



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## **Análisis de la expresión de las moléculas relacionadas con el complejo principal de histocompatibilidad de clase I gen A (MICA) y de NKG2D como respuesta al estrés celular en el cáncer urotelial de vejiga**

Enrique Antonio Rijo Mora

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA  
FACULTAD DE MEDICINA

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS  
RELACIONADAS CON EL COMPLEJO PRINCIPAL DE  
HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE I GEN A (MICA) Y DE  
NKG2D COMO RESPUESTA AL ESTRÉS CELULAR EN EL  
CÁNCER UROTELIAL DE VEJIGA

Tesis presentada por **Enrique Antonio Rijo Mora** para optar al grado de Doctor en  
Medicina por la Universidad de Barcelona

Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona  
Programa de Doctorado en Medicina e Investigación Traslacional

Co-directores:

**Dr. Antonio Alcaraz Asensio**

Jefe de Servicio de Urología y Trasplante Renal. Hospital Clínic, Barcelona  
Catedrático de la Universidad de Barcelona

**Dr. Josep Lloreta Trull**

Jefe de Sección del Servicio de Anatomía Patológica. Hospital del Mar, Barcelona.  
Catedrático de la Universidad Pompeu Fabra, Barcelona

Barcelona, 2017





**Dr. Antonio Alcaraz Asensio** Catedrático de la Universidad de Barcelona y Jefe de Servicio de Urología y Trasplante Renal del Hospital Clínic de Barcelona.

**Dr. Josep Lloreta Trull** Catedrático de la Universidad Pompeu Fabra de Barcelona y Jefe de Sección del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital del Mar de Barcelona.

**CERTIFICAN:**

Que Enrique Antonio Rijo Mora, licenciado en Medicina y especialista en Urología ha realizado bajo mi dirección el Trabajo de Investigación correspondiente a la Tesis Doctoral con el título “Análisis de la expresión de las moléculas relacionadas con el complejo principal de histocompatibilidad de clase I gen A (MICA) y de NKG2D como respuesta al estrés celular en el cáncer urotelial de vejiga”.

Revisada la presente memoria, estimo que corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedo conforme con su presentación para ser juzgada por el tribunal que sea designado para su lectura.

Y para que conste y surtan los efectos oportunos en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo y firmo el presente certificado.

En Barcelona a 24 de Julio de 2017.



Dr. Antonio Alcaraz Asensio



Dr. Josep Lloreta Trull



## AGRADECIMIENTOS

En la realización de esta tesis doctoral han participado un gran número de personas, que directa o indirectamente, han contribuido a que pudiera llegar a buen fin. A todos ellos les estoy agradecido, sin embargo, quiero personalizar mi agradecimiento a las siguientes personas:

A Antonio Alcaraz, por dirigir este proyecto y por haber estado presente desde los inicios de mi formación en la Urología, siendo un ejemplo a seguir durante toda mi carrera como urólogo y cuya notable experiencia científica ha sido una fuente de motivación.

A Josep Lloreta, por dirigir esta tesis doctoral, ya que sin su apoyo constante no sólo desde el punto de vista académico sino también como amigo, ya que sin su ayuda e infinita paciencia no me hubiese sido posible culminar este proyecto. Ha demostrado ser un gran amigo y una bellísima persona.

A Antoni Sitges-Serra por ayudarme a concebir este proyecto a pesar de los obstáculos, siendo su rigor científico y actitud crítica una inspiración y pieza fundamental en el origen de este proyecto.

A Octavio Arango por haber participado en mi formación profesional y haber estado presente en mis primeros pasos como especialista introduciéndome en el mundo de la Urología.

A José Antonio Lorente y a Oscar Bielsa por haberme apoyado durante todo este largo recorrido y durante mi formación como especialista en Urología.

A mis compañeros del Servicio de Urología del Hospital del Mar, especialmente a Albert Francés y a Alfredo Rodríguez.

A Antonio Orozco por participar en las fases iniciales de este trabajo siendo referencia en el área de investigación de MICA.

A Núria Juanpere por todo su ayuda y colaboración científica desde el inicio hasta el final de este proyecto.

A Marta Lorenzo y a Lorena Díaz, también al resto del equipo de Investigación del IMIM y Servicio de Anatomía patológica por su gran colaboración.

A Silvia Pérez y Joan Vila por su gran apoyo para la culminación de este trabajo.

A toda mi familia, especialmente a mis padres a quienes les debo todo y a mis hermanas. Por supuesto a Alejandra que siempre está conmigo en todo momento y por su apoyo durante este proyecto y durante toda mi carrera profesional.

“From inability to let well alone, from too much zeal for the new and contempt for what is old, from putting knowledge before wisdom, science before art and cleverness before common sense, from treating patients as cases and from making the cure of the disease more grievous than the endurance of the same, good Lord deliver us”.

Sir Robert Hutchinson (1871-1960)

BMJ. 1998; 317(7174):1687



## ABREVIATURAS

IARC: International Agency for Research on Cancer

CCT: carcinoma de células transicionales

NAT2: N-acetiltransferasa 2

GST: glutation S-transferasas

INE: Instituto Nacional de Estadística

TMV: Tumor vesical

TMVNMI: Tumor vesical no músculo infiltrante

TMVMI: Tumor vesical músculo infiltrante

RTU: resección transuretral

BCG: Bacilo de Calmette-Guérin

MMC: Mitomicina C

TNM: tumor, nódulos, metástasis

CIS: carcinoma in situ

NUPBPM: Neoplasia urotelial papilar de bajo potencial maligno

OMS: Organización Mundial de la salud

ISUP: Sociedad internacional de patología urológica

EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer

EAU: Asociación Europea de Urología

AUA: Asociación Americana de Urología

AG: alto grado

BG: bajo grado

CUETO: Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico

5-ALA: 5-alfa-aminolevulínico

HAL: ácido hexil-amino-levulínico

PPD: Diagnóstico fotodinámico

EPOC: Enfermedad broncopulmonar obstructiva crónica

TNF: factor de necrosis tumoral

IL: interleucina

NK: natural killer

IFN: interferón

Th1: type 1 T helper



MICA: moléculas relacionadas con el complejo principal de histocompatibilidad de clase I gen A.

sMICA: MICA soluble

NKG2D: Natural-Killer Group 2, member D

ULBP1: UL16 binding protein 1

RAET: Retinoic acid early transcript

HDAC: histona deacetilasa

HDACIs: inhibidores de la histona deacetilasa

VPA: ácido valproico

TSA: Tricostatina A

CAR: receptores de coxsackie y adenovirus

pATM: ataxia telangiectasia mutada

TMA: Tissue microarray

SCF: stem cell factor

*A mi mujer Alejandra*

*A la memoria de mi Padre  
y a mi familia*



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Epidemiología del cáncer vesical</b>	<b>1</b>
1.1.1 Incidencia, prevalencia y mortalidad	1
1.1.2 Diferencias de género	8
1.1.3 Factores de riesgo	10
1.1.4 Edad	13
<b>1.2 Impacto económico del cáncer vesical</b>	<b>14</b>
<b>1.3. Anatomía Patológica</b>	<b>17</b>
1.3.1 Generalidades	17
1.3.2 Clasificación TNM	18
1.3.3 Clasificación histológica	19
<b>1.4 Estratificación en grupos de riesgo para recidiva/progresión en los TMVNMI</b>	<b>23</b>
<b>1.5 Diagnóstico del cáncer vesical</b>	<b>26</b>
1.5.1 Diagnóstico por imagen	27
1.5.2 Cistoscopia	28
1.5.3 Citología de orina	29
1.5.4 Test moleculares de orina	30
<b>1.6 Tratamiento del tumor vesical no músculo-infiltrante (TMVNMI)</b>	<b>32</b>
1.6.1 Indicaciones de re-RTU	35
1.6.2 Tratamiento adyuvante	36
1.6.3 Indicaciones del tratamiento con instilaciones con BCG	37
1.6.4 Eficacia del tratamiento con instilaciones con BCG	39
1.6.5 Valoración de la respuesta al tratamiento con instilaciones con BCG	40
1.6.6 Mecanismo de la inmunoterapia endovesical con BCG	41
1.6.7 Mecanismos de escape del sistema inmune	50
1.6.8 Fracaso del tratamiento del TMVNMI y necesidad de cirugía radical	52
<b>1.7 Seguimiento del TMVNMI</b>	<b>53</b>
<b>1.8 Oncogénesis</b>	<b>56</b>
<b>1.8.1 MICA</b>	<b>59</b>

1.8.1 Moléculas no clásicas relacionadas con el MHC de clase I	59
1.8.2 MIC (Major histocompatibility complex class I Chain related proteins)	60
1.8.3 MICA. Generalidades	60
1.8.4 Interés del estudio de MICA	64
<b>1.9 Receptor NKG2D (Natural- Killer Group 2, member D)</b>	<b>65</b>
<b>1.9.1 Ligandos del receptor NKG2D</b>	<b>67</b>
<b>1.9.2 Expresión de los ligandos de NKG2D</b>	<b>68</b>
<b>1.9.3 Estrategias terapéuticas conocidas</b>	<b>76</b>
<b>2. HIPÓTESIS</b>	<b>79</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>81</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>83</b>
4.1 Tipo de Estudio	83
4.2 Criterios de inclusión	83
4.3 Criterios de exclusión	83
4.4 Aprobación por el Comité ético	84
4.5 Cálculo del tamaño muestral	85
4.6 Construcción del Tissue microarray (TMA)	86
4.7 Anticuerpos y lectura de las reacciones inmunohistoquímicas	88
4.7.1 Controles inmunohistoquímicos de MICA	99
4.7.1.1 Control externo de MICA	99
4.7.1.2 Control interno de MICA	101
<b>4.8 Análisis estadístico</b>	<b>103</b>
4.8.1 Variables analizadas	103
4.8.2 Metodología estadística	104
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>107</b>
<b>5.1 Análisis descriptivo general</b>	<b>107</b>
Análisis descriptivo según:	
5.2 Sexo	111
5.3 Edad	116

5.4 Grupos de riesgo	119
5.5 Hábito tabáquico	130
5.6 Estadio tumoral	139
5.7.1 Grado tumoral (OMS 2004)	144
5.7.2 Grado tumoral (OMS 1973)	149
<b>5.8.1 MICA</b>	<b>152</b>
5.8.1.1 Modelo de regresión logística para MICA	156
<b>5.8.2 NKG2D</b>	<b>157</b>
5.8.2.1 Modelo de regresión logística para NKG2D	160
<b>5.9.1 Recidiva</b>	<b>162</b>
5.9.1.1 Número de recidivas y MICA/NKG2D	168
5.9.1.2 Análisis de regresión logística de Cox para recidiva	169
<b>5.9.2 Progresión</b>	<b>172</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>177</b>
<b>6.1 Expresión tisular de MICA:</b>	<b>179</b>
6.1.1 En el carcinoma vesical	179
6.1.2 En el tejido vesical sano	181
<b>6.2 Expresión tisular de NKG2D</b>	<b>185</b>
6.2.1 Expresión tisular de NKG2D en el carcinoma vesical	185
<b>6.3 Relación entre la expresión tisular de MICA y NKGD2 con las variables anatomopatológicas en el TMV:</b>	
6.3.1 MICA y el estadio	186
6.3.2 NKG2D y el estadio	188
6.3.3 MICA y el grado histológico	189
6.3.4 NKG2D y el grado histológico	190
<b>6.4 Relación entre el nivel de expresión tisular de MICA y NKGD2 con el grupo de riesgo en el TMVNMI:</b>	
6.4.1 MICA y el grupo de riesgo	193
6.4.2 NKG2D y el grupo de riesgo	195
<b>6.5 Relación entre el nivel de expresión tisular de MICA y NKG2D con las variables clínicas el TMV:</b>	
6.5.1 MICA y el hábito tabáquico	196
6.5.2 NKG2D y el hábito tabáquico	198

6.5.3 MICA y NKG2D con el sexo	201
6.5.4 MICA y NKG2D con la edad	202
6.5.5 MICA y NKG2D con la multiplicidad	203
6.5.6 MICA y NKG2D y tratamiento con BCG	205
6.5.7 MICA y NKG2D con la recidiva	208
6.5.7.1 MICA y la recidiva	208
6.5.7.2 NKG2D y la recidiva	217
6.5.8 MICA y NKG2D con la progresión	
6.5.8.1 MICA y la progresión	220
6.5.8.2 NKG2D y la progresión	224
<b>6.6. Expresión de ciertos componentes del infiltrado inflamatorio tumoral y su relación con MICA/NKG2D</b>	<b>226</b>
<b>6.6.1 Relación entre la expresión de NKG2D y otras moléculas en el TMV</b>	<b>227</b>
6.6.1a NKG2D y CD117 (c-Kit)	227
6.6.1b NKG2D y CD15 (Lewis x)	230
<b>6.6.2 Relación entre la recidiva tumoral y la expresión de otras moléculas del infiltrado inflamatorio tumoral</b>	<b>231</b>
6.6.2.1 Recidiva y expresión de CD68	231
6.6.2.2 Recidiva y expresión de CD4	234
<b>6.7 Limitaciones y fortalezas del estudio</b>	<b>236</b>
6.7.1 Limitaciones	236
6.7.2 Fortalezas	237
<b>6.8 Futuras líneas de investigación</b>	<b>238</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>239</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>243</b>







## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Epidemiología del cáncer vesical:

#### 1.1.1 Incidencia, prevalencia y mortalidad

Cada año son diagnosticados 430.000 pacientes de cáncer de vejiga en el mundo, siendo el noveno cáncer más frecuente a nivel mundial (el cuarto más frecuente en hombres y el undécimo en mujeres) causando 165.000 muertes por esta enfermedad en el año 2012 según cifras del proyecto GLOBOCAN de la agencia internacional para la investigación del cáncer (*Tabla 1*) (1,2).

**Tabla 1.** Neoplasias más frecuentes en el mundo para el año 2012 (3).

Ranking	Cáncer	Número de nuevos casos en el año 2012 (1,000s)	% de todos los cánceres excl. no melanoma de piel
1	Pulmón	1,825	13.0
2	Mama	1,677	11.9
3	Colon y recto	1,361	9.7
4	Próstata	1,112	7.9
5	Estómago	952	6.8
6	Hígado	782	5.6
7	Cuello del útero (cérvix)	528	3.7
8	Esófago	456	3.2
9	Vejiga	430	3.1
10	Linfoma no Hodgkin	386	2.7
11	Leucemia	352	2.5
12=	Páncreas	338	2.4
12=	Riñón	338	2.4
14	Cuerpo del útero (endometrio)	320	2.3
15	Labio y cavidad oral	300	2.1
16	Tiroides	298	2.1
17	Cerebro, sistema nervioso	256	1.8
18	Ovario	239	1.7
19	Melanoma	232	1.6
20	Vesícula biliar	178	1.3
21	Larínge	157	1.1
22	Otros faríngeos	142	1.0
23	Mieloma múltiple	114	0.8
24	Nasofaringe	87	0.6
25	Linfoma de Hodgkin	66	0.5
26	Testículo	55	0.4
27	Sarcoma Kaposi	44	0.3

El cáncer vesical es la neoplasia maligna más frecuente del aparato urinario.

En el año 2012 se diagnosticaron unos 151.200 casos nuevos de cáncer de vejiga en Europa, de los que 118.300 se produjeron en varones y 32.900 en mujeres, lo

cual representa el 6,5 % del total de las neoplasias en los varones y el 2 % en las mujeres (*Tabla 2*) (3).

**Tabla 2.** Incidencia y mortalidad estimada del cáncer de vejiga por sexo y tipo de cáncer en Europa para el año 2012 (3)

	Incidencia						Mortalidad					
	Ambos sexos		Hombre		Mujer		Ambos sexos		Hombre		Mujer	
	Casos	ASR (E)	Casos	ASR (E)	Casos	ASR (E)	Muertes	ASR (E)	Muertes	ASR (E)	Muertes	ASR (E)
Cavidad oral y faringe	996	110	739	182	258	49	437	47	342	84	94	16
Esófago	459	47	351	84	108	18	395	39	303	71	92	14
Estómago	1.396	137	842	195	554	93	1.073	103	636	146	437	70
Colon y recto	4.468	435	2.416	557	2.052	347	2.147	195	1.132	252	1.015	154
Hígado	634	62	428	100	206	33	621	59	399	91	222	34
Vesícula biliar	297	27	119	27	179	28	209	19	79	18	130	20
Páncreas	1.038	101	519	121	518	83	1.045	99	526	122	519	81
Laringe	399	44	36	88	39	8	198	21	181	43	17	3
Pulmón	4.099	419	2.907	683	1.192	216	3.535	352	2.544	591	990	172
Melanoma de piel	1.003	111	472	114	531	110	222	23	121	28	101	18
Mama					4.638	942					1.312	231
Cérvix uterino					583	134					244	49
Útero					989	193					237	39
Ovario					655	131					427	76
Próstata			4.167	960					922	193		
Testículo			215	58					16	4		
Riñón	1.152	121	717	172	434	81	490	47	313	72	177	28
<b>Vejiga</b>	<b>1.512</b>	<b>144</b>	<b>1.183</b>	<b>269</b>	<b>329</b>	<b>53</b>	<b>524</b>	<b>45</b>	<b>395</b>	<b>85</b>	<b>129</b>	<b>18</b>
Cerebro, sistema nervioso	571	66	307	78	264	56	450	49	246	60	204	40
Tiroides	529	63	123	31	407	93	63	6	21	5	43	7
Linfoma de Hodgkin	176	23	93	25	83	21	46	5	26	6	20	4
Linfoma no Hodgkin	934	98	495	119	439	80	379	35	203	46	175	27
Mieloma múltiple	389	38	205	47	184	31	243	22	122	27	121	18
Leucemia	823	88	464	113	359	69	538	51	295	67	243	39
Todos los tumores(excl. tumores cutáneos no melanoma)	34.396	3.557	18.291	4.299	16.105	3.063	17.546	1.680	9.759	2.226	7.786	1.288

ASR (age-standardized rate=tasa relativa ajustada por edad) y proporciones por 100.000.

Europa tiene una de las tasas más altas de incidencia de cáncer de vejiga, sobre todo en la zona sur, particularmente España e Italia (*Tabla 3*) (4).

**Tabla 3.** Incidencia y mortalidad estimada del cáncer de vejiga por sexo y regiones del mundo para el año 2012 (1,4).

Región	Incidencia					Mortalidad				
	Hombre		Mujer		H:M	Hombre		Mujer		H:M
	(n)	(ASR)	(n)	(ASR)	(ASR)	(n)	(ASR)	(n)	(ASR)	(ASR)
Mundial	330380	90	99413	22	41	123051	32	42033	9	36
Por nivel de desarrollo										
Regiones mas desarrolladas	196077	169	57766	37	46	58914	45	21024	11	41
Regiones menos desarrolladas	134303	53	41647	15	35	64137	26	21009	7	37
Por nivel de desarrollo humano										
Muy alto desarrollo humano	183065	167	54713	39	43	51927	41	19760	11	37
Alto desarrollo humano	56697	108	15596	22	49	24239	45	6588	8	56
Medio desarrollo humano	79357	47	23748	12	39	39769	23	12226	6	38
Bajo desarrollo humano	11096	31	5311	14	22	7065	21	3443	9	23
África	17685	63	6752	21	30	9362	35	3906	12	29
África oriental	2824	33	1961	20	17	1819	22	1290	13	17
África subsahariana	6460	30	4044	16	19	3873	19	2569	11	17
África media	610	22	441	13	17	420	16	300	9	18
África norte	11225	151	2708	32	47	5489	76	1337	16	48
África del sur	1285	75	483	19	39	494	30	225	9	33
África occidental	1741	21	1159	13	16	1140	15	754	9	17
Centro América, Sur América y el Caribe	17610	61	7234	20	31	7078	24	3069	8	30
Centro América	1839	76	542	18	42	773	30	284	9	33
Sur América	2327	34	1430	18	19	867	12	535	6	20
Norte América	13444	69	5262	21	33	5438	27	2250	9	30
Asia	58089	195	18660	51	38	13285	40	5307	12	33
Asia	115646	55	32922	14	39	52816	25	16478	6	42
Asia	64662	58	20789	16	36	27271	23	10220	7	33
Asia sur-este	10784	43	3034	10	43	5352	22	1517	5	44
Asia sur-central	24415	36	6159	8	45	13413	20	3441	5	40
Asia occidental	15785	190	2940	31	61	6780	84	1300	13	65
Europa	118365	177	32932	35	51	39522	52	12889	11	47
Europa	30871	151	8904	27	56	13231	61	3543	9	68
Europa	12722	124	4645	36	34	5174	44	2391	15	29
Europa	34786	218	8049	38	57	11653	60	3001	10	60
Europa Occidental	39986	197	11334	43	46	9464	40	3954	11	36
Oceania	2985	106	913	27	39	988	32	384	10	32
Australia/Nueva Zelanda	2868	113	887	29	39	939	33	366	10	33
Melanesia	84	35	21	7	50	43	20	13	4	50
Micronesia/Polinesia	33	65	5	9	72	6	12	5	9	13

ASR=age-standardised rate=tasa relativa ajustada por edad

En España en el año 2012 se diagnosticaron 13.789 casos, siendo el quinto tipo de tumor más frecuentemente diagnosticado en la población general (1,5).

En un contexto europeo, la incidencia de cáncer de vejiga en España fue en hombres la tercera más elevada sólo por detrás de Bélgica y Malta (5).

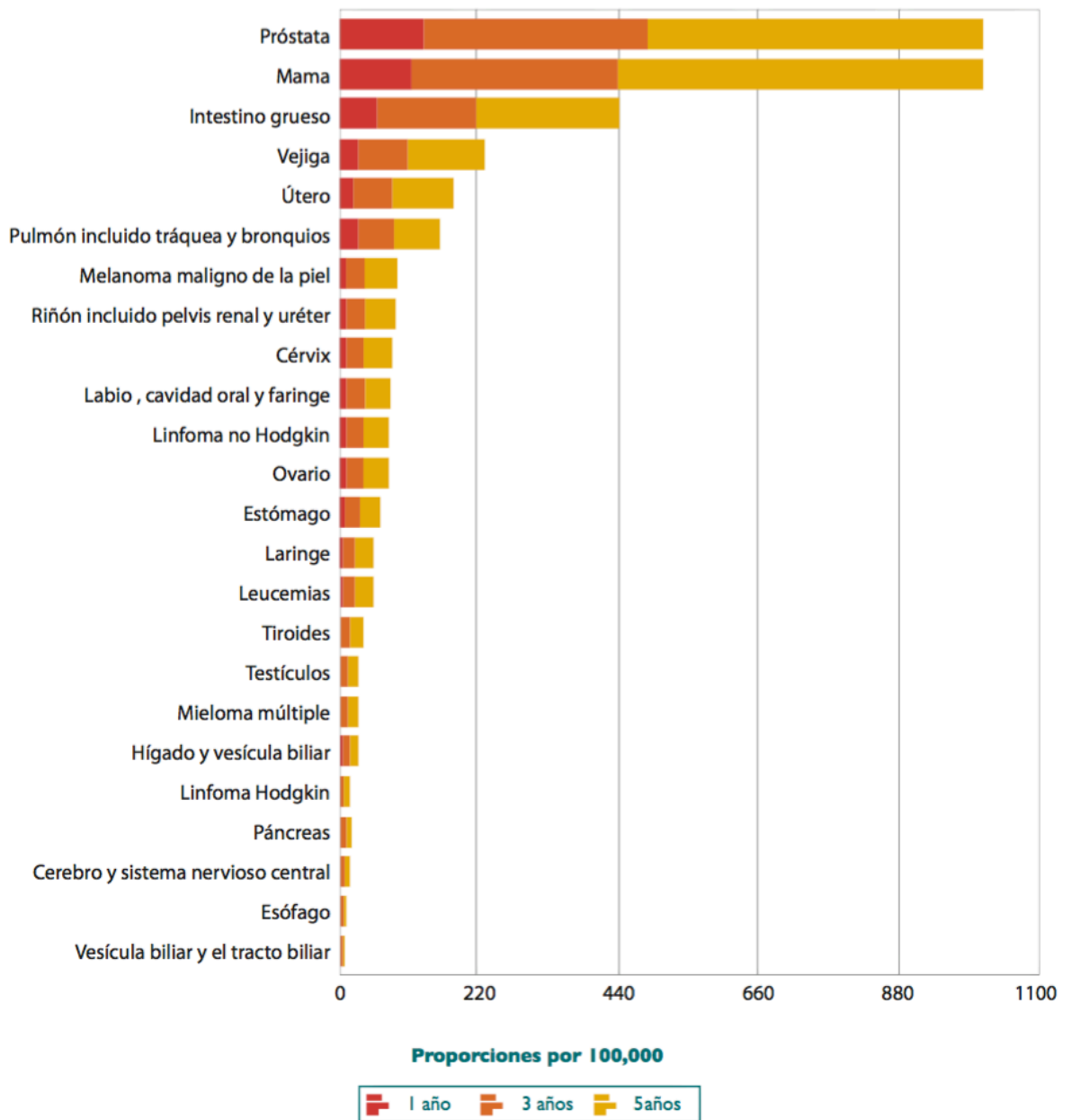
España ocupa un lugar muy elevado en el ranking europeo de mortalidad por tumores de vejiga, aunque como en el resto de los países vecinos, las tasas de mortalidad han descendido en los últimos años (6).

La tendencia observada responde en parte a la caída de la prevalencia del consumo de tabaco en los hombres españoles, así como a una disminución de la exposición laboral a ciertos carcinógenos (7).

El cáncer de vejiga es un grave problema salud pública en España determinado por su alta incidencia y sobre todo por la elevada prevalencia de casos.

La prevalencia de cáncer a 5 años en España en el año 2012 era de 581.688 casos, con una tasa de 1.467,6 casos por 100.000 habitantes. La prevalencia a 3 años era de 389.498 casos y a 1 año de 151.257 casos (8) (Figura 1).

**Figura 1.** Estimación de la prevalencia de tumores en España para el año 2012 (población general) (5).




Fuente: Las estimaciones fueron proporcionadas por IARC.

La supervivencia por este tumor en España a los 5 años del diagnóstico es de 73.7%, cifra algo superior a las del conjunto de Europa (7).

La variabilidad geográfica del cáncer de vejiga se parece a la del cáncer de pulmón reflejando el papel del consumo de tabaco, que constituye el agente etiológico más importante. En España, el mayor número de casos se detecta en los registros de Girona, Murcia, Navarra y Tarragona. La mortalidad es, sin embargo, más alta en Andalucía, Comunidad Valenciana y La Rioja. (7)

En Cataluña el cáncer de vejiga ocupa el cuarto lugar en incidencia en los hombres y el octavo en las mujeres (*Figura 2*).

**Figura 2.** Casos incidentes anuales de cáncer para los 10 tumores más frecuentes. Cataluña, 2003-2007.

	Casos, n	(%)			Casos, n	(%)
Próstata	4258	(21,3)		Mama	3907	(28,6)
Pulmón	3021	(15,1)		Colon y Recto	2088	(15,3)
Colon y Recto	3007	(15,0)		Cuerpo uterino	734	(5,4)
Vejiga urinaria	2238	(11,2)		Pulmón	527	(3,9)
Cavidad Oral y Faringe	788	(3,9)		Linfoma no hodgkiniano	503	(3,7)
Estómago	669	(3,3)		Ovario y anexos	465	(3,4)
Linfoma no hodgkiniano	605	(3,0)		Estómago	427	(3,1)
Hígado	560	(2,8)		Vejiga urinaria	420	(3,1)
Leucemias	499	(2,5)		Leucemias	413	(3,0)
Laringe	493	(2,5)		Páncreas	379	(2,8)

Fuente: Registro de Cáncer de Girona, Registro de Cáncer de Tarragona.

En el entorno europeo, Cataluña tiene unas tasas de incidencia globales intermedias-altas en hombres y bajas en mujeres, con la excepción muy relevante del cáncer de vejiga, en el cual tenemos una de las incidencias más elevadas de Europa (9).

Teniendo en cuenta las previsiones demográficas realizadas por el Instituto de Estadística de Cataluña, las proyecciones de la incidencia hasta el año 2020, efectuadas a partir de los datos de incidencia de los registros de cáncer de Girona y Tarragona, permiten estimar el número de casos previsibles (9).

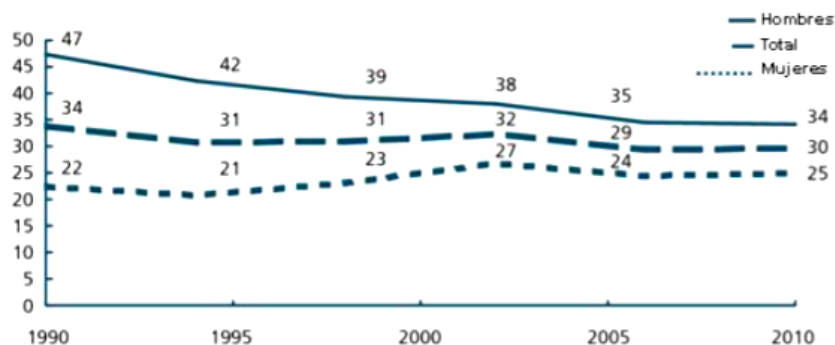
Los datos indican que el número de casos de cáncer en Cataluña pasará de 21,592 hombres diagnosticados en el año 2010 a 26,455 casos en 2020, mientras que, en las mujeres, el número de casos incidentes pasará de 14,741 en el año 2010 a 18,345 en 2020. En conjunto, esto supone un incremento del 22,5% y 24,5%, respectivamente.

A partir de modelos estadísticos se ha determinado la causa de estos cambios en la incidencia, este crecimiento del 22,5% del número de casos incidentes en los hombres se puede atribuir en un 12% al envejecimiento; en un 8%, al crecimiento poblacional, y en un 2%, a los factores de riesgo (10). En los hombres, esta distribución varía mucho según cada tumor y destaca el descenso del riesgo en los tumores asociados al tabaco, atribuible al cambio de tendencia observado en este sexo respecto a dicho hábito (10).

En las mujeres, el peso de cada componente es diferente, un 9% es atribuible al envejecimiento; un 8%, al crecimiento demográfico, y un 8%, a los factores de riesgo. Este porcentaje superior en las mujeres es atribuible al aumento de los tumores relacionados con el tabaco, imputable al incremento de este hábito en dicho género, aunque actualmente se está estabilizando (10).

En el período 1999-2010, la proporción de fumadores en Cataluña ha disminuido.

**Figura 3.** Evolución de la prevalencia del tabaquismo en población de 15 años y más, por sexo; porcentaje.



Fuente: Departamento de Salud. Programa para la prevención y el control del tabaquismo. Encuesta de consumo de tabaco, alcohol y drogas. Encuestas de salud de Cataluña 1994, 2002, 2006 y 2010.

Esta disminución se debe principalmente al abandono del hábito tabáquico entre los hombres. El tabaquismo en los hombres es más frecuente en las clases más desfavorecidas, mientras que en las mujeres el patrón está poco definido. En los últimos años se observa un cierto estancamiento en el descenso del consumo del tabaco iniciado en el año 2002 (9).

Se espera una disminución en el número de tumores relacionados con el tabaco en la población más joven (laringe, cavidad oral/faringe, vejiga y pulmón) mientras que en los ancianos se espera un aumento en los tumores de pulmón y vejiga atribuible al crecimiento de la población (10).

En los varones, el aumento esperado de casos de cáncer debido a cambios en el riesgo, el envejecimiento y al aumento del tamaño poblacional son respectivamente del 2, 12 y 8% y, en las mujeres, del 8, 9 y 8%. Se espera que en las mujeres aumenten los tumores relacionados con el tabaco y en los hombres un aumento en el cáncer colorrectal y hepático. Para el período 2010-2020 se estima una disminución de la mortalidad en ambos sexos (10).

En Estados Unidos se han estimado para el año 2016 unos 76.960 casos nuevos. El cáncer de vejiga es 3 veces más común en el sexo masculino, siendo el quinto cáncer más común después del cáncer colorrectal, de próstata, pulmón y mama (11).

Como fue mencionado anteriormente, el cáncer de vejiga es más frecuente en los países desarrollados con una proporción casi 3:1 en comparación con los países menos desarrollados (*Tabla 4*).

También se ha detectado una alta incidencia de cáncer de vejiga, sobre todo del carcinoma de células escamosas en zonas de África y Oriente Medio, en relación con la mayor frecuencia de infección crónica por *Schistosoma haematobium*.



**Tabla 4.** Tasa relativa ajustada por edad y proporciones por 100.000 (en ambos sexos a nivel mundial).

Tasa relativa ajustada por edad y proporciones por 100.000 (en ambos sexos a nivel mundial)			
Cáncer	Mundial	Mas desarrollados	Menos desarrollados
Pulmón	23.1	30.8	20.0
Colon y recto	17.2	29.2	11.7
Estómago	12.1	10.6	12.7
Hígado	10.1	5.4	12.0
Esófago	5.9	3.6	7.0
<b>Vejiga</b>	<b>5.3</b>	<b>9.5</b>	<b>3.3</b>
Linfoma no Hodgkin	5.0	8.6	3.6
Leucemia	4.7	7.2	3.8
Riñón	4.4	9.2	2.6
Páncreas	4.2	7.2	2.8
Labio y cavidad oral	4.0	4.7	3.7
Cerebro, sistema nervioso	3.4	5.1	3.0
Tiroides	4.0	7.4	3.0
Melanoma	3.0	9.6	0.8
Laringe	2.1	2.7	1.9
Otros faringeos	1.9	2.7	1.7
Vesícula biliar	2.2	2.1	2.2
Mieloma múltiple	1.5	2.7	0.9
Nasofaringe	1.2	0.4	1.4
Linfoma de Hodgkin	0.9	2.1	0.6
Sarcoma de Kaposi	0.6	0.2	0.7
Todos los tumores (excl. tumores cutáneos no melanoma)	182.3	268.3	147.7

El 90-93% de los casos de cáncer de vejiga en nuestro medio son carcinomas de células transicionales. El resto son carcinomas escamosos y adenocarcinomas.

La mayoría de los casos se diagnostican entre los 65 y los 75 años, con un máximo a los 70, aunque se registran casos desde los 40-45 años.

### 1.1.2 Diferencias de género

Existe un fuerte predominio en el sexo masculino, tres cuartas partes de todos los casos de cáncer de vejiga se presentan en hombres (1). La razón entre hombres y mujeres en Europa occidental varía entre 2:1 y 7:1 (12). 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 (13–15). A pesar de que son bien conocidas las diferencias

epidemiológicas en la incidencia del carcinoma de células transicionales (CCT), existen pocos y contradictorios datos sobre las diferencias en el grado y estadio entre hombres y mujeres (16–19). Los estudios Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening y National Lung (PLCO) Cancer Screening Trial en una de sus ramas evaluaron la relación del tabaquismo con el riesgo de cáncer de vejiga. Curiosamente, a pesar de que en ambos sexos la exposición al tabaco fue similar, los hombres fueron diagnosticados con cáncer de vejiga aproximadamente cuatro veces más que las mujeres en ambos estudios (20). Previamente un metaanálisis concluyó que la prevalencia del tabaquismo sólo podría explicar en parte la diferencia en la incidencia de cáncer de vejiga entre hombres y mujeres (21).

Hay evidencia de que el género femenino está asociado con un mayor riesgo de recidiva del estadio T1 del cáncer de vejiga (22).

En un estudio reciente llevado a cabo con datos del Registro Nacional Sueco de cáncer de vejiga urinaria entre 1997 a 2011 con todos los pacientes diagnosticados de cáncer vesical, de un total de 30,310 pacientes (74.9% hombres, 25.1% mujeres) el sexo femenino fue asociado con una supervivencia cáncer específica inferior. Aunque las mujeres tenían una tasa más alta de tumores agresivos, una proporción menor de mujeres que de hombres recibieron un tratamiento óptimo. La supervivencia cáncer específica fue del 77% a los 5 años para los hombres y del 72% para las mujeres ( $p < 0.001$ ). Este estudio demostró que las mujeres con tumores vesicales primarios T1G3 o CIS recibieron menor cantidad de tratamientos con instilaciones endovesicales que los hombres con la misma enfermedad. Desafortunadamente, esta observación confirma que los hombres suelen recibir terapia intravesical más intensa en comparación con las mujeres y que los

pacientes más jóvenes con tumor vesical músculo infiltrante en los cuales se ha indicado un tratamiento con intención curativa (cistectomía o radioterapia) suelen ser más hombres que mujeres (23).

La relación entre el género y el cáncer de vejiga es compleja, y está probablemente influenciada por factores biológicos y epidemiológicos.

### 1.1.3 Factores de riesgo:

Los dos factores de riesgo más importantes para este cáncer son el tabaco (24) y la exposición ocupacional (25–27). Un 50% de los casos de cáncer de vejiga se pueden atribuir al consumo de tabaco y hasta un 10% a exposiciones ocupacionales (28).

La exposición ocupacional crónica a carcinógenos produce una elevada concentración de sustancias en la orina que pueden conducir, con los años, al desarrollo de CCT. Más del 90% de los mismos aparecen en la vejiga. Sin embargo, sólo una minoría de los casos de cáncer de vejiga se cree que es atribuible a tales carcinógenos distintos al tabaco (29,30).

Podemos dividir los factores de riesgo en 2 grupos: los relacionados con la susceptibilidad genética y la exposición a diversos agentes carcinógenos externos.

#### 1.1.3a Predisposición genética:

El riesgo de presentar cáncer de vejiga es 2 veces mayor en los familiares de primer grado de los pacientes con cáncer vesical (28). La predisposición genética influye en la susceptibilidad a otros factores de riesgo.

La N-acetiltransferasa 2 (NAT2) es una enzima clave en el metabolismo de las aminas aromáticas carcinogénicas vesicales. Varios haplotipos del gen NAT2 pueden reducir la capacidad de acetilación cuando están presentes en ambos

cromosomas (acetiladores lentos). Existe un subgrupo de acetiladores lentos con genotipo NAT2\*6A/\*6A que se denomina acetiladores ultra-lentos, estos pacientes presentan un mayor riesgo de recidiva, sobre todo si son fumadores (31). Por lo tanto, este factor no aumenta directamente el riesgo de cáncer vesical, sino que confiere un riesgo adicional a la exposición de agentes carcinógenos como el tabaco. Las glutatión S-transferasas (GST) pertenecen a una familia de enzimas de gran importancia en mecanismos de desintoxicación celular, eliminando xenobióticos o sustancias nocivas para las células. Entre los sustratos de estas enzimas se incluyen los productos del estrés oxidativo y los derivados de la activación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. El genotipo GST mu 1 (GSTM1) nulo en el que no hay expresión de proteína, debido a una condición homocigota en la que ambos alelos están deleccionados, se ha asociado con la susceptibilidad genética de las neoplasias relacionadas con el tabaco incluyendo el cáncer de vejiga.

#### 1.1.3b Factores de riesgo externos:

##### Tabaco:

El tabaco representa el principal factor de riesgo para el cáncer vesical y como se mencionó previamente la mitad de los casos se pueden atribuir a su consumo. Las personas que han fumado tienen 2.5 veces más riesgo que los no fumadores (32). Las aminas aromáticas como la beta-naftilamina e hidrocarburos aromáticos policíclicos que se forman durante la combustión incompleta del tabaco son los responsables del potencial carcinógeno del tabaco a nivel de todo el sistema excretor urinario incluida la vejiga. Según estimaciones, actualmente un 25% de la población de Europa y de Estados Unidos son fumadores.

Las diferencias de prevalencia del hábito tabáquico en cuanto al género han variado en las últimas décadas, las mujeres históricamente fumaban menos, sin embargo, a partir de los años 70 y 80 han ido en aumento. Actualmente la prevalencia del hábito tabáquico es similar en ambos géneros, aunque la incidencia de cáncer vesical está disminuyendo en los hombres y aumentando en las mujeres. Este patrón refleja un largo período de latencia para el cáncer vesical igual o mayor a 30 años (28).

En los fumadores pasivos también aumenta el riesgo de cáncer vesical, sobre todo en las mujeres (33).

Factor ocupacional:

El factor ocupacional después del tabaco representa el segundo factor de riesgo para el cáncer vesical, sin embargo sólo representa hasta el 10% de los casos.

Entre las ocupaciones asociadas a un mayor riesgo de cáncer de vejiga se encuentran las relacionadas con la fabricación de aminas aromáticas, de gomas, tintes, pinturas, aluminio o cuero y los conductores de vehículos pesados (25–27), también tienen elevado riesgo los trabajadores de empresas de metal, mecánicos, servicios de limpieza, fontaneros, operadores en industria del plástico y textil (34).

Otros factores de riesgo:

La endometriosis en raras ocasiones afecta al tracto urinario, siendo la vejiga el órgano más frecuentemente afectado. La endometriosis con afectación vesical es muy poco frecuente y su transformación a un tumor vesical es más bien anecdótica, describiéndose solo 8 casos en la literatura (35).

La infección crónica por el “Squistosoma haematobium” (propia del norte de África) es una enfermedad parasitaria que se relacionó por primera vez con el cáncer de vejiga en el año 1911 (36). Los huevos de bilharzia depositados en la vejiga provocan una intensa reacción inflamatoria, asociada con la producción de radicales de oxígeno libre, los cuales pueden inducir mutaciones o promover la producción de compuestos carcinogénicos (como las N-nitrosaminas e hidrocarburos aromáticos policíclicos) jugando un papel importante en la transformación maligna (37). La esquistosomiasis habitualmente asocia una infección bacteriana, la cual por si misma también predispone a una neoplasia de células escamosas. No solo la esquistosomiasis, sino en general las infecciones crónicas del tracto urinario pueden producir cáncer vesical. También el uso de algunos medicamentos como la fenacetina (38) o la ciclofosfamida (39) podrían estar implicados en el origen de un cáncer vesical. Recientemente se ha asociado el uso de pioglitazona, un antidiabético oral, con un elevado riesgo de cáncer vesical (40).

#### 1.1.4 Edad

La incidencia del cáncer vesical se incrementa con la edad, la población de edad avanzada tiene una probabilidad tres 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 .

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) (41) , la proporción de población de 65 y más años ha pasado de representar un 11,2%

en 1981 a un 17,3% en 2011, lo que supone que entre 1981 y 2011 casi se ha duplicado la población anciana. En el año 2050 habrá algo más de 15 millones de mayores, casi el doble que en la actualidad y representarán más de un tercio del total de la población española (36,4%) (41) (*Tabla 5*).

**Tabla 5.** Población de 65 años y más y 80 años y más en algunos países del mundo, 2010 y 2050 (42).

Países	Población de 65 y más años				Países	Población de 80 y más años			
	2010		2050			2010		2050	
	Número (miles)	Porcentaje	Número (miles)	Porcentaje		Número (miles)	Porcentaje	Número (miles)	Porcentaje
Japón	29.243	23,0	39.594	36,5	Japón	8.086	6,3	16.903	15,6
Alemania	17.275	20,8	23.743	32,7	Italia	3.571	5,9	8.280	13,8
Italia	12.279	20,3	19.827	33,0	Francia	3.411	5,4	7.801	10,7
<b>España</b>	<b>7.899</b>	<b>17,1</b>	<b>16.651</b>	<b>34,4</b>	Alemania	4.248	5,1	10.429	14,4
Francia	10.625	16,8	18.636	25,5	<b>España</b>	<b>2.331</b>	<b>5,0</b>	<b>6.196</b>	<b>12,8</b>
Reino Unido	10.296	16,6	18.063	24,7	Reino Unido	2.890	4,7	6.930	9,5
Ucrania	7.268	15,8	7.523	22,4	EE. UU.	11.341	3,6	31.739	7,9
EE. UU.	40.794	13,1	85.979	21,4	Ucrania	1.616	3,5	1.690	5,0
Federación Rusa	18.815	13,1	24.776	20,5	Federación Rusa	4.211	2,9	5.631	4,7
China	113.545	8,4	331.314	23,9	Vietnam	1.598	1,8	7.004	6,8
Brasil	13.485	6,9	52.008	22,5	China	19.980	1,5	90.425	6,5
Vietnam	5.823	6,5	23.911	23,1	Brasil	2.878	1,5	15.823	6,8
México	7.053	6,0	31.542	20,2	México	1.472	1,2	9.260	5,9
Egipto	4.288	5,5	14.969	12,3	Indonesia	1.918	0,8	9.559	3,0
India	61.100	5,1	205.752	12,7	Bangladesh	1.140	0,8	7.410	3,7
Indonesia	12.057	5,0	50.725	15,8	Egipto	651	0,8	2.838	2,3
Bangladesh	6.966	4,6	32.729	16,2	India	8.490	0,7	37.173	2,3
Paquistán	7.484	4,3	25.969	9,6	Paquistán	1.036	0,6	3.747	1,4
Nigeria	4.358	3,8	16.627	3,8	Nigeria	332	0,2	1.437	0,3

Fuente: United Nations: World Population Prospects: The 2012 Revision: <http://esa.un.org/unpp>.

### 1.2 Impacto económico del cáncer vesical:

Debido a las altas tasas de recidiva, necesidad de seguimiento intensivo y tratamientos costosos, sumado a una alta tasa de supervivencia del tumor vesical no músculo-infiltrante (TMVNMI), el manejo del cáncer vesical supone un importante impacto económico en los sistemas sanitarios.

El cáncer de vejiga representa el noveno cáncer más costoso en los Estados Unidos con un coste estimado de \$3.98 billones en el año 2010 (43), lo que representa cerca del 7% del gasto de todos los tipos de cáncer.

El costo desde el diagnóstico hasta la muerte se ha estimado entre \$89,000 a \$202,000 por paciente (44), es el más alto entre todos los tipos de cáncer debido a su alta tasa de recidiva, baja tasa de mortalidad y costes asociados con la seguimiento y tratamiento de la enfermedad (44,45). Hasta el 60% de estos costes se asocian con los controles y el tratamiento de las recidivas (46).

Las cistoscopias para el seguimiento, aunque sean realizadas bajo anestesia local, representan el 13 % del coste total.

Los costes presentan una amplia variabilidad de acuerdo al sistema de salud de cada país (*Tabla 6*).

**Tabla 6.** Coste en euros del cuidado del cáncer de vejiga (47).

	Estados Unidos	Reino Unido	Suecia	Alemania	Italia
Cistoscopia en el despacho	163	520	165		
RTU Tm vesical	4348	2362	2200	2500	2242
Dosis única de MMC 40 mg.	219	87	-	-	-
BCG 6 semanas	528	630	-	-	975
Cistectomía	23451	8090	20570	15419	7222

BCG: Bacilo de Calmette-Guérin, MMC: Mitomicina C, RTU: resección transuretral

Un estudio realizado en los Estados Unidos demostró las consecuencias económicas de no realizar la prevención de las recidivas en el tratamiento del TMVNMI (48). A pesar de que el tratamiento con quimioterapia endovesical con MMC perioperatoria tras la RTU de TMV ha demostrado una disminución relativa de aproximadamente el 35 % en la tasa de recidiva tumoral con un nivel de evidencia 1 (49,50), su práctica sigue infrautilizada. Mediante estimaciones poblacionales de la incidencia de TMVNMI, se desarrolló un modelo de 2 años para



estimar el número de recidivas evitables en pacientes no tratados con quimioterapia intravesical perioperatoria. El modelo estimó que 7,827 recidivas de TMVNMI podrían ser evitadas si todos los pacientes recibieran quimioterapia intravesical inmediata, lo que representa un ahorro económico de \$ 3,847 por recidiva evitable, resultando en un ahorro total de \$ 30,1 millones (48).

Aunque los costes de atención médica asociados con la administración de BCG no se han evaluado rigurosamente, los estudios han sugerido que la inducción y el mantenimiento con la terapia con BCG puede lograr ahorros de costes al disminuir los riesgos de recidiva y sus tratamientos. Un estudio de coste-efectividad evaluó los costes totales de la instilación de BCG y las complicaciones relacionadas con el tratamiento en comparación con los atribuibles a recidivas, encontrando que los costes disminuirían en \$ 3,900 por intervalo sin recidiva de 5 años desde la administración de la terapia intravesical con BCG (51,52).

Los gastos asociados a la cistectomía radical incluyen los costes de la preparación preoperatoria y después del procedimiento. El coste de la cistectomía radical incluyendo linfadenectomía y la derivación urinaria en un centro médico académico es mayor a \$ 30,000 (51). La introducción de la cirugía robótica como alternativa a la cirugía abierta en centros con experiencia podría reducir los costes de estancia hospitalaria y complicaciones, sin embargo esta afirmación aún no se ha demostrado.

También debemos contar con el coste elevado de las complicaciones del tratamiento del cáncer vesical. El tratamiento de las complicaciones representa hasta el 30% del coste total (\$19,811): hasta un 26% (\$16,934) para el TMVMI y hasta un 4% (\$2,312) para las complicaciones del TMVNMI (46).

### *1.3 Anatomía Patológica:*

#### 1.3.1 Generalidades

En el momento del diagnóstico, el 70-85 % de los casos se diagnostica como TMVNMI limitado a la mucosa (estadio Ta, CIS) y submucosa (estadio T1) y el 30%, como enfermedad con invasión muscular o TMVMI. En pacientes tratados con una cistectomía radical por TMVMI, el 57 % tenía invasión muscular en el momento de presentación, en tanto que el 43 % había sido diagnosticado inicialmente de TMVNMI que progresó a pesar del tratamiento (53). Aproximadamente un tercio de los pacientes diagnosticados de TMVMI presenta metástasis no detectadas en el momento del tratamiento del tumor primario (53), mientras que el 25 % de los que se someten a una cistectomía radical tiene afectación ganglionar en el momento de la intervención quirúrgica.

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

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 unas 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. 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.

### 1.3.2 Clasificación TNM

Desde el punto de vista de clasificación anatomopatológica, está ampliamente aceptada la clasificación TNM (tumor, nodes o ganglios, metástasis) del año 2002 de la Unión Internacional Contra el Cáncer 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 7*) se realizó en el año 2009 (54).

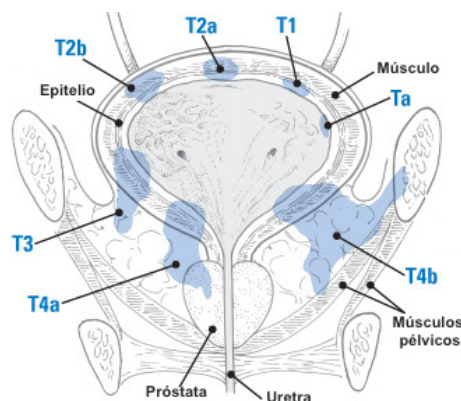
**Tabla 7.** Clasificación TNM 2009 de tumor vesical (54).

T- Tumor primario	
Tx	No se puede evaluar el tumor primario
T0	Ausencia de datos de tumor primario
Ta	Carcinoma papilar no invasivo
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : "tumor plano"
T1	El tumor invade el tejido conjuntivo subepitelial
T2	El tumor invade el músculo T2a Invasión del músculo superficial (mitad interna) T2b Invasión del músculo profundo (mitad externa)
T3	El tumor invade el 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 múltiples 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

**Figura 4.** Estadio tumoral (T) del tumor vesical de acuerdo a la infiltración vesical (Modificado de Staging bladder cancer from Harvard Health publications, Harriet Greenfield 2011).



### 1.3.3 Clasificación histológica

La clasificación histológica de los tumores vesicales (*Tabla 8*) 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 (54).

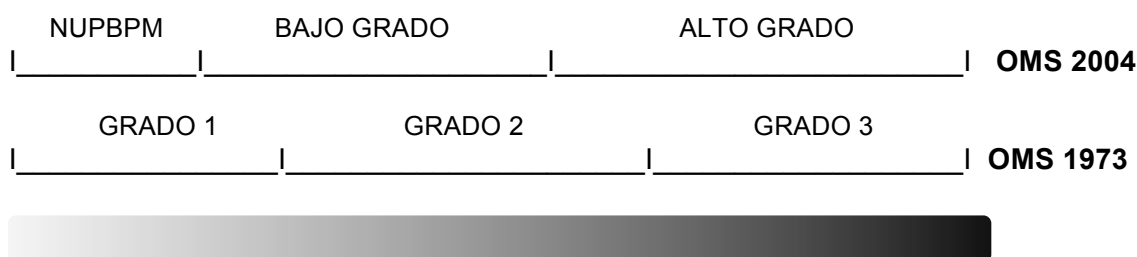
**Tabla 8.** Clasificación histológica de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de la Sociedad internacional de patología urológica (ISUP) (55,56)

Clasificación de la OMS de 1973 (55)	Clasificación de la OMS/ISUP de 2004 (56)
<p>CIS</p> <p><b>Lesiones papilares</b>                      Papiloma urotelial                      Grado 1: bien diferenciado                      Grado 2: moderadamente diferenciado                      Grado 3: mal diferenciado</p>	<p><b>Lesiones planas</b>                      Hiperplasia (lesiones planas sin atipia o aspecto papilar)                      Atipia reactiva (lesiones planas con atipia)                      Atipia de importancia desconocida                      Displasia urotelial                      CIS</p> <p><b>Lesiones papilares</b>                      Papiloma urotelial (lesión benigna)                      NUPBPM                      Carcinoma urotelial papilar de bajo grado (BG)                      Carcinoma urotelial papilar de alto grado (AG)</p>

NUPBPM: Neoplasia urotelial papilar de bajo potencial maligno, CIS: carcinoma in situ

La clasificación histológica en grados según la OMS de 1973 y 2004 poseen ambas valor pronóstico, sin embargo determinar cual de las 2 clasificaciones ofrece una mejor utilidad pronóstica es controvertido.

**Figura 5.** Comparación de las clasificaciones histológicas de los tumores vesicales. Clasificación de la OMS de 1973 vs. OMS de 2004 (54,57)



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

Los tumores vesicales se consideran como TMVNMI (Tis-Ta-T1) o TMVMI (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 TMVNMI. La invasión de la lámina propia o de la muscular corresponden al 28 y 24% respectivamente.

La clasificación de la OMS del año 2004 diferencia entre las neoplasias uroteliales papilares de bajo potencial maligno (NUPBPM) y los carcinomas uroteliales de bajo y alto grado (54).

Las NUPBPM se definen como lesiones que carecen de características citológicas de malignidad, pero muestran células uroteliales normales en una configuración papilar. Aunque conllevan un riesgo insignificante de progresión, no son completamente benignas y siguen presentando tendencia a recidivar.

Otro tipo son las lesiones planas limitadas a la mucosa, entre las cuales están la displasia urotelial, la atipia reactiva, la atipia de significado desconocido y el carcinoma *in situ* (CIS) (Tabla 9).

**Tabla 9.** Clasificación histológica de las lesiones planas según la OMS 2004 (54).

<b>Lesiones planas y su clasificación histológica</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Proliferación urotelial de potencial maligno desconocido. (lesiones planas sin atipia o aspecto papilar).</li><li>• Atipia reactiva (lesiones planas con atipia).</li><li>• Atipia de significado desconocido.</li><li>• Displasia urotelial.</li><li>• CIS urotelial (se considera siempre una lesión de alto grado).</li></ul>

CIS: carcinoma in situ

De las lesiones planas destaca particularmente el CIS que corresponde siempre a una lesión de alto grado. Habitualmente multifocal, puede estar presente en la vejiga o también en el tracto urinario superior, uretra prostática y otras localizaciones (54,58).

Es importante mencionar la subclasificación de los tumores vesicales T1 de acuerdo a la profundidad y extensión de la invasión tumoral en la lámina propia (59)

basado en el reconocimiento de la existencia de una cierta estratificación de la mucosa vesical (T1a, T1b y T1c). Otros sistemas de subclasificación T1 han sido propuestas (T1m y T1e) para predecir el comportamiento de estos tumores (60). Dicha subclasificación no está recomendada por la OMS y está basada principalmente en estudios retrospectivos.

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

#### *1.4 Estratificación en grupos de riesgo para recidiva/progresión en los TMVNMI:*

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 (54). 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 basadas en los resultados de 2596 pacientes con tumores TaT1 que fueron aleatorizados en 7 ensayos para determinar los riesgos individuales de recidiva y progresión (61). Estos pacientes no recibieron tratamiento de mantenimiento con BCG ni tampoco re-RTU, limitando la utilidad del estudio. Recientemente, la EORTC ha publicado una actualización del modelo que incluye pacientes tratados durante 1-3 años con BCG de mantenimiento, pero han sido excluidos los pacientes con CIS y no se ha realizado re-RTU en los pacientes de alto riesgo (62).

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 10*.

**Tabla 10.** Ponderación utilizada para calcular las puntuaciones de recidiva y progresión (54).

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		
Primario	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 11*).

**Tabla 11.** Probabilidad de recidiva y progresión según la puntuación total (54).

Puntuación de recidiva	Probabilidad de recidiva al cabo de 1 año		Probabilidad de recidiva al cabo de 5 años		Grupo de riesgo de recidiva
	%	(IC del 95 %)	%	(IC del 95 %)	
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		Probabilidad de progresión al cabo de 5 años		Grupo de riesgo de progresión
	%	(IC del 95 %)	%	(IC del 95 %)	
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)	

Para facilitar las recomendaciones terapéuticas es importante categorizar a los pacientes en grupos de riesgo. Basado en factores pronósticos y particularmente en las tablas de riesgo de la EORTC, las guías de la EAU han recomendado estratificar a los pacientes en 3 grupos de riesgo (*Tabla 12*).

**Tabla 12.** Estratificación del tumor vesical en grupos de riesgo según la EAU basado en las tablas de riesgo de la EORTC (54).

GRUPOS DE RIESGO	Características del tumor
<b>Bajo riesgo</b>	Tumor primario, único, Ta, G1 (NUPBPM, BG), <3cm, no CIS.
<b>Riesgo intermedio</b>	Todos los tumores no definidos en las otras dos categorías (entre las categorías de bajo y alto riesgo).
<b>Alto riesgo</b>	Cualquiera de las siguientes: <ul style="list-style-type: none"> <li>• T1.</li> <li>• G3 (AG).</li> <li>• CIS.</li> <li>• Múltiple, recurrentes y &gt;3 cm Ta, G1G2 (deben estar presentes todas las condiciones en este punto)</li> </ul>

NUPBPM: Neoplasia urotelial papilar de bajo potencial maligno, CIS: carcinoma in situ, AG: alto grado, BG: bajo grado.

Estos grupos de riesgo proporcionan el marco para protocolos de seguimiento/control, terapias intravesicales adyuvantes y orientación sobre cuando continuar o abandonar el tratamiento conservador y proceder con una cistectomía radical (63). La última actualización de las guías de la asociación americana de urología (AUA) han adoptado un sistema similar de grupos de riesgo, en el cual han incluido la variable tratamiento previo con terapia intravesical con BCG en el pronóstico (64).

El Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico (CUETO) ha establecido un modelo de puntuación para pacientes tratados con BCG que permite predecir el riesgo de recurrencia y progresión a corto y largo plazo (65). Este modelo se basa en 7 factores pronósticos (sexo, edad, recidivas previas, número de tumores, categoría T, asociación de CIS y grado tumoral). El riesgo calculado de recurrencia y progresión de las tablas CUETO es menor que las de la EORTC, probablemente debido a una instilación más eficaz en los estudios individuales en los que se basó el sistema.

### *1.5 Diagnóstico del cáncer vesical:*

La historia clínica es muy importante en el diagnóstico del cáncer vesical dado su asociación con el hábito tabáquico, factor de exposición a ciertas sustancias, etc.

El síntoma más común en los TMVNMI es la hematuria, sin embargo es posible la asociación de síntomas del tracto urinario inferior en los casos de CIS.

### 1.5.1 Diagnóstico por imagen:

#### 1.5.1.1 Ecografía abdominal

La ecografía abdominal suele ser la primera exploración que se realiza ante la sospecha de TMVNMI (54), permite visualizar los tumores vesicales con una sensibilidad de hasta 87.1%, especificidad de 98.1%, valor predictivo positivo de 94.4% y valor predictivo negativo de 95.4% (66,67). Es una prueba rápida, no invasiva y económica, que permite también valorar el tracto urinario superior, sin embargo es operador dependiente y las lesiones pequeñas (<5mm) o planas en algunos casos no son posibles de visualizar, por lo que ante la sospecha de CIS es imprescindible realizar una cistoscopia flexible. También presentan dificultad en el diagnóstico de las lesiones localizadas en la cúpula o cuello vesical. Factores como la obesidad y grado de distensión vesical pueden afectar el diagnóstico mediante la ecografía abdominal.

#### 1.5.1.2 Urografía intravenosa (UIV) y tomografía axial computarizada (TAC)

Los tumores de mayor tamaño pueden visualizarse como un defecto de llenado en la vejiga y el compromiso de los meatos ureterales que produce obstrucción puede detectarse como ectasia con ureterohidronefrosis. La UIV puede detectar estos defectos de llenado y dilatación en el tracto urinario superior que pueden indicar la presencia de tumor urotelial. El uso rutinario de la UIV esta cuestionado dada la baja incidencia simultánea de tumores vesical y del tracto urinario superior, un 1.8% que puede aumentar hasta un 7.5% en los tumores localizados en el trígono vesical (68).

La TAC con contraste se utiliza como una alternativa a la UIV convencional. En los TMVMI y en los tumores del tracto urinario superior, proporciona más información

que la UIV. Es importante destacar que tanto la ecografía abdominal, la UIV y la TAC con contraste no son capaces de diagnosticar el CIS ni otras lesiones planas.

#### 1.5.2 Cistoscopia:

El diagnóstico de cáncer de vejiga depende del examen cistoscópico y la evaluación histológica del material extraído bien mediante biopsia o toda la pieza tumoral. El diagnóstico de CIS se hace utilizando la combinación de cistoscopia, citología urinaria y evaluación histológica de biopsias de vejiga múltiples (54).

La cistoscopia puede realizarse de forma ambulatoria bajo anestesia local en la consulta mediante el uso de instrumentos flexibles. Si tenemos un diagnóstico previo de imagen, podemos omitir la realización de la cistoscopia y pasar directamente al tratamiento.

Los cistoscopios estándar para el diagnóstico y seguimiento del tumor vesical poseen luz blanca. En la última década se ha introducido la fluorescencia a través de derivados de las porfirinas, los cuales pueden mejorar la detección de lesiones vesicales planas o CIS. Es posible su aplicación tanto en cistoscopios rígidos como en los cistoscopios flexibles (69).

El 5-alfa-aminolevulínico (5-ALA) y el ácido hexil-amino-levulínico (HAL) son sustancias empleadas para el diagnóstico fotodinámico (PPD) mediante una instilación vesical. El más usado es el HAL, sustancia que es captada mayoritariamente por las células neoplásicas del urotelio debido a que compite con los betaaminoácidos y los aminoácidos gammaaminobutíricos. A nivel intracelular se induce la acumulación de protoporfirina IX, que es la sustancia fotosensible, la cual se estimula mediante una luz violeta que la activa. Tras la activación de la

sustancia sensible se emite una luz roja fluorescente (longitud de onda de 600-700 nm) que nos permite evidenciar la lesión neoplásica.

(69). El PDD mejora el contraste visual entre el tejido benigno y las lesiones malignas mediante una acumulación selectiva de porfirina rojo-fluorescentes, principalmente protoporfirina IX (PpIX), en las células malignas (70).

### 1.5.3 Citología de orina:

La citología urinaria se considera el marcador urinario no invasivo estándar, cuya utilidad depende del desprendimiento de células tumorales a la orina y de su correcta identificación por un patólogo (71).

La muestra se puede obtener tras la micción espontánea o mediante la obtención de una muestra urinaria de células tumorales exfoliadas obtenidas tras lavado vesical. Tiene una sensibilidad y especificidad razonable para la detección de los tumores vesicales de alto grado, mientras que la sensibilidad para la detección de los tumores de bajo grado es solo de 4% a 31% (72).

Por lo tanto, es útil principalmente para los tumores G3/alto grado (sensibilidad de hasta el 84%) o CIS (sensibilidad del 28-100%); sin embargo, un resultado negativo no puede excluir la presencia de un cáncer de bajo grado (54).

La positividad de una citología puede indicar la presencia de tumor urotelial en cualquier segmento del tracto urinario superior o inferior. La interpretación de la citología es observador-dependiente (73). El análisis citológico puede estar afectado por un bajo rendimiento celular, infecciones del tracto urinario, la presencia de litiasis o instilaciones intravesicales recientes. Sin embargo con citólogos con amplia experiencia, la especificidad puede superar el 90% (74). A

pesar de todas sus limitaciones, su alta especificidad y relativo bajo coste han convertido a la citología urinaria en el marcador urinario usado habitualmente (71).

