

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL II – MORFOLOGIE MICROSCOPICĂ**

MIHAI IOANA-MARIA



**CONTRIBUȚII LA STUDIUL UNOR MARKERI IMPLICAȚI ÎN
DIAGNOSTICUL, STADIALIZAREA, EVALUAREA
PROGNOSTICULUI ȘI TERAPIA CANCERULUI DE VEZICĂ
URINARĂ**

REZUMAT

Conducător științific
PROF. UNIV. DR. DEMA ALIS LILIANA CARMEN

**Timișoara
2023**

CUPRINS

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE	VI
LISTA CU ABREVIERI ȘI SIMBOLURI	VII
LISTA FIGURILOR	XII
LISTA TABELELOR	XV
MULȚUMIRI	XVIII
INTRODUCERE	XIX
PARTEA GENERALĂ	1
1. Considerații clinico-epidemiologice privind tumorile de vezică urinară	1
1.1. Epidemiologia cancerului de vezică urinară	1
1.2. Etiopatogeneza cancerului de vezică urinară	2
1.3. Patogeneza cancerului de vezică urinară	6
1.4. Manifestările clinice ale cancerului de vezică urinară	7
2. Diagnosticul tumorilor de vezică urinară	8
2.1. Examenul clinic	8
2.2. Examinarea imagistică	8
2.3. Citologia urinară și markerii tumorali urinari	8
2.4. Cistoscopia	9
2.5. Biopsia și TUR-TV	10
3. Aspecte macroscopice și microscopice ale carcinoamelor de vezică urinară	12
3.1. Carcinomul urotelial convențional	12
3.2. Carcinomul urotelial cu diferențiere divergentă	13
3.3. Alte variante de carcinoame uroteliale de vezică urinară	14
3.4. Gradul de diferențiere al carcinoamelor de vezică urinară	17
3.5. Stadializarea TNM	17
3.6. Clasificarea moleculară a tumorilor de vezică urinară	21
4. Principii de terapie în carcinoamele de vezică urinară	30
4.1. Tratamentul chirurgical	30
4.2. Radioterapia	31
4.3. Chimioterapie	31
4.4. Imunoterapie	32
4.5. Riscul de recurență și progresie a cancerului de vezică urinară	35
PARTEA SPECIALĂ	37
5. CORELAȚII CLINICO - PATOLOGICE ÎN CARCINOAMELE PRIMARE DE VEZICĂ URINARĂ	37
5.1. Introducere	37
5.2. Material și metodă	37
5.3. Rezultate	40
5.4. Discuții	62
6. EVALUAREA UNOR MARKERI IMUNOHISTOCHIMICI CU ROL ÎN STADIALIZAREA CARCINOMULUI UROTELIAL DIAGNOSTICAT ÎN SPECIMENE DE REZECȚIE TRANSURETRALĂ DE VEZICĂ URINARĂ	71
6.1. Introducere	71
6.2. Materialul de studiu și metoda de lucru	72
6.3. Rezultate	74
6.4. Discuții	82

7. EVALUAREA UNOR MARKERI IMUNOHISTOCHIMICI CU VALOARE POTENȚIALĂ PENTRU IDENTIFICAREA SUBTIPURILOR MOLECULARE DE CARCINOAME UROTELIALE MUSCULO-INVAZIVE	86
7.1. Introducere	86
7.2. Material și metodă	86
7.3. Rezultate	89
7.4. Discuții	97
CONCLUZII	103
BIBLIOGRAFIE	107
ANEXE	I
ARTICOLELE PUBLICATE IN EXTENSO	IX

INTRODUCERE

Tumorile vezicale (TV) maligne ocupă un rol important în patologia aparatului genitourinar. O ușoară creștere a numărului de cazuri de cancer de vezică urinară (VU) a fost observată în ultimii 10 ani la nivel global [1]. Ultima raportare statistică publicată în 2020 de Agenția Internațională pentru Cercetarea în Cancer (IARC) a estimat că în România, cancerul de VU a fost a 5-a cea mai frecventă afecțiune malignă [1].

Cea mai importantă clasificare a cancerului de VU, din perspectiva terapiei și a evoluției bolii, este cea care împarte aceste tumori în carcinoame vezicale non-musculo-invazive (NMIBC) și carcinoame vezicale musculo-invazive (MIBC). Chiar dacă supraviețuirea este una bună pentru pacienții cu NMIBC, mai mult de jumătate (60%) dintre aceștia vor prezenta recurențe în următorii 5 ani, iar 20% vor progresa spre MIBC. În schimb, MIBC, definite ca tumori care infiltrază musculara proprie (MP) a VU reprezintă o formă agresivă de cancer, cu capacitate crescută de invazie și de metastazare [2]. Astfel, identificarea invaziei tumorale în MP reprezintă un criteriu esențial pentru tratamentul, evoluția și prognosticul pacienților cu cancer de VU și totodată un subiect larg dezbătut în comunitatea medicală.

Progresele realizate în domeniul biologiei moleculare și în descifrarea carcinogenezei neoplasmelor vezicale, au deschis era medicinei personalizate în cazul pacienților cu carcinoame de VU. Diverse grupuri de cercetători implicați în studierea caracteristicilor moleculare ale MIBC au propus diferite clasificări moleculare, fără însă a ajunge la un consens până în momentul de față. Pentru a putea fi aplicate în practica clinică, aceste clasificări moleculare trebuie să fie validate, standardizate și unanim acceptate.

Progrese remarcabile în terapia carcinoamelor de VU (CVU) s-au realizat în ultimile decenii prin introducerea imunoterapiei (imunoterapia cu inhibitori ai punctelor de control imun – ICI). Agenția Europeană pentru Medicamente (EMA) și Administrația Alimentelor și Medicamentelor din SUA (FDA) au aprobat pembrolizumab, atezolizumab, nivolumab, avelumab și durvalumab pentru tratamentul de linie a doua a pacienților adulți cu carcinom urotelial (CU) [3].

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Principalele *scopuri* pe care le-am urmărit în elaborarea tezei doctorale au fost de a aduce contribuții la managementul pacienților cu CU, de a identifica factori histopatologici cu potențială valoare pentru prognosticul și terapia acestei neoplazii.

Pentru realizarea acestor scopuri, am avut ca *obiective* principale:

- creionarea unui profil clinico-morfologic al pacienților cu cancer de VU diagnosticați într-un centru de referință din zona de vest a țării;
- evaluarea unor markeri IHC cu valoare potențială pentru stadializarea cazurilor dificile de carcinoame infiltrative de VU;
- analiza unor markeri, determinați prin metode ieftine, ușor aplicabile în practica de rutină în laboratoarele de anatomie patologică, utili pentru încadrarea CU în clase moleculare cu valoare prognostică și predictivă.

