

Universidad Autónoma de Barcelona

Facultad de Medicina

Departamento de Cirugía

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS RELACIONADAS CON
EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE I Y DE
NKG2D COMO RESPUESTA AL DAÑO OXIDATIVO DEL DNA EN EL CÁNCER
UROTELIAL DE VEJIGA. RELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS
CLÍNICO PATOLÓGICAS Y SUPERVIVENCIA**

Dirección: Antonio Sitges-Serra

Co-Dirección: José Antonio Lorente Garín

Trabajo de investigación del Doctorado de Cirugía

Presentado por Enrique Antonio Rijo Mora

Servicio de Urología. Hospital del Mar

Curso 2010/11

Barcelona, Septiembre de 2011.

ÍNDICE

Páginas

1. Introducción

1.1	Epidemiología del cáncer vesical.....	1
1.2	Anatomía patológica.....	3
	1.2.1 Clasificación TNM.....	3
	1.2.2 Clasificación histológica.....	5
1.3	Grupos de riesgo para recidiva/progresión en los tumores TaT1.....	6
1.4	Tratamiento del cáncer vesical sin infiltración muscular (CVSIM).....	9
1.5	Inmunoterapia con BCG	
	1.5.1 Indicaciones.....	10
	1.5.2 Eficacia.....	11
	1.5.3 Mecanismo de la inmunoterapia endovesical con BCG.....	12
	1.5.3.1 Citocinas involucradas.....	13
	1.5.3.2 Participación de células inmunes.....	14
	1.5.3.3 Macrófagos, moléculas inductoras de apoptosis y citocinas.....	15
1.6	Inmunología tumoral	
	1.6.1 Mecanismos de escape tumoral.....	18
	1.6.2 Células reguladoras T, MDSCs.....	19
1.7	Oncogénesis.....	20

2. Revisión y actualización bibliográfica

2.1	Moléculas no clásicas relacionadas con el MHC	23
2.2	MIC.....	24
2.3	MICA	
	2.3.1 Generalidades.....	24
	2.3.2 Interés del estudio de MICA.....	26
2.4	Receptor NKG2D	
	2.4.1 Estructura y función.....	27
	2.4.2 Ligandos del receptor NKG2D.....	28

3. Hipótesis	29
4. Objetivos	30
5. Material y métodos	
5.1 Tipo de estudio	31
5.2 Criterios de inclusión	31
5.3 Criterios de exclusión	31
5.4 Variables	
5.4.1 Variables clínicas	32
5.4.2 Variables anatomopatológicas	32
5.4.3 Variables moleculares	32
5.5 Construcción del TMA	33
5.6 Inmunohistoquímica	
5.6.1 Detección y cuantificación de la expresión de MICA	35
5.6.2 Análisis de la expresión de MICA	36
5.6.3 Detección y cuantificación de la expresión de NKG2D	36
5.6.4 Controles	37
5.7 Seguimiento oncológico	38
5.8 Tamaño muestral	39
5.9 Métodos estadísticos	39
6. Resultados	
6.1 Resultados preliminares	40
6.2 Calendario de actuaciones	41
7. Bibliografía	42

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Epidemiología del cáncer vesical:

El carcinoma de vejiga es la neoplasia maligna más frecuente del aparato urinario.

En el año 2006 se diagnosticaron unos 104.400 casos nuevos de cáncer de vejiga en Europa, de los que 82.800 se produjeron en varones y 21.600 en mujeres. Esto representa el 6,6 % del total de cánceres en los varones y el 2,1 % en las mujeres [1].

En Estados Unidos la incidencia en el año 2005 fue de 63.210 casos. El cáncer de vejiga es 3 veces más común en el sexo masculino, siendo el cuarto cáncer más común después del cáncer de próstata, pulmón y cáncer colorrectal [2].

Aunque el hábito tabáquico es el principal factor de riesgo conocido [3], se ha relacionado con factores profesionales como la manipulación de aminas aromáticas, caucho y tintes [4-6]. La exposición crónica a estos carcinógenos produce una elevada concentración de estas sustancias en la orina que pueden conducir, con los años, al desarrollo de carcinoma de células transicionales (CCT). Más del 90% de los mismos aparecen en la vejiga. La razón entre hombres y mujeres en Europa occidental varía entre 2:1 y 7:1 [7]. Las diferencias en la incidencia pueden ser principalmente explicadas por los distintos hábitos tabáquicos y por la exposición a los mencionados factores. Así mismo, se ha propuesto la posible influencia de factores anatómicos, biológicos, hormonales y retrasos en el diagnóstico para explicar la diferente incidencia y comportamiento clínico entre géneros [8-9]. A pesar de que son bien conocidas las diferencias epidemiológicas en la incidencia del CCT, existen pocos y contradictorios datos sobre las diferencias en el grado y estadio entre hombres y mujeres [10-13].

La incidencia del cáncer vesical se incrementa con la edad, la población de edad avanzada tiene una probabilidad 3 veces mayor de padecer cáncer vesical con respecto a otra con edad comprendida entre los 55-59 años y 15 veces mayor que las que se encuentran en el intervalo de edad de 30-54 años [14].

Existe un incremento de la esperanza de vida y como consecuencia la población de edad avanzada aumenta progresivamente en los países industrializados. En España de acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) [15], la población mayor de 75 años en el año 2001 suponía el 7,4% (3 millones). En Estados Unidos se calcula que en 2020 el 20% de la población tendrá más de 65 años [16], por lo que la incidencia del cáncer de vejiga presenta un aumento en los últimos años.

En el momento del diagnóstico, el 70 % de los casos se diagnostica como cáncer vesical sin infiltración muscular (CVSIM) y el 30 %, como enfermedad con invasión muscular (CVIM). En pacientes tratados con una cistectomía radical por CVIM, el 57 % tenía invasión muscular en el momento de presentación, en tanto que el 43 % había sido diagnosticado inicialmente de CVSIM, que progresó a pesar del tratamiento con conservación del órgano [17]. Aproximadamente un tercio de los pacientes diagnosticados de CVIM presenta metástasis no detectadas en el momento del tratamiento del tumor primario [18], mientras que el 25 % de los que se someten a una cistectomía radical tiene afectación ganglionar en el momento de la intervención quirúrgica.

Aproximadamente el 75-85 % de los pacientes con cáncer de vejiga debuta con una enfermedad limitada a la mucosa (estadio Ta, CIS) o submucosa (estadio T1).

Las altas tasas de recidiva tumoral y las bajas tasas de progresión y mortalidad que caracterizan a los al CVSIM, hacen que el tumor vesical sea un tumor con una alta prevalencia.

1.2 Anatomía Patológica:

Los tumores vesicales puede originarse a partir de cualquiera de los tejidos que conformen la vejiga como son:

- a) El urotelio es la capa más interna y consta de una serie de capas variables de células transicionales en función de que la vejiga este vacía o llena. La capa más superficial posee unes uniones intercelulares características que le confieren una impermeabilidad necesaria. El urotelio normal puede desarrollar cambios metaplásicos, por lo que los carcinomas vesicales pueden presentar un fenotipo transicional (95%), escamoso (5%) o glandular. Estas capas internas reposan sobre una membrana basal o lámina propia. Separando la lámina propia de la submucosa se encuentra la muscularis mucosae, formada por haces musculares de forma discontinua y que no se deben confundir con la muscular propia.
- b) La capa muscular de la vejiga es la muscular propia. Se dispone en 3 capas: longitudinal externa, circular media y longitudinal interna.
- c) Por último nos encontramos con la capa externa o serosa.

1.2.1 Clasificación TNM:

Desde el punto de vista de clasificación anatomopatológica, está ampliamente aceptada la clasificación TNM del 2002 de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) y difiere respecto a las previas en el estadio T2, que ahora incluye la infiltración de toda la pared vesical (T2a mitad interna, T2b mitad externa) y T3. La última actualización del TNM (*Tabla 1*) se realizó en el año 2009 [19].

Tabla 1. Clasificación TNM 2009 de tumor vesical [19].

T- Tumor primario

Tx	No se puede evaluar el tumor primario
T0	Ausencia de datos del tumor primario
Ta	Carcinoma papilar no invasivo
Tis	carcinoma <i>in situ</i> : “tumor plano”
T1	Invasión del tejido conectivo subepitelial
T2	Invasión muscular
T2a	Músculo superficial (mitad interna)
T2b	Músculo profundo (mitad externa)
T3	Invasión del tejido perivesical
T3a	Microscópicamente
T3b	Macroscópicamente (masa extravesical)
T4	Invasión de otras estructuras adyacentes
T4a	Invasión de la próstata, el útero o la vagina
T4b	Invasión de la pared pelviana o abdominal

N- Ganglios linfáticos

Nx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	Ausencia de metástasis ganglionares regionales
N1	Metástasis en un sólo ganglio linfático de la pelvis menor. (hipogástrico, obturator, ilíaco externo o presacro).
N2	Metástasis en varios ganglios de la pelvis menor (hipogástrico, obturator, ilíaco externo o presacro).
N3	Metástasis a nivel de ganglio (s) linfático ilíaco común

M- Metástasis a distancia

Mx	No se pueden evaluar las metástasis a distancia
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia

1.2.2 Clasificación histológica:

La clasificación histológica de los tumores vesicales (*Tabla 2*) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) fue modificada en el año 2004. Su principal contribución es una descripción histológica detallada de los diversos grados, aplicando criterios citológicos y estructurales específicos [19].

Tabla 2. Clasificación histológica de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de la Sociedad internacional de patología urológica (ISUP) [19].

	Clasificación 1973	Clasificación 2004 WHO/ISUP
	Papiloma (lesión benigna)	Papiloma
Grado 1	bien diferenciado	Neoplasia urotelial papilar de bajo potencial maligno (NUPBPM)
Grado 2	moderadamente diferenciado	Carcinoma urotelial papilar de bajo grado
Grado 3	mal diferenciado	Carcinoma urotelial papilar de alto grado

Más del 90% de los tumores vesicales son CCT; el resto, son carcinomas escamosos o adenocarcinomas.

Los tumores vesicales se consideran como CVSIM (Tis-Ta-T1) o CVIM (T2-T3-T4) basándose en los hallazgos objetivados a la cistoscopia, resección transuretral (RTU), estudios de imagen y hallazgos histopatológicos. Alrededor del 50 al 70% de los tumores vesicales primarios son CVSIM. La invasión de la lámina propia o de la muscular corresponden al 28 y 24% respectivamente.

La historia natural del cáncer vesical se define por dos procesos separados, pero relacionados: la recurrencia y la progresión. La progresión representa el mayor riesgo biológico; no obstante, la recurrencia, incluso sin progresión, representa una importante morbilidad para el paciente, ya que requiere de reevaluación periódica (citologías,

cistoscopia, pruebas de imagen), resecciones transuretrales repetidas, y a veces, instilaciones endovesicales. Las decisiones del tratamiento se hacen en función del estadio tumoral, el grado, tamaño, multiplicidad y patrón de recurrencia.

En la actualidad, el grado y el estadio son las variables pronósticas que condicionan la estrategia terapéutica y, aunque ambas variables proporcionan cierto grado de estratificación del potencial biológico del tumor, un subgrupo no pequeño de tumores superficiales desarrollará enfermedad músculo-infiltrante y no todos los infiltrantes se comportarán con la misma agresividad.

Por lo tanto el análisis histopatológico convencional de los tumores vesicales, incluye la determinación del grado y el estadio del tumor, no permite predecir de forma fiable el comportamiento. La evaluación de los marcadores moleculares de la enfermedad, con mayor frecuencia con métodos inmunohistoquímicos, puede complementar la evaluación tradicional del estadio y grado del cáncer y predecir mejor la evolución.

