

ORIGINAL

La falta d'expressió de MICA en pacients amb càncer de bufeta significa un pitjor pronòstic

Lack of MICA Expression Predicts a Worse Prognosis in Patients with Bladder Cancer

Mauricio Orozco-Levi^{1, 2, 3, 4, 5}, **Alba Ramírez-Sarmiento**^{1, 2, 3, 5}, **Michael Borchers**⁶,
Cristiane Murta-Nascimento^{7, 8}, **Francesc Macià**^{7, 8},
Beatriz Casado¹, **Maeba Polo**¹, **Andrea Caballero Benitez**¹,
Fredy Díaz-Quijano⁹, **Antoni Gelabert i Mas**¹⁰

1.- Grup de Recerca en Lesió, Resposta Immune i Funció Pulmonar (LIF), Institut Municipal d'Investigació Mèdica del Hospital del Mar (IMIM), 2.- Centro de Investigación Biomédica en Xarxa de Malalties Respiratòries (CIBERES), Institut de Salut Carles III, Ministeri de Ciència i Tecnologia, Espanya; 3.- Departament de Pneumologia, Hospital del Mar-Parc de Salut Mar, Barcelona, Espanya, 4.- Departament de Ciències Experimentals i el de Salut de la Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Espanya, 5.- Departament de Pneumologia, Fundación Cardiovascular de Colòmbia, Santa Marta, Colòmbia, 6.- Departament de Salut Ambiental, Universitat de Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, EUA, 7.- Epidemiology i Serveis de Salut Departament d'Avaluació, Hospital del Mar-Parc de Salut Mar, Barcelona, Espanya; 8.- Consorcio de Investigación Biomédica en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Espanya; 9.- Organización Americana para la Promoción de la Investigación en Salud (OL-FIS), Bucaramanga, Colòmbia, 10.- Departament d'Urologia, Grup de Recerca en Tumors Sòlids de la Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Espanya

Correspondencia

Antoni Gelabert-Mas
Servei i Càtedra d'Urologia - Hospital del Mar, IMAS.
08003 · Barcelona.
Tel: + 034 93 248 32 31
e-mail: Agelabert@hospitaldelmar.cat

Recibido: 12 – II – 2013

Aceptado: 4 – III – 2013

doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.28.02.11

Resum

Antecedents: el càncer de bufeta urinària i de pulmó es troben entre els deu tipus de càncer més comuns en ambdós sexes. El receptor NKG2D i un dels seus lligants, MICA, s'associen amb el tabaquisme i la susceptibilitat de patir malaltia pulmonar obstructiva crònica i càncer de pulmó.

Objectiu: esbrinar si el sistema NKG2D-MICA s'associa amb altres càncers epitelials relacionats amb l'hàbit de fumar com el càncer de bufeta.

Disseny, Escenari i Participants: 70 casos primaris de càncer de bufeta no múscul invasiu van ser examinats per detectar l'expressió de MICA i CD8 +, CD4 + i la infiltració de cèl·lules NK. La majoria dels pacients (n = 55, 78,6%) eren fumadors actuals o anteriors.

Metodologia: la tecnologia de microarrays (TMA) va ser triada per avaluar MICA i l'infiltració tumoral de limfòcits en les mostres de càncer de bufeta. Es varen utilitzar Curves de Kaplan-Meier i l'anàlisi univariant de Cox per avaluar la recaiguda, mortalitat total per càncer i la mortalitat específica per càncer de bufeta.

Resultats i limitacions: MICA es va expressar en la majoria dels espècimens de càncer examinats (és a dir, 70%). La recaiguda del càncer de bufeta no es va associar amb l'estat d'expressió de MICA (log rank p = 0,1123). No obstant això, ha existit una associació significativa entre l'expressió de MICA i l'alta mortalitat per càncer de bufeta (HR = 0,25; IC95% = 0,06-0,97). Limfòcits CD4 + i CD8 + es van trobar a la majoria (64%) de les mostres de tumors infiltrants. Les cèl·lules que expressen el receptor NKG2D es van trobar només en el 3% de les mostres. No hi havia cap funció lineal entre les cèl·lules NKG2D +, el nombre o proporció de cèl·lules CD4 + i CD8 + TIL.

Conclusions: MICA s'expressa només en una proporció significativa de carcinomes de bufeta. L'expressió de MICA s'associa amb avantatges significatius en la supervivència davant el càncer de bufeta. El sistema NKG2D-MICA podria representar un mecanisme comú involucrat en la història immunopatològica i natural de les neoplàsies vesicals.

Paraules clau: Càncer de bufeta; lligants NKG2D, MICA, supervivència i pronòstic.

Fons de suport: Aquest treball va ser recolzat per beques dels CIBER de Malalties Respiratòries (CIBERES), Institut de Salut Carlos III (ISCIII), Ministeri de Ciència i Tecnologia, Espanya, FEDER ISCIII-(PI08-1612) i el Fons d'Investigació Sanitària (FIS), Ministeri de Ciència i Tecnologia, Espanya (PI: 02/0468).

Abstract

Background: Bladder and lung cancer are among the ten most common cancers in both genders. The NKG2D receptor and one of its ligands, MICA, are associated with smoking and susceptibility to both chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer.

Objective: We hypothesized that NKG2D-MICA system was associated with other smoking-related epithelial cancers such as bladder cancer.

Design, Setting, and Participants: 70 cases of primary non-muscle invasive bladder cancer were screened for the MICA expression and CD8+, CD4+ and NK cell infiltration. Most patients (n = 55, 78.6%) were current or former smokers.

Measurements: Tissue microarray (TMA) technology was chosen to evaluate MICA and tumor infiltrating lymphocytes in samples with confirmed bladder cancer. Kaplan-Meier curves and univariate Cox analysis was used to assess relapse, all-cancer mortality and specific bladder cancer mortality.

Results and Limitations: MICA was expressed in most cancer specimens examined (i.e., 70%). Relapse of bladder cancer was not associated with the status of MICA expression (log rank $p = 0.1123$). Nevertheless, a significant association existed between high MICA expression and bladder cancer mortality (HR = 0.25; CI95% = 0.06 - 0.97). Tumor infiltrating CD4+ and CD8+ lymphocytes were found in the majority (64%) of samples. Cells expressing the NKG2D receptor were found in only 3% of the samples. There was no linear function between NKG2D+ cells and number or ratio of CD4+ and CD8+ TIL.

Conclusions: MICA is expressed in a significant proportion of bladder carcinomas. MICA expression associates with significant survival advantages in the face of both all-cancer and bladder cancer. The NKG2D-MICA system could represent a common mechanism involved in the immunopathology and natural history of bladder neoplasms.

Keywords: Bladder Cancer; NKG2D Ligands; MICA; Survival; Prognosis

Introducció

El càncer vesical i el càncer de pulmó es troben entre els deu principals tipus de càncer més comuns en ambdós sexes a tot el món¹. L'incidència de càncer de bufeta urinària es distribueix irregularment a Europa, sent més comú en les regions del sud, i menys comú en les regions del nord^{2,3}. Als EUA, 215.000 nous casos de càncer de pulmó i 69.000 nous casos de càncer de bufeta es diagnostiquen cada any^{4,5}. A Europa, gairebé 134.000 nous casos de càncer de bufeta son diagnosticats anualment. A Espanya, 23.000 nous casos de càncer de pulmó i 13.000 casos de càncer de bufeta es diagnostiquen cada any. Existeix una forta associació amb el consum de tabac per ambdós tumors⁶.