#### 1.5.4 Test moleculares de orina:

El seguimiento y diagnóstico del tumor vesical muchas veces requiere de exploraciones invasivas como la cistoscopia y el uso de la citología de orina, la cual tiene múltiples limitaciones ya mencionadas. El objetivo del desarrollo de test moleculares de orina es permitir un diagnóstico con elevada especificidad y sensibilidad de forma no invasiva y disminuir si es posible la realización de cistoscopias innecesarias.

Los test moleculares de orina pueden ser utilizados no sólo para el diagnóstico sino también para el cribado de la población en riesgo, aunque dado la baja incidencia del cáncer vesical en la población general y el elevado coste de estos test, de momento no representan una prueba de cribado adecuada. El TMVNMI suele recidivar requiriendo el uso de la cistoscopia y citologías de orina para el control, la cistoscopia es una prueba invasiva y las citologías de orina a pesar de su alta especificidad, tienen una baja sensibilidad para los tumores de bajo riesgo (75). Estos dos factores han obligado al desarrollo de los marcadores urinarios moleculares en el cáncer vesical, sin embargo su uso rutinario no se ha generalizado en la práctica clínica. Se han descrito múltiples test moleculares, muchos de ellos aún están en fase de investigación. La *Tabla 13* muestra un resumen de los diferentes marcadores moleculares en orina para detectar el cáncer vesical.

**Tabla 13.** Biomarcadores en orina para la detección del cáncer vesical (76)(75)(71).

Marcador/Test	Método de detección	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
NMP22	ELISA	56	86
UroVysion	FISH	69-87	89-96
MicroRNA	RT-PCR	75	75
Marcador epigenético	Metilación-específica PCR	79-92	87-90
Antígeno tumoral vesical cualitativo (BTA-stat®)	Inmunoensayo cualitativo	57-83	60-92
Antígeno tumoral vesical cuantitativo (BTA-TRAK)	ELISA	62-91	65
Immunocyt®	citología+inmunofluorescencia	66.7-84.9	62-84.7
Lewis X (Ag del grupo sanguíneo)	detección AC monoclonal	79.8	86.4
Accu-Dx (FDP)		68.4	79.6
TRAP (Telomerasa)	PCR	90	88
Ácido hialurónico (AH)	ELISA	83.1	90.1
HYAL-1	ELISA	81.5	83.8
Survivina	ELISA	75	100
BCLA-4 (proteínas matriz nuclear)	ELISA	89-96.4	95-100
Análisis de Microsatélites/LOH		60-97	93
UPK3A	ELISA	83	83

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay (análisis por inmuoadsorción con enzimas ligados), FISH: hibridación fluorescente in situ, NMP22: proteína de la matriz nuclear 22, Ag: antígeno, AC: anticuerpo, HYAL-1: hialuronidasa 1, PCR: Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa), RT: transcriptasa reversa, FDP: Productos de degradación de la fibrina y fibrinógeno, UPK3A: uroplaquina 3A.

Ninguno de los tests de orina puede sustituir a la cistoscopia. Sin embargo, la citología urinaria o marcadores moleculares en orina se pueden utilizar como complemento de la cistoscopia para detectar tumores invisibles, especialmente CIS u otras lesiones planas.

Recientemente se han combinado 3 marcadores moleculares en orina: la mutación del receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblasto (FGFR3), la mutación de la telomerasa transcriptasa inversa (TERT) y el ensayo de metilación OTX1 para el seguimiento de los pacientes con TMVNMI de bajo grado con una sensibilidad para la detección de recidivas de un 57% (que aumenta al 83% para la detección de recidivas en tumores pT1 o TMVMI) y de 72% para los TMVNMI de alto grado (77). Los objetivos de esta combinación fueron sustituir la realización de las cistoscopias flexibles para el seguimiento de los pacientes con TMVNMI de bajo grado y detectar de forma precoz el potencial de invasión y recidiva en el seguimiento de los pacientes tras una resección de un TMVNMI de alto grado.



Con esta combinación se logró obtener una sensibilidad superior a la citología urinaria para la detección de TMVNMI de bajo grado (57% vs 4-31%).

#### *1.6 Tratamiento del tumor vesical no músculo-infiltrante (TMVNMI):*

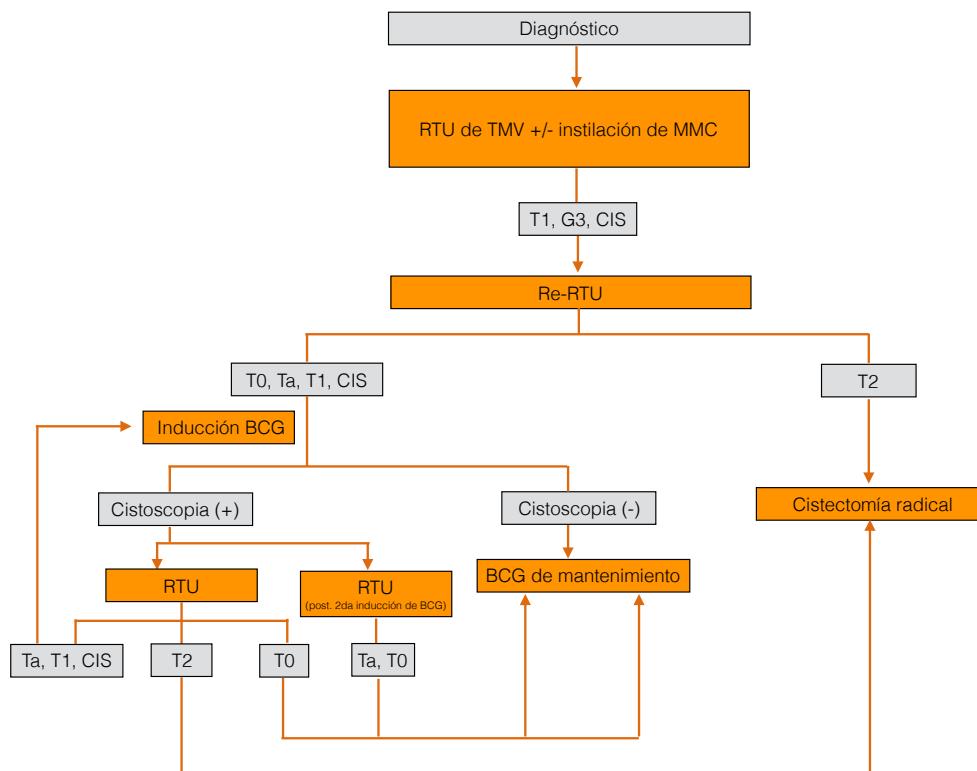
Existe una variedad de tratamientos para el TMVNMI, el más extendido de dichos tratamientos en nuestro medio es la resección transuretral (RTU) de tumor vesical con o sin tratamiento adyuvante.

El objetivo de la RTU de TMV es la extracción completa de todas las lesiones visibles y la realización de un adecuado diagnóstico anatomopatológico para posteriormente de acuerdo al tipo de tumor establecer el correcto manejo del paciente (54). Es fundamental la calidad de la RTU de TMV, no sólo debe ser completa, sino que debe incluir una buena representación de la capa muscular; la ausencia de representación muscular está asociada con un mayor riesgo de recidiva precoz (78).

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 recidiva vesical después de la resección inicial fue del 80% (79). Los pacientes con mayor riesgo de desarrollar recidiva son aquellos que tienen tumores grandes, menos diferenciados, tumores múltiples o vinculados con una sobreexpresión del p53 nuclear (80). Además, los pacientes que tienen CIS tienen un riesgo más alto de tener recidiva y de progresión tumoral (79,81,82).

La *Figura 6* resume el tratamiento estándar del tumor vesical.

**Figura 6.** Tratamiento del tumor vesical.



TMV: tumor vesical, RTU: resección transuretral, CIS: carcinoma in situ, MMC: Mitomicina-C  
Modificado de Zuiverloon et al. Eur urol 2011;(2012):129

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.

Recientemente ha despertado el interés de la RTU de TMV "en bloque" como una alternativa a la RTU de TMV clásica. La RTU "en bloque" aporta una amplia muestra de tejido muscular (en el 97% de los casos) y una muestra de tejido tumoral en bloque lo cual puede facilitar el análisis. Sus objetivos son mejorar la calidad de la resección, disminuir las tasas de complicaciones perioperatorias y disminuir las recidivas tumorales (83,84). Se ha descrito la técnica con diferentes fuentes de energía además de las fuentes de energía clásicas monopolar y bipolar,

se han empleado el láser de holmio, tulio y el verde. La morbilidad y complicaciones no varían respecto a la RTU tradicional, tampoco los resultados oncológicos. No existen estudios del impacto de la RTU "en bloque" y la recidiva tumoral (83,84).

De la misma forma como se podía emplear el PPD para el diagnóstico durante la realización de la cistoscopia también se puede emplear durante la RTU de Tm vesical, para delimitar mejor las lesiones papilares o para detectar lesiones planas o de CIS. El PPD tiene una mayor sensibilidad que la endoscopia de luz blanca (93% vs. 65%) sin embargo, tiene una menor especificidad (63% vs. 81%) (85).

Otra modificación de la visión endoscópica se obtiene con el NBI (Narrow Band Imaging) que es una cromoendoscopia digital que permite una valoración más detallada de la superficie mucosa y de su patrón vascular, facilitando la diferenciación entre el urotelio normal y las lesiones hipervasculares tumorales (86). Tiene la ventaja de ser más económica frente al PPD y si se dispone de la torre de endoscopia con esta función no es necesaria la administración de ningún fármaco endovesical.

Se han descrito otros tratamientos como la fulguración de pequeñas lesiones en pacientes con antecedentes de tumores pequeños de bajo grado, la cual puede realizarse de forma ambulatoria bajo anestesia local (87).

En pacientes con tumores TaT1, las biopsias aleatorias no están recomendadas de manera rutinaria. La probabilidad de detectar CIS en los tumores de bajo riesgo es extremadamente baja (<2%) (88) .

En pacientes con CIS, tumores exofíticos de apariencia no papilar, tumores de alto riesgo y citologías de orina positivas puede estar indicado la toma de biopsias vesicales múltiples randomizadas (89) . Ha sido descrita la afectación de la uretra

prostática en el TMVNMI (90) que puede ser de hasta un 11.7%, principalmente en los tumores localizados en el trigono o en el cuello vesical que asocien CIS y tumores múltiples (90), por lo que en algunos casos la biopsia de la uretra prostática estaría indicada.

### 1.6.1 Indicaciones de re-RTU

En determinados casos está indicada una segunda RTU principalmente en los casos de una resección inicial incompleta con lesión tumoral residual que impide un correcto diagnóstico. Debemos sospechar en una resección incompleta en los casos de tumores múltiples o de gran tamaño o cuando el patólogo no informa de la presencia de tejido muscular en el tumor resecado. En estos casos un tumor invasivo puede no ser diagnosticado durante la RTU inicial, siendo infraestimado por lo que se recomienda una segunda RTU o re-RTU (91).

Las indicaciones de una segunda RTU se resumen en la *Tabla 14*. No existe consenso en relación al momento adecuado de su realización, sin embargo. la mayoría de autores recomiendan llevarla a cabo tras 2-6 semanas de la RTU inicial.

**Tabla 14.** Indicaciones de re-RTU de tumor vesical según la EAU y la AUA.

EAU	Resección inicial incompleta. Tumores T1. Tumores de alto grado/G3 - excepto CIS primario. Ausencia de representación muscular en la muestra - excepto TaG1 y CIS primario.
AUA	Resección inicial incompleta. Tumores de alto riesgo (recidiva,multifocal,>3cm) Tumores de alto grado Ta. Tumores T1. Variantes histológicas . (micropapilar, nested, plasmocitoide, neuroendocrino, sarcomatoide).

CIS: carcinoma in situ, EAU: asociación europea de urología, AUA: asociación americana de urología.

### 1.6.2 Tratamiento adyuvante

El tratamiento adyuvante con quimioterapia intravesical con Mitomicina C, epirubicina 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. De acuerdo a las últimas guías de la Asociación Europea de Urología (54) las indicaciones de quimioterapia intravesical en los pacientes con TMVNMI son:

- Única instilación inmediata de quimioterapia postoperatoria: sólo se benefician los pacientes con una tasa previa de recidiva menor o igual a 1 recidiva por año y aquellos con una puntuación de recidiva de la EORTC < 5.
- Instilaciones adicionales con quimioterapia intravesical disminuyen la tasa de recidiva en los pacientes con riesgo intermedio.

En la siguiente tabla se resumen los resultados los resultados del tratamiento con terapia intravesical (quimioterapia o inmunoterapia) vs. no terapia intravesical (sólo RTU de tumor vesical) en el TMVNMI (*Tabla 15*) (92).

**Tabla 15.** Resumen de los resultados del tratamiento con terapia intravesical vs. no terapia intravesical (sólo RTU de tumor vesical) en el TMVNMI.

Terapia intravesical	Mortalidad (todas las causas)	Mortalidad específica por cáncer vesical	Recidiva del cáncer vesical	Progresión del cáncer vesical
BCG	No ensayos	1 ensayo, RR 0.62, IC del 95% 0.32-1.19	3 ensayos, RR 0.56, IC del 95% 0.43-0.71, $I^2=0\%$	4 ensayos, RR 0.39, IC del 95% 0.24-0.64, $I^2=40\%$
MMC	1 ensayo, HR 1.17, IC del 95% 0.89-1.53	1 ensayo, HR 0.71, IC del 95% 0.34-1.46	11 ensayos, RR 0.68, IC del 95% 0.55-0.83, $I^2=74\%$	7 ensayos, RR 0.65, IC del 95% 0.38-1.11, $I^2=0\%$
Doxorrubicina	2 ensayos, RR 1.83, IC del 95% 0.78- 4.28 y RR 0.93, IC del 95% 73-1.18	2 ensayos, RR 2.35, IC del 95% 0.25-21.6 y RR 0.97, IC del 95% 0.54-1.76	10 ensayos, RR 0.80, IC del 95% 0.72-0.88, $I^2=46\%$	5 ensayos, RR 1.03, IC del 95% 0.72-1.46, $I^2=0.0\%$
Epirubicina	No ensayos	No ensayos	9 ensayos, RR 0.63, IC del 95% 0.53 to 0.75, $I^2=64\%$	8 ensayos, RR 0.79, IC del 95% 0.48-1.30, $I^2=27\%$
Gemcitabina	1 ensayo, RR 0.50, IC del 95% 0.13-2.00	1 ensayo, RR 1.00, IC del 95% 0.06-15.8	1 ensayo, RR 0.98, IC del 95% 0.70-1.36	1 ensayo, RR 3.00, IC del 95% 0.32-28.4
Interferón-alfa	1 ensayo, RR 1.00, IC del 95% 0.15-6.75	1 ensayo, RR 1.00, IC del 95% 0.15-6.75	3 ensayos, RR 0.75, del 95% 0.53-1.06, $I^2=50\%$	2 ensayos, RR 0.33, IC del 95% 0.14-0.76, $I^2=0\%$
Tiotepa	1 ensayo, HR 0.99, IC del 95% 0.56-1.82	1 ensayo HR 1.61, IC del 95% 0.59-4.30 (multi-instilaciones) y HR 1.73, IC del 95% 0.65- 4.63 (instilación única)	5 ensayos, RR 0.78, IC del 95% 0.58-1.06, $I^2=69\%$	1 ensayo, RR 0.92, IC del 95% 0.13-6.36

BCG: bacilo de Calmette-Guérin; MMC: mitomicina C; IC: intervalo de confianza; RR: riesgo relativo; HR: hazard ratio

### 1.6.3 Indicaciones del tratamiento con instilaciones con BCG

Deberían recibir tratamiento con BCG los pacientes con tumores de alto grado, tumores T1, CIS, tumores múltiples, grandes y por último los pacientes con múltiples recidivas tumorales.

La terapia con BCG disminuye el riesgo de recidiva y progresión (93), sin embargo no aumenta la supervivencia (94).

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

- En pacientes con tumores de riesgo intermedio o alto riesgo la terapia intravesical con BCG después de la RTU de tumor vesical reduce el riesgo de recurrencia, es más efectiva que el tratamiento con RTU sola o que la RTU + quimioterapia intravesical.
- Para obtener una eficacia óptima, es importante la terapia de mantenimiento con BCG. La duración del mantenimiento con BCG en los pacientes con tumor vesical de alto riesgo es de 3 años, mientras que en los pacientes de riesgo intermedio sería de 1 año.

La *Tabla 16* resume las indicaciones de terapia intravesical (quimioterapia o inmunoterapia) en el tratamiento del TMVNMI.

**Tabla 16.** Indicaciones de terapia intravesical en el TMVNMI según la EAU y la AUA.

EAU	<p>Bajo riesgo-riesgo intermedio: una instilación inmediata de quimioterapia post-RTU.  Riesgo intermedio: inducción con BCG o QT.  Mantenimiento por máximo 1 año recomendado en aquellos que respondan a la inducción con QT.  Mantenimiento por 1 año recomendado en aquellos que respondan a la inducción con BCG.  Alto riesgo: inducción con BCG y mantenimiento con BCG por 1-3 años.</p>
AUA	<p>Bajo riesgo-riesgo intermedio: una instilación inmediata de quimioterapia post-RTU.  Bajo riesgo: no ofrecer inducción con quimioterapia.  Riesgo intermedio: considerar inducción con QT o inmunoterapia.  Mantenimiento puede usarse en aquellos que respondan a la inducción con QT.  Mantenimiento debe ser considerado por 1 año en aquellos que respondan a la inducción con BCG.  Alto riesgo: inducción con BCG y continuar mantenimiento con BCG por 3 años, según tolerancia.</p>

BCG: bacilo de Calmette-Guérin, EAU: asociación europea de urología, AUA: asociación americana de urología, RTU: resección transuretral, QT: quimioterapia.

Aunque la BCG es un tratamiento muy eficaz, existe el consenso de que no todos los pacientes con TMVNMI deben ser tratados con BCG, debido al riesgo de toxicidad. En último término, la elección del tratamiento depende del riesgo de recidiva y progresión del paciente (54).

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.

Hasta un 90% de los pacientes pueden experimentar efectos secundarios locales, como son los síntomas de cistitis (disuria, polaquiuria y hematuria ocasional) (95,96). Se observan efectos adversos graves en menos del 5 % de los pacientes y pueden tratarse con eficacia en casi todos los casos (97).

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, casos con hematuria ni tras un sondaje traumático.

#### 1.6.4 Eficacia del tratamiento con instilaciones con BCG

La administración de BCG intravesical después de la RTU de TMV se comparó con tratamiento sólo con RTU de TMV, en pacientes con lesiones Ta y T1. El tratamiento con BCG retardó la evolución a enfermedad muscular infiltrante o metastásica, mejoró la preservación de la vejiga y disminuyó el riesgo de muerte por cáncer de la vejiga (98). 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 (99–101).

Un estudio aleatorio llevado a cabo por el Grupo Sueco-Noruego sobre el Cáncer de vejiga comparó el tratamiento intravesical de dos años con MMC, versus BCG en pacientes con alto riesgo de recidiva o progresión. 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 (102).

Varios metaanálisis han demostrado la eficacia del BCG en los tumores vesicales TaT1. En cuatro metaanálisis 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 (103–105).

Se demostró en dos metaanálisis que el tratamiento con BCG previene, o al menos retrasa, el riesgo de progresión del tumor (106,107). 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 CIS (107).

Sin embargo, en otros dos metaanálisis se indicó un posible sesgo a favor de la BCG al incluir en los estudios a pacientes tratados previamente con quimioterapia intravesical (108,109).

#### 1.6.5 Valoración de la respuesta al tratamiento con instilaciones con BCG

La respuesta al tratamiento con BCG es impredecible, por lo que es muy importante encontrar biomarcadores que puedan ser capaces de predecir el grupo de pacientes con riesgo de fracaso del tratamiento o de los pacientes que tengan más riesgo de presentar efectos secundarios (110).

La determinación de p53, una proteína bien conocida que participa en el ciclo celular y en la regulación de la apoptosis, representa uno de los marcadores moleculares más estudiados cuya expresión no ha demostrado relación con la tasa de recidiva tras el tratamiento con BCG, a pesar de que su expresión elevada se relaciona con un menor tiempo hasta la recidiva (111–113) o progresión (111,113–

115), sin embargo esta asociación no ha sido demostrada en otros estudios (116,117).

ki-67 es una proteína nuclear de proliferación celular que no ha demostrado ser un marcador predictivo independiente de recidiva (111,112).

Marcadores como CD68 que es un marcador de macrófagos o TAMs (presencia de macrófagos asociados al tumor) y otras moléculas (ezrin, HSP90, CD83 y Cox2) requieren aún una validación. Otras técnicas como el estudio de expresión de genes y alteraciones epigenéticas del tumor antes del tratamiento podrían ser alternativas en la búsqueda de biomarcadores que puedan predecir la respuesta a la inmunoterapia con BCG (110).

En cuanto a los marcadores urinarios, la monitorización de los niveles de IL-2 durante el tratamiento parece una alternativa para determinar la respuesta al tratamiento (otros marcadores como la IL-8, TNF-alfa e IL-18); la única desventaja de estos marcadores es el hecho de que estos marcadores no son capaces de predecir la respuesta al tratamiento antes de la terapia (118).

#### 1.6.6 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 40 años por Morales y cols (119).

A pesar de que se dispone de una amplia experiencia clínica con el Bacillus Calmette-Guérin para el tratamiento del cáncer de vejiga, el mecanismo de su efecto terapéutico aún está bajo investigación. Está claro que la BCG funciona a través de la activación del sistema inmune e inducción de una respuesta inflamatoria. 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.

Un metanaálisis reciente (92) sobre las terapias intravesicales en el tratamiento del TMVNMI (BCG, mitomicina-C, gemcitabina, tiotepa, valrubicina, doxorubicina, epirubicina e interferón) no demostró diferencias entre la BCG versus MMC en cuanto al riesgo de recidiva (RR 0.95, 95% CI 0.81-1.11), pero la BCG se asoció con una disminución del riesgo de recidiva del 20% en el subgrupo de los ensayos de terapias de mantenimiento (RR 0.79, 95% CI 0.71- 0.87).

Existe una sólida evidencia a favor del uso de la terapia de mantenimiento para obtener el máximo beneficio de la terapia con BCG (120–122).

La terapia con BCG se asocia con un elevado porcentaje de efectos adversos locales y sistémicos en comparación con otros agentes intravesicales. Un ensayo clínico comparativo no encontró diferencias entre la dosis estándar y baja de BCG para la recidiva, progresión o mortalidad (92). La BCG es el único agente asociado con una disminución del riesgo de progresión versus RTU sola (92).

#### *Respuesta inmune a la BCG:*

La vejiga es un compartimento mucoso confinado, lo que permite mantener elevadas concentraciones de BCG y así poder lograr a largo plazo una activación inmune continua, ejerciendo una estimulación innata local, teniendo una amplia reactividad cruzada y más memoria originada a partir de un reordenamiento de genes (123).

La inmunoterapia representa una estrategia de tratamiento técnicamente factible para el cáncer de vejiga por múltiples razones (124). Los tumores de la vejiga poseen uno de los índices más altos de mutación de todos los tumores humanos y

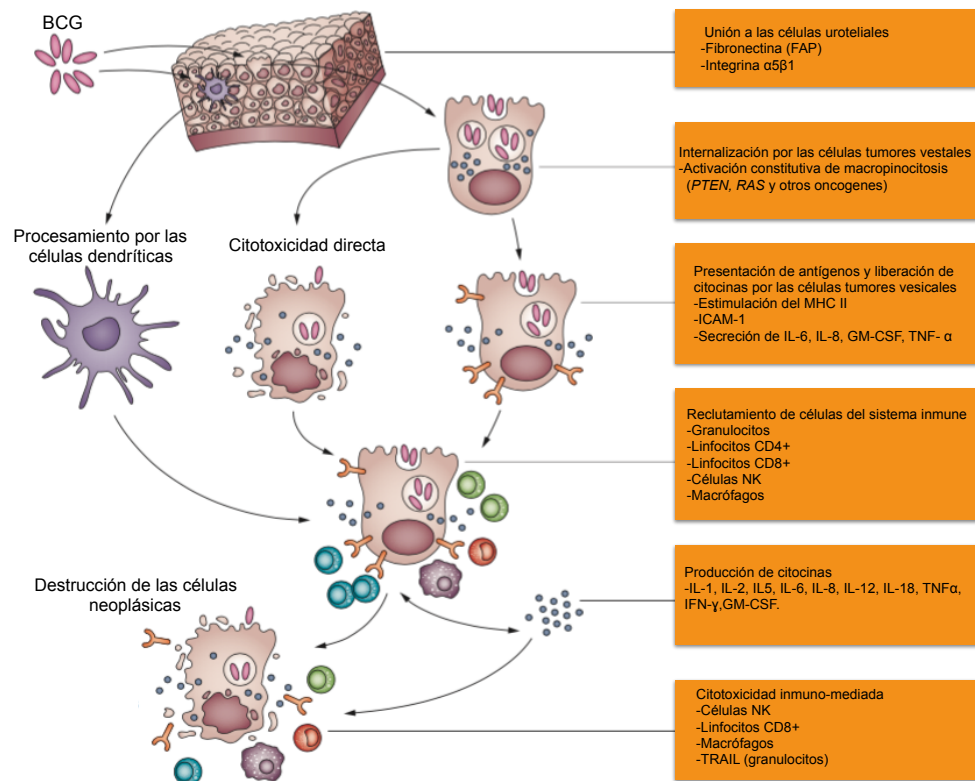
son muy antigénicos (125). Otras ventajas incluyen la capacidad de lograr un contacto directo entre los agentes terapéuticos y el tumor a través de la administración intravesical, la exposición sistémica teóricamente esta limitada y la capacidad de monitorizar la respuesta al tratamiento mediante la cistoscopia, la biopsia y la monitorización no invasiva de células y biomarcadores urinarios (124).

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, esta se internaliza en el urotelio y en las células tumorales vesicales en un proceso fibronectina dependiente mediado por integrinas (126,127). 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 (128) 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 (*Figura 7*).

Para un tratamiento efectivo con BCG es necesario un sistema inmune intacto, la BCG y contacto de la misma con las células tumorales vesicales.

**Figura 7.** Modelo de mecanismo de acción de la BCG en el cáncer vesical.



BCG: bacilo de Calmette-Guérin, IL: interleucina, GM-CSF: factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos, TNF: factor de necrosis tumoral, ICAM-1: moléculas de adhesión intracelular, NK: natural killer, INF: interferón, MHC: complejo principal de histocompatibilidad, TRAIL: ligando relacionado con TNF en la inducción a la apoptosis. (Modificado de: The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer. Nat Rev Urol. 2014;11:155).

### *Citocinas involucradas:*

La interacción de la BCG con las células uroteliales desencadena cambios inmunológicos importantes, incluidos la liberación masiva de citocinas a la orina de los pacientes tratados como la interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-17 (129), 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 (130,131).

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 (130,132,133). Niveles elevados de producción de IL-8 se asocian a una mejor respuesta clínica a la BCG (134,135).

Es posible aumentar la respuesta Th1 asociando la administración de BCG a citocinas como el IFN-  $2\alpha\beta$  (136).

Como se mencionó previamente es posible monitorizar los niveles de IL-2 en orina durante el tratamiento con BCG para determinar la respuesta del mismo (también la IL-8, TNF- $\alpha$ , e IL-18); sin embargo estas determinaciones no son capaces de predecir la respuesta al tratamiento antes de la terapia (118).

#### *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%) (137). 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 (138,139).

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 (140), células killers activadas por linfocinas (LAK) (140,141), células

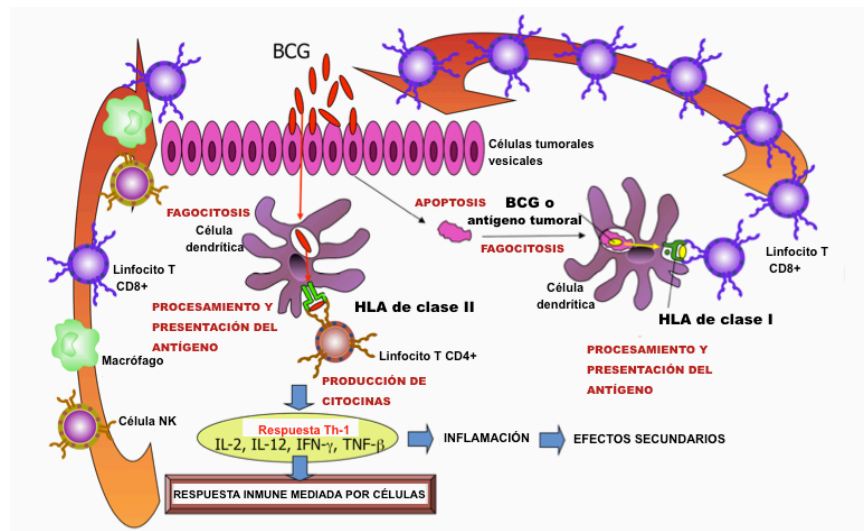
NK activadas por BCG (142–144), células T CD8+ CD-1-restringidos (145), células T  $\gamma\delta$  (123,146,147), células T NK (123,147,148), neutrófilos (140,149,150) , macrófagos (151,152), células T CD8+ restringidas por el MHC y células T CD4+ (153–156). De estas células, los linfocitos T son considerados las células efectoras más efectivas responsables de eliminar las células tumorales (157).

Las células "profesionales" presentadoras de antígenos como son las células dendríticas y los macrófagos pueden capturar, procesar y presentar no sólo las micobacterias sino también los antígenos apoptóticos de las células tumorales a los linfocitos T (*Figura 8*).

Se ha postulado que las células dendríticas inician la activación de las células T tras la administración de BCG. Células dendríticas inmaduras han sido identificadas en la orina de pacientes tratados con BCG (158).

In vitro, las células dendríticas que han sido expuestas a las BCG pueden activar a las células NK y a las células T  $\gamma\delta$ , e inducir la actividad citotóxica en contra de las células tumorales vesicales infectadas con BCG (123,160).

**Figura 8.** Principales células que participan en la respuesta inmune inducida por la inmunoterapia intravesical con BCG (161). (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 (153).

El papel de los linfocitos ha sido estudiado ampliamente; en el modelo de cáncer vesical en ratones, se ha observado que la BCG no tiene ningún efecto terapéutico en los ratones atímicos y que su eficacia puede restaurarse mediante una transferencia de esplenocitos sensibilizados a la BCG (162).

La mayoría de linfocitos en la orina de los pacientes tratados con BCG son linfocitos T, principalmente CD4+, lo mismo ocurre en el infiltrado de la mucosa vesical meses después del tratamiento con BCG (163,164). Sin embargo, a pesar del predominio de linfocitos CD4+, también es necesaria la participación de los linfocitos T CD8+.

Los pacientes con buena respuesta a la terapia con BCG presentan una notable infiltración de células CD8+ después de la terapia con BCG (155).

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

Los macrófagos juegan un papel importante no sólo 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 (156).

Podemos encontrar macrófagos en la orina de pacientes tratados con BCG así como un infiltrado a nivel de la pared vesical.

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 (165–167).

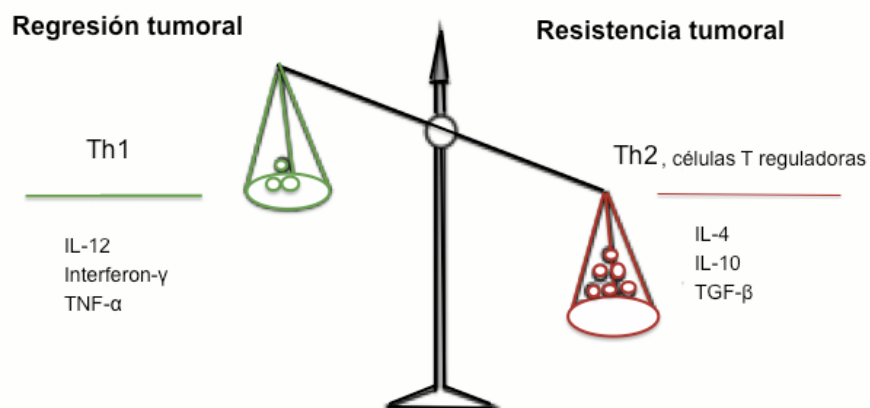
Las citocinas Th1 como IFN- $\gamma$ , IL-12, e IL-18 juegan un rol importante en la citotoxicidad de los macrófagos en contra de las células tumorales vesicales inducida por la BCG (168,169), pudiendo dichas citocinas estimular la actividad citotóxica de los macrófagos en contra de las células tumorales vesicales. Otras citocinas como la IL-10 pueden tener acción inhibitoria sobre la actividad citotóxica de los macrófagos (170).

En contraste, Ayari y cols (171) comunicaron que elevados niveles de infiltración tumoral por células dendríticas CD83+ y macrófagos CD68+ antes de 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 (171).

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 $\alpha$ , y MIP-1 $\beta$ , pueden reclutar varias células inmunes (135,172–175). 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 (176), y TLR9 (177) e induce la producción de IFN- $\gamma$  por la células dendríticas vía TLR2 (178). La BCG es capaz de inducir también la expresión de TRAIL en los neutrófilos (179). Niveles elevados de proteína TRAIL en la orina de pacientes con cáncer vesical tratados con BCG están asociados con una respuesta favorable al tratamiento (180).

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 9*) (181).

**Figura 9.** 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) (181).



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 (153).

En realidad, con mayor control del patrón de citocinas Th1 dominado por el interferon- $\gamma$  e IL-12 se desvía hacia un patrón Th2 con IL-10 (182).

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 (183).

La citotoxicidad BCG-específica de las células NK puede ser estimulada con la IL-12 o IFN- $\gamma$ , e inhibida por la IL-10 (184).

### 1.6.7 Mecanismos de escape del sistema inmune

#### *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 la lisis de células tumorales por los linfocitos T citolíticos (CTLs) y defectos en la presentación de antígenos podrían permitir a los tumores escapar a la acción de CTLs (185). El *down-regulation* del HLA de clase I en las células tumorales perjudica la presentación de antígenos tumorales y su péptido al sistema inmune (186). El HLA de clase I presenta *down-regulation* en aproximadamente el 30% de las neoplasias vesicales (187,188). Este es un factor pronóstico significativo en los pacientes sometidos a inmunoterapia con BCG (155). 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 (189). 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 (190). 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 mas 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 (191).

*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 (192). En contraste, Winerdal y cols (193) 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 mielóide) 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 (192). Eruslanov y cols (194) 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.

#### 1.6.8 Fracaso del tratamiento del TMVNMI y necesidad de cirugía radical

La progresión de los TMVNMI (Ta-T1) a TMVMI (T2) se ha comunicado entre un 6% y un 25% en los tumores Ta y entre un 27 % y un 48 % en los T1 de cualquier grado.

En los pacientes con tumores pequeños (< 3 cm) y sin CIS asociado la tasa de progresión de la enfermedad es baja (tasa de progresión de 20 % a 5 años) y aproximadamente 90 % de los pacientes mantiene la vejiga intacta durante un seguimiento máximo de 10 años (11).

Según los normogramas de la EORTC (año 2015) el riesgo de progresión a 5 años de los tumores T1G3 tratados con terapia de mantenimiento con BCG es < 20 % (62).

Es muy importante mencionar que en los casos en los cuales existe una progresión tumoral real de TMVNMI a un TMVMI (no por infraestadiaje inicial), la supervivencia cáncer-específica disminuye un 35% después de 4 años, la cual es significativamente peor si la comparamos con la de los pacientes con TMVMI sin historial de TMVNMI (195). Por esto es muy importante realizar un tratamiento con cistectomía radical precoz en los casos de fracaso de la terapia intravesical en los pacientes con TMVNMI.

De acuerdo con las guías del año 2016 de la EAU para TMVNMI, debe considerarse la cistectomía radical en los pacientes con TMVNMI con elevado riesgo de progresión (*Tabla 17*).

**Tabla 17.** Recomendaciones de tratamiento con cistectomía radical precoz en los casos de fracaso del tratamiento del TMVNMI (54,196).

Recomendación de cistectomía radical precoz	GR
<ul style="list-style-type: none"> <li>En los tumores T1 de alto riesgo de progresión (alto grado, multifocales, CIS y tamaño del tumor). En estos casos la CR inmediata es una opción.</li> </ul>	C
<ul style="list-style-type: none"> <li>En los tumores T1 con fracaso de la terapia intravesical. La CR es una opción.</li> </ul>	B

TMVNMI: Tumor vesical no músculo-infiltrante, GR: grado de recomendación, CIS: carcinoma in situ, CR: cistectomía radical

### 1.7 Seguimiento del TMVNMI:

Los pacientes con TMVNMI tienen un riesgo de recidiva a 5 años de un 70 % y de progresión de un 25 % (197), razón por la que es necesario llevar a cabo un seguimiento que en algunos casos debe ser intensivo.

Los calendarios de seguimiento y duración del mismo se ajustan según el grupo de riesgo al cual pertenece cada paciente, mediante el uso de tablas de riesgo de la EORTC (61) (*Tabla 12*) se pueden predecir los riesgos a corto y largo plazo de recidiva y progresión en pacientes individuales y adaptar el calendario de seguimiento de forma individual.

Existen varios factores que debemos tener en cuenta a la hora de planificar el calendario de seguimiento y las exploraciones complementarias. Las guías de la EAU puntualizan muy bien estos factores, de acuerdo al tipo de tumor, grupo de riesgo al que pertenece el paciente (54):

- La detección precoz de los casos con invasión muscular y HG/ G3 sin invasión muscular es crucial porque un retraso en el diagnóstico y el tratamiento puede traer como consecuencia una disminución de la supervivencia.
- La recidiva tumoral en el grupo de bajo riesgo suele ser de BG/G1. Las recidivas pequeñas, Ta BG/G1 papilares no representan un peligro inmediato para el paciente y la detección temprana no es esencial en estos casos para que el tratamiento tenga éxito (198–202). La fulguración de pequeñas recidivas papilares de forma ambulatoria podría ser una opción segura (87) para reducir la carga asistencial y terapéutica. Algunos autores han planteado la vigilancia temporal o conducta expectante en casos seleccionados (198,199,203).
- La primera cistoscopia después de la RTU de TMV a los 3 meses es un indicador pronóstico muy importante de recidiva y progresión (204–207). Por lo tanto, la primera cistoscopia debe realizarse siempre 3 meses después de la RTU de TMV en todos los pacientes con tumores Ta, T1 y CIS.
- En los tumores de bajo riesgo el riesgo de recidiva después de 5 años libre de recidiva es bajo (207). En estos casos se puede considerar la interrupción de la cistoscopia o la realización de métodos menos invasivos (208).
- En los tumores de riesgo intermedio y alto riesgo de inicio, las recidivas después de 10 años libres de enfermedad no son inusuales (209). Por lo tanto se recomienda seguimiento durante toda la vida (208).
- La estrategia de seguimiento debe reflejar el riesgo de recidiva extravesical (uretra prostática en hombres y tracto urinario superior).
- En los tumores del tracto urinario superior el riesgo de recidiva aumenta en pacientes con tumores múltiples y alto riesgo (210).

- Los resultados positivos de los test de orina tienen un impacto positivo en la calidad de la cistoscopia de seguimiento realizada (211).

El seguimiento de los TMVNMI se basa en la realización de cistoscopias. Ningún método no invasivo puede sustituir a la cistoscopia. Los estudios con biomarcadores moleculares en orina son prometedores y su implementación intenta reducir el número de controles con cistoscopias; sin embargo no pueden sustituir de momento dichos controles.

En los casos de CIS el cual habitualmente no es visible, las biopsias vesicales múltiples randomizadas son necesarias para confirmar la eficacia del tratamiento de las terapias endovesicales.

La *Tabla 18* resume las recomendaciones de seguimiento del TMVNMI.

**Tabla 18.** Recomendaciones de seguimiento del TMVNMI según la EAU y la AUA (63).

EAU	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A todos los pacientes: realizar una cistoscopia a los 3 meses.</li> <li>- Bajo Riesgo: otra cistoscopia a los 9 meses, luego anual durante 5 años. Considerar parar a los 5 años.</li> <li>- Riesgo intermedio: esquemas de seguimiento entre bajo y alto riesgo.</li> <li>- Alto riesgo: cistoscopia + citología C/3 meses por 2 años, luego C/6 meses hasta 5 años y luego anualmente.</li> <li>- Evaluación del tracto urinario superior anual en los casos de alto riesgo, no recomendaciones específicas para riesgo bajo e intermedio.</li> </ul>
AUA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A todos los pacientes: realizar una cistoscopia a los 3-4 meses tras completar el tratamiento.</li> <li>- Bajo riesgo: cistoscopia 6-9 meses después y luego anual durante al menos 5 años.</li> <li>- Riesgo intermedio: cistoscopia + citologías C/3-6 meses por 2 años, luego cada 6-12 meses por 3-4 años y después anual.</li> <li>- Alto Riesgo: cistoscopia + citologías C/3-4 meses por 2 años, luego cada 6 meses por 3-4 años y después anual.</li> <li>- Evaluación del tracto urinario superior cada 1-2 años en los casos de riesgo intermedio o alto riesgo. No recomendada rutinariamente para los casos de bajo riesgo.</li> </ul>

EAU: Asociación Europea de Urología, AUA: Asociación Americana de Urología.



### *1.8 Oncogénesis:*

Un cambio neoplásico del urotelio es un fenómeno producido por multitud de procesos (212). 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 transcripción 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 (213).

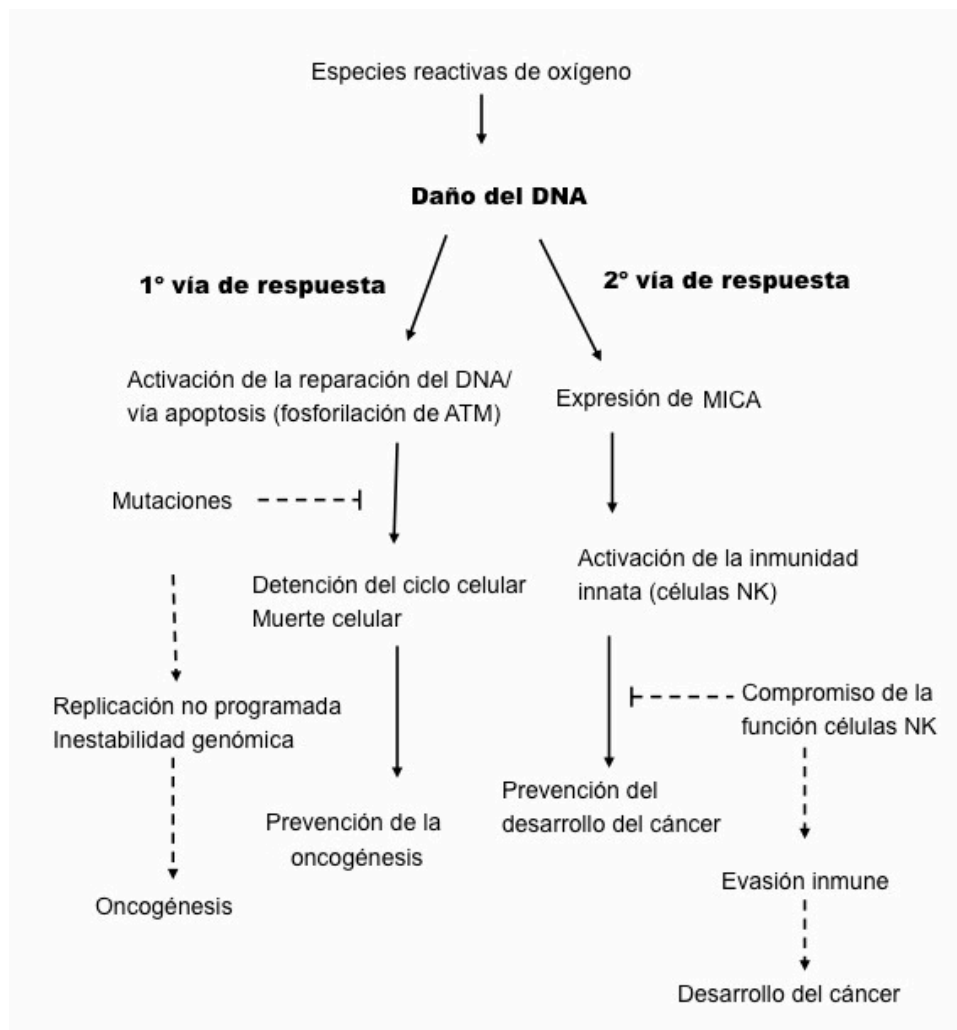
La proliferación celular normal es el resultado de una progresión ordenada a través del ciclo celular, mientras que la neoplasia se caracteriza por un crecimiento celular descontrolado. Los complejos proteicos vinculados al ciclo celular de ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas regulan en gran 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, deteniendo 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 (214). La proteína alterada de p53 puede detectarse mediante técnicas de inmunohistoquímica. La inmunoreactividad aumentada de p53 se ha encontrado en neoplasias vesicales de alto grado y se vincula con progresión de la enfermedad y

disminución de la supervivencia total y específica de la enfermedad. Existe evidencia científica de que p53 no sería la única proteína que se activaría en caso de daño del DNA (215,216).

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 demuestran las relaciones encontradas entre la activación de los mecanismos de respuesta al daño del DNA y numerosos estados patológicos, incluido el cáncer (216,217). 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, evidenciado 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 (218,219).

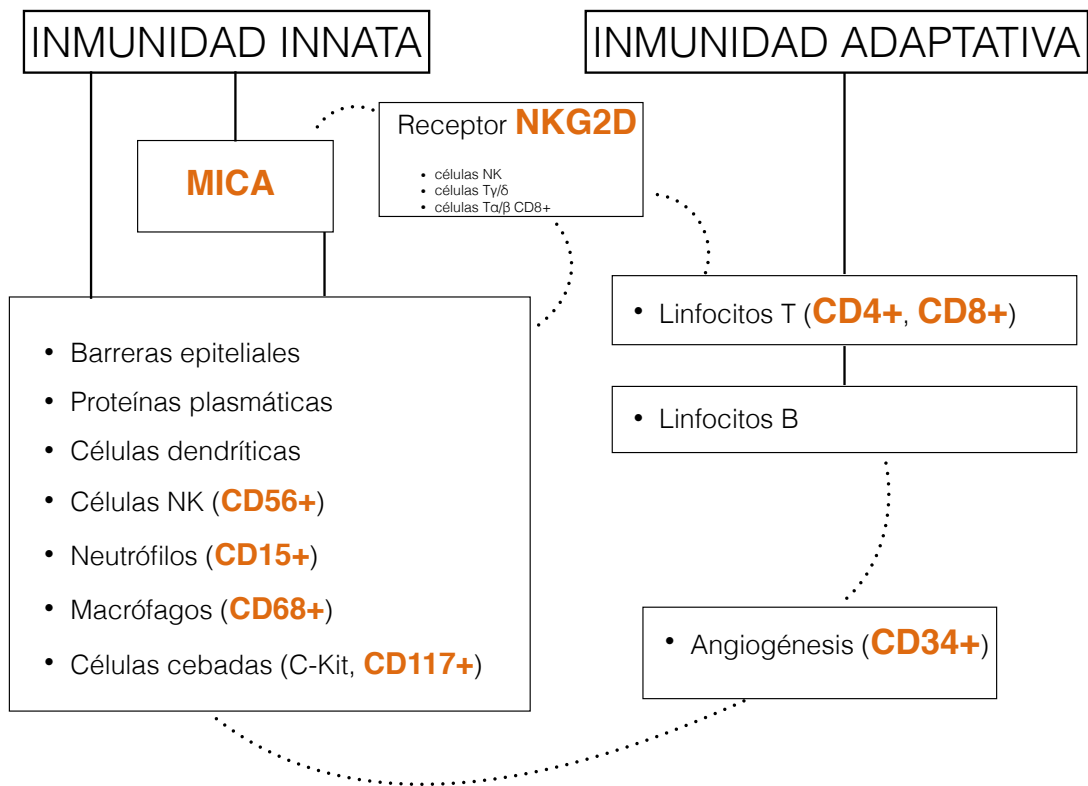
Una segunda vía de respuesta al daño oxidativo del DNA sería la expresión de MICs (moléculas no clásicas relacionadas con el MHC de clase I) con la consiguiente activación de la inmunidad innata a través de las células NK (*Figura 10*).

**Figura 10.** 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)(220).



Esta segunda vía con activación de la inmunidad innata genera no sólo la activación de las células NK, sino también de otras células de la inmunidad innata y de la inmunidad específica (adaptativa), así como producción de diversas citocinas y estimulación de la angiogénesis (Figura 11).

**Figura 11.** Esquema de algunos de los elementos importantes de la inmunidad que participan como mecanismo de respuesta al daño oxidativo.



### 1.8.1 MICA:

#### 1.8.1 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 (221) 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).

#### 1.8.2 MIC (**M**ajor histocompatibility complex class **I** **C**hain 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) (222). MICA y MICB (MICA/B) forman una nueva familia de moléculas de HLA de clase I denominadas no clásicas.

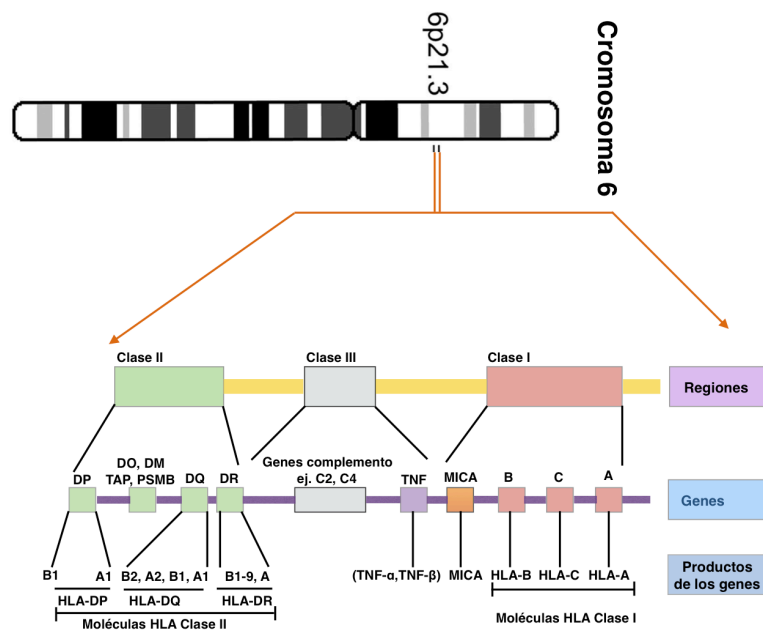
#### 1.8.3 MICA. Generalidades

MICA es el acrónimo de **M**ajor histocompatibility complex class **I** **C**hain related proteins to gen **A**. Constituye una de las moléculas relacionadas con el MHC de tipo I "no clásicas". Existen otras moléculas no clásicas como MICB, pero su importancia parece ser menor. Los antígenos MICA son glicoproteínas que se expresan en la superficie celular y tienen funciones relacionadas con la inmunidad innata.

En el año 1994 Bahram y cols (223) describieron una nueva familia de secuencia dentro del MHC de clase I pero con sólo un 27% de homología con las demás moléculas de clase I del MHC.

Esta familia está ubicada en el brazo corto del cromosoma 6 a unos 40 kb en sentido centromérico del gen del HLA-B (Figura 12).

Figura 12. Esquema de las moléculas del MHC. Cromosoma 6p21



Los alelos MICA más frecuentes son el MICA\*008 y MICA\*010, mientras que los alelos MICA\*005, \*013 y \*014 parecen no expresarse (224,225). Este polimorfismo de las moléculas MICA (ausente en las MICB) está relacionado con cambios en el aminoácido 129 (metionina/valina; M129V) del dominio α2 (exón 3, A454G). Este polimorfismo parece tener implicaciones funcionales relevantes, aunque aún está por precisar (226).

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 el epitelio gastrointestinal sano (227,228) 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 de estrés celular. No obstante recientemente se ha demostrado su expresión en diversos tejidos sanos (229).

MICA no se asocia a  $\beta$ 2-microglobulina y se expresa en tumores, epitelio gastrointestinal, células endoteliales, queratinocitos, células dendríticas, fibroblastos y médula tímica. También se ha detectado su expresión en los linfocitos T activados, pero no se expresa en los linfocitos de sangre periférica (230).

MICA es reconocida por un receptor denominado NKG2D (**N**atural- **K**iller **G**roup **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- $\gamma$  por células que expresan NKG2D. El IFN- $\gamma$  puede inducir la expresión de MICA y MICB por las células dendríticas (231). 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.

La expresión de antígenos MICA en el aloinjerto puede provocar varias respuestas en el receptor, incluida la producción de anticuerpos. Los anticuerpos anti-MICA aparecen un tiempo después del trasplante y generan una activación celular endotelial crónica (que puede desencadenar en un rechazo crónico). Los anticuerpos anti-MICA pre-existentes pueden también provocar un rechazo humoral agudo inmediatamente después del trasplante (232).

Zou y cols. (230) demostraron que en el trasplante renal de donante cadáver los pacientes con anticuerpos anti-MICA presentaron un aumento en el riesgo de rechazo del injerto en los receptores de un primer trasplante (HR 1.86, 95% CI 1.17–2.97;  $p=0.009$ ). Su estudio concluyó que la sensibilización en contra de los antígenos MICA se asocia a una reducción de la supervivencia del injerto después del trasplante renal.

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 IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$ ).
- La célula que expresa MICA es destruida, mediante la inyección de perforinas y granzimas.

En las infecciones virales, MICA juega un papel importante, uno de los modelos mejor conocido es el de la infección por citomegalovirus (CMV) (233). A partir de las primeras 24-72 horas después de la infección, la expresión de MICA a nivel de la superficie celular de las células infectadas aumenta progresivamente. La interacción del receptor NKG2D con su ligando MICA trae como consecuencia una cascada de eventos, entre los cuales destaca la respuesta anti-CMV de los



linfocitos T CD8  $\alpha\beta$ . Posteriormente, 72 horas tras la infección se alcanzan los máximos niveles de MICA.

La interacción MICA-NKG2D activa las células NK y células T para eliminar las células infectadas por el virus, mediante una respuesta citotóxica y la secreción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

Por lo tanto la expresión de MICA es beneficiosa inicialmente, pero a medida que progresa el tumor o infección los niveles elevados de MICA, inicialmente intracelular incapaz de interactuar con su receptor y posteriormente a nivel sérico (MICA soluble), saturan a su receptor NKG2D, inhibiendo la respuesta citotóxica y toda la cascada de acontecimientos dirigidos a combatir a las células tumorales que expresan MICA, convirtiendo los niveles elevados de MICA en perjudiciales.

#### 1.8.4 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 (234).

Existe un interés en MICA como inductor de una respuesta citotóxica antitumoral y la secreción de IFN- $\gamma$  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- $\beta$  de origen tumoral.
- Retención intracelular de MICA, lo que compromete la vigilancia inmunológica.

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

El receptor NKG2D es una glicoproteína transmembrana tipo II que se expresa de manera constitutiva en las células NK, células T  $\gamma/\delta$  y células T  $\alpha/\beta$  CD8+ (235). Normalmente no se expresa en las células T CD4+, sin embargo, en los pacientes con artritis reumatoide es posible su expresión en las células T CD4+ (*Tabla 19*) (236).

**Tabla 19.** Expresión de NKG2D por las células inmunes humanas.

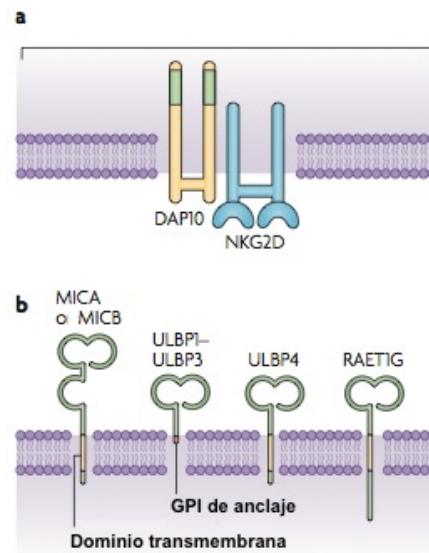
Tipo de célula	Patrón de expresión en la superficie celular
NK	~100%
T $\alpha/\beta$ CD8+	Antes de la activación: ~100% Después de la activación: ~100% Células de memoria antígeno-específica: ~100%
T $\alpha/\beta$ CD4+	Normalmente ausente, presentes en la artritis reumatoide.
T $\gamma/\delta$	Sangre periférica: ~100% Intraepiteliales intestinales: ~100%

NK: natural killer.

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 (237).

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 13a*).

**Figura 13.** (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)(238).



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 incremento de la actividad citotóxica y de la síntesis de citocinas entre las que destaca el interferón- $\gamma$  (239,240). Los niveles de NKG2D aumentan tras la exposición a IL-15 (241).

Spies y cols. (235) fueron los primeros en definir la expresión y función del receptor NKG2D, así como su interacción con MICA y respuesta antitumoral. Esta respuesta depende del balance entre múltiples señales inhibitorias y activadoras, de los niveles de receptores y sus ligandos y del estado de activación de las células NK.

#### *1.9.1 Ligandos del receptor NKG2D:*

NKG2D interactúa con ligandos que no son constitutivos, pero la expresión de estos ligandos es inducida.

En humanos existen 7 ligandos de NKG2D (*Figura 13b*), 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. Se componen de 5 miembros (ULBP1–ULBP4 y RAET1G).

No todos los ligandos de NKG2D son funcionalmente equivalentes, el ligando mejor conocido es MICA (238).

La expresión de ambos, el receptor NKG2D y sus ligandos, tiene un papel crucial en los mecanismos de defensa inmune en contra de las células tumorales a través de los linfocitos T y células NK. Estudios llevados a cabo en ratones demostraron que tanto las células NK como los linfocitos T CD8+ eliminan a las células tumorales que expresan ligandos de NKG2D a través respuestas mediadas por el receptor NKG2D (242,243).

En contraste con la expresión de MICA y MICB que no se expresa en las células normales (excepto el epitelio gastrointestinal), otros ligandos de NKG2D como RAET1 y ULBP se encuentran expresadas en tejidos sanos (244).

#### *1.9.2 Expresión de los ligandos de NKG2D en situaciones de estrés celular:*

##### *Cáncer colorrectal:*

Watson y cols. (245) evaluaron la expresión inmunohistoquímica de MICA en los tumores colorrectales, la cual fue ampliamente homogénea. Se observó que el tejido epitelial adyacente normal era también positivo para MICA, así como las células endoteliales y algunos leucocitos infiltrantes del tumor. En contraste, no se observó tinción de elementos nucleares o estromales. Todos los tumores evaluados mostraron expresión de MICA.

A pesar de esta expresión de MICA por una proporción similar de células en cada caso, se observó que la intensidad de tinción variaba entre tumores. Todas las células tumorales mostraron una intensidad muy similar de tinción MICA. No demostraron correlación entre los niveles de expresión de MICA (valorados mediante inmunohistoquímica a nivel tisular, así como a nivel sérico) con las variables clinicopatológicas convencionales. Por el contrario, el análisis de

supervivencia mostró una correlación significativa entre los niveles más altos de expresión MICA y la mejora de la supervivencia específica de la enfermedad, con un significado pronóstico independiente en el análisis multivariante (245).

Otros autores (246) han demostrado que los ligandos de NKG2D como MICA están sobreexpresados en el carcinoma de colon. La citotoxicidad mediada por las células NK de líneas celulares en el carcinoma de colon depende de las interacciones receptor-ligando. Los niveles de MICA soluble (sMICA) se incrementan en los pacientes con cáncer de colon, saturando e inhibiendo al receptor NKG2D en las células NK, lo que finalmente produce la inhibición de la citotoxicidad NK y estímulo de la progresión tumoral (246).

Por lo tanto niveles elevados de MICA y NKG2D, representan un factor buen pronóstico hasta cierto punto; sin embargo, si esta elevación de MICA es muy pronunciada, este ligando se internaliza (siendo incapaz de interactuar con NKG2D) o se desprende de la superficie celular, aumentando los niveles de sMICA, que saturan a su receptor NKG2D, generando una serie de eventos que permiten la progresión tumoral. Siendo buena la presencia de MICA solo en fases iniciales para estimular a su receptor NKG2D y posteriormente puede ser perjudicial.

Carcinoma hepatocelular:

Uno de los ligandos de NKG2D, ULBP1 se expresa de forma abundante en el carcinoma hepatocelular, pero a medida que progresa la enfermedad se pierde su expresión. Se demostró que la pérdida de expresión de ULBP1 se asoció con la recidiva precoz después de la resección hepática, no obstante su expresión no se relaciona con la supervivencia (247).

Timoma:

El equilibrio entre los niveles de NKG2D y sus ligandos son importantes para una correcta respuesta inmune frente a las células tumorales, a pesar de que a medida que la neoplasia progresa, los niveles persistentemente elevados de los ligandos de NKG2D pueden favorecer la progresión tumoral (248). En los timomas los niveles de NKG2D y de sus ligandos (MICA, MICB y ULBP1) están considerablemente elevados en comparación con los pacientes con atrofia o hiperplasia tímica. Y esta elevación contribuye al reconocimiento de las células tumorales por las células NK, contribuyendo a su eliminación. El aumento de la expresión de NKG2D y de sus ligandos podría ser un método útil en el tratamiento de los timomas de acuerdo al estadio de la enfermedad, siendo beneficiosa la inducción de dichos ligandos en las fases iniciales de la enfermedad. En las fases avanzadas (timomas subtipo C), la estrategia sería contraria; el empleo de fármacos que inhiban dichos ligandos y permitan el reestablecimiento de la actividad citotóxica para combatir las células tumorales (248).

Melanoma:

Se ha estudiado la influencia de la IL-10 en la regulación de la expresión de los ligandos de NKG2D en el melanoma y su efecto sobre la citotoxicidad de las células NK. La IL-10 disminuye los niveles de ligandos de NKG2D a nivel de la superficie celular. Tras la administración de IL-10 se obtienen menores niveles de MICA sobre la superficie celular y una disminución de los niveles de lisis de las células tumorales. Esto sugiere que la IL-10 es capaz de llevar a cabo una modulación de la actividad citotóxica desencadenada por la interacción de MICA con su receptor (249).

En otro estudio se demostró la expresión de MICA en el 70% de los tumores primarios y en 60% de los tumores metastásicos (250).

Leucemia:

Se ha sugerido que la citotoxicidad mediada por NKG2D se correlaciona con los niveles de expresión de ligandos de NKG2D en las células diana. En un estudio realizado con pacientes con leucemia se estimuló el aumento de los niveles de expresión de MICA y MICB en las líneas celulares leucémicas y las células leucémicas de los pacientes por tratamiento con tricostatina A, un inhibidor de la histona deacetilasa (HDAC). El tratamiento con TsA dio como resultado una acetilación incrementada de la histona H3 y una disminución de HDAC1. La estimulación de MICA y MICB por el tratamiento con TsA llevó a la mejora de la susceptibilidad de las células leucémicas a la citotoxicidad celular mediada por la activación de NKG2D. Estos resultados sugieren que la regulación de la expresión de los ligandos de NKG2D mediante el tratamiento con medicamentos de remodelación de la cromatina puede ser una estrategia atractiva para la inmunoterapia (251).

Cáncer de páncreas:

Chen y cols. demostraron que la elevación de los niveles de sMICA y NKG2D se correlaciona no sólo con la tumorigénesis y la progresión sino también con la invasión del tumor y la producción de metástasis (252). La expresión de sMICA fue más elevada en tejidos tumorales que en el tejido no tumoral adyacente (67.1 % vs 31.4 %) y la expresión de NKG2D fue significativamente más baja en los tejidos tumorales (32.9 %) que en los tejidos no tumorales adyacentes (60 %); esto indica



una correlación negativa entre los niveles de sMICA y los de NKG2D. Los niveles elevados de sMICA se correlacionaron significativamente con una disminución de la supervivencia libre de enfermedad y de la supervivencia global. Mientras que niveles de expresión elevados de NKG2D se asociaron con un aumento de la supervivencia libre de enfermedad y de la supervivencia global. En el análisis multivariante se demostró que niveles elevados de sMICA representan un factor independiente predictivo de mal pronóstico (252).

Colangiocarcinoma:

En el colangiocarcinoma la expresión de los ligandos de NKG2D fue homogénea (253). Niveles de expresión elevados de MICA/B se correlacionaron con una baja invasión linfocítica ( $p=0.0407$ ). No hubo asociación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de los ligandos de NKG2D y la edad, sexo, T, ganglios linfáticos, metástasis, así como tampoco con la recidiva tumoral.