1.3 Grupos de riesgo para recidiva/progresión en los tumores TaT1:

La forma clásica de clasificar a los pacientes con tumores Ta y T1 consiste en distribuirlos en grupos de riesgo según los factores pronósticos derivados de análisis multifactoriales. Con esta técnica se propuso distribuir a los pacientes en grupos de riesgo bajo, intermedio y alto [19]. Sin embargo, al utilizar estos grupos de riesgo no suelen hacerse diferencias entre el riesgo de recidiva y progresión. Aunque los factores pronósticos pueden indicar un riesgo elevado de recidiva, el riesgo de progresión puede seguir siendo bajo, mientras que otros tumores pueden conllevar un riesgo alto de recidiva y progresión.

Con el fin de predecir por separado los riesgos a corto y largo plazo de recidiva y progresión en pacientes concretos, la Organización europea para la investigación y el tratamiento del cáncer (EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer) elaboró un sistema de puntuación y tablas de riesgo.

El sistema de puntuación está basado en los seis factores clínicos y anatomopatológicos más importantes:

- Número de tumores.
- Tamaño del tumor
- Frecuencia de recidiva anterior.
- Categoría T.
- Presencia de un CIS concomitante.
- Grado del tumor.

Las ponderaciones aplicadas a dichos factores para calcular las puntuaciones totales de recidiva y progresión se incluyen en la Tabla 3.

Tabla 3. Ponderación utilizada para calcular las puntuaciones de recidiva y progresión [19].

Factor	Recidiva	Progresión
Número de tumores		
Único	0	0
2-7	3	3
≥ 8	6	3
Diámetro del tumor		
< 3 cm	0	0
≥ 3 cm	3	3
Frecuencia de recidiva anterior		
Prímaria	0	0
≤ 1 recidiva/año	2	2
> 1 recidiva/año	4	2
Categoría		
Ta	0	0
T1	1	4
CIS concomitante		
No	0	0
Sí	1	6
Grado (OMS de 1973)		
G1	0	0
G2	1	6
G3	2	5
Puntuación total	0-17	0-23

CIS = carcinoma *in situ*

Mediante una combinación de categorías de manera definida en la recidiva y la progresión, la Asociación Europea de Urología (EAU) aconseja usar un sistema de 3 niveles que define grupos de riesgo bajo, intermedio y alto de recidiva y progresión, definido según el sistema de puntuación y tablas de riesgo de la EORTC (*Tabla 4*).

Tabla 4. Probabilidad de recidiva y progresión según la puntuación total [19].

Puntuación de recidiva	Probabilidad de recidiva al cabo de 1 año % (IC del 95 %)	Probabilidad de recidiva al cabo de 5 años % (IC del 95 %)	Grupo de riesgo de recidiva
0	15 (10-19)	31 (24-37)	Riesgo bajo
1-4	24 (21-26)	46 (42-49)	Riesgo intermedio
5-9	38 (35-41)	62 (58-65)	Riesgo alto
Puntuación de progresión	Probabilidad de progresión al cabo de 1 año % (IC del 95 %)	Probabilidad de progresión al cabo de 5 años % (IC del 95 %)	Grupo de riesgo de progresión
0	0,2 (0-0,7)	0,8 (0-1,7)	Riesgo bajo
2-6	1 (0,4-1,6)	6 (5-8)	Riesgo intermedio
7-13	5 (4-7 %)	17 (14-20)	Riesgo alto
14-23	17 (10-24)	45 (35-55)	

1.4 Tratamiento del cáncer vesical sin infiltración muscular (CVSIM):

Existe una variedad de tratamientos para el CVSIM, el más extendido de dichos tratamientos en nuestro medio es la resección transuretral (RTU) vesical con o sin tratamiento adyuvante.

En una serie de pacientes con tumores Ta o T1 que fueron seguidos por un mínimo de 20 años o hasta la muerte, el riesgo de la recidiva en la vejiga después de la resección inicial fue del 80% [20]. Los pacientes con mayor riesgo de desarrollar tumores recidivantes son aquellos que tienen tumores grandes, menos diferenciados, tumores múltiples o vinculados con una sobreexpresión del p53 nuclear [21]. Además, los pacientes que tienen carcinoma in situ (Tis) tienen un riesgo más alto de tener recidiva y de que la enfermedad avance [20,22-23].

Es importante una observación cuidadosa de la evolución de los tumores subsecuentes de la vejiga. Los pacientes que requieren de una forma de tratamiento más agresiva, son aquellos que presentan enfermedad recidivante multifocal extensiva o cualquier otro factor pronóstico no favorable. La cistectomía parcial sólo se aplica a una pequeña minoría de pacientes debido a la multifocalidad o tendencia del carcinoma vesical de comprometer múltiples regiones de la mucosa ya que ocurre en áreas que no son resecaadas en segmentos.

El tratamiento adyuvante con quimioterapia intravesical con Mitomicina C, epirrubicina y doxorubicina o inmunoterapia intravesical con bacilo de Calmette-Guérin (BCG) se usan con mayor frecuencia en pacientes con tumores múltiples o recidivantes o como medida profiláctica en pacientes con mayor riesgo después de la RTU.

La necesidad de tratamiento intravesical adyuvante depende del riesgo de recidiva y/o progresión. La elección entre quimioterapia o inmunoterapia adicional depende en gran medida del riesgo que hay que reducir: recidiva o progresión.

1.5.1 Indicaciones del tratamiento con instilaciones con BCG:

La última versión de las guías de la Asociación Europea de Urología (EAU) para el tratamiento del CVSIM propone las siguientes recomendaciones:

- En pacientes con tumores TaT1 con riesgo intermedio o elevado de recurrencia y riesgo intermedio de progresión, una instilación inmediata de quimioterapia debe ser seguida de al menos 1 año de tratamiento con instilaciones de BCG o instilaciones adicionales de quimioterapia.
- En pacientes con riesgo elevado de progresión del tumor, deben recibir al menos 1 año de tratamiento con instilaciones de BCG.
- Los pacientes con *carcinoma in situ* también deberán ser tratados durante 1 año con BCG intravesical [19].

Aunque la BCG es un tratamiento muy eficaz, existe el consenso de que no todos los pacientes con CVSIM deben ser tratados con BCG a causa del riesgo de toxicidad. En último término, la elección del tratamiento depende del riesgo de recidiva y progresión del paciente [19].

El uso de BCG no modifica la evolución natural de la enfermedad en los tumores con un riesgo bajo de recidiva y progresión y se puede considerar un tratamiento excesivo para esta categoría.

Sin embargo, al aumentar la experiencia en la aplicación del BCG, ahora parece que los efectos secundarios son menos prominentes. Se observan efectos adversos graves en

menos del 5 % de los pacientes y pueden tratarse con eficacia en casi todos los casos [24].

Tras la absorción sistémica del medicamento pueden surgir complicaciones importantes. Por tanto, no debe administrarse BCG durante las dos primeras semanas después de una RTU, a los pacientes con hematuria ni tras un sondaje traumático.

1.5.2 Eficacia del tratamiento con instilaciones con BCG:

La administración de BCG intravesical después de la RTU del tumor vesical se comparó con RTU vesical sólo en pacientes con lesiones Ta y T1. El tratamiento con BCG retardó la evolución a enfermedad muscular invasora o metastásica, mejoró la preservación de la vejiga y disminuyó el riesgo de muerte por cáncer de la vejiga [25]. Los pacientes con un tumor T1 en la evaluación a los tres meses después de un curso de seis semanas con BCG y los pacientes con *carcinoma in situ* que persiste después de un segundo curso de seis semanas de BCG tienen una probabilidad alta de desarrollar enfermedad muscular invasiva y deben ser considerados para una cistectomía [26-28].

Un estudio aleatorio llevado a cabo por el Grupo Sueco-Noruego sobre el Cáncer de vejiga comparó el tratamiento intravesical de dos años con mitomicina C, versus BCG en pacientes con alto riesgo de recidiva o evolución. En cinco años, se notó una importante mejoría en cuanto a la supervivencia sin enfermedad en el grupo tratado con BCG ($P = 0,04$); sin embargo no se encontró diferencia alguna en cuanto a la evolución del tumor o la supervivencia general entre los dos grupos [29].

Varios metanálisis han demostrado la eficacia del BCG en los tumores vesicales TaT1. En cuatro metanálisis se confirmó que la BCG después de la RTU es superior a la RTU

aislada o a RTU y quimioterapia en lo que respecta a prevenir las recidivas de los tumores TaT1 [30-33].

Se demostró en dos metanálisis que el tratamiento con BCG previene, o al menos retrasa, el riesgo de progresión del tumor [34-35]. Sylvester y cols comunicaron una reducción del 27 % de las posibilidades de progresión con el tratamiento con BCG ($p = 0,0001$), siendo la magnitud de la reducción similar en los pacientes con tumores papilares TaT1 y en aquellos con *carcinoma in situ* [35].

Sin embargo, en otros dos metanálisis se indicó un posible sesgo a favor de la BCG al incluir en los estudios a pacientes tratados previamente con quimioterapia intravesical [36-37].

1.5.3 Mecanismo de la inmunoterapia endovesical con BCG:

La primera experiencia en el tratamiento del cáncer vesical con instilaciones endovesicales con la BCG, una cepa viva atenuada de *Mycobacterium bovis*, fue comunicada hace más de 30 años por Morales y cols [38].

Los resultados de estudios recientes sugieren que en la inmunoterapia con BCG participa no solo la inmunidad innata sino que también la inmunidad adquirida puede desempeñar una papel importante.

La vejiga es un compartimiento mucoso confinado, lo cual permite mantener elevadas concentraciones de BCG y así puede lograr a largo plazo una activación inmune continua, lo cual parece ejercer una mejor estimulación innata local, teniendo una amplia reactividad cruzada con menos memoria mas que inmunidad específica adquirida con alta especificidad y memoria originada a partir de reordenamiento de genes [39].

La inmunoterapia intravesical con BCG provoca una respuesta inmune masiva local caracterizada por la secreción de varias citocinas en la orina o tejido vesical, como también infiltración de granulocitos y células mononucleares a nivel de la pared vesical después de varias instilaciones con BCG.

Después de una instilación intravesical con BCG, ésta se internaliza en el urotelio y células tumorales vesicales en un proceso fibronectina dependiente mediado por integrinas [40-41]. La proteína de unión a la fibronectina (FAP) media la unión de la BCG a las células tumorales vesicales y a la pared vesical. Recientemente Sinn y cols [42] comunicaron que ratones preinmunizados con FAP demostraban una reducción significativa del crecimiento tumoral tras las instilaciones vesicales con BCG, sugiriendo que FAP es también un agente antitumoral efectivo.

1.5.3.1 Citocinas involucradas:

La interacción de la BCG con las células uroteliales desencadena cambios inmunológicos importantes, incluidos la inducción de citocinas como la interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-17 [43], factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF) y el aumento de las moléculas de adhesión intracelular (ICAM)-1 [44-45].

Estas citocinas se considera que preparan el terreno para el asalto celular resultando en un expresión de moléculas por parte de las células tumorales que sirven como anclaje para la fijación de las células inmunes. Los neutrófilos y los linfocitos T, así como señales de activación como ICAM-1, ácido graso sintetasa (FAS), CD40, etc [44,46-47]. Niveles elevados de producción de IL-8 se asocian a una mejor respuesta clínica a la BCG [48-49].

1.5.3.2 Participación de células inmunes:

Después de múltiples instilaciones con BCG, varios tipos de células inmunes como los neutrófilos, macrófagos, células natural killer (NK), linfocitos T y células NKT son reclutadas. Un 75% de estas células inmunes, están contenidas en la orina evacuada de la vejiga de los pacientes con cáncer vesical después del tratamiento con terapia endovesical con BCG, compuesto mayoritariamente por neutrófilos, seguido de macrófagos (5-10%) y células NK (1-3%) [50]. Los neutrófilos secretan grandes cantidades de citocinas que activan varias células efectoras.

La inducción en las células tumorales de ICAM-1, moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y clase II, es importante para eliminar estas células. Se necesitan 5 o 6 instilaciones de BCG para inducir estas reacciones inmunes y una respuesta clínica [51-52].

