



# UNIVERSIDAD DE GRANADA

**TESIS DOCTORAL**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA**

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS HLA Y  
MECANISMOS DE ESCAPE INMUNOLÓGICO EN LOS  
TUMORES VESICALES**

**José Francisco Flores Martín**

Directores

José Manuel Cózar Olmo  
Federico Garrido Torres-Puchol

Granada, 2021

**Editor:** Universidad de Granada. Tesis Doctorales

**Autor:** José Francisco Flores Martín

**ISBN:** 978-84-1306-894-7

**URI:** <http://hdl.handle.net/10481/69087>

## **FINANCIACIÓN**

Este trabajo ha sido en parte financiado por las becas del Instituto Español de Salud Carlos III (ISCIII, Instituto Carlos III) cofinanciadas por la Unión Europea (FEDER-Fondo Europeo de Desarrollo Regional) [PI12 / 02031, PI11 / 01022, PI11 / 01386, RETIC RD 06/020, PT13 / 0010/0039, PI14 / 01978, PI16 / 00752, PI17 / 00197] y por la Junta de Andalucía en España [Grupo CTS-143].



*A mis padres y mi hermano*



*El mundo está en las manos de aquellos  
que tienen el coraje  
de soñar y correr el riesgo de vivir sus sueños*

*Paulo Coelho*



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. José Manuel Cózar, por todo su apoyo y enseñanzas desde el inicio de mi época de residente en el servicio de Urología del Hospital Virgen de las Nieves de Granada y durante la realización de esta tesis y, por transmitirme la importancia de la investigación en nuestra profesión

Al Dr. Federico Garrido por su confianza, enseñanzas y consejos durante la elaboración de esta tesis, sobretodo en lo que se refiere a la parte inmunológica, descubriéndome una nueva visión muy interesante de la urooncología.

A la Dra. Natalia Aptsiauri por su gran ayuda en todo el proceso de trabajo de campo y posterior escritura del artículo y la propia tesis doctoral, sin ella este trabajo no habría sido posible.

A todo el personal del servicio de inmunología y análisis clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Nieves de Granada, por todo el apoyo y ayuda desinteresada que han mostrado durante la realización de la tesis

A mis compañeros y amigos urólogos de los servicios de urología de los hospitales Virgen de la Nieves de Granada y Universitario de Jaén por su apoyo y ayuda inestimable a lo largo de todos estos años.

A mis padres Jose y Feli, y mi hermano Nacho, por su apoyo en toda mi carrera y su confianza día a día, y por no dejar por muy desmotivado que estuviera que dejase este proyecto de lado y haya conseguido finalizarlo.



## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	15
RESUMEN.....	17
INTRODUCCION.....	23
1. Epidemiología del tumor vesical.....	25
2. Etiología del tumor vesical.....	26
3. Estadificación del tumor vesical.....	29
4. Diagnóstico del tumor vesical.....	31
5. Tratamiento del tumor vesical.....	34
5.1 Tratamiento del tumor vesical no músculo-invasivo.....	35
5.2 Tratamiento del tumor vesical músculo-invasivo.....	44
5.3 Tratamiento de la enfermedad metastásica.....	50
6. Respuesta inmune antitumoral.....	54
7. Alteraciones del HLA-I.....	59
7.1 Estructura y función del HLA.....	59
7.2 Pérdida del HLA-I y escape tumoral.....	61
7.3 Defectos reversibles e irreversibles del HLA-I.....	64
7.4 Alteraciones del HLA-I y cambios en la arquitectura tumoral.....	67
7.5 Correlación clínico-patológica de las alteraciones del HLA-I.....	69
7.6 Alteraciones del HLA-I y resistencia a inmunoterapia.....	70
8. Inhibidores de punto de control inmunitario (Immune Checkpoint inhibitors) y otras moléculas del microambiente tumoral.....	73
8.1 CTLA-4.....	74
8.2 PD-L1 y PD1.....	75
8.3 Otras moléculas del microambiente tumoral.....	80
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	81

MATERIAL Y MÉTODOS.....	85
1. Pacientes y muestras tumorales.....	87
2. Análisis inmunohistoquímico de las muestras tumorales.....	89
3. Análisis Estadístico.....	91
RESULTADOS.....	93
1. Análisis inmunohistoquímico y asociación entre inmunogenicidad tumoral, infiltración inmunitaria intratumoral y microambiente.....	95
2. Relaciones del microambiente tumoral con las características clínico-patológicas de los tumores vesicales.....	103
3. Relaciones de la agrupación del HLA-I y PD-L1 con el microambiente tumoral y las características clínico-patológicas de los tumores vesicales.....	105
DISCUSIÓN.....	109
CONCLUSIONES.....	117
REFERENCIAS.....	121
ANEXOS.....	145
1. Producción científica derivada de la tesis.....	147
2. Lista de tablas, gráficos y figuras.....	148

## ABREVIATURAS

- APM: Maquinaria de procesamiento antigénico
- BCG: Bacilo de Calmette -Guérin
- $\beta 2m$ :  $\beta 2$ -microglobulina
- Cis: Carcinoma in situ.
- CV: Cáncer vesical
- CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad (I-II)
- CTLA-4: Antígeno 4 asociado a los LTC
- EORTC: European Organisation for Research and Treatment of Cancer
- FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
- HLA: Antígeno leucocitario humano (I o II)
- IFN: Interferón
- IL-2: Interleucina 2
- IMRT: Radioterapia de intensidad modulada
- LTC: linfocitos T citotóxicos
- M-CAVI: metotrexate, carboplatino y vinblastina
- MVAC: Metotrexate, Vinblastina , adriamicina , Cisplatino.
- MMC: Mitomicina
- NK: Natural killer
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- RMN: Resonancia magnética nuclear
- RR: Riesgo relativo
- RTU: Resección transuretral
- SG: Supervivencia Global
- SLP: Supervivencia libre de progresión
- SLR: Supervivencia libre de recurrencia
- TCR: Receptor de células T
- TILs: Linfocitos infiltrantes de tumor
- TMPV: Técnica multimodal de preservación vesical
- TNM: Tumor, Node, Metastasis.
- TVMI: Tumor vesical músculo-invasivo

- TVNMI: Tumor vesical no músculo-invasivo
- UICC: Unión Internacional contra el Cáncer

# RESUMEN



## RESUMEN

El cáncer de vejiga es actualmente el undécimo tumor más diagnosticado en el mundo, con una incidencia ajustada por edad (100.000 habitantes / año) de 8,9 para los hombres y 2,2 para las mujeres. Aproximadamente, el 75% de los pacientes con cáncer vesical presentan tumores vesicales no músculo-invasivos, es decir, tumores confinados a la mucosa (estadio Ta, CIS) o submucosa (estadio T1). Este tipo de tumores tienen una alta prevalencia debido a la supervivencia a largo plazo y menor riesgo de mortalidad específica en comparación con los tumores vesicales músculo-invasivos (estadios T2-T4).

La recurrencia de los tumores vesicales no músculo-invasivos es mayor al 60%, mientras que la progresión tumoral ocurre en el 42% de los pacientes con una mediana de seguimiento de 10 años. El estadio y el grado histológico son los predictores de recurrencia y progresión clásicamente más utilizados

A pesar de los avances en la prevención de la enfermedad y su progresión, es difícil predecir el curso benigno o más agresivo de la enfermedad. Una mejor comprensión de los mecanismos del control inmunológico sobre la progresión del tumor y las rutas de escape inmunológico del cáncer puede ayudar a predecir el comportamiento del tumor y desarrollar nuevos biomarcadores de la evolución de la enfermedad.

La respuesta inmune antitumoral requiere habitualmente la activación de linfocitos T CD8 + con péptidos antigénicos tumorales presentados por el complejo HLA de clase I de la superficie celular. Al mismo tiempo, las células T CD4 + pueden estimular la función de los linfocitos T CD8 + o regular negativamente la infiltración de estas células en el tumor mediante la regulación positiva de moléculas co-inhibidoras, incluidas CTLA-4, PD-L1 y PD-1, y por la producción de citocinas inmunosupresoras.

Con frecuencia, las células tumorales pierden la expresión normal de la superficie celular de las moléculas de HLA de clase I, por diferentes mecanismos

moleculares. Estas alteraciones del HLA de clase I se han descrito en diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer de vejiga, con diferente frecuencia, que van desde el 15% en el cáncer renal hasta el 80% en el cáncer colorrectal. Estos defectos pueden producir una pérdida total o parcial del HLA de clase I, y pueden clasificarse en defectos reversibles o irreversibles. La regulación negativa de HLA de clase I producida por alteraciones reversibles puede corregirse mediante citocinas, pero las alteraciones irreversibles del HLA de clase I pueden causar resistencia a la inmunoterapia contra el cáncer.

En el microambiente tumoral existen importantes mecanismos de control negativo de la activación de linfocitos T, incluido el eje de inmunosupresión PD-L1 / PD1. Las nuevas estrategias de inmunoterapia contra el cáncer se basan en el bloqueo de estos "puntos de control inmunitarios" que conducen a la activación de las células T y promueven respuestas inmunitarias antitumorales más potentes. Dado que las células T desempeñan un papel clave en la eliminación de células malignas, la expresión de HLA de clase I tumoral puede predeterminar una terapia anti-PD1 / PD-L1 exitosa. Sin embargo, no hay estudios que analicen el papel de la coexpresión de las moléculas tumorales HLA-I y PD-L1 / PD1 en la búsqueda de biomarcadores relacionados con la progresión del cáncer y la respuesta al bloqueo de puntos de control en el cáncer de vejiga.

En este estudio analizamos la expresión de HLA-I y PD-L1 en tumores vesicales no metastásicos, tanto en correlación con la infiltración linfocitaria intratumoral como en asociación con las características clínico-patológicas de los pacientes.

Se analizaron un total de 85 muestras de tumores vesicales de estirpe urotelial. Las muestras procedían de resecciones transuretrales de vejiga realizadas en el Servicio de Urología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. Las muestras de tumor se almacenaron en nitrógeno líquido a -80°C inmediatamente después de la RTU, hasta que se realizó el análisis inmunohistoquímico. Posteriormente, se realizó el análisis inmunohistoquímico para investigar la expresión de HLA-I, PD-L1, PD-1, CD3, CD8 y CXCR4. Los

resultados se correlacionaron con el estadio tumoral y otras variables clínico-patológicas de los pacientes.

Encontramos una fuerte correlación positiva entre la expresión de HLA de clase I del tumor y la infiltración con células T CD3 + y CD8 +, de manera que el HLA de clase I parece ser un factor importante de rechazo tumoral asociado con un aumento de la infiltración de linfocitos intratumorales, y que cambia durante la evolución de la enfermedad tumoral como resultado de la selección y eliminación mediada por linfocitos T de células tumorales positivas para HLA de clase I y el escape inmune de células negativas para HLA de clase I.

La expresión de PD-L1 fue positiva en el 15,5% de los tumores y heterogénea en el 40,5%, y se relacionó con un estadio tumoral más avanzado. Alrededor del 80% de los tumores en estadio tumoral T2 expresaban PD-L1, en comparación con el grupo de tumores Ta + T1 donde esta incidencia fue solo del 44,4%, lo que sugiere que los tumores más agresivos podrían utilizar la expresión de PD-L1 como un mecanismo de escape inmunológico para avanzar a una etapa de invasión más avanzada.

No encontramos ninguna correlación estadísticamente significativa entre HLA de clase I y PD-L1 analizados de forma independiente. Sin embargo, muchos tumores mostraron un patrón heterogéneo de expresión de HLA de clase I y PD-L1 y diferentes fenotipos de coexpresión, por lo que clasificamos los tumores en cuatro grupos: HLA-I+ / PD-L1-, HLA-I- / PD -L1+, HLA-I+/PD-L1+ y HLA-I-/PD-L1-. El análisis de la expresión simultánea de HLA-I+ / PD-L1-, reveló que el 85,2% de los tumores con fenotipo HLA de clase I positivo / heterogéneo y negativo para PD-L1 eran en su mayoría no músculo-invasivos, lo que representa un fenotipo inmunológico de "rechazo tumoral".

El inmunofenotipo tumoral HLA-I+ /PD-L1+, relacionado con las características clínico-patológicas de los tumores dio como resultado una asociación significativa con el estadio, siendo tumores que se reparten casi al 50% en músculo-invasivos y no músculo-invasivo, lo cual puede representar una etapa intermedia en

esta evolución natural del tumor. En etapas tempranas, la expresión de HLA de clase I positiva puede coincidir con una baja expresión de PD-L1 (fenotipo de rechazo inmune) y progresar a una variante de escape con patrón HLA-I- / PD-L1 + en estadios avanzados.

Como conclusiones podemos comentar que nuestros resultados muestran que PD-L1 es un factor independiente de invasividad y mal pronóstico en los tumores vesicales, lo que sugiere que PD-L1 pueda ser un factor que promueva la progresión de estadios localizados a más avanzados, encontrando en nuestro estudio que la mayoría de los tumores HLA-I positivos / PD-L1 negativos se encuentran en una etapa menos avanzada, lo que vendría a apoyar esta hipótesis. Una mayor expresión de HLA-I se asocia con una mayor infiltración de linfocitos intratumorales y, junto con una baja expresión de PD-L1 en las células de cáncer de vejiga, representa un fenotipo de rechazo tumoral y podría usarse como marcador predictivo de buen pronóstico. Con base en los resultados obtenidos, creemos que la pérdida de HLA de clase I, junto con la regulación al alza de PD-L1 en los tumores de vejiga, puede estar asociada con un mal pronóstico y posiblemente con diseminación metastásica.

En caso de tumores vesicales músculo-invasivos, más agresivos, en los que puede aparecer el fenotipo PD-L1-positivo / HLA de clase I negativo, la terapia con anticuerpos anti-PD-L1 / PD-1, junto con una regulación al alza de la expresión normal de HLA de clase I (inmunoterapia o terapia génica) podría mejorar los protocolos existentes del tratamiento del cáncer de vejiga, así como la selección de pacientes para inmunoterapia. Se necesitan estudios y ensayos clínicos adicionales para confirmar las hipótesis y determinar otros aspectos en la interrelación de HLA de clase I y PD-L1.

# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

### 1) Epidemiología del tumor vesical

El cáncer vesical (CV) es a día de hoy el undécimo tumor más diagnosticado en el mundo, siendo su tasa de incidencia estandarizada por edad (100.000 habitantes-año) de 9 para los hombres y 2,2 para las mujeres. En la Unión Europea esta misma tasa fue de 19.1 para los hombres y 4 para las mujeres. En Europa, la tasa más alta se encuentra en Bélgica (31 en hombres y 46,2 en mujeres) y la menor en Finlandia (18,1 en hombres y 4,3 en mujeres) (1).

Las tasas de incidencia y mortalidad del CV varían entre los distintos países debido a las diferencias en los factores de riesgo, la detección y las pruebas diagnósticas, así como la disponibilidad de los tratamientos. Las variaciones son, sin embargo, en parte causadas por la diferente metodología y la calidad de los datos recogidos (2).

Aproximadamente, el 75% de los pacientes con CV presentan tumor vesical no musculo-invasivo (TVNMI), es decir, tumores confinados a la mucosa (estadio Ta, CIS) o submucosa (estadio T1); siendo este porcentaje mayor en pacientes menores de 40 años(3). Este tipo de tumores tienen una alta prevalencia debido a la supervivencia a largo plazo y menor riesgo de mortalidad específica en comparación con los tumores vesicales músculo invasivos (TVMI) (estadio T2-T4) (1,2).

La recurrencia de los TVNMI es mayor al 60%, mientras que la progresión tumoral ocurre en el 42% de los pacientes a los con una mediana de seguimiento de 10 años. El estadio y el grado histológico son los predictores de recurrencia y progresión clásicamente más utilizados (4).

## 2) Etiología del tumor vesical

Existen diferentes factores que pueden influir en el desarrollo del CV:

- **Hábito Tabáquico:** Es el factor de riesgo mejor establecido para el desarrollo de CV, causando de l 50-60% de los casos en hombres y el 20-30 % en las mujeres. (5). La incidencia de CV es directamente proporcional a la duración del tiempo en el cual se ha fumado, así como al número de cigarrillos por día. (6). El riesgo de cáncer de vejiga también es mayor en quienes empiezan a fumar a una edad temprana o en quienes están expuestos a humo de tabaco, como demuestra un reciente metaanálisis que relaciona la exposición al humo del tabaco durante la infancia y edad adulta, con una mayor incidencia de cáncer vesical en mujeres (7). Un reducción drástica en el riesgo de desarrollo de CV se observó cuando se dejaba de fumar, siendo éste del 40% en los 4 primeros años tras dejar el tabaco y de hasta el 60% después de 25 años. (6). Educar a la gente para dejar de fumar disminuye la incidencia de TV de forma igualitaria en hombres y mujeres (5).
- **Factores ocupaciones:** La exposición laboral es el segundo factor de riesgo más importante de CV. Los casos relacionados con el trabajo, supusieron el 20-25 % de todos los CV en algunas series, ocurriendo en profesiones expuestas a aminas aromáticas, que pueden ser utilizadas en tintes, gomas, textiles, pinturas, cuero... (8). El riesgo de CV debido a la exposición ocupacional a aminas aromáticas cancerígenas, es significativamente mayor después de 10 años o más de exposición; siendo el período de latencia medio superior a 30 años. (9).
- **Radioterapia:** Se ha descrito un aumento del riesgo relativo (RR) de sufrir CV en pacientes con tumores ginecológicos y prostáticos sometidos a radioterapia externa (RR 2-4 y de 1,4 respectivamente) (10) . Actualmente con las nuevas técnicas como la radioterapia de intensidad modulada (IMRT) para el tratamiento de diferentes patologías como el cáncer de próstata, ha supuesto una disminución de tumores secundarios en recto y vejiga (11). No

obstante, hasta que no se realicen estudios a largo plazo, los pacientes con cáncer de próstata con alta esperanza de vida sometidos a radioterapia, tienen riesgo de desarrollo de CV (11).

- **Factores dietéticos:** Se han descrito varios factores alimentarios que podrían estar relacionados con el CV, sin embargo, estas relaciones continúan siendo controvertidas. El estudio Europeo EPIC, no encontró relación entre el CV y el consumo de líquidos, carne roja, frutas o verduras; únicamente observó una relación inversa entre la toma diaria de flavonoides y lignanos con el riesgo de agresividad del CV (12).
- **Infecciones urinarias crónicas:** El TVMI (el subtipo de células escamosas) está directamente relacionado con la presencia de infección urinaria crónica. Varios estudios de casos y controles, han encontrado una relación directa entre el CV y las infecciones de orina recurrentes, constatando un aumento del riesgo, aunque estos resultados podrían ser debidos a sesgos de selección. (13). Por el contrario, se ha descrito un aumento del riesgo de CV en pacientes portadores de sondas permanentes a largo plazo (14).
- **Esquistomatosiis vesical:** La esquistosomiasis (bilharziosis) vesical se considera una causa de cáncer de vejiga, con un riesgo asociado cinco veces mayor (15). Existe una asociación bien establecida entre la esquistomatosiis y carcinoma urotelial vesical que puede progresar a carcinoma de células escamosas (16). Un buen control de la enfermedad puede disminuir la incidencia de CV en zonas endémicas como Egipto. (17).
- **Género:** El CV es más frecuente en hombres que en mujeres, no obstante, las mujeres suelen presentar diagnósticos más tardíos con enfermedad más avanzada , y por tanto peor supervivencia (18). Las diferencias en la prevalencia de cáncer de vejiga según el sexo, pueden deberse a otros factores distintos del tabaco y la exposición a sustancias químicas. En un estudio de cohortes prospectivo, la postmenopausia se asoció a un mayor riesgo de cáncer de vejiga incluso tras efectuar ajustes respecto al

tabaquismo. Las diferentes concentraciones de estrógenos y andrógenos existentes en hombres y mujeres, podrían ser responsables de las diferencias observadas en cuanto a la prevalencia del cáncer de vejiga entre sexos (19).

