamente con el TB. De este modo, encontramos que una expresión reducida de E-cadherina en las células tumorales ha sido

descrita como factor de mal pronóstico en cáncer de vejiga, asociándose a mayor agresividad tumoral y a un riesgo incrementado de recurrencia y mortalidad.<sup>124-129</sup> A su vez, una expresión aberrante de  $\beta$ -catenina también se ha definido como factor pronóstico,<sup>124,130</sup> encontrando que en carcinomas uroteliales de bajo grado clínico y patológico su expresión es fundamentalmente a nivel de membrana y citoplasma celular, y sin embargo en carcinomas de alto grado su expresión es nuclear de manera predominante.<sup>130</sup> Otra de las moléculas estudiadas en cáncer vesical es la vimentina, que como ya se comentó es una proteína cuya sobreexpresión inmunohistoquímica a nivel citoplasmático se ha asociado a mayor agresividad tumoral.<sup>128</sup> También se ha demostrado que expresiones aberrantes de las proteínas TWIST, SNAIL, ZEB juegan un papel importante en la progresión tumoral en el cáncer de vejiga.<sup>126,128,130</sup> Este es un campo que centra gran interés y cuya investigación de manera continua ha supuesto la identificación de multitud de moléculas implicadas en el proceso TEM, sin embargo su análisis en mayor profundidad no es objeto de este trabajo.

Hasta la fecha, el único trabajo en el que se ha estudiado el TB como concepto anatomopatológico en el carcinoma vesical es el de Fukumoto et al.<sup>131</sup> Este trabajo publicado en septiembre de 2016 evalúa la existencia y el impacto pronóstico del TB en pacientes con carcinoma vesical urotelial no músculo-invasivo (pT1). El número de casos evaluados fue 121 y la metodología empleada consistió en evaluación del tejido mediante H&E, selección para el recuento de un único campo x200 (el de mayor densidad de “buds”) y estratificación según un “cut-off” de 10 “buds” (< 10 “buds”: negativo;  $\geq$  10 “buds”: positivo). El tiempo medio de seguimiento fue de 52 meses. En cuanto a los resultados, el TB fue positivo en 21 de 121 pacientes (17.4%). Se encontró asociación estadísticamente significativa entre TB y subestadio T1 con invasión extensa ( $p = 0.002$ ), arquitectura tumoral nodular ( $p = 0.23$ ) e invasión linfovascular ( $p = 0.001$ ). El porcentaje de pacientes con supervivencia libre de progresión (SLP) a los 5 años fue de 53.8% para los pacientes con TB frente al 88.4% de los pacientes sin TB ( $p = 0.001$ ). Y en el análisis multivariante de Cox, el TB se definió como factor asociado de manera independiente con progresión tumoral (HR = 4.90, IC95% 1.81-13.33;  $p = 0.002$ ).

## ***8. Paralelismo entre “tumor budding” y otros conceptos: patrón infiltrativo en vejiga y grados de Gleason del carcinoma de próstata***

Si bien es cierto que no existen publicaciones previas sobre el estudio del TB como tal en CVMI, sí que hemos encontrado una clara similitud entre TB y el denominado **patrón de crecimiento infiltrativo** descrito por Jiménez et al.<sup>132</sup> Este autor publicó en 2001 un artículo en el que distinguía tres patrones de crecimiento en el CVMI: patrón nodular, patrón trabecular y patrón infiltrativo (figura 7 y 8). De entre estos, llama la atención como el patrón infiltrativo, definido como un carcinoma “compuesto por estrechos cordones de células tumorales o células aisladas”, guarda una clara semejanza con la definición de TB. Y es que este autor encontró asociación entre la presencia de patrón infiltrativo y la supervivencia, de modo que la supervivencia media de los casos con patrón infiltrativo era de 29 meses frente a los 85 meses de los que presentaban un patrón nodular o trabecular ( $p = 0.06$ ). Poco después, Krüger et al.<sup>133</sup> también evaluaron la presencia de los patrones propuestos por Jiménez et al.<sup>132</sup> en pacientes con CVMI. En este trabajo objetivaron que presentar un patrón infiltrativo

suponía un factor predictor independiente de supervivencia (RR (IC 95%): 2.16 (1.08-4.31);  $p = 0.029$ )). Posteriormente, Langner et al.<sup>134</sup> evaluaron los mismos patrones pero en carcinoma urotelial de tracto urinario superior, encontrando una supervivencia libre de metástasis progresivamente reducida en función del patrón predominante (nodular > trabecular > infiltrativo). Además, el patrón infiltrativo también demostró significación estadística en el análisis multivariante (RR (IC 95%): 3.88 (1.87-8.05);  $p < 0.001$ )).

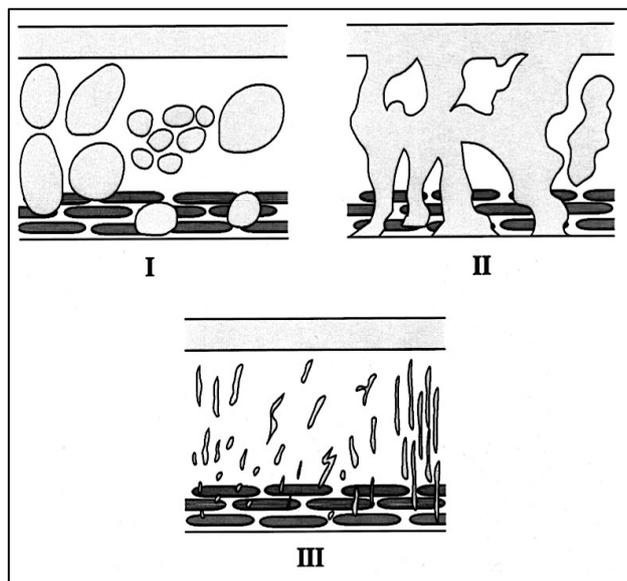


FIGURA 7. Representación de los tres patrones de crecimiento propuestos por Jimenez et al.<sup>132</sup> Patrón nodular o tipo I: compuesto mayoritariamente por nidos de células tumorales bien delineados. Patrón trabecular o tipo II: compuesto por células tumorales dispuestas en bandas interconectadas entre sí. Patrón infiltrativo o tipo III: compuesto por estrechos cordones de células tumorales o células aisladas. *Reproducido de Jimenez et al.<sup>132</sup>, con permiso.*

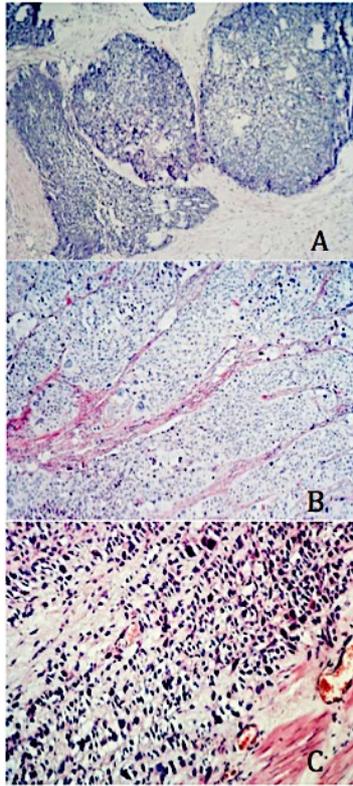


FIGURA 8: A) Patrón nodular. B) Patrón trabecular. C) Patrón infiltrativo. *Reproducido de Bircan et al.<sup>135</sup>, con permiso.*

Sin embargo, a pesar del paralelismo entre ambos conceptos, el TB supone una condición más compleja y elaborada, llevando implícita una metodología de evaluación (nidos celulares de hasta 4 células, recuento de “buds”, puntos de corte para su categorización...) que no está contemplada para la definición de los patrones de crecimiento, siendo por tanto éste, un concepto mucho más básico.

Si hablamos ahora de **cáncer de próstata**, algunos autores han descrito la evidencia del proceso TEM en este tipo tumoral,<sup>136,137</sup> y han visto su representación en los cambios morfológicos que se van desarrollando en la secuencia del sistema de gradación Gleason. Y

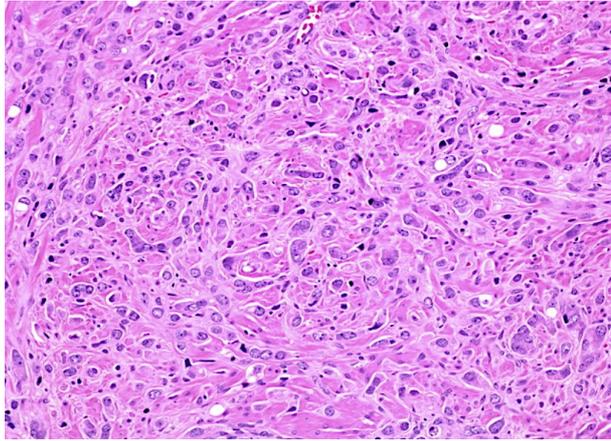


FIGURA 9. Carcinoma prostático formado por células tumorales individualizadas infiltrando el estroma (Gleason grado 5). *Reproducida de "WebPathology"<sup>138</sup>, con permiso.*

es que conforme va aumentando el grado de Gleason se va evidenciando una pérdida de la arquitectura glandular, incluyendo una pérdida de la membrana basal y de la polaridad celular, y las células tumorales se van distribuyendo progresivamente formando cordones, sábanas y finalmente dando lugar a células aisladas que van invadiendo el estroma. Por tanto, si nos encontramos en cáncer de próstata un patrón tumoral consistente en células tumorales aisladas o agrupación de pocas células diremos que se trata de un Gleason 5 (figura 9). De este modo, vemos un claro paralelismo entre el Gleason 5 de estas características y el TB. Aunque el TB como tal todavía no ha sido evaluado en próstata.

## ***9. Carcinoma vesical músculo-invasivo***

El cáncer de vejiga supone el **undécimo** carcinoma en frecuencia a nivel mundial, es el **segundo** más frecuente del tracto urinario tras el carcinoma de próstata y es causante de 150.000 muertes al año.<sup>139</sup> En Estados Unidos, se producen aproximadamente 79.000 nuevos casos y 17.000 muertes al año por este carcinoma.<sup>140</sup> En Europa se estiman 118.000 casos/año y 52.000 muertes/año.<sup>141</sup>

Se han identificado múltiples **factores de riesgo** para el carcinoma vesical. El más importante de ellos es el tabaquismo, de modo que la incidencia de cáncer de vejiga está directamente relacionada con la duración del tabaquismo y el número de cigarrillos diarios.<sup>142</sup> Otros factores de riesgo son la exposición ocupacional a ciertas sustancias químicas como las aminas aromáticas,<sup>143</sup> el antecedente de radioterapia pélvica<sup>144</sup> y la esquistosomiasis vesical o la cistitis crónica para el carcinoma escamoso.<sup>145</sup>

En el momento del diagnóstico, aproximadamente en el 75% de los casos el carcinoma de vejiga se encuentra confinado a mucosa (pTa

o carcinoma in situ [CIS]) o a submucosa (pT1), es decir son **no músculo-invasivo**. Sin embargo, en el 25% restante se trata de un carcinoma vesical **músculo-invasivo** (CVMI), de peor pronóstico y con diferente manejo terapéutico.<sup>146</sup> En Europa, en más del 90% de los casos, la **histología** predominante es transicional o urotelial. Otros tipos histológicos como el adenocarcinoma, el carcinoma epidermoide, la variante micropapilar o el carcinoma neuroendocrino de células pequeñas son mucho menos frecuentes en nuestro medio y de peor pronóstico que los transicionales.<sup>146</sup> Se ha documentado, con una incidencia en torno al 1%, la existencia de una variante del carcinoma urotelial conocida como “carcinoma linfoepitelioma-like”. Su nombre procede de su semejanza con el linfoepitelioma indiferenciado de nasofaringe. Esta variante se caracteriza por presentarse como un carcinoma infiltrante pero con un importante componente de infiltrado inflamatorio y una alta densidad linfocitaria (figura 10). Además, presenta un pronóstico más favorable que el carcinoma urotelial, con un potencial metastásico bajo,<sup>147</sup> especialmente en los “carcinomas linfoepiteliomas-like” puros.<sup>148,149</sup>

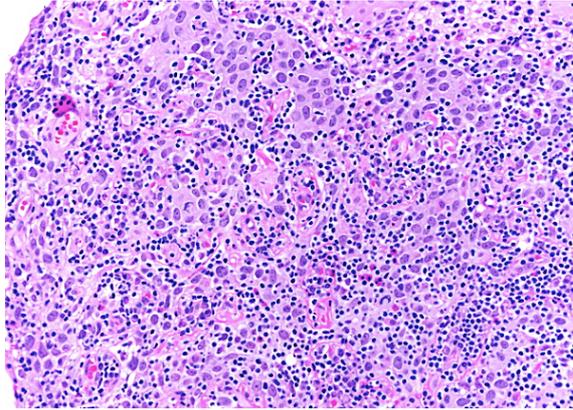


FIGURA 10. Carcinoma transicional con variante “linfoepitelioma-like”. Apréciase el abundante infiltrado inflamatorio en el seno del carcinoma vesical. *Reproducido de “WebPathology”<sup>150</sup>, con permiso.*

El **tratamiento** estándar para el carcinoma urotelial músculo-invasivo de vejiga ha consistido durante décadas en la realización de cistectomía radical y derivación urinaria. Sin embargo, se ha observado que con la realización únicamente de cistectomía radical la supervivencia de los pacientes a los 5 años es inferior al 50%.<sup>151-</sup>  
<sup>153</sup> Por ello, recientemente se ha incluido en las guías clínicas la administración de quimioterapia neoadyuvante seguida de cistectomía radical,<sup>146</sup> consiguiendo con ello una mejoría de la supervivencia a los 5 años del 5-8%.<sup>154,155</sup>

La cistectomía radical debe incluir siempre la realización de linfadenectomía de los ganglios linfáticos regionales, teniendo ésta

un papel fundamental tanto para una correcta estadificación como por su beneficio terapéutico.<sup>146</sup> Además, el número total de ganglios extirpados se considera factor pronóstico, por lo que es preferible la realización de una linfadenectomía extendida (hasta aorta) a limitada (iliaca externa, hipogástrica y obturatriz).<sup>156,157</sup>

Por otro lado, la quimioterapia adyuvante es especialmente útil en pacientes con enfermedad avanzada (pT3/4 y/o pN+) si no han recibido quimioterapia neoadyuvante.<sup>146</sup> En un estudio retrospectivo que incluyó 3974 pacientes tras cistectomía y linfadenectomía, la quimioterapia adyuvante mostró beneficio en la SG (HR: 0.75; IC95% 0.62-0.90,  $p < 0.0001$ ) en pacientes de alto riesgo (extensión tumoral extravesical y linfática).<sup>158</sup>

Hasta el 10-15% de los pacientes con CVMI ya presentan **metástasis a distancia** en el momento del diagnóstico.<sup>159</sup> En estos casos la supervivencia es muy limitada, generalmente inferior a seis meses, y el tratamiento principal es la quimioterapia. En estos casos, la cistectomía radical tiene un papel paliativo y está

especialmente indicado en pacientes con síntomas (dolor, hematuria persistente u obstrucción urinaria).<sup>146</sup>

En cuanto a la **supervivencia** del CVMI, en una serie de 888 pacientes, de manera global se objetivó una supervivencia libre de recidiva (SLR) a los 5 años del 58% y una SCE del 66%.<sup>160</sup> En otra serie de 1054 pacientes, la SLR y la SCE a 5 años fueron de 68% y 66% respectivamente.<sup>151</sup> En otra serie de 804 pacientes, la SG a 5 años fue del 53.2%; sin embargo en pacientes con tumor localizado fue del 72%, en pacientes con adenopatías positivas del 51% y en pacientes con metástasis a distancia del 10%.<sup>161</sup> Y es que, si hablamos de supervivencia es importante tener en cuenta el estadio, así la SLR a los 5 años en pacientes con adenopatías positivas tras cistectomía suele ser inferior al 34-43%.<sup>151,162,163</sup>

Durante el seguimiento tras la cistectomía, la recidiva locorregional tiene una incidencia del 5-15%. En el 36-64% de estos casos, se asocia a enfermedad metastásica y la expectativa de vida es corta (4-8 meses). Además, aproximadamente el 50% de los pacientes desarrollan metástasis a distancia en los primeros 2-3 años tras la

cistectomía, siendo los órganos afectados de manera más frecuente los ganglios linfáticos, el pulmón, el hígado y los huesos.<sup>164</sup>

En el CVMI se han descrito múltiples **factores de mal pronóstico**. Sin duda el más importante es el estadio tumoral o **estadio TNM** de la American Joint Committee on Cancer (AJCC).<sup>165</sup> Es el factor más relevante en la predicción de recidiva y supervivencia.<sup>166-169</sup> El riesgo de recidiva tras la cistectomía por CVMI se incrementa cuanto más avanzado es el estadio patológico, así se han publicado tasas del 11 al 21% en estadios órgano-confinados (pT1-pT2), del 32 a 62% con tumor extravesical (pT3-pT4) y del 52-70% en caso de enfermedad ganglionar (pN+).<sup>166</sup> Otro de los factores pronósticos más relevantes es la presencia de **invasión linfovascular**.<sup>169,170</sup> En una revisión de 12.527 cistectomías, el 34.6% presentaba invasión linfovascular, asociándose ésta a un estadio patológico y un grado tumoral más avanzado. También se encontró asociación estadísticamente significativa entre invasión linfovascular y tiempo libre de enfermedad (HR 1.61; IC95% 1.26-2.06), la SCE (HR 1.67; IC95% 1.38-2.01) y SG (HR 1.67; IC95% 1.38-2.01).<sup>171</sup> La **edad**<sup>172</sup> y la **comorbilidad**<sup>173,174</sup> del paciente son

también factores pronósticos con un papel fundamental en la supervivencia. El **sexo femenino** también se considera un factor de mal pronóstico, ya que aunque el cáncer de vejiga es más frecuente en hombres, en mujeres se suele presentar en estadios más avanzados y la supervivencia en ellas es menor.<sup>175</sup> Al igual que en la mayoría de tumores, los **márgenes positivos** tras la cirugía y el **tamaño tumoral** también son factores pronósticos. En un trabajo reciente se ha descrito que la recurrencia a 5 años en caso de márgenes negativos fue del 40% frente a 81% en el caso de márgenes positivos.<sup>176</sup> Por su parte, un diámetro tumoral superior a 3 cm se considera factor predictor independiente de MCE<sup>177</sup>. En cuanto a la localización tumoral, se considera que los tumores localizados en **trígono** son de peor pronóstico, con mayor probabilidad de afectación ganglionar y de supervivencia reducida.<sup>178</sup> Otros factores considerados como predictores son la asociación con un **CIS vesical**<sup>179</sup> o la presencia de **hidronefrosis** preoperatoria.<sup>180</sup>

Recientemente se ha puesto especial interés en el estudio de ciertos **marcadores moleculares** que han demostrado tener implicación

pronóstica. Algunos de los más estudiados son p53, p21 o Ki67.<sup>181-</sup>

<sup>183</sup> Sin embargo, la evaluación de estos marcadores todavía no se ha consolidado en la práctica habitual. Además, también se han definido dos subtipos de carcinoma vesical en función de su expresión molecular: subtipos “basal” y “luminal”. El subtipo “basal” es de características más agresivas (positividad para CK5/6 y CD44, sobreexpresión del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y ausencia de CK20), sin embargo es potencialmente sensible a quimioterapia. Por su parte, el subtipo “luminal” presenta sobreexpresión del receptor de factor de crecimiento fibroblástico (FGFR), negatividad para CK5/6 y CD44, positividad para CK20 y se caracteriza por su quimioresistencia<sup>184,185</sup> (figura 11).

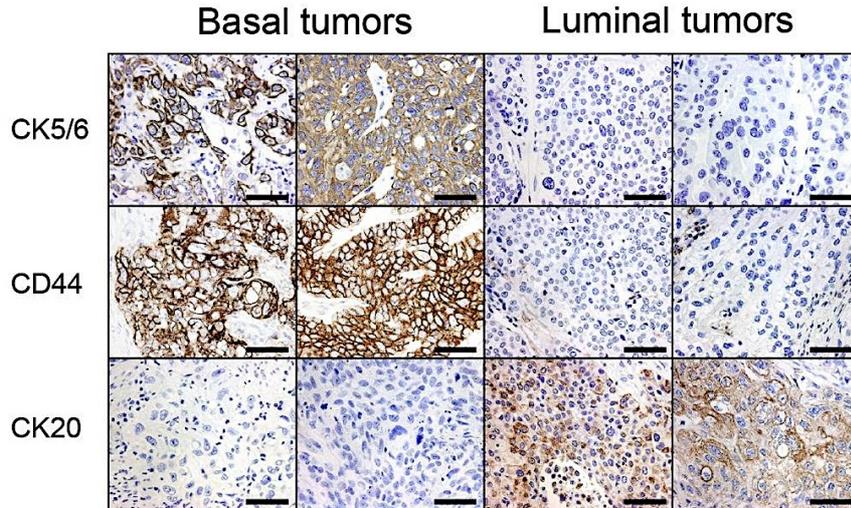


FIGURA 11. Análisis inmunohistoquímico (CK5/6, CD44 y CK20) de los subtipos basal y luminal. *Reproducido de Choi et al.<sup>185</sup>, con permiso de Elsevier.*

Con el objetivo de predecir el riesgo de recurrencia y mortalidad tras la cistectomía por tumor vesical, se han propuesto varios **nomogramas** como el que desarrolló el “Bladder Cancer Research Consortium” (BCRC) que incluye las variables estadio tumoral, presencia de invasión linfovascular, presencia de CIS y administración de quimioterapia/radioterapia;<sup>179</sup> o el que publicó el “International Bladder Cancer Nomogram Consortium” (IBCNC) y que incluye como factores predictores la edad, el sexo, el estadio tumoral, la histología, la afectación ganglionar y el tiempo entre diagnóstico y cirugía.<sup>186</sup>



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



## ***1. Hipótesis***

La hipótesis principal del trabajo consiste en que, dado que el “tumor budding” ha demostrado ser un factor predictor independiente de mal pronóstico en multitud de tumores (CCR, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de mama, etc.), este fenómeno histopatológico también podría tener valor pronóstico en el carcinoma vesical músculo-invasivo.

Las hipótesis secundarias serían las siguientes:

1. Que si efectivamente el “tumor budding” se comportase como factor predictor de mal pronóstico en el carcinoma vesical músculo-invasivo, es probable que se asociase a otros factores de mal pronóstico ya establecidos para el carcinoma vesical.
2. Que si el “tumor budding” demostrase tener un valor predictor y se asociase a otros factores de mal pronóstico en el carcinoma vesical músculo-invasivo, se podría establecer un modelo predictivo de probabilidad de mortalidad del paciente.