El comportament clínic dels tumors de bufeta de baix risc en pacients que son controlats per un llarg període de temps, en alguns casos s'assisteix al desenvolupament d'un segon tumor primari⁷. Els estudis epidemiològics han mostrat que després de vuit anys de seguiment del càncer de bufeta, els pacients mostren un augment del risc d'una segona neoplàsia no urinària^{1,8,9}. També s'ha informat d'un augment del risc relatiu de càncer de pulmó entre els pacients amb càncer de bufeta^{10,11}. Espanya és el país europeu líder en termes de la incidència de càncer de pulmó i de mortalitat conseqüència d'aquesta dada. Els dos tumors comparteixen el comú factor etiològic del tabac¹. Les cèl·lules immunes per tal de controlar la inflamació i promoure la reparació, elimina les cèl·lules sotmeses a lesions o estrès. S'han descrit diverses vies que permeten detectar i eliminar aquestes cèl·lules¹². Un mecanisme ben descrit que proporciona un vincle entre l'estrès cel·lular epitelial causat el tabaquisme i l'activació immune de les cèl·lules NK, involucra l'activació del receptor del grup 2D (NKG2D, també coneguda com KLRK1)¹³. Re-

centment s'ha demostrat que el fumar cigarrets induïx l'expressió de lligant de NKG2D en les cèl·lules epitelials pulmonars¹⁴, implicant l'activació del receptor NKG2D com un mecanisme d'enllaç entre l'estrès cel·lular epitelial induït pel tabaquisme crònic i activació dels limfòcits en els teixits pulmonars.

El paper del complex receptor-ligand NKG2D en el desencadenament de les respostes immunes en els fumadors també pot influènciar vies extrapulmonars provocant l'activació del sistema immune que condueix a formes d'autoimmunitat o d'un altre tipus d'immunopatologia^{13,15}. El lligant NKG2D no s'expressa en teixits adults sans, però són induïts per la infecció, la transformació i dany d'ADN^{13,15}. S'han identificat en éssers humans múltiples famílies de lligants NKG2D estructuralment diferents. S'han identificat dues famílies de lligants de NKG2D: la MHC de classe I relacionades molècules MICA i MICB i les proteïnes d'unió UL-16. El receptor NKG2D s'expressa en teixit circulant i els limfòcits i les cèl·lules estressades es reconeixen directament a través de lligants expressats en la superfície cel·lular. Receptors de NKG2D s'expressen gairebé exclusivament en limfòcits citotòxics (és a dir, cèl·lules T CD8+, cèl·lules NK, cèl·lules NK T, i $\gamma\delta$ + cèl·lules T) i pot induir directament la citòlisi cel·lular, millorar funcions immunes innates i modular la resposta immune adaptativa.

La nostra hipòtesi es que la regulació aberrant negativa dels lligants NKG2D, NKG2D receptor, o tots dos, pot conduir a l'evasió de les cèl·lules estressades de bufeta i es transforma per contra en immunovigilància en els fumadors de cigarrets. Examinem el càncer de bufeta com una forma de tumor epitelial associada amb el tabaquisme crònic, ja que permet la determinació del deteriorament de l'immunovigilància local i en d'altres òrgans

extrapulmonars relacionats amb fumar cigarrets. Per tant, es va intentar avaluar en aquest estudi, en primer lloc, si l'expressió de les molècules MICA de la bufeta és relacionada amb la presència de càncer de bufeta en fumadors de cigarrets; segon, si limfòcits NKG2D + de tumors infiltrants (NKG2D + TIL) estan presents en aquests tumors; i tercer, si aquestes característiques immunopatològiques es reflecteixen als resultats clínics a llarg termini, com la recaiguda del càncer de bufeta i la supervivència específica de la malaltia.

Mètodes

Ètica i disseny de l'estudi. Aquest estudi va ser dissenyat segons les directrius per a la investigació en éssers humans ¹⁶ i aprovat pel Comitè d'Investigació Humana de l'Hospital del Mar (IMIM). Els propòsits i característiques de l'estudi s'expliquen completament al pacient, sense revelar cap hipòtesi a priori, i de cada participant es va obtenir el consentiment escrit informat.

Definició dels casos. Per cada pacient que s'ha inscrit com un cas, un de diagnòstic de càncer de bufeta no múscul invasiu s'hi va incorporar. Per dur a terme aquest estudi es va utilitzar com a font d'informació la base de dades proporcionada pel Registre de Càncer de l'Hospital del Mar.

Les mostres de teixit. Es va construir un Tissue Microarray (TMA) de 127 casos consecutius de càncer vesical primari no múscul invasiu amb un mínim de 5 anys de seguiment, i format per 127 cilindres de 0,6 mm de diàmetre, i va ser analitzat. El TMA incloïa cinc cilindres d'altres teixits per al control intern, que serveix per guiar la lectura. La construcció de la micromatriu de teixit de la bufeta s'ha descrit anteriorment ¹⁷. No hi ha cap cas corresponent a pacients que havien rebut radioteràpia o quimioteràpia sistèmica. Diferents patòlegs experts van avaluar els cilindres tumorals. Totes les mostres van ser de carcinoma urotelial no múscul infiltrant. La distribució per grau i estadi, foren classificats segons (UICC/99) com es descriu a la **Taula 1**. Les laminetes per fer l'estudi tenien entre 125 i 72 cilindres, considerant la pèrdua habitual de mostres durant el processament.

Fonts d'anticossos. Anti-MIC 1 anticòs monoclonal (clon AMO1, Biotecnologies anticòs monoclonal MICA-Immatics, Tübingen, Alemanya), anti-CD4 anticòs monoclonal (clon 4B12, Ref M7310, Dako, Dinamarca.), Anti CD8 anticòs monoclonal (clon C8/144B, Ref M7103., Dako, Dinamarca), anti NKG2D anticòs monoclonal (clon 1D11, ref. 14-5878, Bioscience, San Diego, CA, EUA).

Immunodetecció de l'expressió de NKG2D. Varen ser incloses mostres d'amígdala humans com a controls positius de CD8, CD4, i cèl·lules NKG2D + utilitzant qualsevol de les tècniques de tinció d'immunofluorescència

o immunohistoquímica recent. Van ser incloses microfotografies de contrast de fase i dels controls negatius. L'expressió de NKG2D es va confirmar utilitzant tant microscopia fluorescent com de llum visible (**Figura 1**).

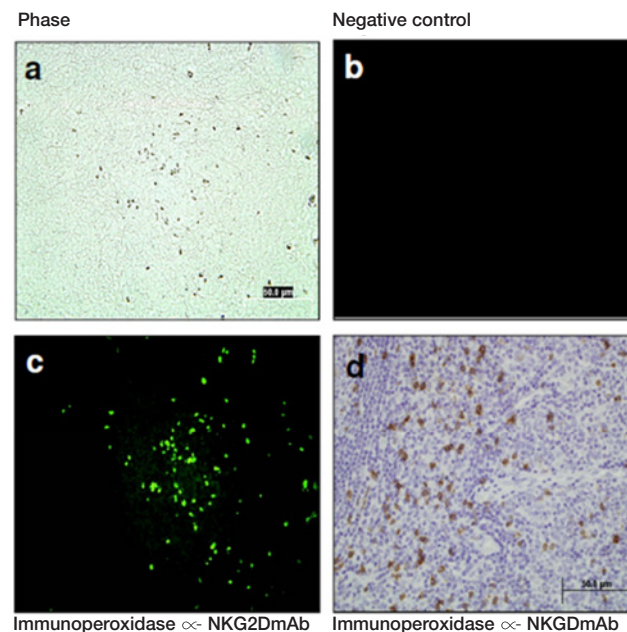


Figura 1. Els controls positius de cèl·lules NKG2D + utilitzant tècniques de tinció ja sigui immunohistoquímica o immunofluorescent. Microfotografies representatives de mostres d'amígdala humana. Es van incloure els controls de fase (a) i negatius (b). L'expressió de NKG2D es va confirmar usant tant fluorescent (c) com microscopia de llum visible (d).