- **Factores Genéticos:** Los estudios citogenéticos y moleculares realizados en las neoformaciones vesicales de origen urotelial indican que el desarrollo y progresión de estas lesiones depende de múltiples y complejos reordenamientos genéticos. Los cambios citogenéticos encontrados con mayor frecuencia son la monosomía 9, isocromosomas de 5p y trisomía 7. También se han hallado monosomías 8, isocromosomas de 8q y deleciones de 8p. Los resultados de los estudios moleculares muestran que los sitios más frecuentes donde se aprecia pérdida alélica son los cromosomas 9p, 9q, 11p, 13q, 17p, 4p y 8p. (20).

### 3) **Estadificación del tumor vesical**

Podemos diferenciar diferentes tipos de clasificaciones para la estadificación del CV:

- **Clasificación TNM**

En el año 2009, la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC) aprobó la clasificación TNM (Tumor, Node, Metastasis) para tumores vesicales, que se ha mantenido sin cambios hasta la actualidad (21). (Tabla1)

- **Clasificación Histológica del CV**

En 2004, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Sociedad Internacional de Patología Urológica publicaron una nueva clasificación histológica del carcinoma urotelial con respecto a la anterior del año 1973. (22,23). Actualmente ambas clasificaciones deben utilizarse hasta que la clasificación de la OMS de 2004 sea validada por más ensayos clínicos y se incorpore a modelos predictivos pronósticos.

Clasificación de la OMS 1973:

- Grado 1: Tumor urotelial bien diferenciado
- Grado 2: Tumor urotelial moderadamente diferenciado
- Grado 3: Tumor urotelial pobremente diferenciado.

Clasificación de la OMS 2004 ( Lesiones papilares):

- Neoplasia urotelial papilar de bajo potencial de malignidad
- Carcinoma urotelial papilar de bajo grado.
- Carcinoma urotelial papilar de alto grado.

<b>T – Tumor primario</b>
<p>Tx No se puede evaluar el tumor primario</p> <p>T0 Sin evidencia de tumor</p> <p>Ta Carcinoma papilar no invasivo</p> <p>Tis Carcinoma <i>in situ</i>: tumor plano</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. T1 Tumor que invade el tejido conectivo subepitelial</li> <li>. T2 Tumor que invade la capa muscular <ul style="list-style-type: none"> <li>. T2a Tumor que invade la capa muscular superficial</li> <li>. T2b Tumor que invade la capa muscular profunda</li> </ul> </li> <li>. T3 Tumor que invade el tejido perivesical <ul style="list-style-type: none"> <li>. T3a Microscópicamente</li> <li>. T3b Macroscópicamente</li> </ul> </li> <li>. T4 Tumor que invade estroma prostático, útero, vagina y pared pélvica o abdominal <ul style="list-style-type: none"> <li>. T4a Tumor que invade estroma prostático, útero, vagina</li> <li>. T4b Tumor que invade pared pélvica o abdominal</li> </ul> </li> </ul>
<b>N – Ganglios linfáticos regionales</b>
<p>NX No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. N0 No hay metástasis en ganglios linfáticos regionales</li> <li>. N1 Metástasis en un solo ganglio regional en la zona pélvica: hipogástrica, obturatriz, ilíaca externa o presacra.</li> <li>. N2 Metástasis en más de un ganglio regional de la zona pélvica</li> <li>. N3 Metástasis en un solo ganglio o más de la zona iliaca común</li> </ul>
<b>M – Metástasis a distancia</b>
<p>M0 No existen metástasis a distancia</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>. M1a Metástasis ganglionares no regionales</li> <li>. M1b Otras metástasis a distancia</li> </ul>

Tabla 1. Clasificación TNM del CV (21)

#### 4) Diagnóstico del tumor vesical

- **Historia Clínica**

Para un correcto diagnóstico del CV, es imprescindible comenzar con una correcta historia clínica en la que se debe hacer hincapié en la aparición de hematuria indolora con coágulos, lo cual nos puede indicar estadios más avanzados de la enfermedad. Así mismo, la aparición de síntomas del tracto urinario inferior rebeldes al tratamiento habitual, sobretodo de llenado, y asociados o no a hematuria, nos podría hacer sospechar de carcinoma in situ (Cis). (24).

- **Estudios de imagen**

- **Ecografía:** La ecografía es una herramienta de fácil acceso y realización con una sensibilidad moderada a una amplia gama de anomalías en el tracto urinario superior e inferior. Permite la caracterización de masas renales, la detección de hidronefrosis y la visualización de masas intraluminales en la vejiga, pero no puede descartar todas las posibles causas de hematuria (25). No puede excluir la presencia de tumores del tracto urinario superior, así como la presencia de Cis.
- **Uro-TC:** Se puede utilizar para el diagnóstico de tumores papilares del tracto urinario, indicado por defectos de repleción o hidronefrosis (26). Así mismo nos proporciona información valiosa acerca de la afectación de ganglios y órganos vecinos en caso de TVMI.
- **Resonancia magnética nuclear (RMN):** La precisión de la resonancia magnética para la estadificación del tumor primario varía del 73% al 96%. Un metanálisis de 17 estudios mostró una sensibilidad del 91% y una especificidad del 96% para la RM con dispositivo de 3 teslas combinada con imágenes ponderadas por

difusión para diferenciar los TVNMI de los TVMI (27). Se ha propuesto el sistema VI-RADS (Vesical Imaging-Reporting And Data System) derivado del uso de resonancia magnética en T2, imágenes ponderadas por difusión y realce dinámico de contraste, que sugiere los riesgos de invasión de la capa muscular. Se divide en 5 puntos según la probabilidad de afectación de la capa muscular propia, siendo los valores 4 y 5 los que sugieren afectación de la misma. (28).

- **Citología urinaria**

El análisis de orina de lavado de la vejiga en busca de células cancerosas exfoliadas tiene una alta sensibilidad en los tumores G3 y de grado alto (84%), pero una sensibilidad baja en los tumores G1 o de bajo grado (16%) (29). La sensibilidad en la detección de Cis va desde el 28-100% (30). La citología es útil como complemento de la cistoscopia y otras pruebas diagnósticas en pacientes con tumores de alto grado o G3, aunque no tiene porque indicar que el tumor se encuentre en la vejiga, ya que puede encontrarse en cualquier parte del aparato urinario.

La interpretación de la citología depende del patólogo (31), aunque en 2016, el Grupo de Trabajo de París publicó un sistema estandarizado que redefine las categorías de diagnóstico de citología urinaria (32):

- Negativo para carcinoma urotelial de alto grado.
- Células uroteliales atípicas.
- Sospechoso de carcinoma urotelial de alto grado.
- Carcinoma urotelial de alto grado.
- Neoplasia urotelial de bajo grado.

- **Biomarcadores moleculares urinarios**

Actualmente ninguno de los marcadores existentes ha sido aceptado para diagnóstico o seguimiento del CV en guías clínicas. En general este tipo

de marcadores deben ir en la dirección de evitar la realización de cistoscopias, por lo que en lugar de buscar marcadores con una alta sensibilidad y especificidad, el enfoque debe estar en identificar un marcador con un valor predictivo negativo alto. Una prueba capaz de predecir de predecir la ausencia de tumor tendrá una gran utilidad en la práctica clínica diaria.

- **Cistoscopia:**

El diagnóstico final del CV depende finalmente de la cistoscopia vesical y de la evaluación histológica del tejido tumoral mediante biopsia fría o resección. El carcinoma in situ se diagnostica con la combinación de cistoscopia, citología de orina y evaluación histológica de múltiples biopsias de vejiga (33).

## 5) Tratamiento del tumor vesical

El primer paso del tratamiento de los tumores de vejiga, es la realización de una resección transuretral (RTU) vesical para intentar eliminar toda la parte visible del tumor, y tomar una muestra de la zona de implantación llegando hasta la capa muscular vesical, para poder obtener una muestra que el patólogo pueda analizar posteriormente y darnos más información acerca del mismo y su grado de infiltración.

Los pasos necesarios para lograr una RTU vesical con éxito, incluyen la identificación de los factores necesarios para asignar el riesgo de enfermedad (número de tumores, tamaño, multifocalidad, características, sospecha de CIS, tumor recurrente o primario), estadio clínico (examen bimanual bajo anestesia, asignación del estadio clínico del tumor), resección adecuada (resección visualmente completa, visualización del músculo en la base de la resección) y presencia de complicaciones (evaluación de la perforación) (34). La ausencia de músculo detrusor en la muestra se asocia con un riesgo significativamente mayor de enfermedad residual, recidiva temprana y subestadificación del tumor (35). La presencia de músculo detrusor en la muestra se considera un criterio indirecto de la calidad de la resección y es necesaria (excepto en los tumores Ta G1 o de bajo grado).

Tras la realización de la RTU vesical, el informe del patólogo es una información esencial para poder continuar realizando el mejor tratamiento según el tipo de tumor. Se requiere una estrecha cooperación entre urólogos y patólogos para conseguir los mejores resultados. Una buena calidad del tejido resecado y la información clínica es esencial para una correcta evaluación patológica. Así mismo, se necesita suficiente músculo detrusor para la correcta evaluación de la categoría T.

A continuación clasificaremos el tratamiento posterior a la primera RTU vesical en función de si en el informe patológico obtenemos un TVNMI o un TVMI

### 5.1) Tratamiento del TVNMI

- **Papel de la Re-RTU vesical**

Una vez se recibe el resultado de la Anatomía patológica y nos encontramos con un TVNMI (Ta-T1), es recomendable la realización de una 2º RTU vesical sobre el lecho de la primera RTU. Existe riesgo significativo de tumor residual después de una RTU inicial de las lesiones de Ta-T1 (36). Un metanálisis de 3556 pacientes con tumores T1 mostró una alta tasa de tumores residuales y aumento del estadio a enfermedad músculoinvasiva después de la 2º RTU. En un subgrupo de 1.565 tumores T1 con presencia de músculo detrusor, se encontró tumor persistente en el 58% y subestadificación en el 11% de los casos (37). Un estudio analizó los datos de 8.409 pacientes con TVNMI y demostró un 51% de riesgo de persistencia de la enfermedad y un 8% de riesgo de subestadificación en tumores T1. Así mismo, mostró un alto riesgo de enfermedad residual en los tumores Ta, aunque esto se basó en un número limitado de casos. La mayoría de las lesiones residuales se detectaron en la ubicación original del tumor (38). Otras ventajas que han sido demostradas a la hora de realizar una Re-RTU vesical, son el aumento de la supervivencia libre de recurrencia (SLR) (39) y la mejora de los resultados después del tratamiento con BCG (40).

En cuanto al momento en el que debe realizarse la Re-RTU vesical, no está del todo claro. Un estudio retrospectivo mostró que la realización de una segunda resección realizada entre 14-42 días después de la resección inicial proporciona una SLR y una supervivencia libre de progresión (SLP) más prolongadas en comparación con la segunda resección realizada después de 43-90 días [170] (41).

Por tanto y tras toda la información existente, las principales guías de práctica clínica recomiendan la realización de una segunda RTU vesical en tumores T1 o en aquellos sin presencia de musculo detrusor (excepto Ta, G1 o de bajo grado) a realizar entre 2-6 semanas después de la RTU inicial

(42). Es importante que cada servicio de urología conozca sus resultados de la 2ª RTU vesical para poder adaptar los beneficios de realizarla a sus poblaciones concretas.

- **Categorización del riesgo**

Las Guías de práctica clínica (42), recomiendan la estratificación de los pacientes en tres grupos de riesgo que tienen en cuenta las probabilidades de recurrencia y, especialmente, de progresión de las tablas de riesgo de la EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) (43). La base de estas tablas son los datos de 2596 pacientes que diagnosticados de tumores TaT1, y fueron asignados al azar a siete ensayos EORTC. No se incluyeron pacientes con Cis, recibiendo el 78% de los pacientes tratamiento intravesical, principalmente Mitomicina (MMC). En la tabla 2, se exponen los diferentes grupos de riesgo los y factores de los cuales dependen para encuadrarse en un grupo u otro.

<b>Grupos de riesgo</b>	<b>Características</b>
Tumores de bajo riesgo	Primario, solitario, TaG1, < 3 cm, no Cis
Tumores de riesgo intermedio	Todos los tumores no encuadrados en las otras 2 categorías
Tumores de alto riesgo	Cualquiera de las siguientes: <ul style="list-style-type: none"> <li>• T1</li> <li>• G3 o Alto riesgo</li> <li>• Cis</li> <li>• Múltiple, recurrente, mayor de 3 cm, Ta G1G2 (Debe cumplir todas las características)</li> </ul>

**Tabla 2. Grupos de riesgo TVNMI**

- **Tratamiento adyuvante**

Aunque la RTU vesical por sí sola puede eliminar un TVNMI, estos tumores suelen reaparecer y pueden progresar a TVMI. La alta variabilidad en la tasa de recurrencia a los 3 meses puede indicar que la RTU fue incompleta o provocar recurrencias en un alto porcentaje de pacientes (44). Por tanto, es necesario considerar la terapia adyuvante en todos los pacientes.

- **Quimioterapia intravesical**

A) Dosis única postoperatoria:

Ha sido comprobado en diferentes estudios que una dosis única de quimioterapia intravesical tras la realización de la RTU, tiene un efecto ablativo sobre las células tumorales residuales que puedan quedar tras la misma. Han sido utilizados distintos tipos de quimioterapia como gemcitabina (45) o Mitomicina (46), aunque no se han realizado ensayos clínicos aleatorizados para comparar unas sustancias con otras.

En un metanálisis con datos de 2278 pacientes (47), una dosis única de quimioterapia intravesical, redujo la tasa de recurrencia a 5 años en un 14%, del 59% al 45%. Solo los pacientes con una tasa de recurrencia previa menor o igual a una recurrencia por año y aquellos con una puntuación de recurrencia EORTC <5 se beneficiaron de la dosis única.

La instilación de la quimioterapia, debe de realizarse las primeras horas tras la realización de la RTU, ya que tras ese tiempo se ha demostrado que las células tumorales se implantan y la dosis ya no es eficaz. (48). En todos los estudios la instilación se administró dentro de las 24 horas. Para mejorar la eficacia de la instilación, se deben diseñar prácticas flexibles que permitan que se administre lo antes posible

después de la RTU, preferiblemente dentro de las primeras dos horas tras la misma.

#### B) Instilaciones adicionales de quimioterapia intravesical adyuvante

La indicación de terapia intravesical adyuvante adicional va a depender del riesgo pronóstico, ya comentado en apartados anteriores (Tabla 2). En pacientes de bajo riesgo una instilación de quimioterapia única postoperatoria reduce el riesgo de recurrencia y se considera el tratamiento estándar y completo (47). Para pacientes de riesgo intermedio, sin embargo, una instilación única es un tratamiento incompleto debido a la alta probabilidad de recurrencia y / o progresión. La duración y la frecuencia de las instilaciones de quimioterapia repetidas siguen siendo controvertidas; sin embargo, no debe exceder de un año (49).

- **Bacilo de Calmette -Guérin (BCG) intravesical**

#### A) Eficacia de la BCG en recurrencia y progresión de TVNMI

Existe múltiples estudios que demuestran la eficacia de la BCG intravesical en cuanto a recurrencia de enfermedad. Por un lado contamos con varios metanálisis que han confirmado que la BCG después de RTU es superior a RTU en monoterapia o RTU con quimioterapia para prevenir la recurrencia de TVNMI (50,51). En otro metanálisis (52) se han evaluado los datos individuales de 2.820 pacientes incluidos en nueve ensayos clínicos aleatorizados que han comparado MMC frente a BCG. En los ensayos con mantenimiento de BCG, hubo una reducción del 32% en el riesgo de recurrencia de BCG en comparación con MMC, pero un aumento del 28% en el riesgo de recurrencia para los pacientes tratados con BCG en los ensayos sin mantenimiento con BCG. Por otro lado, nos encontramos con tres ensayos clínicos aleatorizados en los que se incluyeron tumores de riesgo intermedio y alto que compararon la BCG con epirubicina e interferón (53),

MMC (54) y epirrubicina (55) y que confirman la superioridad de BCG para la prevención de la recidiva tumoral, siendo este efecto es duradero (55).

En lo que respecta a la progresión existen varios metanálisis que han demostrado que la terapia con BCG retrasa y reduce el riesgo de progresión de los TVNMI (56,57). Uno de ellos, realizado por el Grupo de Cánceres Genito-Urinaris de la EORTC evaluó los datos de 4.863 pacientes incluidos en 24 ensayos clínicos. Con una mediana de seguimiento de 30 meses, los tumores progresaron en el 9,8% de los pacientes tratados con BCG en comparación con el 13,8% en los grupos de control (RTU en monoterapia, RTU y quimioterapia intravesical o RTU asociada a otra inmunoterapia). Asimismo demostró una reducción del 27% en las probabilidades de progresión con el tratamiento de mantenimiento con BCG. (57). Un ensayo clínico aleatorizado con seguimiento a largo plazo mostró un número significativamente menor de metástasis a distancia y una mejor SLP y SG en los pacientes tratados con BCG en comparación con epirrubicina (55). Por el contrario, otro metanálisis no pudo confirmar ninguna diferencia estadísticamente significativa entre MMC y BCG en cuanto a progresión o supervivencia (52).

Los resultados contradictorios entre los diferentes estudios y metanálisis podrían ser explicados por las diferentes características de los pacientes, la duración del seguimiento, la metodología y el poder estadístico. Sin embargo, la mayoría de los estudios mostraron una reducción del riesgo de progresión en tumores de riesgo alto e intermedio si se aplicaba un programa de mantenimiento con BCG.

## B) Toxicidad de la BCG

El tratamiento intravesical con BCG se asocia a más toxicidad comparado con la quimioterapia intravesical (57). Sin embargo, los efectos secundarios graves grado III-IV, se encuentran en menos del 5% de los

pacientes y pueden tratarse eficazmente en casi todos los casos, demostrándose que la mayoría de los efectos secundarios locales y sistémicos (entre los que se encuentran hematuria, prostatitis, orquioepididimitis, fiebre, artralgias, síndrome pseudogripal...) que se observan durante la inducción y los primeros 6 meses de mantenimiento no suelen aumentar durante el mantenimiento (58). Las toxicidades que requirieron la interrupción del tratamiento se observaron con más frecuencia durante el primer año de tratamiento (59). Así mismo, los síntomas que aparecen pueden ser causados por efectos secundarios del tratamiento con BCG o por el tumor vesical en sí. En consecuencia, la carga de síntomas se reduce una vez finalizado el tratamiento en un número significativo de pacientes (60).

### C) Duración de la BCG

Las dosis de inducción de BCG se administran de forma habitual de acuerdo con el programa empírico de seis semanas presentado por Morales y cols. (61). Para conseguir una eficacia óptima como se ha comentado anteriormente, la BCG debe administrarse con un programa de mantenimiento (56,57). En un metanálisis, Bohle y cols. (56) concluyeron que al menos era necesario un año de BCG de mantenimiento para obtener la superioridad de BCG sobre MMC para la prevención de la recurrencia o progresión.

A pesar de todo no se conocen completamente el número óptimo de instilaciones de inducción y la frecuencia y duración óptimas de las instilaciones de mantenimiento. En un ensayo clínico aleatorizado de 1355 pacientes, la EORTC ha demostrado que cuando se administra BCG en dosis completa, el mantenimiento de tres años (3 instilaciones semanales en los meses 3, 6, 12, 18, 24, 30 y 36) reduce la tasa de recurrencia en comparación con un año en pacientes de riesgo alto pero no intermedio, sin diferencias significativas en SLP y SG. (62)

#### D) Indicaciones de BCG

Tras comentar las evidencias existentes, las guías de práctica clínica (42) recomiendan la utilización de BCG en pacientes alto riesgo con la dosis de inducción y mantenimiento de 3 años. En lo que respecta a pacientes de riesgo intermedio es necesario individualizar las características de los mismo para indicar tratamiento con BCG (más toxicidad) durante 1 año o quimioterapia intravesical durante el mismo tiempo.