Las células efectoras potencialmente responsables de llevar a cabo la muerte de las células tumorales incluyen células no restringidas por el MHC como son las células NK [53], células killers activadas por linfocinas (LAK) [53-54], células NK activadas por BCG [55-57], células T CD8+ CD-1-restringidos [58], células T $\gamma\delta$ [59-61], células T NK [60-62], neutrófilos [63-53], macrófagos [65-66], células T CD8+ restringidas por el MHC y células T CD4+ [67-70]. De estas células, los linfocitos T son considerados las células efectoras más efectivas responsables de eliminar las células tumorales [71].

Las células "profesionales" presentadoras de antígenos como son las células dendríticas (DCs) y los macrófagos pueden capturar, procesar y presentar no solo las micobacterias sino también los antígenos apoptóticos de las células tumorales a los linfocitos T (*Figura 1*).

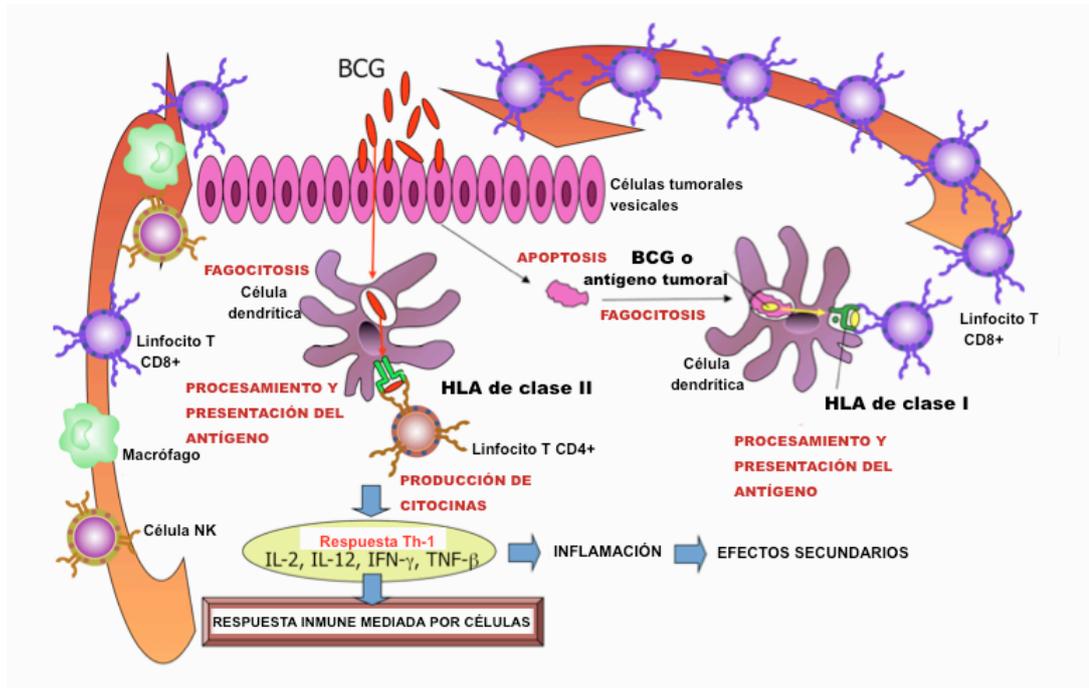


Figura 1. Respuesta inmune inducida por la inmunoterapia intravesical con BCG [72]. (Modificada de: Immunotherapy for Urothelial Carcinoma: Current Status and Perspectives. Cancers 2011;3:3055-72).

En un estudio de depleción, tanto los linfocitos T CD8+ y CD4+ fueron esenciales para llevar a cabo con éxito el efecto antitumoral de la BCG [73].

Los pacientes con buena respuesta a la terapia con BCG presentan una notable infiltración de células CD8+ después de la terapia con BCG [69].

1.5.3.3 Papel de los macrófagos, expresión de moléculas inductoras de apoptosis y citocinas en la respuesta inmunológica:

Los macrófagos juegan un papel importante no solo en la presentación de antígenos sino también en la citotoxicidad.

Los macrófagos pueden unirse a las células tumorales vesicales a través de proteínas de superficie y posteriormente eliminarlas [70].

La terapia con BCG puede dar como resultado una estimulación positiva de la expresión de moléculas de adhesión como son el antígeno-1 asociado a función linfocitaria (LFA-1) o las moléculas inductoras de apoptosis como el ligando FAS y el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) en macrófagos[74-76]. Las citocinas Th1 como IFN- γ , IL-12, e IL-18 juegan un rol importante en la citotoxicidad de los macrófagos en contra de las células tumorales vesicales inducida por la BCG [77-78].

En contraste, Ayari y cols [79] comunicaron que elevados niveles de infiltración tumoral por células dendríticas CD83+ y macrófagos CD68+ previo a la terapia con BCG estaban asociados a un elevado riesgo de recurrencia. Estos resultados podrían ser explicados por un cambio favorable de respuesta Th1 de las células dendríticas en pacientes expuestos a pocas instilaciones con BCG a una respuesta Th2 menos favorable en los casos de instilaciones repetidas de BCG [79].

Las citocinas inducidas por la terapia con BCG, incluyen IL-8, IL-18, la proteína inducida por interferón (IP)-10, proteína quimiotáctica para monocitos (MCP)-1, MCP-3, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α , y MIP-1 β , pueden reclutar varias células inmunes [49,80-83]. La terapia con BCG activa componentes de la respuesta innata del sistema inmune a través de receptores tipo Toll (o Toll-like receptor TLR) (TLR) 2, TLR4 [84], y TLR9 [85] e induce la producción de IFN- γ en humanos por la células dendríticas vía TLR2 [86]. La BCG es capaz de inducir también la expresión de TRAIL en los neutrófilos [87]. Niveles elevados de proteína TRAIL en la orina de pacientes con cáncer vesical tratados con BCG están asociados con una respuesta favorable al tratamiento [88].

En el cáncer vesical predomina el patrón de citocinas supresor Th2, siendo susceptible al tratamiento con inmunoterapia intravesical, inclinando el patrón dominante Th2 a un patrón de citocinas Th1 (Figura 2) [89].

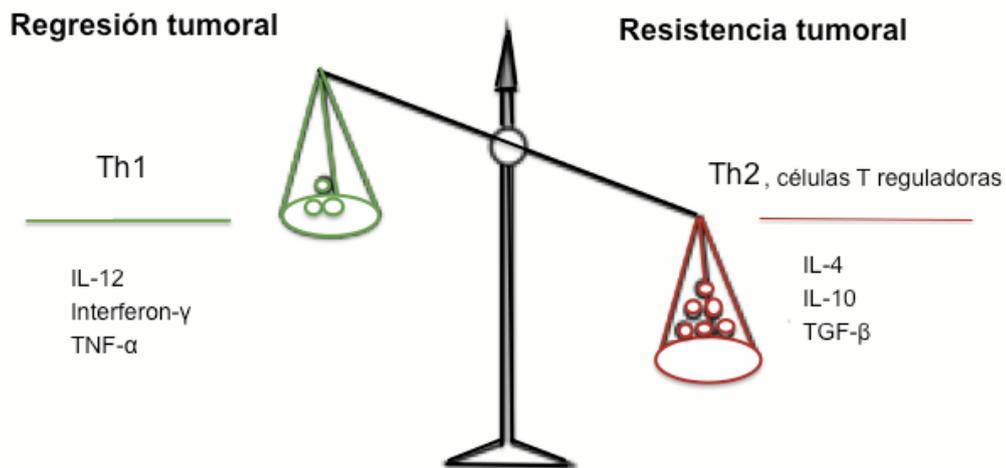


Figura 2. Factores que inhiben la función citolítica y promueven la resistencia tumoral incluidas la citocinas tipo Th2 y las células T reguladoras. Cuando existe predominio de citocinas Th1 se promueve la actividad citolítica. (Modificada de: The immunotherapy of prostate and bladder cancer. BJU int 2005;96:728-735).

La eficacia terapéutica de la inmunoterapia con BCG se basa en un correcto funcionamiento del sistema inmune. El patrón de citocinas representado por una respuesta de tipo Th1 ha sido detectado en modelos animales [90].

En realidad, con mayor control del patrón de citocinas Th1 dominado por el interferon- γ e IL-12 se desvía hacia un patrón Th2 con IL-10 [91].

Estudios in vitro en humanos han proporcionado una fuerte evidencia de que la BCG es un potente activador de las células NK, lo cual podría explicar la fuerte respuesta local en ausencia de inmunidad sistémica [92].

1.6.1 Mecanismos de escape de las células tumorales a la acción del sistema inmune en el cáncer vesical:

El sistema antígeno leucocitario humano (HLA), MHC en humano, de clase I juega un papel crítico en el reconocimiento y lisis de las células tumorales por los linfocitos T citotóxicos (CTLs), y defectos en la presentación de antígenos podrían permitir a los tumores escapar a la acción de CTLs [93]. El *down-regulation* del HLA de clase I en las células tumorales perjudica la presentación de antígenos tumorales y su péptido al sistema inmune [94]. El HLA de clase I presenta *down-regulation* en aproximadamente el 30% de las neoplasias vesicales [95-96]. Este es un factor pronóstico significativo en los pacientes sometidos a inmunoterapia con BCG [69]. Se sugiere que las células tumorales con down-regulated HLA de clase I escapan al reconocimiento de las células T y así, en estos casos, la inmunoterapia con BCG no es efectiva en el tratamiento de pacientes con cáncer vesical. En un modelo animal empleando cáncer vesical químicamente inducido, la actividad citotóxica de las células T de las ratas en las células tumorales con baja expresión de MHC de clase I, estuvo disminuida comparada con la de las células tumorales con alta expresión de MHC de clase I [97]. Otro estudio reciente utilizando muestras quirúrgicas de cáncer de vejiga humano ha demostrado cambios en la expresión de HLA de clase I durante el desarrollo tumoral [98]. Esto sugiere que la inmunoterapia estimula un nuevo ciclo de fuerte inmunoselección, eliminando las células con bajo HLA y/o cambios en este, sin embargo las células tumorales con alteraciones más importantes del HLA de clase I pueden escapar a la acción del sistema inmune y desarrollar tumores recurrentes. Por lo tanto, es esencial no sólo analizar los mecanismos de escape del sistema inmune, sino también desarrollar un

enfoque de inmunoterapia dirigidas a inhibir el escape, por ejemplo estimular *upregulation* de las moléculas HLA clase I en las células tumorales [99].

1.6.2 Mecanismo de escape inmune mediado por las células reguladoras T, MDSCs:

Las células reguladoras T (Tregs) son una subpoblación de células T que regulan la activación de las células T efectoras/helper así como de las células B. Muchos estudios de pacientes con cáncer han demostrado que la prevalencia de las Tregs es significativamente alta en las lesiones cancerosas en comparación con los controles sanos, y el porcentaje de Tregs entre TILs (linfocitos infiltrantes del tumor) se correlaciona positivamente con una tasa de supervivencia significativamente más baja [100]. En contraste, Winerdal y cols [101] comunicaron que la infiltración de Tregs en el cáncer vesical también se asoció con un mejor pronóstico. Sin embargo, el mecanismo de escape inmune a través de Treg sigue siendo controvertido en el cáncer de vejiga. Las MDSCs (células supresoras derivadas de mieloides) representan una población heterogénea de células inmunosupresoras que expresan una variedad de marcadores de superficie como CD11c+, CD11b+, CD33+, CD34+ y CD15+. La presencia de estas células también se correlaciona positivamente con la incidencia de recurrencia o enfermedad metastásica en los pacientes [100]. Eruslanov y cols [102] han demostrado que la activación de las células mieloides inflamatorias inhibiendo la proliferación de las células T a través de la inducción de Tregs en sangre periférica y tejidos tumorales de pacientes con cáncer vesical, representa una fuente de quimiocinas/citocinas y puede contribuir a la inflamación y a la disfunción inmune en el cáncer vesical. Se necesitan más estudios para confirmar estos resultados, examinar los

mecanismos que subyacen en los detalles, e investigar el impacto pronóstico en la supervivencia.