Immunodetecció de l'expressió de MICA i quantificació de immunoreactivitat MICA. Es va utilitzar tinció indirecte amb immunoperoxidassa per quantificar l'expressió de MICA en biòpsies de teixit de bufeta. La **Figura 2** mostra una tinció representativa MICA en mostres de bufeta neoplàsiques. Les imatges que es mostren per a) isotipo amb control de seccions tenyides, b) seccions tenyides de MICA i c) seccions tenyides amb MICA modificades per ordinador com es descriu a continuació. Es van fixar de manera immediata mostres de teixit de bufeta en formalina al 10% i tamponada neutra a 4 ° C durant 24 hores i després es van processar per a la secció de parafina. Seccions de teixits de sis micres de gruix van ser tenyides per IHC utilitzant un mètode indirecte d'immunoperoxidassa (The Binding Site, UK). Totes les biòpsies van ser processades utilitzant un processador automàtic de teixits. Les seccions es rehidrataven i es van bloquejar per a la peroxidassa endògena utilitzant 0,3% d'hidrogen peròxid. L'especificitat de la immunoreactivitat es va avaluar mitjançant una apropiada concordància, no rellevant per l'anticòs de control (IgG1, BD, Pharmingen), que es va incloure com un control negatiu. El control del anticòs monoclonal estima la unió no específica d'anticossos diària primaris a antigens de superfície cel·lular perquè van mostrar una menyspreable reactivitat

creuada amb antigens de la superfície cel·lular en seccions de teixit. Controls d'isotipo es van usar a idèntiques concentracions i condicions de tinció com l'anticòs primari. A més, els frotis de cèl·lules HeLa (les cèl·lules HeLa són positives per MICA) es van incloure amb els controls com tinció positiva. Es van avaluar les imatges microscòpiques utilitzant un microscopi i una càmera d'imatge digital. Les micrografies de biòpsies de bufeta es van obtenir en un augment final de 40 x.

Anàlisi d'imatges assistides per ordinador. Les mesures de perfil es van realitzar amb ajuda d'ordinador d'anàlisi d'imatge (Computer-Assisted-Image-Analysis (CAIA) i software (Image J1.37, Wayne Rasband, els Instituts Nacionals de Salut, EUA. <http://rsb.info.nih.gov/ij>). La **Figura 3** mostra els diferents passos involucrats en la quantificació de MICA en biòpsies de neoplàsia vesical per CAIA. CAIA es considera un mètode eficaç de quantificació quan es comparen les característiques de tinció entre els grups experimentals. CAIA permet l'extracció de dades en 2D, com a fracció d'àrea (àrea tacada total) i distribució. CAIA es basa en la capacitat de separar netament o per segments una estructura d'interès del conjunt mitjançant una diferència física, tal com color, per facilitar la segmentació de color vermell/marró de cèl·lules epitelials tenyides en blau a nivell nuclear de les seccions del conjunt del teixit. El mètode converteix la RGB (ver-

mell-Red, verd-Green, i blau-Blue) en compostos HSI (matis-Hue, saturació-Saturation, intensitat-Intensity). La configuració del llinard de color per la discriminació òptima entre la tinció marró i blau en aquest sistema es van fixar abans de l'anàlisi i es deixà sense canvis durant tot l'experiment. A més, un investigador que desconeixia la patologia clínica va revisar les imatges de cada mostra individualment per confirmar tant la seva presència a la diapositiva, i la presència de teixit tumoral dins la mostra. La immunorreactivitat es va quantificar utilitzant el to (color de longitud d'ona) i saturació (quantitat de color) de la reacció en les cèl·lules epitelials. Es va utilitzar els valors mínims per segmentar l'àrea epitelial en les imatges sobre la base de nivells de gris. La selecció es basa automàticament en el llinard de l'histograma. El llinard estava habilitat, les àrees epitelials positives es mostren en vermell i fons blanc (**Figura 3**). Amb aquest mètode, les descripcions positives de color eren prou ampli per incloure totes les característiques de interès i prou estrictes per excloure el fons. A causa dels diversos tons de color entre diferents biòpsies, l'anàlisi de la immunorreactivitat de MICA es va restringir només a una escala binomial segons àrea epitelial normal tacada a la superfície global de cada matriu de biòpsia. La raó és que la immunorreactivitat de MICA era positiva quan la mostra de la biòpsia va mostrar un patró de reacció de color vermell / marró més gran que el llinard de fons. El fonament per immunorreactivitat negativa

Tabla 1. Característiques Demogràfiques i clíniques de l'estudi dels pacients segons l'expressió de MICA en el tumors vesical.

MICA status	MICA (-)	MICA (+)	p-value
Patients, n (%)	21 (30)	49 (70)	
Gender, n (%)			
Male, n (%)	18 (31.0)	40 (69.0)	>0.05
Female, n (%)	3 (25.0)	9 (75.0)	
Age, years			
Mean (SD)	71.0 (11.5)	71.2 (9.9)	>0.05
Current smoking			
	>0.05		
No, n (%)	15 (33.3)	30 (66.7)	
Yes, n (%)	6 (24.0)	19 (76.0)	
Smoking index			
Pack-year, mean (SD)	56 ± 34	48 ± 29	>0.05
Cigarettes per day in the last year			
Mean (SD)	15 ± 14	12 ± 12	>0.05
0, n (%)	9 (12.9)	25 (35.7)	>0.05
1 - 20, n (%)	4 (5.7)	15 (21.4)	
>20, n (%)	8 (11.4)	9 (12.9)	
Total, n (%)	21 (30.0)	49 (70.0)	
Time since quitting smoking			
Never smoker, n (%)	8 (11.4)	19 (27.1)	>0.05
Quitted >1 year, n (%)	9 (12.9)	19 (27.1)	
Quitted <1 year, n (%)	4 (5.7)	11 (15.7)	
Total, n (%)	21 (30.0)	49 (70.0)	
Histological grade			
1, n (%)	1 (25.0)	3 (75.0)	>0.05
2, n (%)	12 (31.6)	26 (68.4)	
3, n (%)	8 (30.8)	18 (69.2)	
Total, n (%)	21 (30.0)	49 (70.0)	
Secondary bladder cancer			
No, n (%)	17 (29.8)	40 (70.2)	>0.05
Yes, n (%)	4 (30.8)	9 (69.2)	
Total, n (%)	21 (30.0)	49 (70.0)	
Secondary lung cancer			
No, n (%)	19 (28.8)	47 (71.2)	>0.05
Yes, n (%)	2 (50.0)	2 (50.0)	
Total, n (%)	21 (30.0)	49 (70.0)	

és que la immunorreactivitat va ser equivalent o per sota del fons (és a dir, estructures com ara interstici marcat amb una intensitat similar). Van ser utilitzats com a controls d'uroteli normal, seccions de 6 subjectes no fumadors.