- **Nuevas terapias en TVNMI de alto riesgo**

#### A) Pacientes no respondedores a BCG

El fallo al tratamiento con BCG ha sido definido como la aparición de un nuevo tumor vesical tras tratamiento con BCG (63). Esta definición incluye a grupos de pacientes muy heterogéneos, por lo que se han creado una serie de subgrupos con definiciones más concretas para poder ser correctamente estudiados a la hora de incluirse en ensayos clínicos (64,65):

- Tumor refractario a BCG (*BCG refractory*): Persistencia de tumor de alto grado a los 6 meses a pesar de tratamiento adecuado con BCG (Definido por la FDA y consistente en haber recibido al menos 5 de las 6 dosis inducción y 2 de mantenimiento (66)). También incluye cualquier progresión de estadio o de grado a los 3 meses del primer ciclo de BCG. Es el tipo de fallo de peor pronóstico con una SLP a 10 años del 51% (64,65)
- Recaída a BCG (*BCG relapsing*): Recurrencia del tumor de alto grado después de completar el mantenimiento con BCG, a pesar de una buena respuesta inicial (Al menos 6 meses sin presencia de tumor vesical). Es el más frecuente con un porcentaje del 61% (64,65)

- No respuesta a BCG (*BCG unresponsive*): Pacientes refractarios o con recaída a BCG. Son los pacientes que tienen más riesgo de progresión y recurrencia, siendo por tanto, pacientes que no suelen ser candidatos a nuevas sesiones de BCG. (64,65)
- Intolerancia al BCG (*BCG intolerant*): Persistencia de la enfermedad debido a no poder completar el tratamiento con BCG por efectos secundarios graves. (64,65)

En la actualidad el tratamiento estándar con un grado de recomendación fuerte por las guías europeas de Urología en pacientes no respondedores a BCG es la cistectomía radical, no obstante con un grado de recomendación débil estos pacientes pueden entrar en un ensayo clínico (42).

En el año 2020, han empezado a publicarse los resultados de diferentes ensayos clínicos basados en inmunoterapia (más adelante se explicará detenidamente los mecanismos de acción de los inhibidores de punto de control, el tipo de inmunoterapia en la que se basan las nuevas moléculas de tratamiento) para este tipo de pacientes. Existen 15 ensayos en marcha, de los cuales el KEYNOTE 057 es el más importante actualmente debido a las implicaciones de sus primeros resultados. (66)

El ensayo KEYNOTE 057 es un estudio fase II de brazo único en el que se utilizó pembrolizumab en pacientes con TVNMI no respondedores a BCG y/o pacientes con carcinoma in situ con o sin papilas. Para su inclusión en el estudio, los pacientes debían haber recibido tratamiento adecuado de BCG, según la definición de la FDA, y rechazar o no ser candidatos a una cistectomía radical. Posteriormente recibieron pembrolizumab 200 mg intravenoso cada tres semanas durante un máximo de dos años, o hasta el desarrollo de recurrencia, progresión o toxicidad significativa. El objetivo primario fue la tasa de respuesta completa. Los resultados iniciales del

ensayo se presentaron en febrero de 2019 y demostraron una tasa de respuesta completa del 38,8% a los tres meses. Tras la presentación de estos datos, el pembrolizumab recibió la aprobación de la FDA en enero de 2020. Posteriormente en ASCO-GU 2020, se presentaron resultados más maduros tras 28,4 meses de seguimiento, La tasa de respuesta completa fue del 40,6% y la duración media de la respuesta fue de 16,2 meses. Entre los 39 pacientes con respuesta completa, 18 (46,2%) tuvieron una respuesta completa de más de 12 meses de duración. Entre los 36 pacientes que se sometieron finalmente a una cistectomía radical, tres pacientes (8,4%) presentaron una enfermedad músculo-invasiva, mientras que 33 pacientes (91,6%) no presentaron un estadio patológico superior. Un 85% de los pacientes presentaron efectos adversos, pero únicamente en el 12,7% fueron grado III o IV.

Otro de los ensayos a destacar por haber presentado sus primeros resultados es el SWOG S1605 (67), el cual evalúa la respuesta con atezolizumab en pacientes con TVNMI no respondedores a BCG con o sin CIS. Se han presentado los primeros los resultados en los pacientes del grupo con CIS. El 41% de los pacientes presentó respuesta completa a los 3 meses y el 26% a los 6 meses. El 83% de los pacientes presentaron algún tipo de toxicidad, siendo un 12,6% de tipo III o IV. Concluyen comunicando que la eficacia a los 3 meses parece ser comparable entre atezolizumab y pembrolizumab.

#### B) Pacientes sin tratamiento previo con BCG

En este subgrupo de pacientes todavía no existe ningún tratamiento inmunoterápico aprobado, estando actualmente en desarrollo 5 ensayos clínicos de los cuales no se han publicado aún resultados.

## 5.2) Tratamiento del TVMI

- **Neoadyuvancia:**

El tratamiento estándar para los TVMI es la cistectomía radical, pero la supervivencia de los pacientes sometidos a esta técnica es solo del 50% a 5 años, por lo que es necesario usar tratamiento neoadyuvante para el intento de mejora de estos resultados:

- **Quimioterapia:** Desde los años 80, se han venido utilizando regímenes de quimioterapia basada en cisplatino para el tratamiento neoadyuvante de los pacientes con TVMI. Múltiples ensayos clínicos fase III (68,69,70), demostraron la eficacia de este tipo de quimioterapia, no obstante era complicado sacar conclusiones al agruparlos, debido a las diferencias en sus criterios de inclusión y seguimiento (Cisplatino solo o asociado, estadios clínicos distintos, tratamiento definitivo distinto...)

Un metaanálisis, publicado en 2005 (71) con datos actualizados de pacientes de 11 ensayos aleatorizados (con una n de 3005 pacientes) demostró un beneficio de supervivencia significativo a favor de la neoadyuvancia con cisplatino. Uno de los metaanálisis más recientes (72), incluyó cuatro ensayos aleatorizados adicionales y utilizó los resultados actualizados de ensayos previos, confirmando los datos publicados anteriormente y mostrando una mejora de la supervivencia a los cinco años del 8%. Las respuestas patológicas completas tras la cistectomía ocurren en un 20-35% de los pacientes, y en aproximadamente el 50% de los casos se obtiene una reducción del estadio tumoral a enfermedad no músculo-invasiva (73)

En los estudios analizados, solo la quimioterapia combinada con cisplatino y al menos un agente quimioterapéutico adicional

produjo un beneficio terapéutico significativo (71). Las combinaciones probadas fueron metotrexato, vinblastina, adriamicina (epirrubicina) más cisplatino; cisplatino, metotrexato más vinblastina; cisplatino y metotrexato; cisplatino y adriamicina; cisplatino y 5-fluorouracilo (73).

La mayoría de los estudios de neoadyuvancia con quimioterapia, se han realizado en pacientes con TVMI de origen urotelial, no estando claro el beneficio de la misma cuando no son de esta histología, a excepción de los tumores neuroendocrinos que han demostrado mejora en la supervivencia global en estudios retrospectivos (74).

Teniendo en cuenta los datos anteriores, las guías europeas de urología recomiendan tratamiento neoadyuvante con quimioterapia en combinación con cisplatino a todo paciente (fit para quimioterapia) con TVMI T2-4 cN0 M0, con un grado de recomendación fuerte (75).

- **Inmunoterapia:** Están en marcha múltiples ensayos clínicos en neoadyuvancia con inmunoterapia en agente único, con 2 fármacos y en combinación con quimioterapia, pero a día de todavía no existe aprobación de los mismos. Se han publicado resultados del estudio fase II PURE 01 (76), en el cual se utiliza pembrolizumab con unos resultados prometedores (la tasa de pT0 fue del 37% y la tasa de pT ≤ 1 fue del 55%) y escasos efectos secundarios en comparación con la quimioterapia, así como los del ABACUS (77), utilizando en este caso atezolizumab con resultados similares al estudio anterior (tasa de pT0 del 31%).

- **Cistectomía radical:** Se considera el tratamiento estándar del TVMI (78), no obstante en los últimos años han surgido nuevas terapias basadas en quimioterapia y radioterapia para el intento de conservación vesical y por tanto de la mejoría de la calidad de vida de los pacientes, de lo cual hablaremos más adelante.
  - **Indicaciones:** La cistectomía radical está indicada con intención curativa en tumores T2-T4a, Nx, M0; TVNMI de alto riesgo y recidivantes o no controlables mediante RTU así como como tumores sin respuesta a BCG (79). También se puede realizar como terapia de rescate tras el fallo de la conservación vesical. Se utiliza en ocasiones como terapia paliativa en caso evolucionados (>T4a, M1) o pacientes muy añosos o con múltiples comorbilidades con sintomatología importante (hematuria incoercible, dolor...).

En lo que respecta al momento de la realización de la cistectomía se recomienda que no debe superar los 3 meses tras el diagnóstico de TVMI. Estos datos se han visto apoyados por varios estudios entre los que se encuentran uno realizado por Ayres y cols. (80) con 543 pacientes sometidos a cistectomía donde se observó un beneficio estadísticamente significativo en SG en pacientes intervenidos en los 90 primeros días tras el diagnóstico. Otro estudio con resultados similares, analizó los pacientes sometidos a cistectomía del programa estadounidense de vigilancia epidemiológica entre 1992 y 2001, llegando a la conclusión de que retrasar la cirugía más de 90 días tiene un impacto negativo en la supervivencia. (81).

- **Técnica:** En los hombres, la cistectomía radical estándar incluye la extracción de la vejiga, la próstata, las vesículas seminales, los uréteres distales y los ganglios linfáticos regionales. En las mujeres, la cistectomía radical incluye la extirpación de la vejiga, la uretra completa y la vagina adyacente, el útero, los uréteres distales y los

ganglios linfáticos regionales (82). En ambos sexos se realiza de tras la cistectomía y linfadenectomía una derivación urinaria ya sea abdominal, uretral o rectosigmoidea, en función de las características y prioridades del paciente.

Hemos comentado que la cistectomía incluye tanto en hombres como en mujeres una linfadenectomía estándar de los ganglios linfáticos regionales (implica la los ganglios iliacos internos, presacros, obturador interno, iliaco externo y cranealmente hasta la bifurcación iliaca común). No obstante, no se conoce el alcance óptimo de la linfadenectomía y si esta debe hacerse de forma más extendida (incluyendo los ganglios hasta la bifurcación aortica en el caso de la extendida y llegando hasta la arteria mesentérica inferior en la superextendida) (83,84). Un reciente metanálisis incluyó estudios con mas de 19.000 pacientes concluyó que a pesar de la heterogenicidad de los datos se evidenciaba que cualquier tipo de linfadenectomía es mejor que no realizarlas, así como que la extendida parece ser superior en términos en supervivencia frente a la estándar sin encontrar diferencias con la superextendida (85). Un estudio prospectivo fase III del año 2019 con 401 pacientes no demostró ventajas en SLP, SG y tasa de recurrencia de la linfadenectomía extendida sobre la estándar (86). Por tanto y hasta la publicación de nuevos estudios, se recomienda por parte de las guías europeas de urología con grado de recomendación fuerte la realización de linfadenectomía (al menos estándar) (75).

La cistectomía radical puede realizarse de forma abierta, por laparoscopia y asistida por robot. Clásicamente la técnica estándar era abierta, pero con la llegada de la cirugía mínimamente invasiva primero con la laparoscopia y posteriormente con el robot, ha hecho que cada vez más centros se decanten por estas dos últimas técnicas. Existen multitud de estudios comparando las técnicas, realizando Novara y cols. (87) en metanálisis en 2015 con la evidencia disponible

hasta ese momento, concluyendo que la técnica asistida por robot puede proporcionar algunas ventajas términos de pérdida de sangre, tasa de transfusión, estancia hospitalaria y complicaciones postoperatorias sobre la técnica laparoscópica y abierta, teniendo la ventaja la técnica abierta de menor tiempo operatorio (influyendo en este parámetro de forma importante la habilidad y curva de aprendizaje del urólogo). En lo que respecta a resultados oncológicos, ha sido publicado recientemente el ensayo clínica aleatorizado de no inferioridad fase III RAZOR, que comparaba la SLP a 2 años y la seguridad entre la cistectomía abierta y la asistida por robot. Observaron tras incluir a 350 pacientes en el estudio que la SLP a 2 años con la técnica robótica fue de 72,3% (IC al 95% de 64,3% a 78,8) frente al 71,6% de la técnica abierta (IC al 95% de 63,6% a 78,2) siendo estos resultados estadísticamente significativos ( $p < 0,001$ ), indicando por tanto la no inferioridad de la técnica robótica. Así mismo, tampoco existieron diferencias significativas en las complicaciones. (88)

- **Técnica multimodal de preservación vesical (TMPV):** Este tipo de tratamiento combina RTU, radioterapia tras la misma para el control local y ganglionar así como quimioterapia concomitante para potenciación de la radioterapia y eliminación de las micrometástasis. No existen estudios aleatorizados que comparen adecuadamente los resultados de la cistectomía radical y la TMPV, por lo que la cistectomía radical continúa siendo el tratamiento estándar para pacientes con TVMI.
  - **Indicaciones:** Se puede realiza en pacientes que no son candidatos a cistectomía, más de manera paliativa que curativa; y por otro lado y en donde la técnica tiene más sentido, en pacientes que no desean cistectomía para intentar mejorar su calidad de vida, siendo condición importante para el éxito de la técnica que sean tumores de pequeño tamaño T2, sin componente de Cis y con ausencia de hidronefrosis. (89)

- **Técnica:** El tratamiento TMPV, incluye una RTU del tumor de la vejiga lo más completa posible, seguida de radioterapia con quimioterapia concomitante. Un programa de radioterapia estándar incluye radiación sobre la vejiga y los ganglios linfáticos pélvicos limitados a una dosis inicial de 40 Gy, con un refuerzo de toda la vejiga a 54 Gy y un refuerzo adicional del tumor a una dosis total de 64-65 Gy. La quimioterapia suele utilizar el cisplatino y la mitomicina C más 5-fluorouracilo. Se debe realizar una nueva RTU con biopsia tras completar el TMPV, para identificar lo antes posible a los pacientes no respondedores para ofrecer cistectomía radical de rescate. La SLP a 5 años y la SG varían del 50% al 82% y del 36% al 74%, respectivamente según las series, con tasas de cistectomía de rescate del 25-30%. No hay datos definitivos que respalden el beneficio del uso de quimioterapia neoadyuvante o adyuvante. Es fundamental para obtener buenos resultados la selección adecuada de pacientes (90).
  
- **Adyuvancia:** Existen datos limitados acerca de si la adyuvancia con quimioterapia en pacientes T3/T4 o N+, aporta mejoría en SG frente a la quimioterapia tras progresión de la enfermedad. En uno de los metanálisis más recientes, se incluyen 9 ensayos aleatorizados con 945 pacientes, llegando a la conclusión de que existe un beneficio en SLP y SG en los pacientes que reciben quimioterapia adyuvante (91). No obstante, el nivel de evidencia es bastante bajo debido a la heterogenicidad y metodología de los ensayos incluidos por lo que las guías europeas de urología, recomiendan ofrecer el uso de la quimioterapia adyuvante solo si no se ha pautado quimioterapia neoadyuvante (75). Existen varios estudios con inmunoterapia (con nivolumab, atezolizumab y pembrolizumab), pero no se han publicado resultados a día de hoy.

### 5.3) Tratamiento de la enfermedad metastásica

Aproximadamente un 15% de los pacientes con un TVMI presentarán metástasis en el momento del diagnóstico y un 50 % de los intervenidos mediante cistectomía desarrollarán metástasis (92). Debemos saber que antes de la aparición de la quimioterapia basada en cisplatino, la supervivencia media de estos pacientes era de entre 3 y 6 meses (93), no obstante la inmunoterapia ha irrumpido con fuerza en este estadio de la enfermedad mejorando aún más los resultados de la quimioterapia con menores efectos secundarios.

- **Primera línea de tratamiento**

En la actualidad tenemos dos tipos de tratamiento en primera línea, por un lado la quimioterapia basada habitualmente en una combinación de cisplatino en pacientes fit para este tratamiento (definido por la EORTC como pacientes con una tasa de filtrado glomerular mayor a 60 ml/min y ECOG menor o igual a 2) o bien quimioterapia sin cisplatino o inmunoterapia en pacientes unfit.

Existen 2 tipos de terapia basadas en cisplatino que se utilizan como primera línea de tratamiento. En primer lugar la combinación de metotrexate, vinblastina y adriamicina con cisplatino (MVAC) que demostró en un ensayo fase III con 405 pacientes una mediana de SLP de 7,7 meses y de SG de 15,2 meses, frente a la combinación alternativa de gemcitabina y cisplatino con una SLP de 8,3 meses y de SG de 14 meses siendo la comparación de resultados no estadísticamente significativa (P: 0,66 para la SLP y P: 0,53 para la SG) (94). Hemos visto por tanto que ambas combinaciones son eficaces, por lo que la menor tasa de toxicidad de gemcitabina con cisplatino, ha hecho que actualmente sea el estándar de tratamiento (95). Se ha propuesto añadir paclitaxel a la combinación cisplatino y gemcitabina, pero los resultados de un estudio fase III con 626 pacientes que comparaba ambos regímenes no demostró diferencias significativas en supervivencia, aunque sí se observó una mejor tasa de

respuesta objetiva (55% vs 43,6%, p:0,031) para la combinación que incluía paclitaxel, sin aumento de la toxicidad (96).

En pacientes unfit para cisplatino, que son aproximadamente el 50% de todos los que se tratan (97), antes de la irrupción de la inmunoterapia y actualmente cuando no son candidatos a la misma (PD-L1 negativo) se utilizan los esquemas basados en carboplatino como son metotrexate, carboplatino y vinblastina (M-CAVI) o bien carboplatino con gemcitabina. Ambos esquemas han demostrado en ensayos fase II y III que los comparaban eficacia y perfil de toxicidad similares, por lo que son utilizados para el tratamiento en esta fase de la enfermedad (98).

Recientemente han sido publicados los resultados del estudio fase III JAVELIN Bladder 100 que comparaba aplicar terapia con avelumab (anti PD-L1) con cuidados estándar frente a cuidados estándar en pacientes que habían recibido quimioterapia con cisplatino o carboplatino en primera línea y no habían progresado. El objetivo primario fue la SG en toda la población y en los pacientes PD-L1 positivos. Se aleatorizaron 700 pacientes, obteniendo una mediana de SG en población total en el grupo de avelumab de 21,4 meses frente a 14,3 meses del grupo control (HR 0,69 con IC al 95% de 0,56 -0,86, p:0,001) (99). En pacientes PD-L1 positivos, los resultados incluso mejoraron a los de la población general. Por tanto y tras la publicación de estos resultados, tanto la FDA como la EMA han autorizado el uso de avelumab para su aplicación como terapia de mantenimiento tras en pacientes con enfermedad estable tras quimioterapia de primera línea.

Como hemos comentado anteriormente, han sido aprobados varios tratamientos inmunoterápicos, pembrolizumab (anti-PD1) y atezolizumab (anti PD-L1), en pacientes unfit para cisplatino con PD-L1 positivo en el tumor. Pembrolizumab fue aprobado tras la publicación del ensayo fase II KENOTE 052 con 370 pacientes en un solo brazo, donde se observó una tasa de respuesta objetiva del 29% y una remisión completa en el 9% (100). En

el caso de atezolizumab, el estudio que dio lugar a su aprobación fue el IMvigor 210, ensayo fase II con brazo único y 123 pacientes, siendo en este caso la tasa de respuesta objetiva del 23% y de remisión completa del 9% (101).

- **Segunda línea de tratamiento**

En los últimos años la inmunoterapia también ha irrumpido con fuerza en la segunda línea de tratamiento de los tumores vesicales metastásicos. No obstante, la quimioterapia sigue vigente en aquellos pacientes que han progresado en primera línea tratamiento a inmunoterapia. Suelen utilizarse regímenes basados en paclitaxel y gemcitabina o incluso cisplatino sin ser fit para el mismo (102). Estos tratamientos se basan en estudios con pocos participantes y poca evidencia ya que no son muchos los pacientes que llegan a estas fases y muchas veces son candidatos a entrar en ensayos clínicos.