1.7 Oncogénesis:

Un cambio neoplásico del urotelio es un fenómeno producido por multitud de procesos [103]. Un iniciador o su metabolito son capaces de inducir alteraciones del DNA de una célula normal, lo que permite su transformación hacia una célula maligna. Ocurre una alteración de la transformación normal de la información genética de DNA a RNA y, por último, a la formación de la proteína.

Se desconocen los eventos genéticos exactos que conducen a esta transformación de múltiples fases, pero es probable que sean muchos y que pueden incluir la activación de oncogenes e inactivación o pérdida de genes supresores de tumores [104].

La proliferación celular normal es el resultado de una progresión ordenada a través del ciclo celular, mientras que la neoplasia se caracteriza por un crecimiento celular descontrolado. Los complejos proteicos vinculados al ciclo celular de ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas, regulan en gran medida esta progresión. La pérdida del control del ciclo celular puede ser el primer paso en la oncogénesis. El marcador molecular caracterizado de manera extensa en pacientes con cáncer vesical invasivo es la expresión de p53. Este gen es un gen supresor de tumor con una función importante en la regulación del ciclo celular. Cuando se produce daño en el DNA, la concentración de p53 aumenta, parando el ciclo celular y permitiendo la reparación del DNA. Mutaciones en el p53 producen un producto proteico anormal, permitiendo que células con un DNA dañado continúen su ciclo celular [105]. La proteína alterada de p53 puede detectarse mediante técnicas de inmunohistoquímica. La inmunoreactividad aumentada de p53 se

ha encontrado en cánceres vesicales de alto grado y se vincula con progresión de la enfermedad y disminución de la supervivencia total y específica de la enfermedad. En los últimos años han aparecido multitud de artículos que informan que p53 no sería la única proteína que se activaría en caso de daño del DNA [106-107].

La maquinaria celular que responde al daño del DNA consiste en una red de proteínas jerárquicamente ordenadas y complejos multiproteicos capaces de detectar las lesiones del DNA y activar mecanismos que o bien reparen dichas lesiones, detengan el ciclo celular (los denominados “checkpoints”) o sean capaces de inducir la muerte celular (apoptosis). El significado biológico de esta respuesta al daño del DNA tiene una gran importancia durante el desarrollo embrionario, así como para mantener la homeostasis del tejido adulto, como demuestra las relaciones encontradas entre la activación de los mecanismos de respuesta al daño del DNA y numerosos estados patológicos, incluido el cáncer [108-109]. Al contrario que los tejidos normales, en los cuales la respuesta al daño del DNA es prácticamente inexistente, las células tumorales muestran activación de los mecanismos de respuesta al daño del DNA, como se ha demostrado con la presencia de formas activadas de las kinasas Ataxia-telangiectasia mutada (ATM), Checkpoint 2 (Chk 2) y p53 los estadios iniciales de ciertos tumores de origen epitelial, entre ellos el tumor vesical [110-111].

Una segunda vía de respuesta al daño oxidativo del DNA sería al expresión de MICs (moléculas no clásicas relacionadas con el MHC de clase I) con la consiguiente activación de la inmunidad innata a través de las células NK (*Figura 3*).

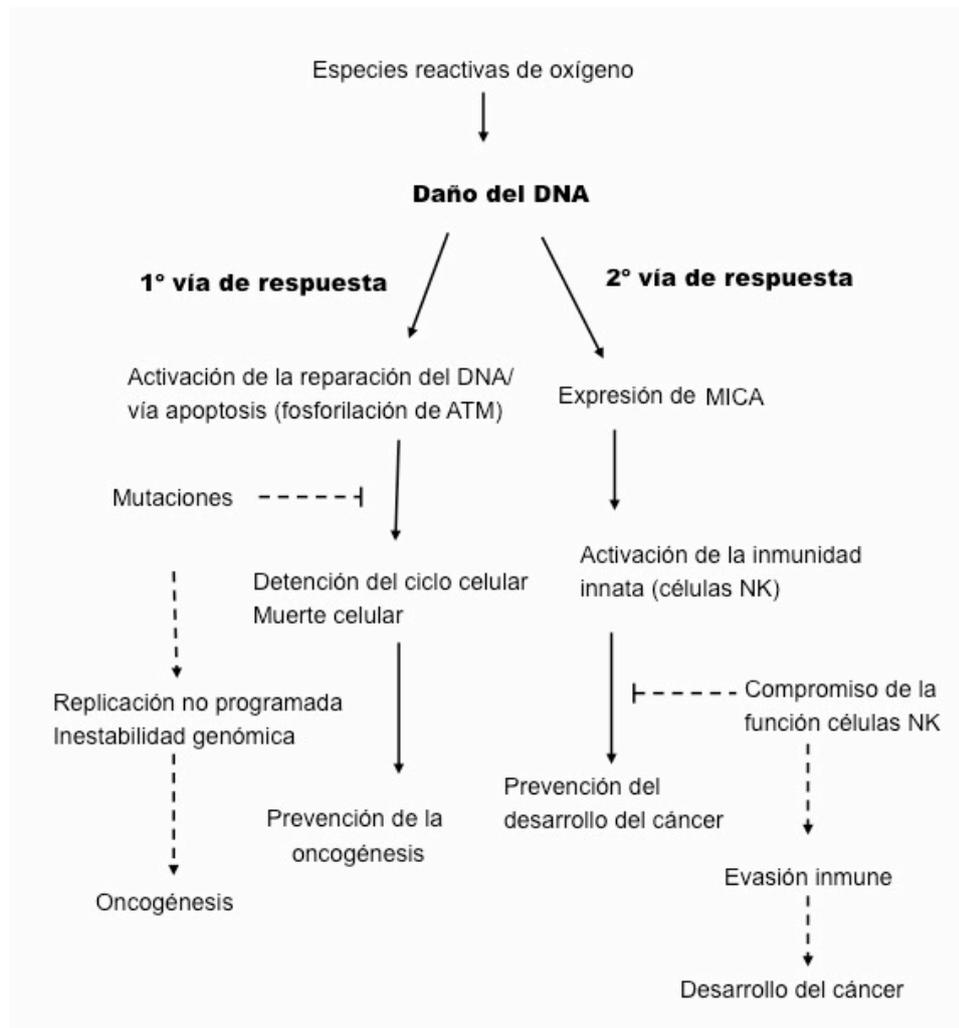


Figura 3. Respuesta celular y sistémica al daño oxidativo del DNA para prevenir el desarrollo del cáncer. (Modificada de: Oxidative DNA Damage in the Prostate May Predispose Men to a Higher Risk of Prostate Cancer. Transl Oncol 2009;2:39-45).

2. REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN BIBLIOGRÁFICA.

En los últimos años se ha intentado diseñar diversas estrategias de tratamiento con el uso de dianas moleculares.

En otros tumores (pulmón, próstata, riñón, mama, colon, cérvix, etc) se han llevado a cabo estudios relacionados con los mecanismos de respuesta de la inmunidad innata ante el daño oxidativo del DNA, desencadenando la citotoxicidad y secreción de citocinas.

2.1 Moléculas no clásicas relacionadas con el MHC de clase I:

En los últimos años se han descubierto genes relacionados con los genes HLA de clase I a los que se ha denominado en conjunto genes HLA de clase I "no clásicos".

Aunque existen diferencias en la secuencia aminoacídica, las moléculas HLA de clase I no clásicas presentan una estructura tridimensional similar a las clásicas, en particular en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$.

Hughes y cols [112] propusieron otra clasificación de esta familia multigénica, según la cual los genes HLA de clase I "clásicos" (HLA-A, -B y -C) se agruparían como HLA de clase Ia.

Los genes HLA de clase I "no clásicos" se dividirían en tres subfamilias:

- *HLA de clase Ib*: están dentro de la región cromosómica MHC y que muestran alta similitud con los clásicos (HLA-E, -F y -G).
- *HLA de clase Ic*: están dentro de la región cromosómica MHC y que muestran baja similitud con los clásicos (HFE y MIC).
- *HLA de clase Id*: situados fuera de la región cromosómica MHC y en general de baja similitud con los clásicos (CD1, EPCR, FcRN, MR1, ULBP y ZAG).

2.2 MIC (*Major histocompatibility complex class I Chain related proteins*):

MIC constituye una familia génica localizada en la región cromosómica formada por dos genes (MICA y MICB) y cinco pseudogenes no traducidos (MIC-C, -D, -E, -F y-G) [113] (Figura 4).

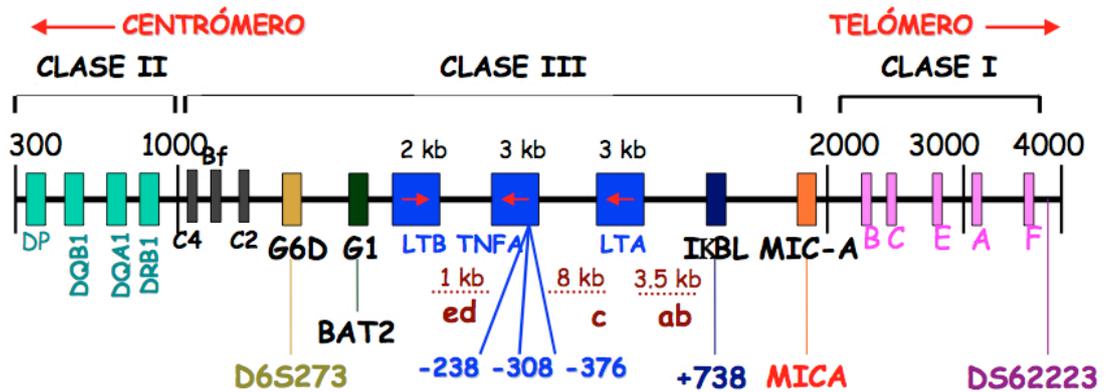


Figura 4. Esquema de las moléculas del MHC. Cromosoma 6p21.

2.3.1 MICA. Generalidades:

MICA es el acrónimo de **M**ajor **h**istocompatibility complex **C**lass **I** Chain related proteins to gen **A**. Constituye una de las moléculas relacionadas con el MHC de tipo I, de las denominadas "no clásicas". Existen otras moléculas no clásicas como MICB, pero su importancia parece ser menor.

En el año 1994 Bahram y cols [114] describieron una nueva familia de secuencia dentro del MHC de clase I pero con solo un 27% de homología con las demás moléculas de clase I del MHC.

Esta familia está ubicada en el cromosoma 6 a unos 40 kb en sentido centromérico del gen del MHC-B (Figura 4).

Los alelos MICA más frecuentes son el MICA*008 y MICA*010, mientras que los alelos MICA*005,*013 y *014 parecen no expresarse [115-116]. Este polimorfismo de las moléculas MICA (ausente en las MICB) está relacionado con cambios en el aminoácido 129 (metionina/valina; M129V) del dominio $\alpha 2$ (exón 3, A454G). Este polimorfismo parece tener implicaciones funcionales relevantes, aunque aún está por precisar [117].

La expresión de MICA aumenta en los procesos de neoformación, pero también como respuesta a otros tipos de estrés celular como las infecciones virales, procesos inflamatorios y enfermedades autoinmunes. También se han encontrado aloanticuerpos contra MICA en pacientes con rechazo de aloinjerto.

No se expresa por defecto, a pesar de que tiene homología con HLA, es decir no está presente en tejidos sanos, sólo está presente en colon, cuya presencia parece estar relacionada con el estrés bacteriano propio y contrariamente a lo que son las moléculas de histocompatibilidad de clase I y clase II, las moléculas MICA sólo se expresan en aquellas situaciones que llamamos estrés epitelial.

MICA no se asocia a $\beta 2$ -microglobulina y se expresa en tumores, epitelio gastrointestinal, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos y médula tímica. También se ha detectado su expresión en linfocitos T activados.