Niveles de expresión elevados de MICA/B se asociaron también con una mayor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global ( $p=0.0031$  y  $p=0.0012$ , respectivamente). Concluyendo que los niveles elevados de los ligandos de NKG2D se asocian con un buen pronóstico (253).

Cáncer de mama:

En el carcinoma de mama invasivo el patrón de expresión inmunohistoquímico de MICA es heterogéneo, no se observa tinción del estroma ni del núcleo, sin embargo las áreas adyacentes de tejido no tumoral epiteliales, células endoteliales e infiltrado leucocitario demostró positividad para MICA (254). Existe una correlación

positiva entre la expresión de MICA y el grado tumoral, tipo, invasión linfática y vascular.

En pacientes con tumores de mal pronóstico los niveles de expresión de MICA fueron más elevados que en los tumores de buen pronóstico.

La correlación observada entre la expresión elevada de MICA y mal pronóstico en el carcinoma de mama invasivo podría explicarse por varios factores. Es predecible una respuesta inmune ante niveles elevados de MICA caracterizada por aumento de la actividad citotóxica de las células NK y linfocitos T, produciendo la lisis y erradicación del tumor. No obstante, en este estudio, observaron lo contrario, los tumores más agresivos son los que expresan mayores niveles de MICA. Una explicación razonable sería que los tumores más agresivos con alto grado de indiferenciación da como resultado no sólo unos niveles elevados de MICA, sino también ausencia de otras señales proinflamatorias. Con lo cual no se produce infiltración de las células inmunes efectoras y por lo tanto la expresión de MICA no tiene ninguna influencia en la evolución del tumor. Alternativamente, si MICA sólo se expresa dentro del citoplasma y no esta presente a nivel de la superficie celular, no será posible su interacción con NKG2D en las células NK (254).

Es posible que los tumores de mama agresivos comprendan variantes que son resistentes al ataque inmunitario por otros motivos, independientemente de la expresión de MICA, y que la mayor expresión de MICA observada en estos casos refleja simplemente el estrés alrededor de estos tumores.

Cáncer de próstata:

El daño en el ADN o el fracaso de los mecanismo de vigilancia ante los daños del ADN se ha asociado con el aumento del riesgo de cáncer de próstata. Varios

estudios clínicos han indicado que los hombres que fueron remitidos para realización de una biopsia de próstata debido a un antígeno prostático específico elevado (PSA > 4,0 ng / ml) o por un tacto rectal (TR) alterado, pero ninguna evidencia de cáncer en la biopsia tienen una probabilidad más alta de desarrollar cáncer de próstata que los hombres en la población general (255–257). Se ha sugerido que hay cambios preneoplásicos en estos pacientes, que puede estar asociada con un mayor riesgo de cáncer de próstata (258). Wu y cols (259). han formulado la hipótesis de que en los casos "derivados" (pacientes con PSA > 4 ng/ml. o TR alterado sin evidencia de cáncer) se han producido cambios biológicos, tales como daño al DNA, que predisponen a estos pacientes a un riesgo elevado de cáncer de próstata y que la vigilancia temprana en estos casos proporciona un diagnóstico precoz. En este estudio se evaluaron diversas respuestas al daño oxidativo del ADN entre las cuales estaba la expresión de MICA/B (259). Gasser y cols. (260) han demostrado que la expresión de MICA y otros ligandos de NKG2D está asociada al daño oxidativo del DNA. Wu y cols. demostraron que MIC positivo en los pacientes "derivados" también demostraron positividad para la fosforilación de ATM (pATM). Mientras que las muestras de pacientes de entre 19-20 años de edad con próstatas sanas fueron negativos para MIC. En los carcinomas también fue positivo la expresión de MIC y de pATM. Los niveles de MIC fueron más bajos en los pacientes con carcinoma que en los pacientes "derivados". Este nivel de MIC más bajo en los carcinomas se debe probablemente al desprendimiento de MIC de la superficie celular (261).

Estos datos indican que es posible la detección de MIC en los tejidos humanos preneoplásicos donde se ha producido daño al ADN. Se demuestra que el nivel de expresión de MIC se correlaciona con la fosforilación ATM en los tejidos, lo que

sugiere que la inducción de la expresión de la MIC puede servir como marcador general de daño al ADN y traducir un cambio biológico preneoplásico en los tejidos (259).

Cáncer renal:

En el carcinoma renal de células claras existe sobreexpresión de MICA con un patrón homogéneo. Niveles elevados de MICA se asociaron con metástasis, estadio clínico avanzado y mal pronóstico (262).

Cáncer de pulmón:

En estudios de cáncer de pulmón avanzado de células no pequeñas (NSCLC) la expresión elevada de MICA es uno de los indicadores de mal pronóstico y es uno de los factores de mal pronóstico de respuesta al tratamiento con terapia con citocinas (263). La mayoría de casos presentaban una expresión de MICA citoplasmática y de membrana, pero en el epitelio de pulmón normal no se expresaba MICA.

Trasplante renal:

La expresión de MICA en el aloinjerto puede provocar varias respuestas en el receptor, incluida la producción de anticuerpos. Los anticuerpos anti-MICA aparecen un tiempo después del trasplante y generan una activación celular endotelial crónica (que puede desencadenar en un rechazo crónico). Los anticuerpos anti-MICA preexistentes pueden también provocar un rechazo humoral agudo inmediatamente después del trasplante (232).

Zou y cols. (230) demostraron que en el trasplante renal de donante cadáver los pacientes con anticuerpos anti-MICA aumentaron el riesgo de rechazo del injerto en los receptores de un primer trasplante (HR 1.86, 95% CI 1.17–2.97; p=0.009). Su estudio concluyó que la sensibilización en contra de los antígenos MICA se asocia a una reducción de la supervivencia del injerto después del trasplante renal.

### *1.9.3 Estrategias terapéuticas conocidas. Sobreexpresión farmacológica de los ligandos de NKG2D:*

#### Ácido valproico e inhibidores de la histona deacetilasa.

Los inhibidores de la histona deacetilasa (HDACIs) representan una nueva clase de agentes antineoplásicos prometedores que afectan la proliferación, diferenciación y apoptosis en tumores sólidos y hematológicos (264,265) .

En los pacientes con tumores vesicales el tratamiento con ácido valproico (VPA) puede restaurar la expresión de los receptores de coxsackie y adenovirus (CAR). Este receptor es una molécula de adhesión en el cáncer vesical (266). La ausencia de expresión del CAR se ha asociado con una mayor agresividad del cáncer vesical (267,268).

El VPA también inhibe la migración e invasión de las células tumorales vesicales en múltiples líneas celulares de cáncer vesical. Estos efectos fueron dosis dependiente (269).

En procesos neoplásicos hematológicos como la leucemia los ligandos de NKG2D están ausentes o se expresan de forma muy discreta (251). En la leucemia mieloide aguda se ha demostrado que es posible obtener una sobreexpresión

farmacológica de los ligandos de NKG2D (MICA/B y ULBP1) mediante el uso de VPA, lo cual aumenta de forma significativa la lisis de las células tumorales mediada por las células NK, en un proceso de destrucción y reconocimiento de antígenos dependiente del receptor NKG2D (251). Este proceso constituye un mecanismo de la inmunidad innata en respuesta al daño al DNA para eliminar las células preneoplásicas y neoplásicas.

En líneas celulares de cáncer de vejiga TCCSUP y 253J tratadas con VPA y ácido zoledrónico, se demostró que el VPA aumenta los niveles de expresión de ligandos de NKG2D (MICA/B) en ambas líneas celulares, aumentando la susceptibilidad de las células tumorales que son reconocidas por NKG2D, a la citólisis por las células T  $\gamma/\delta$ , aunque el mecanismo exacto es desconocido (270). Por otro lado el ácido zoledrónico es un bifosfonato nitrogenado que produce la inhibición de la enzima farnesil pirofosfato sintetasa, necesaria para la actividad biológica de los osteoclastos, inhibiendo la resorción ósea mediada por los osteoclastos; demostró aumentar la susceptibilidad de las células tumorales a las citólisis por las células gamma-delta (270).



## 2. HIPÓTESIS

La hipótesis del presente trabajo es que los pacientes afectados 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 libre de recidiva/progresión tumoral.

Esta hipótesis se basa en:

- La 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.
- La mayor expresión de su receptor NKG2D en la células NK.

La expresión de MICA y NKG2D podría servir como un marcador para predecir la agresividad del tumor, en términos de recidiva y progresión tumoral.

El hecho de poder predecir la recidiva del tumor mediante un marcador podría permitir reducir el número de controles y pruebas innecesarias disminuyendo el impacto económico, así como detectar los pacientes en los cuales es necesario realizar un seguimiento más intensivo.





### 3. 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.
6. De manera complementaria, analizar las subpoblaciones de linfocitos T, histiocitos y células cebadas en el carcinoma de vejiga, su relación con la expresión tisular de MICA y NKG2D, así como el impacto que el perfil de estas subpoblaciones celulares inflamatorias puede tener sobre la historia natural del tumor.



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 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 (393 pacientes) con un seguimiento de 78 meses según los protocolos de seguimiento oncológico del Servicio de Urología del Hospital del Mar.

### 4.2 Criterios de inclusión

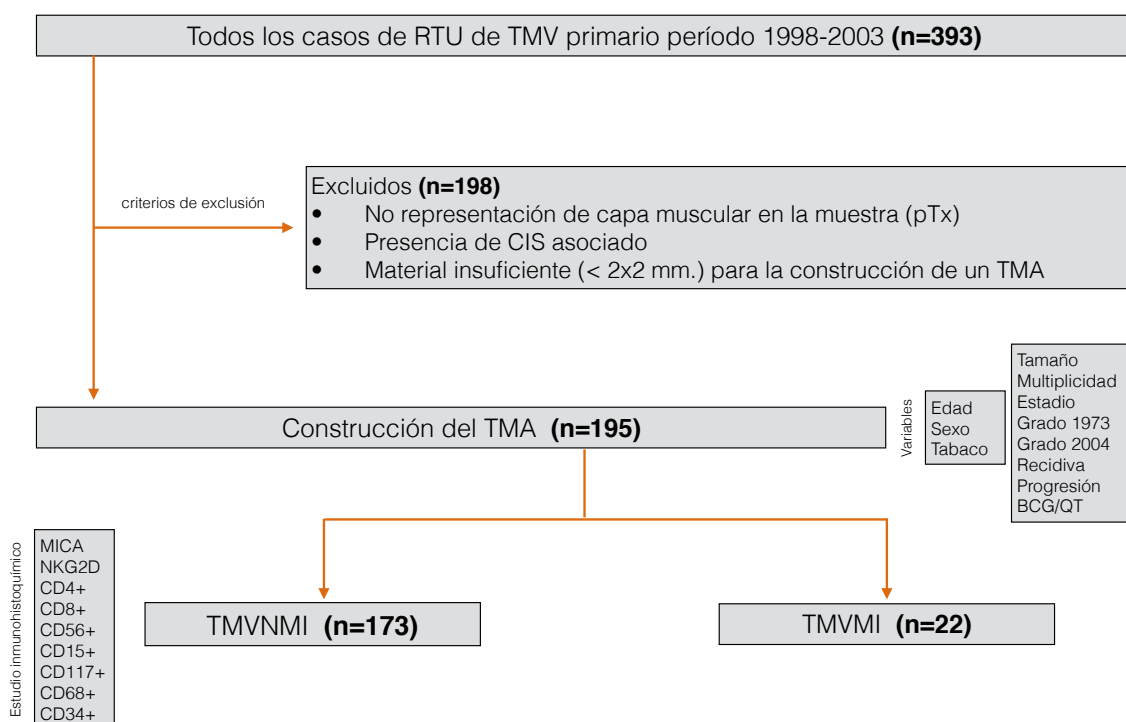
Se han recogido todos los pacientes diagnosticados de tumor vesical primario tratados con resección transuretral de tumor vesical (RTU) procedentes del archivo de registro de tumores del Servicio de Urología en el período comprendido entre los años 1998-2003 y en los que hubiera suficiente material recogido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

### 4.3 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión han sido:

- No representación de capa muscular en la muestra (pTx).
- Presencia de *carcinoma in situ* (CIS) asociado.
- Material insuficiente para la construcción de un microarray de tejido (TMA), considerando material insuficiente < 2x2 mm.

**Figura 14.** Proceso de inclusión de casos en el estudio.



TMV: tumor vesical, RTU: resección transuretral, CIS: carcinoma in situ, TMA: tissue-microarray, TMVNMI: TMV no músculo-infiltrante, TMVMI: TMV músculo-infiltrante

#### 4.4 Aprobación por el Comité ético del Hospital del Mar

Previamente se obtuvo la aprobación del banco de tejidos del Hospital del Mar para poder tener acceso a todas las muestras y posteriormente la autorización del *Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC)* del Parc de Salut Mar. Los pacientes firmaron un consentimiento informado antes de realizar la RTU de tumor vesical en el cual se hizo mención a la posibilidad de que parte del material extraído, tras realizar el diagnóstico anatomopatológico pudiese ser empleado con fines de investigación. Posteriormente se contactó con todos los pacientes que no tuviesen el consentimiento firmado previo al uso de las muestras.

Todo el estudio de las muestras anatomopatológicas y lectura de las inmunohistoquímicas fueron realizados por 2 uropatólogos sénior del Servicio de Anatomía patológica del Hospital del Mar, con la colaboración de un residente del último año de anatomía patológica y un urólogo.

#### 4.5 Cálculo del tamaño muestral

Para el cálculo del tamaño muestral nos basamos en el riesgo de recidiva de los pacientes con TMV estimado en la literatura en torno a un 70% a 5 años (197,271,272). En nuestro estudio de cohorte tenemos una aproximación del riesgo relativo de 0.7. Se calcula que aproximadamente el 80% de los no expuestos presentaron el evento de interés. Para el cálculo se tuvo en cuenta que la razón entre el número de expuestos y no expuestos es de 1.2.

Estos datos se introdujeron en una calculadora estadística Granmo (Calculadora de Grandària Mostral GRANMO desarrollada por el Program of Research in Inflammatory and Cardiovascular Disorders del IMIM, Barcelona <https://www.imim.cat/ofertadeserveis/software-public/granmo/>).

Se necesitan 132 pacientes (74 pacientes en los cuales este presente la recidiva y 62 sin recidiva para detectar como estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) un RR del 0.7.

#### 4.6 Construcción del Tissue microarray (TMA)

El Tissue microarray (TMA) para el estudio de la expresión inmunohistoquímica es un potente instrumento que ofrece la oportunidad trabajar con cientos de muestras de manera masiva y permite realizar estudios retrospectivos ya que preserva las muestras originales. Se trata de una técnica de investigación a nivel poblacional y no debe ser considerada como una técnica diagnóstica de casos individuales.

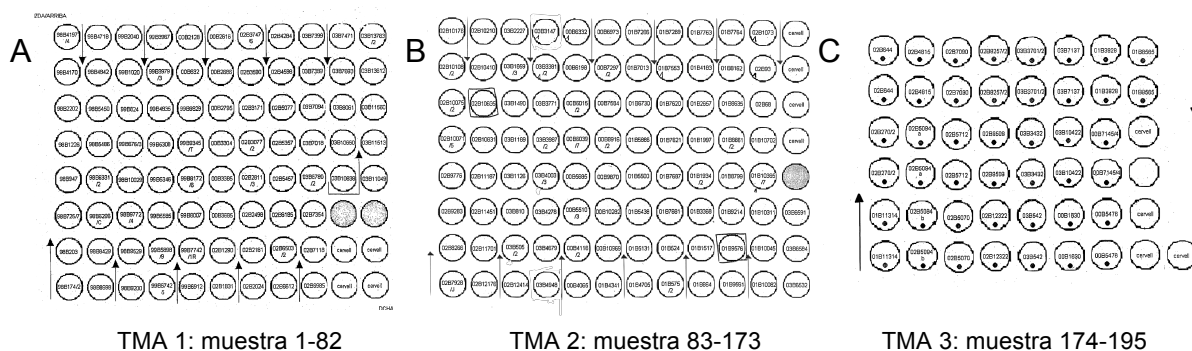
Los TMAs del presente estudio se construyeron a partir de las muestras de anatomía patológica de las resecciones transuretrales de tumor vesical que cumplían los criterios de inclusión (n=195) (*Tabla 15*).

El primer paso de la construcción del TMA es la revisión de todas las preparaciones histológicas de cada caso, en las que se marcaba con tinta las zonas de interés (áreas tumorales de mayor grado y estadio tumoral), seleccionando las zonas sin artefactos (de fijación o cauterización). A continuación se localizaron los bloques de parafina correspondiente a dichos cortes y se compararon con las laminillas, transfiriendo las marcas de las zona de interés al bloque con la mayor precisión posible.

Con los casos seleccionados, se diseñaron los mapas de distribución en los que se repartían al azar los 195 casos del estudio en 3 grupos, uno para cada bloque.

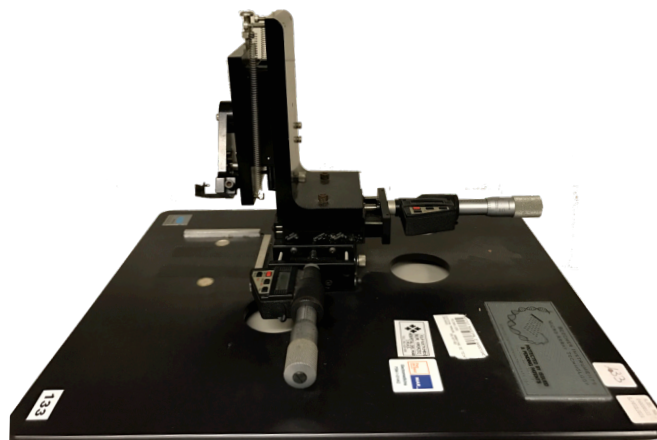
Los 3 TMAs contienen respectivamente 82 cores (muestra 1-82), 91 cores (muestra 83-173) y 44 cores (muestra 174-195). Ver *Figura 15*.

**Figura 15.** Mapas de distribución de los casos: A) TMA 1 B)TMA 2 y C)TMA 3.



De los diferentes bloques donantes se obtuvieron muestras con una aguja de 1 mm. de diámetro. Estos cilindros se transportaban con precisión al bloque receptor mediante un arrayer manual (Beecher Instruments, Silver Spring, USA) (*Figura 16*).

**Figura 16.** Arrayer manual (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA).



Los bloques de parafina resultantes contenían toda la serie de tumores dispuestos de acuerdo al mapa preestablecido.

Seguidamente se colocó el bloque sobre una placa termostática a 56°C durante 3 minutos aproximadamente, para lograr una mejor cohesión de los cilindros al bloque y para que todos ellos estuvieran al mismo nivel a la hora de obtener los cortes. Tras enfriar cada bloque a 4 °C se colocaron en un micrótomos y se seccionaron en láminas de 5 micrómetros de grosor.

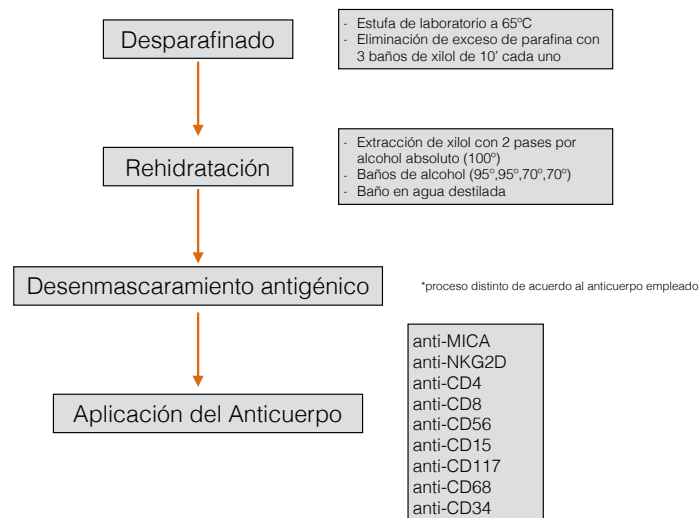


Se obtuvieron un total de 30 secciones de cada bloque, de las cuales la número 1, la 11 y la 21 se tiñeron con H&E para comprobar la representatividad de la muestra a los distintos niveles. El resto de secciones se sumergieron en parafina líquida y una vez solidificada, se guardaron en un congelador a -20°C para protegerlas hasta el momento de efectuar las técnicas inmunohistoquímicas.

#### 4.7 Anticuerpos y lectura de las reacciones inmunohistoquímicas

La realización de la técnica inmunohistoquímica se llevó a cabo en varios pasos según el siguiente esquema (*Figura 17*):

**Figura 17.** Protocolo para realización de la técnica inmunohistoquímica.



**Desparafinado:**

El primer paso antes de realizar las diversas técnicas inmunohistoquímicas es el desparafinado, que se lleva a cabo sometiendo las preparaciones histológicas a una temperatura de 65°C en una estufa de laboratorio. Posteriormente se elimina el exceso de parafina en 3 baños de xilol de 10' cada uno.

## Rehidratación:

Para rehidratar los cortes, primero se extrae el xilol en 2 pases de 10' cada uno por alcohol absoluto (100°) y posteriormente se sumergen en baños de alcohol de graduación decreciente (95°, 95°, 70°,70°) y finalmente en agua destilada.

## Desenmascaramiento antigénico:

Se utilizan distintos recursos dependiendo de las pruebas previas que se han hecho con cada anticuerpo para poder ponerlo a punto.

**Tabla 20.** Anticuerpos empleados en el estudio.

	Laboratorio	Clon	Desenmascaramiento	Dilución	T/°C incubación	Control
<b>MICA</b>	Immatics Biotechnologies, Tübingen, Germany	AM01 anti-human monoclonal	Tampón fosfato-salino pH 7.3. 20°C/30'	1:60	20°C	gastrointestinal
<b>NKG2D</b>	NovusBio, Littleton, CO	CD314 rabbit polyclonal	Tampón citrato pH 6. 120°C/ 3'	1:250	overnight/4° C	ganglio linfático
<b>CD8</b>	Ventana, Tucson, AZ	SP57 rabbit monoclonal	Tampón CC1 Roche® pH alcalino. 37°C/24'	prediluido	37°C/16'	ganglio linfático
<b>CD4</b>	Ventana, Tucson, AZ	SPR35 rabbit monoclonal	Tampón CC1 Roche® pH alcalino. 37°C/40'	prediluido	37°C/28'	ganglio linfático
<b>CD68</b>	Ventana, Tucson, AZ	PGM1	Tampón CC1 Roche® pH alcalino. 37°C/24'	prediluido	37°C/24'	ganglio linfático
<b>CD56</b>	Ventana, Tucson, AZ	MRQ-42 rabbit monoclonal	Tampón CC1 Roche® pH alcalino. 37°C/24'	prediluido	37°C/24'	ganglio linfático
<b>CD34</b>	Ventana, Tucson, AZ	QBEnd/10 mouse monoclonal	Tampón CC1 Roche® pH alcalino. 37°C/24'	prediluido	37°C/8'	ganglio linfático
<b>CD117</b>	Ventana, Tucson, AZ	9.7 rabbit antibody	Tampón CC1 Roche® pH alcalino. 37°C/32'	prediluido	37°C/36'	ganglio linfático
<b>CD15</b>	Ventana, Tucson, AZ	MMA mouse monoclonal	Tampón CC1 Roche® pH alcalino. 37°C/40'	prediluido	37°C/20'	ganglio linfático

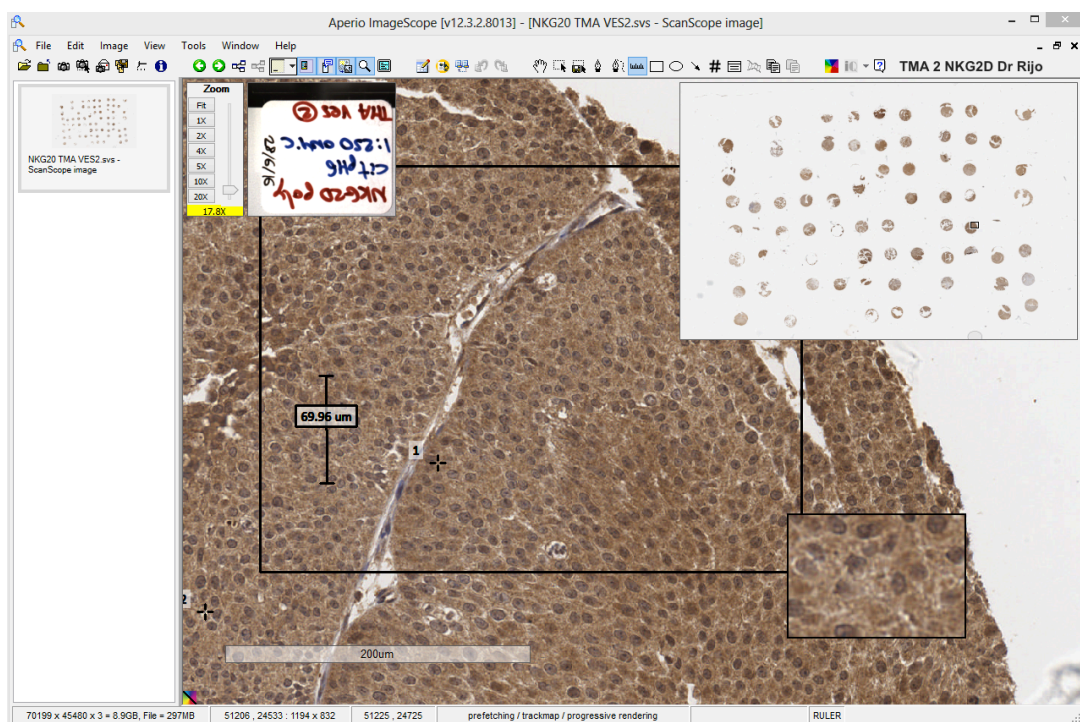
## LECTURA DE LAS REACCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS:

La totalidad de las lecturas de las preparaciones inmunohistoquímicas fueron realizadas por dos uropatólogos y por un urólogo, sin que ninguno de los 3 observadores tuviera conocimiento del grupo al que pertenecían las muestras.

Por otra parte las lecturas las efectuaron los 3 observadores en dos rondas completas en parejas (patólogo-urólogo) con la idea de llegar a un consenso en cada una de las lecturas y minimizar el factor de subjetividad.

Para obtener una mayor precisión y facilitar las lecturas, las muestras fueron previamente digitalizadas mediante un scanner de preparaciones histológicas (Aperio© Digital pathology scanner) y las lecturas se realizaron en un ordenador con pantalla HD mediante el software Aperio© Imagescope (Leica Microsystems GmbH. [www.LeicaBiosystems.com/ePathology](http://www.LeicaBiosystems.com/ePathology)), detalle en la *Figura 18*.

**Figura 18.** Lecturas de las inmunohistoquímicas mediante el software Aperio© Imagescope.



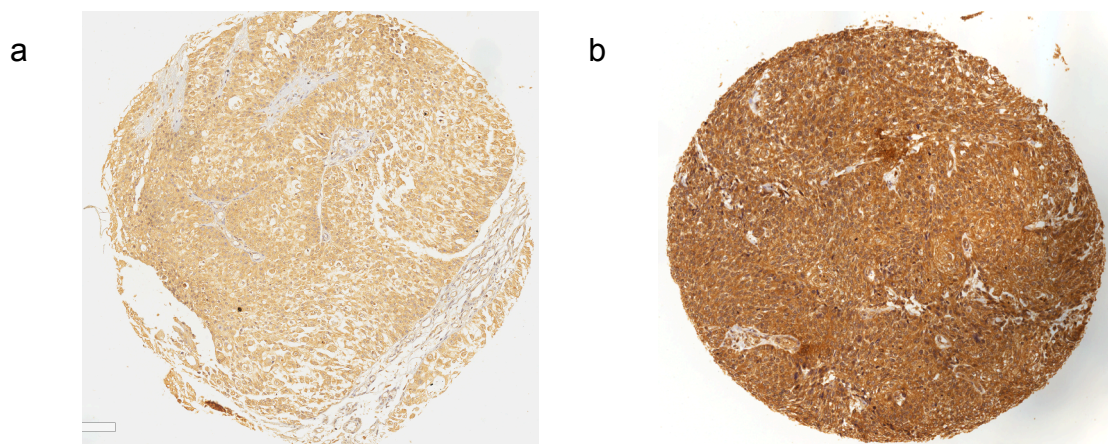
Esto permitió visualizar de manera más ágil y precisa todas las imágenes, así como realizar comparaciones y revisar nuevamente los casos en los cuales existía algún tipo de duda.

Para cada anticuerpo, tras estudiar de manera cualitativa las distintas secciones, se estableció una estrategia de valoración adaptada a sus distintos perfiles.

MICA y NKG2D:

Para ambos anticuerpos empleamos un sistema de evaluación semicuantitativo en el cual se puntuaba con 0/+/>++ de acuerdo a la intensidad del anticuerpo evaluado, ya que con estas tres categorías era suficiente para clasificar la totalidad de las muestras debido a su homogeneidad de expresión. En todos los casos se detectó una reacción inmunohistoquímica homogénea de todo el cilindro para MICA y NKG2D. Sin embargo, la intensidad de la misma era variable en cada caso. Para el análisis posterior de los datos se consideró 0=ausente, 1=leve y 2=intenso.

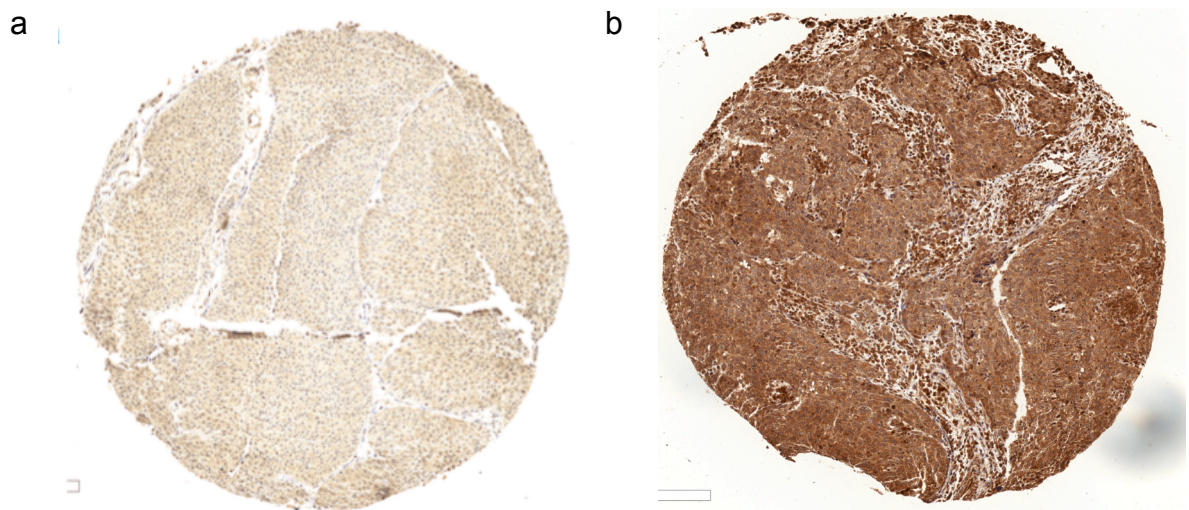
**Figura 19.** Cilindros del TMA vesical con tinción del anticuerpo anti-MICA demostrando una (a) expresión débil y (b) una expresión intensa de MICA (60X)



También se establecieron las categorías de no valorable (cuando la muestra era de mala calidad o se había dañado durante el proceso y no permitía una correcta evaluación) y missing (en los casos en los cuales no quedaba ningún cilindro con tumor correspondiente al caso en el TMA).

El anticuerpo empleado para la detección de MICA fue el anticuerpo Anti-MICA MICA-b1 monoclonal (clone AMO1; Immatics Biotechnologies, Tübingen, Germany) y para la detección de NKG2D fue el anticuerpo anti-NKG2D rabbit polyclonal (clone CD314, ref. NBP2-43645, Novus Biologicals, Littleton, Colorado, USA).

**Figura 20.** Cilindros del TMA vesical con tinción del anticuerpo anti-NKG2D demostrando (a) una expresión débil y (b) una expresión intensa de NKG2D (60X)

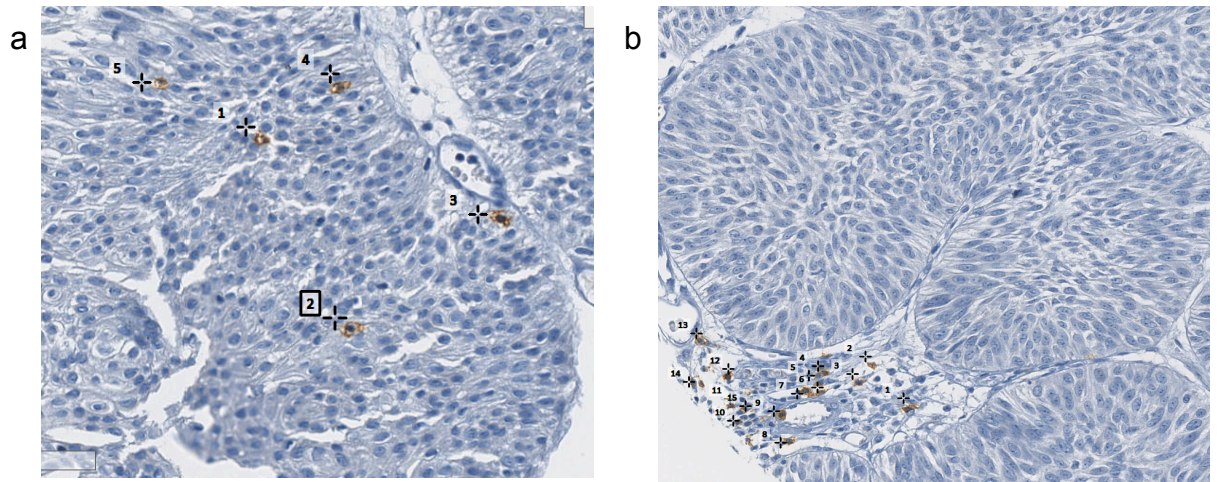


CD8:

Se contabilizó el número absoluto de linfocitos CD8+ intraepiteliales en el tumor mientras que en el compartimiento estromal se establecieron las siguientes categorías: ausente, 1-9 linfocitos CD8+ por core, 10-30 linfocitos CD8+ por core y > 30 linfocitos CD8+ por core.



**Figura 21.** Cilindros del TMA vesical con tinción del anticuerpo anti-CD8 demostrando linfocitos CD8+ intraepiteliales, (a) detalle de un campo con 5 linfocitos CD8+ y (b) linfocitos CD8+ estromales (120X)

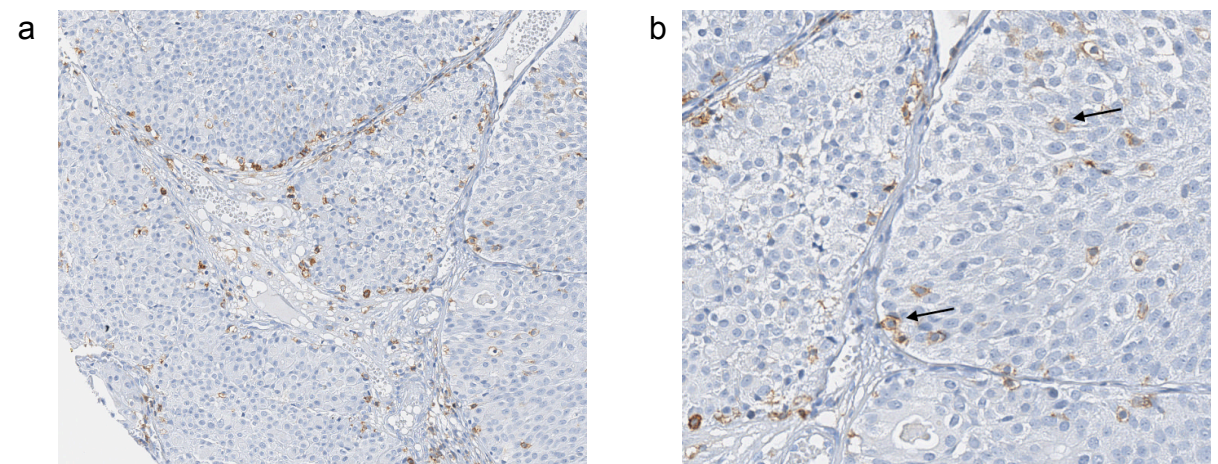


El anticuerpo utilizado fue anti-CD8 rabbit monoclonal primary antibody Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona (clone SP57).

#### CD4:

Similar a la lectura de CD8 se contabilizó primero el número absoluto de linfocitos positivos intraepiteliales tumorales y para el estroma se establecieron 4 categorías: ausente, 1-9 linfocitos CD4+ por core, 10-30 linfocitos CD4+ por core y > 30 linfocitos CD4+ por core.

**Figura 22.** Cilindros del TMA vesical con tinción del anticuerpo anti-CD4 demostrando (a) linfocitos CD4+ intraepiteliales y linfocitos CD4+ estromales (120X) y (b) en el mismo core detalle de dos linfocitos CD4+ (160X).

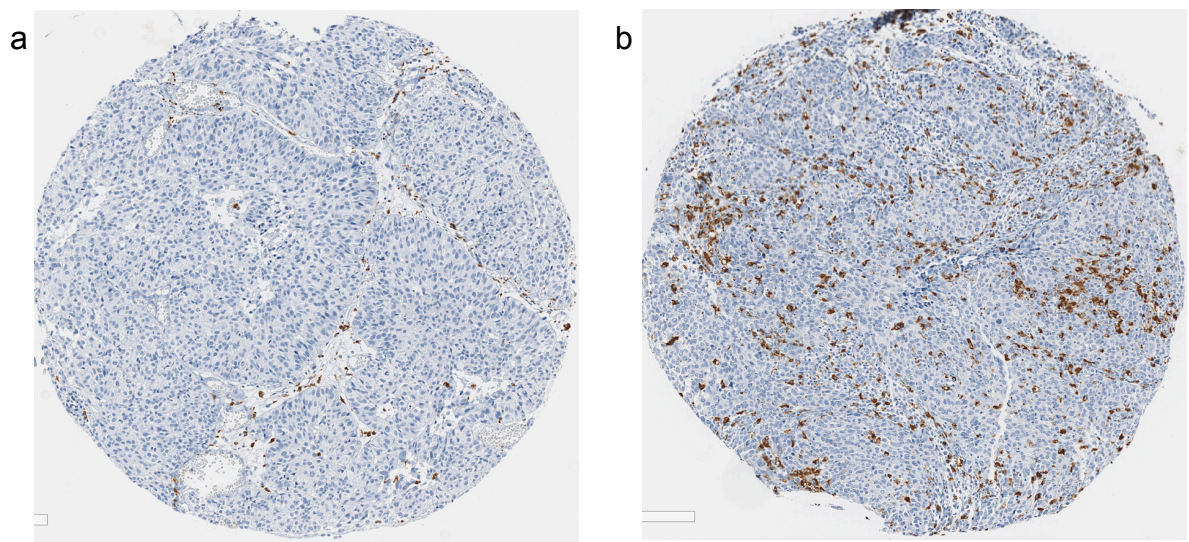


El anticuerpo empleado en este caso fue el anti-CD4 rabbit monoclonal primary antibody Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona (clone SPR35).

CD68:

Las lecturas de la reacción inmunohistoquímica para la detección de células CD68+ se realizó en función del rango observado en el examen histológico convencional primero a nivel epitelial estableciendo 4 categorías: ausente, escaso, abundante y difuso. Mientras que para el compartimiento estromal se emplearon 3 categorías: 1-9 células CD68+ por core, 10-30 células CD 68+ por core y > 30 células CD68+ por core.

**Figura 23.** Cilindros del TMA vesical con tinción del anticuerpo anti-CD68 demostrando (a) células CD68+ intraepiteliales escasos (60X) y (b) células CD68+ intraepiteliales abundantes y estromales >30 por core(60X).



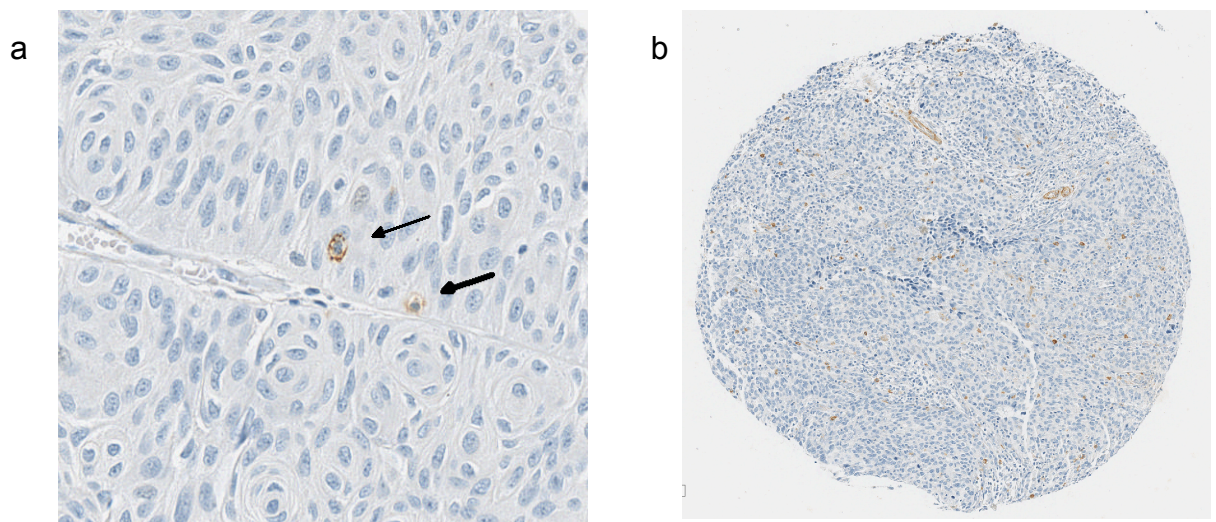
El anticuerpo empleado en este caso fue el anti-CD68 rabbit monoclonal primary antibody Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona (clone PGM1).



CD56:

Se contabilizó de la misma forma que CD4 y CD8, primero el número absoluto de células CD56+ intraepiteliales en el tumor mientras que en el compartimiento estromal se establecieron las siguientes categorías: ausente, 1-9 células CD56+ por core, 10-30 células CD56+ por core y > 30 células CD56+ por core.

**Figura 24.** Cilindros del TMA vesical con tinción del anticuerpo anti-CD56 demostrando (a) células CD56+ intraepiteliales, detalle de un campo con 2 células CD56+ (160X) y (b) un core completo con múltiples células CD56+ (60X)



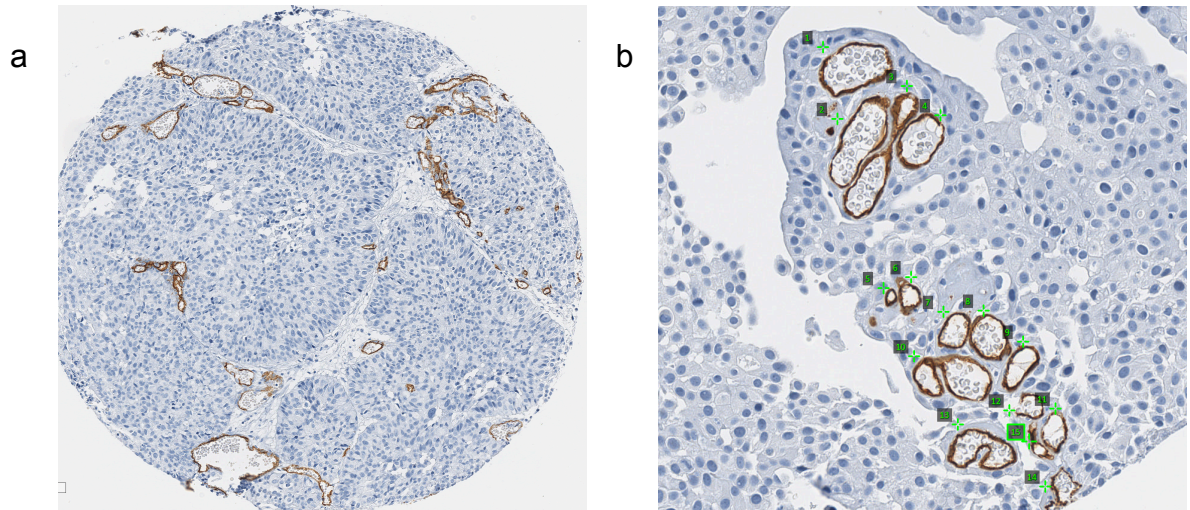
El anticuerpo usado anti-CD56 rabbit monoclonal primary antibody Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona (clone MRQ-42).



CD34:

Se contabilizó el número absoluto de "cortes" de vasos en cada core.

**Figura 25.** Cilindros del TMA vesical con tinción del anticuerpo anti-CD34 demostrando (a) reacción positiva para CD34+, visión panorámica de un core completo (60X) y (b) detalle magnificado de algunos "cortes" de vasos señalados (160X)

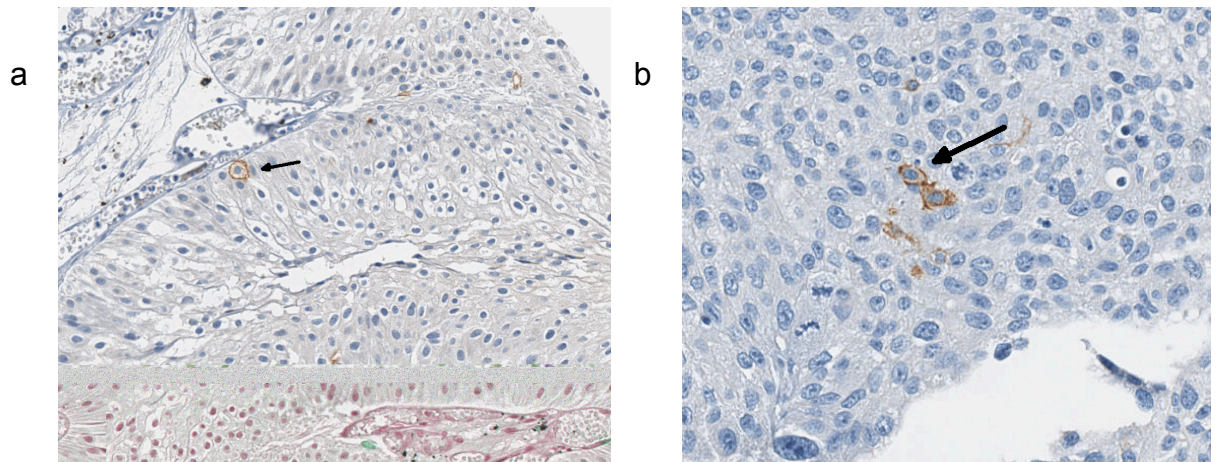


El anticuerpo usado anti-CD34 mouse monoclonal primary antibody Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona (clone QBEnd/10).

CD117 (c-kit):

Para valorar la reacción de CD117 de acuerdo al escaso número de células positivas observadas en el examen histológico convencional se decidió contabilizar el número absoluto de células positivas para CD117 a nivel intraepitelial tumoral y posteriormente se llevó a cabo el mismo procedimiento a nivel del compartimiento estromal.

**Figura 26.** Cilindros del TMA vesical con tinción del anticuerpo anti-CD117 (Anti-c-KIT) demostrando la reacción positiva para CD117+ en dos casos (a) (120X), y (b) (140X) en ambos casos las células positivas se han señalado con una flecha.



El anticuerpo usado anti-CD117 (Anti-c-KIT) rabbit primary antibody Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona (clone 9.7).

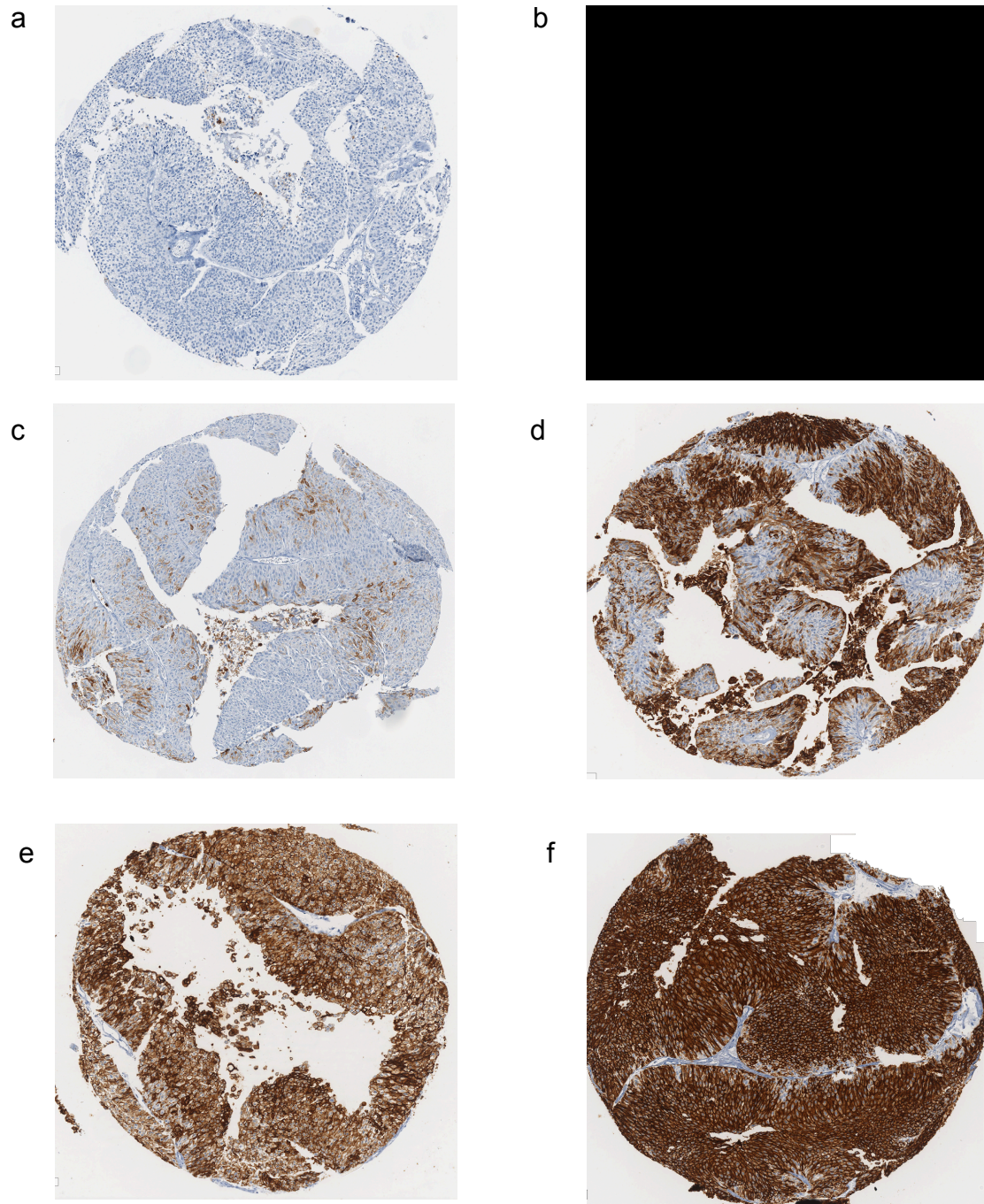
CD15:

La reacción positiva para CD15 presentó un expresión particular que en principio estaba pensado para células inflamatorias, pero fue llamativo el hecho de observar una mayor expresión a nivel de las células tumorales. Esta expresión de CD15 ha sido descrita en proliferaciones tumorales glandulares (adenocarcinoma), pero tras revisar de manera exhaustiva nuestros casos con expresión de CD15, todos mostraban diferenciación urotelial pura y no fue posible detectar componente de diferenciación glandular en ninguno de ellos.

La expresión fue focal a nivel del compartimiento basal, intermedio, superficial o incluso de forma heterogénea y en otros casos presentó una expresión de forma homogénea débil, media o intensa. Estas dos formas de expresión homogénea o focal incluían el epitelio y el estroma. Al final los 7 patrones posibles de expresión fueron categorizados en: ausente, focal y homogéneo.



**Figura 27.** Cilindros del TMA vesical con tinción del anticuerpo anti-CD15 demostrando (a) reacción negativa para CD15, (b) expresión de CD15 focal basal, (c) expresión focal media, (d) focal superficial, (e) homogénea medio y (f) homogénea intensa (60X)



El anticuerpo utilizado fue anti-CD15 mouse monoclonal primary antibody Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona (clone MMA).

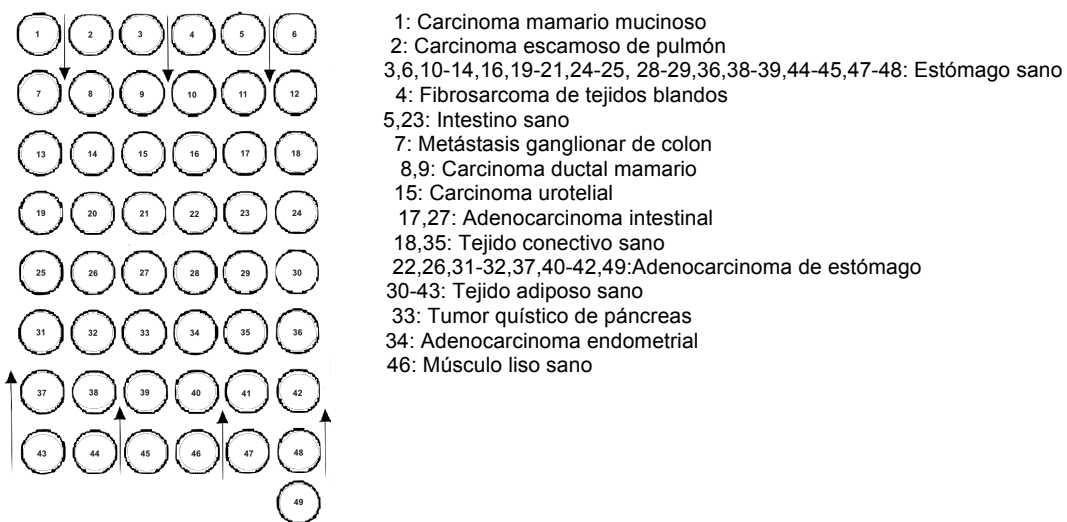
#### 4.7.1 Controles inmunohistoquímicos de MICA

En el caso de MICA se realizó un control más exhaustivo para determinar la precisión de la reacción inmunohistoquímica. A pesar de la extensa evidencia comunicada en la literatura en la que se describe la positividad de MICA en la mayoría de tumores (con distintos grados de positividad, de acuerdo al tipo de tejido), decidimos realizar un control externo (negativo y positivo) de dicha reacción inmunohistoquímica y posteriormente un control interno (positivo y negativo).

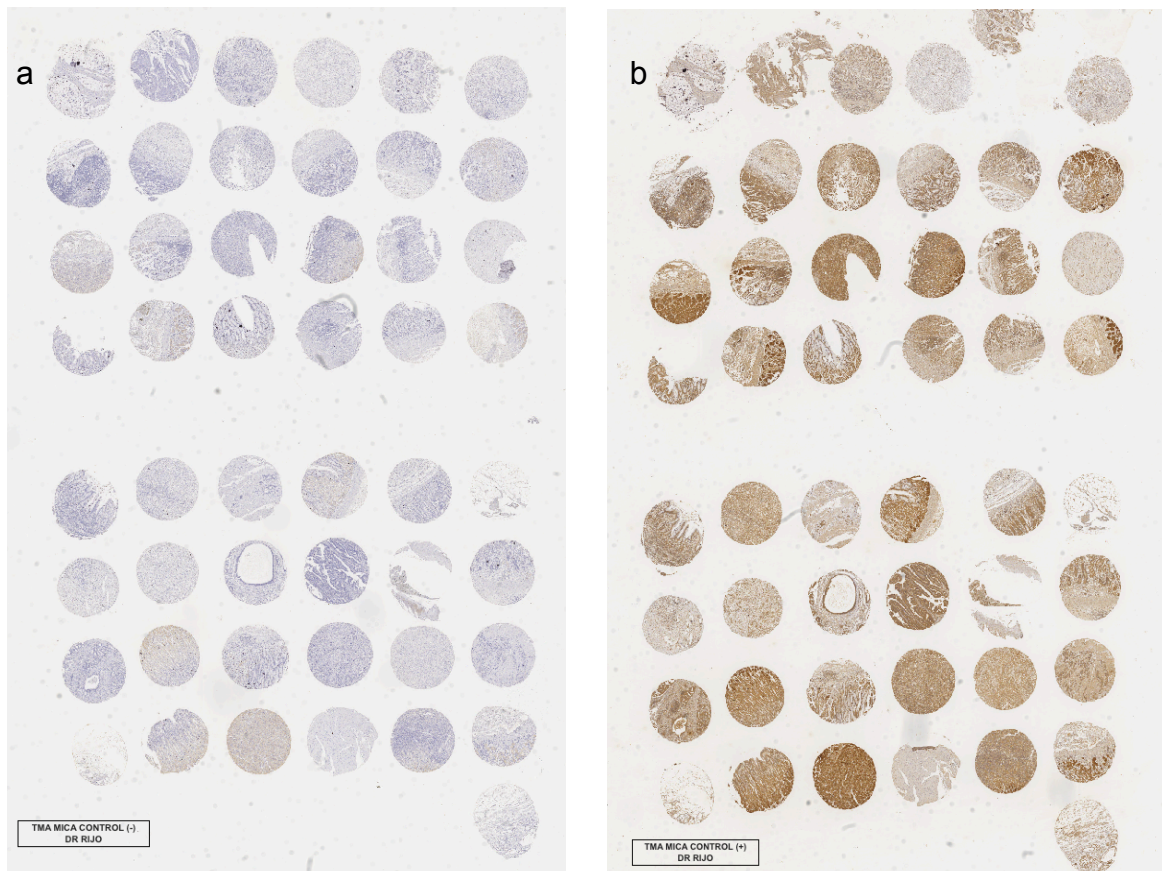
##### 4.7.1.1 Control externo de MICA

Para el control externo diseñamos de forma específica un mini-TMA con 49 cores de diferentes muestras histológicas de tejido sano y neoplásico procedente de diversos órganos (*Figura 28 y 29*).

**Figura 28.** Mapa de distribución de los casos en el TMA multiorgánico diseñado para el control externo de la expresión de MICA y procedencia de las muestras.



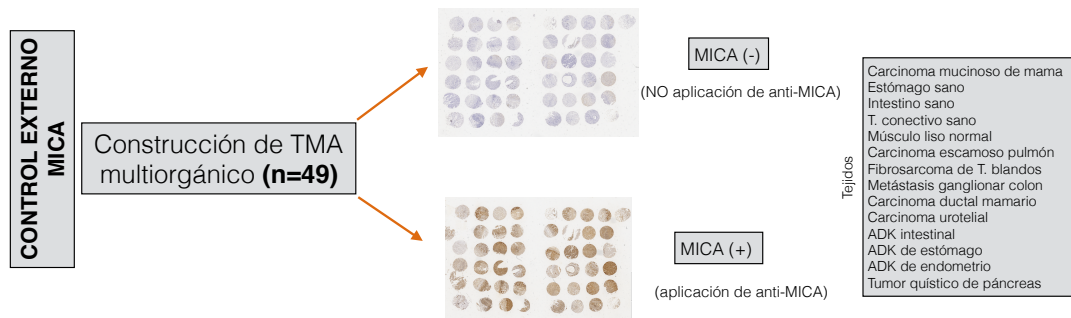
**Figura 29.** Cilindros del TMA de múltiples tejidos creado para el control externo de MICA, (a) control externo negativo de MICA y (b) control externo positivo de MICA.



El control externo (-) estaba constituido por el mini-TMA con las 49 muestras de tejidos de diversos órganos sin aplicar el anticuerpo anti-MICA (*Figura 29a*). Mientras que el control externo (+) se realizó en otro corte del mini-TMA al cual se le aplicó el anticuerpo anti-MICA (*Figura 29b*).



**Figura 30.** Control externo de MICA mediante un TMA multiorgánico.



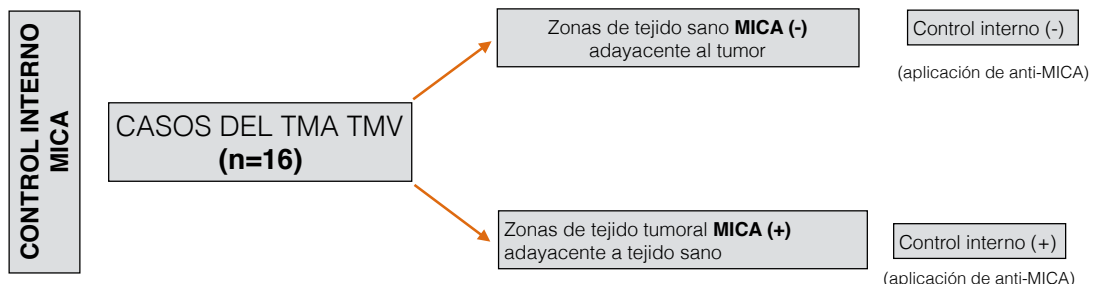
En el control de MICA positivo, todos los tejidos presentaron expresión de MICA con intensidad variable en cada caso.

#### 4.7.1.2 Control interno de MICA

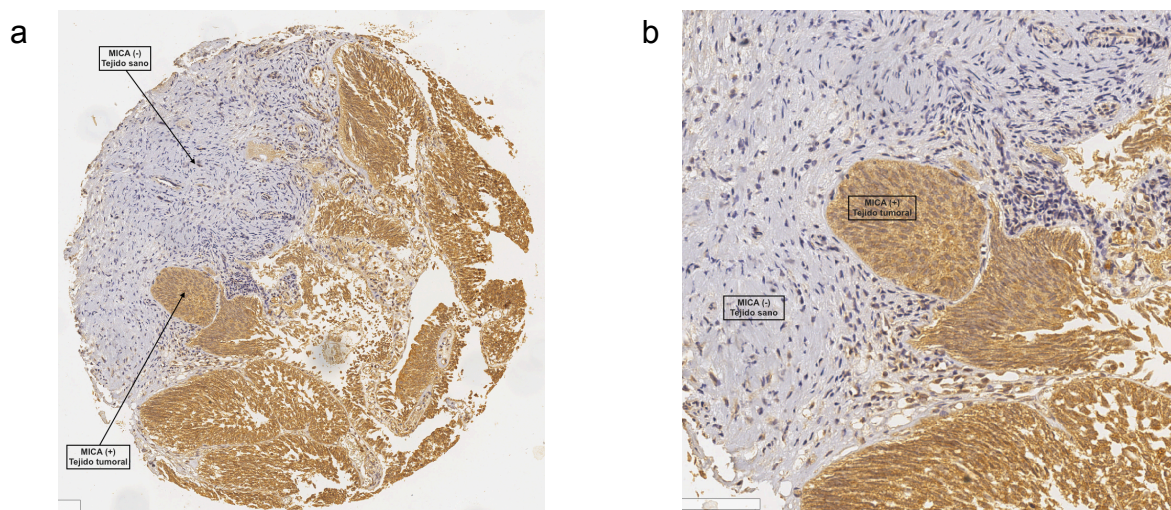
Para el control interno de MICA utilizamos zonas del TMA de TMV negativas a pesar de que en nuestro TMA la totalidad de las muestras fueron positivas para MICA de forma "homogénea" en cada caso, si bien de diferente intensidad de acuerdo al caso. En 16/195 cores se detectó alguna zona de tejido sano adyacente al tumor, que resultaron negativas para MICA. De modo que el control interno de MICA (-) estaba constituido por estas zonas de tejido sano, fundamentalmente fibroblastos del estroma y fibras colágenas que en general no expresan MICA. En condiciones normales, las áreas de tejido tumoral, con independencia de la intensidad, deben demostrar expresión de MICA y este fue por lo tanto el control interno de MICA (+). También podría utilizarse como control interno positivo el infiltrado linfocitario, pero su presencia en los cores era menos constante que la del tejido tumoral (en los mismos cores del TMA de TMV que incluían estas zonas de tejido sano negativo). En la *Figura 31* se observa el diseño del control interno para

MICA (+) y (-) y en la *FIGURA 32*, podemos observar un caso en el cual se presentaba esta condición.

**Figura 31.** Diseño del control interno de MICA.



**Figura 32.** Detalle de un caso de control interno de MICA, (a) control interno de MICA (+) en tejido tumoral y MICA (-) en tejido adyacente sano (60X) (b) detalle a mayor aumento (140X).



#### 4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

##### 4.8.1 Variables analizadas

##### 4.8.1a Variables clínicas

Tabla 22. Variables clínicas en el estudio.