Nos encontramos por otro lado con pacientes que han recibido quimioterapia en primera línea, siendo en este caso candidatos a inmunoterapia en esta segunda línea de tratamiento. Múltiples moléculas han demostrado su eficacia como han sido pembrolizumab, atezolizumab, nivolumab, durvalumab (anti PD-L1) y avelumab; no obstante y debido a su mayor grado de evidencia por basarse su aprobación en un estudio fase III, el pembrolizumab es el más recomendado por las guías europeas de urología en esta fase del tratamiento (75). En dicho estudio fase III, se incluyeron 542 pacientes que recibieron pembrolizumab o quimioterapia en segunda línea de tratamiento. La SG alcanzada fue de 10,3 meses (IC del 95% de 8-11,8 meses) en el grupo de pembrolizumab, frente a 7,4 meses (IC del 95% de 6,1-8,3 meses) en el grupo de quimioterapia ( $p:0,002$ ), siendo estas diferencias a diferencias de lo que ocurría en primera línea, independiente de la expresión de PD-L1 del tumor (103). Posteriormente se analizó si existían diferencias en la calidad de vida reportada por los pacientes de este estudio entre ambos grupos, dando como resultado que se

producía una estabilidad o mejora de la calidad de vida en el grupo de pacientes tratados con pembrolizumab, mientras que en el grupo de pacientes que recibieron quimioterapia la calidad de vida disminuía a lo largo del tratamiento (104).

## **6) Respuesta inmune antitumoral**

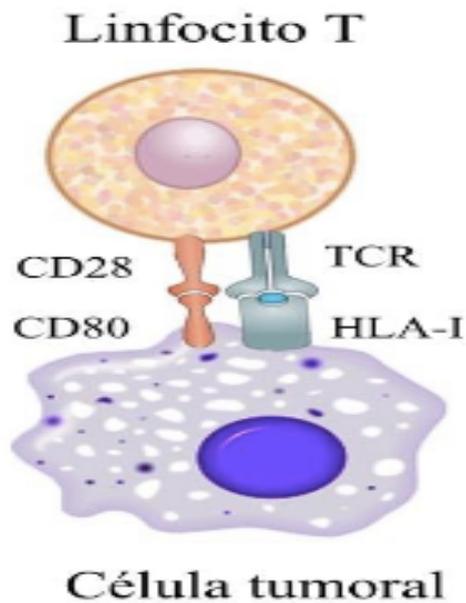
Como se ha comentado previamente en el tema anterior del tratamiento de los tumores vesicales, la inmunoterapia esta cada vez más en auge como alternativa de tratamiento en diferentes puntos de la enfermedad, debido a los avances que se han venido desarrollando los últimos años en este campo. Así mismo, en las ultimas décadas, han aparecido evidencias de la importancia del sistema inmune en el desarrollo del cáncer, de manera que en un primer momento el sistema inmunitario puede combatirlo para que no se desarrolle, mientras que si se produce una disminución por cualquier causa de la funcionalidad del mismo, el tumor puede crecer y descontrolarse (105).

Cuando un tumor se desarrolla, el sistema inmune se expone a antígenos nuevos que suelen aparecer por anomalías genéticas, por lo que nuestra inmunidad puede reconocer y eliminar algunos tumores al principio de su desarrollo. Esta idea fue desarrollada de forma primaria en los años 60 y 70 por Burnet proponiendo el concepto de inmunovigilancia del cáncer describiendo que el sistema inmunológico del huésped reconoce los antígenos de los tumores que surgen y los elimina antes de que se vuelvan clínicamente evidentes, siendo los linfocitos claves en este proceso (106). Durante estos años, Thomas también puso su grano de arena al concepto de inmunovigilancia, teorizando que los organismos complejos de larga vida deben poseer mecanismos para protegerse contra enfermedades neoplásicas similares a los que median los rechazos de homoinjertos (107). Posteriormente, surgieron evidencias en contra de esta teoría como el trabajo desarrollado por Stutman en 1974, en el cual no apreciaba diferencias en la aparición de cáncer en ratones atímicos en comparación con normales de tipo salvaje, siendo los únicos tumores más frecuentes en los inmudeprimidos los mediados por virus (108).

Un punto importante de la respuesta inmune antitumoral es conocer cómo el sistema inmunológico puede reconocer las células cancerosas y distinguirlas de las células normales. Las células tumorales, poseen una serie de alteraciones en genes que codifican proteínas que el sistema inmune reconoce llamados antígenos

específicos de tumores, pero al mismo tiempo también expresan otro tipo de antígenos llamados asociados a tumor que también pueden expresarse en células sin tumor evitando así que el sistema inmune pueda reconocerlas (109,110).

Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), también denominado en humanos como antígeno leucocitario humano (HLA) desempeñan un papel crucial en la interacción de las células tumorales con el sistema inmunitario del huésped, ya que puede identificar los diferentes tipos de antígeno y presentarlos a los linfocitos T citotóxicos (LTC) o CD8+. Las moléculas del CMH-I se expresan en la superficie de las células diana y son reconocidas por el receptor de células T (TCR) de los LCT, CD8 +. Cuando este reconocimiento ocurre junto con moléculas coestimuladoras, como la que se establece entre CD28 y CD80, los LCT se activan (Figura 1) y conducen a la destrucción de las células cancerosas. (111)



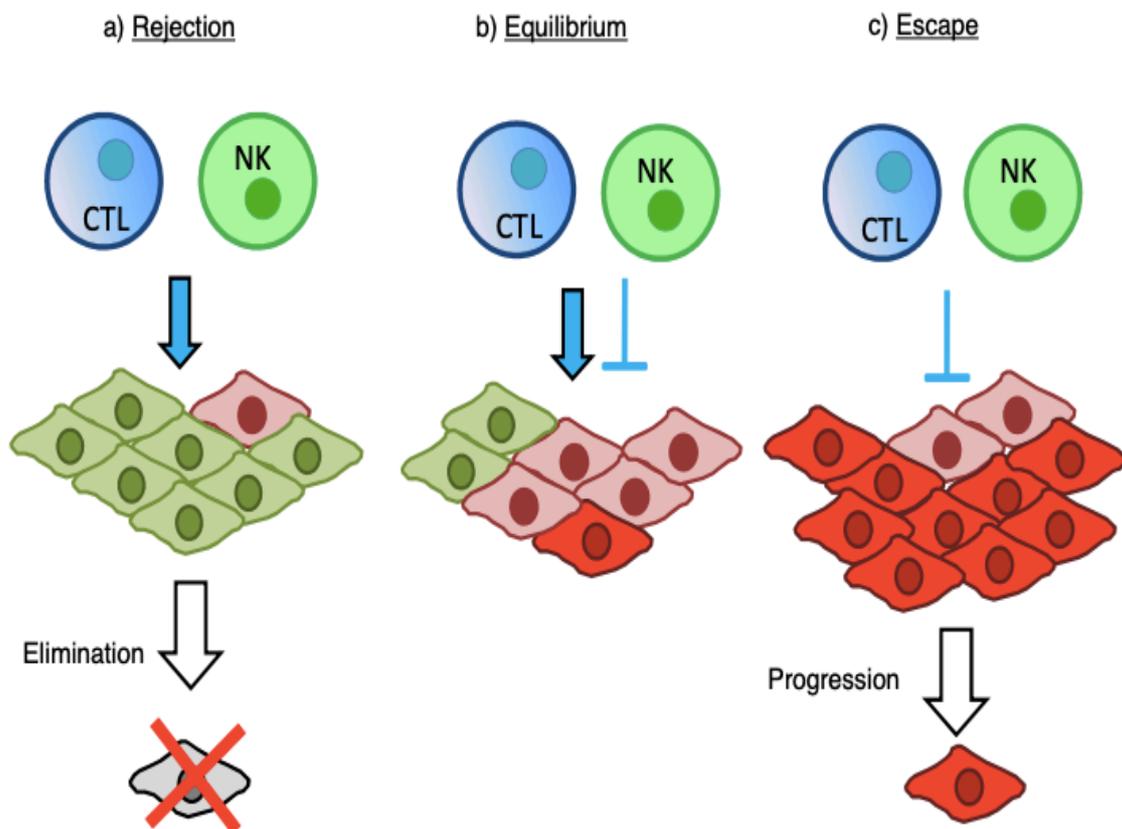
**Figura 1: Reconocimiento de la Célula tumoral por el LTC.** Reconocimiento por el linfocito T de la célula tumoral a través del complejo HLA-I -TCR, y activación del mismo mediante moléculas coestimuladoras CD28-CD80.

Las células natural killer (NK) son linfocitos del sistema inmune innato que pueden eliminar células tumorales al igual que ocurría con los LTC. Las células NK expresan el receptor NKG2D un receptor que reconoce moléculas conocidas como ligandos NKG2D, que en humanos incluyen el reconocimiento de MIC-A, MIC-B, ULB, que son proteínas de tipo CMH-I modificadas y que se encuentran en células tumorales y no en células normales. Tras este reconocimiento, las células NK son capaces de destruir las células tumorales (112,113,114).

A pesar de los trabajos presentados anteriormente, que muestran evidencias del concepto de inmunovigilancia, los tumores aparecen y se desarrollan en pacientes sanos no inmunodeprimidos, por lo que parece que es insuficiente para explicar las complejas interacciones que se producen entre el sistema inmunológico y el tumor. A raíz de ello surgió el concepto de inmuoedición del cáncer, que ocurre cuando se produce una intensa inmunovigilancia que lleva a la destrucción de las células tumorales, pero al mismo tiempo se seleccionan las células tumorales menos inmunogénicas que pueden escapar de la vigilancia y desarrollarse (115).

La inmuoedición se puede dividir en 3 fases (116) (Figura 2): La primera fase se denomina eliminación mediada por la inmunidad innata y adaptativa, comentada previamente, donde el sistema inmune detecta y elimina células tumorales en estadios tempranos antes de que el tumor se vuelva clínicamente relevante (117). Si consiguen destruirse todas las células tumorales, la inmuoedición finaliza aquí, si no continua con la fase de equilibrio donde el sistema inmune controla el crecimiento tumoral, pero sin eliminar todas las células cancerosas, que quedan en un estado de latencia. Se promueve entonces la edición del tumor acumulando cambios y mutaciones en el DNA y en la expresión génica, alterando su fenotipo, de manera que se seleccionan aquellos de baja inmunogenicidad que son resistentes a las células del sistema inmune (118). Estas células seleccionadas, son las que consiguen pasar a la tercera etapa denominada escape, en la cual son capaces de crecer y progresar, creando posteriormente tumores clínicamente relevantes (119).

Esta fase representa la incapacidad del sistema inmune en eliminar las células tumorales, además de contribuir a la progresión tumoral seleccionando las células tumorales más agresivas (120).



**Figura 2: Fases de la Inmunoección:** A) En la primera fase de eliminación, las células y moléculas de inmunidad innata y adaptativa pueden eliminar el tumor en desarrollo y proteger al huésped del tumor. Sin embargo, si este proceso no tiene éxito, las células tumorales pueden entrar en un estado de equilibrio (b), donde pueden ser mantenidas en un estado de latencia y a su vez editadas por el sistema inmunológico seleccionando nuevas poblaciones de variantes tumorales. Estas variantes pueden eventualmente evadir el sistema inmunológico por una variedad de mecanismos y escapar a la inmunovigilancia (c). Adaptado desde: Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science. 2011 Mar 25;331(6024):1565-70. (116)

El escape inmunitario del tumor lleva a una mala progresión y un fallo en la inmunoterapia del cáncer (121). Las células tumorales han desarrollado múltiples mecanismos de escape inmunitario entre los que podemos encontrar la activación de células con actividad supresora (122), alteraciones de los antígenos tumorales, pérdida del HLA-I (123), pérdida de ligandos NKG2D (124), expresión de ligandos inactivadores de linfocitos como PD-L1 y CTLA-4 (125) ... En los siguientes puntos, trataremos algunos de las más importantes en el contexto de esta investigación.

## **7) Alteraciones del HLA-I**

Como se ha comentado anteriormente, se piensa que los LTC son los principales implicados en el reconocimiento de las células tumorales, pero necesitan reconocer los antígenos tumorales mediante el HLA-I que se puede encontrar en la superficie de las células tumorales. En caso de alteración de este sistema, no se podrían reconocer de forma correcta las células tumorales y por tanto podrían crecer y descontrolarse. Vamos a ver más en profundidad este tipo de mecanismo de escape a lo largo de este punto.

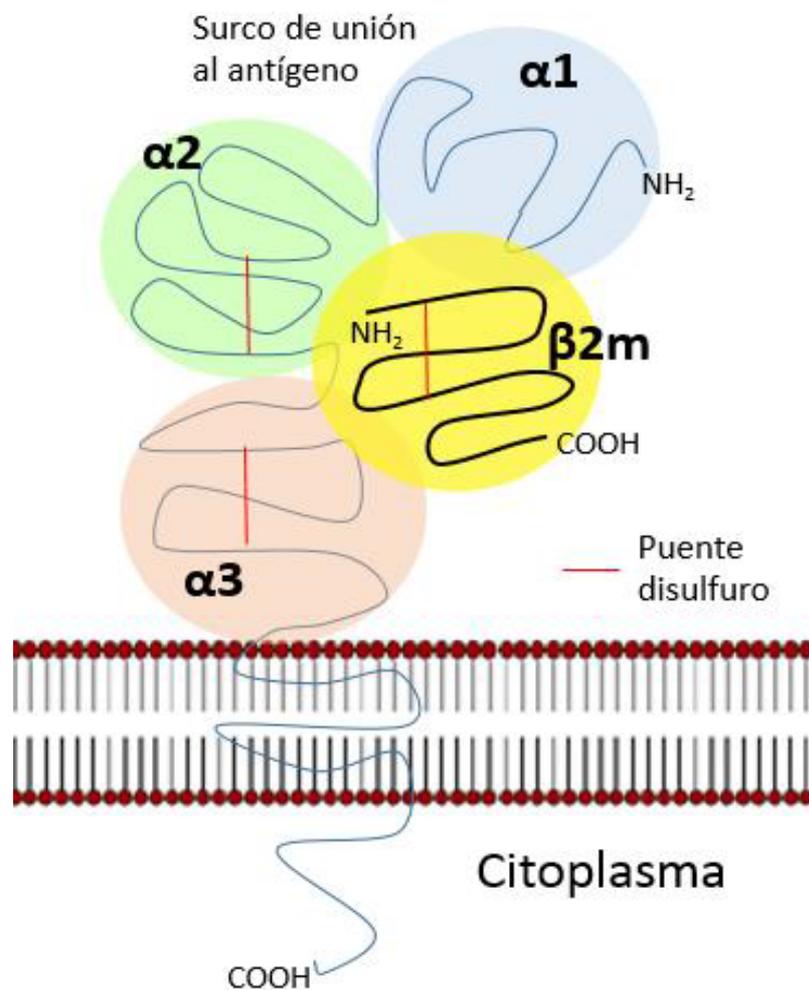
### *7.1 Estructura y función del HLA*

El CMH es el encargado de la presentación de antígenos a los linfocitos T y en la distinción inmunológica entre las células propias y extrañas. En los seres humanos, el CMH, también se conoce como HLA.

Existen dos grupos de moléculas de HLA: HLA de clase I (HLA-I) representada principalmente en humanos como HLA-A, HLA-B y HLA-C, y HLA de clase II (HLA-II), que incluyen HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. Las moléculas de HLA-I se expresan en todas las células nucleadas de los vertebrados, excepto en los espermatozoides; mientras que las moléculas de HLA-II suelen estar presentes en células presentadoras de antígeno como por ejemplo células dendríticas y fagocitos. El HLA-I está constituido por las moléculas clásicas o clase Ia, HLA-A, HLA-B y HLA-C (126) y no clásicas o clase Ib: HLA-E, HLA-F y HLA-G (127) similares a las clásicas, pero con diferentes funciones.

HLA-I es un heterodímero formado por una cadena pesada o alfa ( $\alpha$ ) de 45 KD (codificado por genes en el cromosoma 6) unido a una cadena ligera denominada  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m) de 12 KD (el gen se encuentra en el cromosoma 15). HLA-I se asocia con un péptido que proporciona estabilidad al complejo (128). La cadena pesada de HLA contiene 5 dominios en tres regiones: extracelular, transmembrana e intracitoplasmática. El dominio extracelular se divide en tres dominios ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3) con 90 aminoácidos cada uno. La cadena pesada es muy polimórfica,

especialmente en los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  que forman una región hipervariable que forma un surco de unión de péptidos. Esta región es reconocida por el TCR, mientras que el dominio  $\alpha 3$ , se une a la molécula CD8 de LTC. El complejo de la  $\beta 2m$  es reconocido por el TCR de los LTC, induciendo proliferación de citoquinas y la lisis de las células diana (130).



**Figura 3: Estructura del HLA-I:** Se observa la composición del HLA-I, formado por una cadena pesada dividida en tres dominios ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ) unido a una cadena ligera  $\beta 2m$ . Adaptado desde: Yang Y. Generation of major histocompatibility complex class I antigens. *Microbes Infect.* 2003 Jan;5(1):39-47. (129)

Las moléculas de HLA-II están formadas por dos cadenas, denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ , que forman un dímero en la superficie celular. Estas cadenas se unen a un péptido para proporcionar estabilidad al complejo, tal y como ocurría en el HLA-I, pero en este caso algo más grande. Como se ha comentado, el HLA-II, se expresa en células presentadoras de antígeno (Células dendríticas, linfocitos B, macrófagos, células endoteliales, linfocitos T activados y células tímicas), teniendo como principal función presentar péptidos a linfocitos CD4 + (131). Si estos linfocitos reconocen al péptido como extraño, inducirán la proliferación y activación de macrófagos y linfocitos B, que secretarán anticuerpos específicos contra el péptido.

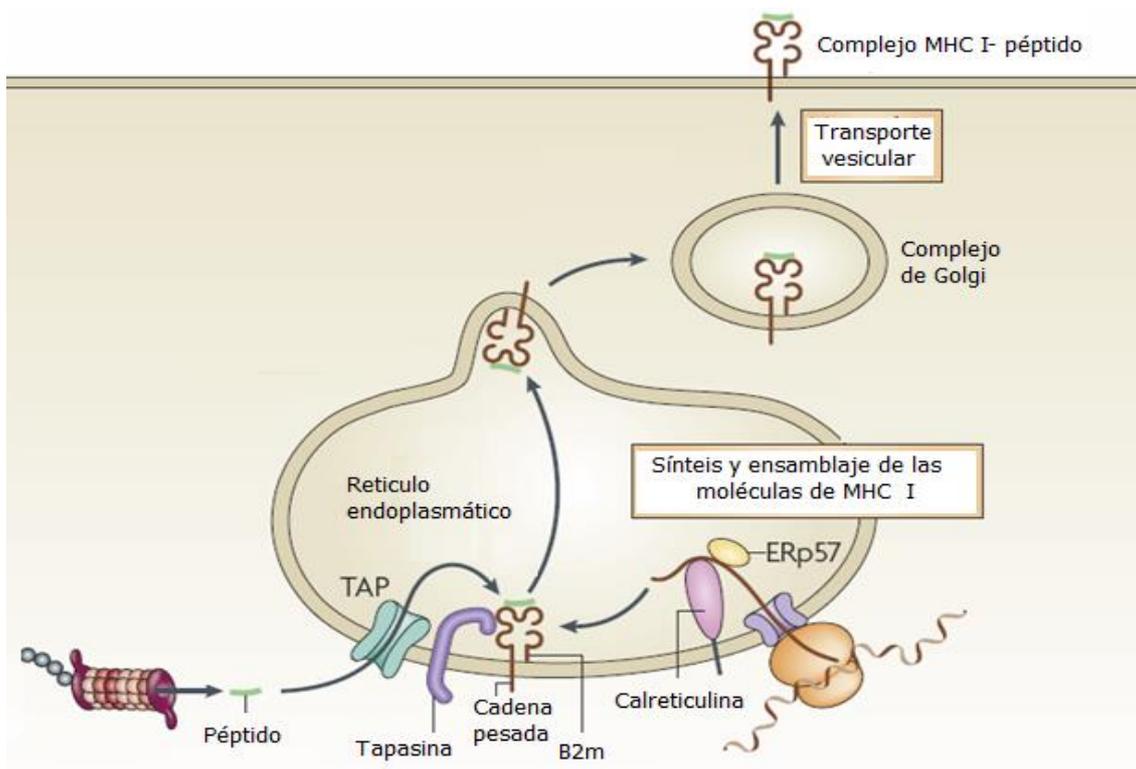
## *7.2 Pérdida de HLA-I y escape tumoral*

El HLA-I representa un mecanismo importante para la respuesta inmunológica contra el cáncer, debido a su implicación en el reconocimiento de células tumorales por LTC (132), siendo por tanto indispensables para la identificación y eliminación de células tumorales en etapas tempranas, y también responsable mediante el proceso de inmunoección de la selección de variantes inmunoresistentes. Se ha publicado en diferentes tipos de tumores (melanoma, vejiga, colorrectal, pulmón, mama renal...) una pérdida o disminución del HLA-I, lo que produce un escape tumoral, facilitando la el crecimiento y/o diseminación del tumor (123,133,134,135,136). Este sistema también es utilizado por diferentes tipos de virus para evitar ser reconocidos y posteriormente eliminados por el sistema inmune (137).