Pentru a îndeplini obiectivele principale stabilite, am realizat următoarele studii:

- În primul studiu am analizat principalele caracteristici ale cazurilor de carcinom de VU diagnosticate într-o perioadă de timp de 5 ani în Serviciul de Anatomie Patologică (SAP) al Spitalului Clinic Județean de Urgență “Pius Brînzeu” Timișoara (SCJUPBT).
- În al doilea studiu am analizat valoarea markerilor IHC smoothelin și actină mușchi neted (SMA) în vederea utilizării acestora în cazurile de carcinoame infiltrative de VU la care încadrarea pT1 vs. pT2 este problematică în speciemenle de TUR.
- În cel de-al treilea studiu am testat panelul de markeri IHC: GATA3, CK5/6, p16 și FGFR3 ca metodă surogat pentru clasificarea moleculară a MIBC.

- În ultimul studiu am analizat expresia PD-L1 în carcinoamele de VU, ca potențial marker predictiv pentru răspunsul la imunoterapie al fiecărei clase moleculare din cele identificate prin utilizarea markerilor IHC.

Cuvinte cheie: cancer de vezică urinară, IHC, smoothelin, SMA, clasificare moleculară, subclase moleculare, GATA3, p16, CK5/6, FGFR3, PD-L1.

PARTEA GENERALĂ

Potrivit datelor OMS din 2020, în România, cancerul de VU reprezenta al 5-lea cel mai frecvent tip de cancer, după cel colorectal, de plămân, sân și prostată. Rata estimată a incidenței (la 100,000 de locuitori) pentru această neoplazie, pe plan național, este de 12,2 iar cea a mortalității de 3,5. Totodată, cancerul de VU este a 9-a cauză de deces prin boală neoplazică din România [1]. Cancerul de VU afectează cu precădere bărbații vârstnici, vârsta medie la diagnostic fiind de 65-70 de ani [4].

Încadrarea corectă a tumorii primare de VU, din punct de vedere al parametrului pT, este fundamentală pentru aprecierea prognosticului și pentru stabilirea conduitei terapeutice adecvate la pacienții cu această neoplazie [5]. Evaluarea profunzimii invaziei tumorale în peretele VU se face, în principal, în momentul diagnosticului, pe speciemenle de TUR-TV. Dacă tumora infiltrază lamina propria (LP) (pT1), pacientul este, cel mai probabil, candidat pentru tratament conservator al tumorii, în timp ce un diagnostic clar de invazie a MP (pT2) reprezintă o recomandare standard pentru o terapie agresivă, cel mai adesea cistectomie radicală (CR) [5–7]. Totuși, există situații în care pot apărea erori de diagnostic datorită dificultății de a diferenția MM hipertrofiată și MP sau o stromă tumorală desmoplazică de MP. Pentru a evita aceste situații, au fost testați diverși markerii IHC pentru a încerca diferențierea celor două structuri (MM și MP), rezultate publicate în literatură fiind variate [8–17].

Clasificarea moleculară a MIBC, dezvoltată prin metode similare cu cele folosite pentru cancerul de sân, include două clase majore (bazal și luminal) și s-a extins ulterior la șase clase, conform unui studiu publicat în 2020 [18]. Aceste clase, cu trăsături histologice, mecanisme oncogenice și evoluție clinică diferite, păstrează parțial caracteristicile clasificărilor anterioare și introduc clase noi. Un obiectiv actual în patologia genitourinară este stabilirea unui panel unic, universal și standardizat de markeri IHC pentru identificarea claselor moleculare de MIBC și integrarea acestuia în diagnosticul histopatologic de rutină.

Imunoterapia neoadjuvantă utilizează ICI și este aprobată ca monoterapie sau în combinație cu chimioterapia în tratamentul CU [19]. Testarea IHC a PD-L1 este necesară pentru selectarea pacienților eligibili pentru tratamentul cu ICI [20], însă variabilitatea rezultatelor privind expresia IHC a PD-L1, în diferite studii clinice, fac dificilă introducerea acestor determinări în practica de zi cu zi. Rezultatele discrepante ale acestor studii sunt legate de clonele diferite de anticorpi, de diferitele platforme automate utilizate pentru colorare și de variabilitatea algoritmilor de interpretare și cuantificare a reacției IHC (expresia în celulele immune și/sau tumorale) [3].

PARTEA SPECIALĂ

1. CORELAȚII CLINICO - PATOLOGICE ÎN CARCINOAMELE PRIMARE DE VEZICĂ URINARĂ

Acest studiu retrospectiv a vizat analiza CVU diagnosticate și/sau tratate într-un spital cu adresabilitate mare pentru această patologie, într-un interval de timp de 5 ani, din perspectiva principalilor parametri clinico-demografici și histopatologici.

Material și metodă

Au fost selectate din arhiva digitală a SAP al SCJUPBT, cazurile de CVU diagnosticate în intervalul ianuarie 2016 - decembrie 2020. Au fost excluse cazurile de tumori recidivate sau secundare de VU. Tipul histologic de carcinom și gradul de diferențiere au fost stabilite pe baza clasificării OMS, ediția a 4-a (2016) [4], iar stadializarea patologică a fost realizată în acord cu sistemul pTNM AJCC, ediția a 8-a [7].

Studiul a fost divizat în două părți. Prima parte a inclus evaluarea parametrilor generali (clinico-demografici) și repartitia pe ani a cazurilor de CVU iar în a doua parte cazurile au fost încadrate în două subloturi:

- sublotul I a cuprins cazurile de CVU diagnosticate în specimene de biopsie și TUR-TV și - sublotul II a fost format din cazurile care au avut diagnostic histopatologic stabilit pe piese de exereză).

La cazurile la care s-au identificat în baza de date pacienți diagnosticați în specimene de biopsie sau TUR-TV care au precedat rezecția chirurgicală, am efectuat o analiză comparativă a parametrilor morfologici între pe cele două tipuri de specimene (biopsie/TUR-TV vs. piesa de rezecție).