MICA es reconocida por un receptor denominado NKG2D (Natural- Killer Group 2, member D), siendo el más potente de sus ligandos.

La expresión de MICA aumenta en respuesta a infecciones o por neotransformación, desencadenando la citotoxicidad y secreción de IFN- γ por células que expresan NKG2D. Asimismo, la expresión de MICA en tejidos inflamados o en enfermedades autoinmunes (artritis reumatoidea, enfermedad celíaca y dermatitis seborreica) podría contribuir a la inmunopatología. Se han detectado aloanticuerpos contra MICA en

sueros de pacientes trasplantados con rechazo del aloinjerto, por lo que MICA es blanco de una respuesta inmune alogénica durante el rechazo.

Ante una situación de estrés celular, la expresión de MICA y su reconocimiento por la célula NKG2D+, se precipita una serie de respuestas:

- Liberación moléculas proinflamatorias (el prototipo es IF- α y TNF- α).
- La célula que expresa MICA es destruida, mediante la inyección de perforinas y granzimas.

2.3.2 Interés del estudio de MICA:

La expresión de MICA no es simplemente fenotípica sino que tienen funciones inmunológicas concretas. Mientras que la expresión de moléculas clase I del MHC son indicativas de integridad celular (conocido como "self" inactivador de respuesta inmune), la expresión de moléculas MICA y MICB traducen estrés celular (definido como infección o transformación celular). Las moléculas MICA no inactivan sino que evocan (activan) una respuesta inmunitaria específica inclusive a pesar de que las moléculas de clase I estén inactivas [118].

Existe un interés en MICA como inductor de una respuesta citotóxica antitumoral y la secreción de IFN- γ por células NKG2D+.

El estudio de la expresión de MICA podría servir como un antígeno tumoral diana en diversos tipos de neoplasias incluida el carcinoma vesical.

Se podrían reducir los efectos de la liberación de MICA de la superficie celular al torrente sanguíneo y mantener la respuesta inmune mediada por NKG2D como nueva opción terapéutica. Además aportaría información relacionada con el pronóstico y la supervivencia de los pacientes con cáncer vesical.

Sin embargo, nuevas evidencias indican que algunos tumores desarrollaron mecanismos de escape que comprometen al sistema MICA-NKG2D tales como:

- Secreción de MICA soluble, la disminución de la expresión de NKG2D y MICA inducido por el TGF- β de origen tumoral.
- Retención intracelular de MICA, lo que compromete la vigilancia inmunológica.

2.4.1 Receptor NKG2D (Natural- Killer Group 2, member D). Estructura y función:

El receptor NKG2D se encuentra en las células NK, células T γ/δ y células T α/β CD8+. El gen que codifica para este receptor se localiza en el complejo NKG2 (natural killer grupo 2), el producto del gen fue originalmente designado como nkg2d/NKG2D. El complejo NKG2 está localizado en el cromosoma 6 en ratones y en el cromosoma 12 en humanos [119].

El receptor NKG2D forma un heterodímero en la membrana de la célula con la molécula DAP10 (DNAX-activating protein of 10 kDa), que sirve como correceptor transductor de señales (*Figura 5a*).

La cascada señalizadora parece comenzar con la activación de la PI3K (fosfatidilinositol-3-kinasa) por la porción intracitoplasmática de la molécula adaptadora DAP10. Es importante destacar que al no ser esta activación mediada por un motivo ITAM (immunoreceptor tyrosine- based activating motif), no es inhibible por receptores portadores de motivos ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) presentes en la misma célula. De ahí que la señal activadora proporcionada por la unión del ligando MICA sea dominante sobre otras señales inhibitorias emanantes de la misma célula, como las generadas por las propias moléculas de clase I.

La respuesta de la célula estimulada por este receptor (NKG2D/DAP10) consiste en un disparo de la actividad citotóxica y en un incremento de la síntesis de citocinas entre las que destaca el interferón- γ [120-121].

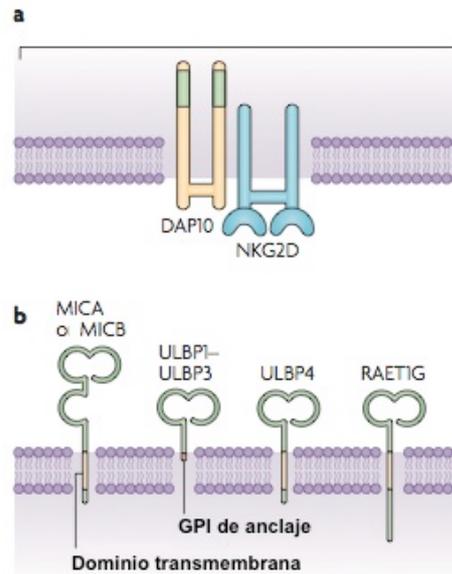


Figura 5. (a) Receptor NKG2D acoplado a DAP10. (b) MICA y otros ligandos del receptor NKG2D. (Modificada de: Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol.* 2007 ;7:737-44).

2.4.1 Ligandos del receptor NKG2D:

En humanos existen 7 ligandos de NKG2D (*Figura 5b*), los cuales se dividen en 2 familias:

- Las proteínas relacionadas con el MHC de clase I, gen A (MICA) y MICB.
- La familia de las proteínas de unión al citomegalovirus ULBP (UL16-binding protein) también conocidas como proteínas RAET1. Las cuales consisten 5 miembros (ULBP1–ULBP4 y RAET1G).

No todos los ligandos de NKG2D son funcionalmente equivalentes, el ligando mejor conocido es MICA [122].

3. HIPÓTESIS.

En base a la ya conocida expresión de las *moléculas relacionadas con el complejo principal de histocompatibilidad de clase I, gen A* (MICA) en las células tumorales de algunos órganos como mecanismo de defensa innato al daño oxidativo del DNA y a la mayor expresión de su receptor NKG2D en la células NK, la hipótesis del presente trabajo es que los pacientes afectos de cáncer urotelial vesical presentarán a nivel tisular mayor expresión de MICA así como de su receptor NKG2D y que tal expresión posiblemente esté relacionada con las características clínico patológicas del tumor y la supervivencia.

4. OBJETIVOS.

1. Determinar la expresión tisular de las *moléculas relacionadas con el complejo principal de histocompatibilidad de clase I, gen A (MICA) y NKG2D (Natural-Killer Group 2, member D)* en el carcinoma urotelial de vejiga.
2. Evaluar el nivel de expresión de estas moléculas relacionándolo con el grado de infiltración (T) y con el grado histológico (G).
3. Analizar el nivel de expresión tisular de MICA y NKG2D según determinados factores clínicos conocidos de riesgo en el carcinoma urotelial de vejiga:
 - 3.1 Grupos de riesgo de la EORTC.
 - 3.2 Hábito tabáquico.
 - 3.3 Sexo.
4. Estudiar la utilidad de la expresión tisular de MICA y NKG2D como factor pronóstico independiente de recidiva.
5. Estudiar la utilidad de la expresión tisular de MICA y NKG2D como factor pronóstico independiente de progresión tumoral.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 Tipo de Estudio:

Se trata de un estudio retrospectivo de casos de todos los pacientes diagnosticados de tumor vesical primario tratados con resección transuretral de tumor vesical (RTU) durante el período 1998-2003 (352 pacientes) con un seguimiento mínimo de 8 años según los protocolos de seguimiento oncológico del Servicio de Urología del Hospital del Mar.

5.2 Criterios de inclusión:

Se han recogido todos los pacientes diagnosticados de tumor vesical primario tratados con resección transuretral de tumor vesical (RTU) procedentes del archivo de registro de tumores del Servicio de Urología en el período comprendido entre los años 1998-2003 (correspondiente a 352 pacientes) y en los que hubiera suficiente material recogido para diagnóstico histológico.

5.3 Criterios de exclusión:

Los criterios de exclusión han sido:

- No representación de capa muscular en la muestra (pTx).
- Presencia de *carcinoma in situ* (Tis) asociado.
- Material insuficiente para la construcción de un microarray de tejido (TMA).

5.4.1 Variables clínicas:

- **Edad** (años): Variable cuantitativa discreta.
- **Sexo**: Variable cualitativa binaria.
- **Fecha del diagnóstico**.
- **Recidiva**: Variable cualitativa binaria.
- **Fecha de la recidiva**.
- **Progresión**: Variable cualitativa binaria.
- **Fecha de la progresión**.
- **Instilaciones con BCG**: Variable cualitativa binaria.

5.4.2 Variables anatomopatológicas:

- **Multiplicidad**: Variable cuantitativa continua.
- **Tamaño tumoral**: Variable cuantitativa continua.
- **Estadio** (pTa, pT1): Variable cualitativa ordinal.
- **Grado tumoral según la clasificación de la OMS de 1973** (GI, GII, GIII): Variable cualitativa ordinal.
- **Grado tumoral según la clasificación de la OMS del 2004** (Bajo grado, alto grado): Variable cualitativa binaria.

5.4.3 Variables moleculares:

- **Expresión de MICA tisular**: Variable semicuantitativa según el grado de intensidad.
- **Expresión de NKG2D tisular**: Variable semicuantitativa según el grado de intensidad.

5.5 Construcción del Tissue microarray (TMA):

A partir de las muestras de anatomía patológica de las resecciones transuretrales de tumor vesical y después de la aplicación de los criterios de exclusión se ha construido un Tissue microarray (TMA).

De los 352 pacientes tras aplicar los criterios de exclusión, quedaron 280 pacientes.

El primer paso de la construcción del TMA fue el análisis y preparación de los bloques de parafina archivados de dichos pacientes.

La posibilidad intrínseca a la técnica de analizar muchos casos y un período largo de estudio, permitió la inclusión de un número suficiente de pacientes en diferentes situaciones clínicas. Para ello fue de gran utilidad el trabajo con bases de datos clínicas y patológicas actualizadas.

La información clínica y patológica obtenida fue introducida en una base de datos relacional (TMA DB) creada mediante Microsoft Access 2002 (Microsoft, Redmond, WA) para organizar y relacionar todos los niveles de información a medida que fue creándose el TMA y para posteriormente realizar las diferentes lecturas de las técnicas de inmunohistoquímica.

Se llevó a cabo la tinción de las laminillas con hematoxilina y eosina (H&E) de referencia en todos los bloques para revisar los diagnósticos y marcar con tinta las zonas de interés.

De los diferentes bloques donantes, y una vez localizados los focos a adquirir, se obtuvieron mediante un arrayer manual (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) las biopsias de 1 mm a integrar en el bloque receptor (*Figura 6*).

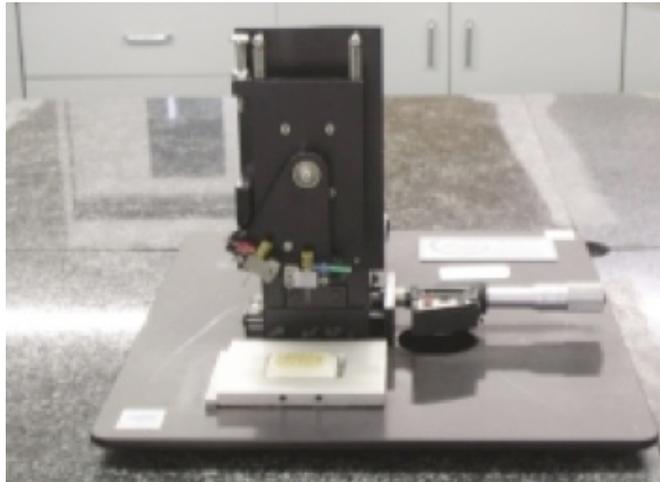


Figura 6. Arrayer manual (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) montado con agujas de 0.6 mm construyendo un bloque receptor.

Una vez que los bloques receptores estuvieron contruidos, se seccionaron en láminas de 6 micras para realizar un control de calidad con tinción de H&E.