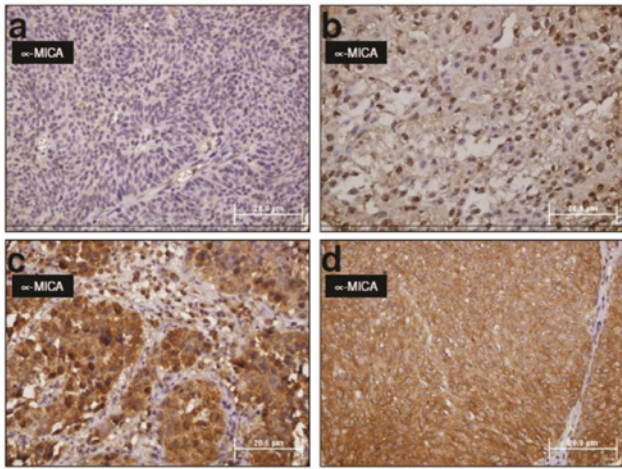


Figura 2. Molècules MICA s'expressen en el càncer de bufeta. Tinció immunohistoquímica de molècules MICA (AM01 mAb) en mostres parafinades. Microfotografies representatives (microscopi de llum) de les mostres on s'observen graus variables d'expressió de MICA. Idèntiques condicions de tinció simultània es van utilitzar per a tots els casos. L'expressió de MICA estava absent o sota dels límits de detecció (a) en algunes mostres de tumor, mentre que la majoria de les mostres van mostrar una clara evidència de l'expressió de MICA amb tinció positiva apeçada (b), irregular (c) o difusa (d).

L'anàlisi estadística de les dades de l'estudi es van realitzar amb el paquet estadístic SPSS (versió 15 per a Windows, SPSS, Chicago, IL). En primer lloc, chi-quadrat o la prova exacta de Fisher es va utilitzar per avaluar la relació entre l'expressió de MICA i característiques del pacient i la malaltia. Els punts finals d'interès van ser: recaiguda, definit com el temps de diagnòstic a la reaparició del tumor, i supervivència càncer específica on els pacients que van morir com a conseqüència del seu càncer de bufeta o un altre, i es van explicar com fracassos. Els pacients que no presentaven cap esdeveniment fins al final de l'estudi, els que es van perdre durant el seguiment i els que van morir per altres causes van ser censurats ja sigui en la visita mèdica passada o en la mort. Les corbes de supervivència es van estimar mitjançant corbes de Kaplan-Meier i les diferències entre les categories de cada variable es va avaluar mitjançant la prova de log-rank i regressió de Cox univariant. La significació es va establir en $p \leq 0,05$.

Resultats

En el nostre estudi, 70 casos de càncer primari vesical no múscul-invasiu i seccions de uroteli normal de 6 pacients no fumadors (controls), van ser examinats per detectar l'expressió de MICA, CD8 +, CD4 + i cel·lules infiltrants NKG2D + utilitzant la tecnologia TMA. Les principals característiques demogràfiques i clíniques dels pacients de l'estudi es mostren a la **Taula 1**. Tots els pacients eren

adults, amb una major proporció de mascles. La majoria dels pacients ($n = 55$, 78,6%) eren fumadors actuals o exfumadors, mentre que 29 (22,8%) pacients mai van ser fumadors. Cap dels pacients van ser exposats a materials cancerígens coneguts a la feina o a casa.

Durant el seguiment, 13 (18,6%) pacients van tenir un segon tumor primari, i 4 (5,7%) van ser diagnosticats amb càncer de pulmó primari. En els propers 5 anys després del diagnòstic de càncer de pulmó, tots els pacients amb diagnòstic de càncer de pulmó en estadi tardà va morir. Només un pacient amb càncer de pulmó en estadi primerenc viu després de la quimioteràpia, i mostrà remissió parcial del tumor. MICA es va expressar en la majoria dels espècimens de càncer examinats (és a dir, 70%, **Taula 1**). La mitjana d'intensitat de la tinció de MICA s'utilitza per separar els dos grups corresponents a l'expressió d'alt i baix. No hi va haver tinció visible dels compartiments nuclears o l'estroma.

Limfòcits infiltrants de tumors (TIL) es van trobar en 64% de les mostres. Les cel·lules que expressen receptor NKG2D es van trobar només en 3% de les mostres i amb una densitat molt baixa ($0,2 \pm 1,1$ cel·lules NKG2D per unitat d'àrea $1000 \mu m^2$). No existia una funció lineal entre cel·lules NKG2D + i el nombre o la proporció de CD4 + i CD8 + TIL. La densitat de NKG2D + TIL no va mostrar associació estadística amb la categoria d'expressió de MICA per les cel·lules tumorals (**Figura 4**).

L'expressió de MICA en el càncer de bufeta i l'hàbit de fumar. L'expressió de MICA no es va correlacionar amb el tabaquisme. Per avaluar si aquesta manca d'associació en els tumors pot ser interpretada com una finestra de relació inversa en el temps transcorregut sense fumar i l'expressió de MICA +, es van incloure en l'anàlisi.

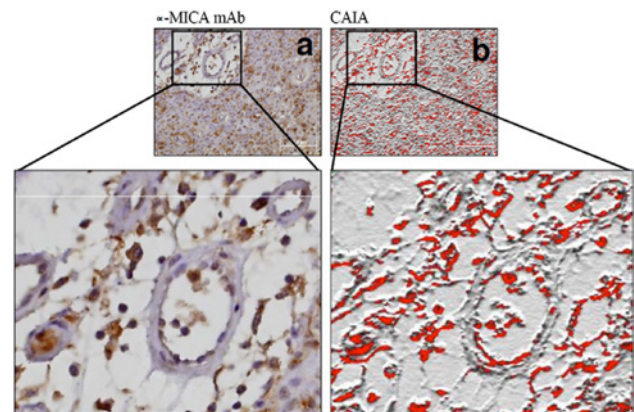


Figura 3. L'expressió MICA es pot trobar tant en cel·lules tumorals com capil·lars. La immunoperoxidasa i la imatge CAIA revelada una clara evidència que no només les cel·lules canceroses de la bufeta, sinó també els tumor capil·lars mostren l'expressió de MICA. No obstant això, les implicacions potencials en termes de immunovigilància sistèmica segueixen sense estar clares.

Taula 2 . Regressió Univariant de Cox per expressió de MICA en el tumors dels pacients amb tumors vesicals no-muscle invasius. Events i Hazard Ratio (HR) presentat per cada cas segons l'expressió de MICA. Associació entre expressió de MICA i and resultats clínics.

Expressió de MICA en el tumor	MICA- (n = 21)	MICA+ (n = 49)	HR (95% CI)	p value
Mortalitat Total	11 (52.4%)	20 (40.8)	0.47 (0.21 - 1.05)	0.07
Mortalitat de tots els cancers	7 (33.3%)	9 (18.4%)	0.22 (0.07 - 0.76)	0.02
Mortalitat cancer vesical	5 (23.8%)	5 (10.2%)	0.16 (0.03 - 0.8)	0.03
Recidiva	13/20 (65%)	23/48 (47.9%)	0.62 (0.31 - 1.23)	0.17

El temps transcorregut (en anys), entre que els pacients deixen de fumar i el moment de la cirurgia no van mostrar associació significativa amb l'expressió de MICA + en els tumors (**Taula 1**). A més, hem volgut avaluar una potencial relació dosi-efecte entre el grau de consum de cigarrets (com un índex d'exposició al fum de tabac) i l'expressió de MICA +. Els pacients no fumadors es van incloure com a referent. Amb independència de la cohort, no es van trobar diferències en la taxa de tabaquisme acumulat (paquets-any) i expressió + de MICA (**Taula 1**).

de supervivència del grup amb expressió baix de MICA va ser de 49 mesos, en comparació amb 66 mesos per al grup amb alts nivells d'expressió. En l'anàlisi de regressió de Cox, els pacients amb nivells elevats d'expressió de MICA presenten una disminució del risc de mort per de càncer de bufeta en comparació amb aquells amb nivells baixos (HR = 0,25; IC95% = 0,06-0,97, p = 0,045) (**Taula 2, Figura 5**).