Rezultate

În intervalul de timp analizat au fost identificate 821 de cazuri de CVU diagnosticate în SAP al SCJUPBT. Analiza distribuției cazurilor de CVU în funcție de grupa de vârstă și de sexul pacienților a arătat că cei mai mulți pacienți diagnosticați cu această neoplazie au avut vârste cuprinse în intervalul 60 – 69 de ani (33,37%) și 70 – 79 de ani (32,52%). La polul opus, cele mai puține cazuri au fost observate la grupele de vârstă 20 – 29 de ani (0,24%) și 30 – 39 de ani (1,21%). Indiferent de grupa de vârstă analizată, numărul pacienților de sex masculin a fost constant mai mare față de cel al pacienților de sex feminin. Incidența cea mai mare a tumorilor vezicale la bărbați a fost observată la grupa de vârstă 60 – 69 de ani (27,28%), iar la femei la grupa de vârstă 70 – 79 de ani (6,33%).

Sublotul I a inclus 737 de cazuri de CVU diagnosticate pe material tisular prelevat prin biopsie și TUR-TV, dintre care 7 cazuri (0,95%) au fost diagnosticate în specimene de biopsie și 730 de cazuri (99,05%) în specimene de TUR-TV. Majoritatea cazurilor au fost CU (99,05%). Din punctul de vedere al clasificării pTNM, majoritatea tumorilor (40,30%), au fost încadrate pTa, urmate fiind de tumorile pT1 (38,26%) și de tumorile pT2 (18,18%). Au fost identificate 7 cazuri (0,94%) de CVU non-uroteliale: 3 cazuri de NEC cu celule mici, 3 cazuri de SCC și 1 caz de ADK cu celule clare.

Raportat la numărul total de cazuri incluse în sublotul I de studiu (n=737) am remarcat că în cele mai multe cazuri CU convenționale au fost NMIBC (64,99%) și nu au prezentat LVI (69,6%), PNI (71,64%) sau leziuni asociate de CIS (64,17%).

Un număr mai mic de cazuri au fost clasificate ca MIBC (18,19%). Aceste tumori au predominat la sexul masculin, toate au fost de grad înalt (HG), iar cele mai multe cazuri au fost CU cu diferențiere divergentă (8,27%). În grupul MIBC s-a notat prezența LVI (78%) și a PNI (2,44%) într-un procent mai mare față de grupul NMIBC (LVI: 2,44% și PNI: 0,14%).

Invazia limfovasculară (LVI) a constituit un parametru de agresivitate identificat exclusiv în tumorile HG (68 de cazuri – 9,23%). Au fost identificate 13 cazuri (1,76%) de TUR-TV/biopsie care au prezentat atât aspecte de LVI cât și de PNI și 42 de cazuri (5,70%) unde au fost raportate aspecte de LVI și leziuni asociate de CIS concomitente.

Sublotul II a fost alcătuit din 84 de carcinoame vezicale diagnosticate pe piese chirurgicale de rezecție. Invazia tumorală cu depășirea peretelui VU a fost observată cel mai frecvent la cazurile de CU cu diferențiere divergentă (38,09%). În CU convenționale s-a observat un număr semnificativ mai mare de cazuri cu invazie tumorală limitată la peretele VU (19,04%). Invazia perineurală a fost identificată cu precădere la cazurile de CU cu diferențiere divergentă (34,52%), iar cele mai multe cazuri în care limitele de rezecție chirurgicală au fost pozitive au aparținut grupului de CU cu diferențiere divergentă (10,71%). În cazul tuturor tumorilor încadrate NEC/SCC invazia tumorală a depășit peretele VU și au fost identificate aspecte de PNI. Trei din cele 4 cazuri de NEC/SCC (3,57% din totalul tumorilor analizate) au prezentat limite pozitive de rezecție chirurgicală. Luând în calcul parametrii cu impact asupra statusului limfonodal, am remarcat faptul că cele mai multe cazuri pN+ au fost tumori pT3a-pT4b (41,43%) și au asociat mai frecvent aspecte de LVI (42,86%) și PNI (38,57%).

Au fost identificate 45 de cazuri (53,57%) de TV care au beneficiat de cistectomie (sublotul II) și care au avut TUR-TV anterioare, realizate în SCJUPBT. Dintre acestea, 60% și-au păstrat nemodificată încadrarea histologică iar în 40% din cazuri, diagnosticul stabilit pe piesa de CR a fost diferit. În 15,55% din cazuri a existat concordanță între parametrul pT stabilit în

specimenul de TUR-TV și cel stabilit pe piesa de CR. Cele mai multe cazuri (82,22%) de tumori diagnosticate în specimene de TUR-TV au fost subevaluate din punctul de vedere al profunzimii invaziei.

2. EVALUAREA UNOR MARKERI IMUNOHISTOCHIMICI CU ROL ÎN STADIALIZAREA CARCINOMULUI UROTELIAL DIAGNOSTICAT ÎN SPECIMENE DE REZECȚIE TRANSURETRALĂ DE VEZICĂ URINARĂ

Scopul studiului de față a fost de a analiza valoarea și aplicabilitatea markerului smoothelin în vederea îmbunătățirii stadializării CVU în speciemenle de TUR-TV. Studiul a vizat în primul rând standardizarea metodei de determinare a markerului smoothelin, iar apoi investigarea expresiei și valorii acestuia în diferite circumstanțe.

Material și metodă

Am realizat 3 studii: unul prospectiv și două retrospective. Partea prospectivă a studiului a presupus prelevarea a câte trei fragmente de perete vezical netumoral/caz, din 9 piese de cistectomie. De la 12 cazuri de colectomie a fost selectată câte o secțiune de colon netumoral. Pentru partea retrospectivă a studiului am folosit baza de date electronică a SAP al SCJUPBT. În primul studiu retrospectiv (care a vizat cazuri de TV din anul 2017), am căutat toate cazurile de cistectomie parțială, cistoprostatectomie sau pelvectomie la care diagnosticul de CVU cu invazie neechivocă a MP a fost stabilit anterior în specimene de TUR-TV realizată tot în SCJUPBT. Dintre acestea au fost selectate 12 cazuri de TUR-TV. În al doilea studiu retrospectiv am căutat și am selectat 33 de cazuri de carcinoame vezicale diagnosticate în specimene de TUR-TV (în intervalul 2017 - 2018) cu încadrare echivocă a profunzimii invaziei tumorale.