## **2. Objetivos**

1. Evaluar si la presencia (y densidad) de un componente tumoral indiferenciado (“tumor budding”) localizado en el seno de la pared vesical (muscular propia o grasa perivesical), se comporta como factor de mal pronóstico en el carcinoma vesical músculo-invasivo.
2. Definir el punto de corte con mayor sensibilidad y especificidad en la cuantificación del “tumor budding” con respecto a la mortalidad y que permita estratificar a los pacientes en “tumor budding” de bajo y alto grado.
3. Evaluar la posible asociación entre “tumor budding” y los principales factores predictores para el cáncer vesical infiltrante: edad, sexo, índice de Charlson, tamaño tumoral, estadio TNM, presencia de CIS, grado de diferenciación, invasión venosa, linfática y perineural, p53, índice proliferativo Ki67 y subtipo molecular.

4. Valorar la metodología más adecuada para el estudio del “tumor budding” en nuestros casos: la que aporte mayor fiabilidad y mejor aplicabilidad.

5. Establecer un modelo predictivo para mortalidad cáncer-específica en carcinoma vesical músculo-invasivo.



## MATERIAL Y MÉTODOS

---



## ***1. Diseño del estudio***

Se llevó a cabo un estudio de carácter retrospectivo, en el que se evaluaron los pacientes intervenidos de cistectomía radical tras ser diagnosticados de CVMI, entre Enero de 2004 y Diciembre de 2014 en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del hospital La Fe con N° de registro: 2016/0558.

Dada la supervivencia limitada de la patología objeto del trabajo, en el momento del inicio del estudio nos encontramos que un porcentaje elevado de los pacientes había fallecido. Por ello, basándonos en el artículo 26 del BOE núm. 290, del 2 de Diciembre de 2011, que regula la obtención y utilización de muestras biológicas de personas fallecidas, las muestras biológicas de nuestros casos fallecidos podían ser utilizadas para el proyecto al no haber dejado éstos constancia expresa de su oposición.

En cuanto a los pacientes que permanecían vivos, se contactó con

ellos y se les informó acerca de las características del estudio. Se les solicitó permiso para la utilización de sus muestras biológicas obtenidas durante los procedimientos quirúrgicos de su patología tumoral (resección transuretral [RTU] de vejiga y cistectomía) y almacenadas en bloques de parafina en el Servicio de Anatomía Patológica. Cada paciente recibió la hoja de información del estudio y firmó el consentimiento informado.

## ***2. Proceso de diagnóstico y tratamiento en el carcinoma vesical músculo-invasivo***

El motivo de consulta más habitual en el carcinoma vesical es la hematuria macroscópica. Así, en pacientes con un primer episodio de hematuria de etiología no filiada, y especialmente en fumadores, de manera rutinaria se lleva a cabo un **estudio diagnóstico** que se apoya principalmente en tres pruebas complementarias: una citología de orina, una ecografía vesicoprostática y renal y una cistoscopia. En ocasiones, cuando mediante la ecografía se objetiva una clara lesión tumoral en vejiga, la cistoscopia no se considera necesaria (figura 12).

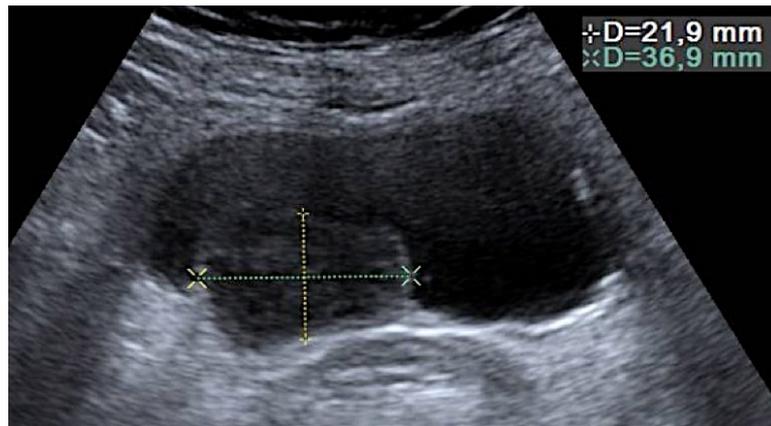


FIGURA 12. Ecografía vesical de uno de nuestros casos donde se objetiva lesión intravesical claramente sugestiva de tumor vesical.

Una vez diagnosticado el tumor vesical, se realiza una **RTU vesical** (figura 13), procedimiento endoscópico que nos permite en primer lugar caracterizar el tumor vesical (definir su histología, su nivel de infiltración –músculo-invasivo frente a no músculo-invasivo– y su grado de diferenciación), y en segundo lugar reseca de manera completa o incompleta el tumor, dependiendo de la extensión del mismo.

En el caso de que el informe anatomopatológico nos indique que nos encontramos ante un CVMI, el tratamiento “gold estándar” es la **cistectomía radical**. En nuestra serie de pacientes, el

procedimiento consistió en cistectomía radical vía abierta, asociada a linfadenectomía iliobturatriz bilateral y derivación urinaria tipo Bricker en la mayoría de los casos (figura 14).

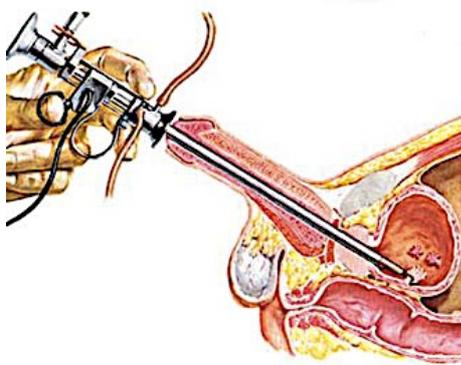


FIGURA 13: Resección transuretral de tumor vesical. *Reproducido de "Società italiana di urologia (SIU) website"<sup>187</sup>, con permiso.*

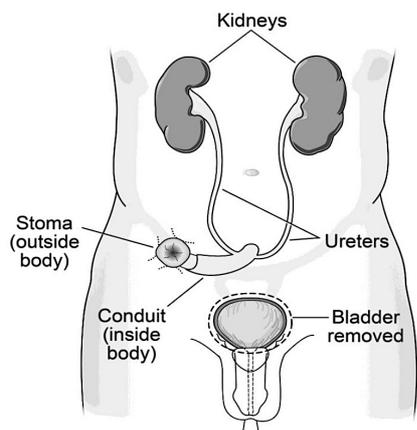


FIGURA 14: Derivación urinaria tipo Bricker, consistente en el empleo de un fragmento de asa ileal como reservorio urinario. Al extremo proximal del asa se anastomosan los uréteres y el extremo distal de la misma se aboca a la pared abdominal creando una ileostomía. *Reproducido de "Metrovan Urology website"<sup>188</sup>, con permiso.*

Previa a la cistectomía se realizó una tomografía computerizada (TC) toraco-abdomino-pélvica para llevar a cabo el **estudio de extensión**. La información aportada por el estudio

anatomopatológico de la pieza de cistectomía y de los ganglios linfáticos resecados, junto al estudio de extensión mediante el TC nos permitió establecer el estadio TNM en cada caso (figura 15). Así, en los casos con metástasis ya presente en el momento del diagnóstico, la realización de cistectomía tenía un papel básicamente paliativo.

<b>T – Tumor primario</b>	
Tx	No se puede evaluar el tumor primario
T0	Ausencia de datos de tumor primario
Ta	Carcinoma papilar no invasor
Tis	Carcinoma in situ: “tumor plano”
T1	El tumor invade el tejido conjuntivo subepitelial
T2	El tumor invade el músculo
	T2a El tumor invade el músculo superficial (mitad interna)
	T2b El tumor invade el músculo profundo (mitad externa)
T3	El tumor invade el tejido perivesical
	T3a Microscópicamente
	T3b Macroscópicamente (masa extravesical)
T4	El tumor invade cualquiera de las estructuras siguientes: próstata, útero, vagina, pared de la pelvis o pared abdominal
	T4a El tumor invade la próstata, el útero o la vagina
	T4b El tumor invade la pared de la pelvis o la pared abdominal
<b>N – Ganglios linfáticos</b>	
Nx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	Ausencia de metástasis ganglionares regionales
N1	Metástasis en un solo ganglio linfático en la pelvis verdadera (hipogástricos, obturadores, ilíacos externos o presacos)
N2	Metástasis en varios ganglios linfáticos en la pelvis verdadera (hipogástricos, obturadores, ilíacos externos o presacos)
N3	Metástasis en uno o varios ganglios linfáticos ilíacos comunes
<b>M – Metástasis a distancia</b>	
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
	M1a Ganglios linfáticos no regionales
	M1b Otras metástasis a distancia

FIGURA 15. Clasificación TNM de la UICC para cáncer de vejiga.<sup>189</sup>

### ***3. Seguimiento de los pacientes***

Tras la cistectomía, cada paciente se sometió a un seguimiento en consultas externas de Urología. El objetivo de este seguimiento era la detección de posibles complicaciones postoperatorias, principalmente relacionadas con la derivación urinaria, y la detección de posibles recurrencias locales o a distancia. El protocolo en nuestro servicio consiste en la realización de TC cada 4 meses durante el primer año de seguimiento, cada 6 meses durante el segundo y tercer año de seguimiento y posteriormente de manera anual.

Aquellos casos con riesgo elevado de recurrencia (márgenes positivos en la pieza de cistectomía, ganglios positivos, invasión linfovascular...) y aquellos con desarrollo de metástasis fueron remitidos a la unidad de Oncología para la administración de tratamiento adyuvante (quimioterapia en la mayoría de casos).

#### ***4. Selección de pacientes***

A través del programa informático “Orion Clinic” versión 9, se obtuvo un listado con los pacientes cistectomizados entre 2004 y 2014. De entre estos pacientes seleccionamos nuestros casos tras la aplicación de los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

##### *Criterios de inclusión*

- Pacientes diagnosticados de CVMI (pT2, pT3 o pT4).
- Intervenidos de cistectomía radical entre enero de 2004 y diciembre de 2014.
- Histología tumoral: carcinoma papilar o sólido de células transicionales (carcinoma urotelial).

##### *Criterios de exclusión*

- Muerte derivada de complicaciones postoperatorias (durante los 30 días siguientes a la cistectomía).
- Antecedente de patología oncológica que pudiera condicionar la supervivencia del paciente (incluido el tumor de tracto urinario)

superior).

-Tipo histológico tumoral de peor pronóstico: adenocarcinomas, carcinoma epidermoide, carcinoma micropapilar, carcinomas neuroendocrinos o carcinomas sarcomatoides.

-Carcinoma transicional variante “linfoepitelioma-like” de manera predominante, dado su mejor pronóstico que la variante transicional clásica (figura 16).

-Pacientes inmunodeprimidos, ya que en estos casos la patología tumoral evoluciona de manera más agresiva.

-Casos con material histológico no valorable por mala calidad o por falta de tejido tumoral suficiente.

-Pérdida de seguimiento del paciente.

-Causa de muerte dudosa o desconocida.

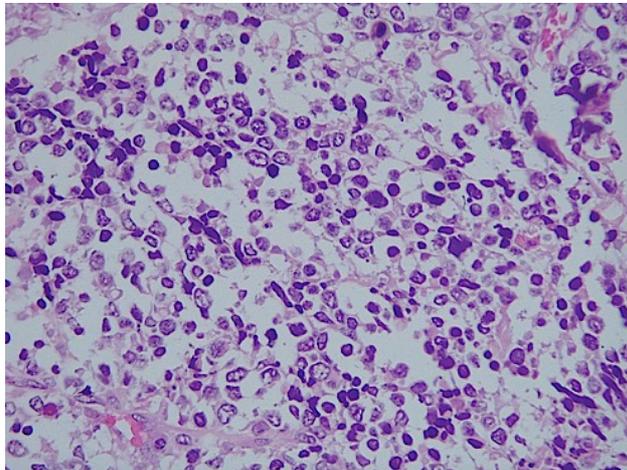


FIGURA 16. Caso de carcinoma transicional con variante “linfoepitelioma-like” de manera predominante, detectado y excluido durante nuestro estudio.

## 5. Variables evaluadas

En cada uno de los casos se recogieron las siguientes variables:

- *Variables relacionadas con el paciente*

-Edad

-Sexo

-Índice de Charlson, que valora la comorbilidad del paciente (figura 17)

-Estadificación TNM en el momento del diagnóstico

-Quimioterapia adyuvante

Comorbilidad presente	Puntos	Edad (años)
Infarto de miocardio	1	50-59 1
Insuficiencia cardíaca congestiva	1	60-69 2
Enfermedad vascular cerebral	1	70-79 3
Demencia	1	80-89 4
Enfermedad pulmonar crónica	1	90-99 5
Enfermedad del tejido conectivo	1	
Enfermedad ulcerosa	1	
Enfermedad hepática leve	1	
Diabetes (sin complicaciones)	1	Total de la puntuación:
Diabetes con daño a órgano diana	2	Comorbilidad + edad
Hemiplejía	2	
Enfermedad renal moderada o severa	2	
Tumor sólido (no metastásico)	2	
Leucemia	2	
Linfoma, mieloma múltiple	2	No comorbilidad: 0-1 puntos
Enfermedad hepática moderada o severa	3	Comorbilidad baja: 2 puntos
Tumor sólido metastásico	6	Comorbilidad alta: 3 puntos
Sida	6	

FIGURA 17. Índice de Charlson. Herramienta de evaluación de la comorbilidad del paciente. *Reproducido de Charlson et al.<sup>190</sup>*

- *Variables anatomopatológicas*

-Nivel de infiltración (pT) y grado de diferenciación tumoral (G) del primer tumor infiltrante (RTU).

-Nivel de infiltración (pT) y grado de diferenciación tumoral (G) en la pieza de cistectomía.

-CIS asociado (presente o ausente)

-Tamaño tumoral (cm.)

-Localización del tumor en vejiga (afectación trigonal o no)

-Recuento de TB según la técnica “10 CGA”

-Recuento de TB según la técnica “hot-spot”

-p53 (porcentaje de afectación y positividad/negatividad)

-Ki67 (porcentaje de afectación e índice alto/bajo)

-Presencia o ausencia de invasión venosa, linfática o perineural

-Subtipo molecular del tumor (basal o luminal)

- *Variables relacionadas con la evolución y supervivencia*

-Tiempo de seguimiento: comprendido desde el momento del diagnóstico del CVMI hasta la “última visita” (considerando ésta como el último registro de la situación clínica del paciente, ya sea en un ingreso hospitalario, una asistencia en urgencia o una valoración en consultas externas).

-Desarrollo de recidiva local o a distancia: objetivada por prueba de imagen.

-Tiempo de supervivencia global: desde el diagnóstico de CVMI hasta el fallecimiento o hasta la última visita en caso de no haber fallecido (casos censurados).

-Tiempo libre de progresión tumoral: desde el diagnóstico de CVMI hasta el momento de recidiva local o a distancia en los casos NOMO al diagnóstico. En los casos con afectación ganglionar o metástasis al diagnóstico, hasta el momento de detección mediante prueba de

imagen de un aumento en el volumen o número de ganglios afectos,  
o de un aumento del número de metástasis a distancia.

-Estado última visita:

- *éxitus tumoral*: éxitus en paciente con estadio tumoral terminal con metástasis objetivadas por prueba de imagen o a consecuencia de complicaciones derivadas de una gran progresión local, por ejemplo, obstrucción intestinal por atrapamiento tumoral vesical.
- *éxitus por otro motivo*: por causa distinta a la tumoral.
- *no éxitus pero progresión tumoral*
- *vivo y libre de enfermedad*
- *vivo y enfermedad estable*

## **6. Metodología**

### 6.1. Selección de la laminilla más representativa

Para cada paciente que cumplía los criterios de inclusión y ningún criterio de exclusión se recuperó tanto el tejido tumoral obtenido mediante la RTU como el tejido procedente de la pieza de cistectomía, almacenado en el Servicio de Anatomía Patológica del

hospital La Fe (muestras fijadas en formalina tamponada al 10% e incluidas en parafina). Para el estudio histológico se empleó un microscopio óptico Leica® DM2000 LED, con proyección de imágenes en monitor mediante una cámara ICC50W.

En cada caso se revisaron todas las laminillas del tumor en la RTU y en la pieza de cistectomía, teñidas con H&E. En primer lugar se visualizaron a bajo aumento (x4-x10), y tras ello, a mayor aumento (x40) para confirmación de las características histológicas del tumor. El objetivo fue seleccionar de entre todas las laminillas de cada caso, la que presentaba de manera subjetiva una mayor densidad de TB. De este modo, para cada caso escogimos la laminilla más representativa y sobre ésta aplicamos las diferentes técnicas de inmunohistoquímica.

## 6.2. Aplicación de técnicas de inmunohistoquímica

### 6.2.1. Principios básicos

La inmunohistoquímica tiene por objeto la identificación de componentes biomoleculares específicos (en general proteicos)

presentes en los tejidos mediante reacciones antígeno-anticuerpo “in situ”. En ella se establece la unión específica del **antígeno**, o mejor, el determinante antigénico de la molécula a identificar y el anticuerpo correspondiente. El antígeno puede ser cualquier molécula capaz de inducir una respuesta inmunogénica. El otro componente de la reacción es el **anticuerpo**. Según la manera de obtenerlos distinguimos entre anticuerpos policlonales y monoclonales. Los anticuerpos policlonales se obtienen por inmunización de un animal con el antígeno purificado. El resultado es una mezcla de anticuerpos específicos contra diferentes determinantes antigénicos de la molécula. Este tipo de sueros exige complicadas técnicas de purificación para evitar la presencia de anticuerpos naturales inespecíficos contaminantes y las reacciones cruzadas. Por su parte, los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de células de mieloma de ratón fusionadas con células B humanas o de un animal, productoras del anticuerpo deseado (hibridomas). De esta manera se consigue una población celular de crecimiento indefinido productora de un solo anticuerpo específico. De forma general, son los anticuerpos más recomendables y con los que se obtienen mejores resultados.

La unión antígeno-anticuerpo se hace visible solo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración (**cromógeno**). En las técnicas de inmunofluorescencia se utilizan como marcadores compuestos de fluoresceína que bajo luz ultravioleta emiten luz de longitud de onda visible. En las técnicas de inmunoperoxidasa se utilizan marcadores enzimáticos capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro. Las enzimas más frecuentemente utilizadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina, y los sustratos más comunes son la diaminobenzidina (color marrón), el aminoetilcarbazol (color rojo) y el nitroazul de tetrazolio (color azul). Estos marcadores pueden conjugarse directamente al anticuerpo primario, o indirectamente mediante otros anticuerpos (secundarios).<sup>191</sup>

En nuestro trabajo utilizamos anticuerpos monoclonales y la técnica inmunoenzimática indirecta.

### 6.2.2. Anticuerpos monoclonales

En el proceso de obtención de estos anticuerpos se selecciona un solo clon de linfocitos B que produce un único tipo de anticuerpo

frente al antígeno con el que se ha inmunizado al animal de experimentación. Esto hace que el método sea mucho más específico y por lo tanto nos permite reducir la posibilidad de falsos positivos.

Los anticuerpos monoclonales empleados en nuestro estudio fueron:

-AE1/AE3: es una mezcla de dos clones de anticuerpos monoclonales **anti-citoqueratina**. Las citoqueratinas son una familia de proteínas que forman el citoesqueleto de las células epiteliales. Así, el patrón de tinción celular para AE1/AE3 es citoplasmático. El clon AE1 detecta las citoqueratinas 10, 14, 15, 16 y 19. El clon AE3 detecta las citoqueratinas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.<sup>192</sup>

-CD34 (clon QBEnd10): Anticuerpo que se une a la proteína CD34, que es miembro de una familia de proteínas sialomucinas transmembrana que muestran expresión en tejidos hematopoyético temprano y tejido vascular asociado. Por tanto es un marcador de membrana de células endoteliales en pequeños **vasos sanguíneos**.<sup>193-195</sup>

-D2.40: Reconoce a la proteína “podoplanina” (marcador citoplasmático), que se expresa selectivamente en el **endotelio linfático**, así como en linfangiomas, sarcomas de Kaposi y en un subconjunto de angiosarcomas con probable diferenciación linfática.<sup>196,197</sup>

-P53 (clon DO-7): El anticuerpo monoclonal DO-7 reconoce p53, un gen supresor de tumor que codifica la proteína p53 (marcador nuclear). Esta proteína desarrolla un papel central en la **regulación del ciclo celular** parando la célula en fase G1 del ciclo, permitiendo la reparación del ADN cuando es posible o conduciendo a la célula a la apoptosis si el daño es irreparable. La sobreexpresión de p53 es mayor en tumores más indiferenciados y es un factor pronóstico negativo e independiente en el progreso de la patología neoplásica urotelial.<sup>180,181,198</sup>

-Ki67 (MIB-1): Reconoce a la proteína Ki-67, que es un marcador de **proliferación celular** (marcador nuclear). Ki67 está presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y

mitosis), pero está ausente en células en reposo o inactivas (G0). Se ha definido como factor tumoral de mal pronóstico.<sup>182,199</sup>

-CK 20 (clon Ks20.8): Anticuerpo frente a CK20, la cuál pertenece al subgrupo epitelial de filamentos intermedios asociados al citoesqueleto (marcador citoplasmático) y tiene una expresión restringida en el tracto gastrointestinal y urinario. Su expresión se ha relacionado con el subtipo molecular **luminal** en el carcinoma vesical.<sup>183,184</sup>

-CK 5/6 (clon D5/16BA): Se asocia a la CK 5/6 (marcador citoplasmático), la cuál se ha relacionado con los carcinomas de tipo escamoso y con el subtipo molecular **basal** en el carcinoma vesical.<sup>183,184,200</sup>

-CD44 (clon DF1485): Anticuerpo frente a CD44, que abarca una familia de glicoproteínas transmembrana (marcador de membrana). CD44 se ha implicado en la adhesión célula-célula y las interacciones del citoesqueleto. Se considera marcador de agresividad tumoral en cáncer de mama, gástrico, de colon y

urotelial. Así, se ha asociado al subtipo molecular **basal** en el carcinoma vesical.<sup>183,184</sup>

### 6.2.3. Recuperación antigénica, técnica inmunoenzimática indirecta y sistema de visualización

Generalmente los tejidos se fijan en formalina y se embeben en parafina. Esto provoca la alteración de la estructura tridimensional de las proteínas. Así, muchos antígenos pierden su reactividad inmunológica tras el procesamiento de rutina. Para poder determinar estos antígenos ha sido necesario desarrollar técnicas tales como tratamiento proteolítico y pretratamiento con calor o presión. La fijación con formaldehído forma enlaces cruzados estables entre las proteínas, mientras que la parafina altera su forma. Mediante las técnicas de **desenmascaramiento o recuperación antigénica** se busca revertir este proceso. Es importante el buffer utilizado en la recuperación antigénica para obtener buenos resultados. El más común es el buffer citrato con pH 6.0. Sin embargo muchos antígenos "prefieren" un pH más alcalino. En nuestro caso, la recuperación antigénica se llevó a cabo con tampón citrato a pH alto.