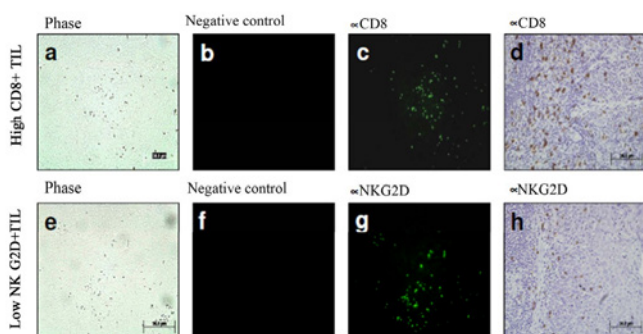


Figura 4. En mostres de càncer de bufeta, una regulació a la baixa de l'aparent expressió NKG2D existeix com es mostra en aquest cas per les diferències en limfòcits infiltrants de tumor (TIL) CD8 + vs + NKG2D).

L'expressió de MICA en el càncer de bufeta i associació amb el pronòstic. Quan es consideren en l'anàlisi univariada contra els factors clínic-patològics, l'expressió de MICA + no es va associar amb la ubicació o el nombre de tumors ni el grau de diferenciació cel·lular. El seguiment a llarg termini va mostrar recaiguda del càncer en 55 (43,3%) dels casos (**Taula 2**). Els nivells d'expressió de MICA no va mostrar efecte en recaiguda (log-rank, p = 0,1123). No es va observar una associació entre l'expressió de MICA en bufeta i el desenvolupament de càncer de pulmó. La taxa de supervivència a 5 anys va ser del 87% (**Taula 2, Figura 5**). Durant el període de seguiment, 14 (20%) dels pacients van morir per càncer i 10 d'ells van ser pel càncer de bufeta. Els pacients amb alta expressió de MICA va mostrar avantatges significatives en la supervivència quan es van analitzar per separat per l'efecte tant en la mortalitat per tots els càncers (14,3% vs 33,3%; log rank p = 0,02) com la mortalitat específica per càncer (10,2% vs 23,8%; log rank p = 0,03), en comparació amb el grup MICA (-) (**Taula 2, Figura 5**). La mitjana

Discussió

Aquest estudi és una visió de l'expressió de MICA i lligant NKG2D + en limfòcits infiltrants de tumor de una cohort de pacients amb càncer de bufeta primari. Emprant la tecnologia Tissue-microarray, investiguem l'associació de l'expressió de MICA i les característiques clínic-patològiques i el seu efecte sobre el pronòstic de càncer de bufeta. L'anàlisi dels especimens mostren que l'expressió de MICA és freqüent en el càncer de bufeta. No obstant això, un grup dels tumors presenten nivells baixos o indetectables d'expressió de MICA. Aquests tumors MICA-negatius no mostren associació amb l'hàbit de fumar o la diferenciació cel·lular. Els limfòcits tumor infiltrants NKG2D + estaven presents en una proporció petita d'aquests tumors. Els tumors MICA negatius s'associen amb un major risc de mort per càncer de bufeta o de mort per tots els càncers. L'expressió de MICA i NKG2D en les cèl·lules NK i limfòcits CD8 + pot ser un bon indicador en pacients immunodeprimits pel que fa al creixement tumoral en el cos.

El nostre estudi demostra que l'expressió de les molècules MICA és molt freqüent en el càncer de bufeta. Els limfòcits infiltrants de tumor NKG2D+ estaven presents en una petita proporció d'aquests tumors. La identificació d'antígens associats amb la destrucció del tumor és un objectiu principal de la immunologia del càncer. Diverses tècniques genètiques i bioquímiques han posat de manifest una àmplia gamma de productes dels gens que provoquen el reconeixement immune en pacients amb càncer, però la importància biològica d'aquestes respostes en la majoria dels casos és difícil d'entendre. Mentre que alguns vinculen les regressions tumorals en el context de l'adopció de teràpies cel·lulars o vacunes contra el càncer, les possibles funcions de la immunitat a la majoria dels antígens en la patogènesi de la malaltia i els resultats clínics encara no s'han dilucidat. Una de les estratègies per a la caracterització d'antígens amb potencial clínic significatiu

de reconeixement immune implica l'estudi dels pacients que aconseguen diferents (durador davant no durador) beneficis clínics de les actuals estratègies de tractament basades en les guies terapèutiques. A través d'aquest enfocament, hem demostrat que MICA-NKG2D s'expressen de forma aberrant en la majoria dels tumors de bufeta.

La tecnologia TMA permet avaluar l'expressió de proteïnes en un gran nombre de mostres de forma simultània, en un sol bloc, disminuint les diferències interobservador i de processament¹⁸. Múltiples estudis han demostrat que els resultats obtinguts en les TMA són altament representatius dels teixits dels donants, malgrat el petit tamany de les mostres individuals¹⁹. Això permet que la identificació de les grans tendències en els patrons d'expressió i la correlació entre l'expressió, les característiques clíniques patològiques i el pronòstic del pacient¹⁹. Estudis anteriors han avaluat l'expressió intracel·lular de p16 i p21 de productes gènics per càncer de bufeta no múscul invasiu per avaluar el seu possible paper com a factors pronòstic, però va mostrar no tenir valor predictiu independent estadísticament significatiu²⁰. Els nostres resultats són consistents amb les dades de Cathro et al.²¹ que descriu l'expressió d'MICA amb un TMA de 167 cistectomies per carcinoma vesical primari. 128 van ser carcinoma urotelials. En aquest estudi, MICA estava menys tenyida que en el carcinoma urotelial que l'uroteli en condicions normals. Amb una mitjana de 3,6 anys de seguiment, la pitjor supervivència significativament es va associar amb una puntuació més alta delta en el carcinoma urotelial i una puntuació inferior calreticulina en tots els tipus de tumors. Delta i expressió de proteïna calreticulina es va associar amb la supervivència en carcinoma urotelial i en tots els tipus de carcinoma de bufeta, respectivament. Aquests resultats són consistents amb els nostres resultats i suggereixen que els defectes de MICA tenen un paper en el curs clínic del carcinoma de bufeta.

Evidències disponibles impliquen l'activació del receptor NKG2D com enllaç mecànic entre l'estrès cel·lular epitelial i activació dels limfòcits en els teixits epitelials. Expressió lligant NKG2D és generalment absent en els teixits sans,

però pot ser induïda en la infecció, i per estímuls d'estrès de cèl·lules²². El lligand NKG2D es també àmpliament expressat en tumors primaris sòlids i leucèmia²³. En els pacients amb càncer MICA+ o MICB+, tumors infiltrants i cèl·lules sistèmiques NK i CD8+ T expressen sovint poc NKG2D i estan compromeses funcionalment²⁴. Aquest estat s'ha atribuït a que actuen en MICA i MICB solubles de tumors sòlids i leucèmies associades a una metaloproteïna²⁵. Aquest mecanisme podria explicar la selecció de les cèl·lules tumorals que sustenten que l'expressió de MICA i / o MICB i, en lloc de suggerir l'activació immune crònica, "prediu" que sostenia expressió NKG2D lligant en viu seria promoure la supressió immune crònica²⁶.