Au fost folosiți următorii anticorpi primari: anti-smoothelin (R4A; diluție 1: 100; Thermo Fisher; Waltham, MA USA) și anti-SMA (HHF35; RTU; Cell Marque; The Hague, NL). Demascarea antigenului s-a realizat prin fierbere (heat-induced epitope retrieval - HIER), utilizând soluția Retrieval 1 (Bond Epitope Retrieval Solution 1 – ERS1), pH 6.0. Au fost evaluate diferite diluții ale anticorpului concentrat smoothelin, fiind aleasă diluția de 1:100. Secțiunile de colon și de VU netumorale care includeau MP adecvată au fost utilizate pentru controlul pozitiv al markerului smoothelin, iar celulele musculare netede vasculare au fost utilizate ca și control intern pentru SMA.

Atât expresia smoothelin, cât și expresia SMA au fost evaluate într-o manieră semicantitativă, după modelul indicat de Paner și colab. [9]. Am evaluat intensitatea reacției (absentă, slabă, moderată și puternică) și extinderea acesteia (absent <5% celule musculare marcate; focală = reacție pozitivă în 5% - 10% celule musculare marcate; heterogenă = 11% până la 50% celule musculare marcate și difuză >50% celule musculare marcate). Am utilizat un scor care ia în considerare atât procentul de celule pozitive, cât și intensitatea colorării, după cum urmează: 1 (+): orice colorare slabă sau focală; 2 (+): colorare moderată și heterogenă sau difuză, sau colorare puternică, dar heterogenă; și 3 (+): colorare puternică și difuză. Pe preparatele care au inclus secțiuni complete de perete de VU, interpretarea IHC a modelului de colorare a vizat cu precădere stratul muscular intern al MP, deoarece acestea sunt fasciculele musculare netede incluse de regulă în speciemenle TUR-TV.

Rezultate

Expresia smoothelin și SMA în fragmentele de vezică urinară și de colon netumoral (probele pentru controlul pozitiv)

Expresia smoothelin pe preparatele de VU netumorale a fost următoarea: MM nu a exprimat markerul în 8/14 cazuri (57%) și în 6/14 cazuri (43%) s-a observat un scor de colorare 1+ la acest nivel; expresia smoothelin în MP a avut un scor de 1+ în 2/14 cazuri (14%), 2+ în 7/14 cazuri (50%) și 3+ în 5/14 cazuri (36%). La evaluarea comparativă a celor două compartimente de pe aceeași lamă, am remarcat că în toate cele 14 cazuri, reacția pentru smoothelin a avut o intensitate de colorare mai puternică la nivelul MP decât la nivelul MM. Marcajul SMA al MM din fragmentele de VU netumorală a avut un scor de 2+ în 4/14 cazuri (29%) și 3+ în 10/14 cazuri (71%); în cazul MP am obținut următoarele scoruri: 2+ în 5/14 cazuri

(36%) și 3+ în 9/14 cazuri (64%). În aproape toate cazurile, expresia SMA a prezentat o intensitate și un model de colorare similar în MM și în MP ($r = 0,9859$; $p=0.014$), cu o intensitate de marcaj mai mare în comparație cu marcajul pentru smoothelin.

În ceea ce privește cele 12 cazuri de perete de colon netumoral, smoothelin a fost negativ în MM din 6 (50%), iar în celelalte 6 (50%), scorul a fost de 1+. Referitor la MP, scorurile de marcaj pentru smoothelin au fost de 1+ în 6 (50%), 2+ în 3 cazuri (25%) și 3+ în 3 cazuri (25%). Atât straturile interne cât și cele externe ale MP din toate cele 12 cazuri de colon netumoral au exprimat un marcaj omogen pentru acest marker IHC. Diferența de intensitate a marcajului pentru smoothelin, între MM și MP, a fost întotdeauna prezentă și în favoarea fasciculelor musculare din MP ($p=0.001$). Vasele din LP nu au prezentat reactivitate pentru smoothelin.

Scorul de colorare pentru SMA în cazul MM din porțiunile netumorale de colon a fost de 2+ în 5 cazuri (42%) și 3+ în 7 cazuri (5%), iar în cazul MP am obținut un scor de colorare 2+ în 8 cazuri (67%) și 3+ în 4 cazuri (33%).

Evaluarea profunzimii invaziei tumorale și a expresiei markerilor smoothelin și SMA în cazurile de TUR-TV cu încadrare neechivocă a profunzimii invaziei

Am obținut următoarele rezultate ale marcajului cu smoothelin în MM: negativ în 8/12 cazuri (67%) și 1+ în 4/12 cazuri (33%). Expresia smoothelin în MP a avut un scor de 1+ la 4/12 cazuri (33%), 2+ la 7/12 cazuri (58%) și 3+ la 1/12 cazuri (9%). Marcajul vaselor din LP a avut scor 1+ în 4/12 cazuri (33%), iar 8/12 cazuri (67%) au fost lipsite de reactivitate. În 1/12 cazuri (9%) de TUR-TV am observat fascicule de MP cu artefacte de cauterizare în care expresia smoothelin din fibrele musculare a fost păstrată (2+).

Într-un caz din cele 12 (9%), SMA a avut un scor de expresie IHC de 2+ atât în MM, cât și în MP. Celelalte 11 cazuri (91%) au prezentat o imunoreactivitate difuză și puternică pentru SMA, atât în MM, cât și în MP.

Pe lamele colorate HE în 7 din cele 12 cazuri de TUR-TV (58%) analizate, unele fragmente infiltrate tumoral erau dificil de interpretat, deoarece morfologic nu se putea diferenția reacția desmoplazică stromală de infiltrarea tumorală a MP. Evaluarea IHC a acelor arii a arătat o reacție negativă pentru smoothelin și o colorare puternică și difuză pentru SMA. Aceleași 7 specimene de TUR-TV colorate cu anti-smoothelin prezentau concomitent, pe alte chips-uri rezecate, la nivelul fasciculelor de MP neechivoce, un scor de expresie IHC de 1+ în 2 cazuri, 2+ în 4 cazuri și 3+ într-un caz, iar pentru MM următoarele scoruri: negativ în 5 cazuri și 1+ în 2 cazuri.