Se emplearon como casos control 10 biopsias en cada TMA de tejido procedente de vejiga urinaria sana.

En cada TMA los controles fueron colocados en diferentes localizaciones. Todo el proceso fue representado manualmente a medida que se construía en unas plantillas para facilitar el paso de los datos a la TMA DB.

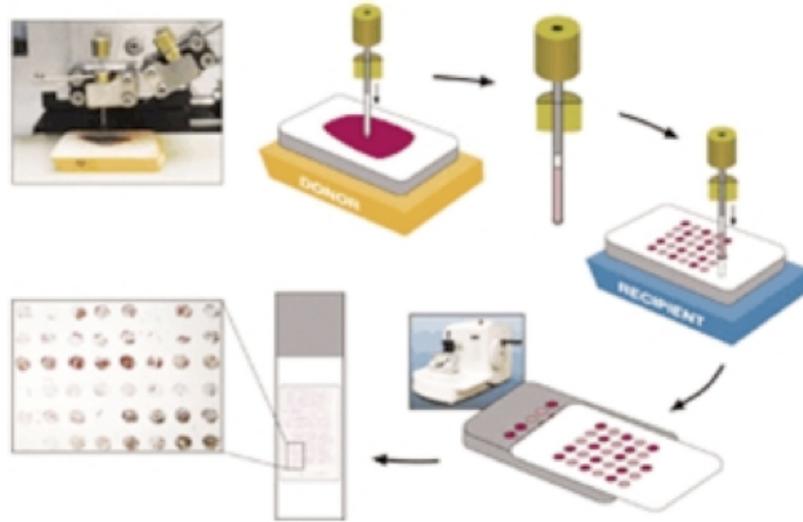


Figura 7. Proceso de creación de una laminilla de TMA.

5.6.1 Detección y cuantificación de la expresión de moléculas MICA a nivel tisular:

La metodología que se aplicará para evaluar la expresión (presente o ausente) y su intensidad (método semicuantitativo) se basará en técnicas inmunohistoquímicas, utilizando como anticuerpo primario un policlonal monoespecífico anti-MICA humanas. Brevemente, las laminillas se procesarán mediante un proceso convencional de desparafinación y desenmascaramiento mediante presión y ácido cítrico (3g/1500 ml PBS). Se realizarán lavados con solución tampón fosfato-salino (PBS) y solución de peróxido de hidrógeno (15 cc/250 ml H₂O₂).

El anticuerpo primario se aplicará a la dilución validada. La reacción se incubará a temperatura ambiente durante 1 hora. Se realizarán nuevos lavados con solución tampón fosfato salino (PBS). El revelado de la reacción utilizará un anticuerpo secundario (anti-mouse), diaminobencidina y peroxidasa, según métodos específicos. El contraste se logrará mediante tinción con hematoxilina de Mayer. Todas las muestras

serán procesadas por duplicado e incluirán un control negativo interno. Este incluirá el mismo proceso excepto el anticuerpo primario, en cuyo lugar se aplicará durante el tiempo requerido PBS como solución control. Las laminillas serán almacenadas en un archivador específico, rotuladas por paciente y lote de procesamiento.

5.6.2 Análisis de la expresión de MICA:

La expresión de MICA se evaluará en dos compartimientos, el epitelial y el basal (lámina propia y/o muscular). Se incluirá un baremo doble. El primero categorizará la expresión como presente o ausente en cada compartimiento. El segundo baremo la cuantificará por el método de cuantificación por "histocore", en el que dos observadores que no tendrán conocimiento del grupo al que pertenecen las muestras, valorarán al microscopio la proporción de células que expresan el anticuerpo con una intensidad de 1+, 2+ o 3+. La expresión global en cada muestra se obtendrá en función de la fórmula $[(\%1+) + 2(\%2+) + 3(\%3+)]$, cuyo valor máximo será de 300 y el mínimo de 0. Se calcularán el grado de correlación y concordancia en la lectura inter-observador.

5.6.3 Detección y cuantificación de la expresión de NKG2D:

La expresión tisular de NKG2D en las células que se encuentran infiltrando el tejido tumoral se llevará a cabo mediante la administración de anti-NKG2D monoclonal CX5 (eBioscience) para evaluar la expresión (presente o ausente) y su intensidad (método semicuantitativo) basado en técnicas de inmunohistoquímica.

La desparafinación y desenmascaramiento se realizará con el mismo procedimiento explicado previamente en el apartado de detección de MICA e igualmente todas las muestras serán procesadas por duplicado e incluirán un control negativo interno.

Las laminillas serán almacenadas en un archivador específico, rotuladas por paciente y lote de procesamiento. La expresión de NKG2D se valorará con la misma metodología explicada para valorar la expresión de MICA.

En todos los procedimientos anteriores se seguirán los protocolos detallados por el laboratorio para cada uno de los kits especificados.

5.6.4 Controles de inmunohistoquímica para valorar la expresión tisular de MICA/NKG2D:

Para cada anticuerpo, se emplearán controles positivos y negativos adecuados, a partir de tejidos procedentes de neoplasia de recto que han recibido tratamiento con RT (control positivo) y 10 muestras de tejido vesical sano procedente de donantes de cadáver para trasplante renal, obtenidos durante extracciones multiorgánicas por el equipo de trasplante del Servicio de Urología del Hospital del Mar (controles negativos).

5.7 Seguimiento oncológico:

El protocolo de seguimiento de los pacientes con CVSIM aplicado en el Servicio de Urología del Hospital del Mar se lleva a cabo según una adaptación de las recomendaciones de las guías de la Asociación Europea de Urología (EAU).

Los calendarios de seguimiento se ajustan según el grupo riesgo al cual pertenece cada paciente, mediante el uso de tablas de riesgo de la EORTC (*Tabla 3*).

El estudio con cistoscopia flexible, ecografía reno-vesico-prostática (ECO RVP) y citologías de orina, constituyen las exploraciones complementarias básicas para el seguimiento oncológico. Sin embargo también es fundamental llevar a cabo una correcta anámnesis durante las visitas sucesivas.

- Grupo de **bajo riesgo** de recidiva y progresión: cistoscopia flexible, ECO RVP y 3 citologías urinarias al cabo de 6 meses. En caso de ser negativas, las siguientes cistoscopias y citologías han de repetirse cada 6 meses hasta cumplir 1 año de la RTU y anualmente a partir de entonces.
- Grupo de **alto riesgo** de progresión: cistoscopia flexible, ECO RVP y 3 citologías urinarias al cabo de 6 meses. En caso de ser negativas, las siguientes cistoscopias y citologías han de repetirse cada 6 meses durante un período de 5 años y anualmente a partir de entonces.
- Grupo de **riesgo intermedio** de progresión: cistoscopia flexible, ECO RVP y 3 citologías urinarias al cabo de 6 meses. En caso de ser negativas, las siguientes cistoscopias y citologías han de repetirse cada 6 meses hasta cumplir 2 años de la RTU y anualmente a partir de entonces.

5.8 Tamaño muestral:

Aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.20 en un contraste bilateral, se precisan 66 sujetos en el grupo de "bajo riesgo" y 132 en el grupo de "alto riesgo" para detectar una diferencia igual o superior al 20% de recidiva a los 2 años entre ambos grupos.

5.9 Métodos estadísticos:

A partir de la base de datos se realizará un estudio univariante de las variables analizadas aplicando el test de la U de Mann-Whitney para variables cuantitativas y test de la χ^2 para las variables cualitativas.

Los análisis semicuantitativos se analizarán mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

Se realizará un estudio multivariante para la identificación de las variables con significado pronóstico independiente.

Para el estudio de supervivencia libre de recidiva y progresión se realizará un estudio de regresión logística de Cox mediante un análisis de Kaplan-Meier (log-rank).

En todos los casos se considerará significativo un valor de p menor a 0.05.

Los anteriores cálculos se llevarán a cabo con la ayuda del programa informático SPSS 15.0 para Windows ® (Statistical Product and Service Solutions Ibérica, S.L.U., Madrid, España).

6. RESULTADOS.

6.1 Resultados preliminares:

Hasta Septiembre de 2011 se ha llevado a cabo diversas actividades del trabajo de investigación/proyecto de tesis doctoral:

- Elaboración de la base de datos y actualización constante de la misma, incluyendo todas las variables a estudio y planificación del análisis estadístico.
- Revisión bibliográfica.
- Cálculo del Tamaño muestral.
- Construcción del tissue microarray (TMA) en su totalidad, el cual se encuentra pendiente de corte para aplicación de la inmunohistoquímica.
- Prueba de la técnica de inmunohistoquímica para la detección de MICA/NKG2D tisular por parte de nuestro grupo de trabajo en tejido vesical sano de fumadores y no fumadores, así como también en tejido tumoral, observando mayor expresión por métodos semicuantitativos en las muestras tumorales. También se han probado las técnicas de inmunohistoquímica para detección de MICA en tejido prostático.

6.2 Calendario de actuaciones del Proyecto de Tesis Doctoral:

Fecha	Actuaciones
Septiembre 2011	Entrega de la memoria escrita del trabajo de investigación/ proyecto de tesis doctoral
Octubre 2011	Defensa del trabajo de investigación/ proyecto de tesis doctoral
Noviembre 2011	Corte del tissue microarray (TMA)
Diciembre 2011	Actualización de la base de datos y revisión bibliográfica
Enero 2012	Aplicación de la Técnica de inmunohistoquímica para detección de MICA/NKG2D y lectura de los resultados
Febrero 2012	Actualización de la base de datos y revisión bibliográfica
Marzo-Abril 2012	Análisis de los resultados obtenidos
Mayo-Junio 2012	Discusión y conclusiones

BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18:581-92.
- 2.- Jemal A, Murray T, Ward E, et al: Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:10-30.
- 3.- Vineis P., Alavanja M., Buffler P, Fontham E., Franceschi S., Gao Y.T., et al. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:99-106.
- 4.- Bryant M.S., Vineis P., Skipper P.L., Tannenbaum S.R. Hemoglobin adducts of aromatic amines: associations with smoking status and type of tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:9788-91.
- 5.- Sorahan T., Pope D. Mortality study of workers employed at a plant manufacturing chemicals for the rubber industry: 1955–86. *Br J Ind Med* 1993; 50:998-1002.
- 6.- Baan R., Straif K., Grosse Y., Secretan B., El Ghissassi F., Bouvard V. et al. Carcinogenicity of some aromatic amines, organic dyes and related exposures. *Lancet Oncol* 2008; 9:322-3.
- 7.- Parkin D.M., Pisani P., Ferlay J. Estimates of the Worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80:827-41.
- 8.- Mansson A., Anderson H., Colleen S. Time lag to diagnosis of bladder cancer-influence of psychosocial parameters and level of health-care provision. *Scand J Urol Nephrol* 1993; 27:363-9.
- 9.- Brauers A., Jakse G.. Epidemiology and biology of human urinary bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126:575-83.
- 10.- Madeb R., Messing E.M. Gender, racial and age differences in bladder cancer incidence and mortality. *Urol Oncol* 2004; 22:86-92.
- 11.- Horstmann M., Witthuhn R., Falk M., Stenzl A. Gender-Specific Differences in Bladder Cancer: A Retrospective Analysis. *Gender Med* 2008; 5:385-394.
- 12.- Mungan A.N., Kiemeny L.A.M.L., Van Dicjk J.A.A.M., Van Der Poel H.G., Witjes J.A. Gender differences in stage distribution of bladder cancer. *Urology* 2000; 55:368-71.