Recentment hem demostrat que el tabaquisme produeix l'expressió aberrant del lligand NKG2D en cèl·lules epitelials pulmonars¹⁴. Ús d'epiteli pulmó murí primari aïllat de ratolins crònicament exposats a fum de cigarreta i cultius de cèl·lules epitelials exposades a fum de la cigarreta obtinguts in vitro, hem demostrat que induïx l'expressió del lligand NKG2D del RAET 1 (transcripció primerenca del àcid retinoic), així com citotoxicitat mediada NKG2D. A més, un model genètic induïble d'expressió RAET1 en les cèl·lules epitelials pulmonars de ratolins va produir una severa malaltia pulmonar (fenotip enfisematos) caracteritzat per apoptosi epitelial i l'augment d'activació de CTL, que va poder ser revertit pel bloqueig de l'activació NKG2D. També es va avaluar si l'expressió del lligand NKG2D es corresponia amb malaltia pulmonar en pacients humans mitjançant la tinció de les vies respiratòries i en els teixits perifèrics de pulmó dels no fumadors, els fumadors amb funció pulmonar normal i fumadors actuals i anteriors amb MPOC. L'expressió del lligand NKG2D era independent de l'expressió del receptor NKG2D en pacients amb MPOC, demostrant que l'expressió lligant és el factor limitant en l'activació de CTL. D'altra banda, l'expressió de MICA a les vies respiratòries es va associar estadísticament amb la presència de càncer de pulmó¹⁴. Aquests resultats demostren que l'expressió aberrant, persistent del lligand NKG2D en l'epiteli pulmonar contribueix al desenvolupament de patologies amb MPOC, i està potencialment associat amb aparició de càncer per una alteració adquirida de l'immunovigilància.

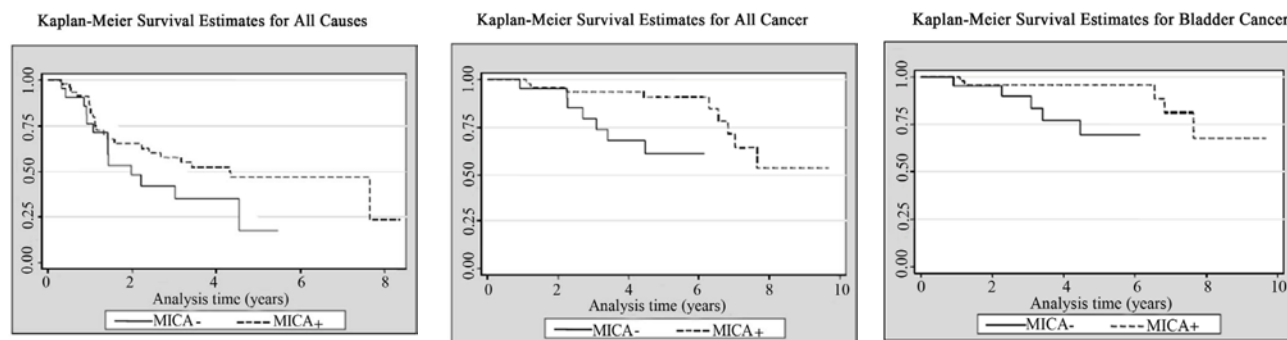


Figura 5. Curves Kaplan-Meier per (a) totes les causes, (b) Tots els tipus de càncer; i (c) en càncer de bufeta d'acord amb l'expressió MICA en els pacients amb tumors de bufeta no múscul invasius.

En aquest estudi, l'anàlisi estadística de l'expressió de MICA destaca la relació amb els resultats clínics que suggereixen un vincle immunològic entre el tabaquisme, sistema NKG2D-MICA i la susceptibilitat per presentar càncer de bufeta i de pulmó. No obstant això, és d'interès observar que l'expressió MICA no es va correlacionar amb el tabaquisme. És possible que els pacients no fumadors que tenen una història subestimada de tabaquisme passiu podria explicar per què no es va trobar associació. No obstant això, hem de destacar l'absència d'associació entre l'expressió tumoral de MICA i el moment de deixar de fumar o la dosi acumulada de fumar (és a dir, total paquets-any). Per tant, l'expressió de MICA en el tumor no és necessàriament causat per l'estrès químic actiu del tabaquisme actual o només la conseqüència de fumar en excés. Nosaltres interpretem que l'expressió persistent de MICA és conseqüència d'alguns mecanismes genètics i / o epigenètics que es perpetuen després de deixar de fumar i fins i tot en els que no hagin estat exposat al fum de cigarret.

En conjunt, aquestes evidències suggereixen que els vincles patològics entre MICA i receptor NKG2D en tumors vesicals comparteixen alguna cosa més que informació anecdòtica o descriptiva. La supervivència global dels pacients amb i sense càncer de bufeta múscul infiltrant sol ser llarg, sense importar el grau histològic del tumor¹. Per contra, els pacients amb càncer de pulmó mostren una supervivència pobre, a part dels tumors en etapa primerenca, que poden ser quirúrgicament extirpats. La instil·lació intravesical de BCG segueix sent el tractament immunoterapèutic d'elecció en la majoria dels càncers de bufeta no múscul infiltrants d'alt grau i carcinoma in situ (CIS) a Europa i els EUA²⁷⁻²⁹. La immunoteràpia amb BCG provoca una resposta local, que es determina per la secreció de citocines identificades en l'orina i en biòpsies de la paret de la bufeta amb infiltració per cèl·lules mononuclears i granulomatoses³⁰⁻³². Es produeix una resposta immune local urotelial i un efecte antitumoral potencial^{33,34}. La magnitud de la resposta específica pot augmentar amb el nombre de instil·lacions, el que justifica els protocols de dosi de manteniment durant anys en pacients amb factors de risc, però l'efecte terapèutic de la vacuna BCG no és dependent de la dosi³⁵. Els mecanismes intrínsecs dels efectes antitumorals de BCG encara no estan clars³⁶. Un possible mecanisme de teràpia intravesical de BCG per carcinomes de bufeta en humans és la participació de cèl·lules efectores innates per la inhibició del creixement del tumor³⁴. Diversos informes demostren la participació de NKG2D en les respostes antitumorals, la vigilància immune i la supressió de tumors induïts experimentalment³⁷. Aquest mecanisme ha estat proposat i estudiat en altres tumors sòlids, i la comprensió de la progressió de metàstasi^{38,39}. Aquestes troballes suggereixen la implicació de les cèl·lules innates d'alerta activades per les cèl·lules dendrítiques vives infectades amb BCG per inhibir el creixement de carcinoma de

bufeta i proporcionar un possible mecanisme de teràpia intravesical de BCG. Un estudi recent va avaluar el risc de desenvolupar càncer de pulmó en pacients amb càncer de bufeta⁴⁰. Curiosament, entre els pacients amb TCC de bufeta no múscul infiltrant, la mortalitat per càncer de pulmó representa un risc significatiu. Alguns autors suggereixen que en els pacients amb càncer de bufeta ha de ser considerada la detecció del càncer de pulmó mitjançant protocols⁴⁰.

En aquest estudi, proporcionem suport a la hipòtesi que el lligant NKG2D s'expressa en la majoria (> 70%) en les mostres de càncer de bufeta. Aquesta expressió associada amb una aparent disminució de la regulació de NKG2D en TIL, i probablement afectada per citotoxicitat mediada per cèl·lules intoxicades (per exemple, fum de cigarrets) exposades a cèl·lules urotelials. Com una forma de tumor epitelial clarament associat amb el tabaquisme crònic, aquest estudi suggereix que els òrgans extrapulmonars estan relacionats amb la immunitat innata i els cigarrets son perjudicials. Els limfòcits de tumors infiltrants són presents al teixit tumoral revelant una baixa regulació del receptor NKG2D. Aquestes característiques immunopatològiques s'associen a llarg termini amb els resultats clínics en pacients amb càncer de bufeta que suggereix que el sistema NKG2D-MICA podria representar un mecanisme comú immunopatològic involucrat en la història natural de les neoplàsies pulmó i bufeta.