Tras esta recuperación antigénica, nosotros aplicamos una **técnica inmunoenzimática indirecta**. Esta se basa en hallar en la preparación una molécula específica, con una distribución y cantidad que desconocemos, para lo cual hibridamos un anticuerpo primario, y sobre éste, un anticuerpo secundario “anti-anticuerpo primario” que se une por toda la superficie que este ofrece. Este segundo anticuerpo es el que va unido, en nuestro caso, a la enzima peroxidasa, la cual reacciona con el sustrato cromógeno que añadimos a continuación obteniendo como producto de la reacción un precipitado insoluble y coloreado, permitiéndonos localizar la reacción y por lo tanto, la molécula que buscamos. La señal resulta amplificada, ya que hay mayor cantidad de peroxidasa que de anticuerpo secundario, y mayor cantidad de éste que de anticuerpo primario. Por éste motivo los métodos indirectos son mucho más sensibles.

Para poder **visualizar la reacción antígeno-anticuerpo**, en nuestro caso empleamos el “sistema *EnVision FLEX*” para inmunohistoquímica Dako®. Este se basa en el empleo de un cromógeno (*EnVisio FLEX DAB+ Chromogen*) sobre el que actúa

la enzima peroxidasa, dando lugar a un producto final de coloración marrón en el lugar del antígeno diana.

#### 6.2.4. Protocolo de inmunohistoquímica aplicado

##### 1. Toma de muestras

Para las técnicas de inmunohistoquímica realizamos cortes histológicos de 3 micras de grosor y utilizamos portaobjetos especiales para dichas técnicas.

Los cortes dispuestos sobre los portaobjetos se pusieron en estufa a 37°C durante toda la noche.

##### 2. Desenmascaramiento antigénico

Los anticuerpos CK AE1/3, CD34, D2.40, p53, Ki67, CK20 y CK5/6 se pusieron en el sistema automatizado PT Link con *Target Retrieval Solution High pH (50x)* durante 20 minutos a 95°C, así de forma automática se llevó a cabo la desparafinación, hidratación y

recuperación antigénica de los tejidos. Una vez terminado el ciclo, las preparaciones recuperadas en el PT Link se lavaron con tampón comercial *Wash Buffer (20x)*, y a continuación se pusieron en el Autoestainer Link 48 para realizar la incubación de anticuerpos.

Con el anticuerpo CD44, la recuperación antigénica se realizó en el Omnis de Dako® (sistema cerrado para la recuperación antigénica y la incubación del anticuerpo de forma automática) usando *Target Retrieval Solution High pH (50x)* durante 20 minutos a 97°C.

### 3. Protocolo para CK AE1/3, CD34, D2.40, p53, Ki67, CK20 y CK5/6

Para esta técnica utilizamos el kit *EnVision FLEX* de Dako®. Estos anticuerpos de Dako® vienen prediluidos de forma comercial, listos para su uso.

Los pasos de este protocolo fueron:

- Bloqueo de la peroxidasa endógena, incubando durante 5 minutos (*EnVision Flex Peroxidase-blocking Reagent*)

- Lavado con tampón PBS (*EnVision Flex Wash Buffer 20x*)

- Incubación del anticuerpo primario (20 minutos)
- Lavado con tampón PBS
- EnVision Flex/HRP* 20 minutos
- Lavado con tampón PBS
- Lavado con tampón PBS
- EnVision Flex Substrate Working Solution* (Substrate buffer con DAB+ Chromogen) 10 minutos
- Lavado con tampón PBS
- EnVision Flex Hematoxilin* 10 minutos.
- Lavado con tampón PBS

#### 4. Protocolo para CD44

El anticuerpo CD44 de Dako<sup>®</sup> viene concentrado. Usamos el diluyente comercial de Dako<sup>®</sup> *EnVision Flex Antibody Diluent* para conseguir una concentración de 1/50 de este anticuerpo, previa a su incubación en el Omnis.

Los pasos de este protocolo fueron:

- Desparafinado con *Clearify (histological Clearing Agent)* a 25°C, durante 10 segundos

- Lavado con agua 5 segundos
- Recuperación antigénica (pH High 20 minutos a 97°C)
- Lavado con tampón *Wash buffer* 2.40 minutos, 2 ciclos
- EnVision Flex Peroxidase-blocking Reagent* 3 minutos
- Lavado con tampón *Wash buffer* 2 minutos, 2 ciclos
- Incubación anticuerpo primario 20 minutos
- Lavado con tampón *Wash buffer* 2 minutos, 2 ciclos
- Lavado con agua 31 segundos
- Lavado con tampón *Wash buffer* 2 minutos, 2 ciclos
- EnVision Flex Substrate Working Solution* (Substrate buffer con DAB+ Chromogen) 5 minutos
- Lavado con tampón *Wash buffer* 2 minutos, 2 ciclos
- Lavado con agua 31 segundos
- Lavado con tampón *Wash buffer* 2 minutos, 2 ciclos
- EnVision Flex Hematoxilin* 3 minutos
- Lavado con tampón *Wash buffer* 2 minutos, 2 ciclos

## 5. Deshidratación y montaje

Una vez terminada la técnica de inmunohistoquímica, todos los portaobjetos pasaron el proceso de deshidratación. Éste se realizó

pasando los portaobjetos por alcoholes de forma gradual: 1 paso por alcohol de 96 grados, 3 pasos por alcoholes de 100 grados y 3 pasos por xiloles, durante 5 minutos cada uno de ellos.

El montaje se realizó con Dako® *Touene-Free Mounting Medium* y cubriendo con cubreobjetos para su observación al microscopio.

Los datos relativos al procedimiento inmunohistoquímico aplicado en nuestro caso se recogen en la tabla 1.

Anticuerpo	Clon	Casa comercial	Dilución	Pretratamiento	Recuperación antigénica	Sistema de visualización
CK AE1/AE3	AE1/AE3	DAKO	READY-TO-USE	NO	TAMPÓN CITRATO PH ALTO	ENVISION FLEX PARA AUTOESTAIMER LINK 48
CD34	QBEnd10	DAKO	READY-TO-USE	NO	TAMPÓN CITRATO PH ALTO	ENVISION FLEX PARA AUTOESTAIMER LINK 48
D2.40	D2.40	DAKO	READY-TO-USE	NO	TAMPÓN CITRATO PH ALTO	ENVISION FLEX PARA AUTOESTAIMER LINK 48
P53	DO-7	DAKO	READY-TO-USE	NO	TAMPÓN CITRATO PH ALTO	ENVISION FLEX PARA AUTOESTAIMER LINK 48
Ki67	MIB-1	DAKO	READY-TO-USE	NO	TAMPÓN CITRATO PH ALTO	ENVISION FLEX PARA AUTOESTAIMER LINK 48
CK20	Ks20.8	DAKO	READY-TO-USE	NO	TAMPÓN CITRATO PH ALTO	ENVISION FLEX PARA AUTOESTAIMER LINK 48
CK5/6	D5/16BA	DAKO	READY-TO-USE	NO	TAMPÓN CITRATO PH ALTO	ENVISION FLEX PARA AUTOESTAIMER LINK 48
CD44	DF1485	DAKO	1/50	NO	TAMPÓN CITRATO PH ALTO	ENVISION FLEX PARA OMNIS

TABLA 1. Datos relativos al procedimiento inmunohistoquímico aplicado en nuestro estudio.

## ***7. Evaluación del “tumor budding”***

Para llevar a cabo la evaluación del TB se empleó la técnica de inmunohistoquímica **CK AE1/3**, para facilitar así la identificación de los “buds” tumorales en el frente de invasión (figura 18 y 19). Cada caso fue evaluado de manera “ciega” (sin conocer la evolución del paciente) y por dos examinadores (Dr. Ramos -uropatólogo- y Dra. Lorenzo -uróloga-), de forma independiente y revisando de forma conjunta los casos discordantes.

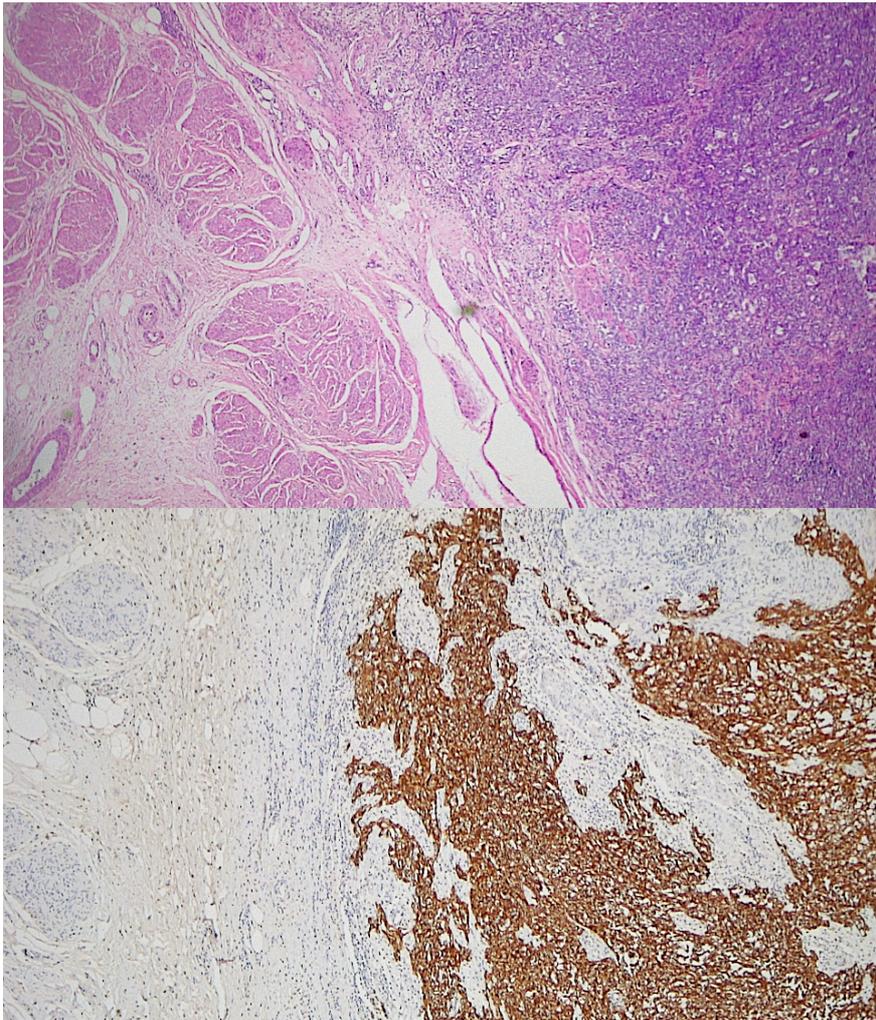


FIGURA 18. Frente tumoral invasor de CVMI de uno de nuestros casos. En la imagen superior con H&E (x4). En la imagen inferior mismo caso con CK AE1/3 (x4). Apréciase como la identificación del frente tumoral invasor se ve claramente facilitada por la CK AE1/3.

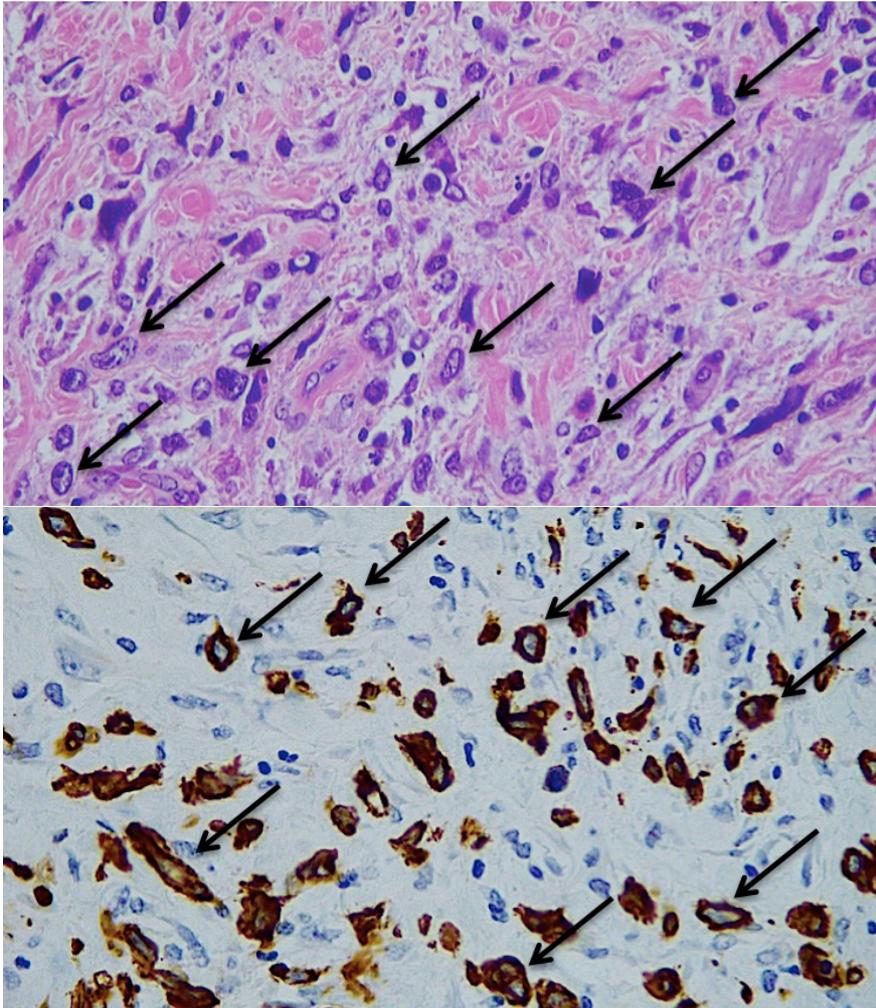


FIGURA 19. Zona de frente tumoral invasor a gran aumento (x40) en uno de nuestros casos de CMVI, con H&E (arriba) y con CK AE1/3 (abajo). Se objetiva la presencia de TB con elevada densidad. Apréciase como la identificación de “buds” (algunos de ellos marcados con flechas) es favorecida por la CK AE1/3.

Durante la evaluación del TB se consideró éste según la **definición**: células tumorales aisladas o en pequeños grupos de hasta 4 células ( $\leq 4$  células) tumorales. Además, se tuvo en cuenta tanto el TB localizado a nivel del estroma adyacente al frente tumoral invasor (TB peritumoral), como el TB localizado en el interior del propio tumor (TB intratumoral), pero siempre en la zona de infiltración tumoral (muscular propia infiltrada (pT2) o grasa peritumoral infiltrada (pT3)) (figura 20).

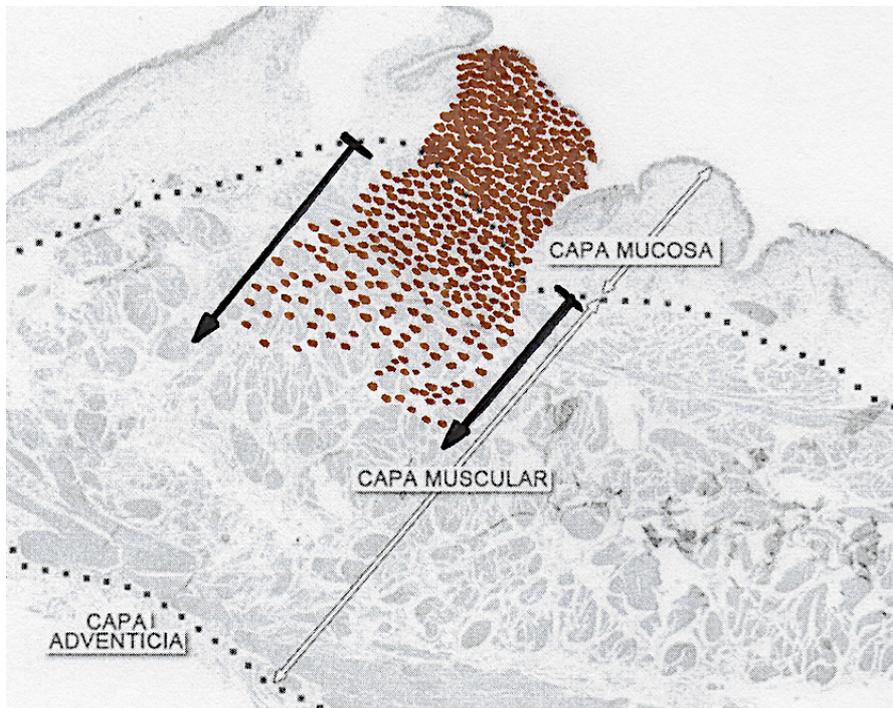


FIGURA 20. Esquema que representa la zona de estudio del TB. Para llevar a cabo el recuento de “buds” valoramos únicamente la zona del frente de invasión tumoral localizado dentro de la muscular propia y más allá de ésta.

Con respecto a la **cuantificación** del TB, se aplicaron dos metodologías cuantitativas: “10 CGA” y “1 CGA”. Con el método “10 CGA” se contabilizaron los “buds” presentes en los 10 CGA con mayor densidad de TB y se calculó la media del recuento total. Con el método “1 CGA” o “hot-spot” se contabilizaron los “buds” presentes en un único CGA, el de mayor densidad de TB. De este modo, para cada caso se obtuvieron dos recuentos o puntuaciones de TB, uno según la técnica “10 CGA” y otro según la técnica “hot-spot” (figura 21). En los casos en los que la evaluación de 10 CGA diferentes no fue factible por presentar un TB muy focalizado o por una escasa extensión tumoral (especialmente en aquellos en los que la laminilla seleccionada era la procedente de la muestra de RTU), se evaluó el mayor número posible de CGA, obteniendo la media del total de campos evaluados.

El proceso de cuantificación se llevó a cabo usando siempre el mismo microscopio óptico, a un aumento de x40 (lente de 22 mm y área de 0.55 mm<sup>2</sup>).

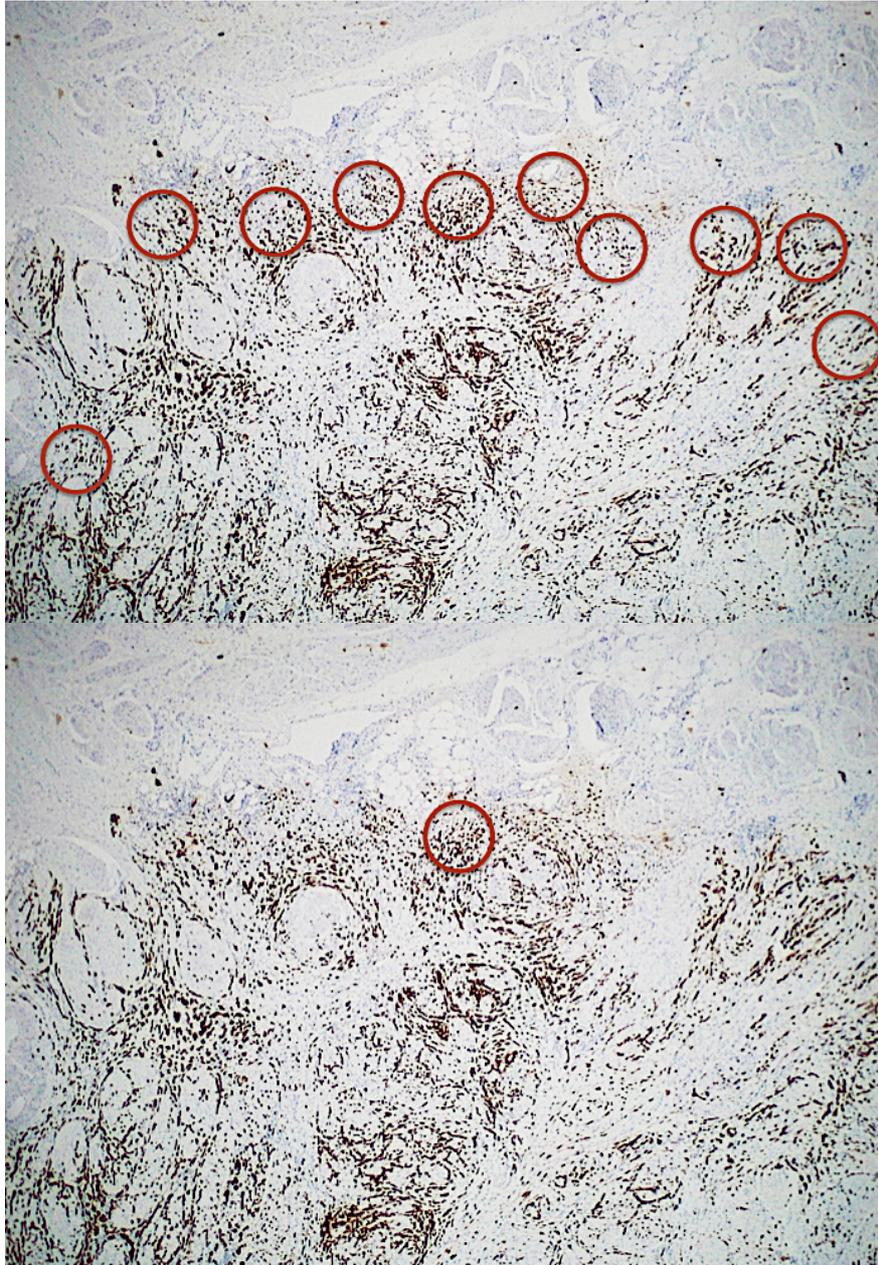


FIGURA 21. Metodologías de recuento empleadas en cada caso: en la imagen superior la media de los “buds” contabilizados en los 10 CGA con mayor densidad de TB (81.1 “buds”), y en la imagen inferior el recuento de “buds” presentes en el CGA de mayor densidad o “hot-spot” (96 “buds”).

## ***8. Evaluación de otros factores pronósticos anatomopatológicos***

En cada caso se evaluaron dos factores de mal pronóstico conocidos para carcinoma vesical como son: la expresión inmunohistoquímica anómala de **p53** y el índice proliferativo de **Ki67**. Tanto para p53 como para Ki67 se registró la densidad observada de manera subjetiva en forma de porcentaje. A continuación se consideró positividad para anomalía de p53 en aquellos casos con un porcentaje de afectación igual o superior a 20%. Para Ki67 consideramos la presencia de un índice proliferativo alto en aquellos casos con un porcentaje de afectación igual o superior a 10%.

Para cada caso también se estudió la presencia o ausencia de **invasión tumoral** de vasos sanguíneos, vasos linfáticos y perineural. Ello se evaluó mediante el estudio convencional con H&E y se confirmó luego mediante CD34 para invasión de vasos sanguíneos (células tumorales en el interior de un vaso con endotelio marcado por CD34) y D2.40 para invasión de vasos

linfáticos (células tumorales en el interior de un vaso con endotelio marcado por D2.40). En el caso de invasión perineural, se evaluó sólo con H&E. Además del empleo de técnicas de inmunohistoquímica, para cada caso se revisaron los informes anatomopatológicos preexistentes tanto de la RTU como de la pieza de cistectomía, con el fin de no pasar por alto la detección de una posible invasión venosa, linfática o perineural que no estuviera presente en nuestra lámina seleccionada.