Como se ha explicado anteriormente, las alteraciones del HLA-I pueden ser diversas, desde su pérdida completa a diferentes tipos de pérdida parcial, estableciéndose varios tipos de fenotipos (138):

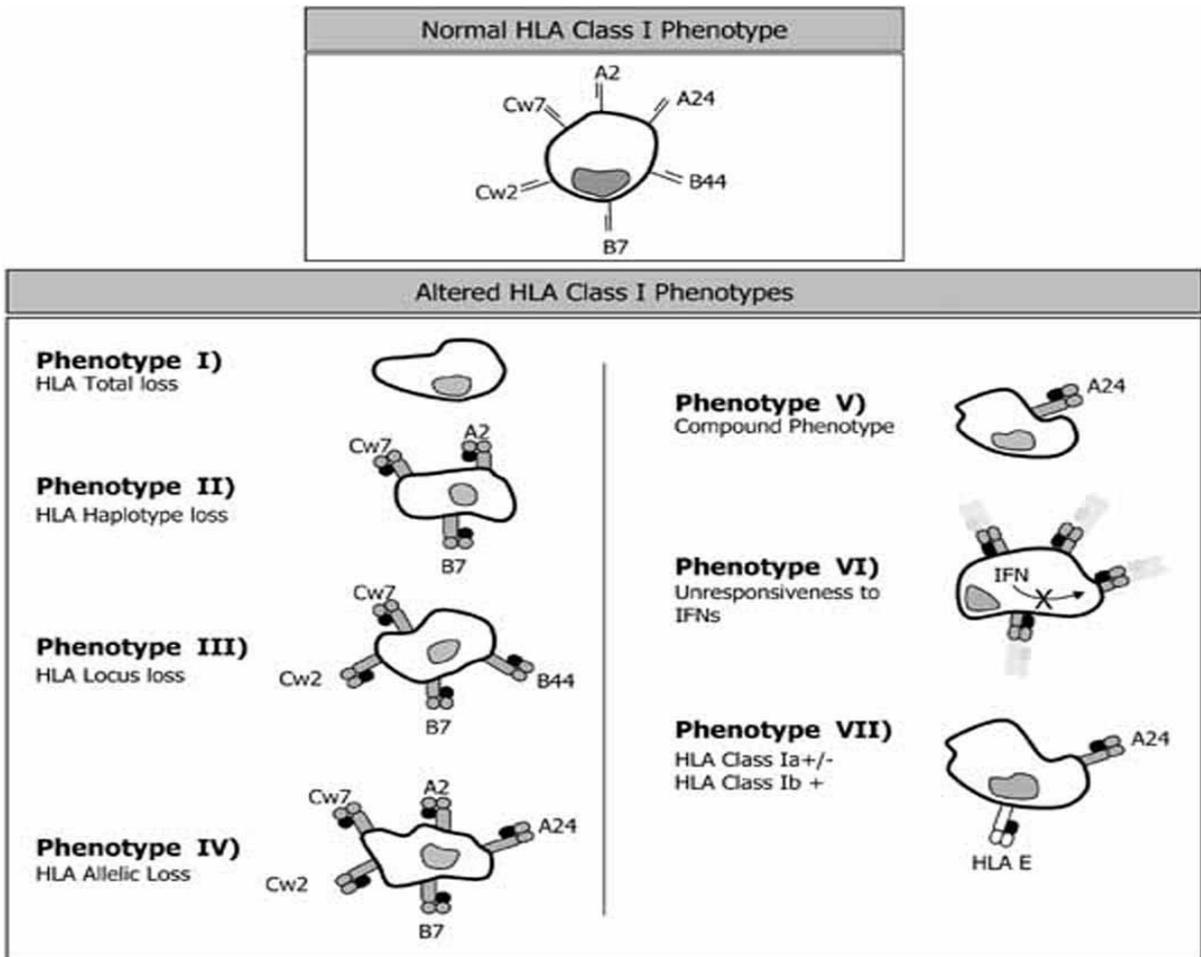
- Fenotipo I: Pérdida total de las moléculas HLA-I. Este fenotipo se caracteriza por la ausencia de cualquier expresión de antígeno HLA-I en las células

tumorales y está presente en diferentes grados en distintos tumores. Suele estar causado por defectos el gen que codifica a la  $\beta 2m$  y que resultan en la falta de expresión de una de las cadenas funcionales (139). Se produce por una inactivación bialélica del gen de la  $\beta 2m$ , resultado de una mutación de una copia del gen asociada a pérdida de otra copia en un proceso de pérdida de heterocigosidad. (140). Otra de las causas de la alteración del HLA-I se debe a una baja expresión o a una pérdida de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM) (Figura 4) (141). La pérdida o baja expresión del gen TAP1, que forma parte de la APM, se ha descrito como uno de los mecanismos implicados., pudiendo observarse en tumores de mama, colon, riñón, cérvix y próstata y en melanomas, con una frecuencia de mutación entre 10-84% (139,141).



**Figura 4: Maquinaria de procesamiento antigénico (APM):** Se representan los pasos necesarios para que se dé la expresión del MHC I a nivel de superficie, así como las moléculas involucradas. Adaptado desde: Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol.* 2008 Aug;8(8):607-18. (142)

- Fenotipo II: Pérdida del haplotipo HLA-I. Los tumores pueden perder parcial o totalmente uno de los dos haplotipos HLA presentes en la célula tumoral.
- Fenotipo III: Regulación a la baja del producto del locus HLA A, B o C. Este fenotipo alterado se encuentra cuando ambos productos de los loci HLA A, B o C están regulados negativamente de manera coordinada. La pérdida de expresión del locus de clase I se ha documentado en varios tumores.
- Fenotipo IV: Pérdida alélica de HLA. Esta alteración se define como la pérdida de un solo alelo HLA de clase I. Se requiere el uso de anticuerpos anti-HLA-I que definen alelos individuales de HLA-I para establecer este diagnóstico en los tejidos.
- Fenotipo V: Fenotipos complejos que representan una combinación de los 4 fenotipos anteriores. Para producir este fenotipo se requiere una combinación de dos alteraciones diferentes, por ejemplo, una pérdida de haplotipo HLA y una regulación negativa del locus HLA B – C (una combinación de los fenotipos II y III). El resultado final es una célula tumoral que expresa solo un alelo HLA -I.
- Fenotipo VI: Fallo de respuesta a Inteferon. Algunas células tumorales expresan niveles basales de antígenos HLA- I, pero han perdido la capacidad de regular positivamente estas moléculas en respuesta a diferentes citocinas, incluidos el interferón (IFN)  $\alpha$ .
- Fenotipo VII: Baja expresión de moléculas clásicas HLA Ia, con expresión aberrante de las no clásicas HLA Ib, es decir, Regulación a la baja de las moléculas clásicas de HLA A – B – C y aparición de moléculas HLA-E.



**Figura 5: Fenotipos alterados de HLA-I:** Las moléculas de HLA-I pueden estar total o parcialmente ausentes de las células tumorales (fenotipo I-fenotipo V). En algunos casos, las células tumorales no cambian la expresión de la HLA-I después del tratamiento con IFN (fenotipo VI). En otros casos, las células tumorales expresan moléculas HLA aberrantes junto con una expresión baja de antígenos HLA - A, -B o -C (fenotipo VII). Adaptada desde: Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol.* 2003 Jun;195(3):346-55. (138)

### 7.3 Defectos reversibles e irreversibles del HLA-I

Los diferentes fenotipos de HLA-I que se han descrito previamente, pueden ocurrir durante la síntesis, transporte o expresión de proteínas en la superficie celular o bien a niveles genético, epigénético, transcripcional y postranscripcional, representado diferentes tipos de defectos como mutaciones o alteraciones cromosómicas. Estas anomalías expresadas en la superficie celular de los antígenos HLA-I en líneas de células tumorales pueden detectarse mediante citometría de flujo utilizando un panel de anticuerpos específicos anti-HLA de clase I (143). La

utilización de anticuerpos monoclonales anti-HLA que definan determinantes específicos de locus o alelos, son necesarios, ya que como hemos visto en los diferentes tipos de fenotipos HLA-I, las células tumorales pueden perder todos o solo algunos alelos del HLA-I.

Los fenotipos alterados de HLA-I que se han descrito en tumores, se pueden definir también en líneas de células tumorales. Estas células se pueden tratar mediante inmunomoduladores (como IFN) u otros fármacos para intentar recuperar la expresión normal de HLA (144). Las células tumorales pueden regularse positivamente y que recuperan el HLA -I después del tratamiento, indican que tienen defectos estructurales reversibles. Por tanto, desde un punto de vista funcional, los fenotipos tumorales HLA alterados se pueden dividir en dos grupos: uno grupo con aquellos capaces de recuperar o regular al alza antígenos HLA-I después del tratamiento con citocinas y otro grupo con aquellos que no pueden recuperar la expresión de HLA-I. El primero podemos considerar que tiene una serie de alteraciones del HLA-I reversibles (también denominados “soft”), mientras que en el segundo grupo dichas alteraciones son defectos estructural irreversibles (también denominados “hard”) (145).

- **Defectos reversibles**

La regulación a la baja del HLA-I es causada frecuentemente por defectos a nivel de los genes de la cadena pesada HLA-I, el gen de la  $\beta 2m$  y los componentes de la APM (145). Los diferentes fenotipos de HLA-I, muestran niveles bajos de ARN mensajero de genes específicos (cadena pesada,  $\beta 2m$  y APM) que parecen estar coordinadamente regulados a la baja. Estos defectos son reversibles ya que pueden corregirse in vitro con IFN u otro tipo de citocinas (143).

Se han comunicado defectos reversibles a nivel de los locus HLA-A, HLA-B o HLA-C (147). Un ejemplo, lo encontramos en el estudio por Mendez y cols. (143) llevado a cabo en líneas celulares de melanoma donde se observó una regulación a la baja específica del HLA-I en el 35% de las líneas

celulares, que afecta principalmente a la expresión del locus B. En los tumores de melanoma, dicho defecto también se puede observar en frecuencias similares (136,149). Esta baja expresión del HLA-I puede regularse al alza después de tratamiento con IFN- $\gamma$ .

La regulación al alza mediada por IFN de los componentes de la APM conduce habitualmente a una expresión de superficie mejorada del HLA-I y mejora las respuestas de los LTC (149). Por tanto, representa una buena estrategia para el tratamiento de pacientes con alteraciones de la APM. Sin embargo, en algunos casos, los tumores siguen siendo insensibles al tratamiento con IFN a pesar de la falta de alteraciones estructurales en los componentes de APM, lo que sugiere una transducción de señal de IFN alterada (150).

Se ha encontrado que los cambios epigenéticos asociados con el desarrollo de tumores y con la progresión del cáncer son la base de los cambios en el HLA-I y en los componentes de APM. A diferencia de las alteraciones genéticas, las modificaciones epigenéticas pueden, en algunos casos, revertirse in vitro con agentes farmacológicos que inducen la hipometilación del ADN o inhiben la desacetilación de las histonas (151).

- **Defectos irreversibles**

La pérdida total de la expresión de HLA-I puede estar causada por diversos motivos como por ejemplo, mutaciones y defectos cromosómicos que involucran genes que codifican la cadena pesada del HLA o la  $\beta 2m$ . La pérdida de haplotipos se puede producir por la pérdida de heterocigosidad del cromosoma 6p21, lo que se ha observado en diferentes tipos de tumores como el colorrectal (152) y el de vejiga (153) con una mediana de incidencia del 35%. La pérdida de alelos de HLA-I de forma individual, define otro fenotipo causado por múltiples defectos genéticos los cuales pueden incluir mutaciones puntuales o deleciones (154).

Otro mecanismo con conlleva defectos irreversibles en la expresión del HLA-I es la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 15 (región del gen de la  $\beta 2m$ ) junto con la mutación en el otro gen homólogo. Este mecanismo irreversible se describió por primera vez en líneas celulares de linfoma (155) y posteriormente en melanomas (156), carcinomas colorrectales (157) y otros tipos de tumores (148). Esta lesión en el cromosoma 15 puede pasar desapercibida ya que las células tumorales pueden tener un patrón normal de HLA de clase I y podría representar uno de los primeros eventos en las células malignas que conducen a la generación de tumores precomprometidos para convertirse en variantes de escape. La coexistencia de diferentes mutaciones en los 2 genes de la  $\beta 2m$  es un hecho muy puntual que se ha comunicado en carcinoma colorrectal (158) y carcinoma renal sarcomatoide (159).

Las mutaciones en algunos componentes de la APM, es causante de algunos defectos irreversibles del HLA-I. La mutación TAP asociada con la pérdida de HLA-I, se ha descrito en el cáncer de pulmón (160) y en el melanoma (161). La resistencia a la regulación positiva mediada por IFN- $\gamma$  de la expresión de HLA-I también puede ser un mecanismo que produce variantes de escape tumoral. Es causado por defectos en los componentes Jak-STAT de la vía de señalización mediada por IFN (162).

#### 7.4 Alteraciones del HLA-I y cambios en la arquitectura tumoral

Se ha observado que la arquitectura del tejido tumoral cambia de forma drástica con la pérdida de HLA-I durante la progresión tumoral (163,164). En cáncer de pulmón, se ha demostrado que la expresión de HLA-I, esta fuertemente ligada a la infiltración linfocitaria y de macrófagos y a su organización en el tejido tumoral. Estos cambios en el HLA-I afectan al patrón de disposición de los linfocitos y a su localización dentro o fuera del área tumoral. Se han clasificado estos tipos de organización en dos fases, una primera fase permisiva con expresión de HLA-I positivo o heterogéneo con presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) y una

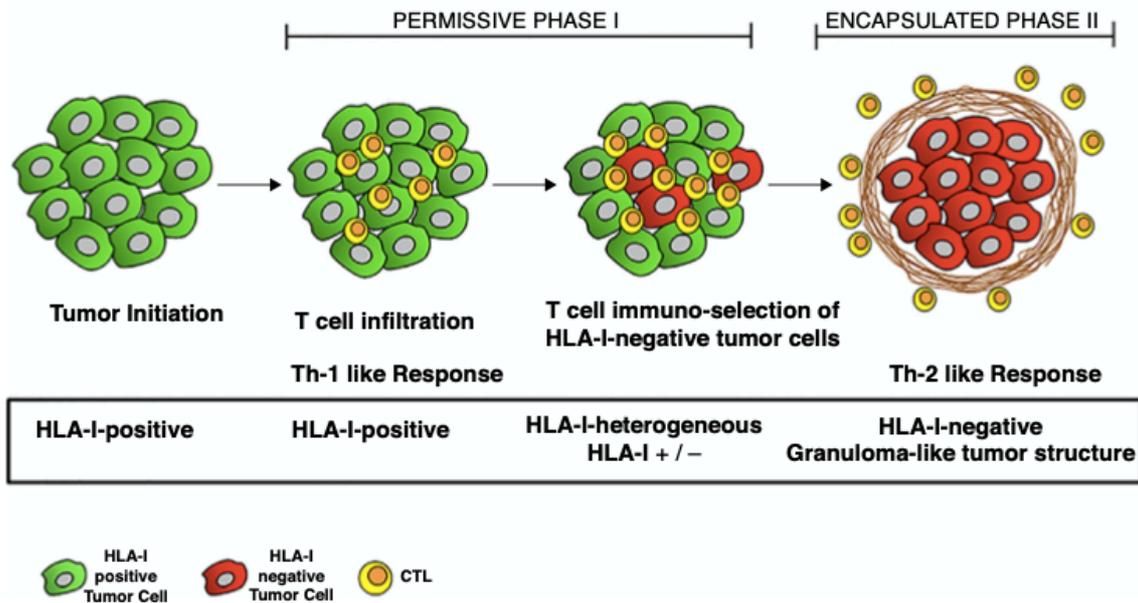
segunda fase no permisiva o encapsulada con expresión de HLA-I negativo y localización peritumoral de linfocitos y otras células inmunes. (164).

- **Fase I (Permisiva)**

Esta fase se produce cuando existe un tumor con expresión de HLA-I positiva o heterogénea, de manera que está fuertemente infiltrado por linfocitos (CD4+, CD3+, CD8+), macrófagos tipo 1 (clásicamente activados, con buena respuesta inmune) y otras células del sistema inmune, creando un microambiente tumoral permisivo, ya que los TILs y el resto de células están muy cerca unos de otros consiguiendo reconocer y destruir las células tumorales. Esta infiltración inmune es la responsable de la destrucción de las células tumorales con expresión de HLA-I positiva y por tanto la selección de las células con expresión de HLA-I negativa que son capaces de proliferar y hacer crecer el tumor (165). (Figura 6)

- **Fase II (No permisiva o encapsulada)**

La fase II se caracteriza por la falta de infiltración de células tumorales y una clara separación entre el tumor HLA-I negativo y las células del estroma HLA-I positivas. Se produce una baja actividad de los LTC sumado a ausencia de células NK de manera que las células tumorales inducen una reorganización del estroma y generan una estructura similar a un granuloma (respuesta similar a linfocitos T helper 2) (166). Todo lo anterior da como resultado un cambio en la arquitectura del tumor, generando nodos tumorales rodeados por diferentes tipos de linfocitos T, macrófagos tipo 2 (activados alternativamente, relacionados con el crecimiento y la progresión tumoral), fibroblastos y otras células del sistema inmune que proporcionan una barrera física y una estructura tisular no permisiva (164). (Figura 6)



**Figura 6. Cambios en la arquitectura tumoral durante la respuesta del sistema inmune:** En la fase I, el tumor está infiltrado por linfocitos T. El tumor en esta fase contiene células HLA-I positivas y HLA-I negativas. En la fase II, los linfocitos T han destruido a las células HLA-I positivas y terminan alrededor del tumor en la zona del estroma. En esta fase, las células tumorales son todas HLA-I negativas y están encapsuladas por el estroma. Adaptada de: Garrido F, Perea F, Bernal M., *et al.* The Escape of Cancer from T Cell- Mediated Immune Surveillance: HLA Class I Loss and Tumor Tissue Architecture. *Vaccines (Basel)*. 2017 Feb 27;5(1):7. (165)

### 7.5 Correlación clínico-patológica de las alteraciones del HLA-I

Se ha intentado correlacionar las alteraciones del HLA-I con el pronóstico del paciente en diferentes tipos de tumores, encontrando en muchas ocasiones resultados contradictorios. En cáncer de mama se ha encontrado que cuando no existe alteración del HLA-I aumenta la SLP (167) y que la regulación a la baja del HLA-I se asocia con factores pronósticos adversos (167); sin embargo en otro estudio se describen resultados contrarios con mejoría del pronóstico con cuando hay pérdida de expresión de HLA-I (169). En cáncer de pulmón encontramos resultados contradictorios similares, como el mejor pronóstico de cáncer de pulmón estadio IV cuando existe alteración del HLA-I al contrario de lo que ocurre en estadio I (170). En cáncer de vejiga se ha observado una mejoría de la SLP a 5 años en pacientes estadio T2 con HLA-I conservado (171), sin embargo las alteraciones del HLA-I no parecen asociarse a un empeoramiento de la progresión de la enfermedad (172).

Las contradicciones entre estos estudios pueden explicarse por varias razones. Una de las causas puede ser la utilización de parafina, que solo permite el uso unos pocos anticuerpos detectan solo la cadena pesada libre intracitoplasmática, pero no la expresión superficial de HLA-I. En otros casos, en los que se disponía de tumores criopreservados, el uso de anticuerpos, se limitó a detectar solo la pérdida total de HLA-I, mientras que no se estudiaron las pérdidas parciales. Además, existen diferencias en las técnicas con diferente grado de sensibilidad, como la inmunohistoquímica, diferentes clasificaciones del HLA-I o de patrones de etiquetado, que podría dar lugar a discrepancias en la interpretación de los datos (173).