Expresia smoothelin și a SMA în cazurile de tumori vezicale diagnosticate în specimene de TUR-TV, cu încadrare echivocă privind parametrul pT

Acolo unde a fost posibil, am analizat chips-urile de TUR-TV fără infiltrare tumorală de la același caz și am identificat 16/33 cazuri (48%) cu MM hiperplazică, care a exprimat smoothelin după cum urmează: 4/16 - negativ, 9/16 - 1+ și 3/16 - 2+. Cazurile cu MM non-hiperplazică (17/33 - 52%) au avut expresii IHC similare: 6/17 negativ, 9/17 - 1+ și 2/17 - 2+. În 4/33 cazuri (12%) nu s-a identificat MP, iar în celelalte 29/33 cazuri (88%), MP a prezentat următoarele scoruri de marcaj pentru smoothelin: 3+ în 14/29 de cazuri (48%), 2+ în 12/29 de cazuri (41%) și 1+ în 3/29 de cazuri (10%). Trei cazuri de TUR-TV cu tumoră situate în zona trigonului au prezentat o expresie 2+ a markerului smoothelin la nivelul fibrelor musculare superficiale. Ca urmare, acestea au fost catalogate ca fiind MP. În niciunul dintre cazuri smoothelin nu a arătat o intensitate mai mare a colorării la nivelul MM comparativ cu MP. Pentru a distinge între MM și MP, smoothelin a avut o sensibilitate de 100% și o specificitate de 53% ($p=0.048$).

Nu am observat nicio modificare remarcabilă a patternului de colorare a smoothelin-ului în cele 3/33 (9%) cazuri de specimene de TUR-TV care prezentat artefacte de cauterizare a fibrelor musculare din MP infiltrate tumoral sau neinfiltrate tumoral.

Peste jumătate din cazurile de TUR-TV - 21/33 (64%) au avut un scor de 1+ pentru smoothelin la nivelul vaselor din LP. În restul de 12/33 cazuri (36%) nu s-a semnalat marcaj IHC al vaselor din LP. Coeficientul de corelație ($r=0,9604$) a arătat o corelație pozitivă puternică, semnificativă statistic ($p=0.009$) între marcajul pentru smoothelin în MM și cel din fibrele musculare netede ale vaselor din specimenele de TUR-TV cu invazie echivocă. Marcajul pentru SMA a fost semnalat atât în MM cât și în MP la lotul analizat.

În 16/33 de cazuri la care profunzimea invaziei a fost echivocă (48%), dificultatea stabilirii acestui parametru pe lamele colorate cu HE a fost determinată de imposibilitatea diferențierii stromei desmoplazice dense de invazia MP. Analiza IHC a cazurilor respective a arătat un marcaj SMA cu scor 2+ în 3 cazuri și cu scor 3+ în 19 cazuri, în condițiile în care reactivitatea pentru smoothelin a fost absentă în aceste arii. În aceste cazuri s-a semnalat marcajul cu smoothelin a MP de pe diferite alte chipsuri TUR-TV, după cum urmează: expresie 1+ într-un caz, 2+ în 5/16 cazuri, 3+ în 8/16 cazuri; 2 cazuri nu au prezentat MP (în ambele cazuri, imunomarcajul cu smoothelin din MM a exprimat un scor de 1+).

Celelalte cazuri echivoce au ridicat probleme de diagnostic cu privire la diferențierea MM hiperplazice de MP (9/33 - 28%), la stabilirea originii fasciculelor subțiri de fibre musculare netede dispersate de tumoră (5/33 - 15%) sau la interpretarea infiltrării tumorale în prezența artefactelor induse termic la nivelul fibrelor musculare (3/33 - 9%). Toate aceste aspecte au fost analizate și interpretate în funcție de reacțiile IHC efectuate, iar în conformitate cu rezultatele obținute s-a restabilit parametrul pT. Astfel, după evaluarea IHC a specimenelor de TUR-TV cu invazie echivocă pe colorația HE, 11 cazuri (33%) au fost încadrate diferit față de încadrarea inițială în ceea ce privește parametrul pT.

3. EVALUAREA UNOR MARKERI IMUNOHISTOCHIMICI CU VALOARE POTENȚIALĂ PENTRU IDENTIFICAREA SUBTIPURILOR MOLECULARE DE CARCINOAME UROTELIALE MUSCULO-INVAZIVE

Obiectivele propuse pentru acest capitol de teză au fost următoarele: de a analiza panelul de markeri IHC propus de Allory (care face parte din grupul EAU) [18] în cadrul congresului ECP 2020, ca surogat pentru determinările moleculare, în vederea stabilirii claselor moleculare de MIBC și de a evalua aspectele clinico-patologice și expresia PD-L1 în MIBC în relație cu aceste clase.

Material și metodă

În prima parte a studiului am selectat, din arhiva SCJUPBT, 50 de cazuri consecutive de TV infiltrative în stratul muscular (MP) – minim pT2, diagnosticate în specimene de TUR-TV. În a doua parte a studiului am realizat colorarea IHC a secțiunilor de tumoră cu ajutorul aparatului automat de colorare IHC Leica BOND Max (Leica, Wetzlar, Germany), conform protocoalelor recomandate de producători. Au fost utilizați următorii anticorpi: anti-GATA3 (L50-823; Cell Marque; The Hague, NL), anti-CK5/6 (D5 & 16B4; Cell Marque; The Hague, NL), anti-p16 (6H12; Leica Biosystems; Newcastle, UK), anti-FGFR3 (B-9; Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, USA) și anti-PD-L1 (28-8, Abcam, Cambridge, UK). Demascarea antigenului s-a realizat prin fierbere (HIER), în soluție de demascare la pH6 sau pH9 (ERS 1 sau 2).

Cea de-a treia etapă a constat în scanarea lamelor și interpretarea reacțiilor IHC. Cele 50 de cazuri au fost scanate cu scannerul de lame Leica Aperio AT2 (Leica Biosystems, Vista, CA, USA) și transferate apoi într-o bază de date securizată. Lamele virtuale au fost vizualizate și interpretate pentru studiu cu ajutorul software-ului Aperio ImageScope, versiunea 12.4.3 (Leica Biosystems, Vista, CA, USA).

În cazul markerilor GATA3, CK5/6, p16 și FGFR3, imunoreacția a fost apreciată ca pozitivă dacă $\geq 10\%$ din celulele tumorale au prezentat imunomarcaj (cut-off de 10%), după modelul descris de Bontoux și colab. [21]. Având în vedere heterogenitatea CVU, cu variații ale aspectului histologic în cadrul aceleiași tumori, pentru fiecare caz am calculat valoarea medie a procentului de celule tumorale marcate, rezultată din evaluarea a 3 zone diferite din tumoră [22].