En último lugar, también se estudió el **“subtipo molecular”** del tumor para cada caso de CVMI. De este modo, clasificamos como subtipo “luminal” aquellos casos que mostraron positividad para CK20 y negatividad para CK5/6 y CD44. Por el contrario, consideramos como subtipo “basal” aquellos que presentaron positividad para CK5/6 y CD44 y negatividad para CK20 .

## ***9. Análisis estadístico***

Para llevar a cabo el análisis estadístico se elaboró una base de datos que recogía todas las variables indicadas previamente, mediante el programa “SPSS” (versión 22.0.0.). Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa “STATA” (versión 13.1.). Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de significación  $p < 0.05$  y las estimaciones con un intervalo de confianza del 95%. Para poder dar respuesta a cada uno de los objetivos planteados, el análisis estadístico incluyó los siguientes apartados:

### *-Cálculo del tamaño muestral*

Empleando el programa estadístico Epidat versión 4.1., aceptando un margen de error del 5% en los resultados y apoyándonos en la bibliografía existente.

### *-Análisis descriptivo*

Las variables cuantitativas se definieron mediante la media o mediana, desviación típica y el valor máximo y mínimo (rango).

Por su parte, las variables cualitativas se definieron mediante frecuencias y porcentajes.

*-Análisis de supervivencia*

Para el cálculo de la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión de nuestra muestra se emplearon curvas de Kaplan-Meier. Además se compararon las curvas de supervivencia de los casos con TB de bajo y alto grado a través del test log-Rank.

*-Curva ROC*

Se desarrolló una curva ROC para establecer el punto de corte en el recuento de TB, con la mayor sensibilidad y especificidad para mortalidad, y de este modo poder estratificar cada caso como TB de bajo o alto grado.

*- Análisis bivariante*

Para valorar posibles asociaciones entre TB de bajo y alto grado y otros factores pronósticos de cáncer vesical se emplearon los test

estadísticos: Chi cuadrado ( $X^2$ ), test exacto de Fisher y U de Mann-Whitney.

#### *-Análisis multivariante*

Con el fin de determinar cuáles de las variables estudiadas actuaban como factores predictores independiente de mortalidad, se llevó a cabo un análisis multivariante (de supervivencia). A pesar de que la amplia mayoría de nuestros casos presentaron éxitos por causa tumoral, dos pacientes murieron por causas distintas a su patología oncológica. Por ello, empleamos el modelo de Fine-Gray para realizar el análisis multivariante, ya que este modelo tiene en cuenta los riesgos competitivos, es decir, el riesgo de mortalidad por otras causas diferentes a la oncológica. Para la elaboración del modelo de Fine-Gray se evaluó la variable TB tanto como variable cuantitativa continua como variable cualitativa dicotómica.

La comparación de modelos se basó en el índice de Akaike (indica la bondad del ajuste del modelo) y en el coeficiente pseudo $R^2$  (porcentaje en que el modelo explica la variable dependiente y cuya obtención se realiza mediante una aproximación logística). Para la

selección del mejor modelo, seleccionamos el que presentaba menor índice de Akaike y mayor pseudoR<sup>2</sup>.

*- Modelo predictivo para mortalidad*

Mediante la combinación de las variables definidas por el análisis multivariante como predictoras de mortalidad de manera independiente, se confeccionó una tabla de predicción con el objetivo de estimar el riesgo de mortalidad individualmente.



## RESULTADOS

---



## ***1. Tamaño muestral***

Durante el periodo evaluado se realizaron un total de 209 cistectomías. De éstos, pudimos incluir en el estudio 106 pacientes que cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión.

Quisimos evaluar si este tamaño muestral era suficiente para obtener resultados fiables. Para ello empleamos el programa “Epidat” (versión 4.1.) y nos apoyamos en el dato aportado por el único trabajo publicado hasta la fecha de TB en carcinoma vesical, donde la proporción observada de TB positivo en la muestra fue del 17%.<sup>131</sup> Así, tomando como base este estudio y aceptando un margen de error del 5% en nuestros resultados, el programa nos indicaba que la muestra requerida sería de 107 casos. Por tanto, dado que nuestra muestra es de 106 pacientes, la consideramos como suficientemente válida para obtener resultados fiables.

## 2. Análisis descriptivo

Los resultados observados para cada una de las variables estudiadas fueron:

- *Variables relacionadas con el paciente*

La edad media de nuestra muestra fue de  $64.6 \pm 10.6$  años (rango: 34-97 años). En cuanto al sexo, había 93 hombres (87.8%) y 13 mujeres (12.2%). La comorbilidad presentada por la muestra, evaluada a través del índice de Charlson (figura 17), se representa en la figura 22. Además, recibieron QT adyuvante 42 pacientes (40%).

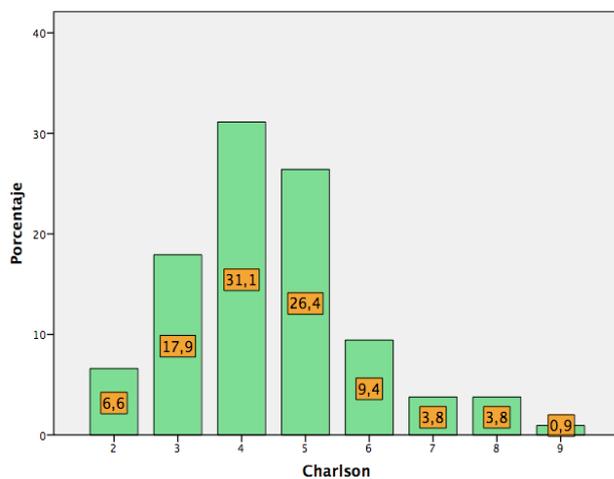


FIGURA 22. Puntuación de nuestra muestra según el índice de Charlson. Una parte mayoritaria de los pacientes presentaban una puntuación igual o superior a 3 (comorbilidad alta) al diagnóstico del CVM

La estadificación TNM presentada por nuestros pacientes al diagnóstico se representa en la figura 23.

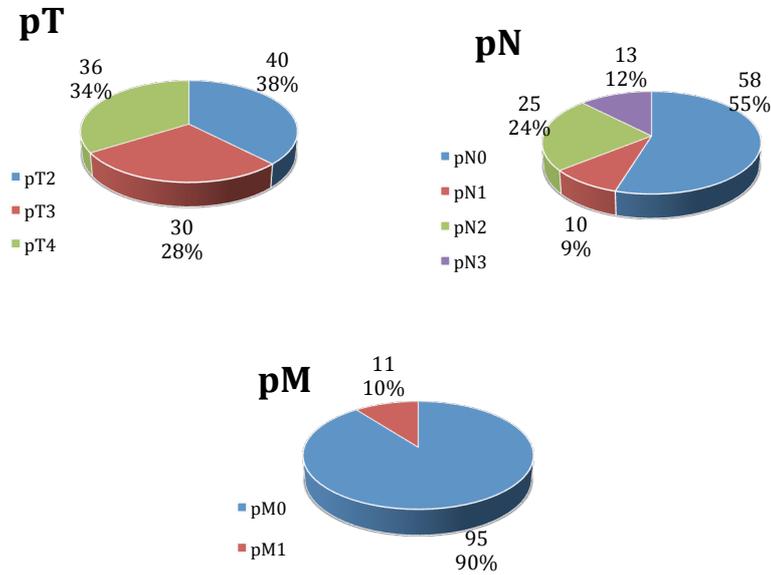


FIGURA 23. Estadio TNM presentado por nuestros pacientes en el momento del diagnóstico del CVMI.

- *Variables anatomopatológicas*

El grado de diferenciación tumoral fue G3 en 103 pacientes (97.2%). Presentaban CIS asociado 14 pacientes (13.2%). El

tamaño tumoral medio fue  $8 \pm 3$  cm, y había afectación trigonal en 50 casos (49%).

En cuanto al recuento de TB (en las figuras 24 y 25 vemos dos ejemplos con elevado y escaso recuento, respectivamente), la puntuación media observada según el método “10 CGA” fue de  $22.2 \pm 18.5$  “buds” (rango: 0-81.1 “buds”), y de  $32.3 \pm 25.9$  “buds” (rango: 0-150 “buds”) según el método “hot-spot”. Por tanto con el método “hot-spot” el recuento fue significativamente mayor ( $p < 0.001$ ).

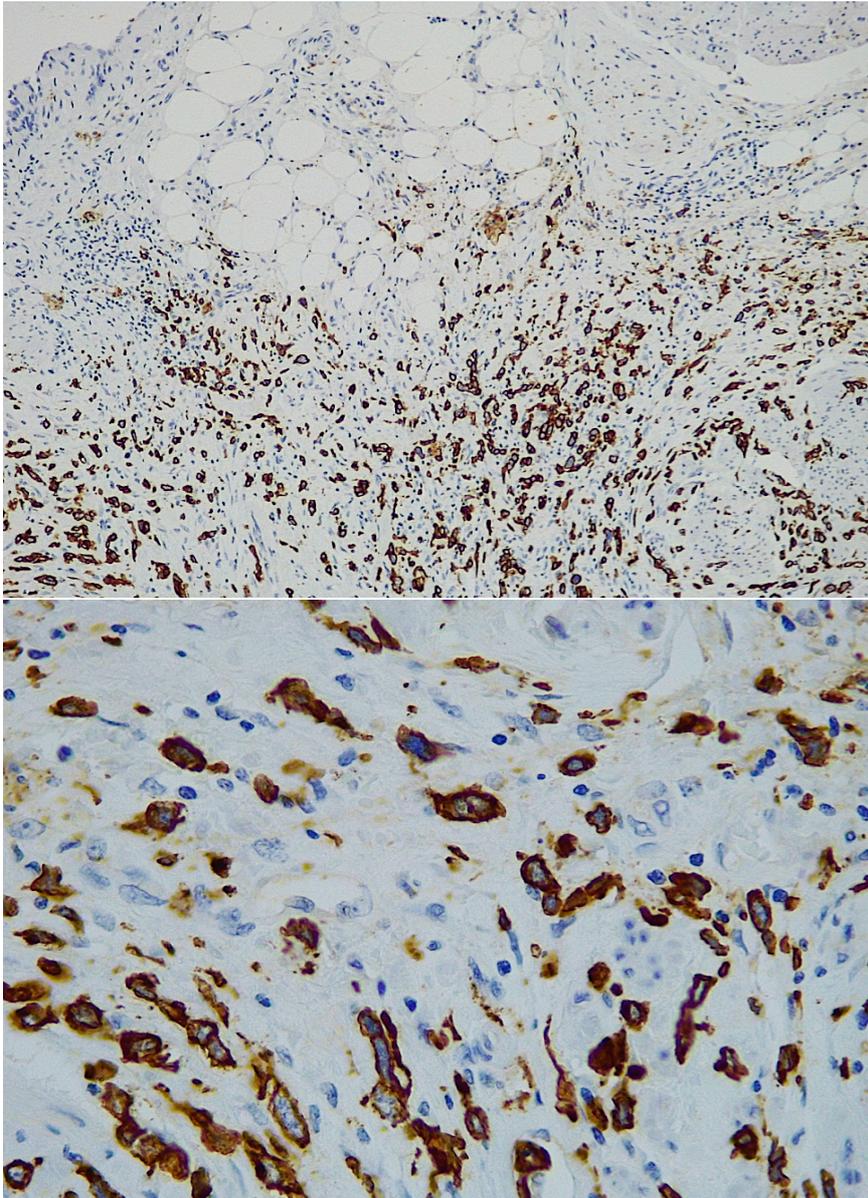


FIGURA 24. Frente tumoral invasor en uno de nuestros casos de CVMI con CK AE1/3. En la imagen superior (x10) se aprecia como el tumor llega a invadir la grasa perivesical. En la imagen inferior (x40) se objetiva la presencia de TB de gran densidad.

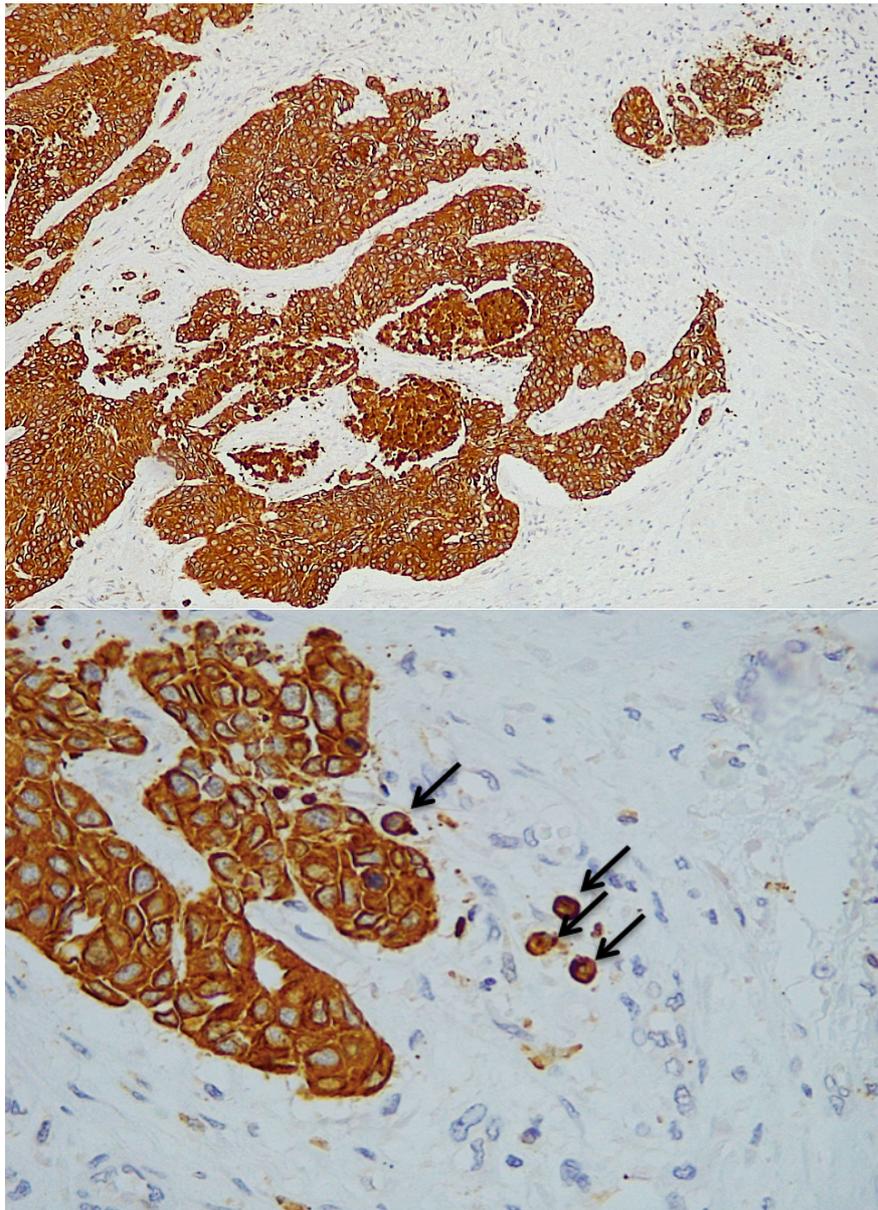


FIGURA 25. Frente tumoral invasor en uno de nuestros casos de CVMI con CK AE1/3, a bajo aumento (x10 en la imagen superior) y a gran aumento (x40 en la imagen inferior). Llama la atención la escasa densidad de TB en este caso, sobre todo en contraste al caso anterior de la figura 24.

Con respecto a p53, en 74 casos (69.8%) resultó positivo ( $\geq 20\%$ ), y en 32 casos (20.2%) resultó negativo ( $< 20\%$ ). Por su parte, respecto al índice proliferativo de Ki67, 100 casos (94.3%) presentaron un índice alto ( $\geq 10\%$ ), y 6 casos (5.7%) un índice bajo ( $< 10\%$ ) (figura 26).

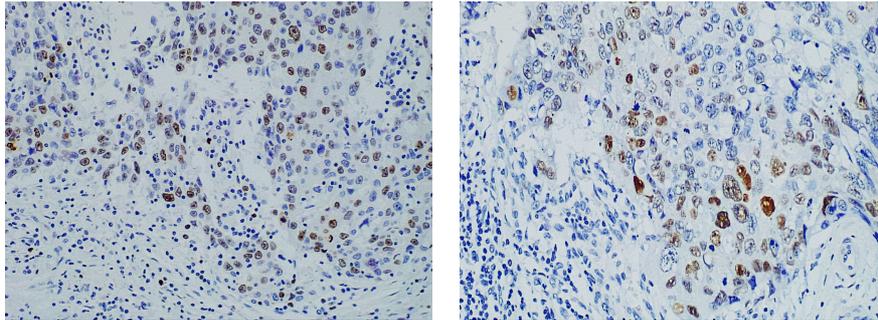


FIGURA 26. Expresión inmunohistoquímica de p53 (41%) (izquierda) y de Ki67 (56%) (derecha) a x40.

Al evaluar la invasión tumoral, encontramos que 58 pacientes (54.7%) no presentaban ninguno de los tres tipos de invasión estudiados. Del 45.3% restante, 29 pacientes presentaban invasión venosa (figura 27), 32 pacientes invasión linfática (figura 28) y 21 pacientes invasión perineural. En la figura 29 se representa la distribución de los tipos de invasión observados.

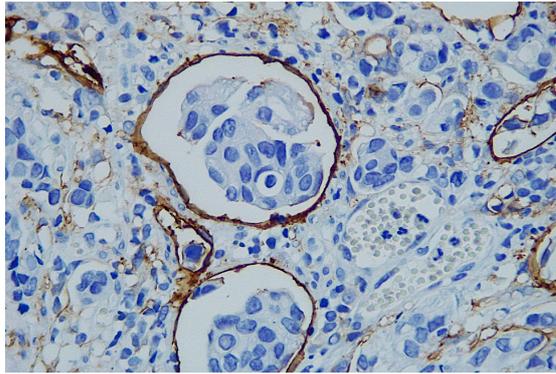


FIGURA 27. Presencia de células tumorales invadiendo vasos sanguíneos. Las células endoteliales del vaso sanguíneo son marcadas gracias a la unión QBEnd10-CD34.

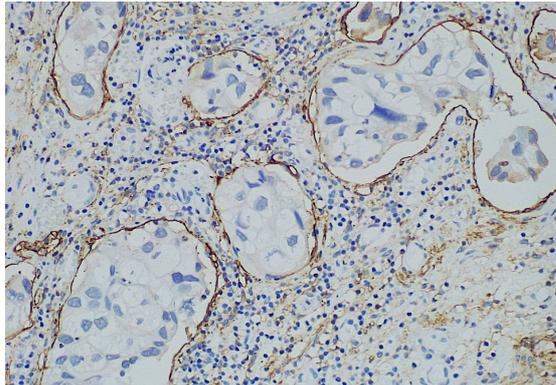


FIGURA 28. Presencia de células tumorales invadiendo vasos linfáticos. Las células endoteliales del vaso linfático son marcadas gracias a la unión D2.40-podoplanina.

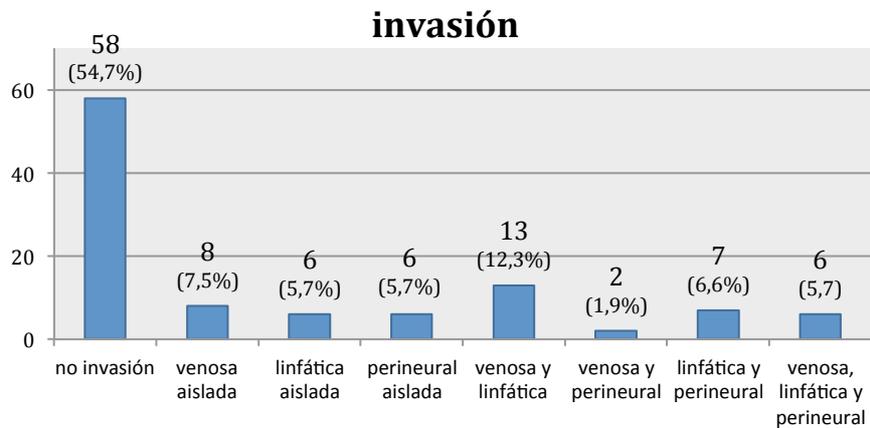


FIGURA 29. Distribución de los tipos de invasión observados. El 45.3% de los pacientes presentaron algún tipo de invasión al diagnóstico. Entre estos, el hallazgo más frecuente fue invasión conjunta venosa y linfática (12.3%), seguido de invasión venosa aislada (7.5%) y de invasión linfática y perineural (6.6%).

Por último, 59 pacientes (55.7%) mostraron un subtipo molecular “luminal” y 47 pacientes (44.3%) un subtipo molecular “basal” (figura 30).

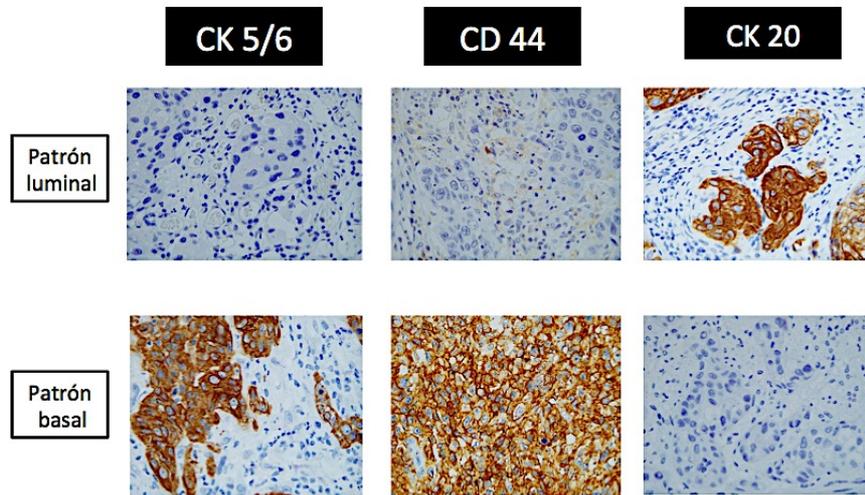


FIGURA 30. Subtipo molecular. Arriba se presenta uno de nuestros casos con subtipo o patrón “luminal” (negativo para CK 5/6 y CD44 y positivo para CK20) y abajo uno de nuestros casos con subtipo o patrón “basal” (positivo para CK5/6 y CD44 y negativo para CK20).