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE
<b>Edad</b>	continua (años)
<b>Sexo</b>	dicotómica (1=hombre, 2=mujer)
<b>Fecha del diagnóstico</b>	discreta (dd/mm/aa)
<b>Tabaquismo</b>	cualitativa (0=nunca, 1= $\leq$ 20 cig/día, 2= $>$ 20 cig/día, 3= exfumador desde hace $\geq$ 1 año)
<b>Recidiva</b>	dicotómica (0=no, 1=si)
<b>Número de recidivas</b>	continua. Mediana (Q1,Q3)
<b>Tiempo a recidiva</b>	continua (meses)
<b>Progresión</b>	cualitativa (0=no, 1=T1, 2= $\Rightarrow$ T1)
<b>Tiempo a progresión</b>	continua (meses)
<b>Instilaciones endovesicales</b>	cualitativa (0=no, 1=BCG, 2=QT)

##### 4.8.1b Variables anatomopatológicas

Tabla 23. Variables patológicas en el estudio.

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE
<b>Tamaño tumoral</b>	dicotómica (1= $<$ 3cm, 2= $\geq$ 3cm)
<b>Estadio tumoral</b>	cualitativa (1=pTa, 2=pT1, 3=pT2)
<b>Grado OMS 1973</b>	cualitativa (1=G1/bajo grado, 2=G2/grado intermedio, 3=G3/alto grado)
<b>Grado OMS 2004</b>	dicotómica (1=bajo grado, 2=alto grado)
<b>Multiplicidad</b>	dicotómica (1=único, 2=múltiple)

##### 4.8.1c Variables de expresión inmunohistoquímica de los marcadores moleculares

Tabla 24. Variables moleculares en el estudio.

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE
<b>MICA</b>	dicotómica (1=débil, 2=intenso)
<b>NKG2D</b>	dicotómica (1=débil, 2=intenso)
<b>CD8 epiteliales</b>	cuantitativa (número absoluto de células)
<b>CD8 estroma</b>	cualitativa (0=no, 1=1-9, 2=10-30, 3= $>$ 30)
<b>CD4 epiteliales</b>	cuantitativa (número absoluto de células)
<b>CD8 estroma</b>	cualitativa (0=no, 1=1-9, 2=10-30, 3= $>$ 30)
<b>CD68 epiteliales</b>	cualitativa (0=no, 1=escaso, 2=abundante, 3=difuso)
<b>CD68 estroma</b>	cualitativa (0=no, 1=1-9, 2=10-30, 3= $>$ 30)
<b>CD56 epiteliales</b>	cuantitativa (número absoluto de células)
<b>CD56 estroma</b>	cualitativa (0=no, 1=1-9, 2=10-30, 3= $>$ 30)
<b>CD34</b>	cuantitativa (número absoluto de vasos)
<b>CD117 estroma</b>	cuantitativa (número absoluto de células)
<b>CD117 epitelio</b>	cuantitativa (número absoluto de células)
<b>CD15</b>	cualitativa (0=no, 1=focal, 2=homogéneo)



## 4.8.2 Metodología estadística

### 4.8.2.1 Creación de bases de datos y procesamiento de datos

La base de datos fue creada con Microsoft® Excel® para Mac 2011 al crear el TMA, introduciendo todas las variables. Después se importó a IBM® SPSS® Statistics versión 24 para Mac para categorizar las distintas variables.

### 4.8.2.2 Análisis estadístico

Para las variables que en nuestro estudio siguen una distribución normal utilizamos la media y la desviación estándar. Mientras que si no siguen una distribución normal utilizamos la mediana, primer y tercer cuartil.

Para comparar las diferencias entre grupos en el caso de las variables que siguen una distribución normal con dos grupos fue usado el test de la t-Student y para más de dos grupos el análisis de varianza (ANOVA). El p.valor se corrige mediante el test de Tukey para comparaciones múltiples.

En el caso de las variables que no siguen una distribución normal se utiliza el test U de Mann-Whitney para comparar dos grupos y el test de Kruskal-Wallis para comparar más de dos grupos corrigiendo mediante la corrección de Benjamin & Hochberg.

En el caso de las variables categóricas se describen con frecuencia y porcentaje; para comparar los grupos se utiliza el test de Chi-cuadrado.

Se utiliza la regresión de Cox cuando tenemos tiempo de seguimiento y la regresión logística en caso de que no tengamos.

A partir de la base de datos creada se importaron todos los datos al software estadístico R (versión 3.3.2. Referencia: R A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/f>) para la realización de todos los análisis estadísticos.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análisis descriptivo general:

Se analizaron todas las características de la cohorte de 195 pacientes intervenidos de RTU de TMV primario en el período de 1998 a 2003, de los cuales 173 casos fueron TMVNMI y 22 casos TMVMI.

En la *Tabla 25* se describen las variables clínicas y anatomopatológicas de los pacientes con TMVNMI y TMVMI. Existen características que sólo están presentes en los TMVNMI como el grupo de riesgo, estadio, grado histológico, recidiva, progresión e instilaciones vesicales.

La edad media fue de 68.4 años (en los TMVNMI de 67.8 años y en los TMVMI de 72.4 años). Con un predominio de hombres (85.6 %) y mujeres en sólo un 14.4 %.

Un 55.3 % de los pacientes eran fumadores, un 28 % ex-fumadores y un 16 % nunca había fumado.

En los TMVNMI el estadio patológico más frecuente fue pTa (64.7 %) y el 35.3 % fue pT1, siendo el grado de diferenciación histológica predominante los tumores de alto grado con un 74 % de los casos. En cuanto al número de tumores presentes, la presencia de un tumor único fue lo más frecuente (72.3 %). En relación al tamaño tumoral en el 66.2 % de los casos el tumor fue de < 3 cm y en el 33.8 % de los casos fue >3 cm.

El grupo de riesgo más frecuente fue el de alto riesgo (75 %).

El 76.91 % de los casos de TMVNMI recibieron tratamiento con instilaciones endovesicales (con BCG el 69.4 % y con QT el 7.51%).

El 50.9% de los casos de TMVNMI presentaron recidiva a 78 meses (más frecuente la recidiva única en el 50 %) y el 17.34 % de los casos presentó progresión.

**Tabla 25.** Variables clínicas y anatomopatológicas de los pacientes con TMV del estudio.

	[ALL] N=195	TMVNMI N=173	TMVMI N=22	OR	p.ratio	p.valor	N
Edad	68.4 (11.4)	67.8 (11.4)	72.4 (11.6)	1.04 [1.00;1.08]	0.080	0.093	195
Edad:						0.140	195
35-59	42 (21.5%)	40 (23.1%)	2 (9.09%)	Ref.	Ref.		
60-74	89 (45.6%)	80 (46.2%)	9 (40.9%)	2.12 [0.50;15.8]	0.330		
>75	64 (32.8%)	53 (30.6%)	11 (50.0%)	3.88 [0.95;28.6]	0.059		
Sexo: Hombre	167 (85.6%)	149 (86.1%)	18 (81.8%)	Ref.	Ref.	0.530	195
Tabaco:						0.288	190
nunca	31 (16.3%)	27 (16.0%)	4 (19.0%)	Ref.	Ref.		
≤20	21 (11.1%)	21 (12.4%)	0 (0.00%)	. [.;]	.		
>20	84 (44.2%)	75 (44.4%)	9 (42.9%)	. [.;]	.		
exfumador	54 (28.4%)	46 (27.2%)	8 (38.1%)	. [.;]	.		
Fumador	105 (55.3%)	96 (56.8%)	9 (42.9%)	0.57 [0.22;1.44]	0.238	0.327	190
Tabaco categorizada:						0.429	190
No fumador	31 (16.3%)	27 (16.0%)	4 (19.0%)	Ref.	Ref.		
Fumador	105 (55.3%)	96 (56.8%)	9 (42.9%)	0.62 [0.18;2.54]	0.482		
Ex-fumador	54 (28.4%)	46 (27.2%)	8 (38.1%)	1.15 [0.32;4.84]	0.832		
Tamaño del tumor:						0.614	195
<3 cm	129 (66.2%)	116 (67.1%)	13 (59.1%)	Ref.	Ref.		
>3 cm	66 (33.8%)	57 (32.9%)	9 (40.9%)	1.41 [0.55;3.51]	0.465		
Estadio tumoral:						<0.001	195
Ta	112 (57.4%)	112 (64.7%)	0 (0.00%)	Ref.	Ref.		
T1	61 (31.3%)	61 (35.3%)	0 (0.00%)	. [.;]	.		
T2	22 (11.3%)	0 (0.00%)	22 (100%)	. [.;]	.		
Grado (OMS 1973):						<0.001	195
G1 bajo grado	45 (23.1%)	45 (26.0%)	0 (0.00%)	Ref.	Ref.		
G2 grado intermedio	79 (40.5%)	79 (45.7%)	0 (0.00%)	. [.;]	.		
G3 alto grado	71 (36.4%)	49 (28.3%)	22 (100%)	. [.;]	.		
Grado (OMS 2004):						0.014	195
bajo grado	45 (23.1%)	45 (26.0%)	0 (0.00%)	Ref.	Ref.		
alto grado	150 (76.9%)	128 (74.0%)	22 (100%)	. [.;]	.		
Multiplicidad:						0.421	195
único	141 (72.3%)	123 (71.1%)	18 (81.8%)	Ref.	Ref.		
múltiple	54 (27.7%)	50 (28.9%)	4 (18.2%)	0.56 [0.15;1.62]	0.304		
Grupo de riesgo:						.	173
Bajo	27 (15.6%)	27 (15.6%)	0 (.)	Ref.	Ref.		
Intermedio	15 (8.67%)	15 (8.67%)	0 (.)	. [.;]	.		
Alto	131 (75.7%)	131 (75.7%)	0 (.)	. [.;]	.		

TMV: Tumor vesical, TMVNMI: Tumor vesical no músculo-infiltrante, TMVMI: Tumor vesical músculo-infiltrante  
 OMS: Organización mundial de la salud  
 Continúa en la siguiente página---->

	[ALL] N=195	TMVNMI N=173	TMVMI N=22	OR	p.ratio	p.overall	N
Instilaciones vesicales:							173
no	40 (23.1%)	40 (23.1%)	0 (%)	Ref.	Ref.		
BCG	120 (69.4%)	120 (69.4%)	0 (%)	. [.;]	.		
QT	13 (7.51%)	13 (7.51%)	0 (%)	. [.;]	.		
Recidiva (78 meses)	88 (50.9%)	88 (50.9%)	0 (%)	. [.;]	.		173
Número de recidivas:							88
1	44 (50.0%)	44 (50.0%)	0 (%)	Ref.	Ref.		
2	24 (27.3%)	24 (27.3%)	0 (%)	. [.;]	.		
≥3	20 (22.7%)	20 (22.7%)	0 (%)	. [.;]	.		
Progresión:							173
no	143 (82.7%)	143 (82.7%)	0 (%)	Ref.	Ref.		
T1	14 (8.09%)	14 (8.09%)	0 (%)	. [.;]	.		
>T1	16 (9.25%)	16 (9.25%)	0 (%)	. [.;]	.		

BCG: bacilo de Calmette-Guérin, QT: quimioterapia

**Tabla 26.** Variables moleculares de los pacientes con TMV del estudio.

	[ALL] N=195	TMVNMI N=173	TMVMI N=22	OR	p.ratio	p.overall	N
MICA						0.295	175
+ (débil)	124 (70.9%)	111 (72.5%)	13 (59.1%)	Ref.	Ref.		
++ (intenso)	51 (29.1%)	42 (27.5%)	9 (40.9%)	1.83 [0.70;4.61]	0.211		
NKG2D						0.110	165
+ (débil)	61 (37.0%)	49 (34.3%)	12 (54.5%)	Ref.	Ref.		
++ (intenso)	104 (63.0%)	94 (65.7%)	10 (45.5%)	0.44 [0.17;1.10]	0.077		
CD8 epitelial	11.5 [3.00;34.8]	10.0 [2.50;31.0]	25.0 [8.00;51.0]	1.03 [1.00;1.05]	0.019	0.020	156
CD8 estroma:						0.062	157
no	7 (4.46%)	7 (5.15%)	0 (0.00%)	Ref.	Ref.		
1-9	66 (42.0%)	61 (44.9%)	5 (23.8%)	. [.;]	.		
10-30	29 (18.5%)	26 (19.1%)	3 (14.3%)	. [.;]	.		
>30	55 (35.0%)	42 (30.9%)	13 (61.9%)	. [.;]	.		
CD4 epitelial	10.5 [2.75;30.0]	9.00 [2.00;22.0]	49.0 [12.0;51.0]	1.06 [1.03;1.08]	<0.001	<0.001	152
CD4 estroma:						0.002	152
no	4 (2.63%)	4 (3.05%)	0 (0.00%)	Ref.	Ref.		
1-9	38 (25.0%)	38 (29.0%)	0 (0.00%)	. [.;]	.		
10-30	34 (22.4%)	31 (23.7%)	3 (14.3%)	. [.;]	.		
>30	76 (50.0%)	58 (44.3%)	18 (85.7%)	. [.;]	.		
CD68 epitelial						<0.001	158
no	1 (0.63%)	1 (0.73%)	0 (0.00%)	Ref.	Ref.		
escaso	68 (43.0%)	67 (48.9%)	1 (4.76%)	. [.;]	.		
abundante	45 (28.5%)	43 (31.4%)	2 (9.52%)	. [.;]	.		
difuso	44 (27.8%)	26 (19.0%)	18 (85.7%)	. [.;]	.		
CD68 estroma:						<0.001	158
1-9	38 (24.1%)	38 (27.7%)	0 (0.00%)	Ref.	Ref.		
10-30	45 (28.5%)	45 (32.8%)	0 (0.00%)	. [.;]	.		
>30	75 (47.5%)	54 (39.4%)	21 (100%)	. [.;]	.		
CD56 epitelial	3.00 [0.00;6.00]	2.00 [0.00;4.00]	8.00 [3.00;16.0]	1.08 [1.03;1.13]	0.001	<0.001	130
CD56 estroma:						0.003	131
no	24 (18.3%)	22 (20.0%)	2 (9.52%)	Ref.	Ref.		
1-9	85 (64.9%)	74 (67.3%)	11 (52.4%)	1.54 [0.37;11.5]	0.585		
10-30	17 (13.0%)	13 (11.8%)	4 (19.0%)	3.18 [0.51;28.7]	0.218		
>30	5 (3.82%)	1 (0.91%)	4 (19.0%)	31.5 [2.96;1112]	0.003		
CD34	52.0 [35.2;84.8]	50.0 [31.0;83.0]	55.0 [48.0;95.0]	1.00 [0.99;1.01]	0.441	0.089	158
CD117 estroma	4.00 [1.00;11.0]	3.00 [1.00;10.0]	9.00 [5.00;17.5]	1.03 [0.99;1.07]	0.201	0.019	137
CD117 epitelial	3.00 [0.00;7.00]	3.00 [0.00;8.00]	0.00 [0.00;4.00]	0.80 [0.64;0.98]	0.034	0.014	139

	[ALL] N=195	TMVNMI N=173	TMVMI N=22	OR	p.ratio	p.overall	N
CD15:						0.020	168
no	41 (24.4%)	34 (23.3%)	7 (31.8%)	Ref.	Ref.		
focal basal	10 (5.95%)	10 (6.85%)	0 (0.00%)	. [.;]	.		
focal intermedio	15 (8.93%)	11 (7.53%)	4 (18.2%)	. [.;]	.		
focal superficial	14 (8.33%)	13 (8.90%)	1 (4.55%)	. [.;]	.		
focal heterogéneo	14 (8.33%)	9 (6.16%)	5 (22.7%)	. [.;]	.		
homogéneo débil	15 (8.93%)	13 (8.90%)	2 (9.09%)	. [.;]	.		
homogéneo medio	32 (19.0%)	29 (19.9%)	3 (13.6%)	. [.;]	.		
homogéneo intenso	27 (16.1%)	27 (18.5%)	0 (0.00%)	. [.;]	.		
CD15 categorizada:						0.094	168
No	41 (24.4%)	34 (23.3%)	7 (31.8%)	Ref.	Ref.		
Focal	53 (31.5%)	43 (29.5%)	10 (45.5%)	1.12 [0.38;3.44]	0.834		
Homogéneo	74 (44.0%)	69 (47.3%)	5 (22.7%)	0.36 [0.10;1.23]	0.103		

La *Tabla 26* muestra las variables moleculares de los pacientes con TMV en el estudio. En el 100% de los casos de TMV MICA fue positivo (débil/+ en el 72.5 % de los casos e intenso/++ en el 27.5 % de los casos de TMVNMI), a diferencia de los TMVMI en los cuales la categoría intenso/++ estuvo presente en el 40.9 % de los casos.

Los valores de NKG2D en todos los TMV fueron débil/+ en el 37 % de los casos e intenso/++ en el 63% de los casos. Siendo diferente su relación en los TMVNMI (débil/+ en 34.3% de los casos e intenso/++ en 65.7 % de los casos) y en los TMVMI una relación inversa (+/débil en el 54.5 % de los casos e intenso/++ en el 45.5 % de los casos).

Los valores del resto de variables detectados a nivel de epitelio y estroma CD4, CD68, CD56, CD34, CD117 y CD15 también se presentan en la misma tabla.

La variable CD15 se valoró inicialmente como ausente, focal basal, focal intermedia, focal heterogénea, homogéneo débil, homogéneo medio y homogéneo intenso, pero posteriormente fue categorizada en ausente, focal y homogéneo para facilitar los análisis posteriores.

## 5.2 Análisis descriptivo según sexo:

Existe un predominio de hombres (85.6 %) sobre mujeres (14.4 %) en nuestra serie. En la *Tabla 27* podemos observar un análisis descriptivo según el sexo.

**Tabla 27.** Análisis descriptivo según sexo en los pacientes con TMV del estudio.

	[ALL] N=195	Hombre N=167	Mujer N=28	OR	p.ratio	p.overall	N
Edad	68.4 (11.4)	67.7 (10.8)	72.2 (14.3)	1.04 [1.00;1.08]	0.054	0.118	195
Edad categorizada:						0.025	195
35-59	42 (21.5%)	36 (21.6%)	6 (21.4%)	Ref.	Ref.		
60-74	89 (45.6%)	82 (49.1%)	7 (25.0%)	0.51 [0.16;1.74]	0.275		
>75	64 (32.8%)	49 (29.3%)	15 (53.6%)	1.80 [0.65;5.58]	0.261		
Tabaco:						<0.001	190
nunca	31 (16.3%)	9 (5.56%)	22 (78.6%)	Ref.	Ref.		
≤ 20	21 (11.1%)	19 (11.7%)	2 (7.14%)	. [.;]	.		
> 20	84 (44.2%)	80 (49.4%)	4 (14.3%)	. [.;]	.		
exfumador	54 (28.4%)	54 (33.3%)	0 (0.00%)	. [.;]	.		
Fumador	105 (55.3%)	99 (61.1%)	6 (21.4%)	0.18 [0.06;0.44]	<0.001	<0.001	190
Tabaco categorizada:						<0.001	190
No fumador	31 (16.3%)	9 (5.56%)	22 (78.6%)	Ref.	Ref.		
Fumador	105 (55.3%)	99 (61.1%)	6 (21.4%)	. [.;]	.		
Ex-fumador	54 (28.4%)	54 (33.3%)	0 (0.00%)	. [.;]	.		
TMVMI	22 (11.3%)	18 (10.8%)	4 (14.3%)	1.41 [0.37;4.24]	0.579	0.530	195
Tamaño del tumor:						0.192	195
<3 cm	129 (66.2%)	114 (68.3%)	15 (53.6%)	Ref.	Ref.		
>3 cm	66 (33.8%)	53 (31.7%)	13 (46.4%)	1.86 [0.81;4.22]	0.141		
Estadio tumoral:						0.799	195
Ta	112 (57.4%)	97 (58.1%)	15 (53.6%)	Ref.	Ref.		
T1	61 (31.3%)	52 (31.1%)	9 (32.1%)	1.13 [0.44;2.73]	0.799		
T2	22 (11.3%)	18 (10.8%)	4 (14.3%)	1.46 [0.37;4.67]	0.555		
Grado (OMS 1973):						0.609	195
G1 bajo grado	45 (23.1%)	38 (22.8%)	7 (25.0%)	Ref.	Ref.		
G2 grado intermedio	79 (40.5%)	70 (41.9%)	9 (32.1%)	0.70 [0.24;2.13]	0.516		
G3 alto grado	71 (36.4%)	59 (35.3%)	12 (42.9%)	1.09 [0.40;3.23]	0.863		
Grado (OMS 2004):						0.985	195
bajo grado	45 (23.1%)	38 (22.8%)	7 (25.0%)	Ref.	Ref.		
alto grado	150 (76.9%)	129 (77.2%)	21 (75.0%)	0.87 [0.36;2.39]	0.779		
Multiplicidad:						0.426	195
único	141 (72.3%)	123 (73.7%)	18 (64.3%)	Ref.	Ref.		
múltiple	54 (27.7%)	44 (26.3%)	10 (35.7%)	1.56 [0.64;3.60]	0.317		
Instilaciones vesicales:						0.286	173
no	40 (23.1%)	33 (22.1%)	7 (29.2%)	Ref.	Ref.		
BCG	120 (69.4%)	103 (69.1%)	17 (70.8%)	. [.;]	.		
QT	13 (7.51%)	13 (8.72%)	0 (0.00%)	. [.;]	.		
Recidiva	88 (50.9%)	75 (50.3%)	13 (54.2%)	1.16 [0.48;2.83]	0.735	0.898	173
Número de recidivas:						0.791	88
1	44 (50.0%)	38 (50.7%)	6 (46.2%)	Ref.	Ref.		
2	24 (27.3%)	21 (28.0%)	3 (23.1%)	0.93 [0.17;4.03]	0.921		
≥3	20 (22.7%)	16 (21.3%)	4 (30.8%)	1.59 [0.35;6.54]	0.533		
Tiempo a 1º recidiva (meses)	16.0 [8.00;28.0]	16.0 [8.00;28.0]	13.0 [8.00;28.0]	0.99 [0.95;1.03]	0.673	0.791	88



	[ALL] N=195	Hombre N=167	Mujer N=28	OR	p.ratio	p.overall	N
Progresión:						0.377	173
No	143 (82.7%)	125 (83.9%)	18 (75.0%)	Ref.	Ref.		
T1	14 (8.09%)	12 (8.05%)	2 (8.33%)	1.22 [0.16;5.08]	0.814		
>T1	16 (9.25%)	12 (8.05%)	4 (16.7%)	2.35 [0.58;7.74]	0.210		
Tiempo a progresión (meses)	20.5 [9.50;54.8]	26.5 [10.5;48.2]	12.0 [8.00;58.8]	1.00 [0.97;1.03]	0.892	0.568	30
Riesgo:						0.765	173
Bajo	27 (15.6%)	22 (14.8%)	5 (20.8%)	Ref.	Ref.		
Intermedio	15 (8.67%)	13 (8.72%)	2 (8.33%)	0.71 [0.08;4.01]	0.709		
Alto	131 (75.7%)	114 (76.5%)	17 (70.8%)	0.65 [0.22;2.18]	0.456		
MICA						0.811	175
+ (débil)	124 (70.9%)	106 (70.2%)	18 (75.0%)	Ref.	Ref.		
++ (intenso)	51 (29.1%)	45 (29.8%)	6 (25.0%)	0.80 [0.27;2.06]	0.654		
NKG2D						0.352	165
+ (débil)	61 (37.0%)	50 (35.2%)	11 (47.8%)	Ref.	Ref.		
++ (intenso)	104 (63.0%)	92 (64.8%)	12 (52.2%)	0.59 [0.24;1.48]	0.259		
CD8 epiteliales	11.5 [3.00;34.8]	11.0 [3.00;33.5]	14.0 [3.00;51.0]	1.00 [0.98;1.03]	0.688	0.675	156
CD8 estroma:						0.846	157
no	7 (4.46%)	6 (4.41%)	1 (4.76%)	Ref.	Ref.		
1-9	66 (42.0%)	58 (42.6%)	8 (38.1%)	0.76 [0.10;21.4]	0.823		
10-30	29 (18.5%)	26 (19.1%)	3 (14.3%)	0.65 [0.06;21.1]	0.759		
>30	55 (35.0%)	46 (33.8%)	9 (42.9%)	1.07 [0.15;30.1]	0.958		
CD4 epiteliales	10.5 [2.75;30.0]	9.00 [2.25;22.0]	30.0 [5.25;50.5]	1.03 [1.01;1.06]	0.012	0.029	152
CD4 estroma:						0.562	152
no	4 (2.63%)	3 (2.31%)	1 (4.55%)	Ref.	Ref.		
1-9	38 (25.0%)	34 (26.2%)	4 (18.2%)	0.34 [0.03;11.5]	0.473		
10-30	34 (22.4%)	30 (23.1%)	4 (18.2%)	0.39 [0.03;13.1]	0.522		
>30	76 (50.0%)	63 (48.5%)	13 (59.1%)	0.58 [0.06;17.5]	0.684		
CD68 epiteliales:						0.185	158
no	1 (0.63%)	1 (0.74%)	0 (0.00%)	Ref.	Ref.		
escaso	68 (43.0%)	61 (45.2%)	7 (30.4%)	. [.;]	.		
abundante	45 (28.5%)	34 (25.2%)	11 (47.8%)	. [.;]	.		
difuso	44 (27.8%)	39 (28.9%)	5 (21.7%)	. [.;]	.		
CD68 estroma:						0.887	158
1-9	38 (24.1%)	33 (24.4%)	5 (21.7%)	Ref.	Ref.		
10-30	45 (28.5%)	39 (28.9%)	6 (26.1%)	1.01 [0.27;3.92]	0.987		
>30	75 (47.5%)	63 (46.7%)	12 (52.2%)	1.24 [0.41;4.26]	0.714		
CD56 epiteliales	3.00 [0.00;6.00]	2.00 [0.00;5.00]	3.50 [1.00;7.25]	1.03 [0.99;1.07]	0.154	0.191	130
CD56 estroma:						0.972	131
no	24 (18.3%)	20 (18.0%)	4 (20.0%)	Ref.	Ref.		
1-9	85 (64.9%)	72 (64.9%)	13 (65.0%)	0.88 [0.27;3.53]	0.849		
10-30	17 (13.0%)	15 (13.5%)	2 (10.0%)	0.69 [0.08;4.31]	0.703		
>30	5 (3.82%)	4 (3.60%)	1 (5.00%)	1.33 [0.04;13.7]	0.837		
CD34	52.0 [35.2;84.8]	52.0 [35.0;87.0]	50.0 [38.0;75.5]	1.00 [0.99;1.01]	0.564	0.693	158
CD117 estroma	4.00 [1.00;11.0]	4.00 [1.00;11.0]	4.00 [3.00;10.0]	0.99 [0.95;1.04]	0.804	0.610	137
CD117 epitelial	3.00 [0.00;7.00]	2.00 [0.00;6.00]	4.00 [0.75;7.00]	1.01 [0.94;1.09]	0.715	0.341	139
CD15 categorizada:						0.069	168
No	41 (24.4%)	32 (22.1%)	9 (39.1%)	Ref.	Ref.		
Focal	53 (31.5%)	50 (34.5%)	3 (13.0%)	0.22 [0.04;0.83]	0.024		
Homogéneo	74 (44.0%)	63 (43.4%)	11 (47.8%)	0.62 [0.23;1.71]	0.351		

TMVNMI: Tumor vesical no músculo-infiltrante, BCG: bacilo de Calmette-Guérin

#### Edad:

La edad media de la mujeres fue de 72.2 años y la de los hombres de 67.7 años, siendo el 53.6 % de las mujeres mayores de 75 años.

#### TMVMI:

El TMVMI en el grupo de mujeres fue de un 14.3 % frente a un 10.8% en el grupo de los hombres.

#### Tamaño tumoral:

Con respecto al tamaño del tumor, las mujeres presentaron tumores de mayor tamaño un 46.4 % de las mujeres presentaron tumores >3 cm. en comparación con un 31.7 % de los hombres.

#### Estadio tumoral:

Al comparar el estadio tumoral entre ambos sexos fue similar, la mayoría presentó tumores pTa (58.4 % de los hombres y 53.6 % de las mujeres) y también en ambos sexos los tumores de alto grado fueron los más frecuentes (77.2% de los hombres y 75 % de las mujeres).

#### Multiplicidad:

Los tumores únicos fueron los más frecuentes en ambos sexos (en 73.7% de los hombres y en 64.3% de las mujeres).

#### Recidiva:

En cuanto a la recidiva las mujeres presentaron 54.2 % de recidivas vs. 50.3 % en los hombres y el tiempo medio a la primera recidiva en las mujeres fue más corto; 13 meses frente a 16 meses en los hombres.

### Progresión:

La progresión del tumor fue mayor en las mujeres 25% frente a un 16% en los hombres, siendo el tiempo medio hasta la progresión en las mujeres menor, de 12 meses frente a 26.5 meses en los hombres.

### MICA:

No se observaron diferencias entre el sexo y la expresión de MICA. En ambos sexos predominó la expresión de MICA +/-débil (en el 70.2 % de los hombres vs el 75 % de las mujeres).

**Tabla 28.** Relación entre el sexo y la expresión de MICA en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=175	Hombre N=151	Mujer N=24	OR	p.ratio	p.valor	N
MICA:						0.811	175
+ (débil)	124 (70.9%)	106 (70.2%)	18 (75.0%)	Ref.	Ref.		
++ (intensa)	51 (29.1%)	45 (29.8%)	6 (25.0%)	0.80 [0.27;2.06]	0.654		

### NKG2D:

Al comparar el sexo con la expresión de NKG2D tampoco se observaron diferencias. En ambos sexos predominó la expresión de NKG2D ++/intensa (en 64.8 % de los hombres vs 52.2 % de las mujeres).

**Tabla 29.** Relación entre el sexo y la expresión de NKG2D en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=175	Hombre N=151	Mujer N=24	OR	p.ratio	p.valor	N
NKG2D:						0.352	165
+ (débil)	61 (37.0%)	50 (35.2%)	11 (47.8%)	Ref.	Ref.		
++ (intensa)	104 (63.0%)	92 (64.8%)	12 (52.2%)	0.59 [0.24;1.48]	0.259		

## CD4:

Con respecto a las variables moleculares no se objetivaron diferencias significativas al comparar por sexos en el análisis univariado, excepto para CD4 epiteliales ( $p=0.029$ ) que en la mujeres fue más elevado (valor medio de 30.0 vs 9.0) . La expresión de CD4 a nivel del estroma fue similar en ambos sexos.

**Tabla 30.** Relación entre el sexo y la expresión de CD4 en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=152	Hombre N=130	Mujer N=22	OR	p.ratio	p.valor	N
CD4 epiteliales	10.5 [2.75;30.0]	9.00 [2.25;22.0]	30.0 [5.25;50.5]	1.03 [1.01;1.06]	0.012	0.029	152
CD4 estroma:						0.562	152
no	4 (2.63%)	3 (2.31%)	1 (4.55%)	Ref.	Ref.		
1-9	38 (25.0%)	34 (26.2%)	4 (18.2%)	0.34 [0.03;11.5]	0.473		
10-30	34 (22.4%)	30 (23.1%)	4 (18.2%)	0.39 [0.03;13.1]	0.522		
>30	76 (50.0%)	63 (48.5%)	13 (59.1%)	0.58 [0.06;17.5]	0.684		

### **5.3 Análisis descriptivo según edad:**

Como se mencionó en el análisis descriptivo inicial (*Tabla 31*) la edad media de los pacientes incluidos en el estudio fue de 68.4 años (en los casos de TMVNMI fue de 67.8 años y en los casos de TMVMI de 72.4 años).

En la *Tabla 31* se muestra un análisis descriptivo según la edad de los pacientes con TMV. La edad ha sido categorizada en 3 grupos: 35-79 años, 60-74 años y > de 75 años.

#### Grado tumoral:

El 84.4% de los pacientes >75 años tenían tumores de alto grado ( $p=0.024$ ).

#### Recidiva y progresión:

Se observó una tendencia de que a mayor edad existe mayor recidiva y progresión, sin embargo no alcanzó la significación estadística.

#### MICA:

Para MICA destaca que en los pacientes >75 años un 66.1 % presentaban MICA débil/+ y con los niveles de expresión de NKG2D existía una tendencia en este mismo grupo de pacientes (>75 años) de aumento sus niveles (el 64.3 % de los pacientes tenían NKG2D intenso/++), sin embargo ninguna de estas dos tendencias alcanzó diferencias estadísticamente significativas.

#### CD68:

En relación a las variables moleculares en el análisis univariante no se observaron diferencias estadísticamente significativas con edad, excepto para la variable CD68 estromal que aumentada con la edad CD68 estromal >30 en el 63.6 % de los pacientes >75 años ( $p=0.024$ ).

**Tabla 31.** Análisis descriptivo según edad categorizada (en años) en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=195	35-59 N=42	60-74 N=89	>75 N=64	p.overall	N
Sexo: Hombre	167 (85.6%)	36 (85.7%)	82 (92.1%)	49 (76.6%)	0.025	195
Tabaco:					<0.001	190
nunca	31 (16.3%)	4 (9.76%)	8 (9.09%)	19 (31.1%)		
≤ 20	21 (11.1%)	8 (19.5%)	10 (11.4%)	3 (4.92%)		
> 20	84 (44.2%)	26 (63.4%)	43 (48.9%)	15 (24.6%)		
exfumador	54 (28.4%)	3 (7.32%)	27 (30.7%)	24 (39.3%)		
Fumador	105 (55.3%)	34 (82.9%)	53 (60.2%)	18 (29.5%)	<0.001	190
Tabaco categorizada:					<0.001	190
No fumador	31 (16.3%)	4 (9.76%)	8 (9.09%)	19 (31.1%)		
Fumador	105 (55.3%)	34 (82.9%)	53 (60.2%)	18 (29.5%)		
Ex-fumador	54 (28.4%)	3 (7.32%)	27 (30.7%)	24 (39.3%)		
TMVMI	22 (11.3%)	2 (4.76%)	9 (10.1%)	11 (17.2%)	0.140	195
Tamaño del tumor:					0.202	195
<3 cm	129 (66.2%)	32 (76.2%)	59 (66.3%)	38 (59.4%)		
>3 cm	66 (33.8%)	10 (23.8%)	30 (33.7%)	26 (40.6%)		
Estadio tumoral:					0.266	195
Ta	112 (57.4%)	27 (64.3%)	54 (60.7%)	31 (48.4%)		
T1	61 (31.3%)	13 (31.0%)	26 (29.2%)	22 (34.4%)		
T2	22 (11.3%)	2 (4.76%)	9 (10.1%)	11 (17.2%)		
Grado (OMS 1973):					0.009	195
G1 bajo grado	45 (23.1%)	16 (38.1%)	19 (21.3%)	10 (15.6%)		
G2 grado intermedio	79 (40.5%)	19 (45.2%)	37 (41.6%)	23 (35.9%)		
G3 alto grado	71 (36.4%)	7 (16.7%)	33 (37.1%)	31 (48.4%)		
Grado (OMS 2004):					0.024	195
bajo grado	45 (23.1%)	16 (38.1%)	19 (21.3%)	10 (15.6%)		
alto grado	150 (76.9%)	26 (61.9%)	70 (78.7%)	54 (84.4%)		
Multiplicidad:					0.533	195
único	141 (72.3%)	31 (73.8%)	61 (68.5%)	49 (76.6%)		
múltiple	54 (27.7%)	11 (26.2%)	28 (31.5%)	15 (23.4%)		
Instilaciones vesicales:					0.194	173
no	40 (23.1%)	11 (27.5%)	19 (23.8%)	10 (18.9%)		
BCG	120 (69.4%)	24 (60.0%)	54 (67.5%)	42 (79.2%)		
QT	13 (7.51%)	5 (12.5%)	7 (8.75%)	1 (1.89%)		
Recidiva	88 (50.9%)	21 (52.5%)	41 (51.2%)	26 (49.1%)	0.943	173
Número de recidivas:					0.146	88
1	44 (50.0%)	9 (42.9%)	21 (50.0%)	14 (56.0%)		
2	24 (27.3%)	3 (14.3%)	13 (31.0%)	8 (32.0%)		
≥3	20 (22.7%)	9 (42.9%)	8 (19.0%)	3 (12.0%)		
Tiempo a 1º recidiva (meses)	16.0 [8.00;28.0]	16.0 [9.00;25.0]	16.0 [7.25;29.5]	14.0 [8.00;19.0]	0.740	88

Progresión:						0.951	173
no	143 (82.7%)	32 (80.0%)	66 (82.5%)	45 (84.9%)			
T1	14 (8.09%)	4 (10.0%)	7 (8.75%)	3 (5.66%)			
>T1	16 (9.25%)	4 (10.0%)	7 (8.75%)	5 (9.43%)			
Tiempo a progresión (meses)	20.5 [9.50;54.8]	38.5 [25.8;63.5]	33.0 [10.0;71.5]	11.0 [8.50;14.0]	0.106		30
Grupos de Riesgo:						0.177	173
Bajo	27 (15.6%)	11 (27.5%)	11 (13.8%)	5 (9.43%)			
Intermedio	15 (8.67%)	4 (10.0%)	7 (8.75%)	4 (7.55%)			
Alto	131 (75.7%)	25 (62.5%)	62 (77.5%)	44 (83.0%)			
MICA						0.592	175
+ (débil)	124 (70.9%)	27 (75.0%)	58 (72.5%)	39 (66.1%)			
++ (intenso)	51 (29.1%)	9 (25.0%)	22 (27.5%)	20 (33.9%)			
NKG2D						0.335	165
+ (débil)	61 (37.0%)	17 (47.2%)	24 (32.9%)	20 (35.7%)			
++ (intenso)	104 (63.0%)	19 (52.8%)	49 (67.1%)	36 (64.3%)			
CD8 epiteliales	11.5 [3.00;34.8]	8.00 [2.00;22.5]	12.5 [4.00;35.5]	16.0 [2.00;44.0]	0.564		156
CD8 estroma:						0.624	157
no	7 (4.46%)	2 (6.45%)	4 (5.48%)	1 (1.89%)			
1-9	66 (42.0%)	12 (38.7%)	28 (38.4%)	26 (49.1%)			
10-30	29 (18.5%)	8 (25.8%)	14 (19.2%)	7 (13.2%)			
>30	55 (35.0%)	9 (29.0%)	27 (37.0%)	19 (35.8%)			
CD4 epiteliales	10.5 [2.75;30.0]	12.0 [2.25;22.0]	9.00 [2.25;21.8]	14.5 [3.00;42.8]	0.512		152
CD4 estroma:						0.635	152
no	4 (2.63%)	0 (0.00%)	3 (4.29%)	1 (1.92%)			
1-9	38 (25.0%)	7 (23.3%)	19 (27.1%)	12 (23.1%)			
10-30	34 (22.4%)	9 (30.0%)	11 (15.7%)	14 (26.9%)			
>30	76 (50.0%)	14 (46.7%)	37 (52.9%)	25 (48.1%)			
CD68 epiteliales:						0.076	158
no	1 (0.63%)	1 (3.03%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)			
escaso	68 (43.0%)	15 (45.5%)	35 (50.0%)	18 (32.7%)			
abundante	45 (28.5%)	12 (36.4%)	15 (21.4%)	18 (32.7%)			
difuso	44 (27.8%)	5 (15.2%)	20 (28.6%)	19 (34.5%)			
CD68 estroma:						0.024	158
1-9	38 (24.1%)	11 (33.3%)	20 (28.6%)	7 (12.7%)			
10-30	45 (28.5%)	12 (36.4%)	20 (28.6%)	13 (23.6%)			
>30	75 (47.5%)	10 (30.3%)	30 (42.9%)	35 (63.6%)			
CD56 epiteliales	3.00 [0.00;6.00]	2.00 [0.00;7.00]	3.00 [1.00;5.00]	2.00 [0.00;6.25]	0.672		130
CD56 estroma:						0.130	131
no	24 (18.3%)	8 (27.6%)	7 (12.1%)	9 (20.5%)			
1-9	85 (64.9%)	16 (55.2%)	41 (70.7%)	28 (63.6%)			
10-30	17 (13.0%)	5 (17.2%)	9 (15.5%)	3 (6.82%)			
>30	5 (3.82%)	0 (0.00%)	1 (1.72%)	4 (9.09%)			
CD34	52.0 [35.2;84.8]	47.0 [30.0;69.0]	52.0 [35.0;94.2]	53.0 [40.0;80.0]	0.661		158
CD117 estroma	4.00 [1.00;11.0]	5.00 [1.00;12.0]	3.00 [1.00;10.0]	4.50 [1.00;11.5]	0.808		137
CD117 epitelial	3.00 [0.00;7.00]	3.50 [1.75;8.00]	3.00 [0.00;5.75]	2.00 [0.00;7.00]	0.373		139
CD15 categorizada:						0.251	168
No	41 (24.4%)	7 (19.4%)	18 (23.7%)	16 (28.6%)			
Focal	53 (31.5%)	8 (22.2%)	24 (31.6%)	21 (37.5%)			
Homogéneo	74 (44.0%)	21 (58.3%)	34 (44.7%)	19 (33.9%)			

#### 5.4 Análisis descriptivo según grupos de riesgo:

El 75% de los casos pertenecían al grupo de alto riesgo, 8.67% eran de riesgo intermedio y el 15.6 % de bajo riesgo.

A continuación se representa la relación de la variable grupo de riesgo con el resto de las variables mediante el análisis univariado.

##### Edad:

La edad media del grupo de alto riesgo fue 68.7 años, en el grupo de riesgo intermedio de 68.2 años y en el grupo de bajo riesgo de 63.2 años.

En los grupos de riesgo alto e intermedio el 47.3% y 46.7 % de los casos tenían entre 60-74 años de edad. En el grupo de bajo riesgo 40.7 % de los casos tenían entre 35-59 años de edad.

**Tabla 32.** Relación entre el grupo de riesgo y la edad en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	Bajo N=27	Intermedio N=15	Alto N=131	p.valor
Edad media	67.8 (11.4)	63.3 (10.4)	68.2 (16.0)	68.7 (10.8)	0.075
Edad:					0.177
35-59	40 (23.1%)	11 (40.7%)	4 (26.7%)	25 (19.1%)	
60-74	80 (46.2%)	11 (40.7%)	7 (46.7%)	62 (47.3%)	
>75	53 (30.6%)	5 (18.5%)	4 (26.7%)	44 (33.6%)	

##### Sexo:

En todos los grupos de riesgo predominaban los hombres, el 86.1 % de los casos (149 pacientes) eran hombres y solo el 13.9 % de todos los grupos fueron mujeres.

En el grupo de alto riesgo el 87 % de los casos (114 pacientes) eran hombres, en el grupo de riesgo intermedio el 86.7% (13 pacientes) y en los de bajo riesgo 81.5 % (22 pacientes).



### Tabaco:

El 56.8 % de los casos de TMVNMI eran fumadores. En el grupo de alto riesgo el 53.5 % eran fumadores, 53.3 % en el grupo de riesgo intermedio y 74.1 % del grupo de bajo riesgo.

El mayor consumo de tabaco se observó en el grupo de bajo riesgo, de este grupo el 51.9 % de los casos eran fumadores de > 20 cig/día.

En el grupo de alto riesgo era donde había una proporción mayor de ex-fumadores con un 31.5 % de pacientes. No detectamos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de riesgo y el hábito tabáquico categorizado ( $p=0.139$ ).

**Tabla 33.** Relación entre el grupo de riesgo y el tabaco en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=169	Bajo N=27	Intermedio N=15	Alto N=127	p.valor
Tabaco:					0.114
nunca	27 (16.0%)	4 (14.8%)	4 (26.7%)	19 (15.0%)	
≤ a 20	21 (12.4%)	6 (22.2%)	3 (20.0%)	12 (9.45%)	
> de 20	75 (44.4%)	14 (51.9%)	5 (33.3%)	56 (44.1%)	
ex-fumador	46 (27.2%)	3 (11.1%)	3 (20.0%)	40 (31.5%)	
Fumador	96 (56.8%)	20 (74.1%)	8 (53.3%)	68 (53.5%)	0.142
Tabaco categorizada:					0.139
No fumador	27 (16.0%)	4 (14.8%)	4 (26.7%)	19 (15.0%)	
Fumador	96 (56.8%)	20 (74.1%)	8 (53.3%)	68 (53.5%)	
Ex-fumador	46 (27.2%)	3 (11.1%)	3 (20.0%)	40 (31.5%)	

### Tamaño tumoral:

En relación a los grupos de riesgo y el tamaño tumoral se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.001$ ). Dichas diferencias se deben en parte a las condiciones del grupo de bajo riesgo que excluyen los tumores <3 cm. En el grupo de alto riesgo un 38.2 % de los casos los tumores eran > 3 cm y en el de riesgo intermedio un 46.7 %.

**Tabla 34.** Relación entre el grupo de riesgo y el tamaño tumoral en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	Bajo N=27	Intermedio N=15	Alto N=131	p.valor	N
Tamaño del tumor:					<0.001	173
<3 cm	116 (67.1%)	27 (100%)	8 (53.3%)	81 (61.8%)		
>3 cm	57 (32.9%)	0 (0.00%)	7 (46.7%)	50 (38.2%)		

Estadio tumoral:

Al comparar los grupos de riesgo con el estadio tumoral objetivamos que los pacientes de alto riesgo tenían un 46.6% de tumores pT1 y un 57.4 % de tumores pTa, mientras que para los grupos de bajo riesgo y riesgo intermedio el 100% de los casos eran pTa ( $p<0.001$ ). Al igual que con el tamaño tumoral dichas diferencias son debidas en parte a la condición del grupo de bajo riesgo que excluye los tumores T1.

**Tabla 35.** Relación entre el grupo de riesgo y el estadio tumoral en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	Bajo N=27	Intermedio N=15	Alto N=131	p.valor
Estadio tumoral:					<0.001
Ta	112 (64.7%)	27 (100%)	15 (100%)	70 (53.4%)	
T1	61 (35.3%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	61 (46.6%)	

Grado tumoral (OMS 1973)/(OMS 2004):

Evidenciamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de riesgo y el grado tumoral ( $p<0.001$ ) que en parte se deben a los criterios de constitución del grupo de bajo riesgo. En el grupo de alto riesgo la mayoría de tumores eran de alto grado (97 %), mientras que el 3 % de los casos eran de bajo grado. En el grupo de riesgo intermedio el 100 % de los tumores eran de bajo grado.

**Tabla 36.** Relación entre el grupo de riesgo y el grado tumoral (OMS1973) / (OMS 2004) en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	Bajo N=27	Intermedio N=15	Alto N=131	p.valor
Grado (OMS 1973):					<0.001
G1 bajo grado	45 (26.0%)	27 (100%)	15 (100%)	3 (2.29%)	
G2 grado intermedio	79 (45.7%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	79 (60.3%)	
G3 alto grado	49 (28.3%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	49 (37.4%)	
Grado (OMS 2004):					<0.001
bajo grado	45 (26.0%)	27 (100%)	15 (100%)	3 (2.29%)	
alto grado	128 (74.0%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	128 (97.7%)	

### Multiplicidad:

En relación con la multiplicidad el 73.3 % de los pacientes del grupo de riesgo intermedio presentaron tumores múltiples frente a un 29.8 % del grupo de alto riesgo.

**Tabla 37.** Relación entre el grupo de riesgo y la multiplicidad en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	Bajo N=27	Intermedio N=15	Alto N=131	p.valor
Multiplicidad:					<0.001
único	123 (71.1%)	27 (100%)	4 (26.7%)	92 (70.2%)	
múltiple	50 (28.9%)	0 (0.00%)	11 (73.3%)	39 (29.8%)	

### Instilaciones endovesicales:

El 76.9 % de los pacientes recibieron tratamiento con terapia con instilaciones vesicales. La mayoría de los pacientes de alto riesgo recibieron tratamiento con BCG (79.8 %) y de este mismo grupo sólo el 8.40 % fueron tratados con MMC.

En el grupo de riesgo intermedio también la mayoría recibió tratamiento con BCG (73.3 %). Mientras que en el grupo de bajo riesgo el 77.8 % de los pacientes no fueron tratados con instilaciones endovesicales.

**Tabla 38.** Relación entre el grupo de riesgo e instilaciones vesicales en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	Bajo N=27	Intermedio N=15	Alto N=131	p.valor
Instilaciones vesicales:					<0.001
no	40 (23.1%)	21 (77.8%)	3 (20.0%)	16 (12.2%)	
BCG	120 (69.4%)	5 (18.5%)	11 (73.3%)	104 (79.4%)	
MMC	13 (7.51%)	1 (3.70%)	1 (6.67%)	11 (8.40%)	

### Recidiva:

Al comparar los grupos de riesgo con la recidiva observamos que la mitad de los pacientes recidivaron (50.9 %). Destaca que sólo presentaron recidiva los pacientes del grupo de alto riesgo, en el cual el 61.5 % de los pacientes recidivaron. En cuanto al número de recidivas que presentó cada paciente, el 50 % tuvo sólo una recidiva, el 27.3 % dos recidivas y solamente tres o más recidivas el 22.7 % de los casos.

**Tabla 39.** Relación entre el grupo de riesgo y la recidiva en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	Bajo N=27	Intermedio N=15	Alto N=131	p.valor	N
Recidiva	88 (50.9%)	15 (55.6%)	5 (33.3%)	68 (51.9%)	0.148	173

### Progresión:

El 82.7 % de los pacientes no presentaron progresión tumoral. Comparando el grupo de riesgo con la progresión tumoral vemos que el 24% de los pacientes de alto riesgo presentó progresión (en 6.11 % a T1 y en 12.2 % a >T1) frente al 6.67% del grupo de riesgo intermedio (6.67 % a T1 y 0 % a >T1) y al 18.5 % de bajo riesgo (18.5 % a T1 y 0 % a >T1).

**Tabla 40.** Relación entre el grupo de riesgo y la progresión en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	Bajo N=27	Intermedio N=15	Alto N=131	p.valor
Progresión:					0.047
No	143 (82.7%)	22 (81.5%)	14 (93.3%)	107 (81.7%)	
T1	14 (8.09%)	5 (18.5%)	1 (6.67%)	8 (6.11%)	
>T1	16 (9.25%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	16 (12.2%)	

**MICA:**

En el 72.5 % de los pacientes la expresión de MICA fue débil y en el 27.5 % intensa.

En los tres grupos de riesgo la expresión de MICA fue similar. No detectamos diferencias.

**Tabla 41.** Relación entre el grupo de riesgo y MICA en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=153	Bajo N=23	Intermedio N=14	Alto N=116	p.valor	N
MICA					0.951	153
+ (débil)	111 (72.5%)	17 (73.9%)	11 (78.6%)	83 (71.6%)		
++ (intenso)	42 (27.5%)	6 (26.1%)	3 (21.4%)	33 (28.4%)		

**NKG2D:**

En el 65.7 % de los pacientes se observó una expresión intensa de NKG2D y en el 34.3 % fue débil. Al comparar los grupos de riesgo con la expresión de NKG2D destaca una relación inversa a menor grupo de riesgo mayor expresión de NKG2D. En los pacientes de bajo riesgo un 73.9 % de los casos tenía expresión intensa de NKG2D vs. 50 % en el grupo de riesgo intermedio y 65.7 % en el grupo de alto riesgo.

**Tabla 42.** Relación entre el grupo de riesgo y NKG2D en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=143	Bajo N=23	Intermedio N=12	Alto N=108	p.valor	N
NKG2D					0.368	143
+ (débil)	49 (34.3%)	6 (26.1%)	6 (50.0%)	37 (34.3%)		
++ (intenso)	94 (65.7%)	17 (73.9%)	6 (50.0%)	71 (65.7%)		

### CD4 epiteliales:

Al comparar los grupos de riesgo con la expresión de CD4 epiteliales evidenciamos una relación inversa, al aumentar el grupo de riesgo disminuye el valor medio de linfocitos T CD4+ epiteliales, no obstante la diferencia no es estadísticamente significativa ( $p=0.685$ ).

**Tabla 43.** Relación entre el grupo de riesgo y CD4 epiteliales en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=131	Bajo N=20	Intermedio N=12	Alto N=99	p.valor	N
CD4 epitelial	9.00 [2.00;22.0]	15.5 [2.75;25.8]	10.0 [2.00;18.0]	8.00 [2.00;21.5]	0.685	131

### CD4 estroma:

La expresión de linfocitos T CD4+ en el compartimiento estromal en los pacientes del grupo de bajo riesgo fue mayor, un 55 % de los casos tenían >30 linfocitos T CD4+ epiteliales por core frente a un 33.3 % de los casos del grupo de riesgo intermedio y al 43.4 % de los casos del grupo de alto riesgo. La ausencia de expresión de linfocitos T CD4+ estromal fue poco frecuente (3%) en todos los grupos.

**Tabla 44.** Relación entre el grupo de riesgo y CD4 estroma en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=131	Bajo N=20	Intermedio N=12	Alto N=99	p.valor
CD4 estroma:					0.323
no	4 (3.05%)	1 (5.00%)	0 (0.00%)	3 (3.03%)	
1-9	38 (29.0%)	7 (35.0%)	4 (33.3%)	27 (27.3%)	
10-30	31 (23.7%)	1 (5.00%)	4 (33.3%)	26 (26.3%)	
>30	58 (44.3%)	11 (55.0%)	4 (33.3%)	43 (43.4%)	

### CD8 epitelial:

Tras comparar el nivel de expresión de linfocitos T CD8+ intraepitelial con los grupos de riesgo no se observó diferencias significativas siendo muy similar en los 3 grupos, con una expresión más baja en el grupo de bajo riesgo.

**Tabla 45.** Relación entre el grupo de riesgo y CD8 epitelial en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=136	Bajo N=23	Intermedio N=14	Alto N=99	p.valor	N
CD8 epitelial	10.0 [2.50;31.0]	6.00 [2.50;21.5]	9.00 [3.00;18.0]	11.0 [2.50;35.5]	0.474	136

### CD8 estroma:

La categoría más frecuente en todos los grupos de riesgo fue la de 1-9 linfocitos T CD8+ en el estroma por core. Destaca que en un 7.07 % de los pacientes de alto riesgo se observó ausencia de linfocitos T CD8+, mientras que para los otros grupos de riesgo no se detectó ausencia de linfocitos T CD8+ en ningún caso.

**Tabla 46.** Relación entre el grupo de riesgo y CD8 estroma en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=136	Bajo N=23	Intermedio N=14	Alto N=99	p.valor
CD8 estroma:					0.575
no	7 (5.15%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	7 (7.07%)	
1-9	61 (44.9%)	11 (47.8%)	9 (64.3%)	41 (41.4%)	
10-30	26 (19.1%)	5 (21.7%)	3 (21.4%)	18 (18.2%)	
>30	42 (30.9%)	7 (30.4%)	2 (14.3%)	33 (33.3%)	

### CD68 epitelial:

En todos los grupos de riesgo la categoría más frecuente fue la de células CD68+ epiteliales escasas (1-9 por core), representando el 59.1 % de los casos del grupo de bajo riesgo, 58.3 % de riesgo intermedio y el 45.6 % del grupo de alto riesgo. Detectamos pocos casos con infiltración difusa de CD68 epitelial y prácticamente ningún caso con ausencia de expresión de CD68 epitelial.

**Tabla 47.** Relación entre el grupo de riesgo y CD68 epiteliales en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=137	Bajo N=22	Intermedio N=12	Alto N=103	p.valor
CD68 epitelial					0.329
no	1 (0.73%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (0.97%)	
escaso (1-9)	67 (48.9%)	13 (59.1%)	7 (58.3%)	47 (45.6%)	
abundante (10-30)	43 (31.4%)	7 (31.8%)	5 (41.7%)	31 (30.1%)	
difuso (>30)	26 (19.0%)	2 (9.09%)	0 (0.00%)	24 (23.3%)	

### CD68 estroma:

En el grupo de pacientes de alto riesgo evidenciamos que la categoría de CD68 estromal >30 por core fue la más frecuente con un 39.4 % de los casos.

No hubo diferencias entre los grupos de riesgo y la expresión de CD68 a nivel del estroma.

**Tabla 48.** Relación entre el grupo de riesgo y CD68 estromal en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=137	Bajo N=22	Intermedio N=12	Alto N=103	p.valor
CD68 estroma:					0.888
1-9	38 (27.7%)	7 (31.8%)	4 (33.3%)	27 (26.2%)	
10-30	45 (32.8%)	8 (36.4%)	4 (33.3%)	33 (32.0%)	
>30	54 (39.4%)	7 (31.8%)	4 (33.3%)	43 (41.7%)	



### CD56 epiteliales y estroma:

En la *Tabla 49* se observa la relación entre los grupos de riesgo y el valor medio de expresión de CD56 a nivel epitelial, observando una expresión escasa en todos los grupos de riesgo, siendo discretamente menor en el grupo de tumores de alto riesgo.

La expresión de CD56 a nivel del estroma fue también escasa en la mayoría de casos (1-9 por core) en casi el 70 % de los casos de todos los grupos de riesgo.

No detectamos tampoco diferencias significativas.

**Tabla 49.** Relación entre el grupo de riesgo y la expresión de CD56 a nivel epitelial y del estroma en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=110	Bajo N=18	Intermedio N=11	Alto N=81	p.valor	N
CD56 epiteliales	2.00 [0.00;4.00]	4.00 [0.50;6.50]	3.00 [1.00;3.50]	2.00 [0.00;4.00]	0.176	109
CD56 estroma:					0.873	110
no	22 (20.0%)	3 (16.7%)	1 (9.09%)	18 (22.2%)		
1-9	74 (67.3%)	12 (66.7%)	9 (81.8%)	53 (65.4%)		
10-30	13 (11.8%)	3 (16.7%)	1 (9.09%)	9 (11.1%)		
>30	1 (0.91%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (1.23%)		

### CD34:

Al comparar la expresión de CD34 según el grupo de riesgo, fue superior en el grupo de riesgo intermedio (mediana de 56.5), seguido del grupo de bajo y alto riesgo (mediana de 44 y 50.5 respectivamente).

**Tabla 50.** Relación entre el grupo de riesgo y la expresión de CD34 en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	Bajo N=22	Intermedio N=112	Alto N=103	p.valor	N
CD34	50.0 [31.0;83.0]	44.0 [30.0;75.0]	56.5 [24.0;67.2]	50.5 [35.0;84.8]	0.778	137

### CD117 epitelial y estromal:

La expresión de CD117 epitelial fue muy similar en los tres grupos de riesgo (medianas de 4, 4 y 3). La diferencias no fueron estadísticamente significativas. No obstante, la expresión de CD117 a nivel del epitelio y del estroma fue discretamente más baja en el grupo de alto riesgo.

**Tabla 51.** Relación entre el grupo de riesgo y la expresión de CD117 en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	Bajo N=27	Intermedio N=15	Alto N=131	p.valor	N
CD117 estroma	3.00 [1.00;10.0]	4.00 [0.00;17.0]	6.00 [2.00;10.5]	3.00 [1.00;8.00]	0.781	118
CD117 epitelial	3.00 [0.00;8.00]	4.00 [1.00;8.50]	4.00 [0.75;14.5]	3.00 [0.00;6.50]	0.399	122

### CD15:

La categoría más frecuente en los tres grupos de riesgo fue la expresión homogénea de CD15, no evidenciamos en el análisis univariado ninguna relación entre el patrón de expresión de CD15 y los grupos de riesgo.

**Tabla 52.** Relación entre el grupo de riesgo y la expresión de CD15 en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=146	Bajo N=22	Intermedio N=12	Alto N=112	p.valor	N
CD15 categorizado:					0.805	146
No	34 (23.3%)	4 (18.2%)	3 (25.0%)	27 (24.1%)		
Focal	43 (29.5%)	6 (27.3%)	2 (16.7%)	35 (31.2%)		
Homogéneo	69 (47.3%)	12 (54.5%)	7 (58.3%)	50 (44.6%)		

## 5.5 Análisis descriptivo según el hábito tabáquico:

El 55.3 % de los pacientes eran fumadores, un 28.4 % ex-fumadores y el 16.3% no habían fumado nunca.

De los fumadores activos, el 80 % fumaba >de 20 cig/día mientras que el 20 % restante fumaban ≤ a 20 cig/día.

La variable tabaco se categorizó de dos formas en el estudio descriptivo, primero en tres categorías (fumador activo, no fumador y ex-fumador) y posteriormente en cuatro categorías (no fumador, fumador de ≤ de 20 cig/día, > de 20 cig/día y ex-fumador) (*Tabla 53 y Tabla 54*).

A continuación se representa la relación de la variable tabaco con el resto de las variables en el modelo univariante.

### Sexo:

En relación al género, un 61.1 % de los hombres (99/162) eran fumadores activos frente a un 21.4 % (6/28) de la mujeres ( $p < 0.001$ ). De los hombres un 37.7 % nunca había fumado vs. 78.57 % de las mujeres. En el grupo de ex-fumadores no había mujeres frente a un 28% de hombres.

**Tabla 53.** Relación entre el tabaco y el sexo en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=190	si N=105	≤ 20 cig /día N=21	>20 cig/día N=84	no N=31	ex-fumador N=54	p.valor
<b>Hombre</b>	162 (85.3%)	99 (94.3%)	19 (90.5%)	80 (95.2%)	9 (29.0%)	54 (100%)	<0.001
<b>Mujer</b>	28 (14.7 %)	6 (5.7%)	2 (9.5%)	4 (4.8%)	22 (71%)	0 (0%)	

### Edad:

La edad media de los fumadores fue de 64.3 años y la de los no fumadores 74.5 años, en nuestra serie a mayor edad disminuye el consumo de tabaco.

El grupo de pacientes de 60-74 años era el que tenía más fumadores, representando el 50.5 % de los fumadores activos, seguido del grupo de 35-59 años con un 32.4% de los fumadores activos y por último el grupo de pacientes de >75 años con un 17.1%. De los fumadores activos el grupo de edad de 60-74 años eran también los que mayor cantidad fumaban representando el 51.2% de los pacientes que fumaban >20 cig/día.

**Tabla 54.** Relación entre el tabaco y la edad en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=190	si N=105	≤ 20 cig /día N=21	≥ 20 cig /día N=84	no N=31	ex-fumador N=54	p.valor
Edad media	68.2 (11.4)	64.3 (10.8)	63.5 (11.2)	64.5 (10.8)	74.5 (13.0)	72.2 (8.52)	<0.001
Edad							<0.001
35-59	41 (21.6%)	34 (32.4%)	8 (38.1%)	26 (31.0%)	4 (12.9%)	3 (5.56%)	
60-74	88 (46.3%)	53 (50.5%)	10 (47.6%)	43 (51.2%)	8 (25.8%)	27 (50.0%)	
>75	61 (32.1%)	18 (17.1%)	3 (14.3%)	15 (17.9%)	19 (61.3%)	24 (44.4%)	

### Tamaño tumoral:

En relación al tamaño tumoral y el hábito tabáquico, en los no fumadores no se observaron diferencias en cuanto al tamaño tumoral. Mientras que en el grupo de fumadores el 66.7% de los pacientes tenía tumores <3 cm.

**Tabla 55.** Relación entre el tabaco y el tamaño tumoral en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=190	No fumador N=31	Fumador N=105	Ex-fumador N=54	p.valor
Tamaño tumoral:					0.077
<3 cm	124 (65.3%)	15 (48.4%)	70 (66.7%)	39 (72.2%)	
>3 cm	66 (34.7%)	16 (51.6%)	35 (33.3%)	15 (27.8%)	

### Estadio tumoral:

De los pacientes con TMVNMI (Ta-T1) eran fumadores el 56.80 % (96/169) y en los pacientes con TMVMI (T2) el 42.86 % (9/21). Los casos con TMVMI fumaban mayor cantidad, el 100% de los fumadores de este grupo fumaban >20 cig/día.

El 54.8% de los pacientes no fumadores presentó tumores pTa.

**Tabla 56.** Relación entre el tabaco y el tamaño del tumor en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=190	si N=105	≤ 20 cig /día N=21	>20 cig/día N=84	no N=31	ex-fumador N=54	p.valor
Estadio :							0.534
Ta	109 (57.4%)	63 (60.0%)	16 (76.2%)	47 (56.0%)	17 (54.8%)	29 (53.7%)	
T1	60 (31.6%)	33 (31.4%)	5 (23.8%)	28 (33.3%)	10 (32.3%)	17 (31.5%)	
T2	21 (11.1%)	9 (8.57%)	0 (0.00%)	9 (10.7%)	4 (12.9%)	8 (14.8%)	

### Grado tumoral:

Un 71.4% de los casos de alto grado eran fumadores activos (p=0.047). En relación a la cantidad, de los fumadores de >20 cig/día, el 75 % de los casos presentaron tumores de alto grado. No detectamos diferencias estadísticamente significativas con la clasificación según la OMS 1973.