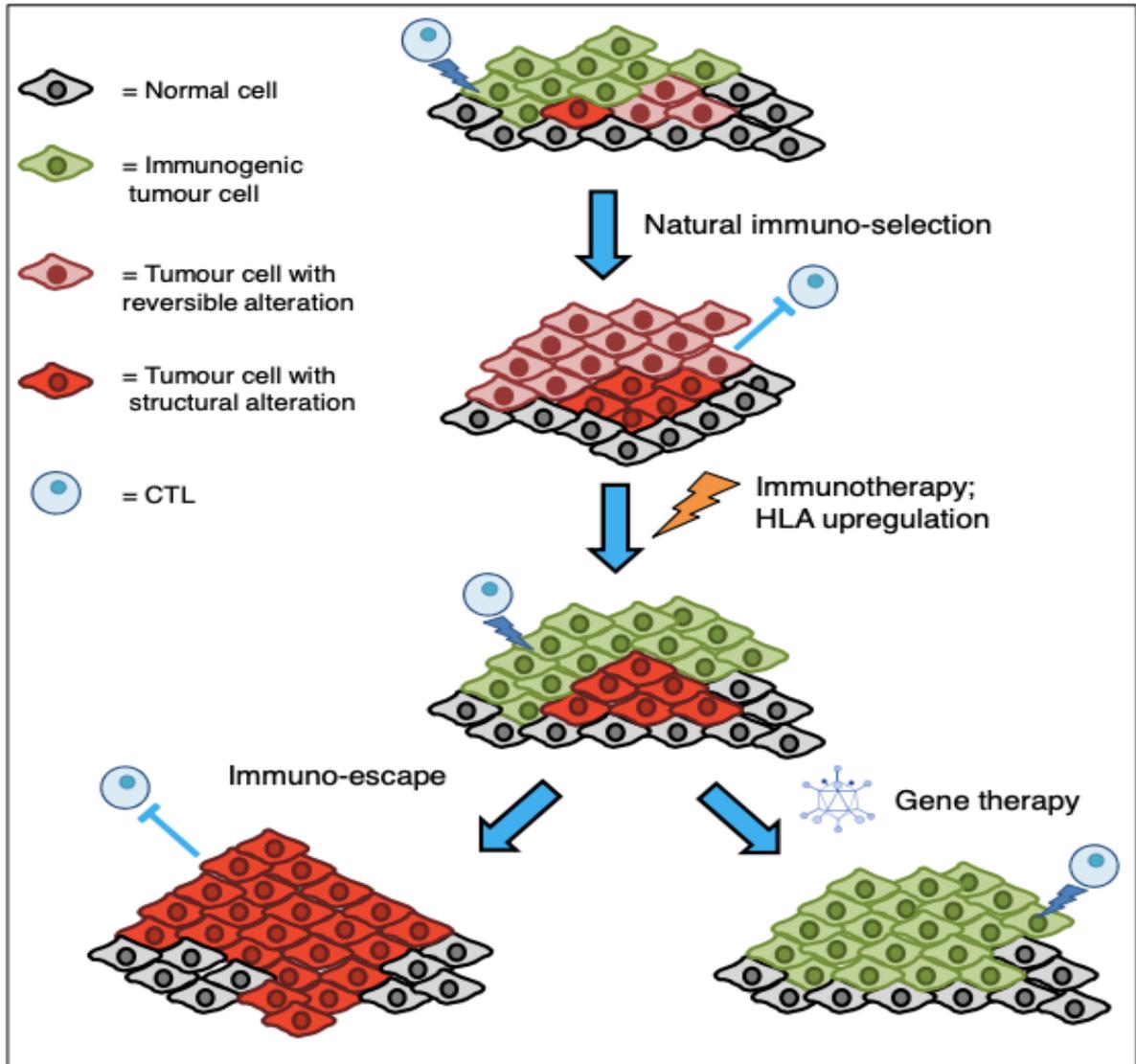
#### *7.6 Alteraciones del HLA-I y resistencia a inmunoterapia.*

Se ha adquirido un gran conocimiento sobre la prevalencia de los defectos del HLA-I y los mecanismos moleculares de los tumores. La expresión de antígenos asociados a tumores y el reconocimiento de estos por los LTC es muy importante para la destrucción de las células cancerígenas. La aparición de estos antígenos inició una nueva etapa de inmunoterapia destinada a aumentar la inmunogenicidad tumoral e inmunidad antitumoral mediada por linfocitos T, siendo las respuestas pesar de todo poco duraderas y por debajo de las expectativas creadas (174,175).

Con el paso de los años la comprensión de los mecanismos de escape inmunológico del cáncer y las complejas relaciones entre el sistema inmunitario y los tumores ha llevado a desarrollar nuevas técnicas de tratamiento basadas en tratamientos de combinación de quimio e inmunoterapia, inhibidores de inmunosupresión o de puntos de control... (125,176). La pérdida o baja expresión de HLA-I, conduce a una falta de reconocimiento de los antígenos asociados a tumor y por tanto un escape del mismo, por lo que los tratamientos encaminados a mejorar la respuesta inmune a este nivel pueden fallar y no ser efectivos.

La inmunoselección que se produce durante la progresión tumoral combinada con la actividad de la inmunoterapia, apoyan la propagación de tumores con diferentes mecanismos de escape entre los que se encuentra la pérdida a

regulación a la baja del HLA-I. La propia inmunoterapia puede producir un aumento de la regulación del HLA-I en algunas lesiones mejorando la respuesta antitumoral, pero no en otras donde los clones tumorales a pesar del tratamiento progresan (Figura 7) (177,178).



**Figura 7. Inmunoselección tumoral:** En condiciones normales, el sistema inmunológico reconoce y destruye las células tumorales con un perfil inmunogénico alto (HLA-I positivas habitualmente). Las células tumorales con bajo perfil inmunogénico (HLA-I negativos habitualmente), pueden progresar evitando ser destruidas por el sistema inmune. En ocasiones, el tratamiento con inmunoterapia aumenta la inmunogenicidad de algunas células tumorales (poseen alteraciones reversibles), promoviendo la respuesta del sistema inmune frente ellas. Sin embargo, las variantes de células tumorales con alteraciones irreversibles, pueden progresar en este contexto de escape tumoral. En este caso, la recuperación de los genes dañados mediante enfoques de terapia génica puede restaurar la inmunogenicidad del tumor y promover la respuesta de LTC. Adaptada desde: Schlom J. Recent advances in therapeutic cancer vaccines. Cancer Biother Radiopharm. 2012 Feb;27(1):2-5. (176)

La hipótesis previa, se ha podido comprobar en algunos tumores, como en melanoma y vejiga en los estudios realizados por Carretero y cols. (179,180). El primero de ellos, se realiza en pacientes con melanoma que reciben inmunoterapia, observando que en aquellos que no responden y progresan de forma metastásica, parecen tener una asociación con defectos irreversibles del HLA-I (179).

El segundo estudio está realizado en pacientes con TVNMI recurrentes, que han recibido previamente mitomicina o BCG, según las características de cada tumor. Se observaron respuestas con alteraciones más profundas del HLA- I (pérdida de heterocigosidad en los cromosomas 15 o 6) en los pacientes tratados con BCG que en los tratados con mitomicina. Así mismo se descubrió que las lesiones tras tratamiento con BCG mostraron una mayor incidencia de defectos estructurales comparado con mitomicina, lo que sugiere una inmunoselección inducida por la inmunoterapia orquestada por la pérdida de HLA-I. Se plantea pues, la hipótesis comentada previamente de que el sistema inmunológico activado por inmunoterapia reconoce y elimina las células tumorales con cambios de HLA clase I reversibles pero no las células transformadas con alteraciones adicionales irreversible (180). Por tanto, la restauración de la expresión normal de HLA -I con mutaciones en cadena pesada,  $\beta$ 2m, pérdida de haplotipos u otros defectos estructurales en genes HLA mediante terapia génica, puede convertirse en un enfoque interesante en el tratamiento de estos pacientes.

## **8) Inhibidores de puntos de control inmunitario (Immune checkpoint inhibitors) y otras moléculas del microambiente tumoral.**

Como se ha comentado anteriormente, los tumores adoptan distintos tipos de estrategias para poder evadir la vigilancia del sistema inmune y por tanto crecer y proliferar. Por tanto para restaurar la eficacia inmunitaria, se debe intentar revertir o anular los mecanismos de escape tumoral.

La inmunidad mediada por células T incluye múltiples pasos secuenciales: selección clonal de células específicas de antígeno, activación, proliferación, tráfico y ejecución de la función efectora directa. Cada paso está regulado por un equilibrio entre señales estimulantes e inhibitoras. Los puntos de control inmunitario son las vías inhibitorias que equilibran fisiológicamente las vías coestimuladoras para afinar las respuestas inmunitarias, es decir, señales capaces de detener la respuesta inmunitaria. Los puntos de control inmunitario, implican habitualmente receptores inhibidores y sus ligandos expresados en el caso de tumores por la célula tumoral y el linfocito T. En condiciones normales estos puntos de control inmunológico son muy importantes para el mantenimiento y modulación de las respuestas inmunitarias normales intentado no dañar tejidos sanos, pero la sobreexpresión de los mismos por las células tumorales produce disminución de la actividad inmunitaria de los linfocitos T (181).

Dado que una parte de los mecanismos de escape inmunológico tumoral utilizan puntos de control inmunitarios, se puede intentar restaurar la inmunidad mediante anticuerpos que bloquean la interacción inhibitoria del receptor-ligando y, por tanto, inactivan los puntos de control inmunitarios. Esta es la base de las nuevas terapias basadas en inmunoterapia y que está revolucionando en los últimos años el tratamiento frente al cáncer en diferentes tipos de tumor, consiguiendo excelentes resultados a nivel de tasas de respuestas, SLP y SG. Vamos a revisar los puntos de control inmunitario más frecuentemente utilizados como dianas en los tumores urológicos.

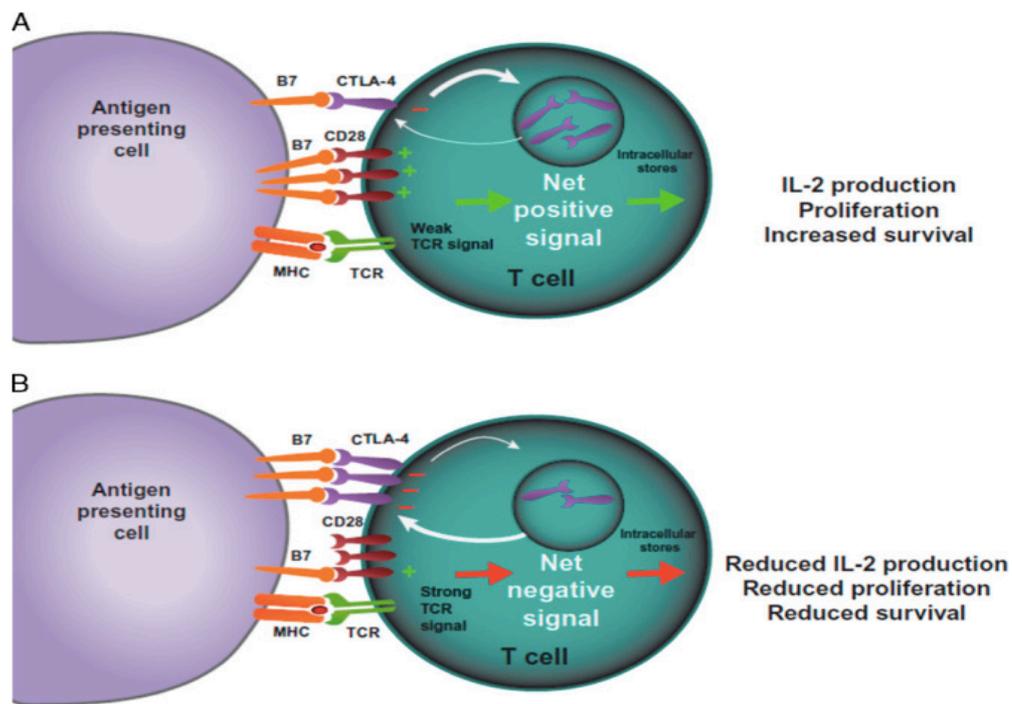
### 8.1 CTLA-4

La activación de linfocitos T requiere de forma habitual más de una señal estimuladora, destacando la unión de TCR a HLA y la de moléculas B7-1 (CD80) o B7-2 (CD86) en las células presentadoras de antígenos con moléculas CD28. Niveles suficientes de unión de CD 80-CD 28, conducen a la proliferación de linfocitos T, aumento de la supervivencia de los mismos y diferenciación a través de la producción de citocinas como interleucina-2 (IL-2), aumento del metabolismo energético y regulación positiva de genes de supervivencia celular.

El antígeno 4 asociado a los LTC (CTLA-4), también conocido como CD152, se expresa exclusivamente en linfocitos T. Uno de sus mecanismos de acción, implica la inhibición de las señales coestimuladoras mediadas por CD80-CD28, que se produce porque CTLA-4 tiene una afinidad mucho mayor por CD80 que CD28. Este mecanismo solo depende del dominio extracelular de CTLA-4 (182,183).

Un segundo mecanismo por el cual CTLA-4 puede inactivar las células T implica la entrega de una señal inhibitoria. En la mayoría de los casos, las acciones inhibitorias de CTLA-4 ocurren a través de su asociación con las tirosinas fosfatasa SHP1, SHP2 y PP2A (184). CTLA-4 se expresa mediante LTC, pero su principal papel fisiológico parece ser a través de distintos efectos sobre los linfocitos T CD4, incluida su regulación a la baja. El bloqueo de CTLA-4 da como resultado una amplia mejora de las respuestas inmunitarias. (Figura 7) (185).

Se han desarrollado fármacos consistentes en anticuerpos anti-CTLA4 para frenar su acción inhibitoria en diferentes tipos de tumores y mejorar las tasas de respuesta y supervivencia de los pacientes oncológicos. Entre ellos el más destacado y con más indicaciones actualmente es el ipilimumab, un anticuerpo monoclonal (IgG1 $\kappa$ ) anti-CTLA-4 completamente humano y producido en células de ovario de hámster chino mediante tecnología de ADN recombinante (187). Entre sus indicaciones terapéuticas a día de hoy encontramos el tratamiento del melanoma metastásico (188), el cáncer renal metastásico (189) o el cáncer colorrectal metastásico (190).



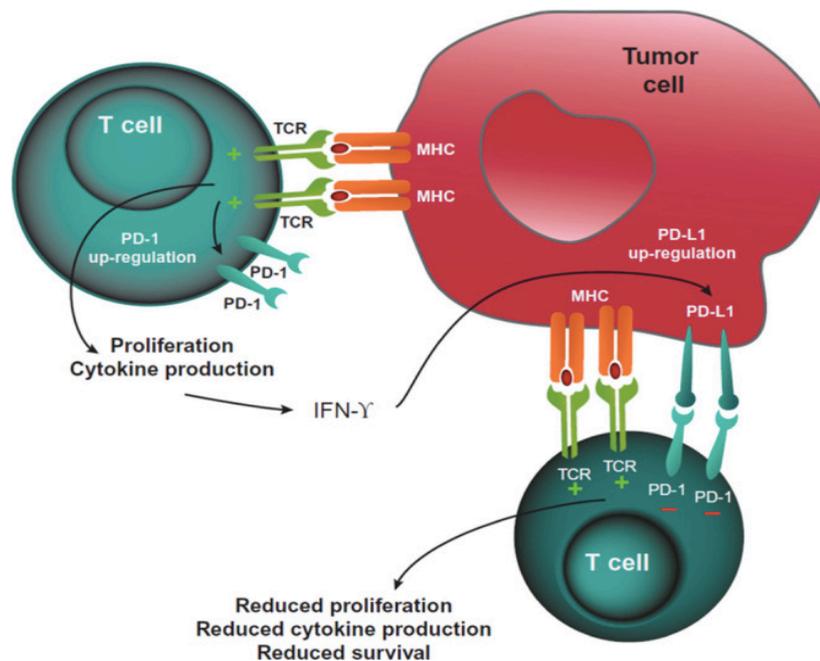
**Figura 8: Mecanismo de acción de CTLA-4:** Las células T se activan cuando los TCR se unen al antígeno mostrado en el MHC en las células presentadoras de antígeno en concierto con la coestimulación mediada por CD28-B7. A) En el caso de un estímulo de TCR débil, predomina la unión de CD28: B7, lo que da como resultado una señal de activación neta positiva y producción, proliferación y aumento de la supervivencia de IL-2. B) En el caso de un fuerte estímulo de TCR, la expresión de CTLA-4 se regula al alza mediante un mayor transporte a la superficie celular desde los depósitos intracelulares y una internalización disminuida. CTLA-4 compete con CD28 por la unión de moléculas B7. El aumento de la unión de CTLA-4- B7 puede resultar en una señal negativa neta, que limita la producción y proliferación de IL-2 y limita la supervivencia de la célula T. Adaptado desde: Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016 Feb;39(1):98-106. (186)

## 8.2 PD-L1 Y PD-1

La proteína inhibitoria transmembrana PD-1, se expresa más ampliamente que CTLA-4, pudiendo encontrarse en linfocitos T, linfocitos B, las células NK y células supresoras de origen mieloide. El bloqueo de PD-1, potencia la actividad de las células T efectoras y la actividad de las células NK en tumores y tejidos, y la producción de anticuerpos. El ligando 1 de PD-1 (PD-L1; también conocido como B7-H1 o CD274) y el ligando 2 de PD-1 (PD-L2; también conocido como B7-DC o CD273) son los dos ligandos de PD-1 (Figura 7) (191,192). La función principal de PD-1 es limitar la actividad de las células T en los tejidos periféricos en el momento

de una respuesta inflamatoria a la infección y limitar la autoinmunidad. Esto se traduce en un importante mecanismo de resistencia inmunitaria dentro del microambiente tumoral (193).

Si una célula T experimenta la unión coincidente de TCR y PD-1, las señales generadas por PD-1 reducen la activación de las células T y de la secreción de citocinas (194). La expresión de PD-1 es un sello distintivo células T "agotadas" que han experimentado altos niveles de estimulación. Este estado de agotamiento, que ocurre durante las infecciones crónicas y el cáncer, se caracteriza por la disfunción de las células T, lo que resulta en un control subóptimo de infecciones y tumores (195).



**Figura 9: Mecanismo de acción de PD1 y PD-L1:** Las células T que reconocen antígenos tumorales pueden activarse para proliferar, secretar citocinas inflamatorias y resistir la muerte celular. La estimulación prolongada de TCR durante una respuesta inmune en curso puede causar una expresión de PD-1 regulada al alza. Las células tumorales pueden expresar PD-L1 como consecuencia de citocinas inflamatorias y / o vías de señalización oncogénicas. La unión PD1- PD-L1 inhibe la señalización positiva mediada por TCR, lo que conduce a una disminución de la proliferación , una secreción de citoquinas reducida y una supervivencia menor. Adaptado desde: Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. Am J Clin Oncol. 2016 Feb;39(1):98-106. (186)

Se han desarrollado fármacos consistentes en anticuerpos anti-PD 1 y anti-PD-L1 para frenar su acción inhibitoria en distintos tumores y mejorar la supervivencia y respuesta de los pacientes oncológicos (Figura 9):

- **Nivolumab**

Nivolumab, es el primer anticuerpo monoclonal IgG4 humano contra PD-1, f aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), el 22 de diciembre de 2014, según el resultado de CheckMate-037. Este estudio demostró una mejora de la tasa de respuesta objetiva con mayor seguridad frente a quimioterapia en pacientes con melanoma avanzado o metastásico tras progresión a tratamiento con ipilimumab o con un inhibidor BRAF si el paciente mostrase esta mutación (196).