- 13.- Puente D., Malats N., Cecchini L., Tardón A., García-Closas R., Serra C. et al. Gender-related differences in clinical and pathological characteristics and therapy of bladder cancer. *Eur Urol* 2003; 43:53-62 .
- 14.- Pashos C.L., Botteman M.F., Laskin B.L., Redaelli A. Bladder cancer. Epidemiology, diagnosis and management. *Cancer pract* 2002;10:311-322.
- 15.- Instituto Nacional de Estadística. Demografía y población: Cifras de población. Consultado en 2006. Disponible en : <http://www.ine.es>.
- 16.- Chang S.S., Alberts G., Cookson M.S., Smith J.A. Jr. Radical cystectomy is safe in elderly patients at high risk. *J Urol*. 2001;166:938-941.
- 17.- Vaidya A., Soloway M.S., Hawke C., Tiguert R., Civantos F. De novo muscle invasive bladder cancer: is there a change in trend? *J Urol* 2001 Jan;165:47-50.
- 18.- Prout G.R. Jr., Griffin P.P., Shipley W.U. Bladder carcinoma as a systemic disease. *Cancer* 1979 ;43:2532-9.
- 19.- Babjuk M., Oosterlinck W., Sylvester R., Kaasinen E., Bohle A., Palou-Redorta J., Roupret M. EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder, the 2011 Update. *Eur. Urol*. 2011, 59, 997-1008.
- 20.- Holmäng S., Hedelin H., Anderström C., et al.: The relationship among multiple recurrences, progression and prognosis of patients with stages Ta and T1 transitional cell cancer of the bladder followed for at least 20 years. *J Urol* 1995 ;153:1823-7.
- 21.- Smits G., Schaafsma E., Kiemeny L., et al.: Microstaging of pT1 transitional cell carcinoma of the bladder: identification of subgroups with distinct risks of progression. *Urology* 52: 1009-13; discussion 1013-4, 1998.
- 22.- Igawa M., Urakami S., Shirakawa H., et al.: Intravesical instillation of epirubicin: effect on tumour recurrence in patients with dysplastic epithelium after transurethral resection of superficial bladder tumour. *Br J Urol* 1996 ;77:358-62.
- 23.- Lacombe L., et al.: Overexpression of p53 protein in a high-risk population of patients with superficial bladder cancer before and after bacillus Calmette-Guérin therapy: correlation to clinical outcome. *J Clin Oncol* 1996 ;14:2646-52.
- 24.- van der Meijden A.P., Sylvester R.J., Oosterlinck W., Hoeltl W., Bono AV; EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Group. Maintenance bacillus Calmette-Guérin for Ta, T1 bladder tumors is not associated with increased toxicity: results from a European

Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Group Phase III Trial. *Eur Urol* 2003 ;44:429-34.

25.- Herr H.W., Schwalb D.M., Zhang Z.F., et al.: Intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy prevents tumor progression and death from superficial bladder cancer: ten-year follow-up of a prospective randomized trial. *J Clin Oncol* 1995;13:1404-8.

26.- Coplen D.E., Marcus M.D., Myers J.A., et al.: Long-term followup of patients treated with 1 or 2, 6-week courses of intravesical bacillus Calmette-Guérin: analysis of possible predictors of response free of tumor. *J Urol* 1990 ;144: 652-7.

27.- Catalona W.J., Hudson M.A., Gillen D.P., et al.: Risks and benefits of repeated courses of intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy for superficial bladder cancer. *J Urol* 1987 ;137:220-4.

28.- Herr HW: Progression of stage T1 bladder tumors after intravesical bacillus Calmette-Guérin. *J Urol* 1991 ;145:40-3.

29.- Malmström P.U., Wijkström H., Lundholm C., et al.: 5-year followup of a randomized prospective study comparing mitomycin C and bacillus Calmette-Guérin in patients with superficial bladder carcinoma. Swedish-Norwegian Bladder Cancer Study Group. *J Urol* 1999 ;161:1124-7.

30.- Shelley M.D., Kynaston H., Court J., Wilt T.J., Coles B., Burgon K., Mason M.D. A systematic review of intravesical bacillus Calmette-Guérin plus transurethral resection vs transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer. *BJU Int* 2001 ;88:209-16.

31.- Han R.F., Pan JG. Can intravesical bacillus Calmette-Guérin reduce recurrence in patients with superficial bladder cancer? A metaanalysis of randomized trials. *Urology* 2006 ;67:1216-23.

32.- Shelley M.D., Wilt T.J., Court J., Coles B., Kynaston H., Mason M.D. Intravesical bacillus Calmette-Guérin is superior to mitomycin C in reducing tumour recurrence in high-risk superficial bladder cancer: a metaanalysis of randomized trials. *BJU Int* 2004 ;93:485-90.

- 33.- Böhle A., Jocham D., Bock P.R. Intravesical bacillus Calmette-Guérin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J Urol* 2003 ;169:90-5.
- 34.- Böhle A., Bock P.R. Intravesical bacillus Calmette-Guérin versus mitomycin C in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology* 2004 ;63:682-7.
- 35.- Sylvester R.J., van der Meijden A.P., Lamm D.L. Intravesical bacillus Calmette-Guérin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 2002; 168:1964-70.
- 36.- Huncharek M., Kupelnick B. Impact of intravesical chemotherapy versus BCG immunotherapy on recurrence of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Am J Clin Oncol.* 2003; 26:402-7.
- 37.- Huncharek M., Kupelnick B. The influence of intravesical therapy on progression of superficial transitional cell carcinoma of the bladder: a metaanalytic comparison of chemotherapy versus bacilli Calmette-Guérin immunotherapy. *Am J Clin Oncol* 2004 ;27:522-8.
- 38.- Morales A., Eidinger D., Bruce, A.W. Intracavitary Bacillus Calmette-Guérin in the treatment of superficial bladder tumors. *J. Urol.* 1976; 116:180-183.
- 39.- Higuchi T., Shimizu M., Owaki A., Takahashi M., Shinya E., Nishimura T., Takahashi H. A possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma: involvement of innate effector cells for the inhibition of tumor growth. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 ;58:1245-55.
- 40.- Becich M.J., Carroll S., Ratliff T.L. Internalization of bacille Calmette-Guérin by bladder tumor cells. *J Urol* 1991 ;145:1316-1324.
- 41.- Kuroda K., Brown E.J., Telle W.B., Russell D.G., Ratliff, T.L. Characterization of the internalization of bacillus Calmette-Guérin by human bladder tumor cells. *J Clin Invest* 1993 ;91:69-76.

- 42.- Sinn H.W., Elzey B.D., Jensen R.J., Zhao X., Zhao W., Ratliff T.L. The fibronectin attachment protein of bacillus Calmette-Guérin (BCG) mediates antitumor activity. *Cancer Immunol. Immunother.* 2008; 57:573-579.
- 43.- Takeuchi A., Dejima T., Yamada H., Shibata K., Nakamura R., Eto M., Nakatani T., Naito S., Yoshikai Y. IL-17 production by gammadelta T cells is important for the antitumor effect of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin treatment against bladder cancer. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41:246-251.
- 44.- Alexandroff A.B., Jackson A.M., O'Donnell M.A., James K. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet* 1999; 353:1689-1694.
- 45.- Simons M.P., O'Donnell M.A., Griffith T.S. Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. *Urol Oncol* 2008 ;26:341-345.
- 46.- Jackson A.M., Alexandroff A.B., McIntyre M., Esuvaranathan K., James K., Chisholm G.D. Induction of ICAM 1 expression on bladder tumours by BCG immunotherapy. *J Clin Pathol* 1994 ;47:309-312.
- 47.- Alexandroff A.B., Robins R.A., Murray A., James K. Tumour immunology: false hopes-New horizons? *Immunol Today* 1998; 19:247-250.
- 48.-Thalmann G.N., Dewald B., Baggiolini M., Studer U.E. Interleukin-8 expression in the urine after bacillus Calmette-Guérin therapy: A potential prognostic factor of tumor recurrence and progression. *J Urol* 1997 ;158:1340-1344.
- 49.- Thalmann G.N., Sermier A., Rentsch C., Mohrle K., Cecchini M.G., Studer, U.E. Urinary Interleukin-8 and 18 predict the response of superficial bladder cancer to intravesical therapy with bacillus Calmette-Guérin. *J Urol* 2000 ;164:2129-2133.
- 50.- De Boer E.C., De Jong W.H., van der Meijden A.P., Steerenberg P.A., Witjes J.A., Vegt P.D., Debruyne F.M., Ruitenberg E.J. Presence of activated lymphocytes in the urine of patients with superficial bladder cancer after intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guérin. *Cancer Immunol Immunother* 1991 ;33:411-416.
- 51.- Prescott S., James K., Hargreave T.B., Chisholm G.D., Smyth, J.F. Intravesical Evans strain BCG therapy: Quantitative immunohistochemical analysis of the immune response within the bladder wall. *J Urol* 1992 ;147:1636-1642.
- 52.- Jackson A.M., Alexandroff A.B., Kelly R.W., Skibinska A., Esuvaranathan K., Prescott S., Chisholm G.D., James K. Changes in urinary cytokines and soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in bladder cancer patients after bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy. *Clin Exp Immunol* 1995 ;99:369-375.

- 53.- Liu W., O'Donnell M.A., Chen X., Han R., Luo Y. Recombinant bacillus Calmette-Guérin (BCG) expressing interferon-alpha 2B enhances human mononuclear cell cytotoxicity against bladder cancer cell lines in vitro. *Cancer Immunol. Immunother.* 2009 ;58:1647-1655.
- 54.- Wang M.H., Flad H.D., Bohle A., Chen Y.Q., Ulmer A.J. Cellular cytotoxicity of human natural killer cells and lymphokine-activated killer cells against bladder carcinoma cell lines. *Immunol Lett* 1991 ;27:191-197.
- 55.- Bohle A., Thanhauser A., Ulmer A.J., Ernst M., Flad H.D., Jocham D. Dissecting the immunobiological effects of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in vitro: Evidence of a distinct BCG-activated killer (BAK) cell phenomenon. *J Urol* 1993 ;150:1932-1937.
- 56.- Thanhauser A., Bohle A., Flad H.D., Ernst M., Mattern T., Ulmer A.J. Induction of bacillus-Calmette-Guérin-activated killer cells from human peripheral blood mononuclear cells against human bladder carcinoma cell lines in vitro. *Cancer Immunol Immunother* 1993 ;37:105-111.
- 57.- Brandau S., Suttman H., Riemensberger J., Seitzer U., Arnold J., Durek C., Jocham D., Flad H.D., Bohle A. Perforin-mediated lysis of tumor cells by Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin-activated killer cells. *Clin. Cancer Res.* 2000 ;6:3729-3738.
- 58.- Kawashima T., Norose Y., Watanabe Y., Enomoto Y., Narazaki H., Watari E., Tanaka S., Takahashi H., Yano I., Brenner M.B., Sugita M. Cutting edge: major CD8 T cell response to live bacillus Calmette-Guérin is mediated by CD1 molecules. *J Immunol* 2003 ;170:5345-5348.
- 59.- Wang M.H., Chen Y.Q., Gercken J., Ernst M., Bohle A., Flad H.D., Ulmer A.J. Specific activation of human peripheral blood gamma/delta + lymphocytes by sonicated antigens of Mycobacterium tuberculosis: role in vitro in killing human bladder carcinoma cell lines. *Scand J Immunol* 1993 ;38:239-246.
- 60.- Higuchi T., Shimizu M., Owaki A., Takahashi M., Shinya E., Nishimura T., Takahashi H. A possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma: involvement of innate effector cells for the inhibition of tumor growth. *Cancer Immunol Immunother* 2009 ;58:1245-1255.
- 61.- Naoe M., Ogawa Y., Takeshita K., Morita J., Iwamoto S., Miyazaki A., Yoshida H. Bacillus Calmette-Guérin-pulsed dendritic cells stimulate natural killer T cells and gammadeltaT cells. *Int J Urol* 2007 ;14:532-538.