- *Variables relacionadas con la evolución y la supervivencia*

El tiempo medio de seguimiento de nuestra serie de pacientes fue  $47 \pm 46.5$  meses (rango: 0-170 meses). Durante este periodo de seguimiento, 66 pacientes (62.3%) desarrollaron recidiva (local o a

distancia) y 68 pacientes (64.2%) fallecieron, 66 de los cuáles a causa de su patología oncológica y 2 por otro motivo no relacionado con su tumor.

En cuanto a la SG (figura 31), la mediana de supervivencia fue 22 meses (IC95% 14.2-29.8), es decir, a los 22 meses de seguimiento el 50% de los pacientes ya había fallecido. Por su parte, para la SLP (figura 32) encontramos una mediana de supervivencia de 15 meses (IC95% 10.8-19.2), es decir, a los 15 meses de seguimiento el 50% de los pacientes ya había progresado.

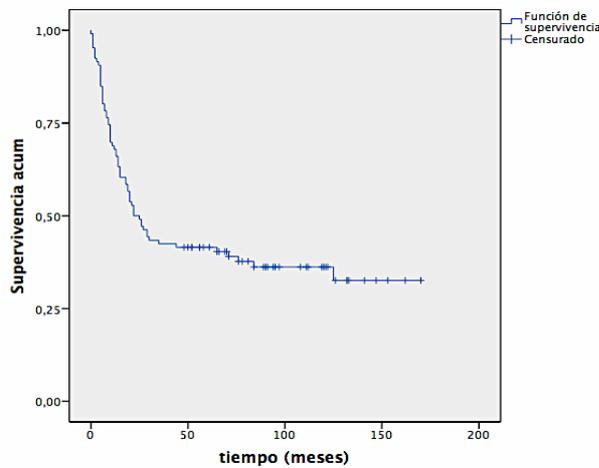


FIGURA 31. Curva Kaplan-Meier de supervivencia global.

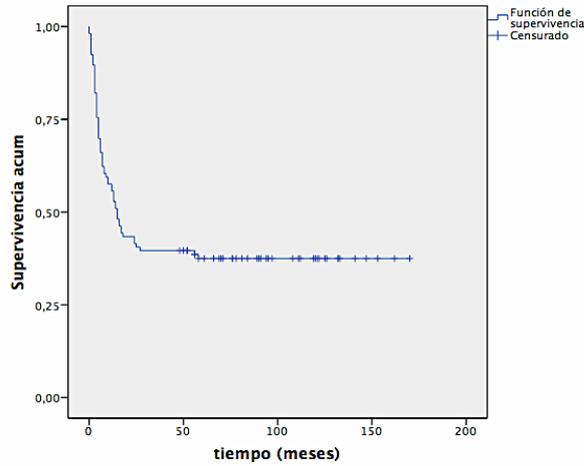


FIGURA 32. Curva Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión.

El estado en la última visita de nuestros pacientes fue el siguiente (figura 33):

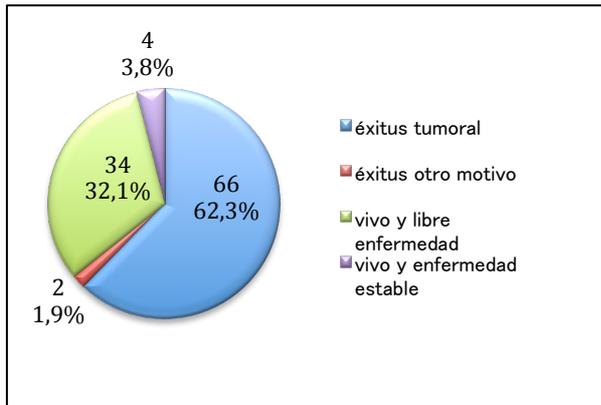


FIGURA 33. Estado de los pacientes en la última visita. Al final del seguimiento habían fallecido 68 pacientes (66 de ellos por causa tumoral) y el resto permanecía vivo con enfermedad estable (4 pacientes) o libre de enfermedad (34 pacientes).

### ***3. Punto de corte en la cuantificación del “tumor budding”.***

Con el fin de estratificar a los pacientes en TB de bajo y alto grado, se estableció un punto de corte en su recuento (el obtenido según el método “hot-spot”) mediante el empleo de una curva ROC (figura 34). Según esta, el punto de corte con la mayor sensibilidad (74.6%) y especificidad (64.1%) posible para mortalidad, con un área bajo la curva de 0.76, fue de 14 “buds”. Además, este valor poseía una razón de verosimilitud (“likelihood ratio”) positiva de 2.08 y una razón de verosimilitud negativa de 0.39.

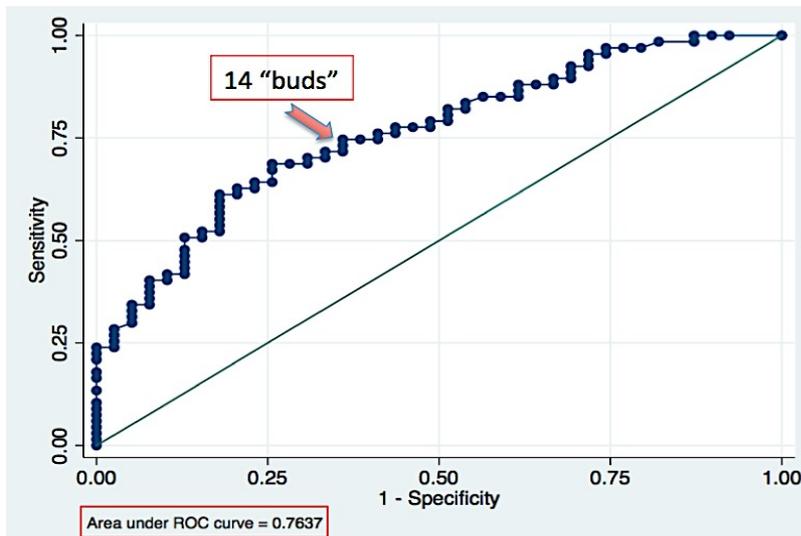


FIGURA 34. Curva ROC que estableció nuestro punto de corte en 14 “buds”.

Siguiendo este punto de corte de 14 “buds” clasificamos a los pacientes según su número de “buds”. De este modo, 28 pacientes (26.4%) presentaban un recuento  $\leq 14$  “buds” (TB de bajo grado) y 78 pacientes (73.6%) un recuento  $> 14$  “buds” (TB de alto grado). Evaluamos la diferencia en cuanto a supervivencia para los dos grupos (figura 35), observando que la mediana de supervivencia para el grupo de bajo grado era de 69.5 meses (rango: 3-162 meses), y de 18.5 meses (rango: 0-170 meses) para el grupo de alto grado, con una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.003$ ).

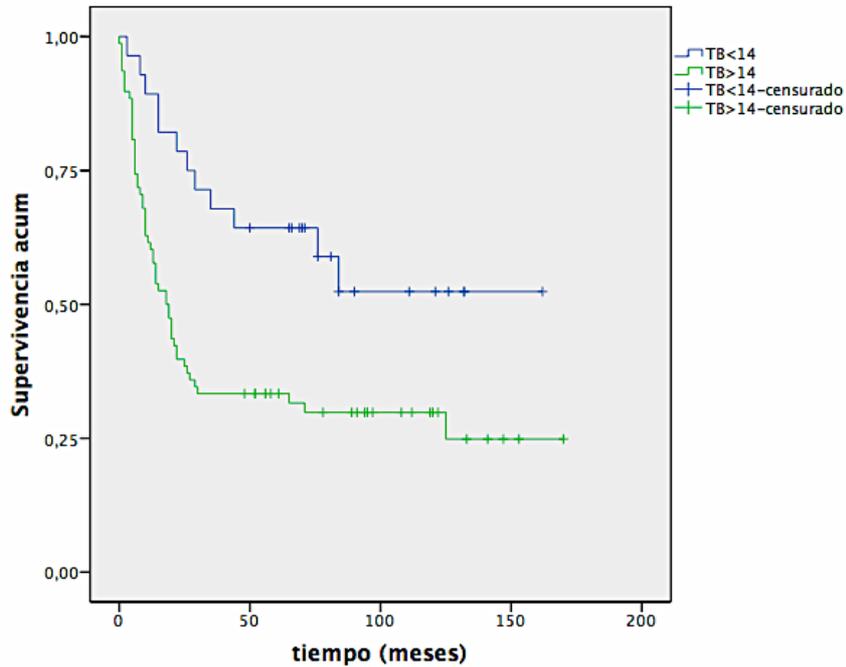


FIGURA 35. Curvas de supervivencia para los grupos de TB de bajo grado ( $TB \leq 14$  “buds”) y alto grado ( $TB > 14$  “buds”). El test de LogRank estableció la existencia de diferencia estadísticamente significativa entre ambas curvas de supervivencia ( $p = 0.003$ ).

#### 4. Análisis bivalente

Dado que en múltiples estudios se ha encontrado asociación entre TB de alto grado y la presencia de otros factores de mal pronóstico, evaluamos si esta relación también estaba presente en nuestra serie de CVMI. Así, a través del análisis bivalente, estudiamos la posible asociación entre TB de bajo y alto grado con los siguientes

factores: edad, sexo, pT (estadio), pN (“status ganglionar”), pM (presencia de metástasis a distancia), CIS asociado, grado de diferenciación tumoral, tamaño tumoral, afectación trigonal, invasión (venosa, linfática o perineural), p53, índice proliferativo Ki67 y subtipo molecular (luminal vs. basal).

Objetivamos asociación estadísticamente significativa entre TB de alto grado y estadio tumoral (pT), “status ganglionar” (pN) y la edad (tabla 2). Con respecto a la edad, los pacientes con TB de alto grado tenían una edad media inferior a los de TB de bajo grado. En cuanto al estadio tumoral, los pacientes con TB de alto grado tenían un nivel superior de pT, así de entre los pacientes con TB de bajo grado, la mayoría de ellos (57.1%) presentaban pT2, frente a los de TB de alto grado que presentaban de manera mayoritaria (69.2%) un pT superior (pT3 o pT4). Del mismo modo, los pacientes con TB de alto grado presentaban al diagnóstico un “status ganglionar” significativamente superior, así la mayoría de los pacientes con TB de bajo grado (78.6%) no mostraban afectación ganglionar, a diferencia de aquellos con TB de alto grado, que presentaban afectación ganglionar al diagnóstico hasta en el 53.8%.

	"Tumor budding"		
Factor de riesgo	Bajo grado (≤ 14 "buds") N = 28, 26.4%	Alto grado (> 14 "buds") N = 78, 73.6%	p-valor
Edad (años) Media ± DE	68.5 ± 11.4	63.2 ± 9.9	<b>0.043</b>
Sexo			
Hombre	25 (89.3%)	68 (87.2%)	0.771
Mujer	3 (10.7%)	10 (12.8%)	
pT			
pT2	16 (57.1%)	24 (30.8%)	<b>0.046</b>
pT3	7 (25%)	29 (37.2%)	
pT4	5 (17.9%)	25 (32%)	
pN			
pN0	22 (78.6%)	36 (46.2%)	<b>0.013</b>
pN1	2 (7.1%)	8 (10.2%)	
pN2	1 (3.6%)	24 (30.8%)	
pN3	3 (10.7%)	10 (12.8%)	
pM			
pM0	27 (96.4%)	68 (87.2%)	0.169
pM1	1 (3.6%)	10 (12.8%)	
CIS asociado			
Presente	4 (14.3%)	10 (12.8%)	0.844
Ausente	24 (85.7%)	68 (87.2%)	
Grado diferenc.			
G1-G2	1 (3.6%)	2 (2.6%)	0.627
G3	27 (96.4%)	76 (97.4%)	
Tamaño tumoral (cm) Media ± DE	4.5 ± 1.8	4.8 ± 2.3	0.167
Localización tumor			
Trígono	11 (39.3%)	43 (55.1%)	0.150
No trígono	17 (60.7%)	35 (44.9%)	
Invasión (vascular o perineural)			
Positiva	10 (35.7%)	38 (48.7%)	0.236
Negativa	18 (64.3%)	40 (51.3%)	
p53			
Positivo	20 (71.4%)	54 (69.2%)	0.828
Negativo	8 (28.6%)	24 (30.8%)	
Ki67			
Índice alto	29 (100%)	71 (92.2%)	0.260
Índice bajo	0 (0%)	6 (7.8%)	
Subtipo molecular			
Basal	9 (32.1%)	38 (48.7%)	0.130
Luminal	19 (67.9%)	40 (51.3%)	

TABLA 2. Relación entre TB de bajo y alto grado con factores pronósticos en cáncer vesical.

## ***5. Análisis multivariante***

### ***5.1. Análisis multivariante para mortalidad cáncer-específica***

Para llevar a cabo el análisis multivariante aplicamos el “modelo de Fine-Gray” diseñado para el estudio de riesgos competitivos. La variable dependiente en este análisis fue mortalidad cáncer-específica.

En primer lugar, se tomó la variable TB como variable cuantitativa continua según el recuento obtenido mediante el método “hot-spot”. En este caso, las variables asociadas de manera independiente con mortalidad fueron: pT (estadio), pN (“status ganglionar”), pM (metástasis en órganos), TB y edad (tabla 3). Con respecto al TB, al tratarse en este modelo de una variable continua, el riesgo de mortalidad aumenta progresivamente conforme mayor es el valor de TB, ya que cada unidad multiplica el riesgo por 1.02 (1.01-1.03). Así, el riesgo de mortalidad aumenta aproximadamente un 2% con cada “bud”. Lo mismo ocurre con la edad, cada año del paciente aumenta el riesgo de mortalidad en 1.07 (1.04-1.10) veces (tabla 3).

	<b>HR (IC95%)</b>	<b>p-valor</b>
<b>pT</b>		
pT3	3.07 (1.55-6.09)	0.001
pT4	2.50 (1.08-5.82)	0.033
<b>pN</b>		
pN1	4.80 (2.25-10.23)	< 0.001
pN2	2.57 (1.40-4.72)	0.002
pN3	3.19 (1.65-6.17)	0.001
<b>pM</b>		
pM1	5.34 (2.55-11.21)	< 0.001
<b>TB</b>	1.02 (1.01-1.03)	< 0.001
<b>Edad</b>	1.07 (1.04-1.10)	< 0.001

TABLA 3. Resultado del análisis multivariante para MCE con TB como variable continua. El p-valor global del modelo es < 0.001 y su AUC 0.875.

A continuación llevamos a cabo el análisis multivariante empleando la variable TB como variable dicotómica según el punto de corte 14 “buds”. Las variables resultantes como significativas fueron las mismas que en el modelo anterior (tabla 4). En este caso, vemos que presentar un recuento de TB superior a 14 “buds” implica un riesgo de mortalidad entre 1.19 y 4.34 veces superior que presentar un recuento de TB inferior a 14 “buds” (tabla 4).

	<b>HR (IC95%)</b>	<b>p-valor</b>
<b>pT</b>		
pT3	3.11 (1.58-6.14)	0.001
pT4	4.06 (1.88-8.89)	< 0.001
<b>pN</b>		
pN1	4.30 (2.14-8.64)	< 0.001
pN2	2.18 (1.09-4.35)	0.028
pN3	3.15 (1.65-5.99)	< 0.001
<b>pM</b>		
pM1	3.52 (1.52-8.17)	0.003
<b>TB</b>		
TB>14	2.27 (1.19-4.34)	0.013
<b>Edad</b>	1.07 (1.04-1.10)	< 0.001

TABLA 4. Resultado del análisis multivariante para MCE con TB como variable dicotómica. El p-valor global del modelo es < 0.001 y su AUC 0.854.

## 5.2. Análisis multivariante para supervivencia libre de progresión

Para valorar la SLP, llevamos a cabo el mismo análisis multivariante, empleando en este caso como variable dependiente el desarrollo de progresión tumoral. Al igual que para MCE, las variables significativas fueron: pT (estadio), pN (“status ganglionar”), pM (metástasis en órganos), TB y edad (tabla 5). Por tanto, el TB también se comporta como un factor predictor independiente de progresión tumoral: el riesgo de progresión se

incrementa progresivamente conforme mayor es el valor de TB, aumentando un 2% (entre un 1% y un 3%) con cada “bud” (tabla 5).

En el caso del análisis multivariante realizado para SLP, dado que determinadas variables examinadas se incluyen en la definición de la variable dependiente (pN y pM), este modelo debe considerarse solamente como explicativo, ya que su objetivo era valorar si el TB se comporta como factor predictor independiente de progresión tumoral, lo cual queda demostrado por su fuerte significación estadística.

	<b>HR (IC95%)</b>	<b>p-valor</b>
<b>pT</b>		
pT3	2.89 (1.54-5.44)	0.001
pT4	1.99 (0.81-4.91)	0.130
<b>pN</b>		
pN1	3.10 (1.27-7.59)	0.013
pN2	1.94 (0.97-3.86)	0.060
pN3	3.80 (1.76-8.24)	0.001
<b>pM</b>		
pM1	5.37 (2.43-11.85)	< 0.001
<b>TB</b>	1.02 (1.01-1.03)	< 0.001
<b>Edad</b>	1.05 (1.02-1.09)	< 0.001

TABLA 5. Resultado del análisis multivariante para SLP con TB como variable continua. El p-valor global del modelo es < 0.001 y su AUC 0.881.

### 5.3. Comparación de los modelos predictores según la metodología de recuento

Con el fin de establecer cuál de los dos métodos empleados en el recuento del TB (“10 CGA” frente a “1 CGA” (“hot-spot”)) se correlacionaba mejor con la mortalidad, realizamos el análisis multivariante empleando el recuento (como variable continua) según cada uno de los métodos. De este modo, se obtuvieron dos modelos (uno con TB según el recuento de “10 CGA” y otro con TB según el recuento de “1 CGA”). Las variables significativas se mantuvieron estables en ambos modelos (pT, pN, pM, TB y edad). Sin embargo, el modelo que contenía TB según el recuento de “1 CGA” o “hot-spot” se correlacionaba ligeramente mejor con la mortalidad, dado que presentaba menor índice de Akaike y mayor  $\text{pseudoR}^2$  (tabla 6), es decir, este modelo predecía con mayor exactitud la mortalidad cáncer-específica de nuestra muestra.

	Índice de Akaike	pseudoR <sup>2</sup>
<b>Modelo con TB según “10 CGA”</b>	488.4	0.122
<b>Modelo con TB según “1 CGA” (“hot-spot”)</b>	488.2	0.123

TABLA 6. Índice de Akaike y pseudoR<sup>2</sup> para los modelos según los métodos de recuento “10 CGA” y “1 CGA”.

## ***6. Modelo predictivo para mortalidad***

Teniendo en cuenta las variables predictoras resultantes del análisis multivariante para MCE, se elaboró un modelo o nomograma que permite predecir el riesgo individual que tiene el paciente recién diagnosticado de CMVI de fallecer a causa de su patología tumoral durante el seguimiento (figura 36). Este modelo tiene una sensibilidad del 81.25%, una especificidad del 69.23% y un AUC (capacidad discriminativa del modelo) de 0.854.

Así por ejemplo, según la tabla, un paciente de 60 años diagnosticado de CVMI pT2N2M0 y con un recuento de 20 “buds”, tiene una probabilidad de fallecer durante el seguimiento por su cáncer 25.9 veces superior al paciente basal (menor de 58 años, pT2N0M0 y con TB < 14 “buds”). Del mismo modo, según el nomograma, el paciente con mayor riesgo de mortalidad (2813 superior al paciente basal) sería aquel con más de 84 años al diagnóstico, con un CVMI pT4N3M1 y con un recuento de TB superior a 14 “buds”.

pM0	edad		≤ 58 años						59-83 años						≥ 84 años					
	pT	pN	pN0	pN1	pN2	pN3	pN0	pN1	pN2	pN3	pN0	pN1	pN2	pN3	pN0	pN1	pN2	pN3		
	pT2		1	4.30	2.18	3.15	5.25	22.58	11.43	16.53	27.58	118.58	60.01	86.79						
TB ≤14	pT3		3.11	13.37	6.77	9.79	16.33	70.21	35.53	51.39	85.77	368.75	186.62	269.89						
	pT4		4.06	17.47	8.84	12.78	21.33	91.73	46.42	67.14	112.05	481.73	243.80	352.58						
	pT2		2.27	9.75	4.94	7.14	11.91	51.21	25.92	37.48	62.56	268.96	136.12	196.85						
TB >14	pT3		7.05	30.32	15.35	22.19	37.04	159.25	80.60	116.58	194.53	836.36	423.30	612.13						
	pT4		9.21	39.61	20.05	28.99	48.39	208.05	105.29	152.27	254.13	1092.63	552.98	799.70						

pM1	edad		≤ 58 años						59-83 años						≥ 84 años					
	pT	pN	pN0	pN1	pN2	pN3	pN0	pN1	pN2	pN3	pN0	pN1	pN2	pN3	pN0	pN1	pN2	pN3		
	pT2		3.52	15.13	7.66	11.07	18.48	79.45	40.21	58.15	97.05	417.26	211.18	305.38						
TB ≤14	pT3		10.94	47.04	23.81	34.43	57.46	247.06	125.04	180.82	301.79	1297.52	656.67	949.66						
	pT4		14.29	61.46	31.10	44.98	75.07	322.77	163.35	236.23	394.26	1695.10	857.88	1240.65						
	pT2		7.98	34.31	17.37	25.11	41.91	180.21	91.20	131.89	220.12	946.40	478.97	692.66						
TB >14	pT3		24.82	106.70	54.00	78.09	130.34	560.37	283.60	410.14	684.50	2942.93	1489.41	2153.95						
	pT4		32.42	139.39	70.55	102.02	170.27	732.07	370.50	535.81	894.23	3844.68	1945.78	2813.94						

FIGURA 36. Nomograma de predicción de mortalidad para CVMI.

## DISCUSIÓN

---



## ***1. “Tumor budding” en cáncer vesical***

El valor pronóstico del TB en CCR ha quedado claramente demostrado en numerosos estudios.<sup>9-27</sup> Del mismo modo, en otros tipos de carcinomas, a pesar de no haber sido estudiado tan extensamente como en el CCR, los resultados son coincidentes y el TB también ha demostrado actuar como factor predictor de mal pronóstico. Sin embargo, si revisamos la literatura, sólo encontramos un único artículo dedicado al estudio del TB en cáncer de vejiga, y en concreto, para carcinoma vesical no músculo-invasivo.<sup>131</sup> Por tanto, se puede decir que el papel que desempeña el TB en vejiga se encuentra prácticamente inexplorado. La singularidad del presente trabajo se debe a que representa el **primer estudio** llevado a cabo con la finalidad de evaluar tanto la presencia como el valor pronóstico del TB en el **CVMI**.

El hallazgo más relevante de nuestro trabajo consiste en que en la serie de casos evaluados, el TB ha demostrado comportarse como un **factor predictor independiente de progresión y mortalidad**, de modo que a mayor densidad de TB, mayor riesgo de MCE y de

SLP limitada. Por tanto, la hipótesis principal de nuestro estudio se ha verificado y al igual que en el resto de carcinomas (colon, esófago, mama, etc.), en CVMI el TB también se comporta como factor de mal pronóstico.