Aquest estudi té limitacions. Malgrat el nombre limitat de participants, aquest estudi va tenir el poder suficient per documentar una associació estadísticament significativa entre l'expressió de MICA i mortalitat per càncer, especialment el causat pel càncer de bufeta. Aquesta troballa suggereix que l'efecte protector és tal que es pot demostrar fins i tot en una petita sèrie de casos. No obstant això, considerem que cal desenvolupar més estudis per avaluar la consistència d'aquesta associació en altres poblacions. A més, una mida de mostra més gran es necessitaria per avaluar la relació entre l'expressió de MICA i altres resultats (per exemple, la recaiguda del càncer de bufeta) i el seu impacte sobre la mortalitat total. Finalment, la informació sobre l'hàbit de fumar es va obtenir de les històries clíniques i no podem excloure la possibilitat de biaix de classificació.

Conclusió

L'expressió del potent lligant NKG2D i de MICA i una aparent regulació a la baixa del receptor NKG2D en limfòcits de tumors infiltrants són evidents en mostres de càncer de bufeta. L'expressió de MICA va mostrar avantatges significatius de supervivència en el càncer de bufeta. Es possible pensar en un potencial terapèutic en el càncer urotelial mitjançant la manipulació biològica de les vies relacionades amb la MICA-NKG2D.

Conflicte d'Interessos

M.O-L no té relació financera amb cap entitat comercial que tingui un interès en el tema d'aquest manuscrit. ARS no té relació financera amb cap entitat comercial que tingui un interès en el tema d'aquest manuscrit. CM-N no té relació financera amb cap entitat comercial que tingui un interès en el tema d'aquest manuscrit. FM no té relació financera amb cap entitat comercial que tingui un interès en el tema d'aquest manuscrit. BC no té relació financera amb cap entitat comercial que tingui un interès en el tema

d'aquest manuscrit. MP no té relació financera amb cap entitat comercial que tingui interès en el tema d'aquest manuscrit. AG no té relació financera amb cap entitat comercial que tingui un interès en el sub-jecte d'aquest manuscrit. MB no té interès financer en cap entitat comercial que tingui un interès en el tema d'aquest manuscrit, AC-B no té interès financer en cap entitat comercial que tingui un interès en el tema d'aquest manuscrit, FD-Q fa no tenen interès financer en cap entitat comercial que tingui un interès en el tema d'aquest manuscrit.

Bibliografia

1. J. Ferlay, H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers and D. M. Parkin, "GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Inter- net]," International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2010. <http://globocan.iarc.fr>
2. T. Skov, P. Sprogel, G. Engholm and C. Frolund, "Cancer of the Lung and Urinary Bladder in Denmark, 1943-87: A Cohort Analysis," *Cancer Causes Control*, Vol. 2, No. 6, 1991, pp. 365-369. doi:10.1007/BF00054296
3. R. J. Black, F. Bray, J. Ferlay and D. M. Parkin, "Cancer Incidence and Mortality in the European Union: Cancer Registry Data and Estimates of National Incidence for 1990," *European Journal of Cancer*, Vol. 33, No. 7, 1997, pp. 1075-107. doi:10.1016/S0959-8049(96)00492-3
4. A. F. Kantor and J. K. McLaughlin, "Second Cancer Following Cancer of the Urinary System in Connecticut, 1935-82," *National Cancer Institute Monograph*, Vol. 68, 1985, pp. 149-159.
5. R. Doll and R. Peto, "The Causes of Cancer: Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States Today," *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 66, No. 6, 1981, pp. 1191-1308.
6. H. Kuper, P. Boffeta and H. O. Adami, "Tobacco Use and Cancer Causation: Association by Tumour Type," *Journal of Internal Medicine*, Vol. 252, No. 3, 2002, pp. 206- 224. doi:10.1046/j.1365-2796.2002.01022.x
7. A. W. Hitchings, M. Kumar, S. Jordan, V. Nargund, J. Martin, D. M. Berney, et al., "Prediction of Progression in pTa and pT1 Bladder Carcinomas with p53, p16, pRb," *British Journal of Cancer*, Vol. 91, No. 3, 2004, pp. 552- 557. doi:10.1038/sj.bjc.6601954
8. J. H. Mydlo, J. A. Agins, J. Donohoe and B. M. Grob, "A Review of Urologic Cancer Patients with Multiple Primary Malignancies," *World Journal of Urology*, Vol. 19, No. 4, 2001, pp. 240-243. doi:10.1007/s003450100210
9. J. H. Mydlo and M. Gerstein, "Patients with Urologic Cancer and Other Nonurologic Malignancies: Analysis of a Sample and Review of the Literature," *Urology*, Vol. 58, No. 6, 2001, pp. 864-869. doi:10.1016/S0090-4295(01)01394-2
10. A. El-Hakim, A. D. Smith and G. Weiss, "Patients with Bladder and Lung Cancer: A Long-Term Outcome Analysis," *British Journal of Urology International*, Vol. 93, No. 9, 2004, pp. 1225-1227. doi:10.1111/j.1464-410X.2004.04842.x
11. E. Salminen, E. Pukkala and L. Teppo, "Bladder Cancer and the Risk of Smoking-Related Cancers during Follow-Up," *Journal of Urology*, Vol. 152, Pt. 1, 1994, pp. 1420-1423.
12. A. M. Jamieson, A. Diefenbach, C. W. McMahon, N. Xiong, J. R. Carlyle and D. H. Raulet, "The Role of the NKG2D Immunoreceptor in Immune Cell Activation and Natural Killing," *Immunity*, Vol. 17, No. 1, 2002, pp. 19- 29. doi:10.1016/S1074-7613(02)00333-3
13. A. Robert, "Eagle and John Trowsdale. Promiscuity and the Single Receptor: NKG2D. *Nature Reviews, Immunology*, Vol. 7, No. 9, 2007, pp. 737-744. doi:10.1038/nri2144
14. M. T. Borchers, S. C. Wesselkamper, V. Curull, A. Ramirez-Sarmiento, A. Sánchez-Font, J. Garcia-Aymerich, C. Coronell, J. Lloreta, A. G. Agustí, J. Gea, J. A. Howington, M. F. Reed, S. L. Starnes, N. L. Harris, M. Vitucci, B. L. Eppert, G. T. Motz, K. Fogel, D. W. McGraw, J. W. Tichelaar and M. Orozco-Levi, "Sustained CTL Activation by Murine Pulmonary Epithelial Cells Promotes the Development of COPD-Like Disease," *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 119, No. 3, 2009, pp. 636- 649. doi:10.1172/JCI34462
15. S. Bahram, M. Bresnahan, D. E. Geraghty and T. Spies, "A Second Lineage of Mammalian Major Histocompatibility Complex Class I Genes," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, Vol. 91, No. 14, 1994, pp. 6259-6263. doi:10.1073/pnas.91.14.6259
16. World Medical Association Declaration of Helsinki, "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects," Adopted by the 18th WMA General Assembly Helsinki, June 1964 and Amended by the 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, October 2000. <http://ohsr.od.nih.gov/guidelines/helsinki.html>
17. L. F. R. Vallmanya, R. A. Laborda, T. J. Lloreta, A. R. Cortadellas, S. J. Placer and A. Gelabert Mas, "Immunohistochemical Expression of p53, p21, p16 and Cyclin D1 in Superficial Bladder Cancer. A Tissue Microarray Study," *Actas Urologicas Espanolas*, Vol. 30, No. 8, 2006, pp. 754-762.
18. A. L. Rodriguez, F. V. Llana, R. C. Angel, J. L. Trull and A. G. Mas, "Histopathological Validation of Tissue-Microarray Technology in Urotelial Cancer. Our Experience," *Actas Urologicas Espanolas*, Vol. 28, No. 3, 2004, pp. 215-220.
19. A. M. Dancau, R. Simon, M. Mirlacher and G. Sauter, "Tissue Microarrays," *Methods in Molecular Biology*, Vol. 576, 2010, pp. 49-60. doi:10.1007/978-1-59745-545-9_4
20. S. F. Shariat, H. Tokunga, J. H. Zhou, J. H. Kim, G. E. Ayala, W. F. Benedict, et al., "p53, p21, pRB and p16 Expression Predict Clinical Outcome in Cystectomy with Bladder Cancer," *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 22, No. 6, 2004, pp. 1014-1023. doi:10.1200/JCO.2004.03.118