**Tabla 57.** Relación entre el tabaco y el grado tumoral en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=190	si N=105	≤ 20 cig /día N=21	>20 cig/día N=84	no N=31	exfumador N=54	p.valor
<b>Grado 1973:</b>							0.215
G1	45 (23.7%)	30 (28.6%)	9 (42.9%)	21 (25.0%)	8 (25.8%)	7 (13.0%)	
G2	77 (40.5%)	42 (40.0%)	7 (33.3%)	35 (41.7%)	11 (35.5%)	24 (44.4%)	
G3	68 (35.8%)	33 (31.4%)	5 (23.8%)	28 (33.3%)	12 (38.7%)	23 (42.6%)	
<b>Grado 2004:</b>							0.047
bajo grado	45 (23.7%)	30 (28.6%)	9 (42.9%)	21 (25.0%)	8 (25.8%)	7 (13.0%)	
alto grado	145 (76.3%)	75 (71.4%)	12 (57.1%)	63 (75.0%)	23 (74.2%)	47 (87.0%)	

### MICA:

El 72 % de los fumadores activos presentaban una expresión de MICA débil y el 28% un expresión intensa. El 78.6 % de los pacientes no fumadores expresaron niveles de MICA bajos y el 21.4 % niveles altos. No existiendo diferencias significativas entre los 3 grupos (fumadores, ex-fumadores y no fumadores) en cuanto a la expresión de MICA ( $p=0.449$ ).

**Tabla 58.** Relación entre el tabaco y la expresión de MICA en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=190	No fumador N=31	<b>Fumador</b> N=105	Ex-fumador N=54	p.valor	N
<b>MICA</b>					0.449	170
+ (débil)	121 (71.2%)	22 (78.6%)	67 (72.0%)	32 (65.3%)		
++ (intensa)	49 (28.8%)	6 (21.4%)	26 (28.0%)	17 (34.7%)		

### NKG2D:

El 64.4 % de los pacientes fumadores activos expresaron un nivel intenso de NKG2D frente al 35.6 % de este mismo grupo que presentaron una expresión débil. En el grupo de no fumadores predominó la expresión intensa de NKG2D en el 62.7 % de los pacientes. En los ex-fumadores no hubo diferencias significativas de expresión.

**Tabla 59.** Relación entre el tabaco y la expresión de NKG2D en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=190	No fumador N=31	<b>Fumador</b> N=105	Ex-fumador N=54	p.valor	N
<b>NKG2D</b>					0.299	161
+ (débil)	60 (37.3%)	7 (28.0%)	32 (35.6%)	21 (45.7%)		
++ (intensa)	101 (62.7%)	18 (72.0%)	58 (64.4%)	25 (54.3%)		

### CD4 epiteliales:

La expresión de CD4 intraepiteliales tumorales fue más elevada en el grupo de pacientes no fumadores que en los grupos de fumadores y ex-fumadores (mediana de 22, 7 y 15 respectivamente) (p=0.023).

**Tabla 60.** Relación entre el tabaco y la expresión de CD4 epiteliales en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=190	No fumador N=31	<b>Fumador</b> N=105	Ex-fumador N=54	p.valor	N
<b>CD4 epiteliales</b>	10.0 [2.00;27.0]	22.0 [6.50;50.0]	7.00 [2.00;20.0]	15.0 [3.00;26.0]	<b>0.023</b>	148

### CD4 estromales:

No se observaron diferencias en cuanto a los niveles de expresión de CD4 a nivel del estroma en los pacientes no fumadores, fumadores y ex-fumadores, en los 3 grupos predominó la categoría de CD4 estromal >30 (56.5 % , 51.2 % y 44.4 %).

**Tabla 61.** Relación entre el tabaco y la expresión de CD4 estroma en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=190	No fumador N=31	<b>Fumador</b> N=105	Ex-fumador N=54	p.valor	N
<b>CD4 estroma:</b>					0.916	148
no	4 (2.70%)	0 (0.00%)	2 (2.50%)	2 (4.44%)		
1-9	38 (25.7%)	5 (21.7%)	19 (23.8%)	14 (31.1%)		
10-30	32 (21.6%)	5 (21.7%)	18 (22.5%)	9 (20.0%)		
>30	74 (50.0%)	13 (56.5%)	41 (51.2%)	20 (44.4%)		

### CD8 epiteliales:

La expresión de linfocitos T CD8+ epiteliales fue más elevada en el grupo de pacientes ex-fumadores y no fumadores (mediana de 19 y 16 respectivamente) en comparación con el grupo de pacientes fumadores (mediana de 9). Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas ( $p=0.602$ ).

**Tabla 62.** Relación entre el tabaco y la expresión de CD8 epiteliales en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=190	No fumador N=31	<b>Fumador</b> N=105	Ex-fumador N=54	p.valor	N
<b>CD8 epiteliales</b>	11.0 [3.00;33.5]	16.0 [6.00;25.0]	9.00 [3.00;30.5]	19.0 [1.00;41.0]	0.602	151

### CD8 estromales:

En los fumadores y ex-fumadores predominó la expresión baja (1-9 por core) de CD8 a nivel del estroma (41.2 % y 44.7 % respectivamente) frente a los no fumadores con niveles elevados de CD8 estromal (>30 por core) en un 44 %.

**Tabla 63.** Relación entre el tabaco y la expresión de CD8 estroma en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=190	No fumador N=31	<b>Fumador</b> N=105	Ex-fumador N=54	p.valor	N
<b>CD8 estroma:</b>					0.755	152
no	7 (4.61%)	0 (0.00%)	3 (3.75%)	4 (8.51%)		
1-9	64 (42.1%)	10 (40.0%)	33 (41.2%)	21 (44.7%)		
10-30	28 (18.4%)	4 (16.0%)	16 (20.0%)	8 (17.0%)		
>30	53 (34.9%)	11 (44.0%)	28 (35.0%)	14 (29.8%)		



### CD56 epiteliales:

No se detectaron diferencias en relación a la expresión de CD56 epiteliales y el consumo de tabaco, siendo similar la expresión en los 3 grupos de pacientes (fumadores, no fumadores y ex-fumadores).

**Tabla 64.** Relación entre el tabaco y la expresión de CD56 epiteliales en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=190	No fumador N=31	<b>Fumador</b> N=105	Ex-fumador N=54	p.valor	N
<b>CD56 epiteliales</b>	3.00 [0.00;6.00]	3.00 [1.00;7.00]	2.50 [0.00;6.00]	2.50 [0.00;4.25]	0.685	127

### CD56 estromales:

No se detectaron diferencias significativas en relación a los niveles de CD56 estromales y el tabaco, en los 3 grupos fue más frecuente una expresión baja de CD56 estromal (1-9 por core).

**Tabla 65.** Relación entre el tabaco y la expresión de CD56 estroma en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=190	No fumador N=31	<b>Fumador</b> N=105	Ex-fumador N=54	p.valor	N
<b>CD56 estroma:</b>					0.680	128
no	22 (17.2%)	2 (9.52%)	11 (15.5%)	9 (25.0%)		
1-9	84 (65.6%)	16 (76.2%)	47 (66.2%)	21 (58.3%)		
10-30	17 (13.3%)	2 (9.52%)	11 (15.5%)	4 (11.1%)		
>30	5 (3.91%)	1 (4.76%)	2 (2.82%)	2 (5.56%)		

### CD34 epiteliales:

No se detectaron diferencias en cuanto a la expresión de CD34 epiteliales y el consumo de tabaco, siendo similar la expresión en los 3 grupos de pacientes (fumadores, no fumadores y ex-fumadores). No obstante, los fumadores tenían un discreto aumento de la expresión de CD34 epiteliales.

**Tabla 66.** Relación entre el tabaco y la expresión de CD34 epiteliales en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=190	No fumador N=31	Fumador N=105	Ex-fumador N=54	p.valor	N
<b>CD34 epiteliales</b>	52.0 [35.0;86.0]	47.0 [35.0;75.0]	55.0 [35.0;102]	50.0 [37.0;68.0]	0.279	155

### CD117:

En la *Tabla 67* se muestra la relación del hábito tabáquico con la expresión de CD117 epitelial y a nivel del estroma.

La relación entre el consumo de tabaco y la expresión de CD117 a nivel del estroma fue similar en los pacientes fumadores y no fumadores, no obstante la misma fue inferior en los ex-fumadores ( $p=0.007$ ).

Al comparar la expresión de CD117 epitelial con el hábito tabáquico se observó una relación similar a la de CD117 estromal, siendo más baja también en el grupo de los ex-fumadores.

**Tabla 67.** Relación entre el tabaco y la expresión de CD117 epiteliales en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=190	No fumador N=31	Fumador N=105	Ex-fumador N=54	p.valor	N
CD117 estroma	4.00 [1.00;11.0]	4.50 [2.25;11.8]	5.00 [2.00;14.8]	2.00 [0.00;6.00]	0.007	133
CD117 epitelial	3.00 [0.00;7.00]	4.00 [1.00;10.5]	3.00 [0.00;7.00]	2.00 [0.00;4.00]	0.093	135

### CD15:

La relación entre el hábito tabáquico y el patrón de expresión de CD15 fue focal en la mayoría (43.5 %) de los pacientes ex-fumadores. En los fumadores y no fumadores predominó el patrón de expresión homogénea (54.3 % vs 44 % respectivamente).

**Tabla 68.** Relación entre el tabaco y la expresión de CD117 epiteliales en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=163	No fumador N=25	Fumador N=92	Ex-fumador N=46	p.valor
CD15 categorizada:					0.008
No	39 (23.9%)	10 (40.0%)	16 (17.4%)	13 (28.3%)	
Focal	50 (30.7%)	4 (16.0%)	26 (28.3%)	20 (43.5%)	
Homogénea	74 (45.4%)	11 (44.0%)	50 (54.3%)	13 (28.3%)	

## 5.6 Análisis descriptivo según el estadio tumoral:

En nuestra serie el 57.4% de los pacientes tenían estadio pTa, el 31.3% pT1 y sólo el 11.3 % estadio pT2.

**Tabla 69.** Análisis descriptivo según el estadio tumoral y las variables clínico-patológicas en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=195	Ta N=112	T1 N=61	T2 N=22	p.valor
Edad media	68.4 (11.4)	67.3 (11.1)	68.8 (11.8)	72.4 (11.6)	0.147
Edad:					0.266
35-59	42 (21.5%)	27 (24.1%)	13 (21.3%)	2 (9.09%)	
60-74	89 (45.6%)	54 (48.2%)	26 (42.6%)	9 (40.9%)	
>75	64 (32.8%)	31 (27.7%)	22 (36.1%)	11 (50.0%)	
Sexo: Hombre	167 (85.6%)	97 (86.6%)	52 (85.2%)	18 (81.8%)	0.799
Tabaco:					0.534
nunca	31 (16.3%)	17 (15.6%)	10 (16.7%)	4 (19.0%)	
≤ 20	21 (11.1%)	16 (14.7%)	5 (8.33%)	0 (0.00%)	
>20	84 (44.2%)	47 (43.1%)	28 (46.7%)	9 (42.9%)	
exfumador	54 (28.4%)	29 (26.6%)	17 (28.3%)	8 (38.1%)	
Fumador	105 (55.3%)	63 (57.8%)	33 (55.0%)	9 (42.9%)	0.451
Tabaco categorizada:					0.764
No fumador	31 (16.3%)	17 (15.6%)	10 (16.7%)	4 (19.0%)	
Fumador	105 (55.3%)	63 (57.8%)	33 (55.0%)	9 (42.9%)	
Ex-fumador	54 (28.4%)	29 (26.6%)	17 (28.3%)	8 (38.1%)	
Tamaño del tumor:					0.009
<3 cm	129 (66.2%)	84 (75.0%)	32 (52.5%)	13 (59.1%)	
>3 cm	66 (33.8%)	28 (25.0%)	29 (47.5%)	9 (40.9%)	
Grado (OMS 1973):					<0.001
G1 bajo grado	45 (23.1%)	43 (38.4%)	2 (3.28%)	0 (0.00%)	
G2 grado intermedio	79 (40.5%)	55 (49.1%)	24 (39.3%)	0 (0.00%)	
G3 alto grado	71 (36.4%)	14 (12.5%)	35 (57.4%)	22 (100%)	
Grado (OMS 2004):					<0.001
bajo grado	45 (23.1%)	43 (38.4%)	2 (3.28%)	0 (0.00%)	
alto grado	150 (76.9%)	69 (61.6%)	59 (96.7%)	22 (100%)	
Multiplicidad:					0.400
único	141 (72.3%)	82 (73.2%)	41 (67.2%)	18 (81.8%)	
múltiple	54 (27.7%)	30 (26.8%)	20 (32.8%)	4 (18.2%)	
Instilaciones vesicales:					0.071
no	40 (23.1%)	31 (27.7%)	9 (14.8%)		
BCG	120 (69.4%)	71 (63.4%)	49 (80.3%)		
MMC	13 (7.51%)	10 (8.93%)	3 (4.92%)		
Recidiva	88 (50.9%)	59 (52.7%)	29 (47.5%)		0.627

Número de recidivas	1.00 [0.00;2.00]	1.00 [0.00;1.25]	0.00 [0.00;2.00]		0.535
Número de recidivas:					0.467
1	44 (50.0%)	32 (53.3%)	12 (42.9%)		
2	24 (27.3%)	14 (23.3%)	10 (35.7%)		
≥3	20 (22.7%)	14 (23.3%)	6 (21.4%)		
Tiempo a 1º recidiva (meses)	16.0 [8.00;28.0]	16.5 [11.8;28.0]	10.5 [4.75;25.8]		0.070
Progresión:					0.006
No	143 (82.7%)	95 (84.8%)	48 (78.7%)		
T1	14 (8.09%)	12 (10.7%)			
>T1	16 (9.25%)	5 (4.46%)	11 (18.0%)		
Tiempo a progresión (meses)	20.5 [9.50;54.8]	24.0 [13.0;43.0]	16.0 [4.00;76.0]		0.950
Mortalidad por TMV (78 meses)	11 (10.9%)	2 (3.77%)	2 (6.90%)	7 (36.8%)	0.001

### Edad:

El 50 % de los casos con estadio tumoral pT2 fueron mayores de 75 años de edad en comparación con el 36.1 % de los pacientes pT1 y el 27.7 % pTa. El rango de edad más frecuente para los estadios pTa y pT1 fue de 60-74 años de edad (48.2 % y 42.6 % respectivamente).

### Tabaco:

No hubo diferencias significativas entre el estadio tumoral y el hábito tabáquico.

Los pacientes fumadores con tumores pTa representan el 57.8 % vs. 55 % pT1 y 42.9 % pT2.

Destaca una mayor proporción de TMVMI en los ex-fumadores 38.1 % vs. 28.3 % pT1 y 26.6% pTa.

### Tamaño tumoral:

En todos los estadios tumorales predominaron los tumores menores de 3 cm. No obstante el 47.5 % de los tumores estadio pT1 eran mayores de 3 cm en comparación con el 25 % pTa y 40.9 % pT2.

#### Multiplicidad:

En todos los estadios tumorales fueron más frecuentes los tumores únicos (73.2 % pTa, 67.2% pT1 y 81.8 % pT2).

#### Grado tumoral (OMS 2004):

El 61.6 % de los tumores pTa fueron de alto grado, frente al 96.7 % de los tumores pT1 y al 100 % de los pT2.

El 38.4 % de los tumores pTa eran de bajo grado y sólo el 3.28 % de los tumores pT1 fueron de bajo grado.

#### Instilaciones endovesicales:

La mayoría de los pacientes recibieron tratamiento con instilaciones vesicales con BCG (63.4 % de los tumores pTa vs 80.3 % de los pT1).

El 27.7 % de los pacientes con tumores pTa no recibieron ningún tratamiento con instilaciones vesicales frente al 14.8 % pT1.

Sólo una minoría de los casos recibió tratamiento con instilaciones vesicales con MMC (8.93 % de los tumores pTa y 4.92 % de los tumores pT1).

#### Recidiva:

No hubo diferencias significativas en cuanto al estadio tumoral y la recidiva tumoral.

El 52.7 % de los tumores pTa recidivaron frente al 47.5 % pT1.

En cuanto al número de recidivas tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

#### Tiempo a la primera recidiva:

El tiempo medio hasta la primera recidiva fue más corto en los tumores pT1 de 10.5 meses vs. 16.5 meses para los tumores pTa.

#### Progresión tumoral:

El 84.8 % de los tumores pTa y el 78.7 % pT1 no presentaron progresión tumoral.

Sólo un 10.7 % de los tumores pTa progresaron hasta T1.

La progresión a >T1 se observó en el 4.46 % de los tumores pTa y en el 18 % pT1.

#### Mortalidad por TMV (78 meses):

En el grupo de tumores pTa la mortalidad por TMV fue del 3.77 % a 78 meses, frente al 6.9 % de los tumores pT1 y el 36.8 % de los pacientes con tumores pT2.

#### MICA:

En los TMVNMI (pTa-T1) se detectó una expresión de MICA débil en la mayor parte de los casos (72.3% y 73.1%), frente a los TMVMI (T2) con un 59.1% de los casos con expresión de MICA débil.

En los TMVMI (T2) la expresión intensa de MICA se observó en el 40.9 % de los casos frente al 27.7 % de los tumores pTa y al 26.9 % de los pT1.

**Tabla 70.** Análisis descriptivo según el estadio tumoral y MICA en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=175	Ta N=101	T1 N=52	T2 N=22	p.valor
MICA:					0.428
+ (débil)	124 (70.9%)	73 (72.3%)	38 (73.1%)	13 (59.1%)	
++ (intensa)	51 (29.1%)	28 (27.7%)	14 (26.9%)	9 (40.9%)	

## NKG2D:

En los tumores pTa predominó la expresión intensa de NKG2D en el 63.4 % de los casos frente a un 36.6 % con expresión débil. En los tumores pT1 fue muy similar con un 70 % de los casos con expresión intensa vs el 30 % de los casos con expresión débil.

Destaca que de forma contraria en los TMVMI (T2) predominaron los casos con expresión débil de NKG2D en un 54.5 % frente al 45.5 % de casos de expresión intensa.

**Tabla 71.** Análisis descriptivo según el estadio tumoral y NKG2D en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=165	Ta N=93	T1 N=50	T2 N=22	p.valor
NKG2D:					0.138
+ (débil)	61 (37.0%)	34 (36.6%)	15 (30.0%)	12 (54.5%)	
++ (intensa)	104 (63.0%)	59 (63.4%)	35 (70.0%)	10 (45.5%)	



## 5.7.1 Análisis descriptivo según el grado tumoral (OMS 2004):

En la *Tabla 72* se observa el análisis según el grado tumoral (OMS 2004).

**Tabla 72.** Análisis descriptivo según el grado tumoral (OMS 2004) y resto de variables en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=195	Bajo grado N=45	Alto grado N=150	OR	p.ratio	p.valor	N
Edad:						0.024	195
35-59	42 (21.5%)	16 (35.6%)	26 (17.3%)	Ref.	Ref.		
60-74	89 (45.6%)	19 (42.2%)	70 (46.7%)	2.25 [1.00;5.08]	0.050		
>75	64 (32.8%)	10 (22.2%)	54 (36.0%)	3.27 [1.31;8.51]	0.011		
Sexo: Hombre	167 (85.6%)	38 (84.4%)	129 (86.0%)	Ref.	Ref.	0.985	195
Tabaco:						0.047	190
nunca	31 (16.3%)	8 (17.8%)	23 (15.9%)	Ref.	Ref.		
≤ 20	21 (11.1%)	9 (20.0%)	12 (8.28%)	0.47 [0.14;1.56]	0.219		
>20	84 (44.2%)	21 (46.7%)	63 (43.4%)	1.05 [0.39;2.66]	0.918		
exfumador	54 (28.4%)	7 (15.6%)	47 (32.4%)	2.30 [0.73;7.49]	0.155		
Fumador	105 (55.3%)	30 (66.7%)	75 (51.7%)	0.54 [0.26;1.08]	0.081	0.112	190
Tabaco categorizada:						0.086	190
No fumador	31 (16.3%)	8 (17.8%)	23 (15.9%)	Ref.	Ref.		
Fumador	105 (55.3%)	30 (66.7%)	75 (51.7%)	0.88 [0.33;2.13]	0.781		
Ex-fumador	54 (28.4%)	7 (15.6%)	47 (32.4%)	2.30 [0.73;7.49]	0.155		
TMVMI	22 (11.3%)	0 (0.00%)	22 (14.7%)	. [.;]	.	0.014	195
Tamaño del tumor:						0.040	195
<3 cm	129 (66.2%)	36 (80.0%)	93 (62.0%)	Ref.	Ref.		
>3 cm	66 (33.8%)	9 (20.0%)	57 (38.0%)	2.41 [1.12;5.72]	0.024		
Estadio tumoral:						<0.001	195
Ta	112 (57.4%)	43 (95.6%)	69 (46.0%)	Ref.	Ref.		
T1	61 (31.3%)	2 (4.44%)	59 (39.3%)	. [.;]	.		
T2	22 (11.3%)	0 (0.00%)	22 (14.7%)	. [.;]	.		
Grado 1973:						<0.001	195
G1 bajo grado	45 (23.1%)	45 (100%)	0 (0.00%)	Ref.	Ref.		
G2 grado intermedio	79 (40.5%)	0 (0.00%)	79 (52.7%)	. [.;]	.		
G3 alto grado	71 (36.4%)	0 (0.00%)	71 (47.3%)	. [.;]	.		
Multiplicidad:						0.988	195
único	141 (72.3%)	32 (71.1%)	109 (72.7%)	Ref.	Ref.		
múltiple	54 (27.7%)	13 (28.9%)	41 (27.3%)	0.92 [0.45;1.99]	0.830		
Instilaciones vesicales:						<0.001	173
no	40 (23.1%)	25 (55.6%)	15 (11.7%)	Ref.	Ref.		
BCG	120 (69.4%)	18 (40.0%)	102 (79.7%)	9.21 [4.14;21.4]	<0.001		
MMC	13 (7.51%)	2 (4.44%)	11 (8.59%)	8.36 [1.87;65.3]	0.004		

Recidiva	88 (50.9%)	21 (46.7%)	67 (52.3%)	1.25 [0.63;2.50]	0.519	0.630	173
Número de recidivas:						0.376	88
1	44 (50.0%)	11 (50.0%)	33 (50.0%)	Ref.	Ref.		
2	24 (27.3%)	4 (18.2%)	20 (30.3%)	1.62 [0.47;6.73]	0.454		
≥3	20 (22.7%)	7 (31.8%)	13 (19.7%)	0.62 [0.20;2.05]	0.427		
Tiempo a 1º recidiva (meses)	16.0 [8.00;28.0]	17.5 [12.0;29.5]	14.0 [7.00;27.2]	0.98 [0.95;1.01]	0.137	0.210	88
Progresión:						0.008	173
No	143 (82.7%)	39 (86.7%)	104 (81.2%)	Ref.	Ref.		
T1	14 (8.09%)	6 (13.3%)	8 (6.25%)	. [.;.]	.		
>T1	16 (9.25%)	0 (0.00%)	16 (12.5%)	. [.;.]	.		
Tiempo a progresión (meses)	20.5 [9.50;54.8]	43.5 [25.2;59.5]	16.0 [7.75;43.5]	0.99 [0.96;1.02]	0.375	0.254	30
Mortalidad por TMV (78 m)	11 (10.9%)	0 (0.00%)	11 (13.8%)	. [.;.]	.	0.114	101
MICA:						0.393	175
+ (débil)	124 (70.9%)	31 (77.5%)	93 (68.9%)	Ref.	Ref.		
++ (intensa)	51 (29.1%)	9 (22.5%)	42 (31.1%)	1.54 [0.69;3.72]	0.301		
NKG2D:						0.945	165
+ (débil)	61 (37.0%)	13 (35.1%)	48 (37.5%)	Ref.	Ref.		
++ (intensa)	104 (63.0%)	24 (64.9%)	80 (62.5%)	0.91 [0.41;1.93]	0.803		
CD8 epiteliales	11.5 [3.00;34.8]	9.00 [2.50;22.5]	15.0 [3.00;42.0]	1.02 [1.00;1.04]	0.072	0.114	156
CD8 estroma:						0.115	157
no	7 (4.46%)	0 (0.00%)	7 (5.98%)	Ref.	Ref.		
1-9	66 (42.0%)	20 (50.0%)	46 (39.3%)	. [.;.]	.		
10-30	29 (18.5%)	10 (25.0%)	19 (16.2%)	. [.;.]	.		
>30	55 (35.0%)	10 (25.0%)	45 (38.5%)	. [.;.]	.		
CD4 epiteliales	10.5 [2.75;30.0]	10.0 [2.00;21.5]	11.0 [3.00;31.0]	1.01 [0.99;1.03]	0.403	0.370	152
CD4 estroma:						0.468	152
no	4 (2.63%)	1 (2.86%)	3 (2.56%)	Ref.	Ref.		
1-9	38 (25.0%)	12 (34.3%)	26 (22.2%)	0.78 [0.03;7.57]	0.849		
10-30	34 (22.4%)	6 (17.1%)	28 (23.9%)	1.64 [0.05;17.2]	0.721		
>30	76 (50.0%)	16 (45.7%)	60 (51.3%)	1.35 [0.04;12.5]	0.820		
CD68 epiteliales:						<0.001	158
no	1 (0.63%)	1 (2.70%)	0 (0.00%)	Ref.	Ref.		
escaso	68 (43.0%)	22 (59.5%)	46 (38.0%)	. [.;.]	.		
abundante	45 (28.5%)	12 (32.4%)	33 (27.3%)	. [.;.]	.		
difuso	44 (27.8%)	2 (5.41%)	42 (34.7%)	. [.;.]	.		
CD68 estroma:						0.040	158
1-9	38 (24.1%)	13 (35.1%)	25 (20.7%)	Ref.	Ref.		
10-30	45 (28.5%)	13 (35.1%)	32 (26.4%)	1.28 [0.50;3.29]	0.612		
>30	75 (47.5%)	11 (29.7%)	64 (52.9%)	2.98 [1.17;7.76]	0.022		
CD56 epiteliales	3.00 [0.00;6.00]	3.00 [1.00;6.25]	2.00 [0.00;5.75]	1.02 [0.97;1.07]	0.387	0.318	130
CD56 estroma:						0.485	131
no	24 (18.3%)	4 (12.5%)	20 (20.2%)	Ref.	Ref.		
1-9	85 (64.9%)	24 (75.0%)	61 (61.6%)	. [.;.]	.		
10-30	17 (13.0%)	4 (12.5%)	13 (13.1%)	. [.;.]	.		
>30	5 (3.82%)	0 (0.00%)	5 (5.05%)	. [.;.]	.		

CD34	52.0 [35.2;84.8] 4.00	46.5 [26.8;69.8] 4.00	52.0 [37.2;86.5] 4.00	1.00 [0.99;1.01]	0.347	0.228	158
CD117 estroma	[1.00;11.0] 3.00	[0.75;11.0] 4.00	[1.00;10.0] 2.00	1.00 [0.96;1.03]	0.904	0.920	137
CD117 epitelial	[0.00;7.00]	[0.25;8.75]	[0.00;5.00]	0.96 [0.90;1.01]	0.122	0.084	139
CD15 categorizada:						0.211	168
No	41 (24.4%)	7 (18.9%)	34 (26.0%)	Ref.	Ref.		
Focal	53 (31.5%)	9 (24.3%)	44 (33.6%)	1.01 [0.32;3.04]	0.985		
Homogéneo	74 (44.0%)	21 (56.8%)	53 (40.5%)	0.53 [0.19;1.34]	0.184		

### Edad:

En ambos grupos tumorales (bajo y alto grado) el rango de edad más frecuente observado fue el de 60-74 años (42.2 % vs. 46.7 %). En los pacientes de edades entre 35-59 años fue más frecuente los tumores de bajo grado con el 35.6 % en comparación con los tumores de alto grado con 17.3 %. Mientras que en el grupo de pacientes mayores de 75 años de edad predominaron los tumores de alto grado con un 36 % vs los de bajo grado con un 22.2% (p=0.024).

### Sexo:

No hubo diferencias significativas en cuanto al sexo y al grado tumoral. En los hombres fue prácticamente igual la proporción de tumores de bajo y alto grado.

### Tabaco:

En cuanto al hábito tabáquico tampoco hubo diferencias significativas. Destaca una mayor proporción de tumores de alto grado en los ex-fumadores 32.4 % vs 15.4 % de ex-fumadores con tumores de bajo grado.

### TMVMI:

Todos los tumores vesicales músculo-infiltrantes fueron de alto grado.

### Tamaño tumoral:

El 80 % de los tumores de bajo grado fueron de tamaño menor a 3 cm en comparación con el 62 % de tumores de bajo grado.

Los tumores mayores de 3 cm fueron más frecuentes en los casos de alto grado (38 %) en comparación con los de bajo grado (20 %).

#### Estadio tumoral:

En relación al estadio tumoral y grado tumoral se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ). El 95.6 % de los tumores de bajo grado fueron estadio Ta frente al 46 % de los tumores de alto grado.

Solo el 4.44 % de los tumores de bajo grado fueron estado T1 vs el 39.3 % de tumores de alto grado. El 100% de los tumores T2 fueron de alto grado.

#### Multiplicidad:

La mayoría de tumores fueron únicos (72.3 %). No se detectaron diferencias en cuanto al grado tumoral y la multiplicidad.

#### Instilaciones endovesicales:

Más de la mitad (55.6 %) de los tumores de bajo grado no recibieron ningún tipo de tratamiento con instilaciones endovesicales. El 88% de los tumores de alto grado fueron tratados con instilaciones endovesicales, la mayoría con BCG (79.7 %) y un 8.59 % con MMC.

#### Recidiva:

La recidiva fue discretamente mayor en el grupo de tumores de alto grado (52.3 %) en comparación con los tumores de bajo grado (46.7 %).

#### Número de recidivas:

La mitad de los pacientes de bajo y alto grado presentaron una (1) recidiva. Destaca que en el grupo de tumores de bajo grado un 31.8 % de los pacientes presentaron 3 o más recidivas frente al 19.7 % en los tumores de alto grado.

#### Tiempo a la primera recidiva:

El tiempo medio hasta la aparición de la primera recidiva fue más corto en los tumores de alto grado (14 meses) frente a unos 17.5 meses en los pacientes con tumores de bajo grado.

#### Progresión:

Más del 80% de los casos de bajo y alto grado no presentaron progresión tumoral.

La progresión tumoral hasta T1 fue más frecuente en los tumores de bajo grado (13.3 %) frente un 6.25 % en los tumores de alto grado.

La progresión tumoral a >T1 se presentó sólo en los casos de alto grado (12.5%).

#### Tiempo hasta la progresión:

El tiempo medio hasta la progresión fue más corto en los tumores de alto grado (16 meses) en comparación con el de los tumores de bajo grado (43.5 meses).

#### Mortalidad por TMV (78 meses):

No se observó ningún caso de mortalidad cáncer específica en los tumores de bajo grado durante el período de seguimiento de este estudio (78 meses) frente a un 13.8 % en los tumores de alto grado.

#### MICA:

No se detectaron diferencias en cuanto al grado tumoral y la expresión de MICA.

#### NKG2D:

Tampoco se detectaron diferencias en cuanto al grado tumoral y la expresión de NKG2D.

#### CD68:

En cuanto al grado tumoral y la expresión de CD68 epitelial destaca que en los tumores de bajo grado la expresión de CD68 epitelial fue escasa en el 59.5 % de los casos frente al 38 % de los casos de tumores de alto grado. En ningún caso de

los tumores de alto grado estuvo ausente la expresión de CD68 epitelial frente al 2.70 % de los casos de tumores de bajo grado.

La expresión de CD68 epitelial con patrón difuso se observó en el 34.7 % de los casos de tumores de alto grado vs. 5.41 % de los tumores de bajo grado.

Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ).

En relación a la expresión de CD68 a nivel del estroma no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

#### Otras variables moleculares:

Al comparar el grado tumoral con la expresión del resto de variables CD4, CD8, CD56, CD34, CD117 y CD15 no detectamos diferencias estadísticamente significativas.

### **5.7.2 Análisis descriptivo según el grado tumoral (OMS 1973):**

En la *Tabla 73* se observa el análisis univariante según grado tumoral de la OMS 1973 (sólo las variables en las cuales se detectaron diferencias estadísticamente significativas).

**Tabla 73.** Análisis descriptivo según el grado tumoral (OMS 1973) y resto de variables en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=195	G1 bajo grado N=45	G2 grado intermedio N=79	G3 alto grado N=71	p.valor	N
TMVMI	22 (11.3%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	22 (31.0%)	<0.001	195
Estadio tumoral:					<0.001	195
Ta	112 (57.4%)	43 (95.6%)	55 (69.6%)	14 (19.7%)		
T1	61 (31.3%)	2 (4.44%)	24 (30.4%)	35 (49.3%)		
T2	22 (11.3%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	22 (31.0%)		
Instilaciones vesicales:					<0.001	173
no	40 (23.1%)	25 (55.6%)	9 (11.4%)	6 (12.2%)		
BCG	120 (69.4%)	18 (40.0%)	61 (77.2%)	41 (83.7%)		
MMC	13 (7.51%)	2 (4.44%)	9 (11.4%)	2 (4.08%)		
CD68 epiteliales:					<0.001	158
no	1 (0.63%)	1 (2.70%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)		

escaso	68 (43.0%)	22 (59.5%)	32 (50.8%)	14 (24.1%)	
abundante	45 (28.5%)	12 (32.4%)	22 (34.9%)	11 (19.0%)	
difuso	44 (27.8%)	2 (5.41%)	9 (14.3%)	33 (56.9%)	
CD68 estroma:					<0.001 158
1-9	38 (24.1%)	13 (35.1%)	19 (30.2%)	6 (10.3%)	
10-30	45 (28.5%)	13 (35.1%)	24 (38.1%)	8 (13.8%)	
>30	75 (47.5%)	11 (29.7%)	20 (31.7%)	44 (75.9%)	

### TMVMI:

Todos los tumores vesicales músculo-infiltrantes (T2) fueron de alto grado (G3).

### Estadio tumoral:

En relación al estadio tumoral y grado tumoral se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ). El 95.6 % de los tumores de bajo grado (G1) fueron Ta, frente al 69.6 % de los tumores de grado intermedio (G2) y el 19.7 % de los tumores de alto grado (G3).

Solo el 4.44 % de los tumores de bajo grado fueron estadio T1 frente el 30.4 % de tumores de grado intermedio (G2) y al 49.3 % de los tumores de alto grado (G3).

Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ).

### Instilaciones endovesicales:

Más de la mitad (55.6 %) de los tumores de bajo grado (G1) no recibieron ningún tipo de tratamiento con instilaciones endovesicales, frente al 11.4 % de los tumores de grado intermedio (G2) y el 12.2 % de los tumores de alto grado (G3). El 83.7 % de los tumores de alto grado (G3) fueron tratados con BCG y sólo el 4.08 % con MMC.

### CD68:

En cuanto al grado tumoral y la expresión de CD68 epitelial destaca que en los tumores de bajo grado (G1) la expresión de CD68 epitelial fue escasa en el 59.5 % de los casos frente al 50.8 % de los casos de tumores de grado intermedio (G2) y al 24.1 % de los tumores de alto grado (G3). En ningún caso de los tumores de

grado intermedio (G2) ni de los tumores de alto grado estuvo ausente la expresión de CD68 epitelial frente al 2.70 % de los casos de tumores de bajo grado.

La expresión de CD68 epitelial con patrón difuso se observó en el 56.9 % de los casos de tumores de alto grado (G3), en el 14.3 % de los tumores de grado intermedio (G2) y sólo en el 5.41 % de los tumores de bajo grado (G1).

Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ).

En relación a la expresión de CD68 a nivel del estroma también se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) existiendo en los tumores de alto grado (G3) un 75.9 % de los casos con expresión de CD68 a nivel estromal de  $>30$  células por core, en los tumores de grado intermedio (G2) un 31.7% y en los tumores de bajo grado (G1) dicho patrón de expresión se presentó en un 29.7 % de los casos. La expresión de CD68 estromal de 1-9 células por core sólo estuvo presente en el 10.3% de los casos de los tumores de alto grado (G3), en el 30.2 % de los tumores de grado intermedio (G2) y en el 35.1 % de los tumores de bajo grado (G1).



## 5.8.1 Análisis descriptivo según la expresión de MICA:

La *Tabla 74* muestra el análisis descriptivo según MICA y su relación con el resto de variables en el estudio.

**Tabla 74.** Análisis descriptivo según MICA y resto de variables en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=175	MICA + (débil) N=124	MICA ++ (intensa) N=51	OR	p.ratio	p.valor	N
Edad media	68.3 (11.4)	68.1 (11.9)	68.9 (10.2)	1.01 [0.98;1.04]	0.680	0.663	175
Edad categorizada						0.592	175
35-59	36 (20.6%)	27 (21.8%)	9 (17.6%)	Ref.	Ref.		
60-74	80 (45.7%)	58 (46.8%)	22 (43.1%)	1.13 [0.46;2.91]	0.793		
>75	59 (33.7%)	39 (31.5%)	20 (39.2%)	1.52 [0.61;4.03]	0.374		
Sexo: Hombre	151 (86.3%)	106 (85.5%)	45 (88.2%)	Ref.	Ref.	0.811	175
Tabaco:						0.540	170
nunca	28 (16.5%)	22 (18.2%)	6 (12.2%)	Ref.	Ref.		
≤ a 20	19 (11.2%)	15 (12.4%)	4 (8.16%)	0.99 [0.21;4.20]	0.986		
> de 20	74 (43.5%)	52 (43.0%)	22 (44.9%)	1.52 [0.56;4.68]	0.420		
exfumador	49 (28.8%)	32 (26.4%)	17 (34.7%)	1.91 [0.67;6.11]	0.235		
Fumador	93 (54.7%)	67 (55.4%)	26 (53.1%)	0.91 [0.47;1.79]	0.786	0.917	170
Tabaco categorizada:						0.449	170
No fumador	28 (16.5%)	22 (18.2%)	6 (12.2%)	Ref.	Ref.		
Fumador	93 (54.7%)	67 (55.4%)	26 (53.1%)	1.40 [0.53;4.22]	0.513		
Ex-fumador	49 (28.8%)	32 (26.4%)	17 (34.7%)	1.91 [0.67;6.11]	0.235		
TMVMI	22 (12.6%)	13 (10.5%)	9 (17.6%)	1.83 [0.70;4.61]	0.211	0.295	175
Tamaño del tumor:						0.833	175
<3 cm	117 (66.9%)	84 (67.7%)	33 (64.7%)	Ref.	Ref.		
>3 cm	58 (33.1%)	40 (32.3%)	18 (35.3%)	1.15 [0.57;2.27]	0.698		
Estadio tumoral:						0.428	175
Ta	101 (57.7%)	73 (58.9%)	28 (54.9%)	Ref.	Ref.		
T1	52 (29.7%)	38 (30.6%)	14 (27.5%)	0.96 [0.44;2.03]	0.925		
T2	22 (12.6%)	13 (10.5%)	9 (17.6%)	1.80 [0.67;4.71]	0.239		
Grado (OMS 1973):						0.142	175
G1 bajo grado	40 (22.9%)	31 (25.0%)	9 (17.6%)	Ref.	Ref.		
G2 grado intermedio	72 (41.1%)	54 (43.5%)	18 (35.3%)	1.14 [0.46;2.98]	0.781		
G3 alto grado	63 (36.0%)	39 (31.5%)	24 (47.1%)	2.09 [0.86;5.40]	0.103		
Grado (OMS 2004):						0.393	175
bajo grado	40 (22.9%)	31 (25.0%)	9 (17.6%)	Ref.	Ref.		
alto grado	135 (77.1%)	93 (75.0%)	42 (82.4%)	1.54 [0.69;3.72]	0.301		
Multiplicidad:						0.732	175
único	125 (71.4%)	90 (72.6%)	35 (68.6%)	Ref.	Ref.		

múltiple	50 (28.6%)	34 (27.4%)	16 (31.4%)	1.21 [0.58;2.46]	0.600		
Instilaciones vesicales:						0.619	153
no	34 (22.2%)	24 (21.6%)	10 (23.8%)	Ref.	Ref.		
BCG	108 (70.6%)	80 (72.1%)	28 (66.7%)	0.84 [0.36;2.05]	0.686		
MMC	11 (7.19%)	7 (6.31%)	4 (9.52%)	1.37 [0.29;5.85]	0.674		
Recidiva	76 (49.7%)	42 (37.8%)	34 (81.0%)	6.80 [2.99;17.3]	<0.001	<b>&lt;0.001</b>	153
Número de recidivas	0.00 [0.00;1.00]	0.00 [0.00;1.00]	1.00 [1.00;2.00]	1.46 [1.11;1.92]	0.007	<b>&lt;0.001</b>	153
Número de recidivas:						0.518	76
1	39 (51.3%)	20 (46.5%)	19 (57.6%)	Ref.	Ref.		
2	21 (27.6%)	14 (32.6%)	7 (21.2%)	0.54 [0.17;1.60]	0.268		
≥3	16 (21.1%)	9 (20.9%)	7 (21.2%)	0.82 [0.24;2.70]	0.750		
Meses a 1era recidiva	16.0 [8.75;30.0]	17.0 [9.00;32.0]	16.0 [7.00;28.0]	0.98 [0.95;1.01]	0.234	0.422	76
Progresión:						<b>0.016</b>	153
No	130 (85.0%)	99 (89.2%)	31 (73.8%)	Ref.	Ref.		
T1	12 (7.84%)	8 (7.21%)	4 (9.52%)	1.62 [0.39;5.64]	0.478		
>T1	11 (7.19%)	4 (3.60%)	7 (16.7%)	5.42 [1.50;22.7]	0.010		
Meses a progresión	17.0 [10.0;44.0]	23.0 [12.0;62.0]	16.0 [9.00;38.5]	0.98 [0.95;1.02]	0.286	0.372	23
Riesgo:						0.951	153
Bajo	23 (15.0%)	17 (15.3%)	6 (14.3%)	Ref.	Ref.		
Intermedio	14 (9.15%)	11 (9.91%)	3 (7.14%)	0.79 [0.13;3.84]	0.778		
Alto	116 (75.8%)	83 (74.8%)	33 (78.6%)	1.11 [0.42;3.36]	0.841		
Supervivencia	66 (41.2%)	46 (40.7%)	20 (42.6%)	Ref.	Ref.	0.968	160
Mortalidad TMV (78 m)	10 (10.6%)	4 (5.97%)	6 (22.2%)	4.36 [1.11;19.3]	0.036	<b>0.030</b>	94
NKG2D:						1.000	160
+ (débil)	60 (37.5%)	43 (37.7%)	17 (37.0%)	Ref.	Ref.		
++ (intensa)	100 (62.5%)	71 (62.3%)	29 (63.0%)	1.03 [0.51;2.13]	0.934		
CD8 epiteliales	11.0 [3.00;33.5]	12.0 [3.00;33.5]	10.0 [1.75;31.8]	1.00 [0.98;1.02]	0.981	0.782	155
CD8 estroma:						0.412	156
no	7 (4.49%)	3 (2.70%)	4 (8.89%)	Ref.	Ref.		
1-9	66 (42.3%)	49 (44.1%)	17 (37.8%)	0.27 [0.05;1.41]	0.118		
10-30	29 (18.6%)	21 (18.9%)	8 (17.8%)	0.30 [0.05;1.74]	0.178		
>30	54 (34.6%)	38 (34.2%)	16 (35.6%)	0.33 [0.05;1.73]	0.184		
CD4 epiteliales	10.0 [2.50;28.0]	12.0 [3.00;22.5]	8.00 [2.00;38.5]	1.01 [0.99;1.02]	0.603	0.931	151
CD4 estroma:						0.812	151
no	4 (2.65%)	2 (1.87%)	2 (4.55%)	Ref.	Ref.		
1-9	38 (25.2%)	28 (26.2%)	10 (22.7%)	0.37 [0.03;3.92]	0.383		
10-30	34 (22.5%)	24 (22.4%)	10 (22.7%)	0.43 [0.04;4.58]	0.459		
>30	75 (49.7%)	53 (49.5%)	22 (50.0%)	0.42 [0.04;4.25]	0.435		
CD68 epiteliales:						0.769	153
no	1 (0.65%)	1 (0.93%)	0 (0.00%)	Ref.	Ref.		
escaso	65 (42.5%)	47 (43.5%)	18 (40.0%)	. [;.]	.		
abundante	43 (28.1%)	28 (25.9%)	15 (33.3%)	. [;.]	.		
difuso	44 (28.8%)	32 (29.6%)	12 (26.7%)	. [;.]	.		
CD68 estroma:						0.840	153
1-9	37 (24.2%)	26 (24.1%)	11 (24.4%)	Ref.	Ref.		
10-30	43 (28.1%)	29 (26.9%)	14 (31.1%)	1.14 [0.44;3.02]	0.793		

>30	73 (47.7%)	53 (49.1%)	20 (44.4%)	0.89 [0.37;2.20]	0.795		
CD56 epiteliales	3.00 [0.00;6.00]	3.00 [0.00;6.00]	2.00 [0.00;6.00]	1.01 [0.98;1.05]	0.569	0.753	126
CD56 estroma:						0.792	127
no	23 (18.1%)	14 (16.3%)	9 (22.0%)	Ref.	Ref.		
1-9	82 (64.6%)	57 (66.3%)	25 (61.0%)	0.68 [0.26;1.85]	0.444		
10-30	17 (13.4%)	11 (12.8%)	6 (14.6%)	0.86 [0.22;3.20]	0.818		
>30	5 (3.94%)	4 (4.65%)	1 (2.44%)	0.43 [0.01;3.81]	0.486		
CD34	52.0 [35.2;86.5]	53.0 [36.5;86.0]	47.0 [35.0;84.0]	1.00 [0.99;1.01]	0.562	0.319	154
CD117 estroma	4.00 [1.00;11.0]	4.00 [1.00;11.8]	4.00 [1.00;6.00]	0.98 [0.94;1.02]	0.241	0.365	136
CD117 epitelial	3.00 [0.00;7.00]	2.00 [0.00;8.00]	3.00 [0.00;5.25]	0.97 [0.91;1.04]	0.360	0.635	138
CD15 categorizada:						0.316	161
No	41 (25.5%)	32 (27.8%)	9 (19.6%)	Ref.	Ref.		
Focal	50 (31.1%)	32 (27.8%)	18 (39.1%)	1.97 [0.78;5.28]	0.153		
Homogéneo	70 (43.5%)	51 (44.3%)	19 (41.3%)	1.31 [0.54;3.41]	0.558		

### TMVMI:

En los TMVMI (T2) el 59 % presentaron expresión débil de MICA y el 41 % de los casos expresión intensa de MICA.

### Progresión:

Un 85% de los pacientes con TMVNMI no presentaron progresión tumoral (89.2% con expresión débil de MICA y 73.8 % con expresión intensa de MICA).

Destaca que un 16.7 % de los casos con expresión intensa de MICA progresaron a >T1 frente al 3.60 % de casos con expresión débil de MICA (p=0.016).

**Tabla 75.** Análisis descriptivo según MICA y progresión tumoral en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=153	MICA + N=111	MICA ++ N=42	OR	p.ratio	p.valor
Progresión:						0.016
No	130 (85.0%)	99 (89.2%)	31 (73.8%)	Ref.	Ref.	
T1	12 (7.84%)	8 (7.21%)	4 (9.52%)	1.62 [0.39;5.64]	0.478	
>T1	11 (7.19%)	4 (3.60%)	7 (16.7%)	5.42 [1.50;22.7]	0.010	

A continuación se describen las variables que alcanzaron la significación estadística en el análisis univariante.

Recidiva:

El 49.7 % de los casos de TMVNMI presentaron recidiva (76/153 casos). Se observó que el 55.26 % (42/76 casos) de las recidivas eran pacientes con expresión débil de MICA y el 44.74 % de los casos (34/76 casos) con expresión intensa de MICA.

Destaca que en el grupo de pacientes con TMVNMI y expresión intensa de MICA el 81% (34/42 casos) recidivaron ( $p < 0.001$ ). Siendo la expresión elevada de MICA un factor de riesgo para la recidiva.

**Tabla 76.** Análisis descriptivo según MICA y recidiva en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=153	MICA + N= 111	MICA ++ N= 42	OR	p.ratio	p- valor
<b>Recidiva</b>	76	42 (55.3%)	34 (44.7%)	6.80 [2.99;17.3]	<0.001	<0.001

Número de recidivas:

El 51.3 % de los pacientes presentaron una (1) recidiva, sólo el 21.1 % presentaron 3 o más recidivas. No hubo diferencias significativas entre el grado de expresión de MICA y el número de recidivas (ver *Tabla 74*).

Resto de variables:

Con el resto de las variables (ver *Tabla 74*) no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al grado de expresión de MICA en el análisis univariante.

### 5.8.1.1 Modelo de regresión logística para MICA:

Con las variables que fueron significativas se realizó un análisis multivariado mediante un modelo de regresión logística.

MICA y NKG2D están muy relacionadas entre sí, es por ello que en el modelo de regresión logística, para evitar influir en los resultados se analizó MICA y el resto de variables del estudio, excluyendo NKG2D del modelo.

La *Tabla 77* muestra los resultados del análisis de regresión logística para MICA en individuos con tumor vesical (pTa-pT2).

Vemos que el tumor vesical músculo-infiltrante (TMVMI) es un factor de riesgo para tener mayores niveles de MICA (OR: 1.83, IC 95%: 0.728; 4.596,  $p=0.199$ ), es decir, los pacientes con tumores infiltrantes tienen niveles de expresión de MICA elevados, aunque no es estadísticamente significativo.

**Tabla 77.** Regresión logística predictores independientes de MICA en individuos con tumor vesical.

	OR	IC 95%	p.valor
TMVMI	1.83	[0.728;4.596]	0.199

TMVMI: tumor vesical músculo-infiltrante

La *Tabla 78* muestra los resultados del análisis de regresión logística para MICA en individuos con tumor vesical no músculo infiltrante (TMVNMI).

Vemos que la recidiva es un factor de riesgo para MICA (OR: 6.982, IC 95%: 2.983; 16.506,  $p<0.001$ ), es decir, la presencia de recidiva se relaciona con un mayor riesgo de elevación de MICA.

**Tabla 78.** Regresión logística predictores independientes de MICA en individuos con TMVNMI.

	OR	IC 95%	p.valor
Recidiva: Si	6.982	[2.953;16.506]	<0.001

## 5.8.2 Análisis descriptivo según la expresión de NKG2D:

La *Tabla 79* muestra el análisis descriptivo según NKG2D y su relación con el resto de variables en nuestro estudio.

**Tabla 79.** Análisis descriptivo según NKG2D y resto de variables en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=165	NKG2D + (débil) N=61	NKG2D ++ (intensa) N=104	OR	p.ratio	p.valor	N
Edad media	68.2 (11.3)	66.7 (12.5)	69.0 (10.5)	1.02 [0.99;1.05]	0.203	0.224	165
Edad categorizada						0.335	165
35-59	36 (21.8%)	17 (27.9%)	19 (18.3%)	Ref.	Ref.		
60-74	73 (44.2%)	24 (39.3%)	49 (47.1%)	1.82 [0.80;4.16]	0.156		
>75	56 (33.9%)	20 (32.8%)	36 (34.6%)	1.60 [0.68;3.81]	0.283		
Sexo: Hombre	142 (86.1%)	50 (82.0%)	92 (88.5%)	Ref.	Ref.	0.352	165
Tabaco:						0.488	161
nunca	25 (15.5%)	7 (11.7%)	18 (17.8%)	Ref.	Ref.		
≤ a 20	19 (11.8%)	7 (11.7%)	12 (11.9%)	0.67 [0.18;2.50]	0.553		
> de 20	71 (44.1%)	25 (41.7%)	46 (45.5%)	0.73 [0.25;1.93]	0.529		
exfumador	46 (28.6%)	21 (35.0%)	25 (24.8%)	0.47 [0.15;1.33]	0.157		
Fumador	90 (55.9%)	32 (53.3%)	58 (57.4%)	1.18 [0.62;2.25]	0.617	0.733	161
Tabaco categorizada:						0.299	161
No fumador	25 (15.5%)	7 (11.7%)	18 (17.8%)	Ref.	Ref.		
Fumador	90 (55.9%)	32 (53.3%)	58 (57.4%)	0.71 [0.25;1.85]	0.498		
Ex-fumador	46 (28.6%)	21 (35.0%)	25 (24.8%)	0.47 [0.15;1.33]	0.157		
TMVMI	22 (13.3%)	12 (19.7%)	10 (9.62%)	0.44 [0.17;1.10]	0.077	0.110	165
Tamaño del tumor:						1.000	165
<3 cm	112 (67.9%)	41 (67.2%)	71 (68.3%)	Ref.	Ref.		
>3 cm	53 (32.1%)	20 (32.8%)	33 (31.7%)	0.95 [0.48;1.89]	0.886		
Estadio tumoral:						0.138	165
Ta	93 (56.4%)	34 (55.7%)	59 (56.7%)	Ref.	Ref.		
T1	50 (30.3%)	15 (24.6%)	35 (33.7%)	1.34 [0.64;2.86]	0.440		
T2	22 (13.3%)	12 (19.7%)	10 (9.62%)	0.48 [0.18;1.25]	0.134		
Grado (OMS 1973):						0.965	165
G1 bajo grado	37 (22.4%)	13 (21.3%)	24 (23.1%)	Ref.	Ref.		
G2 grado intermedio	69 (41.8%)	26 (42.6%)	43 (41.3%)	0.90 [0.38;2.07]	0.804		
G3 alto grado	59 (35.8%)	22 (36.1%)	37 (35.6%)	0.91 [0.38;2.16]	0.838		
Grado (OMS 2004):						0.945	165
bajo grado	37 (22.4%)	13 (21.3%)	24 (23.1%)	Ref.	Ref.		
alto grado	128 (77.6%)	48 (78.7%)	80 (76.9%)	0.91 [0.41;1.93]	0.803		
Multiplicidad:						0.186	165
único	122 (73.9%)	41 (67.2%)	81 (77.9%)	Ref.	Ref.		

múltiple	43 (26.1%)	20 (32.8%)	23 (22.1%)	0.58 [0.29;1.19]	0.140		
Instilaciones vesicales:						0.324	143
no	31 (21.7%)	7 (14.3%)	24 (25.5%)	Ref.	Ref.		
BCG	102 (71.3%)	38 (77.6%)	64 (68.1%)	0.50 [0.18;1.23]	0.135		
MMC	10 (6.99%)	4 (8.16%)	6 (6.38%)	0.45 [0.09;2.25]	0.317		
Recidiva	72 (50.3%)	35 (71.4%)	37 (39.4%)	0.26 [0.12;0.55]	<0.001	<b>0.001</b>	143
Número de recidivas	1.00 [0.00;2.00]	1.00 [0.00;2.00]	0.00 [0.00;1.00]	0.75 [0.58;0.96]	0.023	<b>0.001</b>	143
Número de recidivas:						0.766	72
1	35 (48.6%)	19 (52.8%)	16 (44.4%)	Ref.	Ref.		
2	18 (25.0%)	8 (22.2%)	10 (27.8%)	1.47 [0.46;4.80]	0.515		
≥3	19 (26.4%)	9 (25.0%)	10 (27.8%)	1.31 [0.42;4.15]	0.641		
Meses a 1era recidiva	16.0 [9.00;28.5]	16.5 [10.5;23.5]	15.5 [8.75;30.2]	1.00 [0.97;1.02]	0.704	0.942	72
Progresión:						<b>0.007</b>	143
No	118 (82.5%)	34 (69.4%)	84 (89.4%)	Ref.	Ref.		
T1	13 (9.09%)	9 (18.4%)	4 (4.26%)	0.19 [0.05;0.62]	0.006		
>T1	12 (8.39%)	6 (12.2%)	6 (6.38%)	0.41 [0.12;1.43]	0.156		
Meses a progresión	29.0 [11.0;58.0]	29.0 [14.5;59.5]	22.5 [5.25;54.0]	0.99 [0.97;1.02]	0.686	0.390	25
Riesgo:						0.368	143
Bajo	23 (16.1%)	6 (12.2%)	17 (18.1%)	Ref.	Ref.		
Intermedio	12 (8.39%)	6 (12.2%)	6 (6.38%)	0.37 [0.08;1.63]	0.187		
Alto	108 (75.5%)	37 (75.5%)	71 (75.5%)	0.69 [0.23;1.83]	0.467		
Supervivencia	66 (44.0%)	23 (41.8%)	43 (45.3%)	Ref.	Ref.	0.811	150
Mortalidad TMV (78 m)	9 (10.7%)	9 (28.1%)	0 (0.00%)	. [.;.]	.	<b>&lt;0.001</b>	84
MICA:						1.000	160
+ (débil)	114 (71.2%)	43 (71.7%)	71 (71.0%)	Ref.	Ref.		
++ (intensa)	46 (28.7%)	17 (28.3%)	29 (29.0%)	1.03 [0.51;2.13]	0.934		
CD8 epiteliales	11.0 [3.00;35.5]	9.00 [2.00;35.0]	12.5 [4.00;35.0]	1.01 [0.99;1.02]	0.467	0.326	147
CD8 estroma:						0.985	147
no	7 (4.76%)	3 (5.45%)	4 (4.35%)	Ref.	Ref.		
1-9	61 (41.5%)	23 (41.8%)	38 (41.3%)	1.25 [0.21;6.49]	0.792		
10-30	26 (17.7%)	10 (18.2%)	16 (17.4%)	1.20 [0.19;6.99]	0.837		
>30	53 (36.1%)	19 (34.5%)	34 (37.0%)	1.35 [0.23;7.12]	0.725		
CD4 epiteliales	11.5 [2.00;30.0]	12.0 [1.00;20.8]	10.5 [3.00;35.5]	1.01 [0.99;1.03]	0.312	0.272	148
CD4 estroma:						0.922	148
no	4 (2.70%)	2 (3.45%)	2 (2.22%)	Ref.	Ref.		
1-9	37 (25.0%)	14 (24.1%)	23 (25.6%)	1.62 [0.15;17.1]	0.668		
10-30	33 (22.3%)	14 (24.1%)	19 (21.1%)	1.35 [0.13;14.3]	0.793		
>30	74 (50.0%)	28 (48.3%)	46 (51.1%)	1.63 [0.16;16.4]	0.656		
CD68 epiteliales:						0.769	153
no	1 (0.65%)	1 (1.69%)	0 (0.00%)	Ref.	Ref.		
escaso	67 (43.8%)	26 (44.1%)	41 (43.6%)	. [.;.]	.		
abundante	41 (26.8%)	15 (25.4%)	26 (27.7%)	. [.;.]	.		
difuso	44 (28.8%)	17 (28.8%)	27 (28.7%)	. [.;.]	.		
CD68 estroma:						0.956	153
1-9	37 (24.2%)	14 (23.7%)	23 (24.5%)	Ref.	Ref.		
10-30	42 (27.5%)	17 (28.8%)	25 (26.6%)	0.90 [0.36;2.24]	0.816		

>30	74 (48.4%)	28 (47.5%)	46 (48.9%)	1.00 [0.44;2.26]	0.996		
CD56 epiteliales	3.00 [0.00;6.00]	3.00 [1.00;8.00]	2.00 [0.00;5.00]	0.99 [0.95;1.02]	0.478	<b>0.021</b>	127
CD56 estroma:						0.881	128
no	23 (18.0%)	7 (14.6%)	16 (20.0%)	Ref.	Ref.		
1-9	83 (64.8%)	33 (68.8%)	50 (62.5%)	0.67 [0.23;1.78]	0.431		
10-30	17 (13.3%)	6 (12.5%)	11 (13.8%)	0.81 [0.20;3.22]	0.756		
>30	5 (3.91%)	2 (4.17%)	3 (3.75%)	0.66 [0.08;6.66]	0.699		
CD34	52.0 [35.8;85.5]	51.0 [38.0;74.0]	52.0 [35.0;87.0]	1.00 [0.99;1.01]	0.755	0.837	152
CD117 estroma	4.00 [1.00;11.0]	5.00 [2.00;14.2]	3.00 [0.00;9.00]	0.97 [0.94;1.00]	0.042	0.065	133
CD117 epitelial	3.00 [0.00;6.50]	2.50 [0.00;4.00]	3.00 [0.00;7.00]	1.04 [0.98;1.11]	0.203	0.819	135
CD15 categorizada:						0.104	160
No	40 (25.0%)	13 (21.7%)	27 (27.0%)	Ref.	Ref.		
Focal	49 (30.6%)	14 (23.3%)	35 (35.0%)	1.20 [0.48;3.02]	0.695		
Homogéneo	71 (44.4%)	33 (55.0%)	38 (38.0%)	0.56 [0.24;1.25]	0.158		

A continuación se describen las variables que alcanzaron una significación estadística en el análisis univariante.

#### Recidiva:

El 71.4 % de los pacientes con expresión débil de NKG2D presentaron recidiva tumoral en comparación con el 39.4 % de los pacientes con expresión intensa de NKG2D ( $p < 0.001$ ). Observando una relación inversa entre los niveles de NKG2D y la recidiva tumoral, a mayor recidiva menor expresión de NKG2D.

**Tabla 80.** Análisis descriptivo según NKG2D y la recidiva en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=143	NKG2D + N=49	NKG2D ++ N=94	OR	p.ratio	p.valor
Recidiva	72 (50.3%)	35 (71.4%)	37 (39.4%)	0.26 [0.12;0.55]	<0.001	0.001



### Mortalidad por TMV:

No se presentó ningún caso de muerte por tumor vesical durante los 78 meses de seguimiento en los pacientes con expresión intensa de NKG2D frente a 9 casos en el grupo de pacientes con expresión débil de NKG2D.

**Tabla 81.** Análisis descriptivo según NKG2D y mortalidad por TMV (a 78 meses).

	[ALL] N=84	NKG2D + N=32	NKG2D ++ N=52
Mortalidad por TMV (78 meses)	9 (10.7%)	9 (28.1%)	0 (0.00%)

### **5.8.2.1 Modelo de regresión logística para NKG2D:**

Con las variables que fueron significativas se realizó un análisis multivariado mediante un modelo de regresión logística.

Como se mencionó previamente MICA y NKG2D están muy relacionadas entre sí, es por ello que en el modelo de regresión logística, para evitar influir en los resultados se analizó NKG2D y el resto de variables del estudio, excluyendo MICA del modelo.

La *Tabla 82* muestra los resultados del análisis de regresión logística para NKG2D en individuos con tumor vesical (Ta-T2).

Vemos que la edad es un factor protector de niveles bajos de NKG2D (OR: 1.053, IC 95%: 1.004; 1.105, p=0.035), es decir, a mayor edad existe un mayor riesgo de tener niveles elevados de NKG2D.

**Tabla 82.** Regresión logística predictores independientes de NKG2D en individuos con TMV.

	OR	IC 95%	p-valor
Edad	1.053	[1.004;1.105]	0.035
Sexo	0.069	[0.007;0.677]	0.022
Fumador	0.144	[0.013;1.587]	0.114
Ex-fumador	0.034	[0.003;0.434]	0.009
TMVMI	0.34	[0.103;1.13]	0.078
Multiplicidad	0.328	[0.126;0.857]	0.023
CD117 estroma	0.938	[0.898;0.98]	0.004
CD15 focal	0.447	[0.122;1.639]	0.224
CD15 homogéneo	0.217	[0.069;0.685]	0.009

En cuanto al género (OR: 0.069, IC 95% [0.007; 0.677], p=0.022) los hombres tienen un mayor riesgo de NKG2D alto que las mujeres.

Lo mismo ocurre para el resto de variables que aparecen en el modelo de regresión logística de NKG2D: fumador, exfumador, tumor vesical músculo-infiltrante (T2), multiplicidad, expresión de CD117 a nivel del estroma y la expresión de CD15 homogénea o focal. Estos pacientes tienen un menor riesgo de NKG2D alto.

En la *Tabla 83* se muestran los resultados del modelo de regresión logística para NKG2D en individuos con tumor vesical no músculo infiltrante, en el cual se incluyeron todas las variables del estudio con significación estadística en el modelo univariante y se excluyó MICA.

**Tabla 83.** Regresión logística predictores independientes de NKG2D en individuos con TMVNMI.

	OR	IC 95%	p.valor
Recidiva: Si	0.417	[0.167;1.041]	0.061
Progresión: T1	0.153	[0.028;0.828]	0.029
Progresión: >T1	0.835	[0.183;3.802]	0.815
CD117 estroma	0.96	[0.925;0.996]	0.03

Sólo la progresión a T1 demostró ser un factor de riesgo para valores bajos de NKG2D (p=0.029).