Nuestro resultado es coherente con el obtenido por Fukumoto et al.<sup>131</sup>, es decir, en ambos trabajos el TB ha demostrado tener valor pronóstico en cáncer de vejiga, sin embargo son múltiples las **diferencias entre este trabajo y el nuestro**. En primer lugar, ellos sólo evalúan a pacientes con carcinoma vesical no músculo-invasivo (pT1), que se caracteriza por su alta tasa de recurrencia pero con mucho mejor pronóstico que el CVMI. En segundo lugar, ellos concluyen que el TB es un factor predictor de progresión, pero no encuentran asociación en cuanto a la recurrencia tumoral, ni evalúan el valor predictor de TB sobre la mortalidad del paciente. En tercer lugar, en cuanto a metodología, ellos emplean cortes tumorales teñidos tan solo con H&E, con los problemas de precisión en el recuento que puede suponer esta técnica, y se basan en el “cut-off” de 10 “buds” extrapolado desde CCR. Por último, ellos basan su trabajo únicamente en el tejido obtenido de la RTU,

con las limitaciones que puede presentar (muestra tumoral más pequeña, fragmentada y posiblemente en muchas ocasiones artefactada por la electrocoagulación). Son varios los aspectos que aporta nuestro estudio con respecto al de Fukumoto. En primer lugar, el tumor objeto de nuestro estudio consiste en un carcinoma en estadios más avanzados, que se comporta de manera mucho más agresiva y con un pronóstico ominoso en un porcentaje alto de pacientes. En segundo lugar, en nuestro caso además de valorar progresión, el “endpoint” principal ha sido mortalidad cáncer-específica. Además, creemos que el recuento de “buds” es más fiable con una técnica de inmunohistoquímica que con H&E, y que por otro lado, el empleo de un “cut-off” extrapolado de otros tumores no es lo más correcto. En este sentido, nuestro trabajo aporta el primer “cut-off” propuesto específicamente para cáncer de vejiga y además valora también por primera vez el TB como variable continua. Por último, en nuestro estudio se pudo disponer de abundante material de biopsia de cada caso (al incluir además del tejido de la RTU el de la pieza de cistectomía), lo cual implica la seguridad de haber seleccionado la muestra más adecuada para valorar el TB.

Como se comentó previamente, si revisamos la literatura relacionada con TB encontramos una gran heterogeneidad en cuanto al “cut-off” empleado por los diferentes autores en el recuento. Por tanto, no existe un punto de corte claramente establecido para poder estratificar a los pacientes en TB de bajo y alto grado en función de su número de “buds”. Además, teniendo en cuenta que el recuento medio de “buds” en nuestra serie resultó sustancialmente elevado ( $22.2 \pm 18.5$  “buds” según el método “10 CGA” y de  $32.3 \pm 25.9$  “buds” según el método “hot-spot”) si lo comparamos con los recuentos de otras series tanto en CCR como en otros tipos de tumores,<sup>5,6,14,16,108,123</sup> no tendría sentido emplear cualquiera de los “cut-off” utilizados en otras series. Por ello, en nuestro trabajo establecimos **nuestro propio punto de corte o “cut-off”** mediante el empleo de una curva ROC, siendo este de 14 “buds”. Ello nos permitió clasificar a los pacientes con un recuento superior a 14 “buds” como pacientes con TB de alto grado y postular que en estos casos el riesgo de mortalidad es superior que el de aquellos con un recuento inferior a 14 “buds” (HR (IC 95%): 2.27 (1.19-4.34);  $p = 0.013$ ). Este es el método de análisis empleado de manera mayoritaria en la literatura relativa al TB, es

decir, considerando al TB como una variable dicotómica. Sin embargo, algunos autores ya han defendido el uso de la cuantificación de “buds” como variable continua.<sup>39,71,85</sup> En nuestro caso, también quisimos evaluar la información pronóstica que nos aportaba el uso del TB como variable continua. De este modo, según los datos del análisis multivariante (HR (IC95%): 1.02 (1.01-1.03)), con cada “bud” el riesgo de mortalidad aumenta un 2%. Así, por ejemplo, si tuviéramos dos pacientes con la misma edad y el mismo estadio TNM al diagnóstico, pero uno de ellos con 0 “buds” y el otro con 30 “buds”, este último presentaría un riesgo de MCE durante el seguimiento 32.64 (30 x 1.02) veces superior que el paciente con 0 “buds”. Por otro lado, el riesgo que presentaría un paciente con 15 “buds” (15 x 1.02 = 15.3) distaría bastante del que presentaría un paciente con 60 “buds” (60 x 1.02 = 61.2), y sin embargo según un punto de corte de 14 “buds”, ambos casos serían considerados como TB de alto grado y se les supondría el mismo riesgo. Por tanto, comprobamos que la información que nos proporciona el empleo del **TB como variable continua** es mucho más precisa y relevante que si empleamos un “cut-off”. Y de este modo, podemos afirmar que el TB en CVMI se comporta como un

potente factor pronóstico independiente y con un carácter desfavorable.

Por otra parte, además del TB, las variables que también demostraron utilidad como factores predictores independientes de mortalidad en nuestro análisis multivariante fueron: la edad y el estadio TNM. Así, a mayor edad, mayor riesgo de MCE (HR (IC95%): 1.07 (1.04-1.10);  $p < 0.001$ ), es decir, cada año del paciente aumenta el riesgo de mortalidad aproximadamente un 7%. Y en cuanto al estadio TNM, el componente con mayor repercusión en el pronóstico fue la presencia de metástasis a distancia al diagnóstico (HR (IC 95%): 5.34 (2.55-11.21);  $p < 0.001$ ). Con respecto a la **edad**, su valor pronóstico en el cáncer vesical es ampliamente aceptado, y es que los pacientes más añosos se caracterizan por presentar tumores en estadios más avanzados al diagnóstico, mayor mortalidad perioperatoria, y menor SG y SCE. Además, en ellos el tratamiento suele ser más conservador que en pacientes jóvenes.<sup>172,201-204</sup> Y en cuanto al **estadio TNM**, es considerado como el factor predictor más relevante en la supervivencia del cáncer vesical,<sup>166-169</sup> por tanto, que haya resultado

factor predictor en nuestro estudio era algo esperado. Además, presentar metástasis al inicio (algo que ocurre entre el 5 y 15% de los casos)<sup>205</sup> es determinante, ya que la supervivencia a 5 años suele ser inferior al 15% pese al tratamiento con quimioterapia sistémica.<sup>206,207</sup>

Por el contrario, en nuestro estudio el análisis multivariante **no demostró significación estadística** para ninguna de las siguientes variables: invasión venosa, linfática o perineural; subtipo molecular del tumor (basal o luminal), positividad de p53, índice Ki67 elevado, sexo, presencia de CIS o tamaño tumoral. De entre estos, llama la atención que la presencia de invasión venosa, linfática y perineural no haya presentado significación estadística en nuestra serie, ya que, sobre todo la **invasión venosa y linfática**, son factores con valor pronóstico demostrado en CVMI.<sup>169-171,208-210</sup> Sin embargo, hay que tener en cuenta que en la práctica totalidad de artículos que han valorado la presencia de invasión linfovascular en la pieza de cistectomía, dicha valoración se ha realizado empleando únicamente H&E, y esto puede suponer una limitación importante, ya que ciertos artefactos por retracción estromal pueden simular una

falsa invasión vascular, además de que con H&E puede ser realmente difícil identificar vasos de pequeño tamaño y diferenciar vasos sanguíneos de vasos linfáticos. De hecho, en los artículos de Gakis et al.<sup>211</sup> y Martini et al.<sup>212</sup>, en los cuales realizaron una comparación de la capacidad discriminativa de H&E frente a técnicas de inmunohistoquímica (D2.40, CD31 y CD34) para detección de invasión vascular en la pieza de cistectomía, encontraron que la tasa de invasión vascular variaba significativamente según la técnica de detección utilizada, existiendo una detección superior con el empleo de inmunohistoquímica<sup>211</sup> y la presencia de falsos positivos en caso de emplear H&E de manera aislada.<sup>212</sup> Por tanto, que en nuestro estudio la presencia de invasión linfovascular no haya demostrado valor pronóstico podría tener su explicación en el hecho de haber empleado técnicas de inmunohistoquímica (D2.40 y CD34) para su detección, en lugar de H&E.

Otro aspecto a valorar en cuanto a nuestros resultados son las **relaciones entre TB y otros factores pronósticos**. La asociación

de TB de alto grado con un estadio tumoral (pT) elevado y con un “status ganglionar” (pN) superior ya había sido descrita previamente en la literatura.<sup>6,10,16,19,20,213,214</sup> En cuanto a la relación con metástasis a distancia (pM), en nuestro caso no fue significativa, siendo esto debido probablemente al escaso número de pacientes pM1 (10 casos). Y por otro lado, la relación encontrada entre TB de alto grado y una menor edad de los pacientes tendría difícil explicación, y sería pertinente aclarar que es importante no confundir esta relación encontrada entre TB y edad, con el papel pronóstico mostrado por la edad en el análisis multivariante: a mayor edad, peor pronóstico.

Si nos centramos ahora en el **pronóstico del CVMI**, actualmente sigue siendo una patología con una supervivencia muy reducida pese a los avances en su diagnóstico y tratamiento. Si analizamos nuestra serie, vemos que la SG a los 5 años fue algo inferior (42%) a la descrita en otras series como la de Shariat et al. (66%),<sup>160</sup> la de Patel et al. (53%),<sup>161</sup> la de Monzó et al. (50%)<sup>215</sup> o la de Frazier et al. (48%).<sup>216</sup> Esto podría ser debido a que en nuestro servicio de

Urología se suelen realizar cistectomías con fines paliativos en casos con estadios avanzados. Además, observamos como al igual que otras series, el periodo de mayor riesgo de mortalidad en nuestro caso fueron los 3 primeros años tras la cistectomía, y que una vez superado este periodo la probabilidad de supervivencia era mayor. Por otro lado, si seleccionamos a aquellos pacientes de nuestra serie que ya presentaban al diagnóstico metástasis a distancia (10%) o afectación ganglionar (34.9%), comprobamos que la supervivencia se redujo drásticamente en estos casos, de forma consistente a lo descrito en la literatura<sup>159,205,217</sup>: al año de seguimiento sólo sobrevivieron el 36% de los que ya presentaban metástasis, y a los tres años de seguimiento sólo sobrevivieron el 34.9% de los que ya presentaban adenopatías sin metástasis a distancia.

## ***2. Aplicabilidad a la práctica clínica***

El CVMI es una patología frecuente y de mal pronóstico, cuya mortalidad ha permanecido elevada en las últimas décadas a pesar

de las mejoras en las técnicas quirúrgicas, los cuidados postoperatorios y protocolos de quimioterapia.<sup>218</sup> Además, es llamativo cómo tras su diagnóstico, un subgrupo de pacientes presenta una evolución tórpida, con mortalidad temprana focalizada sobre todo en los 2-3 primeros años. Y por el contrario, otro subgrupo de pacientes, que suele ser menos numeroso, se caracteriza por presentar una evolución favorable, con curación completa de la enfermedad y supervivencia prolongada. Por ello, con el fin de poder **reconocer de manera temprana** a aquellos pacientes con mayor riesgo de presentar una evolución adversa, se hace imprescindible la identificación de nuevos parámetros con potencial carácter pronóstico en el CVMI. Así, la investigación de nuevos factores ya sean moleculares, genéticos o anatomopatológicos, que pudieran desempeñar un papel en la carcinogénesis o progresión tumoral, sería de gran utilidad pues nos permitiría practicar una medicina más personalizada, adaptando el abordaje terapéutico y el seguimiento a las características individuales de cada paciente, y de este modo, intentar mejorar los resultados en cuanto a supervivencia. En base a esto, el estudio del TB como fenómeno anatomopatológico que puede aportarnos

valiosa información pronóstica y específica para cada caso de CVMI, estaría sobradamente justificado. Y es que, como su propio nombre indica, “tumor en ciernes”, la detección del TB nos permite identificar el proceso de metástasis en su fase más precoz y por tanto, nos da la posibilidad de anticiparnos a ésta.

Por consiguiente, la **utilidad del TB en la práctica clínica** habitual se basaría en su capacidad para identificar de manera precoz a aquellos pacientes que probablemente van a presentar un comportamiento tumoral desfavorable y a aquellos con mayor probabilidad de presentar una evolución favorable. Así, en aquellos pacientes con TB de alto grado estaría indicada la aplicación de un abordaje terapéutico más agresivo y precoz y de un seguimiento más estrecho. Por su parte, en aquellos con un TB de bajo grado, en ausencia de otros factores de mal pronóstico, se podría valorar una limitación de la agresividad terapéutica. En este sentido, con el fin de anticiparnos lo máximo posible y contar con un factor con valor pronóstico incluso de manera previa a la cistectomía, consideramos interesante valorar si la densidad de TB observada en la RTU del tumor infiltrante podía sernos útil en cuanto al pronóstico del

paciente. Para ello, de aquellos pacientes en los que disponíamos de la muestra de RTU con CK AE1/3 (58 pacientes) comparamos las curvas de supervivencias Kaplan-Meier de los que presentaban un recuento mayor de 14 “buds” (37 pacientes) y menor de 14 “buds” (21 pacientes), objetivando una supervivencia significativamente menor ( $p= 0.048$ ) para aquellos con un recuento superior a 14 “buds”. De este modo, la utilidad del TB podría aplicarse también de manera previa a la cistectomía, por ejemplo, para facilitar la selección de aquellos pacientes que podrían beneficiarse de una neoadyuvancia con quimioterapia pre-cistectomía o para la selección de pacientes en los se podría aplicar un tratamiento multimodal con preservación vesical en lugar de una cistectomía radical, lo cuál podría ser motivo de otro estudio.

Por otra parte, hay que tener en cuenta que la **implementación del estudio del TB** en el proceso global de estudio histopatológico no implicaría un gran esfuerzo adicional. Y es que, en base a nuestros resultados, con la cuantificación de “buds” presentes en un único CGA (el de mayor densidad de TB o “hot-spot”), sería suficiente para llevar a cabo la evaluación del TB, siendo este un

procedimiento que no supondría más de un par de minutos. Por tanto, estamos hablando de un proceso relativamente económico, altamente reproducible y de sencilla y rápida aplicación.

Por otro lado, uno de los propósitos de este trabajo consistió en el desarrollo de un nomograma con carácter predictor (figura 31). Consideramos que el **nomograma** obtenido supone una herramienta que tendría utilidad en la práctica clínica, permitiéndonos predecir con una elevada sensibilidad (81%) el pronóstico individualizado de mortalidad cáncer-específica tras el diagnóstico de CVMI. Y por tanto, sería un instrumento en el que podríamos apoyarnos a la hora de tomar decisiones terapéuticas. Sin embargo, no hay que olvidar que para poder emplear esta herramienta de manera generalizada (extrapolando su resultado a otras poblaciones), sería imprescindible someterla previamente a un proceso de validación externa, que implicaría su evaluación de manera prospectiva en poblaciones más amplias y heterogéneas.

### ***3. Justificación de la metodología aplicada***

En primer lugar, si nos referimos a los criterios de inclusión y exclusión aplicados en nuestro estudio, apreciamos que se trataron de **criterios de selección muy estrictos**. El fin de ello fue evitar al máximo la inclusión de pacientes cuyas características particulares pudieran tener implicaciones pronósticas. Así, no se incluyeron pacientes a los que no se les hubiera sometido a cistectomía radical, basándonos en el hecho de que probablemente en estos pacientes se descartó dicha opción terapéutica por sus características basales tales como una alta comorbilidad o una edad avanzada, teniendo éstos por tanto una esperanza de vida muy limitada *a priori*. Tampoco se incluyeron pacientes con tipos histológicos diferentes al transicional, ya que es sabido que estas variantes histológicas (epidermoide, adenocarcinoma, neuroendocrino...) presentan un comportamiento más agresivo. Del mismo modo, también se excluyeron a pacientes con antecedente de patología oncológica diferente al carcinoma vesical y a pacientes con historia de tumor de vía del tracto urinario superior, para evitar así que la supervivencia de nuestros casos pudieran estar influida por

cualquiera de estos antecedentes. Los pacientes inmunodeprimidos también se descartaron, ya que típicamente tienen una evolución clínica más desfavorable. A su vez, los pacientes cuya causa de éxitus era dudosa, sin poder ser atribuida claramente a su progresión tumoral, también se excluyeron. Y por el contrario, también creímos conveniente descartar a los pacientes con carcinoma vesical urotelial variante “linfoepitelioma-like”, dado que se caracterizan por un mejor pronóstico que la variante transicional típica. En definitiva, en este estudio aplicamos criterios de selección de pacientes muy estrictos, con la finalidad de evitar la presencia de características que pudieran condicionar la evolución tumoral y que por tanto pudieran comportarse como factores de confusión en el pronóstico.

A continuación, al plantearnos qué **metodología** aplicar para el estudio del TB, nos encontramos con que en la literatura existente había una gran heterogeneidad. Por ello, seleccionamos para cada paso de la metodología la técnica que creímos más conveniente. Así, el primer aspecto fue la laminilla de tejido a seleccionar. Pensamos que lo correcto era evaluar las muestras biológicas tanto

de la RTU como de la cistectomía para asegurar así la selección de la laminilla con mayor densidad de TB en cada paciente. En segundo lugar, aplicamos la técnica de inmunohistoquímica con citoqueratina AE1/3, la cuál permite la señalización de citoqueratinas intracitoplasmáticas, siendo éstas un marcador de células epiteliales, y facilitándonos así el reconocimiento de aquellas células tumorales recientemente desprendidas del frente de invasión tumoral y que por tanto todavía conservan en gran medida sus características de células epiteliales. Otros autores también han empleado esta técnica,<sup>19,71,85,219</sup> y es que pese a incrementar el coste del proceso, la identificación de “buds” se favorece enormemente con respecto a la H&E y por tanto se asegura una cuantificación correcta y mucho más precisa. Y en cuanto al método de valoración del TB, concluimos que lo correcto era emplear una técnica cuantitativa ya que han demostrado ser más reproducibles, y de entre ellas, aplicar las dos técnicas que han mostrado mejor correlación con la SCE: “10 CGA” y “1 CGA”.<sup>19,39,71</sup> En la comparación de ambos métodos de recuento, encontramos que el modelo obtenido con el análisis multivariante incluyendo la variable TB según el método “1 CGA” (“hot-spot”) era ligeramente

superior al modelo con el recuento según “10 CGA”. Si a ello añadimos la importante ventaja que supone, desde el punto de vista práctico, la aplicación de la técnica “1 CGA” sobre la técnica “10 CGA”, al ser un proceso mucho más rápido y asequible; podemos afirmar que optar por la utilización de la técnica “1 CGA” sería válido y apropiado. Este resultado es coherente con lo descrito en otros trabajos que también apoyan la utilización del método “hot-spot”.<sup>1,85</sup>

Por último, es conveniente llevar a cabo ciertas aclaraciones con respecto al **tratamiento** que se aplicó en nuestra serie de pacientes. Y es que hay que tener en cuenta que estamos hablando de un estudio retrospectivo y que en nuestra serie se incluyeron pacientes diagnosticados y tratados de CVMI hace más de una década. Por ello, es fácil entender que los protocolos terapéuticos de entonces difieran algo con respecto a los actuales. Así, en nuestros pacientes no se siguieron pautas que son relativamente recientes como la administración de quimioterapia neoadyuvante (la cuál todavía no está plenamente implantada en todos los centros, sino sólo en un 20% de ellos).<sup>220-221</sup> En vez de ello, la tendencia consistió en la

administración de quimioterapia adyuvante tras la cistectomía, en los casos con factores de mal pronóstico. Además, también es necesario aclarar que en nuestro servicio de Urología tradicionalmente se ha llevado a cabo la realización de cistectomía radical en casos de CVMI avanzados, incluso con la presencia de metástasis al diagnóstico. Su finalidad en estos casos es principalmente paliativa y con el objetivo de prevenir complicaciones derivadas de la extensión local (sangrado persistente, insuficiencia urinaria obstructiva, perforación intestinal...). Ello explicaría que nuestra serie de pacientes cistectomizados presentara una supervivencia ligeramente inferior a la de otras series.

#### ***4. Limitaciones de nuestro estudio***

Si analizamos las limitaciones de nuestro estudio, la primera de ellas sería el hecho de que nos encontremos ante un **estudio retrospectivo**, con los inconvenientes inherentes a este diseño. Sin embargo, si nos fijamos en la literatura relativa a TB, la gran

mayoría de estudios son también retrospectivos.

En segundo lugar, nuestra serie se constituyó por una **muestra relativamente reducida**. Esto se debe principalmente al haber aplicado criterios de selección altamente estrictos con el fin de evitar factores pronósticos de confusión, pero también al hecho de que todos los pacientes provenían de un mismo centro.

Otras de las limitaciones sería el hecho de no haber evaluado moléculas asociadas al **proceso TEM** en las células que conforman el TB, sin embargo, dado que este trabajo tenía como objetivo realizar una primera aproximación al TB en cáncer vesical, no creímos conveniente su realización. No obstante, este aspecto podría realizarse con posterioridad, para definir más concretamente el inmunofenotipo de este componente tumoral más indiferenciado.

Por último, creemos que los resultados de este estudio **deben ser validados** mediante estudios prospectivos en series más amplias, procedentes de múltiples centros y con criterios de selección de pacientes menos restrictivos; evaluando así muestras de pacientes

más heterogéneas, y por tanto, más similares a la población real (validación externa). El fin de ello sería consolidar la evidencia acerca del TB en cáncer vesical y conseguir la implantación de una metodología estandarizada para su estudio. Además, pensamos que este trabajo abre la puerta al desarrollo de una línea de investigación relacionada con el estudio del TB en otras localizaciones del tracto urinario todavía inexplorados en este ámbito, como el tracto urinario superior o la próstata.



## CONCLUSIONES

---



1. La **conclusión principal** de nuestro estudio es: la presencia de “tumor budding” en el carcinoma vesical músculo-invasivo se comporta como un factor predictor independiente de progresión y mortalidad. Así, a mayor densidad de “tumor budding”, mayor mortalidad cáncer-específica y menor supervivencia libre de progresión.

2. Las **conclusiones secundarias** de nuestro estudio son:

2.1. Además del “tumor budding”, también demostraron comportarse como factores pronósticos independientes para mortalidad cáncer-específica y progresión: la edad y el estadio TNM presentados por el paciente al diagnóstico. El resto de factores pronósticos evaluados no demostraron significación estadística en nuestra serie de pacientes.

2.2. Establecimos como punto de corte en el recuento de “tumor budding”: 14 “buds”. De este modo, podríamos considerar a los pacientes con un recuento superior a 14 “buds” como carcinomas con “tumor budding de alto grado” y a aquellos con un

recuento inferior a 14 “buds” como carcinomas con “tumor budding de bajo grado”.