Posteriormente se han ido desarrollando distintos estudios en diferentes tipos de tumores y con ello nuevas indicaciones para su utilización, suponiendo toda una revolución en el tratamiento del cáncer. Entre sus indicaciones actuales encontramos el cáncer de pulmón tanto de célula no pequeña (197), como de célula pequeña (198), cáncer renal metastásico (199), linfoma no Hodking (200), tumor de cabeza y cuello metastásico (201), colorrectal (202), carcinoma hepatocelular (203) y tumores uroteliales metastásicos (204).

- **Pembrolizumab**

Pembrolizumab, es otro anticuerpo monoclonal IgG4 humano contra PD-1. Fue aprobado por primera vez el 4 de septiembre de 2014, tras demostrar una mejora de la tasa de respuesta objetiva del 24%, del ensayo clínico NCT01295827, en pacientes con melanoma metastásico refractarios a ipilimumab y al inhibidor BRAF si tenían esta mutación (205).

Tras esa primera aprobación, se han realizado nuevos estudios que han dado paso a múltiples nuevas indicaciones: cáncer de pulmón tanto de célula no pequeña (206), tumores de cabeza y cuello metastásico (207), linfoma de hodking (208), urotelial metastásico(100,103), gástrico o gastroesofágico (209), cérvix metastásico (210), hepatocarcinoma (211), renal metastásico (212).

- **Cemiplimab**

Cemiplimab es un anticuerpo monoclonal humano contra PD-1. Fue aprobado por la FDA el 28 de septiembre de 2018 para el tratamiento de pacientes con carcinoma de células escamosas cutáneo metastásico o localmente avanzado que no son candidatos para cirugía curativa o radioterapia (213).

- **Avelumab**

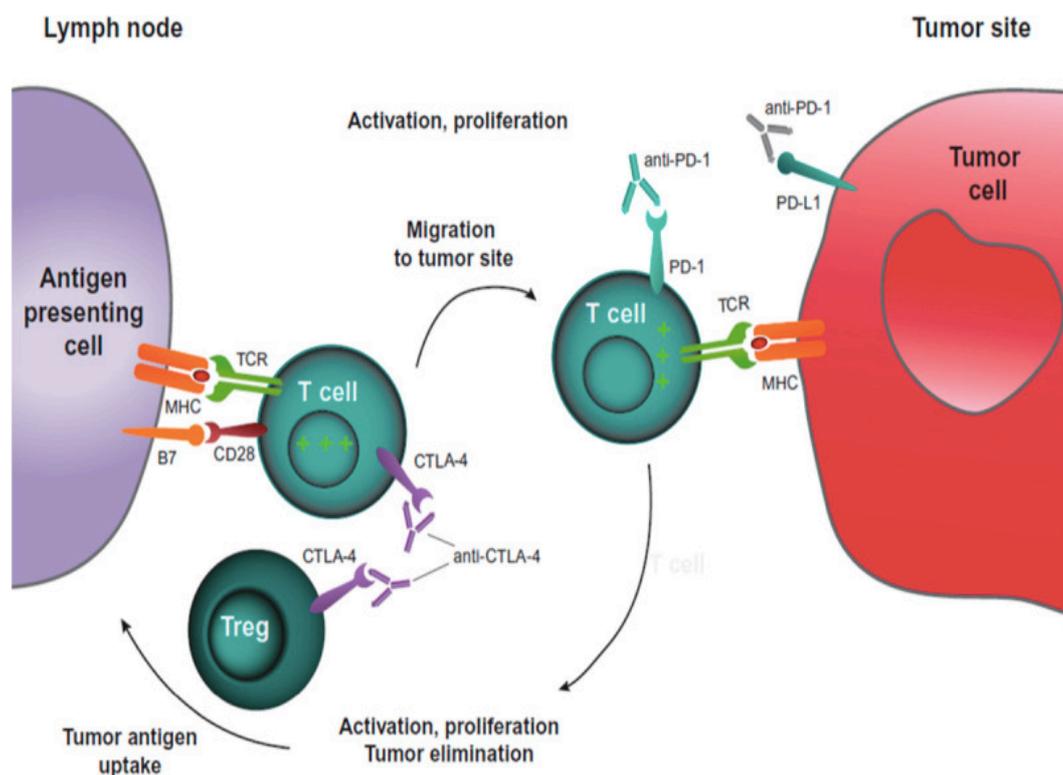
Avelumab es un anticuerpo monoclonal anti PD-L1, aprobado por la el 18 de noviembre de 2015 basado en el ensayo JAVELIN Merkel 200 para el tratamiento del carcinoma metastásico de células de Merkel (214). Posteriormente se ha ampliado su uso al tratamiento de tumores uroteliales metastásicos (99) y está en proceso de aprobación en cáncer renal (215).

- **Durvalumab**

Durvalumab es un anticuerpo monoclonal anti PD-L1 aprobado el 17 de febrero de 2016 por la FDA para el tratamiento de pacientes con cáncer de vejiga urotelial inoperable o metastásico en segunda línea de tratamiento (216). Fue aprobado posteriormente para el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico (217).

- **Atezolizumab**

Atezolizumab es un anticuerpo monoclonal anti PD-L1, aprobado el 18 de mayo de 2016 por la FDA para el tratamiento de pacientes con carcinoma urotelial localmente avanzado o metastásico gracias a los resultados del ensayo IMvigor210 (101). Posteriormente se ha aprobado su utilización para el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico metastásico (218), para el microcítico en combinación con quimioterapia (219) y para el cáncer de mama triple negativo en combinación con quimioterapia (220).



**Figura 10: Bloqueo de las vías CTLA-4 y PD-1.** El bloqueo de CTLA-4 permite la activación y proliferación de más clones de células T y reduce la inmunosupresión mediada por células T reguladoras. El bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 restaura la actividad de las células T antitumorales que se habían sido inactivadas. Adaptado desde: Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. Am J Clin Oncol. 2016 Feb;39(1):98-106. (186)

### 8.3 Otras moléculas del microambiente tumoral.

Existen otras múltiples moléculas del microambiente tumoral entre las que se encuentran diferentes tipos de inmunocheckpoints no comentados anteriormente, receptores de quimiocinas como CXCR-4 , que se sobreexpresa en más de 23 cánceres humanos y contribuye al crecimiento tumoral, invasión, angiogénesis, metástasis, recaída y resistencia terapéutica (221), más de 80 citocinas inmunosupresivas como interleuquina 10 o el factor de crecimiento transformante beta... que también son importantes y se deben tener en cuenta para un mejor entendimiento de la actuación del sistema inmune frente a los tumores.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El HLA-I es clave en el reconocimiento de las células tumorales por LTC y como se ha visto en la introducción la pérdida del mismo es un mecanismo de escape tumoral demostrado en múltiples tumores. Los tumores vesicales no son una excepción, existiendo varios estudios en relación a este mecanismo de escape tumoral aunque su relación con las características clínicas de los tumores no ha sido ampliamente estudiada.

Recientemente han surgido nuevos tipos de tratamiento basados en el bloqueo de diferentes puntos de control inmunitario para el tratamiento del cáncer, siendo los tumores vesicales uno de los más beneficiados con la llegada de estas nuevas terapias. No obstante tanto con este tipo de nuevas terapias como con los tratamientos ya conocidos, existen pacientes no respondedores y que no pueden beneficiarse de estos tratamientos sin conocer factores predictivos de respuesta.

No existen estudios que analicen el papel de la coexpresión de las moléculas tumorales HLA-I y PD-L1 / PD1 en la búsqueda de biomarcadores relacionados con la progresión y la respuesta al bloqueo de puntos de control en el cáncer de vejiga

Nuestra **hipótesis** radica en la importancia de la expresión del HLA-I tumoral para la progresión del cáncer de vejiga y para la eficacia de los inhibidores de los immune checkpoints (PD-L1/PD1), ya que sin presencia de HLA-I no importa el nivel de activación o de agotamiento de los LTC. Por tanto, las células T citotóxicas no podrán ser activadas y capaces de destruir células malignas si no tienen HLA-I con péptido antigénico tumoral en su membrana.

Se desarrollarán los siguientes **objetivos**:

1. **Análisis de la expresión del HLA-I** en muestras de TVNMI y TVMI, y su asociación con las características clínico-patológicas de los pacientes.

2. **Análisis del microambiente tumoral** realizando un estudio de diferentes poblaciones implicadas en la respuesta inmunitaria, incluyendo LTC que expresan CD3 y CD8, así como la expresión de PD-1 y PD-L1, asociando estos resultados a las características clínico-patológicas de los pacientes.
  
3. **Analizar de forma conjunta la expresión de HLA-I y PD-L1** en las muestras de tumores vesicales , su correlación con el microambiente tumoral y con las características clínico-patológicas de los pacientes.

# MATERIAL Y MÉTODOS



## MATERIAL Y MÉTODOS

### **1. Pacientes y muestras de tumores**

Se analizaron un total de 85 muestras de tumores vesicales de estirpe urotelial. Se obtuvieron un total de 68 hombres y 17 mujeres con una mediana de edad 69 años y un rango de 27 a 88 años. Las muestras procedían de RTUs de vejiga realizadas en el Servicio de Urología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. Las muestras de tumor se almacenaron en nitrógeno líquido a  $-80^{\circ}\text{C}$  inmediatamente después de la RTU, hasta que se realizó el análisis inmunohistoquímico. Las características clínicas de los sujetos estudiados y las muestras de tejido se resumen en la tabla 1. Se obtuvieron 54 tumores de origen primario y 30 recidivas, recibiendo tratamiento posterior si éste era necesario según a criterio del urooncólogo. La mediana de seguimiento de los pacientes fue de 3 años.

Antes de la realización del estudio, todos los registros médicos y muestras tumorales fueron revisados por un urooncólogo y un patólogo. Se obtuvo por parte de todos los pacientes el consentimiento informado firmado aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, siguiendo la normativa bioética del protocolo de Helsinki. El estadio TNM se definió de acuerdo con la clasificación de la Unión para el Consejo Internacional del Cáncer (21). El estadio del tumor se determinó de acuerdo con la clasificación de la OMS y el Consenso de la Sociedad Internacional de Patología Urológica (23).

<b>Edad (Rango)</b>	69 (27-88)
<b>Género</b>	68 Hombres 17 Mujeres
<b>Tipo de tumor</b>	54 Tumores primarios 30 Tumores recidivados
<b>Grado</b>	Grado 1: 36 Grado 2: 7 Grado 3: 41
<b>Estadio</b>	Ta: 22 T1: 32 T2: 30

**Tabla 1: Características clínico-patológicas de los pacientes del estudio**

## **2. Análisis inmunohistoquímico de las muestras**

Tras la RTU de vejiga, las muestras fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las piezas se cortaban posteriormente con un espesor 4-8  $\mu\text{m}$  con un micrótopo criostático (Bright) y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 4-18 h, se fijaron en acetona a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 min y se almacenaron a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis inmunohistoquímico.

Para la realización de las técnicas de inmunohistoquímica se utilizó el sistema Biotin-Streptavidin System (supersensible Multilink HRP / Kit DAB, BioGenex, La Haya, Países Bajos). Se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón específicos para analizar la expresión en la muestra tumoral de las siguientes moléculas: complejo de superficie celular de cadena pesada HLA-I /  $\beta 2\text{m}$  (85 tumores) (anticuerpo w6 / 32, un obsequio del Dr. Bodmer, Imperial Cancer Research Fund Laboratories, Londres, Reino Unido ), infiltración de linfocitos (71 tumores) (anti-CD3, clon F7.2.38 y anti-CD8, clon C8 / 144B, ambos de Dako, Glostrup, Dinamarca), PD-L1 (84 tumores) (anti-B7-H1 humano , 29E.2A3 (AbD Serotec) y el clon 22C3 (Merk), PD-1 (60 tumores) (BioSciences) y CXCR4 (59 tumores) (Abcam). Las secciones de tejido inmunoetiquetadas se escanearon y analizaron con el "Pannoramic Scanner MIDI II" y se realizaron fotografías con "Panoramic Viewer" (3DHISTECH).

Se analizó la expresión de los marcadores de los linfocitos infiltrantes tumorales dentro de la masa tumoral. Como aclaración, cuando hablemos de porcentajes positivos de linfocitos infiltrados (CD3 y CD8) dentro del tumor, consideramos dicha positividad cuando al menos en cinco campos (20X), hay de media 10 o más células marcadas, siendo negativo por debajo de dicho valor.

Se consideró pérdida total de HLA-I cuando se tiñeron menos del 25% de las células tumorales, heterogéneas con 25-75% de células tumorales, y positivo cuando más del 75% de las células tumorales fueron marcadas con mAb W6 / 32,

estableciendo esta diferenciación según los criterios establecidos en el 12º International Histocompatibility Workshop study celebrado en 1996 (222).

La expresión de PD-L1 se definió como positiva en las células tumorales que muestran una tinción de membrana de cualquier intensidad en más del 25%, heterogénea cuando entre el 5% y el 25% de las células tumorales se marcaron positivamente y negativa cuando menos del 5% de las células tumorales las células tumorales fueron positivas (223).

### **3. Análisis estadístico**

Los datos se analizaron con el software estadístico IBM SPSS Statistics 19. Las variables con distribución normal se expresaron como la media y desviación estándar. Las variables que presentaron una distribución distinta a la normal se hizo con el rango promedio. La relación entre variables cualitativas se analizó con la prueba de Chi-cuadrado de Pearson con corrección por continuidad o la prueba exacta de Fisher en caso de no alcanzarse los criterios de validez (> 20% de las frecuencias esperadas menores de 5). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para  $p < 0,05$ .



# RESULTADOS



## RESULTADOS

### **1. Análisis inmunohistoquímico y asociación entre inmunogenicidad tumoral, infiltración inmunitaria intratumoral y microambiente.**

Se analizaron muestras de tumores de vejiga por inmunohistoquímica con el fin de establecer la asociación entre diferentes características de inmunogenicidad tumoral, infiltración inmunitaria intratumoral y microambiente (Tabla 1). Dependiendo del patrón de inmunomarcaje de los tejidos tumorales utilizando anticuerpos contra las proteínas HLA-I, PD-1, PD-L1 y CXCR4 ,pudimos distinguir tres tipos de patrones para cada una de las moléculas: positivo, negativo y heterogéneo (Figura 1 y 2). Para el análisis estadístico en algunos casos combinamos tumores HLA-I y PD-L1 positivos y heterogéneos juntos y los comparamos con tumores negativos. Las diferencias estadísticamente significativas se encontraron principalmente cuando comparamos tumores negativos con un grupo de tumores con patrones positivos y heterogéneos.

En este estudio, la presencia de linfocitos T CD3 + y CD8 + que infiltran el tumor es importante en el contexto de la expresión de HLA-I y PD-L1 en el tumor. Por tanto, nos centramos principalmente en el análisis de la infiltración intratumoral, que tiene un alto valor pronóstico e inmunológico en el cáncer. En la gran mayoría de las muestras de tejido estudiadas, una alta expresión de HLA-I se correlacionó con una fuerte infiltración de células T dentro de la masa tumoral con presencia insignificante de células T en el margen del tumor invasivo, que es similar a las observaciones en otros tipos de cáncer (224).

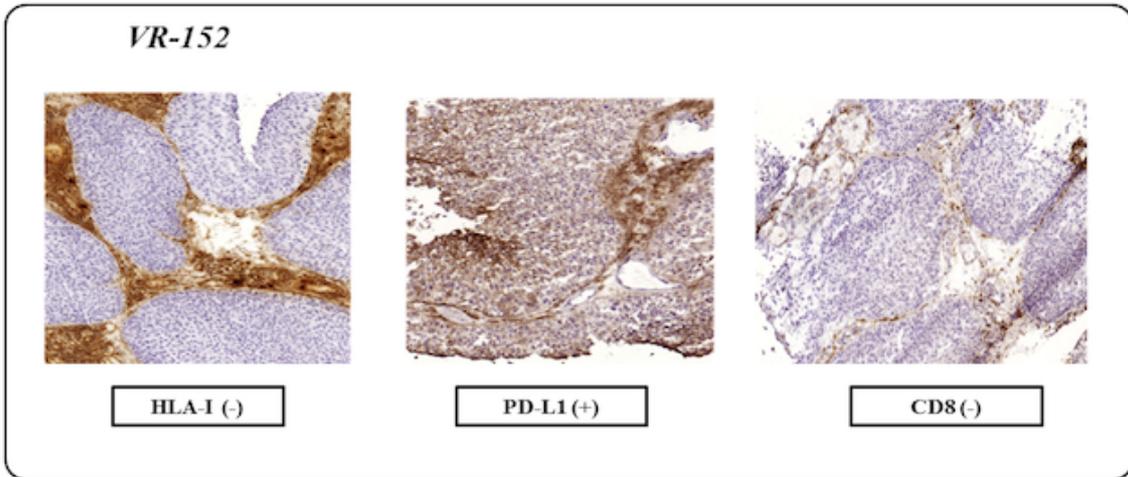


Figura 1. Imágenes representativas de la inmunotinción de una de las muestras de cáncer de vejiga con anticuerpos dirigidos contra HLA-I (mAb w6 / 32), PD-L1, CD8.

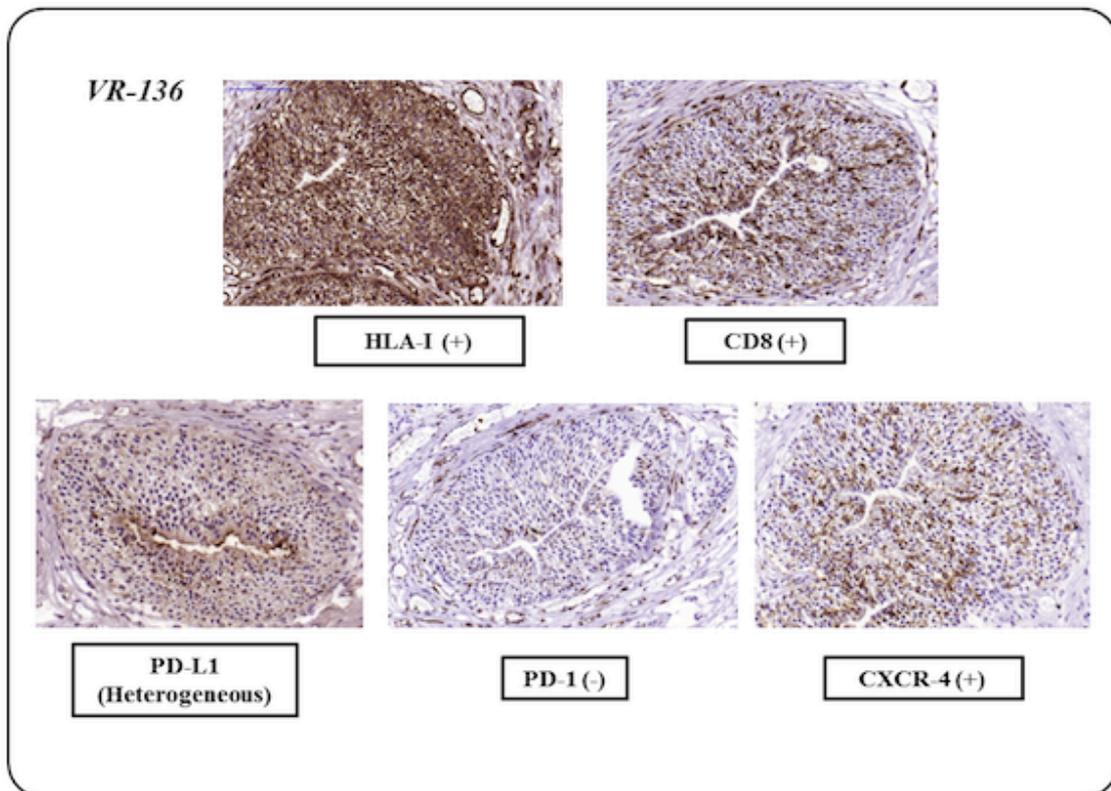


Figura 2: Imágenes representativas de inmunotinción de una de las muestras de cáncer de vejiga con anticuerpos dirigidos contra HLA-I (mAb w6 / 32), PD-L1, PD-1, CD8, CXCR4.