21. H. P. Cathro, M. E. Smolkin, D. Theodorescu, V. Y. Jo, S. Ferrone and H. F. Frierson Jr., "Relationship between HLA Class I Antigen Processing Machinery Component Expression and the Clinicopathologic Characteristics of Bladder Carcinomas," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, Vol. 59, No. 3, 2010, pp. 465-472. doi:10.1007/s00262-009-0765-9
22. V. Groh, S. Bahram, S. Bauer, A. Herman and M. Beauchamp, "Spies T. Cell-Stress Regulated Human Major Histocompatibility Complex Class I Gene Expressed in Gastrointestinal Epithelium," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, Vol. 93, No. 22, 1996, pp. 12445-12450. doi:10.1073/pnas.93.22.12445
23. D. Cosman, J. Mullberg, C. L. Sutherland, et al., "ULBPs, Novel MHC Class I-Related Molecules, Bind to CMV Glycoprotein UL16 and Stimulate NK Cytotoxicity through the NKG2D Receptor," *Immunity*, Vol. 14, No. 2, 2001, pp. 123-133. doi:10.1016/S1074-7613(01)00095-4
24. P. Xiao, L. Xue, L.-H. Che, J.-J. Peng, H.-X. Wu, Y. Li and H. Qiao, "Expression and Roles of MICA in Human Osteosarcoma," *Histopathology*, Vol. 52, No. 5, 2008, pp. 631-656. doi:10.1111/j.1365-2559.2008.02989.x
25. H. Wang, D. Yang, W. Xu, Y. Wang, Z. Ruan, T. Zhao, J. Han and Y. Wu, "Tumor-Derived Soluble MICs Impair CD3(+) NKT. Like Cell Cytotoxicity in Cancer Patients," *Immunology Letters*, Vol. 120, No. 1-2, 2008, pp. 65-71. doi:10.1016/j.imlet.2008.07.001
26. A. I. Roberts, L. Lee, E. Schwarz, V. Groh, T. Spies, E. C. Ebert and B. Jabri, "NKG2D Receptors Induced by IL-15 Costimulate CD28-Negative Effector CTL in the Tissue Microenvironment," *The Journal of Immunology*, Vol. 167, 2001, pp. 5527-5530.
27. H. Herr and A. Morales, "History of Bacillus Calmette-Guerin and bladder Cancer: An Immunotherapy Success Story," *Journal of Urology*, Vol. 179, No. 1, 2008, pp. 53-56. doi:10.1016/j.juro.2007.08.122
28. A. B. Jackson, A. M. Jackson, M. A. O'Donnell and J. K. James, "BCG Immunotherapy of Bladder Cancer: 20 Years on," *Lancet*, Vol. 353, No. 9165, 1999, pp. 1689-1694. doi:10.1016/S0140-6736(98)07422-4
29. A. Bohle and S. Brandau, "Immune Mechanisms in Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy for Superficial Bladder Cancer," *Journal of Urology*, Vol. 170, No. 3, 2003, pp. 964-969. doi:10.1097/O1.ju.000073852.24341.4a
30. A. Bohle, J. Gerdes, A. J. Ulmer, A. G. Hotstetter and H. D. Flad, "Effects of Local Bacillus Calmette-Guerin Therapy in Patients with Bladder Carcinoma on Immunocompetent Cells of the Bladder Cancer," *Journal of Urology*, Vol. 144, No. 1, 1990, pp. 53-58.
31. A. Martino, R. Casetti, A. Sacchi and F. Poccia, "Central Memory Gammadelta T Lymphocytes Primed and Expanded by Bacillus Calmette-Guerin Infected Dendritic Cells Kill Mycobacterial-Infected Monocytes," *The Journal of Immunology*, Vol. 179, No. 5, 2007, pp. 3057-3064.
32. J. Lee, K. Choi, M. R. Olin, S. N. Cho and T. W. Molitor, "Gammadelta T Cells in Immunity Induced by Mycobacterium Bovis Bacillus Calmette-Guerin Vaccination," *Infection and Immunity*, Vol. 72, No. 3, 2004, pp. 1504-1511. doi:10.1128/IAI.72.3.1504-1511.2004
33. A. M. Jackson, A. B. Alexandro, R. W. Kelly, A. Skibinska, K. Esuvaranthan, S. Prescott, G. D. Chisholm and K. James, "Changes in Urinary Cytokines and Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM) in Bladder Cancer after Bacillus Calmette-Guerin (BCG) Immunotherapy," *Clinical & Experimental Immunology*, Vol. 99, No. 3, 1995, pp. 369-375. doi:10.1111/j.1365-2249.1995.tb05560.x
34. G. N. Thalman, A. Sermir, C. Rentch, K. Mohrle, M. G. Cecchini and U. E. Studer, "Urinary Interleukin-8 and 18 Predict the Response of Superficial Bladder Cancer to Intravesical Therapy with Bacillus Calmette-Guerin," *Journal of Urology*, Vol. 164, No. 6, 2000, pp. 2129-2133. doi:10.1016/S0022-5347(05)66983-2
35. J. A. Martínez-Piñero, N. Flores, S. Isoma, E. Solsona, J. L. Sebastián, C. Pertusa, L. A. Rioja, L. Martínez-Piñero, R. Vela, J. E. Camacho, J. L. Nogueira, I. Pereira, L. Resel, P. Muntañola, F. Galvis, N. Chesa, J. A. De Torres, J. Carballido, C. Bernuy, S. Arribas, R. Madero; for CUE-TO (Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico), "Long-Term Follow-Up of a Randomized Prospective Trial Comparing a Standard 81 mg Dose of Intravesical Bacillus Calmette-Guerin a Reduced Dose of 27 mg in Superficial Bladder Cancer," *British Journal of Urology International*, Vol. 89, No. 7, 2002, pp. 671-680. doi:10.1046/j.1464-410X.2002.02722.x
36. T. Higuchi, M. Shimizu, A. Owaki, M. Takahashi, E. Shinya, T. Nishimura and H. Takahashi, "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*, Vol. 58, No. 8, 2009, pp. 1245-1255. doi:10.1007/s00262-008-0643-x
37. M. J. Smyth, J. Swann, E. Cretney, N. Zerafa, W. M. Yokoyama and Y. Hayakawa, "NKG2D Function Protects the Host From Tumor Initiation," *The Journal of Experimental Medicine*, Vol. 202, No. 5, 2005, pp. 583-588. doi:10.1084/jem.20050994
38. C. Macalli, S. Sacramuzza and G. Parmiani, "TNK Cells (NKG2D+ CD8+ or CD4+ T Lymphocytes) in the Control of Human Tumors," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, Vol. 58, No. 5, 2009, pp. 801-808. doi:10.1007/s00262-008-0635-x
39. Z. Madjd, I. Spendlove, R. Moss, S. Bevin, S. E. Pinder, N. F. S. Watson, I. Ellis and G. Lindy, "Differential Upregulation of MICA on High-Grade Invasive Operable Breast Carcinoma," *Cancer Immunology*, Vol. 7, 2007, pp. 17-27.
40. J. del Rey, J. Placer, F. Vallmanya, N. Pujol, E. Prat, R. Miró and A. Gelabert, "Are Patients with Non-Muscle Invasive Bladder Cancer a Suitable Population for a Lung Cancer Screening Trial?" *British Journal of Urology International*, Vol. 106, No. 1, 2010, pp. 49-52.