2.3. Estratificar a los pacientes según su recuento mayor o menor de 14 “buds” es útil ya que aquellos con un recuento superior a 14 “buds” presentaron un riesgo de mortalidad cáncer-específica entre 1.19 y 4.34 veces superior que aquellos con un recuento inferior a 14 “buds” ( $p = 0.013$ ). Sin embargo, la información que nos aporta el empleo de “tumor budding” como variable continua es mucho más relevante, ya que el riesgo de mortalidad cáncer-específica aumenta un 2% con cada “bud” ( $p < 0.001$ ).

2.4. Encontramos asociación estadísticamente significativa entre la presencia de “tumor budding de alto grado” y otros factores predictores de mal pronóstico para el carcinoma vesical músculo-invasivo, en concreto con la edad (pacientes más jóvenes), con pT (estadios pT avanzados) y con pN (estadios pN avanzados); con p-valor de 0.043, 0.046 y 0.013, respectivamente.

2.5. El recuento de “tumor budding” obtenido según el método “1 CGA” o “hot-spot” se correlacionó algo mejor con la mortalidad cáncer-específica que el obtenido empleando el método de “10 CGA”. Además, el método “hot-spot” suponía una gran ventaja en cuanto a su aplicabilidad, ya que estudiar el “tumor budding” mediante el recuento de un único campo de gran aumento implica un proceso sencillo y mucho más rápido.

2.6. Mediante el empleo de las variables con carácter pronóstico independiente para mortalidad (“tumor budding”, edad, pT, pN y pM), desarrollamos un nomograma que nos permite predecir el riesgo individualizado de mortalidad cáncer-específica del paciente tras el diagnóstico. Este nomograma podría ser de utilidad en la práctica clínica como una herramienta de apoyo en la toma de decisiones según el pronóstico específico de cada paciente, aunque para poder utilizarlo debería someterse previamente a un proceso de validación externa.



## BIBLIOGRAFÍA

---



1. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol*. 2017;30(9):1299-311.
2. Imai T. The growth of human carcinoma. A morphological analysis. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 1954; 45:13–43.
3. Morodomi T, Isomoto H, Shirouzu K, Kakegawa K, Irie K, Morimatsu M. An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer*. 1989;63(3):539-43.
4. Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor «budding» in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1993;36(7):627-35.
5. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour «budding» as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*. 2002;40(2):127-32.
6. Park K-J, Choi H-J, Roh M-S, Kwon H-C, Kim C. Intensity of tumor budding and its prognostic implications in invasive colon carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 2005;48(8):1597-602.
7. Compton, C.C. Pathology and prognostic determinants of colorectal cancer. In *UpToDate*; Savarese, D.M., Ed.; UpToDate: Waltham, MA, USA, 2016.
8. Schmol HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol*. 2012;23(10):2479-516.
9. Shinto E, Jass JR, Tsuda H, Sato T, Ueno H, Hase K, et al. Differential prognostic significance of morphologic invasive markers in colorectal cancer: tumor budding and cytoplasmic podia. *Dis Colon Rectum*. 2006;49(9):1422-30.
10. Ohtsuki K, Koyama F, Tamura T, Enomoto Y, Fujii H, Mukogawa T, et al. Prognostic value of immunohistochemical analysis of tumor budding in colorectal carcinoma. *Anticancer Res*. 2008;28(3B):1831-6.
11. Okuyama T, Oya M, Yamaguchi M. Budding (sprouting) as a useful prognostic marker in colorectal mucinous carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2002;32(10):412-6.
12. Okuyama T, Oya M, Ishikawa H. Budding as a useful prognostic marker in pT3 well- or moderately-differentiated rectal adenocarcinoma. *J Surg Oncol*.

2003;83(1):42-7.

13. Tanaka M, Hashiguchi Y, Ueno H, Hase K, Mochizuki H. Tumor budding at the invasive margin can predict patients at high risk of recurrence after curative surgery for stage II, T3 colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2003;46(8):1054-9.

14. Prall F, Nizze H, Barten M. Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology*. 2005;47(1):17-24.

15. Zlobec I, Molinari F, Martin V, Mazzucchelli L, Saletti P, Trezzi R, et al. Tumor budding predicts response to anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2010;16(38):4823-31.

16. Ha S-S, Choi H-J, Park K-J, Kim J-M, Kim S-H, Roh Y-H, et al. Intensity of tumor budding as an index for the malignant potential in invasive rectal carcinoma. *Cancer Res Treat*. 2005;37(3):177-82.

17. Nakamura T, Mitomi H, Kanazawa H, Ohkura Y, Watanabe M. Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2008;51(5):568-72.

18. Graham RP, Vierkant RA, Tillmans LS, Wang AH, Laird PW, Weisenberger DJ, et al. Tumor Budding in Colorectal Carcinoma: Confirmation of Prognostic Significance and Histologic Cutoff in a Population-based Cohort. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(10):1340-6.

19. Karamitopoulou E, Zlobec I, Kölzer V, Kondi-Pafiti A, Patsouris ES, Gennatas K, et al. Proposal for a 10-high-power-fields scoring method for the assessment of tumor budding in colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2013;26(2):295-301.

20. Max N, Harbaum L, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Kornprat P, Langner C. Tumour budding with and without admixed inflammation: two different sides of the same coin? *Br J Cancer*. 2016;114(4):368-71.

21. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, O'Sullivan J, Fennelly D, Hyland J, et al. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(1):134-41.

22. Giger OT, Comtesse SCM, Lugli A, Zlobec I, Kurrer MO. Intra-tumoral budding in preoperative biopsy specimens predicts lymph node and distant metastasis in patients with colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2012;25(7):1048-53.

23. Kanazawa H, Mitomi H, Nishiyama Y, Kishimoto I, Fukui N, Nakamura T, et al. Tumour budding at invasive margins and outcome in colorectal cancer. *Colorectal Dis*. 2008;10(1):41-7.

24. Bhangu A, Wood G, Brown G, Darzi A, Tekkis P, Goldin R. The role of epithelial mesenchymal transition and resistance to neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer. *Colorectal Dis.* 2014;16(4):O133-143.
25. Rogers AC, Gibbons D, Hanly AM, Hyland JMP, O'Connell PR, Winter DC, et al. Prognostic significance of tumor budding in rectal cancer biopsies before neoadjuvant therapy. *Mod Pathol.* 2014;27(1):156-62.
26. Sannier A, Lefèvre JH, Panis Y, Cazals-Hatem D, Bedossa P, Guedj N. Pathological prognostic factors in locally advanced rectal carcinoma after neoadjuvant radiochemotherapy: analysis of 113 cases. *Histopathology.* 2014;65(5):623-30.
27. Rogers AC, Winter DC, Heeney A, Gibbons D, Lugli A, Puppa G, et al. Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2016;115(7):831-40.
28. Sobin L, Wittekind C, eds. *TNM classification of malignant tumours.* New York: Wiley-Liss, 2002.
29. Puppa G, Sonzogni A, Colombari R, Pelosi G. TNM staging system of colorectal carcinoma: a critical appraisal of challenging issues. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(6):837-52.
30. Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 2008;61(5):561-9.
31. Ueno H, Price AB, Wilkinson KH, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. A new prognostic staging system for rectal cancer. *Ann Surg.* 2004;240(5):832-9.
32. Beaton C, Twine CP, Williams GL, Radcliffe AG. Systematic review and meta-analysis of histopathological factors influencing the risk of lymph node metastasis in early colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2013;15(7):788-97.
33. Coverlizza S, Risio M, Ferrari A, Fenoglio-Preiser CM, Rossini FP. Colorectal adenomas containing invasive carcinoma. Pathologic assessment of lymph node metastatic potential. *Cancer.* 1989;64(9):1937-47.
34. Bosch SL, Teerenstra S, de Wilt JHW, Cunningham C, Nagtegaal ID. Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: a systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions. *Endoscopy.* 2013;45(10):827-34.
35. Rubin P, Hansen JT, Rubin P. *TNM staging atlas with oncoanatomy.* Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
36. Lai Y-H, Wu L-C, Li P-S, Wu W-H, Yang S-B, Xia P, et al. Tumour budding

is a reproducible index for risk stratification of patients with stage II colon cancer. *Colorectal Dis.* 2014;16(4):259-64.

37. Betge J, Kornprat P, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, et al. Tumor budding is an independent predictor of outcome in AJCC/UICC stage II colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(12):3706-12.

38. Canney AL, Kevans D, Wang LM, Hyland JMP, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, et al. Stage II colonic adenocarcinoma: a detailed study of pT4N0 with emphasis on peritoneal involvement and the role of tumour budding. *Histopathology.* 2012;61(3):488-96.

39. Horcic M, Koelzer VH, Karamitopoulou E, Terracciano L, Puppa G, Zlobec I, et al. Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2013;44(5):697-705.

40. Okuyama T, Nakamura T, Yamaguchi M. Budding is useful to select high-risk patients in stage II well-differentiated or moderately differentiated colon adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum.* 2003;46(10):1400-6.

41. Choi H-J, Park K-J, Shin J-S, Roh M-S, Kwon H-C, Lee H-S. Tumor budding as a prognostic marker in stage-III rectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis.* 2007;22(8):863-8.

42. Zlobec I, Hädrich M, Dawson H, Koelzer VH, Borner M, Mallaev M, et al. Intratumoural budding (ITB) in preoperative biopsies predicts the presence of lymph node and distant metastases in colon and rectal cancer patients. *Br J Cancer.* 2014;110(4):1008-13.

43. Zlobec I, Borner M, Lugli A, Inderbitzin D. Role of intra- and peritumoral budding in the interdisciplinary management of rectal cancer patients. *Int J Surg Oncol.* 2012;2012:795945.

44. Enderle-Ammour K, Bader M, Ahrens TD, Franke K, Timme S, Csanadi A, et al. Form follows function: Morphological and immunohistological insights into epithelial-mesenchymal transition characteristics of tumor buds. *Tumour Biol.* 2017;39(5):1010428317705501.

45. Zlobec I, Lugli A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget. *Oncotarget.* 2010;1(7):651-61.

46. Gurzu S, Silveanu C, Fetyko A, Butiurca V, Kovacs Z, Jung I. Systematic review of the old and new concepts in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(30):6764-75.

47. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1438-49.
48. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420-8.
49. Gabbert H, Wagner R, Moll R, Gerharz CD. Tumor dedifferentiation: an important step in tumor invasion. *Clin Exp Metastasis.* 1985;3(4):257-79.
50. Zlobec I, Lugli A, Baker K, Roth S, Minoo P, Hayashi S, et al. Role of APAF-1, E-cadherin and peritumoral lymphocytic infiltration in tumour budding in colorectal cancer. *J Pathol.* 2007;212(3):260-8.
51. García-Solano J, Conesa-Zamora P, Trujillo-Santos J, Torres-Moreno D, Mäkinen MJ, Pérez-Guillermo M. Immunohistochemical expression profile of  $\beta$ -catenin, E-cadherin, P-cadherin, laminin-5 $\gamma$ 2 chain, and SMAD4 in colorectal serrated adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2012;43(7):1094-102.
52. Karamitopoulou E, Lugli A, Panayiotides I, Karakitsos P, Peros G, Rallis G, et al. Systematic assessment of protein phenotypes characterizing high-grade tumour budding in mismatch repair-proficient colorectal cancer. *Histopathology.* 2010;57(2):233-43.
53. Roca F, Mauro LV, Morandi A, Bonadeo F, Vaccaro C, Quintana GO, et al. Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, MMPs (7 and 9), and TIMPs (1 and 2) in patients with colorectal carcinoma. *J Surg Oncol.* 2006;93(2):151-60.
54. Chen Z, He X, Jia M, Liu Y, Qu D, Wu D, et al.  $\beta$ -catenin overexpression in the nucleus predicts progress disease and unfavourable survival in colorectal cancer: a meta-analysis. *PLoS ONE.* 2013;8(5):e63854.
55. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):178-96.
56. Pyke C, Salo S, Ralfkiaer E, Rømer J, Danø K, Tryggvason K. Laminin-5 is a marker of invading cancer cells in some human carcinomas and is coexpressed with the receptor for urokinase plasminogen activator in budding cancer cells in colon adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1995;55(18):4132-9.
57. Guzińska-Ustymowicz K. MMP-9 and cathepsin B expression in tumor budding as an indicator of a more aggressive phenotype of colorectal cancer (CRC). *Anticancer Res.* 2006;26(2B):1589-94.
58. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal

transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2000;2(2):76-83.

59. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2000;2(2):84-9.

60. De Craene B, Gilbert B, Stove C, Bruyneel E, van Roy F, Berx G. The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res.* 2005;65(14):6237-44.

61. Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, et al. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20):6566-78.

62. Ono H, Imoto I, Kozaki K, Tsuda H, Matsui T, Kurasawa Y, et al. SIX1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation. *Oncogene.* 2012;31(47):4923-34.

63. Zhang G-J, Zhou T, Tian H-P, Liu Z-L, Xia S-S. High expression of ZEB1 correlates with liver metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2013;5(2):564-8.

64. Kahlert C, Lahes S, Radhakrishnan P, Dutta S, Mogler C, Herpel E, et al. Overexpression of ZEB2 at the invasion front of colorectal cancer is an independent prognostic marker and regulates tumor invasion in vitro. *Clin Cancer Res.* 2011;17(24):7654-63.

65. Galván JA, Astudillo A, Vallina A, Crespo G, Folgueras MV, González MV. Prognostic and diagnostic value of epithelial to mesenchymal transition markers in pulmonary neuroendocrine tumors. *BMC Cancer.* 2014;14:855.

66. Dawson H, Koelzer VH, Karamitopoulou E, Economou M, Hammer C, Muller D-E, et al. The apoptotic and proliferation rate of tumour budding cells in colorectal cancer outlines a heterogeneous population of cells with various impacts on clinical outcome. *Histopathology.* 2014;64(4):577-84.

67. Koelzer VH, Karamitopoulou E, Dawson H, Kondi-Pafiti A, Zlobec I, Lugli A. Geographic analysis of RKIP expression and its clinical relevance in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2013;108(10):2088-96.

68. Rubio CA. Arrest of cell proliferation in budding tumor cells ahead of the invading edge of colonic carcinomas. A preliminary report. *Anticancer Res.* 2008;28(4C):2417-20.

69. Karamitopoulou E. Role of epithelial-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma: is tumor budding the missing link? *Front Oncol.*

2013;3:221.

70. Kang Y, Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*. 2004;118(3):277-9.

71. Koelzer VH, Zlobec I, Berger MD, Cathomas G, Dawson H, Dirschmid K, et al. Tumor budding in colorectal cancer revisited: results of a multicenter interobserver study. *Virchows Arch*. 2015;466(5):485-93.

72. Puppa G, Senore C, Sheahan K, Vieth M, Lugli A, Zlobec I, et al. Diagnostic reproducibility of tumour budding in colorectal cancer: a multicentre, multinational study using virtual microscopy. *Histopathology*. 2012;61(4):562-75.

73. Grigore AD, Jolly MK, Jia D, Farach-Carson MC, Levine H. Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *J Clin Med*. 2016;5(5).

74. van Wyk HC, Park J, Roxburgh C, Horgan P, Foulis A, McMillan DC. The role of tumour budding in predicting survival in patients with primary operable colorectal cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(2):151-9.

75. De Smedt L, Palmans S, Sagaert X. Tumour budding in colorectal cancer: what do we know and what can we do? *Virchows Arch*. 2016;468(4):397-408.

76. Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer--ready for diagnostic practice? *Hum Pathol*. 2016;47(1):4-19.

77. Koelzer VH, Zlobec I, Berger MD, Cathomas G, Dawson H, Dirschmid K, et al. Tumor budding in colorectal cancer revisited: results of a multicenter interobserver study. *Virchows Arch*. 2015;466(5):485-93.

78. Kai K, Aishima S, Aoki S, Takase Y, Uchihashi K, Masuda M, et al. Cytokeratin immunohistochemistry improves interobserver variability between unskilled pathologists in the evaluation of tumor budding in T1 colorectal cancer. *Pathol Int*. 2016;66(2):75-82.

79. Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol*. 2012;25(10):1315-25.

80. Nakamura T, Mitomi H, Kikuchi S, Ohtani Y, Sato K. Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2005;52(65):1432-5.

81. Lugli A, Karamitopoulou E, Zlobec I. Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012;106(11):1713-7.

82. Ogawa T, Yoshida T, Tsuruta T, Tokuyama W, Adachi S, Kikuchi M, et al. Tumor budding is predictive of lymphatic involvement and lymph node metastases in submucosal invasive colorectal adenocarcinomas and in non-polypoid compared with polypoid growths. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(5):605-14.
83. Kajiwara Y, Ueno H, Hashiguchi Y, Mochizuki H, Hase K. Risk factors of nodal involvement in T2 colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2010;53(10):1393-9.
84. Tomita S, Yamauchi M, Ichikawa K, Mitomi H, Fujimori T. [The brand new trend of colorectal carcinoma pathology]. *Nippon Rinsho*. 2014;72(1):63-70.
85. Rieger G, Koelzer VH, Dawson HE, Berger MD, Hädrich M, Inderbitzin D, et al. Comprehensive assessment of tumour budding by cytokeratin staining in colorectal cancer. *Histopathology*. 2017;70(7):1044-51.
86. Roh MS, Lee JI, Choi PJ. Tumor budding as a useful prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus*. 2004;17(4):333-7.
87. Koike M, Kodera Y, Itoh Y, Nakayama G, Fujiwara M, Hamajima N, et al. Multivariate analysis of the pathologic features of esophageal squamous cell cancer: tumor budding is a significant independent prognostic factor. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(7):1977-82.
88. Miyata H, Yoshioka A, Yamasaki M, Nushijima Y, Takiguchi S, Fujiwara Y, et al. Tumor budding in tumor invasive front predicts prognosis and survival of patients with esophageal squamous cell carcinomas receiving neoadjuvant chemotherapy. *Cancer*. 2009;115(14):3324-34.
89. Nakagawa Y, Ohira M, Kubo N, Yamashita Y, Sakurai K, Toyokawa T, et al. Tumor budding and E-cadherin expression are useful predictors of nodal involvement in T1 esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2013;33(11):5023-9.
90. Teramoto H, Koike M, Tanaka C, Yamada S, Nakayama G, Fujii T, et al. Tumor budding as a useful prognostic marker in T1-stage squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Surg Oncol*. 2013;108(1):42-6.
91. Nakanishi Y, Ohara M, Doumen H, Kimura N, Ishidate T, Kondo S. Correlation between tumor budding and post-resection prognosis in patients with invasive squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus. *World J Surg*. 2011;35(2):349-56.
92. Koelzer VH, Langer R, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding in upper gastrointestinal carcinomas. *Front Oncol*. 2014;4:216.

93. Thies S, Guldener L, Slotta-Huspenina J, Zlobec I, Koelzer VH, Lugli A, et al. Impact of peritumoral and intratumoral budding in esophageal adenocarcinomas. *Hum Pathol.* 2016;52:1-8.
94. Landau MS, Hastings SM, Foxwell TJ, Luketich JD, Nason KS, Davison JM. Tumor budding is associated with an increased risk of lymph node metastasis and poor prognosis in superficial esophageal adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2014;27(12):1578-89.
95. Almagush A, Karhunen M, Hautaniemi S, Salo T, Leivo I. Prognostic value of tumour budding in oesophageal cancer: a meta-analysis. *Histopathology.* 2016;68(2):173-82.
96. Olsen S, Linda J, Fields RC, Yan Y, Nalbantoglu Ilk. Tumor Budding in Intestinal Type Gastric Adenocarcinoma is Associated with Nodal Metastasis and Recurrence. *Hum Pathol.* 2017;68:26-33.
97. Almagush A, Karhunen M, Hautaniemi S, Salo T, Leivo I. Prognostic value of tumour budding in oesophageal cancer: a meta-analysis. *Histopathology.* 2016;68(2):173-82.
98. Che K, Zhao Y, Qu X, Pang Z, Ni Y, Zhang T, et al. Prognostic significance of tumor budding and single cell invasion in gastric adenocarcinoma. *Oncotargets Ther.* 2017;10:1039-47.
99. Almagush A, Salo T, Hagström J, Leivo I. Tumour budding in head and neck squamous cell carcinoma - a systematic review. *Histopathology.* 2014;65(5):587-94.
100. Luo W-R, Gao F, Li S-Y, Yao K-T. Tumour budding and the expression of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 in nasopharyngeal carcinoma. *Histopathology.* 2012;61(6):1072-81.
101. Sarioglu S, Acara C, Akman FC, Dag N, Ecevit C, Ikiz AO, et al. Tumor budding as a prognostic marker in laryngeal carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2010;206(2):88-92.
102. Almagush A, Coletta RD, Bello IO, Bitu C, Keski-Säntti H, Mäkinen LK, et al. A simple novel prognostic model for early stage oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(2):143-50.
103. Xie N, Wang C, Liu X, Li R, Hou J, Chen X, et al. Tumor budding correlates with occult cervical lymph node metastasis and poor prognosis in clinical early-stage tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2015;44(4):266-72.

104. Almagush A, Leivo I, Siponen M, Sundquist E, Mroueh R, Mäkitie AA, et al. Evaluation of the budding and depth of invasion (BD) model in oral tongue cancer biopsies. *Virchows Arch.* 2017; 472(2):231-6.
105. Pedersen NJ, Jensen DH, Lelkaitis G, Kiss K, Charabi B, Specht L, et al. Construction of a pathological risk model of occult lymph node metastases for prognostication by semi-automated image analysis of tumor budding in early-stage oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(11):18227-37.
106. Boxberg M, Jesinghaus M, Dorfner C, Mogler C, Drecoll E, Warth A, et al. Tumour budding activity and cell nest size determine patient outcome in oral squamous cell carcinoma: proposal for an adjusted grading system. *Histopathology.* 2017;70(7):1125-37.
107. Seki M, Sano T, Yokoo S, Oyama T. Tumour budding evaluated in biopsy specimens is a useful predictor of prognosis in patients with cN0 early stage oral squamous cell carcinoma. *Histopathology.* 2017;70(6):869-79.
108. Liang F, Cao W, Wang Y, Li L, Zhang G, Wang Z. The prognostic value of tumor budding in invasive breast cancer. *Pathol Res Pract.* 2013;209(5):269-75.
109. Salhia B, Trippel M, Pfaltz K, Cihoric N, Grogg A, Lädach C, et al. High tumor budding stratifies breast cancer with metastatic properties. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;150(2):363-71.
110. Li X, Wei B, Sonmez C, Li Z, Peng L. High tumor budding count is associated with adverse clinicopathologic features and poor prognosis in breast carcinoma. *Hum Pathol.* 2017;66:222-9.
111. Karamitopoulou E, Zlobec I, Born D, Kondi-Pafiti A, Lykoudis P, Mellou A, et al. Tumour budding is a strong and independent prognostic factor in pancreatic cancer. *Eur J Cancer.* 2013;49(5):1032-9.
112. O'Connor K, Li-Chang HH, Kalloger SE, Peixoto RD, Webber DL, Owen DA, et al. Tumor budding is an independent adverse prognostic factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(4):472-8.
113. Yamaguchi Y, Ishii G, Kojima M, Yoh K, Otsuka H, Otaki Y, et al. Histopathologic features of the tumor budding in adenocarcinoma of the lung: tumor budding as an index to predict the potential aggressiveness. *J Thorac Oncol.* 2010;5(9):1361-8.
114. Kadota K, Yeh Y-C, Villena-Vargas J, Cherkassky L, Drill EN, Sima CS, et al. Tumor Budding Correlates With the Protumor Immune Microenvironment and Is an Independent Prognostic Factor for Recurrence of Stage I Lung Adenocarcinoma. *Chest.* 2015;148(3):711-21.