- 62.- Emoto M., Emoto Y., Buchwalow I.B., Kaufmann S.H. Induction of IFN-gamma-producing CD4+ natural killer T cells by Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guérin. *Eur J Immunol* 1999 ;29:650-659.
- 63.- Suttman H., Riemensberger J., Bentien G., Schmaltz D., Stockle M., Jocham D., Bohle A., Brandau S. Neutrophil granulocytes are required for effective Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses. *Cancer Res* 2006 ;66:8250-8257.
- 64.- Rosevear H.M., Lightfoot A.J., O'Donnell M.A., Griffith T.S. The role of neutrophils and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer Metastasis Rev* 2009 ;28:345-353.
- 65.- Klostergaard J., Leroux M.E., Hung M.C. Cellular models of macrophage tumoricidal effector mechanisms in vitro. Characterization of cytolytic responses to tumor necrosis factor and nitric oxide pathways in vitro. *J Immunol* 1991 ;147:2802-2808.
- 66.- Schwamberger G., Flesch I., Ferber E. Tumoricidal effector molecules of murine macrophages. *Pathobiology* 1991 ;59:248-253.
- 67.- Ratliff T.L., Ritchey J.K., Yuan J.J., Andriole G.L., Catalona W.J. T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer. *J Urol* 1993 ;150:1018-1023.
- 68.- Wang R., Rogers A.M., Ratliff T.L., Russell J.H. CD95-dependent bystander lysis caused by CD4+ T helper 1 effectors. *J Immunol* 1996 ;157:2961-2968.
- 69.- Kitamura H., Torigoe T., Honma I., Sato E., Asanuma H., Hirohashi Y., Sato N., Tsukamoto, T. Effect of human leukocyte antigen class I expression of tumor cells on outcome of intravesical instillation of bacillus calmette-guerin immunotherapy for bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2006 ;12:4641-4644.
- 70.- Luo Y., Knudson M.J. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin-induced macrophage cytotoxicity against bladder cancer cells. *Clin. Dev. Immunol* 2010 ;2010:357591.
- 71.- Alexandroff A.B., Nicholson S., Patel P.M., Jackson A.M. Recent advances in bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in bladder cancer. *Immunotherapy* 2010 ;2:551-560.
- 72.- Kitamuro H., Tsukamoto T. Immunotherapy for Urothelial Carcinoma: Current Status and Perspectives. *Cancers* 2011 ;3:3055-3072.

- 73.- Ratliff T.L., Ritchey J.K., Yuan J.J., Andriole G.L., Catalona W.J. T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer. *J Urol* 1993 ;150: 1018-1023.
- 74.- Mustafa T., Phyu S., Nilsen R., Bjune G., Jonsson R. Increased expression of Fas ligand on Mycobacterium tuberculosis infected macrophages: A potential novel mechanism of immune evasion by Mycobacterium tuberculosis? *Inflammation* 1999 ;23:507-521.
- 75.- DesJardin L.E., Kaufman T.M., Potts B., Kutzbach B., Yi H., Schlesinger L.S. Mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages exhibit enhanced cellular adhesion with increased expression of LFA-1 and ICAM-1 and reduced expression and/or function of complement receptors, FcγRII and the mannose receptor. *Microbiology* 2002 ;148:3161-3171.
- 76.- Diehl G.E., Yue H.H., Hsieh K., Kuang A.A., Ho M., Morici L.A., Lenz L.L., Cado D., Riley L.W., Winoto A. TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity* 2004 ;21:877-889.
- 77.- Yamada H., Kuroda E., Matsumoto S., Matsumoto T., Yamada T., Yamashita U. Prostaglandin E2 down-regulates viable Bacille Calmette-Guérin-induced macrophage cytotoxicity against murine bladder cancer cell MBT-2 in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 2002 ;128:52-58.
- 78.- Luo Y., Yamada H., Evanoff D.P., Chen X. Role of Th1-stimulating cytokines in bacillus Calmette-Guérin (BCG)-induced macrophage cytotoxicity against mouse bladder cancer MBT-2 cells. *Clin Exp Immunol* 2006 ;46:181-188.
- 79.- Ayari C., LaRue H., Hovington H., Decobert M., Harel F., Bergeron A., Tetu B., Lacombe, L., Fradet Y. Bladder tumor infiltrating mature dendritic cells and macrophages as predictors of response to bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *Eur Urol* 2009 ;55:1386-1395.
- 80.- Poppas D.P., Pavlovich C.P., Folkman J., Voest E.E., Chen X., Luster A.D., O'Donnell M.A. Intravesical bacille Calmette-Guérin induces the antiangiogenic chemokine interferon-inducible protein 10. *Urology* 1998 ;52:268-275.
- 81.- Reale M., Intorno R., Tenaglia R., Feliciani C., Barbacane R.C., Santoni A., Conti P. Production of MCP-1 and RANTES in bladder cancer patients after bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2002 ;51:91-98.
- 82.- Bisiaux A., Thiounn N., Timsit M.O., Eladaoui A., Chang H.H., Mapes J., Mogenet A., Bresson J.L., Prie D., Bechet S., Baron C., Sadorge C., Thomas S., Albert E.B.,

- Albert P.S., Albert M.L. Molecular analyte profiling of the early events and tissue conditioning following intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy in patients with superficial bladder cancer. *J Urol* 2009 ;181:1571-1580.
- 83.- Luo Y., Chen X., O'Donnell M.A. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG) induces human CC- and CXC-chemokines in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol* 2007 ;147:370-378.
- 84.- Heldwein K.A., Liang M.D., Andresen T.K., Thomas K.E., Marty A.M., Cuesta N., Vogel S.N., Fenton M.J. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against Mycobacterium bovis BCG. *J. Leukoc Biol* 2003 ;74:277-286.
- 85.- von Meyenn F., Schaefer M., Weighardt H., Bauer S., Kirschning C.J., Wagner H., Sparwasser T. Toll-like receptor 9 contributes to recognition of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin by Flt3-ligand generated dendritic cells. *Immunobiology* 2006 ;211:557-565.
- 86.- Fricke I., Mitchell D., Mittelstadt J., Lehan N., Heine H., Goldmann T., Bohle A., Brandau S. Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J Immunol* 2006 ;176:5173-5182.
- 87.- Kemp T.J., Ludwig A.T., Earel J.K., Moore J.M., Vanoosten R.L., Moses B., Leidal K., Nauseef W.M., Griffith T.S. Neutrophil stimulation with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L. *Blood* 2005 ;106:3474-3482.
- 88.- Ludwig A.T., Moore J.M., Luo Y., Chen X., Saltsgaver N.A., O'Donnell M.A., Griffith T.S. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: A novel mechanism for Bacillus Calmette-Guérin-induced antitumor activity. *Cancer Res* 2004 ; 64:3386-3390.
- 89.- Totterman T., Loskog A., Essand M. The immunotherapy of prostate and bladder cancer. *BJU int* 2005 ;96:728-735.
- 90.- Ratliff T.L., Ritchey J.K., Yuan J.J., Andriole G.L., Catalona W.J. T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer. *J Urol* 1993 ;150: 1018-23.
- 91.- Nadler R., Luo Y., Zhao W. et al. Interleukin 10 induced augmentation of delayed-type hypersensitivity (DTH) enhances Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG) mediated antitumour activity. *Clin Exp Immunol* 2003 ;131:206–16.
- 92.- Brandau S., Riemensberger J., Jacobsen M. et al. NK cells are essential for effective BCG immunotherapy. *Int J Cancer* 2001 ;92:697–702.

- 93.- Khong H.T., Restifo N.P. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 2002 ;3:999-1005.
- 94.- Seliger B., Cabrera T., Garrido F., Ferrone S. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin. Cancer Biol* 2002 ;12:3-13.
- 95.- Kitamura H., Torigoe T., Honma I., Asanuma H., Nakazawa E., Shimozawa K., Hirohashi Y., Sato E., Sato N., Tsukamoto T. Expression and antigenicity of survivin, an inhibitor of apoptosis family member, in bladder cancer: implications for specific immunotherapy. *Urology* 2006 ;67:955-959.
- 96.- Homma I., Kitamura H., Torigoe T., Tanaka T., Sato E., Hirohashi Y., Masumori N., Sato N., Tsukamoto T. Human leukocyte antigen class I down-regulation in muscle-invasive bladder cancer: its association with clinical characteristics and survival after cystectomy. *Cancer Sci* 2009 ;100:2331-2334.
- 97.- Li M., Wang H., Xi Z., Xu E., Jiang X., Chen J., Shi W. Reduction of major histocompatibility complex class I expression on bladder carcinoma following tumor antigen-pulsed dendritic cell vaccine: Implications for immunoresistance in therapy. *Int J Urol* 2010 ;17:666-672.
- 98.- Carretero R., Cabrera T., Gil H., Saenz-Lopez P., Maleno I., Aptsiauri N., Cozar J.M., Garrido F. BCG immunotherapy of bladder cancer induces selection of HLA class I-deficient tumor cells. *Int J Cancer* 2011 ;129:839-846.
- 99.- Kitamura H., Torigoe T., Asanuma H., Honma I., Sato N., Tsukamoto T. Down-regulation of HLA class I antigens in prostate cancer tissues and up-regulation by histone deacetylase inhibition. *J Urol* 2007 ;178:692-696.
- 100.- Du C., Wang Y. The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development. *J Exp Clin Canc Res* 2011 ;30:12.
- 101.- Winerdal M.E., Marits P., Winerdal M., Hasan M., Rosenblatt R., Tolf A., Selling K., Sherif A., Winqvist O. FOXP3 and survival in urinary bladder cancer. *BJU Int* 2011, doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.10020.x.
- 102.- Eruslanov E., Neuberger M., Daurkin I., Perrin G.Q., Algood C., Dahm P., Rosser C., Vieweg J., Gilbert S.M., Kusmartsev S. Circulating and tumor-infiltrating myeloid cell subsets in patients with bladder cancer. *Int J Canc Res* 2011, doi: 10.1002/ijc.26123.
- 103.- Shiray et al. Etiology of Bladder Cancer. *Semin Urol* 1993 ;3:1113.
- 104.- Olumi A.F., et al. Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 1990 ;50:7081.

- 105.- Esrig D., et al. Prognostic importance of p53 and Rb alterations in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1995 ;153:362.
- 106.- DiTullio R., et al 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nature Cell Biol* 2002; 4:998-1002.
- 107.- Kastan M.B. & Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004 ;432: 316-320.
- 108.- Hoeijmakers J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001 ;411:366-374.
- 109.- Kastan M., Bartek J. Cell-cycle Checkpoints and cancer. *Nature* 2004 ;432:316-323.
- 110.- Bartkova J., Horejsi Z., Koed K., et al DNA damage response as a candidate anti cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005; 434:864-70.
- 111.- Gorgoulis V.G., Vassiliou L.V., Karakaidos P., et al Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 2005 ;434:907-13.
- 112.- Hughes A.L., Yeager M., Ten Eishof A.E., Chormey M.J. A new taxonomy of mammalian MHC class I molecules. *Immunol Today* 1999 ;20:22-26.
- 113.- Shiina T., Kikkawa E., Iwasaki H., Kaneko M., et al. The β -1,3-galactosyltransferase-4 (B3GALT4) gene is located in the centromeric segment of the human MHC class II region. *Immunogenetics* 1999 ;1:75-78.
- 114.- Bahram S., Bresnahan M., Geraghty D.E, Spies T. 1994. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci* 1991 ;91:6259-6263.
- 115.- Petersdorf E.W., Shuler K.B., Longton G.M., Spies T., Hansen J.A. Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics* 1999 ;49:605-612.
- 116.- Zhang Y., Lazaro A.M., Lavingia B., Stastny P. Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Hum Immunol* 2001 ;62:620-31.
- 117.- Choy M.K., Phipps M.E. MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends Mol Med.* 2010 ;16:97-106.
- 118.- Stephens HA. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol* 2001 ;22:378-385.

- 119.- Glienke J., Sobanov Y., Brostjan C., et al. The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics* 1998 ;48:163-173.
- 120.- Lanier L.L. On guard-activating NK cell receptors. *Nat Immunol* 2001 ;2:23-27.
- 121.- Raulet D.H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nature Rev Immunol* 2003 ;3:781-790.
- 122.- Eagle R.A., Trowsdale J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol* 2007 ;7:737-744.