### 5.9.1 Análisis descriptivo según la recidiva:

En nuestra serie la tasa de recidiva fue del 50.9 % tras un tiempo de seguimiento medio de 78 meses.

Del total de pacientes que recidivaron (n=88) el 41.4% lo hizo a los 12 meses, el 72.4% a los 24 meses, el 89.7 % a los 36 meses y el 98.4 % a los 48 meses.

El tiempo medio hasta la primera recidiva fue de 16 meses.

El 85.2 % de los pacientes eran hombres, un 54 % fumadores y en relación a la edad de los pacientes con recidiva, el 46.6 % tenían edades comprendidas entre 60-74 años.

El 76.1 % (67 casos) de los tumores de alto grado recidivó frente a el 23.9 % (21 casos) de los tumores de bajo grado. El 50% de los casos tuvo una (1) sola recidiva, el 27.3 % dos (2) recidivas y el 22.7 % de los casos tres (3) o más recidivas.

En la *Tabla 84* se presenta la relación de la recidiva con el resto de variables analizadas, independientemente de que existan o no diferencias. Posteriormente se presentan por separado las variables en las cuales se detectaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la recidiva tumoral.

**Tabla 84.** Análisis descriptivo según recidiva y resto de las variables en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	No N=85	Si N=88	OR	p.valor	N
Edad media	67.8 (11.4)	68.7 (12.0)	67.0 (10.7)	0.99 [0.96;1.01]	0.339	173
Edad categorizada:					0.943	173
35-59	40 (23.1%)	19 (22.4%)	21 (23.9%)	Ref.		
60-74	80 (46.2%)	39 (45.9%)	41 (46.6%)	0.95 [0.44;2.05]		
>75	53 (30.6%)	27 (31.8%)	26 (29.5%)	0.87 [0.38;2.00]		
Sexo:					0.898	173
Hombre	149 (86.1%)	74 (87.1%)	75 (85.2%)	Ref.		

Mujer	24 (13.9%)	11 (12.9%)	13 (14.8%)	1.16 [0.48;2.83]		
Tabaco:					0.037	169
nunca	27 (16.0%)	18 (22.0%)	9 (10.3%)	Ref.		
≤ 20	21 (12.4%)	11 (13.4%)	10 (11.5%)	1.79 [0.55;6.02]		
> 20	75 (44.4%)	38 (46.3%)	37 (42.5%)	1.92 [0.77;5.05]		
exfumador	46 (27.2%)	15 (18.3%)	31 (35.6%)	4.02 [1.48;11.6]		
Fumador	96 (56.8%)	49 (59.8%)	47 (54.0%)	0.79 [0.43;1.46]	0.551	169
Tabaco categorizada:					0.015	169
No fumador	27 (16.0%)	18 (22.0%)	9 (10.3%)	Ref.		
Fumador	96 (56.8%)	49 (59.8%)	47 (54.0%)	1.90 [0.78;4.87]		
Ex-fumador	46 (27.2%)	15 (18.3%)	31 (35.6%)	4.02 [1.48;11.6]		
Tamaño del tumor:					0.870	173
<3 cm	116 (67.1%)	58 (68.2%)	58 (65.9%)	Ref.		
>3 cm	57 (32.9%)	27 (31.8%)	30 (34.1%)	1.11 [0.59;2.11]		
Estadio tumoral:					0.627	173
Ta	112 (64.7%)	53 (62.4%)	59 (67.0%)	Ref.		
T1	61 (35.3%)	32 (37.6%)	29 (33.0%)	0.82 [0.43;1.53]		
Grado (OMS 1973):					0.231	173
G1 bajo grado	45 (26.0%)	24 (28.2%)	21 (23.9%)	Ref.		
G2 grado intermedio	79 (45.7%)	42 (49.4%)	37 (42.0%)	1.01 [0.48;2.12]		
G3 alto grado	49 (28.3%)	19 (22.4%)	30 (34.1%)	1.79 [0.79;4.14]		
Grado (OMS 2004):					0.630	173
bajo grado	45 (26.0%)	24 (28.2%)	21 (23.9%)	Ref.		
alto grado	128 (74.0%)	61 (71.8%)	67 (76.1%)	1.25 [0.63;2.50]		
Multiplicidad:					0.488	173
único	123 (71.1%)	63 (74.1%)	60 (68.2%)	Ref.		
múltiple	50 (28.9%)	22 (25.9%)	28 (31.8%)	1.33 [0.69;2.61]		
Instilaciones vesicales:					0.971	173
no	40 (23.1%)	20 (23.5%)	20 (22.7%)	Ref.		
BCG	120 (69.4%)	59 (69.4%)	61 (69.3%)	1.03 [0.50;2.13]		
MMC	13 (7.51%)	6 (7.06%)	7 (7.95%)	1.16 [0.32;4.31]		
Número de recidivas	1.00 [0.00;2.00]	0.00 [0.00;0.00]	1.50 [1.00;2.00]	3614 [221;59153]	<0.001	173
Número de recidivas:					1.000	88
1	44 (50.0%)	1 (100%)	43 (49.4%)	Ref.		
2	24 (27.3%)	0 (0.00%)	24 (27.6%)	. [.;.]		
≥3	20 (22.7%)	0 (0.00%)	20 (23.0%)	. [.;.]		
Meses a 1era recidiva	16.0 [8.00;28.0]	137 [137;137]	16.0 [8.00;28.0]	0.60 [0.00;.]	0.087	88
Progresión:					<0.001	173
No	143 (82.7%)	83 (97.6%)	60 (68.2%)	Ref.		
T1	14 (8.09%)	1 (1.18%)	13 (14.8%)	15.7 [2.98;390]		
>T1	16 (9.25%)	1 (1.18%)	15 (17.0%)	18.1 [3.51;446]		
Meses a 1era progresión	20.5 [9.50;54.8]	41.5 [21.2;61.8]	20.5 [10.5;48.2]	0.99 [0.95;1.04]	0.835	30
Grupo de riesgo:					0.343	173
Bajo	27 (15.6%)	12 (14.1%)	15 (17.0%)	Ref.		
Intermedio	15 (8.67%)	10 (11.8%)	5 (5.68%)	0.41 [0.10;1.53]		

Alto	131 (75.7%)	63 (74.1%)	68 (77.3%)	0.87 [0.37;2.00]		
Muerte cáncer vesical (78 meses)	4 (4.88%)	0 (0.00%)	4 (8.70%)	. [.;.]	0.127	82
MICA:					<0.001	153
+ (débil)	111 (72.5%)	69 (89.6%)	42 (55.3%)	Ref.		
++ (intensa)	42 (27.5%)	8 (10.4%)	34 (44.7%)	6.80 [2.99;17.3]		
NKG2D:					0.001	143
+ (débil)	49 (34.3%)	14 (19.7%)	35 (48.6%)	Ref.		
++ (intensa)	94 (65.7%)	57 (80.3%)	37 (51.4%)	0.26 [0.12;0.55]		
MICA y NKG2D:					<0.001	138
Mica bajo y NKG2D alto	63 (45.7%)	49 (69.0%)	14 (20.9%)	Ref.		
Mica bajo y NKG2D bajo	38 (27.5%)	14 (19.7%)	24 (35.8%)	. [.;.]		
Mica alto y NKG2D alto	27 (19.6%)	8 (11.3%)	19 (28.4%)	. [.;.]		
Mica alto y NKG2D bajo	10 (7.25%)	0 (0.00%)	10 (14.9%)	. [.;.]		
CD8 epiteliales	10.0 [2.50;31.0]	14.5 [3.00;38.8]	8.00 [2.00;26.5]	0.98 [0.97;1.00]	0.128	135
CD8 estroma:					0.213	136
no	7 (5.15%)	1 (1.47%)	6 (8.82%)	Ref.		
1-9	61 (44.9%)	31 (45.6%)	30 (44.1%)	0.18 [0.01;1.20]		
10-30	26 (19.1%)	12 (17.6%)	14 (20.6%)	0.22 [0.01;1.63]		
>30	42 (30.9%)	24 (35.3%)	18 (26.5%)	0.14 [0.01;0.98]		
CD4 epiteliales	9.00 [2.00;22.0]	13.0 [3.25;30.8]	6.00 [1.00;18.0]	0.97 [0.95;1.00]	0.011	131
CD4 estroma:					0.129	131
no	4 (3.05%)	1 (1.52%)	3 (4.62%)	Ref.		
1-9	38 (29.0%)	14 (21.2%)	24 (36.9%)	0.62 [0.02;5.97]		
10-30	31 (23.7%)	17 (25.8%)	14 (21.5%)	0.31 [0.01;2.97]		
>30	58 (44.3%)	34 (51.5%)	24 (36.9%)	0.26 [0.01;2.39]		
CD68 epiteliales:					0.875	137
no	1 (0.73%)	1 (1.49%)	0 (0.00%)	Ref.		
escaso	67 (48.9%)	34 (50.7%)	33 (47.1%)	. [.;.]		
abundante	43 (31.4%)	20 (29.9%)	23 (32.9%)	. [.;.]		
difuso	26 (19.0%)	12 (17.9%)	14 (20.0%)	. [.;.]		
CD68 estroma:					0.162	137
1-9	38 (27.7%)	22 (32.8%)	16 (22.9%)	Ref.		
10-30	45 (32.8%)	17 (25.4%)	28 (40.0%)	2.23 [0.93;5.53]		
>30	54 (39.4%)	28 (41.8%)	26 (37.1%)	1.27 [0.55;2.98]		
CD56 epiteliales	2.00 [0.00;4.00]	2.00 [0.00;4.75]	2.00 [0.00;4.00]	1.00 [0.95;1.05]	0.550	109
CD56 estroma:					0.426	110
no	22 (20.0%)	8 (14.5%)	14 (25.5%)	Ref.		
1-9	74 (67.3%)	39 (70.9%)	35 (63.6%)	. [.;.]		
10-30	13 (11.8%)	7 (12.7%)	6 (10.9%)	. [.;.]		
>30	1 (0.91%)	1 (1.82%)	0 (0.00%)	. [.;.]		
CD34	50.0 [31.0;83.0]	55.0 [35.0;91.5]	47.0 [29.0;75.0]	1.00 [0.99;1.00]	0.212	137
CD117 estroma	3.00 [1.00;10.0]	3.00 [1.00;10.0]	4.00 [1.00;9.00]	0.99 [0.96;1.03]	0.948	118
CD117 epitelial	3.00 [0.00;8.00]	3.00 [0.50;8.50]	3.00 [0.00;7.00]	0.97 [0.91;1.02]	0.389	122
CD15 categorizada:					0.676	146

No	34 (23.3%)	19 (26.4%)	15 (20.3%)	Ref.
Focal	43 (29.5%)	20 (27.8%)	23 (31.1%)	1.45 [0.58;3.65]
Homogéneo	69 (47.3%)	33 (45.8%)	36 (48.6%)	1.38 [0.60;3.20]

### Progresión:

Fue más frecuente la progresión tumoral en los pacientes con recidiva.

El 97.6 % de los pacientes sin recidiva tumoral no presentaron progresión tumoral, frente al 68.2 % de los que si la presentaron. En los pacientes con recidiva tumoral la progresión a T1 se observó en un 14.8 % de los casos frente al 1.18 % de los casos sin recidiva tumoral. Para la progresión >T1 evidenciamos algo similar, estando presente en el 17 % de los pacientes con recidiva tumoral frente al 1.18 % de los pacientes sin recidiva. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ).

**Tabla 85.** Análisis descriptivo según recidiva y la progresión en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	No N=85	Si N=88	OR	p.valor
Progresión:					<0.001
No	143 (82.7%)	83 (97.6%)	60 (68.2%)	Ref.	
T1	14 (8.09%)	1 (1.18%)	13 (14.8%)	15.7 [2.98;390]	
>T1	16 (9.25%)	1 (1.18%)	15 (17.0%)	18.1 [3.51;446]	
Meses hasta progresión	20.5 [9.50;54.8]	41.5 [21.2;61.8]	20.5 [10.5;48.2]	0.99 [0.95;1.04]	0.835

Los pacientes con recidiva tumoral tuvieron un tiempo medio hasta la progresión de 20.5 meses frente a 41.5 meses en los pacientes sin recidiva.

### MICA:

El 55.3 % de los pacientes con recidiva presentaron una expresión débil de MICA y un 44.7 % expresión intensa. Mientras que en el grupo de pacientes que no presentaron recidiva, el 10.4 % presentó una expresión intensa de MICA y el 89.6 % una expresión débil. Estas diferencias son estadísticamente significativas (OR 6.80,  $p < 0.001$ ).

A mayor expresión de MICA mayor es el riesgo de recidiva tumoral.

**Tabla 86.** Análisis descriptivo según recidiva y MICA en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	No N=85	Si N=88	OR	p.valor	N
MICA:					<0.001	153
+ (débil)	111 (72.5%)	69 (89.6%)	42 (55.3%)	Ref.		
++ (intensa)	42 (27.5%)	8 (10.4%)	34 (44.7%)	6.80 [2.99;17.3]		

### NKG2D:

El 48.6% de los casos con recidiva tuvo una expresión débil de NKG2D y el 51.4 % una expresión intensa.

En el 80.3 % de los pacientes que no presentaron recidiva se observó una expresión intensa de NKG2D frente a un 19.7% con expresión débil. Los niveles elevados de NKG2D son un factor protector para la recidiva OR 0.26 [0.12;0.55].

**Tabla 87.** Análisis descriptivo según recidiva y NKG2D en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	No N=85	Si N=88	OR	p.valor	N
NKG2D:					0.001	143
+ (débil)	49 (34.3%)	14 (19.7%)	35 (48.6%)	Ref.		
++ (intensa)	94 (65.7%)	57 (80.3%)	37 (51.4%)	0.26 [0.12;0.55]		

### Establecimiento de categorías de MICA y NKG2D:

Durante el estudio detectamos que la expresión de MICA y NKG2D está muy relacionada, no solo porque se trata de un receptor y su ligando sino porque existe una relación inversamente proporcional y otros mecanismos de regulación que explicaremos más adelante.

Por ello, creamos una nueva variable en la que definimos las siguientes categorías: la primera como la condición óptima de referencia MICA bajo y NKG2D alto, además de 3 categorías adicionales: MICA bajo y NKG2D bajo, MICA alto y NKG2D alto, MICA alto y NKG2D bajo (ver *Tabla 88*).

**Tabla 88.** Análisis descriptivo según recidiva y categorías MICA/NKG2D en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	No N=85	Si N=88	OR	p.valor	N
MICA y NKG2D:					<0.001	138
MICA ↓ y NKG2D ↑	63 (45.7%)	49 (69.0%)	14 (20.9%)	Ref.		
MICA ↓ y NKG2D ↓	38 (27.5%)	14 (19.7%)	24 (35.8%)	. [.,.]		
MICA ↑ y NKG2D ↑	27 (19.6%)	8 (11.3%)	19 (28.4%)	. [.,.]		
MICA ↑ y NKG2D ↓	10 (7.25%)	0 (0.00%)	10 (14.9%)	. [.,.]		

Cabe destacar que el 100 % de los casos con la asociación de MICA alto y NKG2D bajo recidivaron.

Evidenciamos que del grupo de pacientes sin recidiva ninguno presentaba la asociación de MICA alto y NKG2D bajo (siendo esta la peor condición para la recidiva).

Mientras que la mayor parte de pacientes que no recidivaron (69%) pertenecían al grupo con la asociación de MICA bajo y NKG2D alto.



### Otras variables moleculares:

Con el resto de variables moleculares CD4, CD8, CD68, CD56, CD34, CD117 y CD15 no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

#### **5.9.1.1 Análisis descriptivo del número de recidivas y MICA / NKG2D:**

Cuando analizamos la expresión de MICA y NKG2D según número de recidiva fue más frecuente 1 recidiva. En el grupo de pacientes con recidiva única el 51.3 % de los casos presentó una expresión débil de MICA y el 48.7 % expresión intensa. En los pacientes con 3 o más recidivas el patrón de expresión de MICA débil fue más frecuente (56% de los casos).

En el grupo de pacientes con expresión débil de NKG2D fue más frecuente la recidiva única en el 52.78 % de los casos frente al 25 % de los casos que presentaron 3 o más recidivas.

No existieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos.

**Tabla 89.** Análisis descriptivo según el número de recidivas y MICA, NKG2D en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=88	1 N=44	2 N=24	≥3 N=20	p.valor
MICA:					0.518
+ (débil)	43 (56.6%)	20 (51.3%)	14 (66.7%)	9 (56.2%)	
++ (intensa)	33 (43.4%)	19 (48.7%)	7 (33.3%)	7 (43.8%)	
NKG2D:					0.766
+ (débil)	36 (50.0%)	19 (54.3%)	8 (44.4%)	9 (47.4%)	
++ (intensa)	36 (50.0%)	16 (45.7%)	10 (55.6%)	10 (52.6%)	

### 5.9.1.2 Análisis de regresión de Cox para recidiva:

Se realizó un análisis multivariado mediante un modelo de regresión logística.

Las variables incluidas en el modelo de regresión de Cox para recidiva fueron: edad, sexo, tabaco, estadio, tamaño tumoral, recidiva, número de recidivas, grado (OMS 1973), grado (OMS 2004), multiplicidad, CD34, CD8 epitelial, CD8 estroma, CD4 estroma, CD 68 epitelial, CD56 estroma, CD117 estroma, CD117 epitelial, CD15 categorizada, instilaciones vesicales, MICA y NKG2D.

La *Tabla 90* muestra los resultados del análisis de regresión de Cox para la recidiva en individuos con TMVNMI ajustado por sexo, tabaco, progresión, CD4 epitelial CD68 epitelial, instilaciones, MICA y NKG2D.

**Tabla 90.** Regresión de Cox para Recidiva en los pacientes con TMVNMI.

	HR	IC 95%	P-Value
Sexo: Mujer	4.8	[1.583;14.554]	0.006
Fumador	3.503	[1.033;11.879]	0.044
Ex-fumador	5.214	[1.335;20.362]	0.018
Progresión: T1	2.28	[0.963;5.399]	0.061
Progresión: <T1	2.705	[1.168;6.265]	0.02
CD4 epitelial	0.967	[0.947;0.988]	0.002
CD68 epitelial	1.615	[1.095;2.381]	0.016
Instilaciones: BCG	0.481	[0.245;0.944]	0.033
Instilaciones: MMC	0.673	[0.221;2.051]	0.486
MICA bajo y NKG2D bajo	2.51	[1.091;5.776]	0.03
MICA alto y NKG2D alto	4.953	[2.111;11.621]	<0.001
MICA alto y NKG2D bajo	9.1	[3.096;26.748]	<0.001

\*La categoría de referencia es MICA bajo y NKG2D alto.

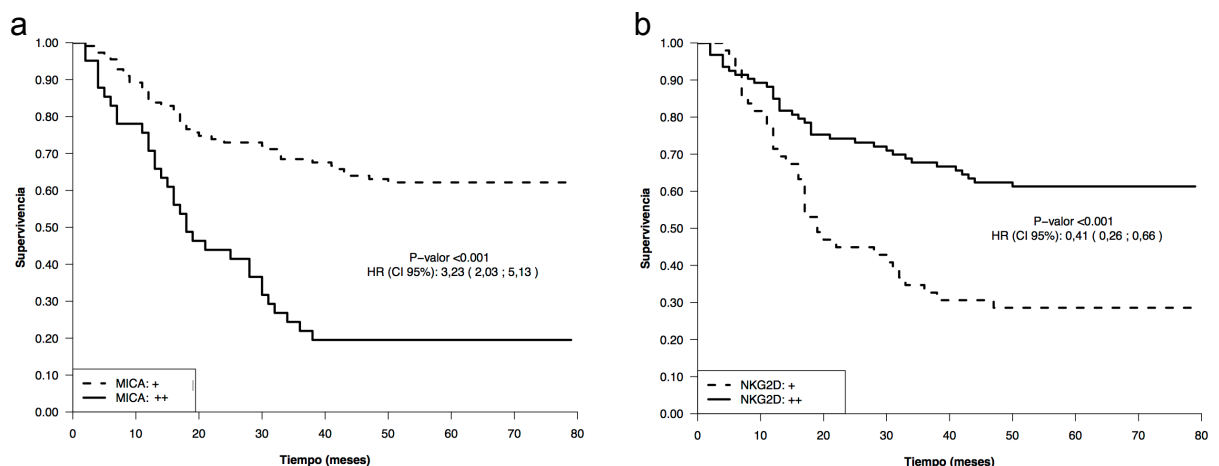
Vemos que ser mujer es un factor de riesgo para la recidiva (HR: 4.8, IC 95%: 1.583; 14.554, p=0.006). Lo mismo ocurre para los fumadores (HR: 3.5, IC 95%:

1.033; 11.879,  $p=0.044$ ) o ex-fumadores (HR: 5.2, IC 95%: 1.335; 20.362,  $p=0.018$ ), los pacientes con progresión  $>T1$  (HR: 2.7, IC 95%: 1.168 ; 6.265,  $p=0.02$ ) y la expresión epitelial de CD68 (HR: 1.6, IC 95%: 1.095;2.381,  $p=0.016$ ); mientras que los pacientes con CD4 epitelial, la asociación MICA bajo y NKG2D alto e instilaciones vesicales BCG y MMC tienen un menor riesgo de recidiva.

Se realizó un análisis mediante curvas de Kaplan-Meier para calcular la supervivencia libre de recidiva tumoral en función de los niveles de expresión de MICA y de NKG2D (Figura 33 a y b).

Los resultados demostraron que los pacientes con niveles elevados de expresión de MICA tienen mayor número de recidivas que los pacientes con niveles de expresión bajo de MICA ( $p<0.001$ ). Existe una relación inversa con NKG2D, ya que los pacientes con mayor expresión de NKG2D tienen una mayor supervivencia libre de recidiva tumoral en comparación con los que tienen menor expresión de NKG2D que tienen un mayor riesgo de recidiva ( $p<0.001$ ).

**Figura 33.** Distribución de la supervivencia libre de recidiva en pacientes con TMVNMI por a) MICA y b) NKG2D.

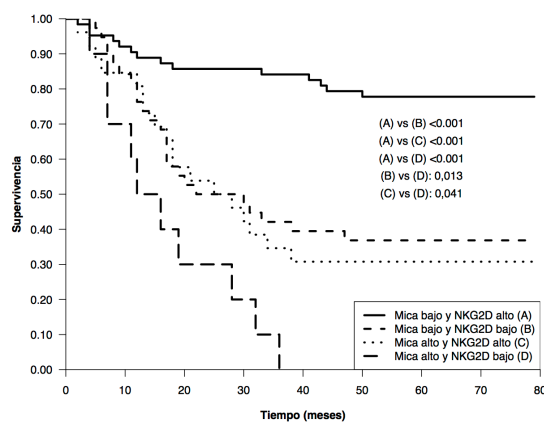


En la *Figura 34* se observa la curva de supervivencia libre de recidiva tumoral para MICA y NKG2D como una variable conjunta categorizada en: A) MICA bajo y NKG2D alto, B) MICA bajo y NKG2D bajo, C) MICA alto y NKG2D alto y D) MICA alto y NKG2D bajo.

También podemos observar las diferencias entre sí de las 4 categorías en cuanto a la supervivencia libre de recidiva tumoral y su nivel de significación estadística.

La categoría A (MICA bajo y NKG2D alto) es la categoría de referencia y cuando está presente dicha combinación representa un factor de protección para la supervivencia libre de recidiva tumoral vesical ( $p < 0.001$ ).

**Figura 34.** Distribución de la supervivencia libre de recidiva tumoral en pacientes con TMVNMI por MICA/NKG2D.



La categoría D (MICA alto y NKG2D bajo) representa la peor de las condiciones con un aumento de riesgo para la recidiva tumoral.

### 5.9.2 Análisis descriptivo según la progresión:

En nuestra serie de TMVNMI progresaron 26 casos (17.7 %). En el análisis univariante no se relacionó la progresión con el resto de las variables.

#### MICA:

Al comparar la progresión tumoral con la expresión de MICA en los pacientes que progresaron no hubo diferencias en cuanto a la expresión de MICA (50 % expresión débil y 50 % expresión intensa).

Sin embargo, en los pacientes sin progresión tumoral en la mayoría (76.3 %) se detectó una expresión débil de MICA, frente a un 23.7 % con expresión intensa ( $p=0.008$ ).

De los pacientes con expresión de MICA intensa (42 casos), el 73.81 % (31 casos) no presentaron progresión tumoral vs. el 26.19 % (11 casos) que si progresaron.

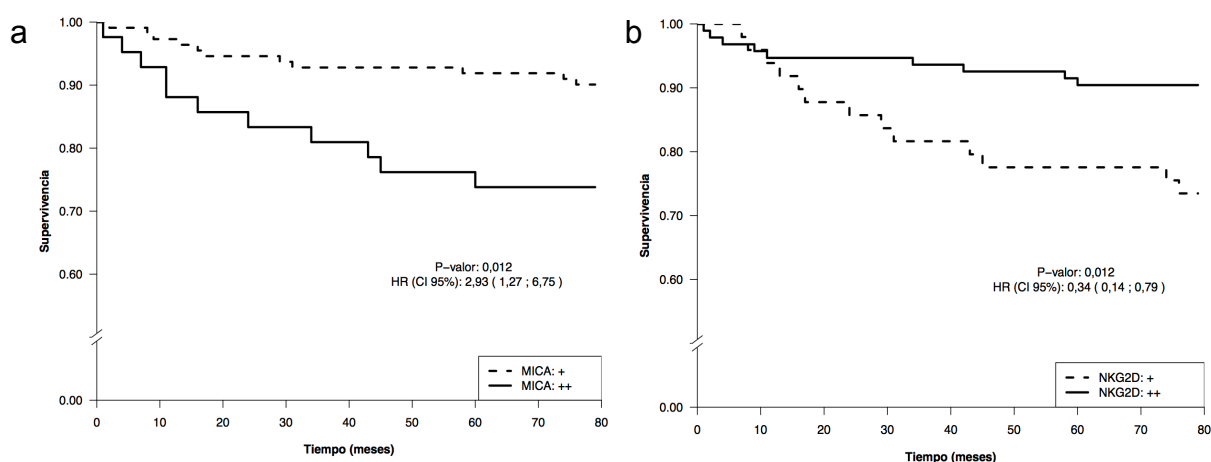
**Tabla 91.** Análisis descriptivo según progresión y MICA en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=153	No event N=131	Event N=22	HR	p.ratio	p.overall
MICA						0.008
+ (débil)	111 (72.5%)	100 (76.3%)	11 (50.0%)	Ref.	Ref.	
++ (intensa)	42 (27.5%)	31 (23.7%)	11 (50.0%)	2.93 [1.27;6.76]	0.012	

Se realizó un análisis mediante curvas de Kaplan-Meier para calcular la supervivencia libre de progresión tumoral en función de los niveles de expresión de MICA (*Figura 35a*) y en función de los niveles de expresión de NKG2D (*Figura 35b*). Observamos que los pacientes con niveles de expresión débil de MICA tienen una mayor supervivencia libre de progresión frente a los pacientes con niveles de expresión intenso que presentan una menor supervivencia libre de progresión (*Figura 35a*).

Niveles de expresión elevado de NKG2D se asocian en nuestro estudio con una mayor supervivencia libre de progresión, en comparación con los pacientes con niveles bajos de expresión de NKG2D que presentan un menor supervivencia libre de progresión (*Figura 35b*).

**Figura 35.** Distribución de la supervivencia libre de progresión en pacientes con TMVNMI por a) MICA y b) NKG2D.



### NKG2D:

En el análisis univariante el 59.1 % de los pacientes con progresión tumoral tuvieron una expresión débil de NKG2D.

Destaca que en los pacientes sin progresión tumoral el 70.2 % demostró una expresión intensa de NKG2D ( $p=0.008$ ). Existe una tendencia a que los niveles elevados de NKG2D sean un factor protector para la progresión tumoral.

**Tabla 92.** Análisis descriptivo según progresión y NKG2D en los pacientes con TMVNMI

	[ALL] N=143	No event N=121	Event N=22	HR	p.ratio	p.overall
NKG2D						0.008
+ (débil)	49 (34.3%)	36 (29.8%)	13 (59.1%)	Ref.	Ref.	
++ (intensa)	94 (65.7%)	85 (70.2%)	9 (40.9%)	0.34 [0.14;0.79]	0.012	

## MICA y NKG2D:

Al igual que para la recidiva agrupamos las variables MICA y NKG2D en una sola variable con 4 categorías según su nivel de expresión (ver pág. 158) detectamos que el 51.3 % de los pacientes de los pacientes con expresión de MICA bajo y NKG2D alto no progresaron.

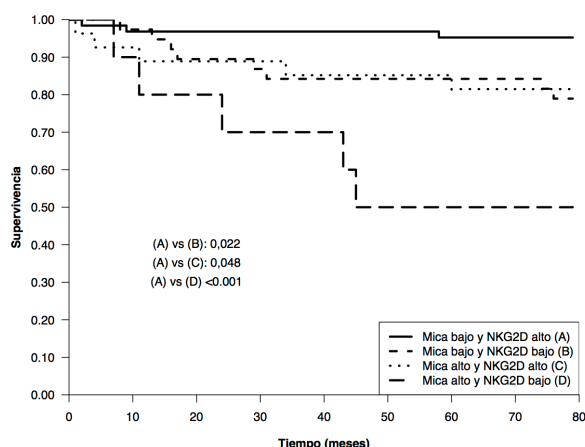
De este mismo grupo de pacientes con expresión de MICA bajo y NKG2D alto (63 casos) sólo progresaron el 4.76 %.

**Tabla 93.** Análisis descriptivo según progresión y MICA/NKG2D en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=138	No event N=117	Event N=21	HR	p.ratio	p.overall
MICA y NKG2D:						0.001
MICA bajo y NKG2D alto	63 (45.7%)	60 (51.3%)	3 (14.3%)	Ref.	Ref.	
MICA bajo y NKG2D bajo	38 (27.5%)	30 (25.6%)	8 (38.1%)	4.70 [1.25;17.7]	0.022	
MICA alto y NKG2D alto	27 (19.6%)	22 (18.8%)	5 (23.8%)	4.24 [1.01;17.7]	0.048	
MICA alto y NKG2D bajo	10 (7.25%)	5 (4.27%)	5 (23.8%)	13.5 [3.23;56.8]	<0.001	

Se realizó un análisis de supervivencia libre de recidiva de Kaplan-Meier en función de la variable MICA/NKG2D (*Figura 36*).

**Figura 36.** Distribución de la supervivencia libre de progresión tumoral en pacientes con TMVNMI por MICA/NKG2D.



En la *Figura 36* se observa la curva de supervivencia libre de progresión tumoral para MICA y NKG2D como una variable conjunta categorizada en: A) MICA bajo y NKG2D alto, B) MICA bajo y NKG2D bajo, C) MICA alto y NKG2D alto y D) MICA alto y NKG2D bajo.

También podemos observar las diferencias entre sí de las 4 categorías en cuanto a la supervivencia libre de progresión tumoral y su nivel de significación estadística.

La categoría A (MICA bajo y NKG2D alto) es la categoría de referencia y cuando está presente dicha combinación representa un factor de protección para la supervivencia libre de progresión tumoral ( $p < 0.001$ ).

La categoría D (MICA alto y NKG2D bajo) representa la peor de las condiciones con un aumento de riesgo para la progresión tumoral.





## 6. DISCUSIÓN

El cáncer de vejiga es la neoplasia maligna más frecuente del aparato urinario y Europa tiene una de las tasas más altas de incidencia, particularmente España e Italia (4). Se trata de un grave problema de salud pública por su alta incidencia, prevalencia y altas tasas de recidiva. El manejo del cáncer vesical supone un importante impacto económico en los sistemas sanitarios por su necesidad de seguimiento intensivo y tratamientos en algunos casos costosos, sumado a una alta tasa de supervivencia del tumor vesical no músculo-infiltrante (45,48,51).

La expresión de MICA y NKG2D ha sido estudiada en diversas neoplasias (245,247,250–254,259,263). MICA y otros ligandos de NKG2D no se expresan de manera constitutiva en los tejidos sanos, excepto a nivel gastrointestinal (227,228). No obstante, recientemente se ha demostrado su expresión en tejido sano de múltiples órganos (229).

Sus niveles de expresión aumentan en situaciones de estrés celular, infecciones virales y otras circunstancias que producen daño al DNA como el cáncer (260,273). En la actualidad existe escasa literatura sobre la expresión de MICA en el cáncer vesical, sólo 3 artículos han estudiado dicha relación, sin analizar de forma directa la expresión de MICA en el carcinoma urotelial vesical ni establecer diferencias en cuanto a su nivel de expresión (274–276).

En el presente trabajo se ha estudiado la expresión tisular de MICA y su receptor NKG2D, analizando su impacto sobre la recidiva y la progresión tumoral en el tumor vesical, así como su relación con las características clínicas, mediante el análisis inmunohistoquímico en un TMA con 195 muestras (173 de TMVNMI y 22 de TMVMI) obtenidas a partir de RTU de TMV primario con 78 meses de

seguimiento. Representa uno de los pocos trabajos en este campo y como se mencionó previamente, partimos de pocas referencias en la literatura.

Por esto, ha sido muy importante la revisión bibliográfica sobre el comportamiento de MICA y NKG2D en otras neoplasias distintas a la vesical para entender la expresión de MICA e interpretar nuestros resultados.

En los humanos se han descrito 7 ligandos de NKG2D (MICA, MICB, ULPB 1-4 y RAET1G), sin embargo MICA ha sido el más estudiado y se cree que es el que tiene una mayor relevancia clínica.

MICA aumenta su expresión en diversas condiciones, incluidas las neoplasias, siendo su sobreexpresión beneficiosa en las fases iniciales de la enfermedad. Posteriormente al aumentar sus niveles, ciertas proteinasas favorecen su paso al suero transformándose en su forma soluble, la cual es capaz de saturar al receptor NKG2D y finalmente bloquear la citotoxicidad.

Existen otros mecanismos que impiden que MICA se exprese a nivel de la superficie celular, permaneciendo a nivel intracelular y evitando su interacción con NKG2D (229,277).

En el siguiente apartado discutiremos los resultados más relevantes de acuerdo a los objetivos que nos planteamos inicialmente, mencionando al final de cada punto una conclusión.

## **6.1 Expresión tisular de MICA:**

### 6.1.1 MICA en el carcinoma vesical

En nuestro estudio se demostró la expresión tisular de MICA en todos los casos de TMV, independientemente del grado de expresión, distinta para cada caso.

Sólo 3 trabajos en la literatura han estudiado la relación de MICA con el cáncer vesical (274–276), sin embargo el análisis de su expresión en el cáncer vesical urotelial no se ha llevado a cabo de forma exhaustiva en ninguno de estos trabajos.

1) Tsuboi y cols. (275) en un estudio con muestras de procedentes de 57 cistectomías de pacientes con tumor vesical músculo infiltrante y 2 líneas celulares de cáncer vesical (YTS-1 derivada de un tumor vesical metastásico y KK-447 derivada de un tumor vesical no metastásico) demostraron que la expresión de MICA fue más elevada en el tumor vesical en comparación con la de otros ligandos de NKG2D. El objetivo de ese estudio fue analizar la expresión de la enzima C2Gnt la cual está relacionada con la progresión y potencial metastásico del tumor. La acción de esta enzima reduce la afinidad de MICA por NKG2D, alterando de forma importante la activación de las células NK y promoviendo la evasión de las células tumorales vesicales que expresan C2GnT. Demostraron que al inhibir MICA se produce una sobreexpresión de C2GnT.

2) Cathro y cols. (274) analizaron la relación de la expresión de MICA y 14 elementos de la maquinaria de procesamiento antigénico (2-microglobulina, calnexina, calreticulina, delta, Z, MB1, LMP2, LMP7, LMP10, cadena pesada de las moléculas de HLA de clase I, tapasina, T AP1, T AP2 y ERp57) con las características clinicopatológicas del cáncer de vejiga. Emplearon un TMA confeccionado con muestras procedentes de 167 cistectomías y 6 controles de

urotelio sano (2 de tejido vesical de cistectomías y 4 ureterales de resecciones de zonas sanas de pacientes con cáncer genitourinario). No demostraron diferencias significativas en los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM) y el grado tumoral. La mayoría de componentes del APM presentaron una expresión más elevada en el urotelio sano. Otra observación fue que los elementos del APM y MICA presentaron un score más elevado en los tumores vesicales de células escamosas en comparación con los uroteliales. Sin embargo, este trabajo aporta poca información en cuanto a la expresión de MICA, demostró que es mayor en el tipo histológico de células escamosas. La expresión de MICA en el urotelio sano se estudió en una muestra muy pequeña; sólo 2 casos de cistectomías de pacientes con cáncer vesical. Únicamente hace referencia a la expresión de elementos del APM elevado en urotelio sano sin mención de la expresión de MICA. Concluyen que las alteraciones en la expresión de MICA y componentes de APM en el cáncer vesical pueden contribuir al escape del tumor al sistema inmune innato.

3) Higuchi y cols. (276) a partir de cultivos de una línea celular de cáncer vesical (T24), células mononucleares alogénicas de sangre periférica y BCG. Demostraron que al añadir anticuerpos anti-MICA se observa una inhibición significativa de la actividad citotóxica de las células NK, mientras que si se bloquean los receptores NKG2D mediante anticuerpos anti-NKG2D esta inhibición de la actividad citotóxica era moderada. De igual manera al agregar células dendríticas infectadas con BCG se producía una inhibición significativa de la proliferación tumoral a diferencia de cuando se agregaron células dendríticas no infectadas con BCG que la inhibición de la proliferación tumoral fue moderada. En este estudio no se analizaron los niveles de expresión de MICA ni tampoco su relación con otras variables.

De este modo a pesar de la escasa evidencia de expresión de MICA en el cáncer de vejiga en la literatura, la expresión de MICA ha sido demostrada en múltiples neoplasias mayoritariamente las epiteliales.

- En nuestro estudio, hemos demostrado la expresión de MICA en la totalidad de muestras estudiadas de TMVNMI y TMVMI.

En los apartados posteriores explicaremos la relación entre los niveles de expresión de MICA con el resto de variables planteadas en nuestros objetivos.

#### 6.1.2 MICA en el tejido vesical sano

En nuestro TMA de 195 muestras de TMV, existieron 16 cores en los cuales se detectó alguna zona de tejido vesical sano adyacente al tumor. Todas estas zonas de tejido vesical sano presentaron ausencia de expresión de MICA. Nuestro hallazgo coincide con toda la literatura que describe la ausencia de la expresión de MICA en los tejidos sanos, excepto a nivel del tejido gastrointestinal (227,228).

No obstante, recientemente, un trabajo ha demostrado la expresión de MICA en tejidos sanos mediante un anticuerpo anti-MICA y microscopía estándar y confocal. Ghadially y cols. analizaron la expresión de MICA en líneas celulares (C1R MICA\*004 y C1R MICB\*001), muestras de tumor colorrectal, ovario, mama, hepatocelular, pulmón, próstata, páncreas y estómago. Tejido sano intestinal, de colon, mama, hígado, páncreas, estómago, tejido bronquial, glándula suprarrenal, médula ósea, cerebro, nervios periféricos, músculo estriado, corazón, bazo, testículos, uréter, riñón, próstata y vejiga (229).

Esta discrepancia entre los estudios previos que demuestran la ausencia de MICA en los tejidos sanos, así como nuestros resultados con el trabajo de Ghadially y cols. tal vez se deba al novedoso método de detección empleado. La expresión de MICA/B en los tejidos tumorales y en tejidos sanos fue llevada a cabo mediante el anticuerpo B1-F2A4 el cual fue detectado en la superficie celular mediante citometría de flujo. Este se une a MICA y MICB con alta afinidad y posiblemente se une al dominio  $\alpha$ -3 de MICA (dominio presente en el 94-96% de la población global). También emplearon un anticuerpo convencional anti-MICA 6D4 para comparar con los medios de detección empleados por otros grupos. En este estudio MICA se expresó en la mayor parte de tumores estudiados, sin embargo, algunos tumores no expresaron MICA cuando se usó el anticuerpo 6D4. En cuanto a los tejidos sanos MICA se expresó en la mayoría de tejidos sanos, incluido el vesical. No se detectó su expresión en la glándula suprarrenal, médula ósea, nervios periféricos, cerebro, médula espinal, corazón, músculo estriado, testículos y tejido esplénico (ver *Tabla 94*).

En ninguno de los tejidos sanos se detectó la expresión de MICA mediante el anticuerpo 6D4, lo que reafirma que con la técnica más sensible empleando el anticuerpo B1-F2A4 es posible detectar MICA en tejido sano y podría ser la explicación de porqué en nuestro estudio y en todos los estudios previamente realizados en la literatura no había sido posible detectar MICA en el tejido sano.

**Tabla 94.** Expresión de MICA (Ac B1-F2A4) en tejido sano con IHQ e IF confocal (229).

Tipo de tejido	IHQ	IF confocal		
	Casos epitelio (+)	Casos epitelio (+)	Localización: membrana	Localización: citoplasma
Vejiga	5/7	5/8	(≤20%)	Si
Intestino grueso-colon	15/16	16/16	(<5%)	Si
Riñón-cortical	8/8	8/8	(<5%)	Si
Riñón-parénquima	2/2	2/2	(<5%)	Si
Pulmón-bronquial	5/6	6/6	(≤20%)	Si
Pulmón-parénquima	8/8	8/8	(<5%)	Si
Páncreas	4/4	5/8	(<5%)	Si
Parótida	6/6	4/4	(<5%)	Si
Placenta	8/8	8/8	(<5%)	Si
Próstata	6/8	8/8	(<5%)	Si
Intestino delgado-ileon	10/11	10/11	(<5%)	Si
Timo	5/5	5/5	(<5%)	Si
Amígdala	6/8	4/5	(≤20%)	Si
Uréter	6/6	6/6	(≤20%)	Si
Útero-endometrio	7/7	7/7	(<5%)	Si
Mama*	2/4	1/2	No	Si
Trompas de Falopio	5/7	6/7	No	Si
Hígado	6/8	8/8	No	Si
Paratiroides	6/6	3/6	No	Si
Hipófisis	5/6	6/6	No	Si
Piel**	1/7	1/8	No	Si
Intestino delgado-duodeno	3/3	3/3	No	Si
Intestino delgado-yeyuno	3/3	3/3	No	Si
Estómago	13/13	7/8	No	Si
Tiroides	8/8	8/8	No	Si
Útero-cérvix	3/5	0/4	No	Si
Glándula suprarrenal	0/8	0/8	No tinción	
Médula ósea	0/3	0/3	No tinción	
Cerebro-cerebelo	0/8	0/8	No tinción	
Cerebro-corteza	0/6	0/6	No tinción	
Globo ocular	0/2	0/2	No tinción	
Corazón	0/8	0/8	No tinción	
Nódulo linfático	0/4	0/2	No tinción	
Ovario	0/8	0/8	No tinción	
Nervio periférico	0/3	0/3	No tinción	
Músculo estriado	0/8	0/8	No tinción	
Médula espinal	0/6	0/6	No tinción	
Bazo	0/8	0/8	No tinción	
Testes	0/4	0/4	No tinción	

\*(+) si esta presente epitelio en la muestra. \*\*(+ si existen conductos excretores en la muestra.  
 IHQ: inmunohistoquímica, IF: inmunofluorescencia, Ac: anticuerpo.



El anticuerpo 6D4 se une al dominio  $\alpha 1/2$ , distinto al dominio con el cual interacciona el anticuerpo B1-F2A4. Otra posible explicación es el uso de anticuerpos que no han sido validados de forma correcta para la detección de la expresión de MICA o errores de tipo metodológico durante la aplicación y lectura de las reacciones inmunohistoquímicas.

Otro aspecto importante que aporta el estudio de Ghadially y cols. fue la localización de la expresión de MICA predominantemente intracelular y que sólo se demostró en la superficie celular en menos del 20% de los casos mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal.

La expresión de ligandos de NKG2D en general alertan al sistema inmune innato de que existe una condición de estrés celular o daño al DNA, de modo que la expresión sobre la superficie celular de estos ligandos permite al sistema inmune detectar las células dañadas que deben ser destruidas por las células citotóxicas que expresan el receptor NKG2D. Aunque si estos ligandos de NKG2D incluido MICA permanecen almacenados a nivel intracelular y no son transportados a la superficie celular no se produce este reconocimiento ni activación de la respuesta citotóxica.

Una posible explicación a la escasa expresión de MICA detectada a nivel de la superficie celular en este estudio son la relativa vida media corta de MICA sobre la superficie celular y a posibles modificaciones a nivel de la región C-terminal de los ligandos de NKG2D, lo que impide su reconocimiento por el receptor NKG2D (278). Se ha descrito que la hipoxia puede reducir la expresión de MICA sobre la superficie celular (279) .

- No detectamos la expresión de MICA en el tejido vesical sano.

## 6.2 Expresión tisular de NKG2D en el carcinoma vesical

Al igual que MICA en nuestro estudio se demostró la expresión tisular de NKG2D en todos los casos de TMV, independientemente del grado de expresión, distinto para cada caso, esta fue homogénea.

La expresión del receptor NKG2D ha sido ampliamente estudiada en diversas neoplasias, otras situaciones de estrés celular y en tejido sano (280–282).

El receptor NKG2D es constitutivo, está presente en todas las células NK y linfocitos CD8 (273). También está presente en los linfocitos T  $\gamma\delta$  de sangre periférica e intestinales intraepiteliales. Se ha descrito su presencia en los linfocitos T CD4  $\alpha\beta$  pero sólo en los pacientes con artritis reumatoide (280).

- En nuestro estudio, hemos demostrado la expresión de NKG2D en todas las muestras estudiadas de TMVNMI y TMVMI.

Más adelante en este apartado analizaremos el nivel expresión tisular de NKG2D y su relación con otras variables en el TMV.

### 6.3 Relación entre la expresión tisular de MICA y NKGD2 con las variables anatomopatológicas en el TMV:

#### 6.3.1 Relación entre el nivel de expresión tisular de MICA y el estadio tumoral en el TMV

No detectamos diferencias estadísticamente significativas entre la expresión tisular de MICA y el estadio tumoral.

Tanto en los TMVNMI (pTa-T1) como en los TMVMI (T2) la expresión de MICA débil fue la más frecuente (ver *Tabla 70*).

Existiendo un mayor número de casos de TMVMI con expresión intensa de MICA, un 40.9 % de los casos frente al 27.7 % de los tumores pTa y al 26.9 % de los pT1.

**Tabla 70.** Análisis descriptivo según el estadio tumoral y MICA en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=175	Ta N=101	T1 N=52	T2 N=22	p.valor
MICA:					0.428
+ (débil)	124 (70.9%)	73 (72.3%)	38 (73.1%)	13 (59.1%)	
++ (intensa)	51 (29.1%)	28 (27.7%)	14 (26.9%)	9 (40.9%)	

Los resultados de Cathro y cols. (274) demuestran una menor intensidad de expresión de los componentes del APM y MICA en los tumores uroteliales de "alto" estadio. Sin embargo las diferencias entre la expresión de MICA y el estadio tumoral no fueron estadísticamente significativas ( $p= 0.1195$ ). El estadio patológico fue evaluado en 2 grupos, "bajo" : T1-T2,N0,M0 y "alto": T3-T4 ó N1 ó M1.

Estos 2 grupos no incluían ningún paciente estadio pTa y de acuerdo a la forma en que se dividieron los grupos para realizar las comparaciones en cuanto a la expresión de MICA, no es posible saber si existen diferencias entre los estadios pTa, pT1 y pT2.

En la literatura tampoco existe ningún trabajo que analice los niveles de expresión de MICA en el TMV según el estadio ni tampoco en TMVNMI.

En nuestro estudio a pesar de que no encontramos diferencias entre la expresión de MICA y el estadio tumoral, existe una tendencia en los TMVNMI de predominio de expresión de MICA débil (72.3 % de los tumores pTa y 73.1% de los pT1) y en los TMVMI, a pesar de que también es más frecuente la expresión débil de MICA (59.1 % de los casos), tienen un mayor número de casos con expresión intensa de MICA (40.9% frente alrededor de 30 % en los TMVNMI). Una limitación de nuestro estudio es el reducido número de casos de TMVMI.

Como se ha explicado previamente, se supone que los niveles de expresión de MICA inicialmente son favorables porque permiten el reconocimiento de las células tumorales por las células NKG2D+ y su posterior destrucción. No obstante, estos niveles de expresión aumentan a medida que progresa el tumor haciéndose posteriormente desfavorables ya que el tumor desarrolla vías de escape para evadir el sistema inmune. Una de estas vías de escape consiste en restringir MICA al compartimiento intracelular (impidiendo su expresión sobre la membrana celular que es el sitio en el cual puede ser reconocida por NKG2D) o mediante la actuación de metaloproteinasas que permiten el desprendimiento de MICA y su paso al suero (esta forma de MICA soluble se une a los receptores NKG2D e impide su activación). Por todo lo antes expuesto, esta tendencia en nuestro estudio a que los casos con mayor estadio tumoral tengan mayor expresión intensa de MICA coincide en parte con nuestros resultados (40.9 % de casos con expresión intensa de MICA en los tumores pT2).

Nuestro resultado de ausencia de relación entre los niveles de expresión de MICA y el estadio tumoral es consistente con los resultados obtenidos en estudios de

cáncer de colon (245), en colangiocarcinoma (253), carcinoma renal de células claras y cáncer de próstata; en estos últimos dos el aumento de expresión de MICA se asoció con el pronóstico, sin embargo no se demostraron diferencias en cuanto al estadio tumoral.

Según los resultados del análisis de regresión logística para MICA en individuos con tumor vesical (ver la *Tabla 77*, página 157). El estadio pT2 es un factor de riesgo para tener mayores niveles de MICA (OR: 1.83, IC 95%: 0.728; 4.596, p=0.199), es decir, los pacientes con TMVMI tienen niveles de expresión de MICA elevados, aunque no es estadísticamente significativo.

- No encontramos diferencias estadísticamente significativas en relación a la expresión de MICA y el estadio tumoral en el TMV.
- El nivel de expresión de MICA débil fue el más frecuente en todos los TMV.
- Los pacientes con TMVMI (T2) tienen niveles de expresión de MICA elevados.

### 6.3.2 Relación entre el nivel de expresión tisular de NKG2D y el estadio tumoral en el TMV

En los TMVNMI (pTa-T1) predominó una expresión intensa de NKG2D (63.4 % en los casos de tumores pTa y 70 % en los pT1). A diferencia de los TMVMI (T2) predominaron los casos con expresión débil en un 54.5 % frente a los casos de expresión intensa 45.5 % (ver *Tabla 71*, página 144).

Esto coincide con lo esperado, ya que un mayor número de células NKG2D+ traduce una mayor integridad de la inmunidad innata que evoca una mayor respuesta citotóxica. En estadios avanzados y a medida que el tumor progresa disminuye la respuesta inmune. En los TMVMI se espera tener menor expresión del

receptor NKG2D. Sin embargo no encontramos diferencias entre los tumores pTa y pT1 en cuanto a la expresión de NKG2D.

En el análisis de regresión logística para NKG2D en individuos con TMV el estadio tumoral pT2 tiene un menor riesgo de niveles de expresión altos de NKG2D (OR: 0.34, IC 95% [0.103; 1.13],  $p=0.078$ ), dicho de otra forma, el estadio pT2 presenta un mayor riesgo de tener niveles bajos de NKG2D (ver *Tabla 82*, página 162).

- En los TMVNMI (pTa-pT1) es más frecuente (70%) la expresión débil de NKG2D.
- El estadio pT2 presenta un mayor riesgo de tener niveles bajos de NKG2D.

### 6.3.3 Relación entre el nivel de expresión tisular de MICA y el grado histológico en el TMV

No detectamos diferencias entre los niveles de expresión de MICA y el grado histológico según la clasificación de la OMS de 1973 ni tampoco con la clasificación de la OMS de 2004.

La expresión de MICA débil fue la más frecuente tanto en los tumores de bajo grado como en los de alto grado.

**Tabla 95.** Análisis descriptivo según expresión de MICA y grado tumoral en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=175	+ (débil) N=124	++ (intenso) N=51	OR	p.valor
Grado (OMS 1973):					0.142
G1 bajo grado	40 (22.9%)	31 (25.0%)	9 (17.6%)	Ref.	
G2 grado intermedio	72 (41.1%)	54 (43.5%)	18 (35.3%)	1.14 [0.46;2.98]	
G3 alto grado	63 (36.0%)	39 (31.5%)	24 (47.1%)	2.09 [0.86;5.40]	
Grado (OMS 2004):					0.393
bajo grado	40 (22.9%)	31 (25.0%)	9 (17.6%)	Ref.	
alto grado	135 (77.1%)	93 (75.0%)	42 (82.4%)	1.54 [0.69;3.72]	

Cathro y cols. no encontraron diferencias en cuanto al nivel de expresión de MICA en el carcinoma urotelial, sin embargo si detectaron diferencias en cuanto a la variante histológica, obteniendo niveles más elevados de expresión en el carcinoma de células escamosas. Podría esperarse al igual que con el estadio, que a mayor grado histológico aumente la expresión de MICA. Nuestro estudio coincide con la escasa literatura.

- No demostramos diferencias entre el nivel de expresión de MICA (débil o intenso) y el grado tumoral.

6.3.4 Relación entre el nivel de expresión tisular de NKG2D y el grado histológico en el TMV.

No encontramos diferencias entre los niveles de expresión tisular de NKG2D y el grado tumoral.

Fue más frecuente la expresión intensa de NKG2D en ambos grupos de tumores de alto grado y bajo grado.

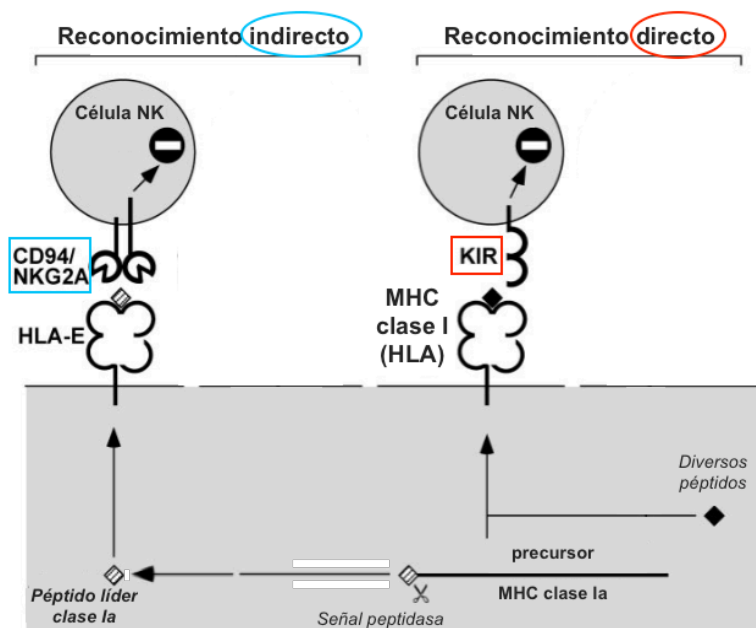
**Tabla 96.** Análisis descriptivo según expresión de NKG2D y grado tumoral en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=165	+ (débil) N=61	++ (intenso) N=104	OR	p.valor
Grado 1973:					0.965
G1 bajo grado	37 (22.4%)	13 (21.3%)	24 (23.1%)	Ref.	
G2 grado intermedio	69 (41.8%)	26 (42.6%)	43 (41.3%)	0.90 [0.38;2.07]	
G3 alto grado	59 (35.8%)	22 (36.1%)	37 (35.6%)	0.91 [0.38;2.16]	
Grado 2004:					0.945
bajo grado	37 (22.4%)	13 (21.3%)	24 (23.1%)	Ref.	
alto grado	128 (77.6%)	48 (78.7%)	80 (76.9%)	0.91 [0.41;1.93]	

La activación de las células NK frente a la presencia de células tumorales o infecciones está determinada por un balance entre las interacciones inhibitorias o estimulatorias de determinados receptores.

Las células NK humanas expresan receptores inhibitorios de 2 familias conocidas que reconocen directamente las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad: the killer cell immunoglobulin-like receptor (KIRs) y el receptor CD94/NKG2A lectin-like (ver Figura 37).

**Figura 37.** Reconocimiento de la célula NK humana de las moléculas propias del *MHC de clase Ia* de forma indirecta a través del receptor CD94/NKG2A lectin-like (b) y de forma directa a través de receptor KIR (a). Modificada de Raulet y cols. (283).





Las células NK también están reguladas por receptores estimuladores, alguno de los cuales reconocen ciertos ligandos expresados en la superficie de las células tumorales (284). El más estudiado de este tipo de receptores estimuladores de las células NK es el receptor NKG2D. No obstante, existen otros receptores estimuladores en las células NK, entre los cuales tenemos el NKp46, NKp30 y NKp44 (285)

La expresión de NKG2D no está limitada sólo a las células NK, se expresa también en todas las células T CD8+ humanas y células T  $\gamma\delta$  (235). Su expresión puede ser inducida por lipopolisacárido (LPS), interferón  $\alpha$   $\beta$ , interferón  $\gamma$  y por IL-15, IL-7 e IL2, siendo la IL-15 la más importante (240).

Existen también inhibidores de la expresión de NKG2D como la IL-21 y el TGF-  $\beta$ . Otro mecanismo de inhibición es a través de la sobreexpresión de sus ligandos, que como hemos comentado previamente un aumento muy marcado de los ligandos de NKG2D como MICA, pueden producir endocitosis y degradación parcial de NKG2D. Además los ligandos solubles de NKG2D como sMICA en sangre periférica pueden producir una reducción de la expresión de NKG2D en las células T CD8+ y NK (286).

También se ha descrito la inhibición de la expresión de NKG2D secundaria a los exosomas derivados del tumor (287). Los exosomas son nanovesículas de origen endocítico derivadas de las células, en el caso de los exosomas derivados de las células tumorales expresan ligandos NKG2D que son capaces de interactuar directamente con las células NK y linfocitos T CD8, en cierta manera dependiente del receptor NKG2D. Esta interacción produce una reducción de la expresión de NKG2D a nivel de la superficie celular (287).

Sin embargo deben existir otros mecanismos aún más complejos de regulación de la expresión de NKG2D que aún están por determinar. Jamieson y cols. (284) demostraron que las células T CD8+  $\alpha$   $\beta$  mantienen niveles elevados de NKG2D tras 8 meses de una infección viral, siendo capaces de responder a otra infección. En nuestro estudio no encontramos diferencias entre el grado de expresión tisular de NKG2D y el grado tumoral. Como hemos mencionado existen múltiples factores que regulan los niveles de NKG2D pero ninguno se ha asociado directamente con el grado tumoral en el cáncer vesical.

- No demostramos diferencias en relación a los niveles de expresión tisular de NKG2D y el grado histológico.
- Fue más frecuente la expresión intensa de NKG2D en los tumores de alto grado y bajo grado.

#### **6.4 Relación entre el nivel de expresión tisular de MICA y NKGD2 con el grupo de riesgo en el TMVNMI:**

##### **6.4.1 MICA y el grupo de riesgo**

En nuestra serie más del 80 % de los casos son de alto riesgo. En todos los grupos de riesgo observamos un predominio de la expresión débil de MICA (90 % del grupo de bajo riesgo, 94.1 % de riesgo intermedio y 68.3 % de alto riesgo). Las diferencias entre la expresión de MICA y el grupo de riesgo no alcanzaron la significación estadística ( $p=0.034$ ). Destaca que la expresión intensa de MICA fue más frecuente en los pacientes de alto riesgo (31.7 % de los pacientes de alto riesgo, frente a un 5.88 % de bajo riesgo y un 10% de bajo riesgo). El único estudio que analiza la relación entre la expresión de MICA y las características

clínico patológicas del cáncer vesical realizado por Cathro y cols. (274) no estudió la relación entre la expresión de MICA y los grupos de riesgo. No está descrita en la literatura la existencia de dicha relación.

Volviendo a nuestro estudio existe una mayor frecuencia de expresión intensa de MICA en los tumores de alto riesgo en comparación con los de riesgo bajo e intermedio.

Esto puede estar influenciado porque las diferentes categorías de riesgo de la EORTC (61) se encuentran establecidas por un sistema de puntuación basado en factores clínicos y anatomopatológicos para predecir el riesgo de recidiva y progresión. Para definir el grupo de alto riesgo se incluye la recidiva como uno de los factores que se puntúan.

El aumento de la expresión de MICA incrementa el riesgo de recidiva (OR 6.982 [2.953;16.506]), dicho de otra forma, los pacientes con expresión intensa de MICA tienen 6.8 veces mayor probabilidad de recidiva.

Este hecho condiciona que en los pacientes del grupo de alto riesgo sea más frecuente la expresión intensa de MICA en comparación con los otros grupos de riesgo.

- No demostramos una relación estadísticamente significativa entre la expresión tisular de MICA y los grupos de riesgo de la EORTC.

#### 6.4.2 Relación entre el nivel de expresión tisular de NKG2D y el grupo de riesgo

En el presente trabajo al comparar los grupos de riesgo con la expresión tisular de NKG2D destaca una tendencia a una relación inversa de acuerdo al grupo de riesgo; a menor grupo de riesgo mayor es el nivel de expresión de NKG2D. En los pacientes de bajo riesgo, un 90 % de los casos tenía expresión intensa de NKG2D, en el grupo de riesgo intermedio el 73.3 % y en el grupo de alto riesgo 62.7 %. A pesar de que estas diferencias no son estadísticamente significativas ( $p=0.187$ ), esta tendencia podría ser explicada porque en el grupo de tumores de alto riesgo podrían establecerse mecanismos de escape tumoral para evadir la inmunidad innata y disminuir el reclutamiento de células NKG2D+ mediante la secreción de citocinas inhibitoras o estimuladoras (240). El TGF- $\beta$ 1 puede inhibir la expresión del receptor NKG2D (288) al igual que la secreción de exosomas (287). Todos estos mecanismos de escape tumoral favorecen una disminución de NKG2D con lo cual las células NK y los linfocitos T CD8 son incapaces de reconocer las células tumorales y por consiguiente desencadenar la actividad citotóxica para su destrucción.

- No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de NKG2D y los grupos de riesgo de la EORTC en el TMVNMI.

## **6.5 Relación entre el nivel de expresión tisular de MICA y NKG2D con las variables clínicas el TMV:**

### **6.5.1 MICA y el hábito tabáquico**

La mitad de los tumores de vejiga se pueden atribuir al tabaco, siendo su principal factor de riesgo, debido a las aminas e hidrocarburos aromáticos producidos durante la combustión del tabaco responsables del potencial carcinógeno del tabaco.

La exposición al tabaco induce la expresión de ligandos de NKG2D incluido MICA, que al ser reconocidos por el receptor NKG2D activan a la células NK para la destrucción de las células que expresan dichos ligandos en su superficie.

Existen evidencias circunstanciales como el aumento de infiltrado de linfocitos T CD8 a nivel pulmonar, aumento de la expresión de IL-8 y TNF- $\alpha$  en los pacientes con EPOC que sugieren la importancia biopatogénica del sistema MICA-NKG2D en los fumadores. Clásicamente se ha explicado a través de un proceso de inflamación crónica, activación de neutrófilos y macrófagos con producción de proteinasas que contribuyen a la degradación de la matriz extracelular, estrés oxidativo y otros cambios (289).

Borchers y cols. (290) demostraron que la expresión MICA en el epitelio pulmonar no es constitutiva en el tejido sano, siendo inducida en respuesta al estrés oxidativo por la exposición al tabaco. Observaron que cuando no existe exposición al tabaco no se detecta la expresión de MICA, pero si una expresión normal de NKG2D.

Estos ligandos al ser reconocidos por las células NKG2D+ generan una respuesta citotóxica en contra de las células epiteliales expuestas al tabaco e incluso un aumento de la apoptosis mediada por perforinas y granzimas. También

demonstraron que la activación sostenida de NKG2D es suficiente para producir enfisema y además una expresión persistente de ligandos de NKG2D por exposición al tabaco puede inducir al desarrollo de EPOC. No todos los individuos que fuman desarrollan EPOC ni tampoco cáncer, esto se explica por una serie de mecanismos altamente complejos.

En nuestro estudio no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el grado de expresión de MICA y el consumo de tabaco. En todos los grupos: fumadores, no fumadores y ex-fumadores fue más frecuente la expresión débil de MICA. Tampoco detectamos diferencias significativas en cuanto a la cantidad, siendo más frecuente la expresión débil de MICA tanto en los fumadores de  $\leq 20$  cig./día y en los  $>20$  cig./día.