115. Masuda R, Kijima H, Imamura N, Aruga N, Nakamura Y, Masuda D, et al. Tumor budding is a significant indicator of a poor prognosis in lung squamous cell carcinoma patients. *Mol Med Rep.* 2012;6(5):937-43.
116. Taira T, Ishii G, Nagai K, Yoh K, Takahashi Y, Matsumura Y, et al. Characterization of the immunophenotype of the tumor budding and its prognostic implications in squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer.* 2012;76(3):423-30.
117. Satabongkoch N, Khunamornpong S, Pongsuwareeyakul T, Settakorn J, Sukpan K, Soongkhaw A, et al. Prognostic Value of Tumor Budding in Early-Stage Cervical Adenocarcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(6):1717-22.
118. Huang B, Cai J, Xu X, Guo S, Wang Z. High-Grade Tumor Budding Stratifies Early-Stage Cervical Cancer with Recurrence Risk. *PLoS ONE.* 2016;11(11):e0166311.
119. Ohike N, Coban I, Kim GE, Basturk O, Tajiri T, Krasinskas A, et al. Tumor budding as a strong prognostic indicator in invasive ampullary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(10):1417-24.
120. Okado Y, Aoki M, Hamasaki M, Koga K, Sueta T, Shiratsuchi H, et al. Tumor budding and laminin5- $\gamma$ 2 in squamous cell carcinoma of the external auditory canal are associated with shorter survival. *Springerplus.* 2015;4:814.
121. Karayannopoulou G, Euvrard S, Kanitakis J. Tumour Budding Correlates with Aggressiveness of Cutaneous Squamous-cell Carcinoma. *Anticancer Res.* 2016;36(9):4781-5.
122. Fujimoto M, Yamamoto Y, Matsuzaki I, Warigaya K, Iwahashi Y, Kojima F, et al. Tumor budding is an independent risk factor for lymph node metastasis in cutaneous squamous cell carcinoma: a single center retrospective study. *J Cutan Pathol.* 2016;43(9):766-71.
123. Gonzalez-Guerrero M, Martínez-Cambolor P, Vivanco B, Fernández-Vega I, Munguía-Calzada P, Gonzalez-Gutierrez MP, et al. The adverse prognostic effect of tumor budding on the evolution of cutaneous head and neck squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2017;76(6):1139-45.
124. Garcia del Muro X, Torregrosa A, Muñoz J, Castellsagué X, Condom E, Vigués F, et al. Prognostic value of the expression of E-cadherin and beta-catenin in bladder cancer. *Eur J Cancer.* 2000;36(3):357-62.
125. Byrne RR, Shariat SF, Brown R, Kattan MW, Morton RA JR, Wheeler TM, et al. E-cadherin immunostaining of bladder transitional cell carcinoma, carcinoma in situ and lymph node metastases with long-term followup. *J Urol.* 2001;165(5):1473-9.

126. Yu Q, Zhang K, Wang X, Liu X, Zhang Z. Expression of transcription factors snail, slug, and twist in human bladder carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;29:119.
127. Breyer J, Gierth M, Shalekenov S, Aziz A, Schäfer J, Burger M, et al. Epithelial-mesenchymal transformation markers E-cadherin and survivin predict progression of stage pTa urothelial bladder carcinoma. *World J Urol.* 2016;34(5):709-16.
128. Zhao J, Dong D, Sun L, Zhang G, Sun L. Prognostic significance of the epithelial-to-mesenchymal transition markers e-cadherin, vimentin and twist in bladder cancer. *Int Braz J Urol.* 2014;40(2):179-89.
129. Khorrami MH, Hadi M, Gharaati MR, Izadpanahi MH, Javid A, Zargham M. E-cadherin expression as a prognostic factor in transitional cell carcinoma of the bladder after transurethral resection. *Urol J.* 2012;9(3):581-5.
130. Ning Z, Wu K, Fan J, Wang B, Lv C, Zhu J, et al. [Aberrant expressions of  $\beta$ -catenin and ZEB1 in bladder cancer and their significance]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2014;30(10):1080-3.
131. Fukumoto K, Kikuchi E, Mikami S, Ogihara K, Matsumoto K, Miyajima A, et al. Tumor budding, a novel prognostic indicator for predicting stage progression in T1 bladder cancers. *Cancer Sci.* 2016;107(9):1338-44.
132. Jimenez RE, Gheiler E, Oskanian P, Tiguert R, Sakr W, Wood DP, et al. Grading the invasive component of urothelial carcinoma of the bladder and its relationship with progression-free survival. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(7):980-7.
133. Krüger S, Noack F, Böhle A, Feller AC. Histologic tumor growth pattern is significantly associated with disease-related survival in muscle-invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Oncol Rep.* 2004;12(3):609-13.
134. Langner C, Hutterer G, Chromecki T, Rehak P, Zigeuner R. Patterns of invasion and histological growth as prognostic indicators in urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *Virchows Arch.* 2006;448(5):604-11.
135. Bircan S, Candir O, Kapucuoglu N. The effect of tumor invasion patterns on pathologic stage of bladder urothelial carcinomas. *Pathol Oncol Res.* 2005;11(2):87-91.
136. Nauseef JT, Henry MD. Epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer: paradigm or puzzle? *Nat Rev Urol.* 2011;8(8):428-39.

137. Khan MI, Hamid A, Adhami VM, Lall RK, Mukhtar H. Role of epithelial mesenchymal transition in prostate tumorigenesis. *Curr Pharm Des.* 2015;21(10):1240–8.
138. Ramnani D. Adenocarcinoma of Prostate – Gleason Score 5 + 5. WebPathology website. Recuperado el 27 de enero de 2018 de [www.webpathology.com](http://www.webpathology.com)
139. Ploeg M, Aben KKH, Kiemeny LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol.* 2009;27(3):289-93.
140. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(1):7-30.
141. Marcos-Gragera R, Mallone S, Kiemeny LA, Vilardell L, Malats N, Allory Y, et al. Urinary tract cancer survival in Europe 1999-2007: Results of the population-based study EUROCARE-5. *Eur J Cancer.* 2015;51(15):2217-30.
142. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA.* 2011;306(7):737-45.
143. Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract.* 2002;10(6):311-22.
144. Chrouser K, Leibovich B, Bergstralh E, Zincke H, Blute M. Bladder cancer risk following primary and adjuvant external beam radiation for prostate cancer. *J Urol.* 2005;174(1):107-10.
145. Salem HK, Mahfouz S. Changing patterns (age, incidence, and pathologic types) of schistosoma-associated bladder cancer in Egypt in the past decade. *Urology.* 2012;79(2):379-83.
146. Witjes JA, Compérat E, Cowan NC, Gakis G, Hernández V, Lebreton T et al. Guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer. European Association of Urology Guidelines. 2017. Disponible en: [www.uroweb.org](http://www.uroweb.org). Acceso: 11-09-2017.
147. Tamas EF, Nielsen ME, Schoenberg MP, Epstein JI. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the urinary tract: a clinicopathological study of 30 pure and mixed cases. *Mod Pathol.* 2007;20(8):828-34.
148. Yoshino T, Ohara S, Moriyama H. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the urinary bladder: a case report and review of the literature. *BMC Res Notes.* 2014;7:779.
149. Yang AW, Pooli A, Lele SM, Kim IW, Davies JD, LaGrange CA.

Lymphoepithelioma-like, a variant of urothelial carcinoma of the urinary bladder: a case report and systematic review for optimal treatment modality for disease-free survival. *BMC Urol.* 2017;17(1):34.

150. Ramnani D. Urothelial CA - Lymphoepithelioma-like. WebPathology website. Recuperado el 12 de diciembre de 2017 de [www.webpathology.com](http://www.webpathology.com)

151. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng AC, Boyd S, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol.* 2001;19(3):666-75.

152. Stein JP, Skinner DG. Radical cystectomy for invasive bladder cancer: long-term results of a standard procedure. *World J Urol.* 2006;24(3):296-304.

153. Dalbagni G, Genega E, Hashibe M, Zhang ZF, Russo P, Herr H, et al. Cystectomy for bladder cancer: a contemporary series. *J Urol.* 2001;165(4):1111-6.

154. Meeks JJ, Bellmunt J, Bochner BH, Clarke NW, Daneshmand S, Galsky MD, et al. A systematic review of neoadjuvant and adjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 2012;62(3):523-33.

155. Yin M, Joshi M, Meijer RP, Glantz M, Holder S, Harvey HA, et al. Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Two-Step Meta-Analysis. *Oncologist.* 2016;21(6):708-15.

156. Koppie TM, Vickers AJ, Vora K, Dalbagni G, Bochner BH. Standardization of pelvic lymphadenectomy performed at radical cystectomy: can we establish a minimum number of lymph nodes that should be removed? *Cancer.* 2006;107(10):2368-74.

157. Bi L, Huang H, Fan X, Li K, Xu K, Jiang C, et al. Extended vs non-extended pelvic lymph node dissection and their influence on recurrence-free survival in patients undergoing radical cystectomy for bladder cancer: a systematic review and meta-analysis of comparative studies. *BJU Int.* 2014;113(5b):E39-48.

158. Svatek RS, Shariat SF, Lasky RE, Skinner EC, Novara G, Lerner SP, et al. The effectiveness of off-protocol adjuvant chemotherapy for patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res.* 2010;16(17):4461-7.

159. Rosenberg JE, Carroll PR, Small EJ. Update on chemotherapy for advanced bladder cancer. *J Urol.* 2005;174(1):14-20.

160. Shariat SF, Karakiewicz PI, Palapattu GS, Lotan Y, Rogers CG, Amiel GE,

et al. Outcomes of radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: a contemporary series from the Bladder Cancer Research Consortium. *J Urol*. 2006;176:2414-22.

161. Patel MI, Bang A, Gillatt D, Smith DP. Contemporary radical cystectomy outcomes in patients with invasive bladder cancer: a population-based study. *BJU Int*. 2015;116 Suppl 3:18-25.

162. Madersbacher S, Hochreiter W, Burkhard F, Thalmann GN, Danuser H, Markwalder R, et al. Radical cystectomy for bladder cancer today--a homogeneous series without neoadjuvant therapy. *J Clin Oncol*. 2003;21(4):690-6.

163. Bruins HM, Huang GJ, Cai J, Skinner DG, Stein JP, Penson DF. Clinical outcomes and recurrence predictors of lymph node positive urothelial cancer after cystectomy. *J Urol*. 2009;182(5):2182-7.

164. Hernández-Fernández C, Herranz-Amo F, Moralejo-Gárate M, Subirá-Ríos D, Caño-Velasco J, Barbas-Bernardos G. Infiltrating bladder cancer: prognostic factors, follow-up and treatment of relapses. *Actas Urol Esp*. 2017;41(6):352-8.

165. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(6):1471-4.

166. Huguet J. Follow-up after radical cystectomy based on patterns of tumour recurrence and its risk factors. *Actas Urol Esp*. 2013;37(6):376-82.

167. Mitra AP, Quinn DI, Dorff TB, Skinner EC, Schuckman AK, Miranda G, et al. Factors influencing post-recurrence survival in bladder cancer following radical cystectomy. *BJU Int*. 2012;109(6):846-54.

168. Palapattu GS, Shariat SF, Karakiewicz PI, Bastian PJ, Rogers CG, Amiel G, et al. Cancer specific outcomes in patients with pT0 disease following radical cystectomy. *J Urol*. 2006;175(5):1645-9.

169. Kluth LA, Black PC, Bochner BH, Catto J, Lerner SP, Stenzl A, et al. Prognostic and Prediction Tools in Bladder Cancer: A Comprehensive Review of the Literature. *Eur Urol*. 2015;68(2):238-53.

170. Bolenz C, Herrmann E, Bastian PJ, Michel MS, Wülfing C, Tiemann A, et al. Lymphovascular invasion is an independent predictor of oncological outcomes in patients with lymph node-negative urothelial bladder cancer treated by radical cystectomy: a multicentre validation trial. *BJU Int*. 2010;106(4):493-9.

171. Kim H, Kim M, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Prognostic significance of

lymphovascular invasion in radical cystectomy on patients with bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e89259.

172. Fonteyne V, Ost P, Bellmunt J, Droz JP, Mongiat-Artus P, Inman B, et al. Curative Treatment for Muscle Invasive Bladder Cancer in Elderly Patients: A Systematic Review. *Eur Urol*. 2018;73(1):40–50.

173. Miller DC, Taub DA, Dunn RL, Montie JE, Wei JT. The impact of comorbid disease on cancer control and survival following radical cystectomy. *J Urol*. 2003;169(1):105-9.

174. Koppie TM, Serio AM, Vickers AJ, Vora K, Dalbagni G, Donat SM, et al. Age-adjusted Charlson comorbidity score is associated with treatment decisions and clinical outcomes for patients undergoing radical cystectomy for bladder cancer. *Cancer*. 2008;112(11):2384-92.

175. Liu S, Yang T, Na R, Hu M, Zhang L, Fu Y, et al. The impact of female gender on bladder cancer-specific death risk after radical cystectomy: a meta-analysis of 27,912 patients. *Int Urol Nephrol*. 2015;47(6):951-8.

176. Moschini M, Karnes RJ, Sharma V, Gandaglia G, Fossati N, Dell'Oglio P, et al. Patterns and prognostic significance of clinical recurrences after radical cystectomy for bladder cancer: A 20-year single center experience. *Eur J Surg Oncol*. 2016;42(5):735-43.

177. Soave A, John L-M, Dahlem R, Minner S, Engel O, Schmidt S, et al. The Impact of Tumor Diameter and Tumor Necrosis on Oncologic Outcomes in Patients With Urothelial Carcinoma of the Bladder Treated With Radical Cystectomy. *Urology*. 2015;86(1):92-8.

178. Svatek RS, Clinton TN, Wilson CA, Kamat AM, Grossman HB, Dinney CP, et al. Intravesical tumor involvement of the trigone is associated with nodal metastasis in patients undergoing radical cystectomy. *Urology*. 2014;84(5):1147-51.

179. Karakiewicz PI, Shariat SF, Palapattu GS, Gilad AE, Lotan Y, Rogers CG, et al. Nomogram for predicting disease recurrence after radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*. 2006;176:1354-61.

180. Eisenberg MS, Boorjian SA, Cheville JC, Thompson RH, Thapa P, Kaushik D, et al. The SPARC score: a multifactorial outcome prediction model for patients undergoing radical cystectomy for bladder cancer. *J Urol*. 2013;190(6):2005-10.

181. Lotan Y, Bagrodia A, Passoni N, Rachakonda V, Kapur P, Arriaga Y, et al. Prospective evaluation of a molecular marker panel for prediction of recurrence and cancer-specific survival after radical cystectomy. *Eur Urol*. 2013;64(3):465-

71.

182. Shariat SF, Bolenz C, Karakiewicz PI, Fradet Y, Ashfaq R, Bastian PJ, et al. p53 expression in patients with advanced urothelial cancer of the urinary bladder. *BJU Int.* 2010;105(4):489-95.

183. Tian Y, Ma Z, Chen Z, Li M, Wu Z, Hong M, et al. Clinicopathological and Prognostic Value of Ki-67 Expression in Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE.* 2016;11(7):e0158891.

184. 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;12:105-17.

185. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell.* 2014;25(2):152-65.

186. International Bladder Cancer Nomogram Consortium, Bochner BH, Kattan MW, Vora KC. Postoperative nomogram predicting risk of recurrence after radical cystectomy for bladder cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(24):3967-72.

187. Resezione trans uretrale della vescica. (s.f.). Società italiana di urologia (SIU) website. Recuperado el 9 de diciembre de 2017 de <http://www.siu.it/contents/view/243>

188. Poon, Rapoport, Hennessey, Mickelson, Hamidizadeh. Ileal conduit (s.f.). Metrovan Urology website. Recuperado el 9 de diciembre de 2017 de <http://www.metrovanurology.com/content/radical-cystectomy#Ileal>

189. Brierley JD, Gospodarowicz MK and Wittekind C. (2017) TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 8th edn. Oxford: Willey-Blackwell.

190. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognosticcomorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis.* 1987;40(5):373–83.

191. Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L. Immunohistochemistry in dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (part I). *Actas Dermosifiliogr.* 2013;104(2):99–127.

192. Tseng SC, Jarvinen MJ, Nelson WG, Huang JW, Woodcock-Mitchell J, Sun TT. Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies. *Cell*. 1982;30(2):361–72.
193. Siemerink MJ, Klaassen I, Vogels IMC, Griffioen AW, Van Noorden CJF, Schlingemann RO. CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis*. 2012;15(1):151–63.
194. Wood HB, May G, Healy L, Enver T, Morriss-Kay GM. CD34 expression patterns during early mouse development are related to modes of blood vessel formation and reveal additional sites of hematopoiesis. *Blood*. 1997;90(6):2300–11.
195. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*. 1990;75(12):2417–26.
196. Fukunaga M. Expression of D2-40 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumours. *Histopathology*. 2005;46(4):396–402.
197. Ordóñez NG. Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol*. 2006;13(2):83–8.
198. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med*. 1994;331(19):1259–64.
199. Yang C, Zhang J, Ding M, Xu K, Li L, Mao L, et al. Ki67 targeted strategies for cancer therapy. *Clin Transl Oncol*. 2017; doi: 10.1007/s12094-017-1774-3.
200. Chu PG, Weiss LM. Expression of cytokeratin 5/6 in epithelial neoplasms: an immunohistochemical study of 509 cases. *Mod Pathol*. 2002;15(1):6–10.
201. Shariat SF, Sfakianos JP, Droller MJ, Karakiewicz PI, Meryn S, Bochner BH. The effect of age and gender on bladder cancer: a critical review of the literature. *BJU Int*. 2010;105(3):300–8.
202. Prout GR, Wesley MN, Yancik R, Ries LAG, Havlik RJ, Edwards BK. Age and comorbidity impact surgical therapy in older bladder carcinoma patients: a population-based study. *Cancer*. 2005;104(8):1638–47.
203. Fitzpatrick JM, Reda M. Bladder carcinoma in patients 40 years old or less. *J Urol*. 1986;135(1):53–4.
204. Dehayni Y, Tetou M, Khdach Y, Janane A, Alami M, Ameer A. Prognostic of older age for patients with invasive-muscle-bladder cancer and treated by radical cystectomy. *Prog Urol*. 2018 Mar;28(3):166–72.

205. Kamat AM, Hegarty PK, Gee JR, Clark PE, Svatek RS, Hegarty N, et al. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Screening, diagnosis, and molecular markers. *Eur Urol*. 2013;63(1):4–15.
206. Bajorin DF, Dodd PM, Mazumdar M, Fazzari M, McCaffrey JA, Scher HI, et al. Long-term survival in metastatic transitional-cell carcinoma and prognostic factors predicting outcome of therapy. *J Clin Oncol*. 1999;17(10):3173–81.
207. von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(21):4602–8.
208. Leissner J, Koeppen C, Wolf HK. Prognostic significance of vascular and perineural invasion in urothelial bladder cancer treated with radical cystectomy. *J Urol*. 2003;169(3):955–60.
209. Hong SK, Kwak C, Jeon HG, Lee E, Lee SE. Do vascular, lymphatic, and perineural invasion have prognostic implications for bladder cancer after radical cystectomy? *Urology*. 2005 Apr;65(4):697–702.
210. Muppa P, Gupta S, Frank I, Boorjian SA, Karnes RJ, Thompson RH, et al. Prognostic significance of lymphatic, vascular and perineural invasion for bladder cancer patients treated by radical cystectomy. *Pathology*. 2017;49(3):259–66.
211. Gakis G, Todenhöfer T, Braun M, Fend F, Stenzl A, Perner S. Immunohistochemical assessment of lymphatic and blood vessel invasion in T1 urothelial carcinoma of the bladder. *Scand J Urol*. 2015;49(5):382–7.
212. Martini T, Ströbel P, Steidler A, Petrakopoulou N, Erben P, Bolenz C. [Detection of lymphovascular invasion in urothelial carcinoma of the bladder through D2-40 immunostaining]. *Urologe A*. 2015 Jan;54(1):70–5.
213. Wang C, Huang H, Huang Z, Wang A, Chen X, Huang L, et al. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2011;40(7):545–51.
214. Thies S, Guldener L, Slotta-Huspenina J, Zlobec I, Koelzer VH, Lugli A, et al. Impact of peritumoral and intratumoral budding in esophageal adenocarcinomas. *Hum Pathol*. 2016;52:1–8.
215. Monzó Gardiner JI, Herranz Amo F, Díez Cordero JM, Cabello Benavente R, Silmi Moyano A, Hernández Fernández C. [Prognostic factors for survival in patients with transitional bladder cancer treated with radical cystectomy]. *Actas Urol Esp*. 2009;33(3):249–57.

216. Frazier HA, Robertson JE, Dodge RK, Paulson DF. The value of pathologic factors in predicting cancer-specific survival among patients treated with radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder and prostate. *Cancer*. 1993;71(12):3993–4001.
217. VAN Bruwaene S, Costello AJ, VAN Poppel H. Prognosis of node-positive bladder cancer in 2016. *Minerva Urol Nefrol*. 2016;68(2):125–37.
218. 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(1):96–108.
219. Leão PLR, Marangon Junior H, Melo VVM, Caixeta ÂB, Souza PEA, de Aguiar MCF, et al. Reproducibility, repeatability, and level of difficulty of two methods for tumor budding evaluation in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2017;46(10):949–55.
220. Raj GV, Karavadia S, Schlomer B, Arriaga Y, Lotan Y, Sagalowsky A, et al. Contemporary use of perioperative cisplatin-based chemotherapy in patients with muscle-invasive bladder cancer. *Cancer*. 2011;117(2):276–82.
221. Porter MP, Kerrigan MC, Donato BMK, Ramsey SD. Patterns of use of systemic chemotherapy for Medicare beneficiaries with urothelial bladder cancer. *Urol Oncol*. 2011;29(3):252–8.