A fost evaluată expresia PD-L1 la nivelul celulelor tumorale, conform recomandărilor din literatură pentru clona 28-8 [3,23,24], cea utilizată în studiul de față. Interpretarea s-a realizat calculând raportul dintre numărul de celule tumorale pozitive și numărul total estimativ de celule tumorale de pe secțiune x100, sub forma unui scor - *tumour proportion score* (TPS), raportat ca procent (%). Am utilizat un cut-off de 1%, pentru a separa tumorile PD-L1 - pozitive ($\geq 1\%$ celule marcate) de tumorile PD-L1 – negative, după modelul utilizat în alte studii [3,24]. Am luat în considerare marcajul membranal, parțial sau complet, al celulelor tumorale, indiferent de intensitatea colorării. Nu am evaluat expresia markerului în celulele netumorale și în celulele imune (limfocite, macrofage, celule dendritice etc.). Pentru interpretarea corectă a imunomarcajului, am ținut cont de caracteristicile morfologice ale celulelor, evaluate, prin comparație, pe lama colorată HE.

În ultima etapă am cuantificat rezultatele reacțiilor IHC și am clasificat tumorile astfel: LumP (GATA3 +, CK5/6 +/-, p16 -, FGFR3+); LumU (GATA3 +, Ck5/6 -, p16+ , FGFR3 -); LumNS (GATA3 +, CK5/6 +/-, p16 +, FGFR3 +); Ba/Sq (GATA3 -, CK5/6 +, p16 +/-, FGFR3 +/-) și NE-like (GATA3 -, CK5/6 -, p16 -, FGFR3 -).

Rezultate

Cele 50 de cazuri analizate au fost încadrate după cum urmează: 23 de cazuri (46%) de CU pur; 18 cazuri (36%) de CU cu diferențiere divergentă, dintre care – 10 (20%) CUdS, 5 (10%) CUdG și 3 (6%) CUdS și dG; 4 cazuri (8%) de CU “în cuiburi” (*nested*); 2 cazuri (4%) de CU micropapilar; 2 cazuri (4%) se CU plasmocitoid și 1 caz (2%) de CU *lymphoepithelioma-like*.

Au fost 43 de cazuri (86%) cu profil IHC GATA3+/CK5/6-, încadrate ca tumori luminaale și 7 cazuri (14%) cu profil GATA3-/CK5/6+, încadrate ca tumori bazale. Analiza corelată a expresiei celor 4 markeri IHC utilizați pentru clasificarea CU a determinat încadrarea celor 50 de cazuri în următoarele subclase moleculare: 17 tumori (34%) LumP, 14 tumori (28%) LumU, 12 tumori (24%) LumNS și 7 tumori (14%) Ba/Sq.

Toate cazurile încadrate LumP (17/17 -100%) au fost GATA3 și FGFR3 pozitive și p16 negative. Din cele 17 cazuri LumP, 11 cazuri (64,7%) au prezentat expresie moderată (6 – 54,54%) sau intensă (5 – 45,45%) pentru markerul CK5/6 în celulele tumorale. Toate cazurile LumU (14/14 – 100%) au exprimat GATA3 și p16, și au fost negative pentru CK5/6 și FGFR3. Din cele 12 cazuri LumNS, 7/12 (58,33%) au fost pozitive pentru GATA3, p16 și FGFR3 și negative pentru CK5/6, iar celălalte 5/12 cazuri (41,66%) au fost pozitive pentru toți cei patru markeri analizați. Toate cazurile încadrate Ba/Sq (7/7 – 100%) au fost CK5/6-pozitive și GATA3-negative. Din cele 7 cazuri încadrate Ba/Sq, 3/7 cazuri (42,85%) au fost FGFR3-pozitive, 2/7 cazuri (28,57%) au fost p16-pozitive, 5/7 cazuri (71,42%) au fost p16-negative și 4/7 cazuri (51,14%) au fost FGFR3-negative.

Douăsprezece din cele 50 de tumori (24%) analizate au prezentat marcaj PD-L1 al celulelor tumorale, cu pattern de colorare membranar, de intensitate variabilă, slabă sau moderată. În 10 cazuri (20%) am remarcat expresia PD-L1 în celulele inflamatorii, în absența expresiei markerului în celulele tumorale.

Caracteristicile clinico-patologice asociate fiecărei subclase moleculare determinată IHC

Asocierea subclaselor moleculare determinate IHC cu variantele histologice de CU a arătat următoarea distribuție a cazurilor încadrate LumP: 8/17 (47,05%) CU convenționale, 4/17 (23,52%) CUdS, 2/17 (11,76%) CUdS și CUdG, 1/17 (5,88%) CUdG și 2/17 (11,76%) CU „în cuiburi” (*nested*). În ceea ce privește cazurile încadrate LumU, acestea au cuprins: 7/14 (50%) CU convenționale, 2/14 (14,28%) CUdG, 1/14 (7,14%) CUdS, 2/14 (14,28%) CU micropapilar, 1/14 (7,14%) CU *lymphoepithelioma-like*, 1/14 (7,14%) CU plasmocitoid. Din cele 12 cazuri LumNS, 6/12 (50%) au fost CU convenționale, 2/12 (16,66%) CU „în cuiburi” (*nested*), 1/12 (8,33%) CU plasmocitoid, 1/12 (8,33%) CUdS, 1/12 (8,33%) CUdG și 1/12 (8,33%) CUdS și CUdG. Din cazurile Ba/Sq, cele mai multe au fost CUdS – 4/7 (57,14%) și doar 2/7 (28,57%) au fost CU convenționale, respectiv 1/7 (14,28%) CUdG.

Expresia PD-L1 în relație cu clasele moleculare de carcinoame uroteliale musculo-invazive

Grupul tumorilor PD-L1-pozitive a fost reprezentat de 6 CU convenționale (50%), 3 (25%) CUdS, 1 (8,33%) CUdG, 1 (8,33%) CU “în cuiburi” (*nested*) și 1 (8,33%) CU *lymphoepithelioma-like*. Conform încadrării IHC în subclase moleculare, expresia PD-L1 a fost prezentă în 3/17 tumori LumP (17,64%), în 4/14 tumori (28,57%) LumU, în 1/12 (8,33%) tumori LumNS și în 4/7 (57,14%) tumori Ba/Sq.