En el grupo de pacientes fumadores se presentó el mismo patrón con predominio de la expresión débil de MICA en un 72 % frente al 28 % de fumadores en el cual detectamos una expresión intensa de MICA (ver *Tabla 97*).

De los pacientes con expresión intensa de MICA el 53.1 % eran fumadores, frente al 34.7 % ex-fumadores y 12.2 % no fumadores.

**Tabla 97.** Relación entre la expresión de MICA y el tabaco en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=170	+ (débil) N=121	++ (intensa) N=49	OR	p.valor
Tabaco:					0.540
nunca	28 (16.5%)	22 (18.2%)	6 (12.2%)	Ref.	
$\leq 20$	19 (11.2%)	15 (12.4%)	4 (8.16%)	0.99 [0.21;4.20]	
$> 20$	74 (43.5%)	52 (43.0%)	22 (44.9%)	1.52 [0.56;4.68]	
exfumador	49 (28.8%)	32 (26.4%)	17 (34.7%)	1.91 [0.67;6.11]	
Tabaco categorizada:					0.449
No fumador	28 (16.5%)	22 (18.2%)	6 (12.2%)	Ref.	
Fumador	93 (54.7%)	67 (55.4%)	26 (53.1%)	1.40 [0.53;4.22]	
Ex-fumador	49 (28.8%)	32 (26.4%)	17 (34.7%)	1.91 [0.67;6.11]	

No existen diferencias significativas entre los 3 grupos (fumadores, ex-fumadores y no fumadores) en cuanto a la expresión de MICA ( $p=0.049$ ).

En la literatura sobre el cáncer vesical no existe ningún estudio que relacione los niveles de expresión de MICA con la exposición al tabaco.

- No detectamos diferencias entre los niveles de expresión tisular de MICA y el hábito tabáquico.

### 6.5.2 NKG2D y el hábito tabáquico

En el 64.4 % de los pacientes fumadores se detectó una expresión tisular intensa de NKG2D frente al 35.6 % de este mismo grupo que presentaron una expresión débil de NKG2D. En el grupo de no fumadores predominó la expresión intensa de NKG2D en el 62.7 % de los pacientes. En los ex-fumadores no hubo diferencias significativas de expresión.

Las diferencias de expresión de NKG2D en los 3 grupos de fumadores, no fumadores y ex-fumadores no son estadísticamente significativas ( $p=0.299$ ).

**Tabla 98.** Relación entre la expresión de NKG2D y el tabaco en los pacientes con TMV.

	[ALL] N=165	+ (débil) N=61	++ (intensa) N=104	OR	p.valor	N
Tabaco:					0.488	161
nunca	25 (15.5%)	7 (11.7%)	18 (17.8%)	Ref.		
≤ 20	19 (11.8%)	7 (11.7%)	12 (11.9%)	0.67 [0.18;2.50]		
> 20	71 (44.1%)	25 (41.7%)	46 (45.5%)	0.73 [0.25;1.93]		
exfumador	46 (28.6%)	21 (35.0%)	25 (24.8%)	0.47 [0.15;1.33]		
Tabaco categorizada:					0.299	161
No fumador	25 (15.5%)	7 (11.7%)	18 (17.8%)	Ref.		
Fumador	90 (55.9%)	32 (53.3%)	58 (57.4%)	0.71 [0.25;1.85]		
Ex-fumador	46 (28.6%)	21 (35.0%)	25 (24.8%)	0.47 [0.15;1.33]		

En los resultados del análisis de regresión logística para NKG2D en individuos con TMV (Ver *Tabla 82*, página 157) vemos que los pacientes fumadores tienen un menor riesgo de niveles altos de NKG2D (OR: 0.144, IC 95% [0.013; 1.587],  $p=0.114$ ) y lo mismo ocurre para el grupo de pacientes ex-fumadores OR: 0.034, IC 95% [0.003; 0.434],  $p=0.009$ ).

Por lo tanto en nuestra serie la exposición al tabaco (fumadores o ex-fumadores) se relaciona con niveles bajos de expresión de NKG2D.

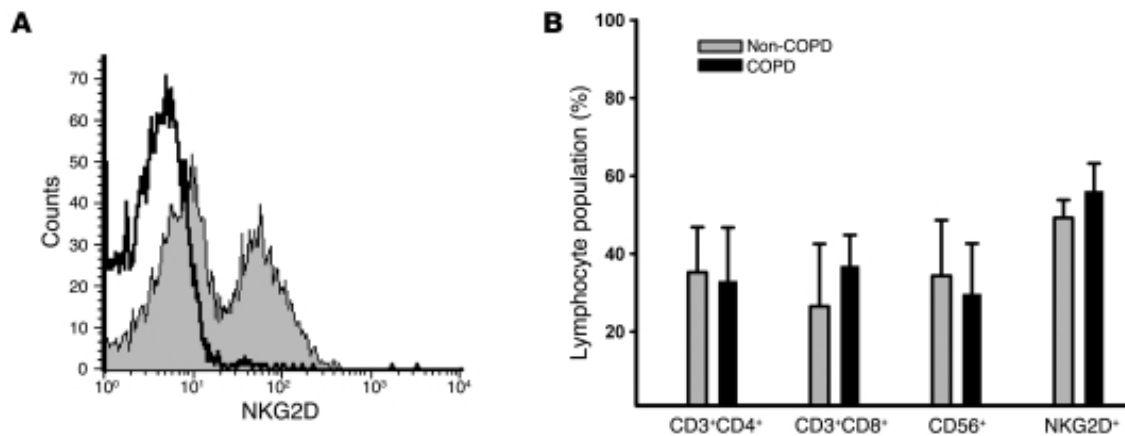
Las células NK constitutivamente expresan el receptor NKG2D y más del 90% de los linfocitos T CD8+ citotóxicos son NKG2D+. No existen estudios en pacientes con tumor vesical que relacionen los niveles de expresión NKG2D con el hábito tabáquico.

Esta relación ha sido estudiada en los pacientes con EPOC. La asociación de la EPOC con el tabaco está ampliamente demostrada y se estima que esta relación existe en más del 50% de los casos (291).

Borchers y cols. (290) estudiaron la presencia de células NKG2D+ en tejido pulmonar periférico de pacientes con EPOC y sin EPOC que se sometieron a cirugía torácica. La citometría de flujo indicó que los receptores NKG2D se expresaban en más del 50% del total de la población de linfocitos T en el pulmón periférico (*Figura 38A*). El porcentaje de células NKG2D+ no mostró diferencia en los distintos grupos (*Figura 38B*).



**Figura 38.** (A) Expresión de NKG2D+ en el parénquima pulmonar de los pacientes con EPOC y sin EPOC y (B) Proporción de las subpoblaciones de linfocitos y NKG2D+ en el parénquima pulmonar de los pacientes con EPOC y sin EPOC (290).



No se objetivaron diferencias en cuanto a los niveles de expresión de NKG2D en pacientes con EPOC y los pacientes sin EPOC.

Los resultados de nuestro trabajo relacionan la exposición al tabaco con niveles bajos de expresión de NKG2D. Recordemos que el 72% de los pacientes fumadores de nuestro estudio presentaron una expresión débil de MICA. En el grupo de expresión intensa de MICA el 53 % eran fumadores y un 34 % ex-fumadores (lo que supone un 87% de los casos con expresión intensa MICA con exposición en algún momento al tabaco). Esto podría en parte explicar la relación de la exposición al tabaco con niveles bajos de NKG2D, por una inhibición por exceso de sus ligandos en nuestro caso de MICA.

Groh y cols. (292) han demostrado que la unión de MICA a su receptor NKG2D induce endocitosis y degradación de NKG2D (reduciendo sus niveles) en los pacientes con cáncer. Otro mecanismo que disminuye los niveles de NKG2D o afecta su funcionamiento son las formas solubles de MICA derivadas del tumor, no obstante en el presente trabajo sólo estudiamos la expresión tisular de MICA y no

fue evaluada la expresión de MICA a nivel sérico, por lo que no es posible demostrar esta hipótesis.

- Los pacientes fumadores tienen un menor riesgo de niveles altos de NKG2D (OR: 0.144, IC 95% [0.013; 1.587],  $p=0.114$ ) y lo mismo ocurre para el grupo de pacientes ex-fumadores OR: 0.034, IC 95% [0.003; 0.434],  $p=0.009$ ).

### 6.5.3 MICA/NKG2D y el sexo

En nuestra serie se observó un predominio de hombres (85.6 %) sobre mujeres (14.4 %). Esas diferencias de género están ampliamente descritas en la literatura. Tres cuartas partes de todos los casos de cáncer de vejiga se presentan en hombres (1). La razón entre hombres y mujeres en Europa occidental varía entre 2:1 y 7:1 (12). Las diferencias en la incidencia no pueden ser explicadas exclusivamente por el hábito tabáquico. 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 (13–15).

En nuestro estudio no se observaron diferencias entre el sexo y la expresión de MICA. En ambos sexos predominó la expresión débil de MICA (en el 70.2 % de los hombres vs el 75 % de las mujeres).

Tampoco detectamos diferencias en cuanto a la expresión de NKG2D tisular y el género, en ambos sexos predominó la expresión intensa de NKG2D (64.8 % de los hombres vs 52.2 % de las mujeres).

En la literatura tampoco se ha comunicado la existencia de esta relación.

- No detectamos relación entre la expresión tisular de MICA o NKG2D y el género.

#### 6.5.4 Relación entre el nivel de expresión tisular de MICA/NKG2D y la edad en el TMV

La incidencia del cáncer vesical se incrementa con la edad, la población de edad avanzada tiene una probabilidad tres 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. La edad es un factor de riesgo independiente para desarrollar carcinoma urotelial de vejiga (293).

Shariat y cols. (294) han descrito varias teorías para explicar la relación entre la edad avanzada y el cáncer de vejiga, como el aumento de la exposición a carcinógenos a lo largo del tiempo, principalmente a la exposición al tabaco y exposición ocupacional a varias aminas aromáticas. También puede contribuir un contacto prolongado de los carcinógenos contenidos en la orina con el urotelio con el envejecimiento, particularmente en los hombres con aumento del volumen prostático y obstrucción infravesical secundaria, con un aumento del residuo postmiccional y las concentraciones urinarias. Disminución de la habilidad de detoxificación de los potenciales carcinógenos como resultado de un deterioro del organismo por el envejecimiento (294).

Volviendo a nuestro estudio la edad media de los pacientes fue de 68.4 años (en los casos de TMVNMI fue de 67.8 años y en los casos de TMVMI de 72.4 años).

En cuanto a la expresión de MICA destaca que en los pacientes >75 años un 66.1 % presentó expresión débil y en relación a los niveles de expresión de NKG2D existía una tendencia en este mismo grupo de pacientes (>75 años) de aumento de sus niveles (el 64.3 % de los pacientes tenían expresión intensa de NKG2D). Es decir, a mayor edad se observaron menores niveles de MICA y mayores niveles de NKG2D, sin embargo ninguna de estas tendencias alcanzó diferencias estadísticamente significativas.

En los resultados del análisis de regresión logística para NKG2D en individuos con TMV (Ver *Tabla 82*, página 157).

Vemos que la edad es un factor de riesgo para tener niveles elevados de NKG2D (OR: 1.053, IC 95% [1.004; 1.105], p=0.035), a mayor edad existe un mayor riesgo de tener niveles elevados de NKG2D.

### 6.5.5 MICA/NKG2D y la multiplicidad

La mayoría de tumores fueron únicos (71.4 %) frente a un 28.6 % múltiples.

No detectamos relación entre la expresión tisular de MICA y la multiplicidad tumoral. En los tumores únicos y múltiples se observó un predominio de la expresión tisular débil de MICA.

**Tabla 99.** Relación entre el nivel expresión de MICA y la multiplicidad en pacientes con TMV.

	[ALL] N=175	+ (débil) N=124	++ (intensa) N=51	OR	p.valor
Multiplicidad:					0.732
único	125 (71.4%)	90 (72.6%)	35 (68.6%)	Ref.	
múltiple	50 (28.6%)	34 (27.4%)	16 (31.4%)	1.21 [0.58;2.46]	

No se ha comunicado ningún estudio que relacione la multicentricidad tumoral con la expresión de MICA en el cáncer vesical.

En la literatura está descrito el mayor riesgo de recidiva a nivel del tracto urinario superior y un mayor riesgo de afectación de la uretra prostática en los TMVNMI múltiples (210) (54).

En cuanto a la relación entre los niveles de expresión de NKG2D y la multiplicidad, para ambos grupos de tumores únicos y múltiples la expresión intensa de NKG2D fue más frecuente (66.4 % y 53.5 % respectivamente).

**Tabla 100.** Relación entre el nivel expresión de NKG2D y la multiplicidad en pacientes con TMV.

	[ALL] N=165	+ (débil) N=61	++ (intensa) N=104	OR	p.valor
Multiplicidad:					0.186
único	122 (73.9%)	41 (67.2%)	81 (77.9%)	Ref.	
múltiple	43 (26.1%)	20 (32.8%)	23 (22.1%)	0.58 [0.29;1.19]	

En los resultados del análisis de regresión logística para NKG2D en individuos con TMV (Ver *Tabla 82* página 157).

Los pacientes con tumores múltiples tienen un menor riesgo de niveles altos de NKG2D (OR: 0.328, IC 95% [0.126;0.857], p=0.023). Dicho de otra forma, los tumores múltiples tienen mayor riesgo de niveles de expresión bajos de NKG2D.

- No observamos relación entre los niveles de expresión de MICA y la multiplicidad tumoral.
- Los pacientes con tumores múltiples tienen un menor riesgo de niveles altos de NKG2D.

### 6.5.6 MICA/NKG2D y tratamiento con BCG

En nuestra serie la mayoría de los pacientes recibieron tratamiento endovesical (76.91 %), un 69.4 % con BCG y un 7.51 % con MMC. Sólo el 23.1 % no recibieron ningún tipo de tratamiento endovesical.

Al analizar los niveles de expresión de MICA de acuerdo al tratamiento endovesical recibido no encontramos diferencias.

**Tabla 101.** Relación entre el nivel expresión de MICA y el tipo de tratamiento endovesical recibido en el TMVNMI.

	[ALL] N=153	+ (débil) N=111	++ (intensa) N=42	OR	p.valor
Tratamiento. endovesical					0.619
no	34 (22.2%)	24 (21.6%)	10 (23.8%)	Ref.	
BCG	108 (70.6%)	80 (72.1%)	28 (66.7%)	0.84 [0.36;2.05]	
MMC	11 (7.19%)	7 (6.31%)	4 (9.52%)	1.37 [0.29;5.85]	

El mecanismo de acción de la BCG no ha sido claramente definido. La BCG induce la producción de ciertas citocinas entre las cuales se encuentran la IL-1, IL-6, IL-8 y factores estimuladores de colonias de granulocitos y macrófagos (FEC-GM) por el urotelio normal y células tumorales. Además posteriormente aumenta la producción de IL-2 e IF- $\gamma$ , que representan la respuesta antitumoral más característica. El efecto neto de las señales producidas por estas citocinas se traduce en el reclutamiento de monocitos y leucocitos intravesicales con cada instilación sucesiva de BCG.

Como fue mencionado previamente Higuchi y cols. (123) en un estudio con cultivos de la línea celular de cáncer vesical T24 con células mononucleares alogénicas de sangre periférica y BCG; demostraron que al añadir anticuerpos anti-MICA se produce una inhibición significativa de la actividad citotóxica de las células NK.

Mientras que si se bloquean los receptores NKG2D mediante anticuerpos anti-NKG2D esta inhibición de la actividad citotóxica era moderada. De igual manera al agregar células dendríticas infectadas con BCG se producía una inhibición significativa de la proliferación tumoral a diferencia de cuando se agregaron células dendríticas no infectadas con BCG, esta inhibición de la proliferación tumoral era moderada. De modo que el estudio de Higuchi y cols. plantea según los resultados obtenidos un posible mecanismo de acción de la terapia endovesical con BCG, pudiendo interpretar que de acuerdo a estos resultados sería mas beneficiosa una manipulación de los ligandos de NKG2D en este caso MICA que del propio receptor. En base a que mediante una inhibición selectiva de MICA se produce una inhibición mayor de la actividad citotóxica de las células NK frente a la inhibición del receptor NKG2D. Por otro lado también observaron una mayor reducción de la progresión tumoral al agregar células dendríticas infectadas con BCG que con las no infectadas.

En este estudio no se analizó los niveles de expresión de MICA ni tampoco su relación con otras variables.

No obstante en nuestro estudio no observamos diferencias entre los niveles de expresión de MICA y el tratamiento endovesical recibido.

García-Cuesta y cols. (273) realizaron un estudio con varias líneas celulares de cáncer vesical, muestras de sangre periférica de pacientes con TMVNMI que habían recibido tratamiento con instilaciones con BCG y como control, muestras de pacientes con TVMNMI que recibieron tratamiento con MMC. Todas las líneas celulares analizadas expresaron MICA y otros ligandos de NKG2D (MICB, ULBP2 y ULBP3) en su superficie con diferentes patrones de expresión en las diferentes líneas celulares. Posteriormente se analizó si la exposición a la BCG afectaba la

expresión de los ligandos de NKG2D. Las células fueron tratadas con BCG durante 1, 4 y 7 días sin observar cambios en cuanto a la expresión de ligandos de NKG2D. Seguidamente investigaron si las células expuestas a la BCG eran reconocidas por las células NK activadas con IL-2 a través de otra interacción receptor ligando. Esto se realizó mediante ensayos de degranulación sin objetivarse tampoco ningún cambio. Estos datos sugieren que la importancia la inmunoterapia con BCG reside en los eventos que conducen al reclutamiento y activación de las células NK, probablemente en el contexto de otras subpoblaciones de células inmunes.

Los resultados de García-Cuesta y cols. (273) se traducen en que la contribución del receptor NKG2D fue dominante sobre la expresión de sus ligandos. Son opuestos en parte a los de Higuchi y cols. (123) quienes obtuvieron una mayor inhibición de la citotoxicidad al inhibir MICA que su receptor, traduciendo una mayor contribución a los ligandos de NKG2D.

En nuestro estudio al analizar los niveles de expresión de NKG2D de acuerdo al tratamiento endovesical recibido tampoco encontramos diferencias. Fue más frecuente la expresión intensa de NKG2D en los 3 grupos de pacientes.

**Tabla 101.** Relación entre el nivel expresión de NKG2D y el tipo de tratamiento endovesical recibido en el TMVNMI.

	[ALL] N=143	+ (débil) N=49	++ (intensa) N=94	OR	p.valor
Tratamiento. endovesical					0.324
no	31 (21.7%)	7 (14.3%)	24 (25.5%)	Ref.	
BCG	102 (71.3%)	38 (77.6%)	64 (68.1%)	0.50 [0.18;1.23]	
MMC	10 (6.99%)	4 (8.16%)	6 (6.38%)	0.45 [0.09;2.25]	

Los mecanismos involucrados en la respuesta al tratamiento con BCG son muy complejos y aún son parcialmente conocidos, no obstante, existe evidencia



importante del papel de la inmunidad innata y entre sus elementos celulares son relevantes las células NK y linfocitos T CD8+. Mediante su activación mediada por el receptor activador NKG2D que interacciona con sus ligandos expresados sobre la superficie celular tumoral desencadenando una respuesta citotóxica. Sin embargo en el presente trabajo no encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la expresión tisular de NKG2D y sus ligandos con el tratamiento con BCG.

En base a la literatura parece ser más atractiva la manipulación de los ligandos de NKG2D para el diseño de nuevos tratamientos en el campo de la inmunoterapia.

- En nuestro estudio no observamos diferencias entre los niveles de expresión de MICA y NKG2D en los pacientes tratados con terapia endovesical (MMC, BCG) o en los que no recibieron ningún tipo de tratamiento.
- Los niveles de expresión de MICA y NKG2D no pueden predecir una respuesta al tratamiento con terapia con BCG.

#### 6.5.7 MICA y NKGD2 con la recidiva tumoral:

##### 6.5.7.1 MICA y la recidiva

En nuestra serie de TVMNMI la mitad de los pacientes (50.9 %) presentaron recidiva tumoral en un período de seguimiento de 78 meses. Durante los primeros 12 meses recidivó el 41.4 %, a los 24 meses el 72.4%, a los 36 meses el 89.7 % y a los 48 meses el 98.4 %.

En cuanto el número de recidivas el 51.3 % de los pacientes presentaron 1 recidiva, sólo el 21.1 % presentaron 3 o más recidivas. No hubo diferencias significativas entre el grado de expresión de MICA y el número de recidivas (ver *Tabla 89*, página 166). El tiempo medio hasta la primera recidiva fue de 16 meses. El 55.3 % de los pacientes con recidiva presentaron una expresión débil de MICA y el 44.74 % de los casos una expresión de MICA intensa.

Destaca que de los pacientes con TMVNMI y con expresión intensa de MICA el 81% recidivaron ( $p < 0.001$ ). Siendo la expresión elevada de MICA un factor de riesgo para la recidiva (ver *Tabla 86*).

**Tabla 86.** Análisis descriptivo según recidiva y MICA en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	No N=85	Si N=88	OR	p.valor	N
MICA:					<0.001	153
+ (débil)	111 (72.5%)	69 (89.6%)	42 (55.3%)	Ref.		
++ (intensa)	42 (27.5%)	8 (10.4%)	34 (44.7%)	6.80 [2.99;17.3]		

El 55.3 % de los pacientes con recidiva presentaron una expresión débil de MICA y el 44.74 % de los casos una expresión de MICA intensa.

En la escasa bibliografía que existe sobre la relación de la expresión de MICA en el cáncer vesical no se ha estudiado específicamente su relación con la recidiva tumoral. Cathro y cols. (274) concluyeron que las alteraciones de la expresión de MICA y componentes del APM en el cáncer vesical pueden contribuir al escape tumoral a los mecanismos de la inmunidad innata y que la expresión varía de acuerdo a la variedad histológica del tumor, pero no hacen referencia a la recidiva. Volviendo a nuestro estudio, el 81 % (34/42) de los pacientes con TMVNMI con expresión intensa de MICA presentaron recidiva tumoral frente al 19 % (8/42) que

no presentaron recidiva ( $p < 0.001$ ). Nuestro hallazgo es interesante y dado que no existe ninguna publicación que relacione los niveles de expresión de MICA y la recidiva en el TMVNMI hace más difícil la discusión, aunque por otro lado la hace más interesante.

Madjd y cols. (254) demostraron en el cáncer de mama una relación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de MICA y el grado tumoral, tipo de tumor, invasión vascular y afectación de nódulos linfáticos. En dicho estudio los pacientes con tumores de mama de mal pronóstico presentaron niveles de expresión elevado de MICA. Para la recidiva tumoral la asociación con los niveles de MICA no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.21$ ). A pesar de que el mismo grupo había realizado otro estudio en cáncer colorrectal en el que se demostró que la expresión de MICA es un factor de buen pronóstico (245), esto probablemente esté en relación a que el colon es por naturaleza un microambiente inflamatorio, además de que en el tracto gastrointestinal sano se expresa MICA de forma constitutiva (227,228).

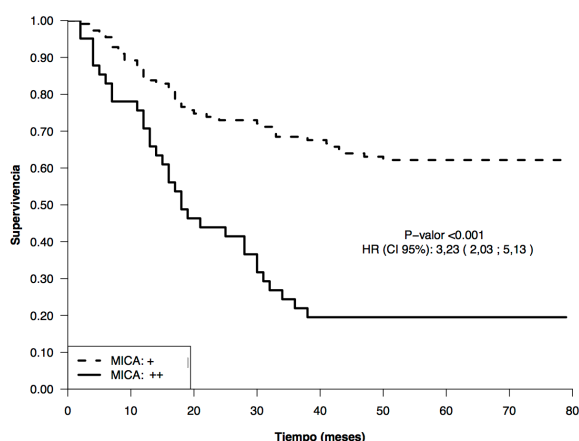
Nuestros hallazgos podrían explicarse por múltiples factores. Ante niveles elevados de MICA podemos predecir una respuesta inmune caracterizada por un aumento de la actividad citotóxica de las células NK y linfocitos T, produciendo la lisis y erradicación del tumor. Aunque en nuestro estudio, observamos lo contrario, los tumores que más recidivaron son los que expresan mayores niveles de MICA. Una posible explicación sería que los tumores más agresivos y con mayor potencial de recidiva tengan un mayor grado de indiferenciación que estimule la elevación de los ligandos de NKG2D, entre ellos MICA, pero que ante la ausencia de otras señales proinflamatorias no es posible la infiltración de las células inmunes efectoras y por lo tanto la expresión de MICA no tiene ninguna influencia en la evolución del tumor.

Alternativamente, si MICA sólo se expresa a nivel intracelular y no está presente a nivel de la superficie celular, no será posible su reconocimiento e interacción con el receptor NKG2D (254). En las fases iniciales la expresión de MICA en las células tumorales es beneficiosa ya que permite el reconocimiento y posterior destrucción de las células tumorales por las células NKG2D+. MICA aumenta progresivamente y en algún momento, sus niveles elevados se hacen perjudiciales. La existencia de grandes cantidades de MICA intracelular que no puede expresarse en la superficie celular no tiene ningún efecto beneficioso ya que no puede ser reconocida. Cuando tenemos niveles elevados de MICA y/o progresión del tumor, MICA es degradada y pasa al suero en su forma soluble que tiene la capacidad de "saturar" el receptor NKG2D e impedir que se produzca una respuesta citotóxica. En nuestro estudio no se realizó la determinación de los niveles de MICA soluble, hubiese sido interesante establecer la correlación entre los niveles séricos y tisulares relacionándolos con la recidiva tumoral.

Es posible que otros mecanismos independientemente de la expresión de MICA se relacionen con la recidiva tumoral. Santos y cols. demostraron como factores predictivos de la recidiva en el TMVNMI la sobreexpresión de p53, el índice de proliferación Ki67 y la multifocalidad (295).

En las curvas Kaplan-Meier para analizar la supervivencia libre de recidiva tumoral en función de los niveles de expresión de MICA.

**Figura 39.** Distribución de la supervivencia libre de recidiva en pacientes con TMVNMI por MICA.



Se observa en la curva como los pacientes con niveles elevados de expresión intenso/++ de MICA tienen una menor supervivencia libre de recidiva tumoral (HR: 3.23; 95% CI: 2.03-5.13;  $p < 0.001$ ).

Como mencionamos en varios apartados de este trabajo durante el estudio detectamos que la expresión de MICA y NKG2D está muy relacionada. Por ello, creamos una nueva variable en la que definimos las siguientes 4 categorías: la primera como la condición óptima de referencia MICA bajo y NKG2D alto, además de 3 categorías adicionales: MICA bajo y NKG2D baja, MICA alto y NKG2D alto, MICA alto y NKG2D.

**Tabla 88.** Análisis descriptivo según recidiva y categorías MICA/NKG2D en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	No N=85	Si N=88	OR	p.valor	N
MICA y NKG2D:					<0.001	138
MICA ↓ y NKG2D ↑	63 (45.7%)	49 (69.0%)	14 (20.9%)	Ref.		
MICA ↓ y NKG2D ↓	38 (27.5%)	14 (19.7%)	24 (35.8%)	. [.,.]		
MICA ↑ y NKG2D ↑	27 (19.6%)	8 (11.3%)	19 (28.4%)	. [.,.]		
MICA ↑ y NKG2D ↓	10 (7.25%)	0 (0.00%)	10 (14.9%)	. [.,.]		

En la *Tabla 88* se muestran las 4 categorías de esta variable y lo que más llama la atención es la categoría MICA alto y NKG2D bajo en la cual todos los pacientes con dicha categoría recidivaron. Las diferencias entre las 4 categorías son estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ).

También es interesante que de los pacientes sin recidiva, ninguno pertenecía a la categoría MICA alto y NKG2D bajo.

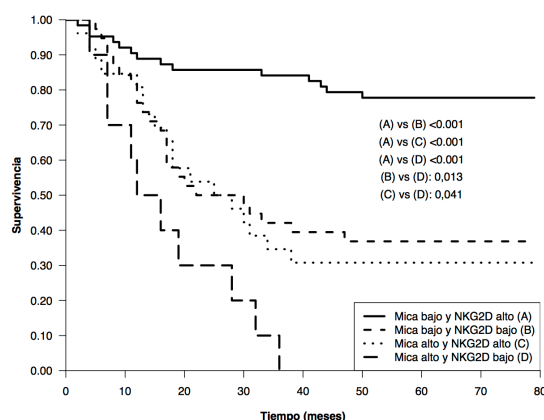
De los pacientes sin recidiva tumoral la mayor parte (69%) pertenecía a la categoría MICA bajo y NKG2D alto.

Con las variables del modelo univariado que fueron significativas se realizó un análisis multivariado mediante un modelo de regresión logística ( ver *Tabla 90*, página 167).

En la *Figura 34* se presenta la curva de supervivencia libre de recidiva tumoral para MICA y NKG2D como una variable conjunta categorizada en: A) MICA bajo y NKG2D alto, B) MICA bajo y NKG2D bajo, C) MICA alto y NKG2D alto y D) MICA alto y NKG2D bajo. También en esta figura observamos las diferencias entre las cuatro categorías (A, B, C y D) y su nivel de significación estadística.

La categoría A (MICA bajo y NKG2D alto) es la categoría de referencia y cuando está presente esta combinación representa un factor de protección para la supervivencia libre de recidiva tumoral vesical ( $p < 0.001$ ).

**Figura 34.** Distribución de la supervivencia libre de recidiva tumoral en pacientes con TMVNMI por MICA/NKG2D.



La categoría D (MICA alto y NKG2D) bajo representa la peor de las condiciones con un aumento de riesgo para la recidiva tumoral.

En el modelo de regresión logística de predictores independientes de MICA en individuos con TMVNMI (*Tabla 78*).

La *Tabla 78* muestra los resultados del análisis de regresión logística para MICA en individuos con TMVNMI. Se observa que la recidiva es un factor de riesgo para MICA (OR: 6.982, IC 95%: 2.983; 16.506,  $p < 0.001$ ), es decir, la presencia de recidiva se relaciona con un mayor riesgo de elevación de MICA.

**Tabla 78.** Regresión logística predictores independientes de MICA en individuos con TMVNMI.

	OR	IC 95%	p.valor
Recidiva: Si	6.982	[2.953;16.506]	<0.001

La presencia de recidiva tumoral aumenta casi 7 veces el riesgo de tener niveles elevados de MICA en el TMVNM.

La utilidad desde el punto de vista práctico de nuestros resultados, si son confirmados en estudios prospectivos mediante la determinación tisular de los niveles de MICA se podría predecir la recidiva tumoral desde el diagnóstico inicial tras la primera RTU. Además la determinación de la expresión tisular de NKG2D asociado a los niveles de expresión de MICA como hemos visto en estas categorías, son útiles también para determinar si existe un mayor o menor riesgo de presentar recidiva tumoral.

Podrían subdividirse los pacientes en grupos de riesgo alto y bajo de acuerdo a los niveles de expresión de MICA y NKG2D.

De esta forma se podría retrasar la cistoscopia en el seguimiento de los pacientes con cáncer de vejiga en el grupo de bajo riesgo de recidiva tumoral o hacer controles más intensivos en los pacientes de alto riesgo de recidiva tumoral.

Esto traería como consecuencia una reducción del impacto económico en los sistemas sanitarios y evitaría en determinados casos las molestias de la realización de la cistoscopia a los pacientes.



- Niveles elevados de expresión de MICA se relacionan con una menor supervivencia libre de recidiva tumoral.
- La asociación de niveles de expresión de MICA elevados y NKG2D bajos representa la peor de las condiciones con un aumento de riesgo para la recidiva tumoral.
- La asociación de niveles de expresión de MICA bajos y NKG2D altos es la categoría de referencia y cuando está presente esta combinación representa un factor de protección para la supervivencia libre de recidiva tumoral vesical.
- La recidiva se relaciona con un mayor riesgo de elevación de MICA. Cuando está presente la recidiva aumenta 7 veces el riesgo de tener niveles elevados de MICA.
- La determinación tisular de MICA y NKG2D podrían representar un nuevo recurso alternativo o complementario en el seguimiento del tumor vesical a las pruebas en las cuales se sustenta en la actualidad el seguimiento de estos. Podría predecir la agresividad tumoral tras la resección del tumor vesical primario, aportando información en relación a la supervivencia libre de recidiva tumoral.

### 6.5.7.2 NKG2D y la recidiva

El 48.6% de los casos con recidiva tuvo una expresión débil de NKG2D y el 51.4 % una expresión intensa.

En el 80.3 % de los pacientes sin recidiva se observó una expresión intensa de NKG2D frente a un 19.7% con expresión débil. Los niveles elevados de NKG2D son un factor protector para la recidiva OR 0.26 [0.12;0.55].

**Tabla 87.** Análisis descriptivo según recidiva y NKG2D en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=173	No N=85	Si N=88	OR	N
NKG2D:					143
+ (débil)	49 (34.3%)	14 (19.7%)	35 (48.6%)	Ref.	
++ (intensa)	94 (65.7%)	57 (80.3%)	37 (51.4%)	0.26 [0.12;0.55]	

El 71.4 % (35/49) de los pacientes con expresión débil de NKG2D presentaron recidiva tumoral en comparación con el 39.4 % (37/94) de los pacientes con expresión intensa de NKG2D ( $p < 0.001$ ). Se observa una relación inversa entre los niveles de NKG2D y la recidiva tumoral, a mayor recidiva, menor expresión de NKG2D.

En el modelo de regresión logística para NKG2D en individuos con TMVNMI, se incluyeron todas las variables del estudio y se excluyó MICA (ver *Tabla 83*).

**Tabla 83.** Regresión logística predictores independientes de NKG2D en individuos con TMVNMI.

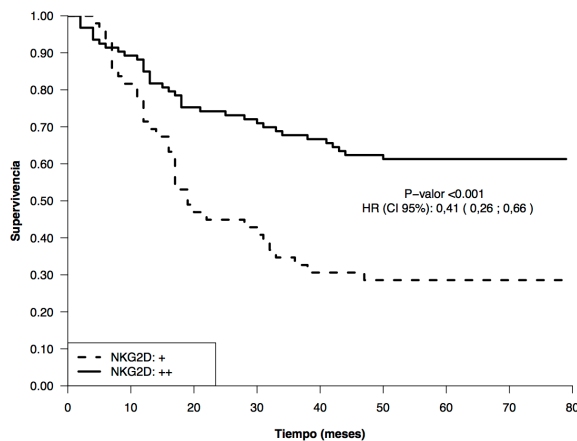
	OR	IC 95%	p.valor
Recidiva: Si	0.417	[0.167;1.041]	0.061
Progresión: T1	0.153	[0.028;0.828]	0.029
Progresión: >T1	0.835	[0.183;3.802]	0.815
CD117 estroma	0.96	[0.925;0.996]	0.03

Los pacientes con recidiva tienen un mayor riesgo de tener valores bajos de NKG2D (OR: 0.417, IC 95%: 0.167; 1.041,  $p=0.061$ ). Niveles de NKG2D elevados son un factor protector para la recidiva.

Realizamos un análisis de supervivencia libre de recidiva de Kaplan-Meier en función de los niveles de expresión de NKG2D (Figura 35).

Los resultados demostraron que los pacientes con mayor expresión de NKG2D tienen una mayor supervivencia libre de recidiva tumoral en comparación con los que tienen menor expresión de NKG2D que tienen un mayor riesgo de recidiva ( $p<0.001$ ).

**Figura 35.** Distribución de la supervivencia libre de recidiva en pacientes con TMVNMI por NKG2D.



En la literatura no existe ningún artículo que estudie la relación entre los niveles de expresión de NKG2D y la recidiva tumoral en el TVNMI.

Un aumento de las células NKG2D+ podría traducirse en una mayor respuesta citotóxica, pero esta respuesta no sólo depende de su aumento, sino de que sean capaces de activarse a través de la interacción con sus ligandos.

Un aumento excesivo de las células encargadas de la respuesta citotóxica también puede ser nocivo.

Independientemente del tipo de tejido tumoral, la mayoría de neoplasias expresan NKG2D de forma heterogénea con una amplia proporción de rangos.

Caballero y cols. (296) sugieren que el receptor NKG2D expresado por las células tumorales humanas puede promover la progresión tumoral en etapas avanzadas. Representa un factor determinante en las neoplasias avanzadas y su correlación con sus ligandos establece el pronóstico (296).

Es muy difícil poder definir realmente las contribuciones de NKG2D en las diferentes etapas de vigilancia tumoral inmune, crecimiento y progresión tumoral.

- Existe una relación inversa entre los niveles de NKG2D y la recidiva tumoral, a mayor recidiva menor expresión de NKG2D.
- Los pacientes con mayor expresión de NKG2D tienen una mayor supervivencia libre de recidiva tumoral en comparación con los que tienen menor expresión de NKG2D que tienen un mayor riesgo de recidiva.

### 6.5.8.1 MICA y la progresión

El 17.34 % de los TMVNMI de nuestra serie progresaron (8.09 % a T1 y 9.25 % a >T1). El tiempo medio hasta la progresión fue de 20.5 meses.

No hubo diferencias en cuanto a la expresión de MICA y la progresión tumoral (50% expresión débil y 50 % expresión intensa de MICA).

En los pacientes que no progresaron la mayoría (76.3 %) tuvo una expresión débil de MICA, frente a un 23.7 % con expresión intensa (p=0.008).

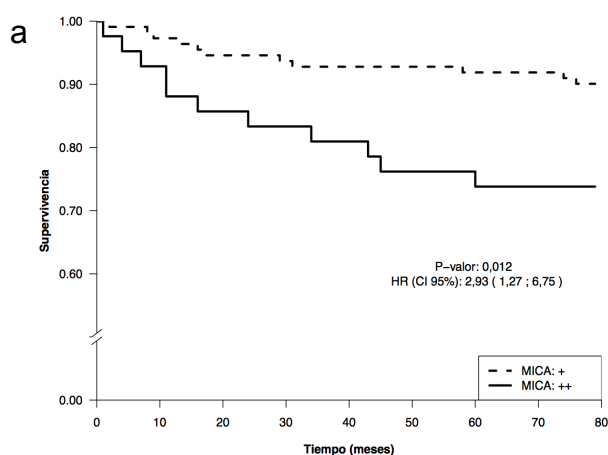
De los pacientes con expresión de MICA intensa (42 casos), el 73.81 % (31 casos) no presentaron progresión tumoral vs. el 26.19 % (11 casos) que si progresaron.

**Tabla 91.** Análisis descriptivo según progresión y MICA en los pacientes con TMVNMI.

	[ALL] N=153	No event N=131	Progresión N=22	HR	p.ratio	p.valor
MICA						0.008
+ (débil)	111 (72.5%)	100 (76.3%)	11 (50.0%)	Ref.	Ref.	
++ (intensa)	42 (27.5%)	31 (23.7%)	11 (50.0%)	2.93 [1.27;6.76]	0.012	

Se realizó un análisis de supervivencia libre de progresión de Kaplan-Meier en función de los niveles de expresión de MICA (*Figura 35a*).

**Figura 35a.** Distribución de la supervivencia libre de progresión en pacientes con TMVNMI por MICA.

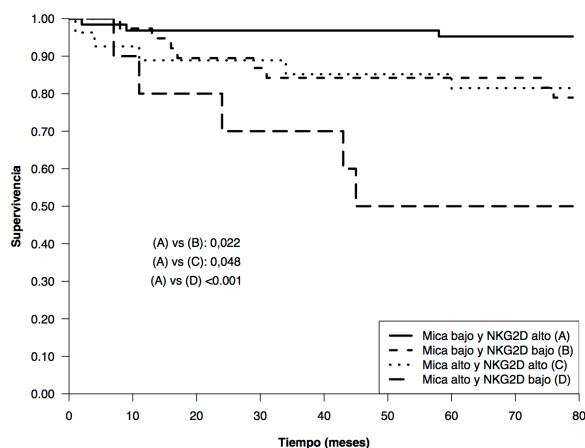


Vemos que los pacientes con niveles de expresión débil de MICA tienen una mayor supervivencia libre de progresión frente a los pacientes con niveles elevados que presentan una menor supervivencia libre de progresión ( $p=0.012$ ).

Al igual que en el apartado de recidiva tumoral, para el estudio de la progresión agrupamos las variables MICA y NKG2D en una sola variable con 4 categorías según su nivel de expresión (ver pág. 158) detectamos que el 51.3 % de los pacientes de los pacientes con expresión de MICA bajo y NKG2D alto no progresaron frente al 4.76 % que presentó progresión (ver *Tabla 93* página 172)

En las curvas de Kaplan-Meier realizadas para analizar la supervivencia libre de progresión en función de la variable conjunta MICA/NKG2D (*Figura 36*).

**Figura 36.** Distribución de la supervivencia libre de progresión tumoral en pacientes con TMVNMI por MICA/NKG2D.



En la *Figura 36* se observa la curva de supervivencia libre de progresión tumoral para MICA y NKG2D como una variable conjunta categorizada en: A) MICA bajo y NKG2D alto, B) MICA bajo y NKG2D bajo, C) MICA alto y NKG2D alto y D) MICA alto y NKG2D bajo.

La categoría A (MICA bajo y NKG2D alto) es la categoría de referencia y cuando está presente dicha combinación representa un factor de protección para la supervivencia libre de progresión tumoral ( $p < 0.001$ ).

La categoría D (MICA alto y NKG2D bajo) representa la peor de las condiciones con un aumento de riesgo para la progresión tumoral. Las diferencias entre las cuatro categorías y su nivel de significación estadística se describen en la *Figura 36*.

Al igual que en la recidiva tumoral, el significado de la elevación o disminución de los niveles de los ligandos de NKG2D son más que controvertidos en la literatura y presentan discrepancias. Los niveles elevados de MICA en las fases iniciales del cáncer de mama y en el cáncer colorrectal, han demostrado un aumento de la supervivencia (245,297). Por otro lado su elevación en el cáncer de mama invasivo y en el cáncer de ovario han demostrado ser un factor de mal pronóstico (254,298). Estas discrepancias también pueden estar en relación a los métodos empleados para la detección de MICA en los estudios publicados, el tipo de anticuerpo empleado y su sensibilidad para la detección.

Liu y cols. (299) determinaron que la progresión tumoral en ratones transgénicos con cáncer de próstata fue debida a elevados niveles séricos de sMICA y un deterioro severo de la inmunidad del huésped, producido por la depleción de las células NK periféricas.

El impacto de la progresión tumoral por ligandos de NKG2D es complejo, dependiendo de si el ligando se encuentra en la superficie celular o en su forma soluble. Como ya se ha mencionado entre los mecanismos de evasión inmune, las células neoplásicas a través de una actividad de proteólisis pueden producir las

formas solubles de los ligandos de NKG2D (292). Las formas solubles de MICA y otros ligandos de NKG2D podrían ser unos marcadores de progresión tumoral.

Puesto que la inducción de expresión de ligandos de NKG2D es una respuesta al estrés celular y daño al DNA para alertar al sistema inmune, el valor pronóstico de la expresión tisular de ligandos de NKG2D durante las fases iniciales del cáncer puede depender de la inmunogenicidad tumoral y del microambiente tisular de un determinado tipo de cáncer (300).

Un consenso de que NKG2D y sus ligandos son protectores en las fases iniciales pero no en las fases avanzadas del tumor, revela el fallo progresivo del sistema inmune el cual permite el crecimiento tumoral. Posteriormente, se produce la progresión tumoral por una expresión persistente de ligandos de NKG2D con cambios funcionales dinámicos que pueden favorecer la susceptibilidad tumoral del huésped en lugar de la resistencia (301). Aunque es más conocido por su función protectora en la vigilancia inmunológica de tumores, NKG2D y sus ligandos pueden permitir al tumor evadir y suprimir al sistema inmune y estimular en determinadas circunstancias el crecimiento y la progresión tumoral.

En nuestro estudio no hemos realizado determinaciones de la forma soluble de MICA. Se desconoce si existe un umbral en el cual tras una elevada expresión de MICA tisular se inicia el paso de MICA a su forma soluble o si existe alguna correlación entre los niveles de la forma tisular y la soluble.



- No detectamos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la expresión de MICA y la progresión tumoral.
- Niveles de expresión débil de MICA tienen una mayor supervivencia libre de progresión frente a los pacientes con niveles elevados que presentan una menor supervivencia libre de progresión.
- La condición MICA bajo y NKG2D alto es un factor de protección para la supervivencia libre de progresión tumoral.
- La categoría MICA alto y NKG2D bajo representa la peor de las condiciones con un aumento de riesgo para la progresión tumoral.

#### 6.5.8.2 NKG2D y la progresión

El 59.1 % de los pacientes con progresión tumoral tuvieron una expresión débil de NKG2D.

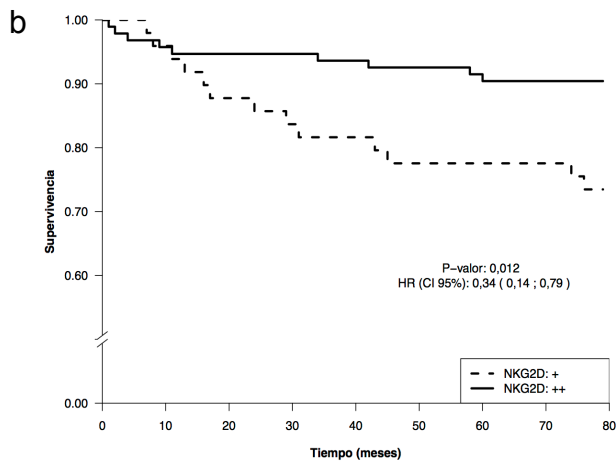
El 70.2 % de los pacientes sin progresión tumoral demostró una expresión intensa de NKG2D ( $p=0.008$ ). Existe una tendencia a que los niveles elevados de NKG2D sean un factor protector para la progresión tumoral (Ver *Tabla 92*)

Se realizó un análisis de supervivencia libre de progresión de Kaplan-Meier en función de los niveles de expresión de NKG2D (*Figura 35b*).

Niveles de expresión elevados de NKG2D se asocian en nuestro estudio con una mayor supervivencia libre de progresión, en comparación con los pacientes con

niveles bajos de expresión de NKG2D que presentan un menor supervivencia libre de progresión (*Figura 35b*).

**Figura 35b.** Distribución de la supervivencia libre de progresión en pacientes con TMVNMI por NKG2D.



- Existe una tendencia a que los niveles elevados de NKG2D sean un factor protector para la progresión tumoral.
- Niveles de expresión elevados de NKG2D se asocian en nuestro estudio con una mayor supervivencia libre de progresión, en comparación con los pacientes con niveles bajos de expresión de NKG2D que presentan una menor supervivencia libre de progresión.

## **6.6. Expresión de ciertos componentes del infiltrado inflamatorio tumoral y su relación con MICA/NKG2D**

La existencia de un infiltrado inflamatorio a nivel del tejido tumoral en algunos casos precede al desarrollo del tumor. Este infiltrado inflamatorio tumoral está formado por varios tipos de células entre las que destacan los linfocitos, que son capaces de producir gran número de citocinas que regulan la respuesta inflamatoria tumoral. Las células inflamatorias pueden producir factores de crecimiento los cuales inhiben la respuesta inmune antitumoral. Estas células también son responsables junto con las células endoteliales, células tumorales y del estroma de crear un microambiente crítico para la supervivencia, desarrollo y diseminación del tumor (302). Las interacciones dentro del microambiente tumoral representan importantes mecanismos para el desarrollo tumoral y metastásico, proporcionando un suministro vascular mediante la angiogénesis y vías de escape. Uno de los objetivos secundarios de nuestro estudio fue valorar algunos de estos componentes del infiltrado inflamatorio tumoral y establecer si existe alguna relación con la expresión de MICA y NKG2D, así como con la recidiva y progresión tumoral.

De estos componentes estudiamos la expresión de células NK (CD56), neutrófilos (CD15), macrófagos (CD68), células cebadas o mastocitos (CD117 o C-Kit) y linfocitos T CD4 y CD8. Finalmente valoramos la expresión de la angiogénesis mediante la detección de la expresión de CD34 (ver *Figura 11*, página 59).

Al analizar la expresión de todos estos elementos pertenecientes al infiltrado inflamatorio tumoral, sólo encontramos alguna relación entre la expresión de CD117 y CD15 con la expresión de NKG2D.

## 6.6.1 Relación entre la expresión de NKG2D y otras moléculas del infiltrado inflamatorio tumoral:

### 6.6.1a NKG2D y CD117 (c-Kit)

En el análisis multivariado de NKG2D mediante un modelo de regresión logística para los pacientes con TMV se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 82.** Regresión logística predictores independientes de NKG2D en individuos con TMV.

	OR	IC 95%	p-valor
Edad	1.053	[1.004;1.105]	0.035
Sexo	0.069	[0.007;0.677]	0.022
Fumador	0.144	[0.013;1.587]	0.114
Ex-fumador	0.034	[0.003;0.434]	0.009
TMVMI	0.34	[0.103;1.13]	0.078
Multiplicidad	0.328	[0.126;0.857]	0.023
CD117 estroma	0.938	[0.898;0.98]	0.004
CD15 focal	0.447	[0.122;1.639]	0.224
CD15 homogéneo	0.217	[0.069;0.685]	0.009

Los pacientes con mayor nivel de expresión de CD117 a nivel del estroma (OR: 0.938, IC 95% [0.898; 0.98], p=0.004) tienen un menor riesgo de NKG2D alto. A mayor expresión de CD117 menor es la expresión de NKG2D.

Los mastocitos son células de origen hematopoyético que pueden participar en la respuesta de la inmunidad innata y adaptativa. Su presencia en la periferia o infiltrando los tejidos tumorales va a favor de su rol en la modulación de la biología tumoral (303). Los mastocitos cuando se activan tienen la capacidad de secretar mediadores inflamatorios como la histamina que se encuentran almacenados en gránulos citoplasmáticos, además de ciertas proteasas y otros factores como prostaglandinas y leucotrienos. Estos mediadores inician la respuesta inmune, se reclutan otras células inflamatorias y así participan en la remodelación y reparación

tisular. Pueden secretar citocinas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$  o anti-inflamatorias como la IL-10 y el TGF- $\beta$ .

Niveles elevados de mastocitos intratumorales se han asociado con un mal pronóstico, aumento de las metástasis y reducción de la supervivencia en diversas neoplasias incluyendo el melanoma (304), próstata (305), páncreas y otras.

Nuestros resultados indican que en el TMV a mayores niveles de CD117 en el estroma disminuyen los niveles de expresión de NKG2D. Lo cual como hemos explicado previamente tiene un efecto perjudicial que puede favorecer la progresión tumoral. No tenemos una explicación de por qué esta relación se ha detectado sólo a nivel del estroma y no en el compartimiento epitelial.

Las células tumorales producen mediadores inflamatorios y factores proangiogénicos incluidos el stem cell factor (SCF). El SCF es un ligando para CD117, también conocido como receptor KIT un receptor de tirosina quinasa expresado ampliamente en los mastocitos (306). La activación de la vía SCF/Kit es necesaria para la maduración, migración y supervivencia de los mastocitos. Los tejidos adyacentes al tumor a través de la quimiotaxis de SCF promueven la infiltración y maduración de los mastocitos para la liberación de mediadores angiogénicos, proteasas y factores de crecimiento que favorecen el crecimiento tumoral (307). Los mastocitos al liberar las proteasas dentro del tumor contribuyen a la degradación de la matriz extracelular y liberación de factores que promueven la angiogénesis y la metástasis (307) (Ver *Figura 37*, página 233).

Serel y cols. (308) estudiaron la presencia y el pronóstico de los mastocitos en el carcinoma vesical en una serie de 56 muestras procedentes de RTU. No demostraron correlación entre la expresión de mastocitos en el tejido tumoral y el

grado histológico ( $p=0.5$ ) y tampoco en la expresión de mastocitos a nivel de la lámina propia y el grado histológico ( $p=0.5$ ).

Volviendo a nuestro estudio al igual que Serel y cols. no observamos correlación entre los niveles de expresión de mastocitos y las variables anatomopatológicas. Sólo encontramos una asociación entre los niveles de expresión de CD117 a nivel del estroma con los niveles de NKG2D.

- No detectamos relación entre los niveles de expresión de los mastocitos (CD117) y las variables clínico-patológicas. Tampoco con el resto de variables moleculares excepto NKG2D.
- A mayor nivel de expresión de CD117 a nivel del estroma menor es la expresión de NKG2D.
- No encontramos correlación entre la expresión a nivel epitelial de los mastocitos y la expresión de NKG2D.

### 6.6.1b NKG2D y CD15 (Lewis x)

El nivel de expresión de CD15 con patrón focal no se relaciona con los niveles de expresión de NKG2D tisular (OR: 0.447, IC 95% [0.122; 1.639], p=0.224).

Los pacientes con mayor nivel de expresión de CD15 con patrón homogéneo (OR: 0.217, IC 95% [0.069; 0.685], p=0.009) tienen un menor riesgo de NKG2D alto. A mayor expresión de CD15 homogéneo, menor es la expresión de NKG2D (ver Tabla 82: regresión logística predictores independientes de NKG2D en individuos con TMV, página 228).

El CD15 o antígeno sialil Lewis X (sLex) se expresa en la superficie de los leucocitos humanos e interacciona con las células endoteliales activadas. Puede expresarse en las células del urotelio sano en forma de "umbrella cells" (309).

En las células tumorales CD15 se encarga de mediar la unión entre las células endoteliales y las tumorales. Su expresión se correlaciona con el potencial invasivo del tumoral.

En el cáncer colorrectal CD15 se expresa en las células tumorales, células estromales y células inflamatorias. Esta expresión no se correlaciona con las características clínicopatológicas del tumor, excepto con el estadio tumoral (310).

La evidencia reciente indica que los neutrófilos juegan un papel importante en la transformación maligna, progresión tumoral, angiogénesis y en la modulación de la inmunidad antitumoral en varias neoplasias (310). Regulan la invasión a múltiples niveles, pueden facilitar la invasión tumoral mediante la degradación de la matriz extracelular a través de la liberación de metaloproteinasa-9.

En las metástasis pulmonares, hepáticas y de cáncer de ovario el antígeno de Lewis X juega un rol importante. El papel biológico de este antígeno es la

adhesión de las células uroteliales tumorales. La habilidad de las células neoplásicas de adhesión a las células endoteliales se correlaciona con su potencial metastásico (309).

En nuestro estudio la expresión de CD15 con patrón homogéneo se asocia a una disminución de los niveles de expresión de NKG2D, la cual es una condición de mal pronóstico, debido a los efectos negativos que producen niveles bajos de NKG2D. Esto coincide en parte con la literatura en cuanto al mal pronóstico de niveles elevados de CD15. No obstante, no se ha comunicado en la literatura la relación de la expresión de CD15 y NKG2D.

- Los pacientes con mayor nivel de expresión de CD15 con patrón homogéneo tienen un menor riesgo de NKG2D alto. A mayor expresión de CD15 homogéneo menor es la expresión de NKG2D.
- Los niveles de expresión de CD15 no se relacionaron con las otras variables clínico patológicas ni moleculares.

### **6.6.2 Relación entre la recidiva tumoral y la expresión de otras moléculas del infiltrado inflamatorio tumoral:**

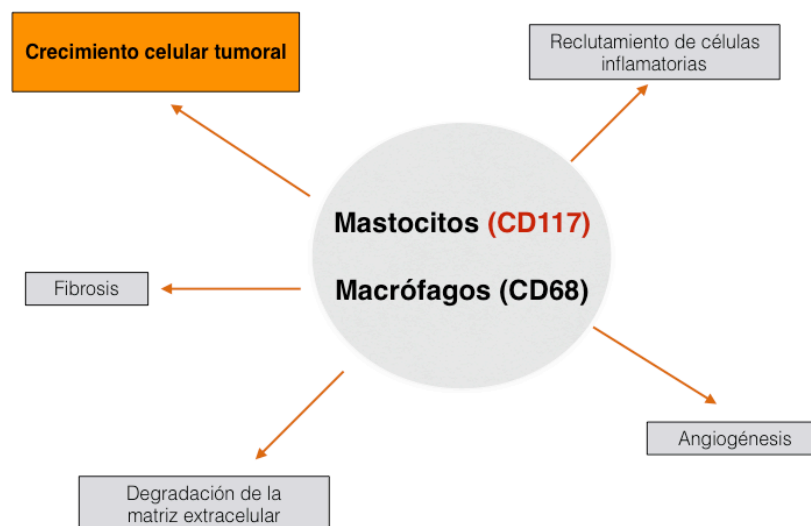
#### **6.6.2.1 Recidiva y expresión de CD68**

Los macrófagos se encuentran entre las células más abundantes del infiltrado inflamatorio tumoral. Los macrófagos activados generalmente se dividen en dos tipos: los macrófagos M1 (clásicamente activados) y los M2 (alternativamente activados). Los M1 pueden eliminar microorganismos y células tumorales, además son capaces de producir grandes cantidades de citocinas proinflamatorias y



agentes tumoricidas (TNF- $\alpha$  e IL-12), especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (ROS y RNS). En el microambiente tumoral los macrófagos asociados al tumor (TAMs) están principalmente constituidos por el tipo M2 (311). Los macrófagos M2 tienen poca capacidad para destruir células tumorales pero están mejor adaptados para la promoción de la angiogénesis, reparación y remodelación de los tejidos dañados y supresión de la respuesta inmune adaptativa

**Figura 37.** Principales efectos ejercidos por los macrófagos y mastocitos en el contexto del microambiente tumoral. Modificado de Ribatti y cols. (311).



En los tumores en regresión sin progresión predomina el tipo M1 ejerciendo un efecto neto de actividad antitumoral. Por otro lado cuando predomina el fenotipo M2 favorece el desarrollo del tumor. No está claro que condición favorece el predominio de uno u otro fenotipo en el microambiente tumoral.

La infiltración extensa de TAMs se ha relacionado con un mal pronóstico para el cáncer de mama, próstata, cervix y vejiga (312,313).

Hanada y cols. (313) demostraron mayores niveles de TAMs en el tumor vesical músculo-infiltrante en comparación con el no músculo infiltrante ( $p < 0.0001$ ). La cuantificación del número de microvasos (MVC) fue mayor en los tumores con

mayor cuantificación de TAMs. Observaron una correlación positiva entre la cuantificación de TAM y los MVC ( $r=0.30$ ;  $p=0.02$ ). La cuantificación de TAMs se realizó mediante un estudio inmunohistoquímico de CD68.

De todos los efectos de los TAMs sobre el microambiente tumoral la estimulación de la angiogénesis es probablemente uno de los que mayor influencia tiene sobre el crecimiento tumoral. A nivel experimental el bloqueo del reclutamiento de los macrófagos disminuye la densidad de los vasos, reduce el crecimiento tumoral y las metástasis pulmonares (314).

En nuestro estudio no existe relación entre los niveles de expresión de CD68 con MICA, NKG2D ni con las variables clínicopatológicas, excepto con la recidiva.

Con todas las variables que fueron significativas en el estudio univariado, se realizó un análisis de regresión logística para la recidiva en individuos con TMVNMI.

Vemos que los niveles de expresión de CD68 son un factor de riesgo para una menor supervivencia libre de recidiva tumoral (HR: 1.615, IC 95%: 1.095; 2.381,  $p=0.016$ ), es decir, los pacientes con mayor expresión de CD68 tienen mayor riesgo de recidiva tumoral.

Coincidiendo en parte con la literatura, en nuestro estudio el aumento de expresión de CD68 representa un factor de mal pronóstico, particularmente para la supervivencia libre de recidiva tumoral.

- Un aumento en la expresión de CD68 se asocia a una menor supervivencia libre de recidiva tumoral en el TMVNMI.

#### 6.6.2.2 Recidiva y expresión de CD4

En la literatura los niveles elevados de infiltrado por linfocitos T CD4 valorados mediante inmunohistoquímica se asocian con mal pronóstico en el carcinoma de células renales (315).

Sin embargo, no queda claro si la infiltración de linfocitos T CD4 + intratumoral es un signo de una respuesta inmune activa o si es una consecuencia de la excreción de citocinas del tumor que estimula este infiltrado (316).

Bromwich y cols. (316) demostraron que el aumento de linfocitos T CD4+ intratumorales se asocia con mal pronóstico independientemente del grado en los pacientes con carcinoma renal de células claras.

Zhang y cols. (317) obtuvieron resultados similares objetivando que una mayor densidad de infiltrado de linfocitos T CD4+ es un factor predictor independiente de la supervivencia desfavorable en los pacientes con TMVNMI. No obstante, no se asoció con la supervivencia libre de recidiva tumoral.

Pichler y cols. (318) demostraron que una disminución del infiltrado tumoral con linfocitos T CD4+ antes de iniciar el tratamiento con BCG disminuye la supervivencia libre de recidiva tumoral. Observaron una asociación estadísticamente significativa entre el fracaso al tratamiento con BCG y una baja densidad de infiltrado de linfocitos T CD4+. El análisis de supervivencia demostró una mayor supervivencia libre de recidiva tumoral para los pacientes con niveles de células T CD4+ y GATA3.

Volviendo a nuestro estudio no detectamos relación entre los niveles de expresión de CD4 con MICA, NKG2D ni con las variables clinicopatológicas, excepto con la recidiva.

En el análisis de regresión logística para la recidiva en individuos con TMVNMI. Vemos que los niveles de expresión de CD4 son un factor protector para una mayor supervivencia libre de recidiva tumoral (HR: 0.967, IC 95%: 0.947; 0.988,  $p=0.002$ ), es decir, los pacientes con mayor expresión de CD4 tienen menor riesgo de recidiva tumoral.

Nuestros resultados difieren de los de Bromwich y Zhang, pero coinciden en parte con los resultados de Pichler y cols. en los que el aumento intratumoral de linfocitos T CD4+ se asocia a una mayor supervivencia libre de recidiva en el TMVNMI, sin embargo en nuestro trabajo a diferencia de Pichler y cols. no pudimos demostrar una asociación entre los niveles de linfocitos T CD4+ y la respuesta al tratamiento con terapia endovesical con BCG.

- Un aumento en la expresión de CD4 se asocia a una mayor supervivencia libre de recidiva tumoral en el TMVNMI.

## **6.7 Limitaciones y fortalezas del estudio:**

### 6.7.1 Limitaciones del estudio

La principal limitación del estudio es su carácter retrospectivo. Se construyeron tres TMAs con muestras procedentes de pacientes tratados con RTU de Tm vesical en el período 1998-2003, siendo una serie histórica. El objetivo era tener un seguimiento clínico largo (en nuestro caso de 78 meses). Hubo un número de casos considerables que no pudieron incluirse en la confección del TMA por muestra insuficiente (dado que las muestras se emplearon en otros estudios previos). Sin embargo, este número de casos excluidos por no cumplir con los criterios de inclusión no afectaron el tamaño muestral.

El hecho de ser una serie histórica también influye en los protocolos de tratamiento del Servicio de Urología en ese momento, principalmente en el tratamiento con instilaciones endovesicales. En nuestra serie un gran número de casos fueron tratados con instilaciones con BCG, a pesar de ser pacientes de bajo riesgo o riesgo intermedio, que según los protocolos actuales no serían tratados con BCG.

En relación al hábito tabáquico en la mayor parte de los casos estaba recogido en las historias clínicas de forma incompleta, sobre todo la variable ex-fumador.

Los datos de la variable ex-fumador se define como el cese del hábito tabáquico de 1 año o más. Por lo que no se ha podido definir subcategorías de acuerdo al tiempo desde que se abandono el tabaco. En este mismo punto del hábito tabáquico tampoco disponiamos de información clínica sobre los fumadores pasivos. Ambos factores podrían haber influido en la recidiva.

No todas las historias clínicas contenían este dato de manera precisa.

Finalmente, el hecho de haber realizado sólo detección inmunohistoquímica de las variables estudiadas, a pesar de que en la actualidad existen otras modalidades diagnósticas más complejas de tipo molecular.

Pero es importante destacar que dichas modalidades requieren un elevado coste económico y deben ser realizadas en centros de referencia. Sin embargo, el diagnóstico mediante inmunohistoquímica está disponible en la mayoría de centros y supone un bajo coste, en contraste con lo que todavía ocurre con las técnicas moleculares.

#### 6.7.2 Fortalezas del estudio

El uso del TMA permite valorar de forma masiva y homogénea numerosos casos del banco de tejidos anatomopatológicos de manera simultánea, rápida y reproducible con lo que pueden estudiarse numerosos marcadores con relativa facilidad y con carácter multicéntrico. El estudio de marcadores inmunohistoquímicos puede ser útil no sólo para la investigación, sino en la práctica clínica diaria, ya que prácticamente la mayoría de laboratorios de cualquier hospital o clínica, independientemente de su tamaño pueden disponer de técnicas de inmunohistoquímica, cuyo bajo coste las hace accesibles en cualquier centro.