CONCLUZII și CONTRIBUȚII PROPRII

- În intervalul ianuarie 2016 - decembrie 2020 am identificat 821 de cazuri de CVU diagnosticate în SAP al SCJUPBT, majoritatea pacienților fiind de sex masculin (raport B:F de 3:1). Decada a șaptea a reprezentat intervalul de vârstă cu incidența cea mai ridicată a CVU în rândul bărbaților, iar decada a opta în rândul femeilor. Majoritatea cazurilor de CVU (>95%) au fost CU, cel convențional fiind varianta cea mai frecvent raportată în speciemenle de TUR-TV/biopsie, iar CU cu diferențiere divergentă în cele de CR.
- Cele mai multe cazuri de tumori din speciemenle de TUR-TV/biopsii au fost tumori superficiale (NMIBC) (80%), caracterizate prin absența aspectelor de LVI, PNI sau leziuni de CIS asociate. Analiza de corelație a demonstrat asocierea invaziei tumorale cu toți factorii de evoluție și prognostic evaluați (gradul tumoral, varianta histologică, LVI, PNI și CIS asociat) ($p < 0.0001$).
- Analiza cazurilor de tumori vezicale din piese de CR a arătat faptul că tumorile încadrate în categoria pTa-pT2 au fost preponderent CU convenționale (19%), cele mai multe fără aspecte de LVI (15%) sau PNI (24%), în timp ce tumorile clasificate pT3-pT4 au fost predominant CU cu diferențiere divergentă (38%), cu LVI (64%), PNI (64%) și metastaze limfonodale prezente (41%) ($p < 0.05$).
- Rezultatele studiului care a evaluat markerii IHC smoothelin și SMA în loturile analizate (cel care a inclus fragmente de perete vezical și intestinal netumoral și cele de CU din speciemenle de TUR-TV cu încadrare neechivocă și echivocă privind parametrul pT) au evidențiat o specificitate a smoothelin pentru MP, spre deosebire de SMA, pentru care am observat o reacție puternică și difuză în celulele musculare netede ale MM și MP și în miofibroblastele reactive din stromă. Totodată, am constatat că expresia smoothelin în MM a fost întotdeauna mai slabă ca intensitate comparativ cu cea din MP de pe aceeași secțiune/lamă și că niciun caz nu a prezentat un scor 3+ pentru smoothelin în MM. Nu s-au identificat diferențe semnificative în ceea ce privește expresia smoothelin între MM hiperplazică și cea non-hiperplazică.
- Recomandările noastre cu privire la interpretarea imunoreacției pentru smoothelin sunt următoarele: (1) să existe un control intern care să arate MM și MP marcate cu intensități diferite, (2) să se adopte un prag ridicat al expresiei markerului pentru colorarea MP (de exemplu un scor +3 sau cel puțin 2 niveluri de colorare diferență față de expresia markerului din MM) și (3) interpretarea imunoreacției să se facă pe fascicule musculare de MP bine reprezentate/bogate, evitând interpretarea expresiei markerului pe fascicule musculare subțiri/fragmentate.
- Studiul markerilor IHC utilizați pentru clasificarea “moleculară” a CVU (GATA3, CK5/6, p16 și FGFR3) a arătat că 86% din cazuri au fost încadrate în clasa moleculară luminală (GATA3+ și CK5/6), în timp ce 14% au fost incluse în clasa moleculară bazală (GATA3- și CK5/6+). Majoritatea tumorilor lumenale au fost clasificate în subclasa moleculară LumP (34%), fiind urmate de tumorile LumU (28%). Tumorile din subclasa LumP au prezentat cel mai frecvent aspecte de PNI, LVI și CIS asociat. Pe de altă parte, subclasa LumU a cuprins un număr mai mare de tumori reprezentând alte variante histologice de CU decât cel convențional, incluzând CU micropapilar, CU *lymphoepithelioma-like* și CU plasmocitoid.
- Din perspectiva implicațiilor terapeutice ale claselor moleculare identificate IHC, am observat că toate tumorile LumP și LumNS au exprimat FGFR3. Totodată, din cele 50 de cazuri analizate, 24% au prezentat reacție PD-L1 pozitivă în celulele tumorale (TPS $\geq 1\%$), majoritatea (57%) fiind tumori din clasa Ba/Sq.
- Importanța standardizării reacției de identificare a FGFR3 rezidă în faptul că ar putea contribui, în condițiile în care se poate stabili o relație între expresia markerului și mutațiile FGFR3, la selectarea pacienților eligibili pentru tratamentul neoadjuvant cu inhibitorul pan-FGFR, Erdafitinib, știut fiind faptul că pacienții cu MIBC avansat și mutații FGFR2/3 beneficiază de acest tratament în alte țări.

- Originalitatea și caracterul de noutate al tezei constă în utilizarea unor markeri IHC mai sofisticati și pretențioși, precum smoothelin, marker care este foarte puțin utilizat în laboratoarele de Anatomie patologică. Pentru a asigura acuratețea și reproductibilitatea rezultatelor, utilizarea anticorpului a necesitat o standardizare riguroasă a metodei de lucru, realizată înaintea începerii etapei experimentale. Acest obiectiv a fost realizat prin optimizarea tehnicii de procesare și metodei de interpretare și evaluare a reacției IHC pentru acest marker. Studiul nostru reprezintă, după cunoștințele noastre, unicul de acest fel din România și, potrivit rezultatelor obținute, are aplicabilitate practică. Deși numărul cazurilor de TV infiltrative cu invazie incertă a MP evaluate utilizând anticorpul anti-smoothelin a fost limitat, markerul se dovedește atractiv ca parte a unui panel de markeri IHC, util pentru cazurile dificil de încadrat ca profunzime a invaziei în speciamele de TUR-TV, datorită capacității sale de a discrimina MM de reacția desmoplazică stromală sau de MP.
- Un alt aspect de noutate, pe plan național, este legat de utilizarea unui panel restrâns de markeri IHC (GATA3, CK5/6, p16 și FGFR3) mai puțin folosit pe plan internațional pentru clasificarea moleculară a CVU, într-un context în care alegerea tipului și numărului de markeri IHC reprezintă un subiect controversat și important prin prisma raportului cost-beneficiu.
- În cadrul claselor moleculare, am evaluat expresia PD-L1 și am optat pentru clona 28-8 (Leica) datorită accesibilității financiare și rapidității cu care se poate interpreta rezultatul reacției prin evaluarea expresiei markerului în celulele tumorale și calcularea TPS. Într-un moment în care există numeroase clone de anticorpi anti-PD-L1 și numeroase sisteme de scorificare a rezultatelor reacției, clona utilizată de noi ar putea fi luată în considerare pentru selectarea cazurilor de CVU (tumori PD-L1-pozitive cu TPS $\geq 1\%$) care ar putea beneficia de tratamente anti-PD1/PD-L1, cu condiția ca ea să fie studiată pe loturi mai mari de pacienți, comparativ cu clonele/sistemele de scorificare existente și acceptate pe plan internațional.

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE

1. **Mihai I**, Taban S, Cumpanas A, Olteanu EG, Iacob M, Dema A. Clear cell urothelial carcinoma of the urinary bladder- a rare pathological entity. A case report and a systematic review of the literature. Bosnian journal of basic medical sciences. 2019 Nov;19(4):400. DOI: <https://doi.org/10.17305/bjbms.2019.4182> **IF= 2.07**
2. Olteanu GE, **Mihai IM**, Bojin F, Gavriluc O, Paunescu V. The natural adaptive evolution of cancer: The metastatic ability of cancer cells. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences. 2020 Feb 3. DOI: <https://doi.org/10.17305/bjbms.2019.4565> **IF= 3.05**
3. **Mihai IM**, Olteanu G-E, Herman D, et al. Analysis of Tumor Depth Invasion With Anti-Smoothelin Antibody in Equivocal Transurethral Resection of Urinary Bladder Tumor Surgical Specimens. International Journal of Surgical Pathology. October 2020. doi:10.1177/1066896920967762 **IF= 1.35**

BIBLIOGRAFIE

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
2. Lenis AT, Lec PM, Chamie K. Bladder cancer: a review. *Jama.* 2020;324(19):1980–91.
3. Lopez-Beltran A, Cimadamore A, Blanca A, Massari F, Vau N, Scarpelli M, et al. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Bladder Cancer. *Cancers (Basel).* 2021;13(1):131.
4. Grignon DJ, Al-Ahmadie H, Algaba F, Amin MB, Eva C, Dyrskjöt L, et al. Tumours of the urinary tract. In: Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.* 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2016. p. 77–135.
5. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—part B: prostate and bladder tumours. *Eur Urol.* 2016;70(1):106–19.
6. Witjes JA, Bruins M, Cathomas R, Eva C, Cowan NC, Gakis G, et al. EAU Guidelines on Muscle-Invasive and Metastatic Bladder Cancer. *European Urology.* Arnhem, The Netherlands: EAU Guidelines; 2019. 82 p.
7. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershewald JE, Brookland RK, et al. The eighth edition AJCC cancer staging manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):93–9.
8. Mihai IM, Olteanu GE, Herman D, Anderco D, Iacob M, Nataras B, et al. Analysis of Tumor Depth Invasion With Anti-Smoothelin Antibody in Equivocal Transurethral Resection of Urinary Bladder Tumor Surgical Specimens. *Int J Surg Pathol.* 2021;29(1):54–63.
9. Paner GP, Brown JG, Lapetino S, Nese N, Gupta R, Shen SS, et al. Diagnostic use of antibody to smoothelin in the recognition of muscularis propria in transurethral resection of urinary bladder tumor (TURBT) specimens. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(6):792–9.
10. Council L, Hameed O. Differential expression of immunohistochemical markers in bladder smooth muscle and myofibroblasts, and the potential utility of desmin, smoothelin, and vimentin in staging of bladder carcinoma. *Mod Pathol.* 2009;22(5):639–50.
11. Paner GP, Shen SS, Lapetino S, Venkataraman G, Barkan GA, Quek ML, et al. Diagnostic utility of antibody to smoothelin in the distinction of muscularis propria from muscularis mucosae of the urinary bladder: a potential ancillary tool in the pathologic staging of invasive urothelial carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(1):91–8.
12. Poletajew S, Wolińska E, Wasiutyński A, Dybowski B, Radziszewski P, Górnicka B. Immunohistochemical differentiation between muscularis mucosae and muscularis propria for improving the staging of bladder cancer in patients undergoing transurethral resection of bladder tumours. *Polish J Pathol.* 2017;68(3):218–24.
13. Elkady N, Abdou AG, Kandil M, Ghanem N. Diagnostic value of smoothelin and vimentin in differentiating muscularis propria from muscularis mucosa of bladder carcinoma. *Int J Biol Markers.* 2017;32(3):305–12.
14. Kamel NN, Helmy NAH, Hassanein AA, Sharaf WM, Moneer BI, Salem MM. The diagnostic utility of antibodies to smoothelin and desmin in staging of urothelial carcinoma. *Egypt J Pathol.* 2015;35(1):14–23.
15. Miyamoto H, Sharma RB, Illei PB, Epstein JI. Pitfalls in the use of smoothelin to identify muscularis propria invasion by urothelial carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(3):418–22.
16. Bovio IM, Al-Quran SZ, Rosser CJ, Algood CB, Drew PA, Allan RW. Smoothelin immunohistochemistry is a useful adjunct for assessing muscularis propria invasion in bladder carcinoma. *Histopathology.* 2010;56(7):951–6.
17. Mihai I, Nataras B, Herman D, Olteanu GE, Gheju A, Jurescu A, et al. Analysis of tumour depth invasion with Smoothelin antibody in equivocal TURBT surgical specimens. In: *Virchows Archiv.* New York, NY, USA: Springer; 2019. p. S180–S180.
18. Kamoun A, de Reyniès A, Allory Y, Sjö Dahl G, Robertson AG, Seiler R, et al. A consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 2020;77(4):420–33.
19. Witjes JA, Bruins HM, Cathomas R, Compérat EM, Cowan NC, Gakis G, et al. European Association of Urology guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2020 guidelines. *Eur Urol.* 2020;
20. Cimadamore A, Scarpelli M, Massari F, Eckstein M, Gevaert T, Cheng L, et al. Immunotherapy for urothelial cancer: from the diagnostic pathologist’s point of view. *Expert Opin Biol Ther.* 2020;20(6):539–44.
21. Bontoux C, Rialland T, Cussenot O, Compérat E. A four-antibody immunohistochemical panel can distinguish clinico-pathological clusters of urothelial carcinoma and reveals high concordance between primary tumor and lymph node metastases. *Virchows Arch.* 2020;1–9.
22. Gottfrid Sjö Dahl. Molecular Subtype Profiling of Urothelial Carcinoma Using a Subtype-Specific Immunohistochemistry Panel. In: Wolfgang A. Schulz MJH, Niegisch G, editors. *Urothelial Carcinoma Methods and Protocols.* New York, NY, USA: Humana

Press; 2018. p. 53–67.

23. Paver EC, Cooper WA, Colebatch AJ, Ferguson PM, Hill SK, Lum T, et al. Programmed death ligand-1 (PD-L1) as a predictive marker for immunotherapy in solid tumours: A guide to immunohistochemistry implementation and interpretation. *Pathology*. 2021;53(2):141–56.
24. Dako Agilent Pathology Solutions. PD-L1 IHC 28-8 pharmDx Interpretation Manual, Urothelial Carcinoma. Publication Part Number: 29188. 2017.