En nuestro estudio hemos observado que la detección de NKG2D y MICA mediante inmunohistoquímica puede predecir la recidiva tumoral, siendo innovador, ya que en la actualidad no existe ningún estudio en la literatura en el que se analice la relación entre la expresión de MICA y NKG2D con la recidiva y progresión tumoral.

Por último, el presente trabajo supone un avance significativo en la literatura sobre este tema no sólo porque se pone de manifiesto el papel de MICA y NKG2D, tanto

de su presencia como de su cuantía, en la biología del cáncer vesical sino además aporta información no descrita hasta el momento sobre el valor de moléculas más estudiadas como son CD15, CD117, CD4 y CD68. Todas ellas también relacionadas con los mecanismos inmunológicos e inflamatorios. En este sentido el presente trabajo constituye un nuevo y poderoso argumento en favor del estudio de la inmunoterapia en el cáncer vesical.

### **6.8 Futuras líneas de investigación:**

Esta tesis doctoral establece la base para futuras líneas de investigación como:

- Determinación de MICA soluble y establecer una correlación con los hallazgos a nivel tisular relacionándolo con la recidiva y progresión en pacientes con TMVNMI.
- Determinación de MICA soluble en pacientes con tumor vesical metastásico.
- Estudio de la expresión de MICA en TMV y tejido vesical sano mediante el anticuerpo B1-F2A4.
- Determinar la expresión de MICA y NKG2D en otras neoplasias urológicas.
- Estudio de MICA y NKG2D en el rechazo del trasplante renal.
- Estudio de MICA y NKG2D en la hiperplasia benigna de próstata y en pacientes en estudio por elevación del PSA con biopsias de próstata negativas.
- Relación entre la expresión de MICA y NKG2D con otras vías de respuesta al daño del DNA como p53, ATM, Chk2 y FOXO1.
- Relación entre la expresión de MICA y NKG2D con la expresión de PDL-1 en el componente inflamatorio y tejido tumoral del carcinoma urotelial.

## **9. CONCLUSIONES**





- 1)** El estudio de la expresión tisular de MICA y NKG2D en los TMVNMI primarios puede ser útil como método complementario o alternativo en la predicción de la recidiva tumoral. Ambas moléculas se expresan en todos los TMV, MICA lo hace de forma exclusiva en el tejido tumoral y NKG2D lo hace además en el tejido sano. Es la intensidad de la expresión lo que les otorga el potencial interés clínico.
  
- 2)** El parámetro más potente para predecir el tiempo de supervivencia libre de recidiva tumoral es la expresión tisular elevada de MICA. Valores altos de expresión de MICA en el TMVNMI primario se asocian con un probabilidad de recidiva 3 a 16 veces más elevada que los casos con expresión débil.
  
- 3)** NKG2D también puede tener interés en este contexto si se combina con MICA, ya que tener alteradas las dos expresiones (niveles altos de MICA y bajos de NKG2D) en el TMVNMI primario conlleva a unos tiempos más cortos de supervivencia libre de recidiva y de progresión tumoral.
  
- 4)** En nuestra serie no hemos detectado diferencias estadísticamente significativas en los niveles de MICA en relación con las distintas variables clínico-patológicas, los grupos de riesgo de la EORTC ni con la predicción de la respuesta al tratamiento con la BCG.
  
- 5)** En cambio, valores bajos de NKG2D se asocian con un perfil de paciente mujer, exfumador, con tumores vesicales múltiples y de menor edad. El resto de variables clínico-patológicas, los grupos de riesgo de la EORTC y la predicción de la respuesta al tratamiento con la BCG tampoco se asocian con la expresión de esta molécula.
  
- 6)** La cantidad de linfocitos CD4 (“helper”) entre las células tumorales se asocia a una menor probabilidad de recidiva tumoral. Por el contrario, la cantidad de células CD68+ (histiocitos) entre las células tumorales se asocia, también de manera significativa, a mayor probabilidad de recidiva tumoral.

**7)** Por último, tanto la expresión homogénea de CD15 en el tumor como la cantidad de CD117+ (mastocitos) en el estroma tumoral se relacionan de manera independiente con menores valores de expresión de NKG2D.

**8)** Este conjunto de datos no se encuentra reflejado en la literatura previa sobre el cáncer de vejiga y constituye una nueva evidencia adicional de la importancia de los mecanismos de inmunidad innata y de la inflamación en la biología de este tumor.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11. International Agency for Research on Cancer; 2014. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
2. American Cancer Society. Cancer facts and figures 2015. Atlanta: American Cancer Society. En 2015.
3. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-403.
4. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol*. 2016;71(1):96-108.
5. Sociedad Española de Oncología Médica. Las Cifras del Cáncer en España 2016. Sociedad Española de Oncología Médica. 2016;1-20.
6. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M BP. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*. 2007;18:581-92.
7. Cabanes A, Cabanes A, Pérez-Gómez B, Pérez-Gómez B, Aragones N, Aragones N, et al. La situación del cáncer en España, 1975-2006. Instituto de Salud Carlos III. 2009;1-137.
8. Sociedad Española de Oncología Médica. Las Cifras del Cáncer en España 2014. Sociedad Española de Oncología Médica. 2014;1-20.
9. Generalitat de Catalunya. Departament de Salut. Plan contra el cáncer en

Cataluña 2015-2020. 2015.

10. Ribes J, Esteban L, Clèries R, Galceran J, Marcos-Gragera R, Gispert R, et al. Cancer incidence and mortality projections up to 2020 in Catalonia by means of Bayesian models. *Clin Transl Oncol*. 2014;16(8):714-24.
11. National Cancer Institute. SEER Stat Fact Sheets: Bladder Cancer. 2016. Disponible en: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html>
12. Parkin DM., Pisani P. FJ. Estimates of the Worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer*. 1999;80:827-41.
13. Shariat SF, Sfakianos JP, Droller MJ, Karakiewicz PI, Meryn S, Bochner BH. The effect of age and gender on bladder cancer: A critical review of the literature. *BJU Int*. 2010;105(3):300-8.
14. Mansson A., Anderson H. CS. 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.
15. Brauers A. JG. Epidemiology and biology of human urinary bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000;126:575-83.
16. Madeb R. MEM. Gender, racial and age differences in bladder cancer incidence and mortality. *Urol Oncol*. 2004;22:86-92.
17. Horstmann M., Witthuhn R., Falk M. SA. Gender-Specific Differences in Bladder Cancer: A Retrospective Analysis. *Gender Med*. 2008;5:385-394.
18. Mungan A.N., Kiemenev L.A.M.L., Van Dicjk J.A.A.M., Van Der Poel H.G. WJA. Gender differences in stage distribution of bladder cancer. *Urology*. 2000;55:368-71.
19. Lorente JA, Bielsa O, Rijo E, Cortadellas R, Nohales G, Francés A, Juanpere N, Lloreta J AO. Clinical-pathological differences and smoking habit

- depending on gender in a cohort of patients with transitional cell carcinoma of the bladder: retrospective study. *Arch Esp Urol*. 2011;64:427-33.
20. Krabbe LM, Svatek RS, Shariat SF, Messing E, Lotan Y. Bladder cancer risk: Use of the PLCO and NLST to identify a suitable screening cohort. *Urol Oncol*. 2015;33(2):65e19-65e25.
  21. Hemelt M, Yamamoto H, Cheng KK, Zeegers MPA. The effect of smoking on the male excess of bladder cancer: A meta-analysis and geographical analyses. *Int J Cancer*. 2009;124(2):412-9.
  22. Kluth LA, Fajkovic H, Xylinas E, Crivelli JJ, Passoni N, Roupret M et al. Female gender is associated with higher risk of disease recurrence in patients with primary T1 high-grade urothelial carcinoma of the bladder. *World J Urol*. 2013;31:1029–36.
  23. Thorstenson A, Hagberg O, Ljungberg B, Liedberg F, Jancke G, Holmäng S, et al. Gender-related differences in urothelial carcinoma of the bladder: a population-based study from the Swedish National Registry of Urinary Bladder Cancer. *Scand J Urol*. 2016;1805(5):1-6.
  24. Vineis P., Alavanja M., Buffler P, Fontham E., Franceschi S. GY. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96:99-106.
  25. Bryant M.S., Vineis P., Skipper P.L. TS. Hemoglobin adducts of aromatic amines: associations with smoking status and type of tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:9788-91.
  26. Sorahan T. PD. Mortality study of workers employed at a plant manufacturing chemicals for the rubber industry: 1955–86. *Br J Ind Med*. 1993;50:998-1002.
  27. Baan R., Straif K., Grosse Y., Secretan B., El Ghissassi F. B V.

- Carcinogenicity of some aromatic amines, organic dyes and related exposures. *Lancet Oncol.* 2008;9:322-3.
28. Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2013;63(2):234-41.
  29. Jung, I., Messing E. Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression. *Cancer Control.* 2000;7(4):325-34.
  30. Cole P., Hoover R. FG. Occupation and cancer of the lower urinary tract. *Cancer.* 1972;29:1250-60.
  31. Selinski S, Gerullis H, Otto T, Roth E, Volkert F, Ovsiannikov D, et al. Ultra-slow N-Acetyltransferase 2 Is Associated with Recurrence-free Time in Bladder Cancer Patients. *Eur Urol.* 2016;6-7.
  32. Cumberbatch MG, Rota M, Catto JWF, La C, Catto J. The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis : A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *Eur Urol.* 2016;70(3):458-66.
  33. Jiang X, Yuan JM, Skipper PL, Tannenbaum SR YM. Environmental tobacco smoke and bladder cancer risk in never smokers of Los Angeles County. *Cancer Res.* 2007;67:7540–5.
  34. Colt JS, Karagas MR, Schwenn M, Baris D, Johnson A, Stewart P, et al. Occupation and bladder cancer in a population-based case-control study in Northern New England. *Occup Environ Med.* 2011;68(4):239-49.
  35. Leone Roberti Maggiore U, Ferrero S, Candiani M, Somigliana E, Viganò P, Vercellini P. Bladder Endometriosis: A Systematic Review of Pathogenesis, Diagnosis, Treatment, Impact on Fertility, and Risk of Malignant



- Transformation. *Eur Urol.* 2017;71(5):790-807.
36. Ferguson AR. Associated bilharziasis and primary malignant disease of the urinary bladder with observations on a series of forty cases. *J Pathol Bacteriol.* 1911;16:76–94.
  37. Salem S, Mitchell RE, El-Alim El-Dorey A, Smith JA, Barocas DA. Successful control of schistosomiasis and the changing epidemiology of bladder cancer in Egypt. *BJU Int.* 2011;107(2):206-11.
  38. Education P, Hospital G, Services S. Phenacetin and Bladder Cancer. *Br Med J.* 1969;4(5685):701-2.
  39. Fairchild WV, Spence CR, Solomon HD GM. The incidence of bladder cancer after cyclophosphamide therapy. *J Urol.* 1979;122(2):163-4.
  40. Tuccori M, Filion KB, Yin H, Yu OH, Platt RW, Azoulay L. Pioglitazone use and risk of bladder cancer: population based cohort study. *BMJ.* 2016;352:i1541.
  41. Instituto Nacional de Estadística. Demografía y población: Cifras de población.
  42. IMSERSO. Informe 2012. Las personas mayores en España. Datos estadísticos Estatales y por Comunidades Autonomas [Internet]. Catálogo de publicaciones de la Administración General del Estado. 2014. 286 p. Disponible en: <http://publicacionesoficiales.boe.es/>
  43. Mariotto AB, Robin Yabroff K, Shao Y, Feuer EJ, Brown ML. Projections of the cost of cancer care in the United States: 2010-2020. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(2):117-28.
  44. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B HR. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature.

- Pharmacoeconomics. 2003;21(18):1315-30.
45. Sievert KD, Amend B, Nagele U, Schilling D, Bedke J, Horstmann M, et al. Economic aspects of bladder cancer: What are the benefits and costs? *World J Urol.* 2009;27(3):295-300.
  46. Avritscher EBC, Cooksley CD, Grossman HB, Sabichi AL, Hamblin L, Dinney CP, et al. Clinical model of lifetime cost of treating bladder cancer and associated complications. *Urology.* 2006;68(3):549-53.
  47. Robert S. Svatek, Brent K. Hollenbeck, Sten Holmäng, Richard Lee, Simon P. Kim, Arnulf Stenzl YL. The Economics of Bladder Cancer: Costs and Considerations of Caring for This Disease. *Eur Urol.* 2014;66:253-62.
  48. Lee CT, Barocas D, Globe DR, Oefelein MG, Colayco DC, Bruno A, et al. Economic and humanistic consequences of preventable bladder tumor recurrences in nonmuscle invasive bladder cancer cases. *J Urol.* 2012;188(6):2114-9.
  49. Sylvester RJ, Oosterlinck W van der MA. A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials. *J Urol.* 2004;171(6):2186-90.
  50. Tolley DA, Parmar MK, Grigor KM, Lallemand G, Benyon LL, Fellows J, Freedman LS, Grigor KM, Hall RR, Hargreave TB, Munson K, Newling DW, Richards B, Robinson MR, Rose MB, Smith PH, Williams JL WP. The effect of intravesical mitomycin C on recurrence of newly diagnosed superficial bladder cancer: a further report with 7 years of follow up. *J Urol.* 1996;155(4):1233-8.
  51. Svatek RS, Hollenbeck BK, Holmäng S, Lee R, Kim SP, Stenzl A, et al. The

- economics of bladder cancer: Costs and considerations of caring for this disease. *Eur Urol.* 2014;66(2):253-62.
52. Uchida A, Yonou H, Hayashi E, Iha K, Oda M, Miyazato M, Oshiro Y, Hokama S, Sugaya K OY. Intravesical instillation of bacille Calmette-Guérin for superficial bladder cancer: cost-effectiveness analysis. *Urology.* 2007;69(2):275-9.
  53. Vaidya A., Soloway M.S., Hawke C., Tiguert R. CF. De novo muscle invasive bladder cancer: is there a change in trend? *J Urol.* 2001;165:47-50.
  54. Babjuk M, Böhle A, Burger M, Compérat E, Kaasinen E, Palou J, et al. EAU Guidelines on Bladder Cancer. 2016;1-45.
  55. Mostofi FSL TH. Histological Typing of Urinary Bladder Tumors. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1973. In: International Classification of Tumors, 1st ed.
  56. Eble JSG, Epstein J SI. The World Health Organization Classification of Tumors of the Urinary System and Male Genital System. Lyon, France: IARC Press; 2004.
  57. MacLennan GT, Kirkali Z CL. Histologic grading of noninvasive papillary urothelial neoplasms. *Eur Urol.* 2007;4(51):889-97.
  58. Sylvester RJ, van der Meijden A, Witjes JA, Jakse G, Nonomura N, Cheng C, Torres A, Watson R KK. High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. *Urology.* 2005;66(6S1):90-107.
  59. Orsola A, Trias I, Raventós CX, Español I, Cecchini L, Búcar S, et al. Initial high-grade T1 urothelial cell carcinoma: Feasibility and prognostic significance of lamina propria invasion microstaging (T1a/b/c) in BCG-treated and BCG-non-treated patients. *Eur Urol.* 2005;48(2):231-8.

60. Van Rhijn BWG, Van Der Kwast TH, Alkhateeb SS, Fleshner NE, Van Leenders GJLH, Bostrom PJ, et al. A new and highly prognostic system to discern T1 bladder cancer substage. *Eur Urol.* 2012;61(2):378-84.
61. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffoux C, Denis L, Newling DW KK. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol.* 2006;49(3):466-5.
62. Cambier S, Sylvester RJ, Collette L, Gontero P, Brausi MA, Van Andel G, et al. EORTC Nomograms and Risk Groups for Predicting Recurrence, Progression, and Disease-specific and Overall Survival in Non-Muscle-invasive Stage Ta-T1 Urothelial Bladder Cancer Patients Treated with 1-3 Years of Maintenance Bacillus Calmette-Guerin. *Eur Urol.* 2016;69(1):60-9.
63. Woldu SL, Bagrodia A, Lotan Y. Guideline of guidelines: non-muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int.* 2017;119(3):371-380.
64. Sam S. Chang, Stephen A. Boorjian, Roger Chou, Peter E. Clark, Siamak Daneshmand, Badrinath R. Konety, Raj Pruthi, Diane Z. Quale, Chad R. Ritch, John D. Seigne, Eila Curlee Skinner, Norm D. Smith JMM. Diagnosis and treatment of non-muscle invasive bladder cancer: AUA/SUO guideline. 2016.
65. Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez-Piñeiro L, Gonzalez M, et al. Predicting Nonmuscle Invasive Bladder Cancer Recurrence and Progression in Patients Treated With Bacillus Calmette-Guerin: The CUETO Scoring Model. *J Urol.* 2009;182(5):2195-203.
66. Amling C.L. Diagnosis and management of superficial bladder cancer. *Curr*

- Probl Cancer. 2001;25(4):219-78.
67. Stamatiou K, Papadoliopoulos I, Dahanis S. The accuracy of ultrasonography in the diagnosis of superficial bladder tumors in patients presenting with hematuria. *Ann Saudi Med.* 2009;29(2):134-7.
  68. Palou J, Rodríguez-Rubio F, Huguet J, Segarra J, Ribal MJ, Alcaraz A, et al. Multivariate Analysis of Clinical Parameters of Synchronous Primary Superficial Bladder Cancer and Upper Urinary Tract Tumor. *J Urol.* 2005;174(3):859-61.
  69. Rink M, Babjuk M, Catto JWF, Jichlinski P, Shariat SF, Stenzl A, et al. Hexyl aminolevulinate-guided fluorescence cystoscopy in the diagnosis and follow-up of patients with non-muscle-invasive bladder cancer: A critical review of the current literature. *Eur Urol.* 2013;64(4):624-38.
  70. Jocham D, Stepp H, Waidelich R. Photodynamic Diagnosis in Urology: State-of-the-Art. *Eur Urol.* 2008;53(6):1138-50.
  71. Parker J, Spiess PE. Current and emerging bladder cancer urinary biomarkers. *The Scientific World Journal.* 2011;11:1103-12.
  72. Lotan Y RC. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology.* 2003;61:109-18.
  73. Raitanen MP, Aine R, Rintala E, Kallio J, Rajala P, Juusela H TTFG. Differences between local and review urinary cytology in diagnosis of bladder cancer. An interobserver multicenter analysis. *Eur Urol.* 2002;41(3):284-9.
  74. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, Murphy WM, Hautmann SH, Hemstreet GP 3rd, Bono AV, Getzenberg RH, Goebell P, Schmitz-Dräger BJ, Schalken JA, Fradet Y, Marberger M, Messing E DM. Bladder tumor markers

- beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology*. 2005;66(6S1):35-63.
75. Tilki D, Burger M, Dalbagni G, Grossman HB, Hakenberg OW, Palou J, et al. Urine markers for detection and surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*. 2011;60(3):484-92.
  76. Kojima T, Kawai K, Miyazaki J, Nishiyama H. Biomarkers for precision medicine in bladder cancer. *Int J Clin Oncol*. 2016;1-7.
  77. Beukers W, van der Keur KA, Kandimalla R, Vergouwe Y, Steyerberg EW, Boormans JL, et al. FGFR3, TERT and OTX1 as urinary biomarker combination for surveillance of bladder cancer patients in a large prospective multicenter study. *J Urol*. 2017 (in press).
  78. Mariappan P., Finney SM., Head E., Somani BK., Zachou A., Smith G., Mishriki SF., N'Dow J., Grigor KM. EUCG. Good quality white-light transurethral resection of bladder tumours (GQ-WLTURBT) with experienced surgeons performing complete resections and obtaining detrusor muscle reduces early recurrence in new non-muscle-invasive bladder cancer: validation. *BJU Int*. 2012;109(11):1666-73.
  79. Holmäng S., Hedelin H. AC. 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.
  80. Smits G., Schaafsma E. KL. Microstaging of pT1 transitional cell carcinoma of the bladder: identification of subgroups with distinct risks of progression. *Urology*. 1998;52:1009-13.
  81. Igawa M., Urakami S. SH. 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.
82. Lacombe, Dalbagni G, Zhang ZF, Cordon-Cardo C, Fair WR, Herr HW RV. 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.
83. Kramer MW, Altieri V, Hurle R, Lusuardi L, Merseburger AS, Rassweiler J, et al. Current Evidence of Transurethral En-bloc Resection of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer: Update 2016. *Eur Urol Focus.* 2017;2-11.
84. Naselli A, Puppo P. *En Bloc* Transurethral Resection of Bladder Tumors: A New Standard? *J Endourol* 2017;31(S1):S20-S24.
85. Mowatt G, N'Dow J, Vale L, Nabi G, Boachie C, Cook JA, Fraser C GTATAR (TAR) G. Photodynamic diagnosis of bladder cancer compared with white light cystoscopy: Systematic review and meta-analysis. *Int J Technol Assess Health Care.* 2011;27(1):3-10.
86. Zheng C, Lv Y, Zhong Q, Wang R JQ. Narrow band imaging diagnosis of bladder cancer: systematic review and meta-analysis. *BJU Int.* 2012;110(11 Pt B):E680-7.
87. Herr HW, Donat SM RV. Management of low grade papillary bladder tumors. *J Urol.* 2007;178:2201-5.
88. van der Meijden A, Oosterlinck W, Brausi M, Kurth K-H, Sylvester R, deBalincourt C M of the E-GGSBC. Significance of bladder biopsies in Ta,T1 bladder tumors: A report of the EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Cooperative Group. *Eur Urol.* 1999;35:267-71.
89. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou J, et al. Guía clínica sobre el cáncer de vejiga TaT1 ( sin invasión muscular ). 2010;1.

90. Babjuk M., Oosterlinck W., Sylvester R., Kaasinen E., Bohle A., Palou-Redorta J. RM. EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder, the 2011 Update. *Eur Urol.* 2011;59:997-1008.
91. Dalbagni G, Vora K, Kaag M, Cronin A, Bochner B, Donat SM, et al. Clinical outcome in a contemporary series of restaged patients with clinical T1 bladder cancer. *Int Braz J Urol.* 2010;36(6):773-4.
92. Chou R, Selph S, Buckley DI, Fu R, Griffin JC, Grusing S, et al. Intravesical Therapy for the Treatment of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Urol.* 2017;197(5):1189-1199.
93. Sylvester RJ, Brausi MA, Kirkels WJ, Hoeltl W, Calais F, Silva D, et al. Long-term efficacy results of EORTC genito-urinary group randomized phase 3 study 30911 comparing intravesical instillations of epirubicin, bacillus Calmette-Guérin, and bacillus Calmette-Guérin plus isoniazid in patients with intermediate- and high-risk stage Ta T1 urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol.* 2010;57(5):766-73.
94. Malmström PU, Sylvester RJ, Crawford DE, Friedrich M, Krege S, Rintala E, Solsona E, Di Stasi SM WJ. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guérin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 2009;56(2):247-56.
95. Lamm D.L, Van der Meijden P.M. MA et al. Incidence and treatment of complications of bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy in superficial bladder cancer. *J Urol.* 1992;147(31):596-600.
96. Kresowik T.P. GT. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for urotelial carcinoma of the bladder. *Immunotherapy.* 2009;1(2):281-8.



97. van der Meijden A.P., Sylvester R.J., Oosterlinck W., Hoeltl W. BAEGTCG. 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.
98. Herr HW, Schwalb DM, Zhang ZF, Sogani PC, Fair WR, Whitmore WF Jr OH. 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.
99. Coplen DE, Marcus MD, Myers JA, Ratliff TL CW. 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.
100. Catalona WJ, Hudson MA, Gillen DP, Andriole GL RT. Risks and benefits of repeated courses of intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy for superficial bladder cancer. *J Urol.* 1987;137:220-4.
101. Herr HW. Progression of stage T1 bladder tumors after intravesical bacillus Calmette-Guérin. *J Urol.* 1991;145:40-3.
102. Malmström PU, Wijkström H, Lundholm C, Wester K, Busch C NB. 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.
103. Shelley M.D., Kynaston H., Court J., Wilt T.J., Coles B., Burgon K. MMD. 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.
104. Han R.F. PJ. Can intravesical bacillus Calmette-Guérin reduce recurrence in patients with superficial bladder cancer? A metaanalysis of randomized trials. *Urology*. 2006;67:1216-23.
  105. Shelley M.D., Wilt T.J., Court J., Coles B., Kynaston H. MMD. 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.
  106. Böhle A. BPR. 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.
  107. Sylvester R.J., van der Meijden A.P. LDL. 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.
  108. Huncharek M. KB. 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.
  109. Huncharek M. KB. 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.
  110. Lima L, Dinis-Ribeiro M, Longatto-Filho A, Santos L. Predictive biomarkers of bacillus Calmette-Guerin immunotherapy response in bladder cancer: Where are we now? *Advances in Urology*. 2012;2012.

111. Lee E, Park I LC. Prognostic markers of intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy for multiple, high-grade, stage T1 bladder cancers. *Int J Urol.* 1997;4(6):552-6.
112. Lopez-Beltran A, Luque RJ, Alvarez-Kindelan J, Quintero A, Merlo F, Carrasco JC, Requena MJ MR. Prognostic factors in stage T1 grade 3 bladder cancer survival: the role of G1-S modulators (p53, p21Waf1, p27kip1, Cyclin D1, and Cyclin D3) and proliferation index (ki67-MIB1). *Eur Urol.* 2004;45(5):606-12.
113. Saint F, Le Frere Belda MA, Quintela R, Hoznek A, Patard JJ, Bellot J, Popov Z, Zafrani ES, Abbou CC, Chopin DK de MS. Pretreatment p53 nuclear overexpression as a prognostic marker in superficial bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guérin (BCG). *Eur Urol.* 2004;45(4):475-82.
114. Lacombe L, Dalbagni G, Zhang ZF, Cordon-Cardo C, Fair WR, Herr HW RV. 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(10):2646-52.
115. Park J, Song C, Shin E, Hong JH, Kim CS AH. Do molecular biomarkers have prognostic value in primary T1G3 bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy? *Urol Oncol.* 2013;31(6):849-56.
116. Palou J, Algaba F, Vera I, Rodriguez O, Villavicencio H S-CM. Protein expression patterns of ezrin are predictors of progression in T1G3 bladder tumours treated with nonmaintenance bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol.* 2009;56(5):829-36.
117. Esuvaranathan K, Chiong E, Thamboo TP, Chan YH, Kamaraj R, Mahendran R TM. Predictive value of p53 and pRb expression in superficial bladder

- cancer patients treated with BCG and interferon-alpha. *Cancer*. 2007;109(6):1097-105.
118. Zuiverloon TCM, Nieuweboer AJM, Vékony H, Kirkels WJ, Bangma CH, Zwarthoff EC. Markers predicting response to bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in high-risk bladder cancer patients: A systematic review. *Eur Urol*. 2012;61(1):128-45.
  119. Morales A., Eidinger D., Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guérin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol*. 1976;116:180-3.
  120. Oddens J, Brausi M, Sylvester R, Bono A, van de Beek C, van Andel G, Gontero P, Hoeltl W, Turkeri L, Marreaud S, Collette S OW. Final results of an EORTC-GU cancers group randomized study of maintenance bacillus Calmette-Guérin in intermediate- and high-risk Ta, T1 papillary carcinoma of the urinary bladder: one-third dose versus full dose and 1 year versus 3 years of main. *Eur Urol*. 2013;63(3):462-72.
  121. Lamm DL, Blumenstein BA, Crissman JD, Montie JE, Gottesman JE, Lowe BA, Sarosdy MF, Bohl RD, Grossman HB, Beck TM, Leimert JT CE. Maintenance bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent TA, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study. *J Urol*. 2000;163(4):1124-9.
  122. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Witjes JA KK. Bacillus calmette-guerin versus chemotherapy for the intravesical treatment of patients with carcinoma in situ of the bladder: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol*. 2005;174:86-91.
  124. Donin NM, Lenis AT, Holden S, Drakaki A, Pantuck A, Belldegrun A, et al. Immunotherapy for the Treatment of Urothelial Carcinoma. *J Urol*.

2017;197(1):14-22.

125. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214-8.
126. Becich M.J., Carroll S. RTL. Internalization of bacille Calmette-Guérin by bladder tumor cells. *J Urol*. 1991;145:1316-24.
127. Kuroda K., Brown E.J., Telle W.B., Russell D.G., Ratliff TL. Characterization of the internalization of bacillus Calmette-Guérin by human bladder tumor cells. *J Clin Invest*. 1993;91:69-76.
128. Sinn H.W., Elzey B.D., Jensen R.J., Zhao X., Zhao W. RTL. The fibronectin attachment protein of bacillus Calmette-Guérin (BCG) mediates antitumor activity. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57:573-9.
129. Takeuchi A., Dejima T., Yamada H., Shibata K., Nakamura R., Eto M., Nakatani T., Naito S. YY. 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;41:246-51.
130. Alexandroff A.B., Jackson A.M., O'Donnell M.A. JK. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet*. 1999;353:1689-94.
131. Simons M.P., O'Donnell M.A. GTS. Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. *Urol Oncol*. 2008;26:341-5.
132. Jackson A.M., Alexandroff A.B., McIntyre M., Esuvaranathan K., James K. CGD. Induction of ICAM 1 expression on bladder tumours by BCG immunotherapy. *J Clin Pathol*. 1994;47:309-12.
133. Alexandroff A.B., Robins R.A., Murray A. JK. Tumour immunology: false hopes-New horizons? *Immunol Today*. 1998;19:247-50.

134. Thalmann G.N., Dewald B., Baggiolini M. SUE. Interleukin-8 expression in the urine after bacillus Calmette-Guérin therapy: A potential prognostic factor of tumor recurrence and progression. *J Urol.* 1997;158:1340-4.
135. Thalmann G.N., Sermier A., Rentsch C., Mohrle K., Cecchini M.G., Studer UE. Urinary Interleukin-8 and 18 predict the response of superficial bladder cancer to intravesical therapy with bacillus Calmette-Guérin. *J Urol.* 2000;164:2129-33.
136. Nepple, K. G., Lightfoot, A. J., Rosevear, H. M., O'Donnell, M. A. & Lamm DL. Bacillus Calmette-Guerin with or without interferon alpha-2b and megadose versus recommended daily allowance vitamins during induction and maintenance intravesical treatment of nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol.* 2010;184:1915-9.
137. 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. REJ. Presence of activated lymphocytes in the urine of patients with superficial bladder cancer after intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guérin. *Cancer Immunol Immunother.* 1991;33:411-6.
138. Prescott S., James K., Hargreave T.B., Chisholm G.D., Smyth JF. Intravesical Evans strain BCG therapy: Quantitative immunohistochemical analysis of the immune response within the bladder wall. *J Urol.* 1992;147:1636-42.
139. Jackson A.M., Alexandroff A.B., Kelly R.W., Skibinska A., Esuvaranathan K., Prescott S., Chisholm G.D. JK. 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;99:369-75.

140. Liu W., O'Donnell M.A., Chen X., Han R. LY. 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;58:1647-55.
141. Wang M.H., Flad H.D., Bohle A., Chen Y.Q. UAJ. Cellular cytotoxicity of human natural killer cells and lymphokine-activated killer cells against bladder carcinoma cell lines. *Immunol Lett.* 1991;27:191-7.
142. Bohle A., Thanhauser A., Ulmer A.J., Ernst M., Flad H.D. JD. Dissecting the immunobiological effects of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in vitro: Evidence of a distinct BCG-activated killer (BAK) cell phenomenon. *J Urol.* 1993;150:1932-7.
143. Thanhauser A., Bohle A., Flad H.D., Ernst M., Mattern T. UAJ. 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;37:105-11.
144. Brandau S., Suttman H., Riemensberger J., Seitzer U., Arnold J., Durek C., Jocham D., Flad H.D. BA. Perforin-mediated lysis of tumor cells by Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin-activated killer cells. *Clin Cancer Res.* 2000;6:3729-38.
145. Kawashima T., Norose Y., Watanabe Y., Enomoto Y., Narazaki H., Watari E., Tanaka S., Takahashi H., Yano I., Brenner M.B. SM. Cutting edge: major CD8 T cell response to live bacillus Calmette-Guérin is mediated by CD1 molecules. *J Immunol.* 2003;170:5345-8.
146. Wang M.H., Chen Y.Q., Gercken J., Ernst M., Bohle A., Flad H.D. UAJ. 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;38:239-46.
147. Naoe M., Ogawa Y., Takeshita K., Morita J., Iwamoto S., Miyazaki A. YH. *Bacillus Calmette-Guérin*-pulsed dendritic cells stimulate natural killer T cells and gammadelta T cells. *Int J Urol.* 2007;14:532-8.
148. Emoto M., Emoto Y., Buchwalow I.B. KSH. Induction of IFN-gamma-producing CD4+ natural killer T cells by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guérin. *Eur J Immunol.* 1999;29:650-9.
149. Suttman H., Riemensberger J., Bentien G., Schmaltz D., Stockle M., Jocham D., Bohle A. BS. Neutrophil granulocytes are required for effective *Bacillus Calmette-Guérin* immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses. *Cancer Res.* 2006;66:8250-7.
150. Rosevear H.M., Lightfoot A.J., O'Donnell M.A. GTS. 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;28:345-53.
151. Klostergaard J., Leroux M.E. HMC. 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;147:2802-8.
152. Schwamberger G., Flesch I. FE. Tumoricidal effector molecules of murine macrophages. *Pathobiology.* 1991;59:248-53.
153. Ratliff T.L., Ritchey J.K., Yuan J.J., Andriole G.L. CWJ. T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer. *J Urol.* 1993;150:1018-23.



154. Wang R., Rogers A.M., Ratliff T.L. RJH. CD95-dependent bystander lysis caused by CD4+ T helper 1 effectors. *J Immunol.* 1996;157:2961-8.
155. 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;12:4641-4.
156. Luo Y. KMJ. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin-induced macrophage cytotoxicity against bladder cancer cells. *Clin Dev Immunol.* 2010;2010:357591.
157. Alexandroff A.B., Nicholson S., Patel P.M. JAM. Recent advances in bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in bladder cancer. *Immunotherapy.* 2010;2:551-60.
158. Beatty, J. D., Islam, S., North, M. E., Knight, S. C., Ogden CW. Urine dendritic cells: a noninvasive probe for immune activity in bladder cancer? *BJU int.* 2004;94:1377-83.
159. Higuchi T, Shimizu M, Owaki A, Takahashi M, Shinya E, Nishimura T TH. 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(8):1245-55.
160. Naoe M, Ogawa Y, Takeshita K, Morita J, Iwamoto S, Miyazaki A YH. Bacillus Calmette-Guérin-pulsed dendritic cells stimulate natural killer T cells and gammadeltaT cells. *Int J Urol.* 2007;14(6):532-8.
161. Kitamuro H. TT. Immunotherapy for Urothelial Carcinoma: Current Status and Perspectives. *Cancers.* 2011;3:3055-72.
162. Ratliff, T. L., Gillen, D. & Catalona WJ. Requirement of a thymus dependent

- immune response for BCG-mediated antitumor activity. *J Urol.* 1987;137:155-8.
163. De Boer EC, De Jong WH, Van Der Meijden AP, Steerenberg PA, Witjes JA, Vegt PD, Debruyne FM RE. 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(6):411-6.
164. Bohle, A., Gerdes, J., Ulmer AJ, Hofstetter, A. G., Flad HD. Effects of local bacillus Calmette-Guerin therapy in patients with bladder carcinoma on immunocompetent cells of the bladder wall. *J Urol.* 1990;144:53-8.
165. Mustafa T., Phyu S., Nilsen R., Bjune G. JR. Increased expression of Fas ligand on Mycobacterium tuberculosis infected macrophages: A potential novel mechanism of immune evasion by Mycobacterium tuberculosis? *Inflammation.* 1999;23:507-21.
166. DesJardin L.E., Kaufman T.M., Potts B., Kutzbach B., Yi H. SLS. 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;148:3161-71.
167. Diehl G.E., Yue H.H., Hsieh K., Kuang A.A., Ho M., Morici L.A., Lenz L.L., Cado D., Riley L.W. WA. TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity.* 2004;21:877-89.
168. Yamada H., Kuroda E., Matsumoto S., Matsumoto T., Yamada T. YU. Prostaglandin E2 down-regulates viable Bacille Calmette-Guérin-induced macrophage cytotoxicity against murine bladder cancer cell MBT-2 in vitro. *Clin Exp Immunol.* 2002;128:52-8.

169. Luo Y., Yamada H., Evanoff D.P. CX. Role of Th1-stimulating cytokines in bacillus Calmette-Guérin (BCG)-induced macrophage cytotoxicity against mouse bladder cancer MBT-2 cells. *Clin Exp Immunol.* 2006;46:181-8.
170. Luo, Y., Han, R., Evanoff, D. P. & Chen X. Interleukin-10 inhibits *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG)-induced macrophage cytotoxicity against bladder cancer cells. *Clin Exp Immunol.* 2010;160:359-68.
171. Ayari C., LaRue H., Hovington H., Decobert M., Harel F., Bergeron A., Tetu B., Lacombe, L. FY. Bladder tumor infiltrating mature dendritic cells and macrophages as predictors of response to bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *Eur Urol.* 2009;55:1386-95.
172. Poppas D.P., Pavlovich C.P., Folkman J., Voest E.E., Chen X., Luster A.D. OMA. Intravesical bacille Calmette-Guérin induces the antiangiogenic chemokine interferon-inducible protein 10. *Urology.* 1998;52:268-75.
173. Reale M., Intorno R., Tenaglia R., Feliciani C., Barbacane R.C., Santoni A. CP. Production of MCP-1 and RANTES in bladder cancer patients after bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2002;51:91-8.
174. 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. AML. 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;181:1571-80.
175. Luo Y., Chen X. OMA. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) induces human CC- and CXC-chemokines in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol.* 2007;147:370-8.

176. Heldwein K.A., Liang M.D., Andresen T.K., Thomas K.E., Marty A.M., Cuesta N., Vogel S.N. FMJ. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against *Mycobacterium bovis* BCG. *J Leukoc Biol.* 2003;74:277-86.
177. von Meyenn F., Schaefer M., Weighardt H., Bauer S., Kirschning C.J., Wagner H. ST. Toll-like receptor 9 contributes to recognition of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin by Flt3-ligand generated dendritic cells. *Immunobiology.* 2006;211:557-65.
178. Fricke I., Mitchell D., Mittelstadt J., Lehan N., Heine H., Goldmann T., Bohle A. BS. Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J Immunol.* 2006;176:5173-82.
179. Kemp T.J., Ludwig A.T., Earel J.K., Moore J.M., Vanoosten R.L., Moses B., Leidal K., Nauseef W.M. GTS. Neutrophil stimulation with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L. *Blood.* 2005;106:3474-82.
180. Ludwig A.T., Moore J.M., Luo Y., Chen X., Saltsgaver N.A., O'Donnell M.A. GTS. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: A novel mechanism for *Bacillus Calmette-Guérin*-induced antitumor activity. *Cancer Res.* 2004;64:3386-90.
181. Totterman T., Loskog A. EM. The immunotherapy of prostate and bladder cancer. *BJU int.* 2005;96:728-35.
182. Nadler R., Luo Y., Zhao W., Ritchey JK., Austin JC., Cohen MB., O'Donnell MA. RT. 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.
183. Brandau S, Riemensberger J, Jacobsen M, Kemp D, Zhao W, Zhao X,

- Jocham D, Ratliff TL BA. NK cells are essential for effective BCG immunotherapy. *Int J Cancer*. 2001;92:697–702.
184. Suttman H, Jacobsen M, Reiss K, Jocham D, Böhle A BS. Mechanisms of bacillus Calmette-Guerin mediated natural killer cell activation. *J Urol*. 2004;172(4):1490-5.
185. Khong H.T. RNP. Natural selection of tumor variants in the generation of «tumor escape» phenotypes. *Nat Immunol*. 2002;3:999-1005.
186. Seliger B., Cabrera T., Garrido F. FS. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin. Cancer Biol*. 2002;12:3-13.
187. Kitamura H., Torigoe T., Honma I., Asanuma H., Nakazawa E., Shimosawa K., Hirohashi Y., Sato E., Sato N. TT. Expression and antigenicity of survivin, an inhibitor of apoptosis family member, in bladder cancer: implications for specific immunotherapy. *Urology*. 2006;67:955-9.
188. Homma I., Kitamura H., Torigoe T., Tanaka T., Sato E., Hirohashi Y., Masumori N., Sato N. TT. Human leukocyte antigen class I down-regulation in muscle-invasive bladder cancer: its association with clinical characteristics and survival after cystectomy. *Cancer Sci*. 2009;100:2331-4.
189. Li M., Wang H., Xi Z., Xu E., Jiang X., Chen J. SW. 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;17:666-72.
190. Carretero R., Cabrera T., Gil H., Saenz-Lopez P., Maleno I., Aptsiauri N., Cozar J.M. GF. BCG immunotherapy of bladder cancer induces selection of HLA class I-deficient tumor cells. *Int J Cancer*. 2011;129:839-46.
191. Kitamura H., Torigoe T., Asanuma H., Honma I., Sato N. TT. Down-regulation

- of HLA class I antigens in prostate cancer tissues and up-regulation by histone deacetylase inhibition. *J Urol*. 2007;178:692-6.
192. Du C. WY. The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development. *J Exp Clin Canc Res*. 2011;30:12.
193. Winerdal M.E., Marits P., Winerdal M., Hasan M., Rosenblatt R., Tolf A., Selling K., Sherif A. WO. FOXP3 and survival in urinary bladder cancer. *BJU Int*. 2011;108:1672-8.
194. Eruslanov E., Neuberger M., Daurkin I., Perrin G.Q., Algood C., Dahm P., Rosser C., Vieweg J., Gilbert S.M. KS. Circulating and tumor-infiltrating myeloid cell subsets in patients with bladder cancer. *Int J Canc Res*. 2011;130:1109–1119.
195. van den Bosch S AWJ. Long-term cancer-specific survival in patients with high-risk, non–muscle-invasive bladder cancer and tumour progression: a systematic review. *Eur Urol*. 2011;60:493-500.
196. Cowan NC, Santis M De, Witjes JA, Lebrecht T, Compe EM, Espino EL, et al. Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. 2016;1-14.
197. Ellen A. M. Schenk-Braat Æ Chris H. Bangma. Immunotherapy for superficial bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54:414-23.
198. Gofrit ON, Pode D, Lazar A, Katz R SA. Watchful waiting policy in recurrent Ta G1 bladder tumors. *Eur Urol*. 2006;49(2):303-6.
199. Soloway MS, Bruck DS KS. Expectant management of small, recurrent, noninvasive papillary bladder tumors. *J Urol*. 2003;170(2 Pt 1):438-41.
200. Borhan A, Reeder JE, O'Connell MJ, Wright KO, Wheelless LL, di Sant'Agnese PA, McNally ML ME. Grade progression and regression in

- recurrent urothelial cancer. *J Urol.* 2003;169(6):2106-9.
201. Fujii Y, Kawakami S, Koga F, Nemoto T KK. Long-term outcome of bladder papillary urothelial neoplasms of low malignant potential. *BJU Int.* 2003;92(6):559-62.
  202. Holmäng S, Andius P, Hedelin H, Wester K, Busch C JS. Stage progression in Ta papillary urothelial tumors: relationship to grade, immunohistochemical expression of tumor markers, mitotic frequency and DNA ploidy. *J Urol.* 2001;165(4):1124-8.
  203. Pruthi RS, Baldwin N, Bhalani V WE. Conservative management of low risk superficial bladder tumors. *J Urol.* 2008;179(1):87-90.
  204. Palou J, Rodríguez-Rubio F, Millán F, Algaba F, Rodríguez-Faba O, Huguet J VH. Recurrence at three months and high-grade recurrence as prognostic factor of progression in multivariate analysis of T1G2 bladder tumors. *Urology.* 2009;73(6):1313-7.
  205. Solsona E, Iborra I, Dumont R, Rubio-Briones J, Casanova J AS. The 3-month clinical response to intravesical therapy as a predictive factor for progression in patients with high risk superficial bladder cancer. *J Urol.* 2000;164(3 Pt1):685-9.
  206. Holmang S JS. Stage Ta-T1 bladder cancer: the relationship between findings at first followup cystoscopy and subsequent recurrence and progression. *J Urol.* 2002;167(4):1634-7.
  207. Mariappan P SG. A surveillance schedule for G1Ta bladder cancer allowing efficient use of check cystoscopy and safe discharge at 5 years based on a 25-year prospective database. *J Urol.* 2005;173(4):1108-11.
  208. Soukup V, Babjuk M, Bellmunt J, Dalbagni G, Giannarini G, Hakenberg OW,

- Herr H, Lechevallier E RM. Follow-up after surgical treatment of bladder cancer: a critical analysis of the literature. *Eur Urol.* 2012;62(2):290-302.
209. Holmäng S S V. Should follow-up cystoscopy in bacillus Calmette-Guérin-treated patients continue after five tumour-free years? *Eur Urol.* 2012;61(3):503-7.
210. Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Huguet-Pérez J V-RJ. Upper urinary tract tumors after primary superficial bladder tumors: prognostic factors and risk groups. *J Urol.* 2000;164(4):1183-7.
211. van der Aa MN, Steyerberg EW, Bangma C, van Rhijn BW, Zwarthoff EC van der KT. Cystoscopy revisited as the gold standard for detecting bladder cancer recurrence: diagnostic review bias in the randomized, prospective CEFUB trial. *J Urol.* 2010;183(1):76-80.
212. Shirai T. Etiology of Bladder Cancer. *Semin Urol.* 1993;11:113-26.
213. Olumi AF, Tsai YC, Nichols PW, Skinner DG, Cain DR, Bender LI JP. Allelic loss of chromosome 17p distinguishes high grade from low grade transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* 1990;50:7081-3.
214. Grossman HB., Liebert M., Antelo M., Dinney CNP., Hu SX., Palmer JL. BW. p53 and RB Expression Predict Progression in T1 Bladder Cancer. *J Urol.* 1999;161:714-36.
215. DiTullio RA Jr, Mochan TA, Venere M, Bartkova J, Sehested M, Bartek J HT. 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nature Cell Biol.* 2002;4:998-1002.
216. Kastan M.B. BJ. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature.* 2004;432:316-20.
217. Hoeijmakers J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001;411:366-74.



218. Bartkova J, Horejsí Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, Guldberg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, Ørntoft T, Lukas J BJ. DNA damage response as a candidate anti cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*. 2005;434:864-70.
219. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Ditullio RA Jr, Kastriakis NG, Levy B, Kletsas D, Yoneta A, Herlyn M, Kittas C HT. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*. 2005;434:907-13.
220. Wu JD, Lin DW, Page ST, Lundgren AD, True LD PS. Oxidative DNA damage in the prostate may predispose men to a higher risk of prostate cancer. *Transl Oncol*. 2009;2:39-45.
221. Hughes A.L., Yeager M., Ten Eishof A.E. CMJ. A new taxonomy of mammalian MHC class I molecules. *Immunol Today*. 1999;20:22-6.
222. Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Yamagata T, Kikkawa E, et al. Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(23):13282–13287.
223. Bahram S., Bresnahan M., Geraghty D.E ST. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:6259-63.
224. Petersdorf E.W., Shuler K.B., Longton G.M., Spies T. HJA. Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics*. 1999;49:605-12.
225. Zhang Y., Lazaro A.M., Lavingia B. SP. Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Hum Immunol*. 2001;62:620-31.
226. Choy M.K. PME. MICA polymorphism: biology and importance in immunity

- and disease. *Trends Mol Med*. 2010;16:97-106.
227. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(22):12445-50.
228. Allegretti YL, Bondar C, Guzman L, Cueto Rua E, Chopita N, Fuertes M, et al. Broad MICA/B Expression in the Small Bowel Mucosa: A Link between Cellular Stress and Celiac Disease. *PLoS ONE*. 2013;8(9).
229. Ghadially H, Brown L, Lloyd C, Lewis L, Lewis A, Dillon J, et al. MHC class I chain-related protein A and B (MICA and MICB) are predominantly expressed intracellularly in tumour and normal tissue. *Br J Cancer*. 2017 (in press).
230. Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med*. 2007;357(13):1293-300.
231. Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, et al. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol*. 2003;170(3):1249-56.
232. Soulillou JP. On the utility of screening for anti-MICA antibodies before kidneytransplantation. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2008;4(4):190-1.
233. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol*. 2001;2(3):255-60.
234. Stephens HA. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol*. 2001;22:378-85.
235. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL ST. Activation of NK

- cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999;285:727-9.
236. Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad of Sci USA*. 2003;100(16):9452-7.
237. Glienke J, Sobanov Y, Brostjan C, Steffens C, Nguyen C, Lehrach H, Hofer E FF. The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics*. 1998;48:163-73.
238. Eagle R.A. TJ. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(737-744).
239. Lanier L.L. On guard-activating NK cell receptors. *Nat Immunol*. 2001;2:23-7.
240. Raulet D.H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:781-90.
241. Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, VandenBos T, Kubin M CD. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol*. 2002;168:671–679.
242. Cerwenka A, Baron JL LL. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell- mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:11521–11526.
243. Wiemann K, Mittrucker HW, Feger U, Welte SA, Yokoyama WM ST. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol*. 2005;175:720–729.
244. Cosman D, Müllberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16

- and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*. 2001;14(2):123-33.
245. Watson NFS, Spendlove I, Madjd Z, McGilvray R, Green AR, Ellis IO, et al. Expression of the stress-related MHC class I chain-related protein MICA is an indicator of good prognosis in colorectal cancer patients. *International Journal of Cancer*. 2006;118(6):1445-52.
246. Zhang Z, Su T, He L, Wang H, Ji G, Liu X, et al. Identification and Functional Analysis of Ligands for Natural Killer Cell Activating Receptors in Colon Carcinoma. *Tohoku J Exp Med*. 2012;226(1):59-68.
247. Kamimura H, Yamagiwa S, Tsuchiya A, Takamura M, Matsuda Y, Ohkoshi S, et al. Reduced NKG2D ligand expression in hepatocellular carcinoma correlates with early recurrence. *J Hepatol*. 2012;56(2):381-8.
248. Xuan XY, Zhang JF, Hu GM, Li QR, Liu PP, Du Y. Upregulated expression of NKG2D and its ligands give potential therapeutic targets for patients with thymoma. *Cancer gene therapy*. 2015;22(7):368-74.
249. Serrano AE, Menares-Castillo E, Garrido-Tapia M, Ribeiro CH, Hernández CJ, Mendoza-Naranjo A, et al. Interleukin 10 decreases MICA expression on melanoma cell surface. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(3):447-57.
250. Vetter CS, Groh V, Straten P, Spies T, Brocker EB BJ. Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma. *J Invest Dermatol*. 2002;118:600-5.
251. Kato N, Tanaka J, Sugita J, Toubai T, Miura Y, Ibata M, et al. Regulation of the expression of MHC class I-related chain A , B ( MICA , MICB ) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia*. 2007;21:103-8.

252. Chen J, Xu H, Zhu XX. Abnormal expression levels of sMICA and NKG2D are correlated with poor prognosis in pancreatic cancer. *Ther Clin Risk Manag.* 2015;12:11-8.
253. Tsukagoshi M, Wada S, Yokobori T, Altan B, Ishii N, Watanabe A, et al. Overexpression of natural killer group 2 member D ligands predicts favorable prognosis in cholangiocarcinoma. *Cancer Science.* 2016;107(2):116-22.
254. Madjd Z, Spendlove I, Moss R, Bevin S, Pinder SE, Watson NF, et al. Upregulation of MICA on high-grade invasive operable breast carcinoma. *Cancer Immun.* 2007;7:17.
255. Smith DS, Humphrey PA and CW. The early detection of prostate carcinoma with prostate specific antigen: the Washington University experience. *Cancer.* 1997;80:1852-6.
256. Roehl KA, Antenor JA and CW. Serial biopsy results in prostate cancer screening study. *J Urol.* 2002;167:2435-9.
257. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ CCJ. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level  $\leq 4.0$  ng per milliliter. *N Engl J Med.* 2004;27(350):2239-46.
258. De Marzo AM, Meeker AK, Zha S, Luo J, Nakayama M, Platz EA, Isaacs WB and NW. Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology.* 2003;62:55-62.
259. Wu JD, Lin DW, Page ST, Lundgren AD, True LD, Plymate SR. Oxidative DNA damage in the prostate may predispose men to a higher risk of prostate cancer. *Transl Oncol.* 2009;2(1):39-45.
260. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ RD. The DNA damage pathway regulates

- innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*. 2005;436(7054):1186-90.
261. Wu JD, Higgins LM, Steinle A, Cosman D, Haugk K, Plymate SR. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain – related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *J Clin Invest*. 2004;114(4).
262. Xiang ZhangLei YanWei JiaoJuchao RenNaidong XingYongzhen ZhangYuanwei ZangJue WangZhonghua Xu. The clinical and biological significance of MICA in clear cell renal cell carcinoma patients. *Tumor Biology*. 2016;37(2):2153-9.
263. Chen Y, Lin G, Guo Z, Zhou Z, He Z, Ye Y. Effects of MICA Expression on the Prognosis of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer and the Efficacy of CIK Therapy. *PLoS ONE*. 2013;8(7):1-8.
264. Sandor, V., Bakke, S., Robey, R.W., Kang, M.H., Blagosklonny, M.V., Bender, J., Brooks, R., Piekarz, R.L., Tucker, E., Figg, W.D., Chan, K.K., Goldspiel, B., Fojo, A.T., Balcerzak, S.P. & Bates SE. Phase I trial of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228, NSC 630176), in patients with refractory neoplasms. *Clinical Cancer Research*. 2002;8:718–728.
265. Takai, N., Desmond, J.C., Kumagai, T., Gui, D., Said, J.W., Whittaker, S., Miyakawa, I. & Koeffler HP. Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells. *Clinical Cancer Research*,. 2004;10:1141–1149.
266. Sachs MD, Ramamurthy M, Poel H Van Der, Wickham TJ, Lamfers M, Gerritsen W, et al. Histone deacetylase inhibitors upregulate expression of the coxsackie adenovirus receptor (CAR) preferentially in bladder cancer cells. *Cancer gene therapy*. 2004;11(7):477-86.

267. Matsumoto K, Shariat SF, Ayala GE, Rauen KA LS. Loss of coxsackie and adenovirus receptor expression is associated with features of aggressive bladder cancer. *Urology*. 2005;66(2):441-6.
268. Sachs MD, Rauen KA, Ramamurthy M, Dodson JL, De Marzo AM, Putzi MJ, Schoenberg MP RR. Integrin alpha(v) and coxsackie adenovirus receptor expression in clinical bladder cancer. *Urology*. 2002;60:531–536.
269. Chen CL, Sung J, Cohen M, Chowdhury WH, Sachs MD, Li Y, Lakshmanan Y, Yung BY, Lupold SE RR. Valproic acid inhibits invasiveness in bladder cancer but not in prostate cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;319(2):533-42.
270. Toru S, Shuji T, Bishnu A, Michio N, Shingo Y, Okamura H, et al. The antitumour effect of???? T-cells is enhanced by valproic acid-induced up-regulation of NKG2D ligands. *Anticancer Research*. 2010;30(11):4509-13.
271. Zlotta AR, van Vooren JP, Huygen K, Drowart A, Decock M, Pirson M, Jurion F, Palfliet K, Denis O, Simon J SC. What is the optimal regimen for BCG intravesical therapy? Are six weekly instillations necessary? *Eur Uol*. 2000;37(4):470-7.
272. Soloway MS. Overview of treatment of superficial bladder cancer. *Urology*. 1985;26(4 Suppl):18-26.
273. Garcia-Cuesta EM, Lopez-Cobo S, Alvarez-Maestro M, Estes G, Romera-Cardenas G, Rey M, et al. NKG2D is a key receptor for recognition of bladder cancer cells by IL-2-activated NK cells and BCG promotes NK cell activation. *Frontiers in Immunology*. 2015;6(5):1-12.
274. Cathro HP, Smolkin ME, Theodorescu D, Jo VY, Ferrone S, Frierson HF. Relationship between HLA class i antigen processing machinery component

- expression and the clinicopathologic characteristics of bladder carcinomas. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2010;59(3):465-72.
275. Tsuboi S, Sutoh M, Hatakeyama S, Hiraoka N, Habuchi T, Horikawa Y, et al. A novel strategy for evasion of NK cell immunity by tumours expressing core2 O-glycans. *EMBO J*. 2011;30(15):3173-85.
276. Higuchi T, Shimizu M, Owaki A, Takahashi M, Shinya E, Nishimura T, et al. A possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma: Involvement of innate effector cells for the inhibition of tumor growth. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2009;58(8):1245-55.
277. Spear P, Wu MR, Sentman ML, Sentman CL. NKG2D ligands as therapeutic targets. *Cancer immunity*. 2013;13(May):8.
278. Agüera-González S, Gross CC, Fernández-Messina L, Ashiru O, Estes G, Hang HC, et al. Palmitoylation of MICA, a ligand for NKG2D, mediates its recruitment to membrane microdomains and promotes its shedding. *Eur J Immunol* 2011;41(12):3667-76.
279. Schilling D, Tetzlaff F, Konrad S, Li W, Multhoff G. A hypoxia-induced decrease of either MICA/B or Hsp70 on the membrane of tumor cells mediates immune escape from NK cells. *Cell Stress and Chaperones*. 2015;20(1):139-47.
280. David H. Raulet. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3:781-90.
281. Raulet DH, Guerra N. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):568-80.
282. Lanier LL. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunology Research*. 2015;3:575-82.



283. Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:291-330.
284. Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity*. 2002;17(1):19-29.
285. Alessandro Moretta, Cristina Bottino, Massimo Vitale, Daniela Pende, Claudia Cantoni, Maria Cristina Mingari, Roberto Biassoni LM. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annual Review of Immunology*. 2001;19:197-223.
286. Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR. Soluble MICA in malignant diseases. *International Journal of Cancer*. 2006;118(3):684-7.
287. Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *The Journal of Immunology*. 2008;180(11):7249-58.
288. Lee, J.-C., K.-M. Lee, D.-W. Kim and DSH. Elevated TGF- $\beta$ 1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J Immunol*. 2004;172:7335–7340.
289. Wortham BW, Eppert BL, Flury JL, Morgado Garcia S, Borchers MT. TLR and NKG2D Signaling Pathways Mediate CS-Induced Pulmonary Pathologies. *PLoS ONE*. 2013;8(10):1-9.
290. Borchers MT, Wesselkamper SC, Curull V, Ramirez-Sarmiento A, Sánchez-Font A, Garcia-Aymerich J, et al. Sustained CTL activation by murine pulmonary epithelial cells promotes the development of COPD-like disease. *J Clin Invest*. 2009;119(3):636-49.

291. Lundbäck B, Lindberg A, Lindström M, Rönmark E, Jonsson AC, Jönsson E et al. Not 15 but 50 % of smokers develop COPD? —Report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. *Respir Med.* 2003;97:115-22.
292. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature.* 2002;419(6908):734-8.
293. Messing EM. Urothelial tumors of the bladder. En: Saunders, editor. *Campbell-Walsh Urology. Ninth Edit.* Elsevier; 2008. p. 2407-46.
294. Shariat SF, Milowsky M, Droller MJ. Bladder cancer in the elderly. *Urol Oncol.* 2009;27(6):653-67.
295. Santos L, Amaro T, Costa C, Pereira S, Bento MJ, Lopes P, Oliveira J, Criado B LC. Ki-67 index enhances the prognostic accuracy of the urothelial superficial bladder carcinoma risk group classification. *Int J Cancer.* 2003;105(2):267-72.
296. Benitez AC, Dai Z, Mann HH, Reeves RS, Margineantu DH, Gooley TA, et al. Expression, signaling proficiency, and stimulatory function of the NKG2D lymphocyte receptor in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(10):4081-6.
297. de Kruijf EM, Sajet A, van Nes JGH, Putter H, Smit VTHBM, Eagle RA, et al. NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. *BMC cancer.* 2012;12(1):24.
298. McGilvray RW, Eagle RA, Rolland P, Jafferji I, Trowsdale J DL. ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients. *Int J Cancer.* 2010;127(6):1412-20.
299. Liu G, Lu S, Wang X, Page ST, Higano CS, Plymate SR, Greenberg NM, Sun

- S, Li Z WJ. Perturbation of NK cell peripheral homeostasis accelerates prostate carcinoma metastasis. *J Clin Invest*. 2013;123(10):4410-22.
300. Wu J. NKG2D Ligands in Cancer Immunotherapy: Target or Not? *Austin J Clin Immunol*. 2014;1(1):1-4.
301. Wen B, Lampe JN, Roberts AG, Atkins WM, Rodrigues AD, Nelson SD. NIH Public Access. October. 2007;454(1):42-54.
302. Hanahan D WR. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-74.
303. Peyromaure M, Guerin F, Amsellem-Ouazana D, Saighi D, Debre B ZM. Intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy for stage T1 grade 3 transitional cell carcinoma of the bladder: recurrence, progression and survival in a study of 57 patients. *J Urol*. 2003;169(6):2110-2.
304. Ribatti D, Ennas MG, Vacca A, Ferrel F, Nico B, Orru S SP. Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma. *Eur J Clin Invest*. 2003;33(5):420-5.
305. Nonomura N, Takayama H, Nishimura K, Oka D, Nakai Y, Shiba M, et al. Decreased number of mast cells infiltrating into needle biopsy specimens leads to a better prognosis of prostate cancer. *Br J Cancer*. 2007;97:952-6.
306. Maurer M, Theoharides T, Granstein RD, Bischoff SC, Bienenstock J, Henz B, Kovanen P, Piliponsky AM, Kambe N, Vliagoftis H, Levi-Schaffer F, Metz M, Miyachi Y, Befus D, Forsythe P, Kitamura Y GS. What is the physiological function of mast cells? *Exp Dermatol*. 2003;12(6):886-910.
307. Iacone D, Henderson C, Lee J. Spinal muscular atrophy: from tissue specificity to therapeutic strategies. *F1000Prime Rep*. 2015;7(4):9-23.
308. Serel TA, Soyupek S CO. Association between mast cells and bladder

- carcinoma. *Urol Int.* 2004;72(4):299-302.
309. Fujii Y., Yoshida M., Chien L.-J., Kihara K., Kageyama Y., Yasukochi Y. OH. Significance of Carbohydrate Antigen Sialyl-Lewis X, Sialyl-Lewis A, and Possible Unknown Ligands to Adhesion of Human Urothelial Cancer Cells to Activated Endothelium. *Urol int.* 2000;64:129-33.
310. Jang TJ, Park JB, Lee JI. The expression of CD10 and CD15 is progressively increased during colorectal cancer development. *Korean Journal of Pathology.* 2013;47(4):340-7.
311. Ribatti D. Mast cells and macrophages exert beneficial and detrimental effects on tumor progression and angiogenesis. *Immunol Lett.* 2013;152(2):83-8.
312. Hanada T, Nakagawa M, Emoto A, Nomura T, Nasu N NY. Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer. *Int J Urol.* 2000;7(7):263-9.
313. Talmadge JE, Donkor M, Scholar E. Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2007;26(3-4):373-400.
314. David G. DeNardo, Donal J. Brennan, Elton Rexhepaj, Brian Ruffell, Stephen L. Shiao, Stephen F. Madden, William M. Gallagher, Nikhil Wadhvani, Scott D. Keil, Sharfaa A. Junaid, Hope S. Rugo, E. Shelley Hwang, Karin Jirström BLW and LMC. Leukocyte Complexity Predicts Breast Cancer Survival and Functionally Regulates Response to Chemotherapy. *Cancer discovery.* 2011;1(1):54-67.
315. Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, Aizawa M, Suzuki Y, Shintaku I, Nagura H OH. Proliferative activity of intratumoral CD8+ T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinico-pathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res.* 2001;61:5132-6.

316. Bromwich EJ, McArdle PA, Canna K, McMillan DC, McNicol A-M, Brown M, et al. The relationship between T-lymphocyte infiltration, stage, tumour grade and survival in patients undergoing curative surgery for renal cell cancer. *Br J Cancer*. 2003;89(10):1906-8.
317. Zhang Q, Hao C, Cheng G, Wang L, Wang X, Li C, et al. High CD4(+) T cell density is associated with poor prognosis in patients with non-muscle-invasive bladder cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11510-6.
318. Pichler R, Fritz J, Zavadil C, Schäfer G, Culig Z, Brunner A. Tumor-infiltrating immune cell subpopulations influence the oncologic outcome after intravesical Bacillus Calmette-Guérin therapy in bladder cancer. 2016;7(26):39916-30.