	<b>HLA-I</b>	<b>PD-L1</b>	<b>PD1</b>	<b>CD3</b>	<b>CD8</b>	<b>CXCR-4</b>
<b>Positivo</b>	64,7% (55)	15,5% (13)	28,3% (17)	52,1 % (37)	52,1% (37)	23,7% (14)
<b>Negativo</b>	17,6% (15)	44% (37)	66,7% (40)	47,9% (34)	47,9% (34)	67,8% (40)
<b>Heterogéneo</b>	17,6% (15)	40,5% (34)	5% (3)			8,5% (5)
<b>Total</b>	85	84	60	71	71	59

**Tabla 1: Resumen del análisis inmunohistoquímico de los tumores de vejiga con diferentes tipos de anticuerpos.**

Tal y como podemos observar en los resultados recogidos en la tabla 1, del total de casos analizados para el HLA -I, la gran mayoría son positivos (64,7%), seguido de un 17,6% de los casos heterogéneos. Sólo un pequeño número carecen de expresión de HLA total (17,6%). A pesar de que la mayor parte de tejidos son positivos y heterogéneos para la expresión de HLA de clase I, se espera que muchos de ellos tengan alteraciones parciales en dicha expresión, que no se pueden detectar en este estudio ya que sólo hemos utilizado un anticuerpo. En el estudio de PD-L1, priman en cambio aunque en menor cantidad, los casos negativos (44%) y heterogéneos (40,5%), siendo un 15,5% positivos. En lo que respecta al infiltrado linfocitario intratumoral, apreciamos la presencia de linfocitos T CD8 y CD3 dentro del tumor en un 52,1 % de los casos.

Se analizaron a continuación las características del microambiente tumoral, analizando en primer lugar la relación HLA-I y la composición del infiltrado linfocitario intratumoral CD3 y CD8. Se observa una relación significativa entre ambas variables, de manera que en el 59,3% de los casos que HLA-I positivo o heterogéneo aparece infiltrado intratumoral positivo, mientras que únicamente en el 16,7% de los casos que HLA es negativo, el infiltrado el positivo. (Tabla 2 y Gráfico 1)

	CD3/CD8 (Positivo)	CD3/CD8(Negativo)	Total
HLA-I(Positivo/Het.)	35 (59,3%)	24 (40,3%)	59
HLA-I(Negativo)	2 (16,7%)	10 (83,3%)	12

Tabla 2: Correlación entre la expresión de HLA de clase I y la infiltración tumoral con linfocitos T CD3 + y CD8 +. (P=0,007).

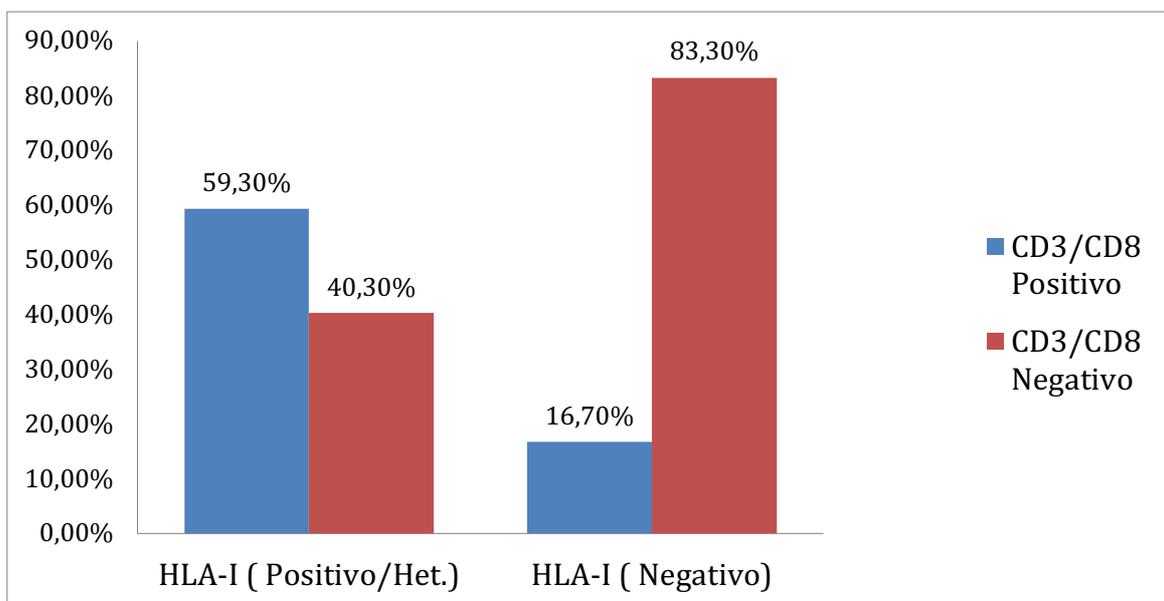
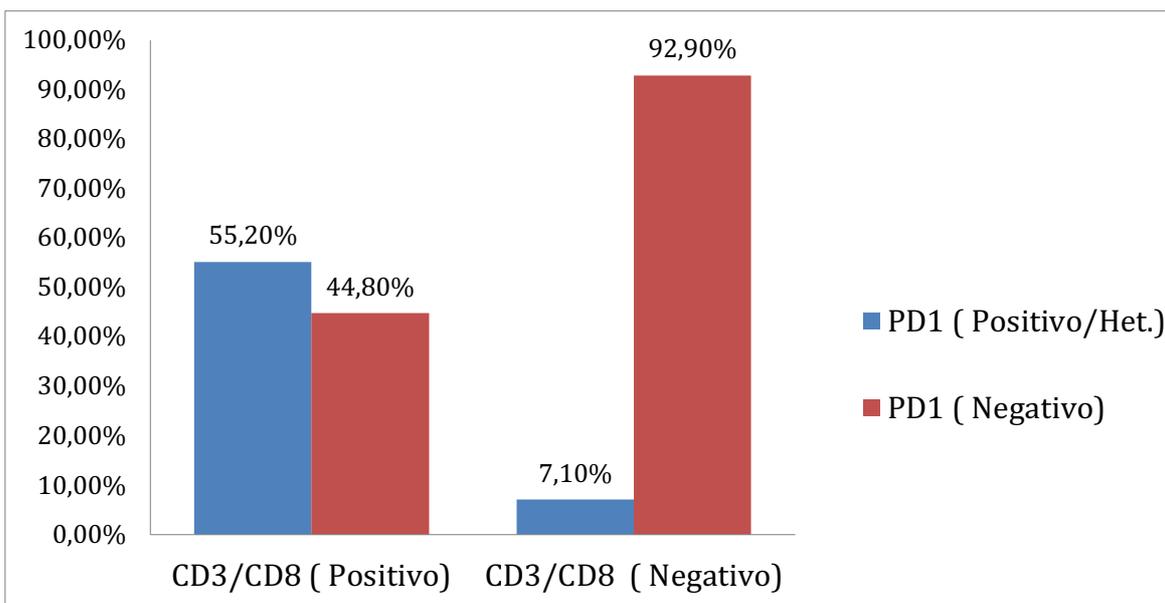


Gráfico 1: Expresión gráfica de la correlación entre la expresión de HLA de clase I y la infiltración tumoral con linfocitos T CD3 + y CD8 +.

A continuación se analizó la relación entre infiltrado linfocitario intratumoral CD3 y CD8 y las moléculas PD-L1 y PD1. Se encuentra una relación significativa entre la presencia de infiltrado linfocitario intratumoral de CD3 y CD8 y de PD1, de manera que en el 55,2 % de los casos que el infiltrado es positivo, la expresión de PD-1 es positiva o heterogénea mientras que el 92,9% de los casos en los que el infiltrado es negativo, la expresión de PD-1 también lo es (Tabla 3, Gráfico 2). En lo que respecta a la relación del infiltrado con PD-L1, observamos también una relación significativa, observando que en el 72,2 % de los casos en los cuales el infiltrado es positivo, es también positivo o heterogéneo PD-L1 (Tabla 4, Gráfico 3).

	PD1 (Positivo/Heterogéneo)	PD1 (Negativo)	Total
CD3/CD8 (Positivo)	16 (55,2%)	16 (44,8%)	29
CD3CD/CD8 (Negativo)	2 (7,1%)	26 (92,9%)	28

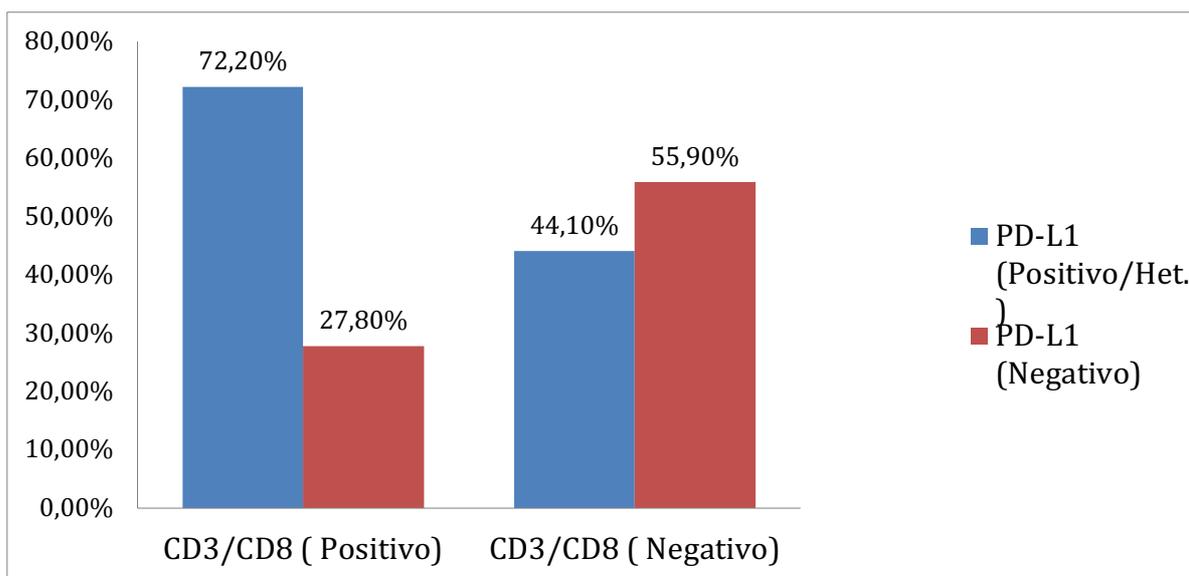
Tabla 3: Correlación entre la infiltración inmunitaria tumoral y la expresión de PD1. (P<0,001)



**Gráfico 2: Expresión gráfica de la correlación entre la infiltración inmunitaria tumoral y la expresión de PD1.**

	PD-L1 (Positivo/Heterogéneo)	PD-L1 (Negativo)	Total
<b>CD3/CD8 (Positivo)</b>	26 (72,2%)	10 (27,8%)	36
<b>CD3/CD8 (Negativo)</b>	15 (44,1%)	19 (55,9%)	34

**Tabla 4: Correlación entre la infiltración inmunitaria tumoral y la expresión de PD-L1. (P: 0,038)**



**Gráfico 3: Expresión gráfica de la correlación entre la infiltración inmunitaria tumoral y la expresión de PD-L1.**

Realizamos una comparación entre la presencia de HLA-I y las moléculas PD-L1 y PD1. No hemos encontrado diferencias significativas en la relación entre el HLA-I con PD-L1 pero si ciertas tendencias que se pueden observar en la tabla 5 y el gráfico 4, de manera que cuando en el 59,4% de los casos que HLA-I es positivo o heterogéneo, existe expresión positiva o heterogénea PD-L1. Sí existen diferencias significativas entre HLA-I y la expresión de PD-1, observando que en el 100% de los casos en que el HLA-I es negativo el PD1 es negativo también (Tabla 6, Gráfico 5). Analizaremos en la discusión las implicaciones de estos resultados.

	PD-L1 (Positivo/Heterogéneo)	PD-L1 (Negativo)	Total
HLA-I (Positivo/Het.)	41 (59,4%)	28 (40,6%)	69
HLA-I (Negativo)	6 (40%)	9 (60%)	15

Tabla 5: Correlación entre la expresión de HLA de clase I y la expresión de PD-L1. (P=0,17)

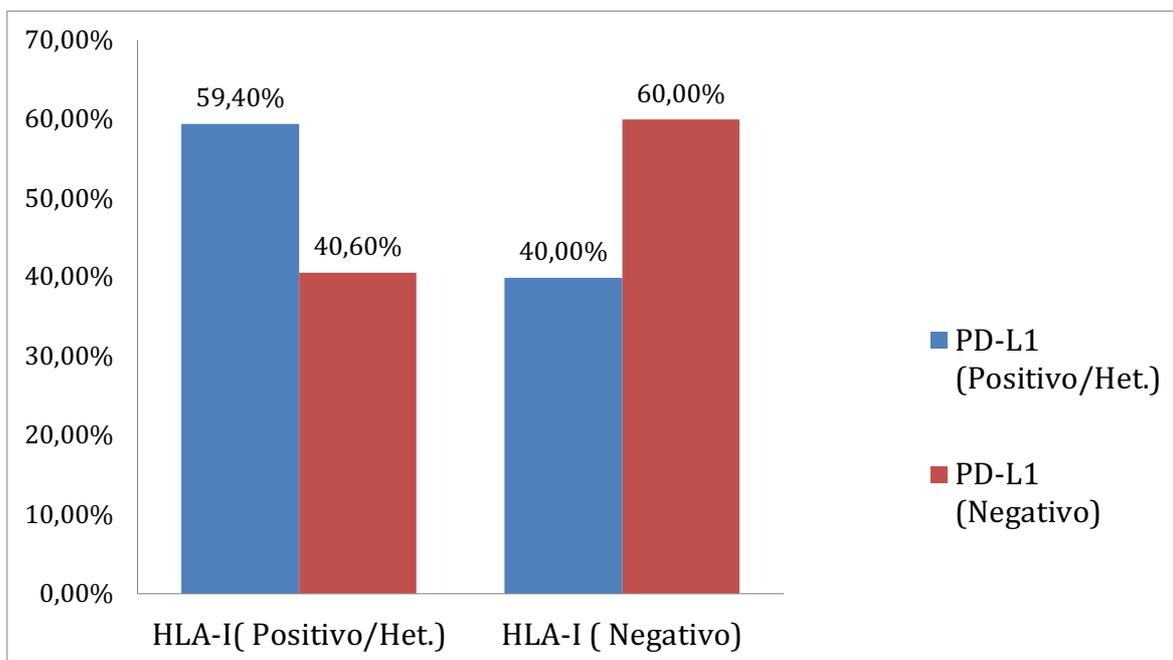
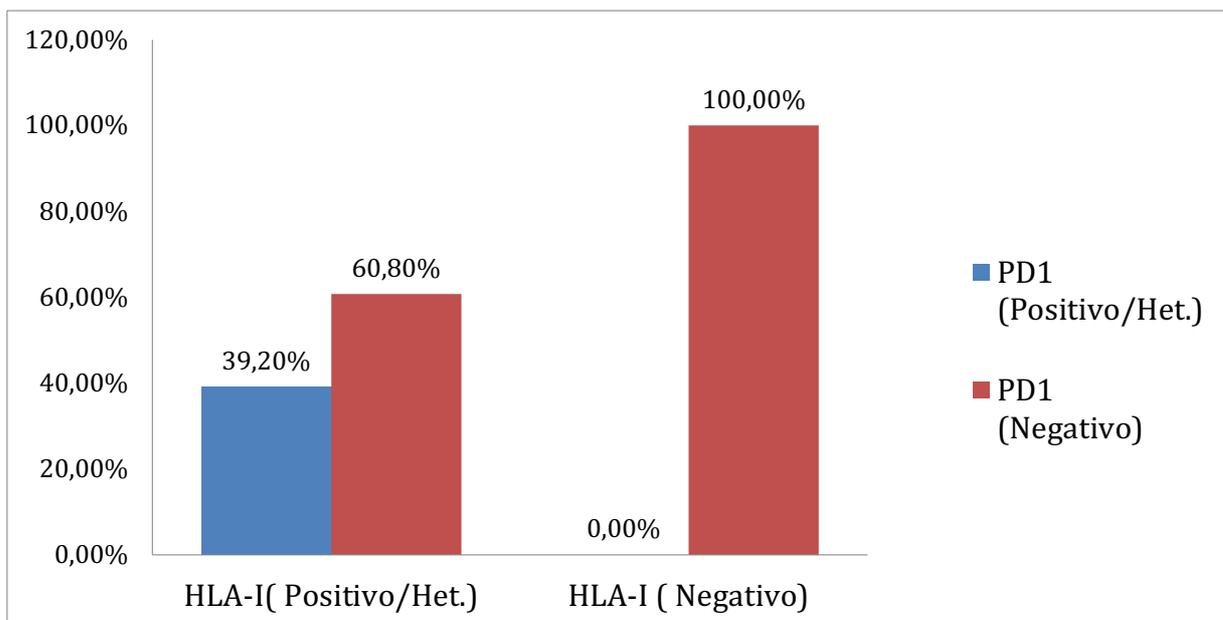


Gráfico 4: Expresión gráfica de la correlación entre la expresión de HLA de clase I y la expresión de PD-L1.

	PD1 (Positivo/Heterogéneo)	PD1 (Negativo)	Total
HLA-I (Positivo/Het.)	20 (39,2%)	31 (60,8%)	51
HLA-I (Negativo)	0 (0%)	9 (100%)	9

Tabla 6: Correlación entre la expresión de HLA de clase I y la expresión de PD 1. (P=0,023)

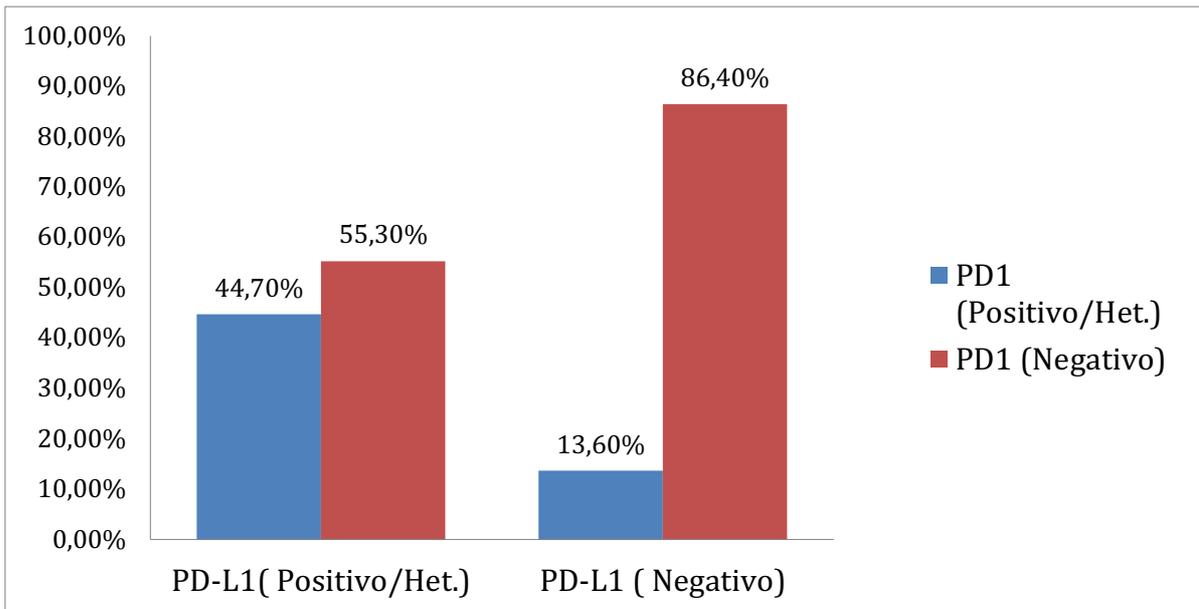


**Gráfico 5: Expresión gráfica de la correlación entre la expresión de HLA de clase I y la expresión de PD1.**

Observamos que existen diferencias significativas en la relación entre la presencia de PD-L1 y PD-1, de manera que en nuestra muestra un 44,7% de pacientes con PD-L1 positivo o heterogéneo tienen PD1 positivo heterogéneo, frente el 13,6% de pacientes con PD-L1 negativo que tienen PD 1 positivo o heterogéneo. (Tabla 7, Gráfico 6) Esto podría indicarnos que los tumores expresan PD-L1 en mayor cuantía cuando aparece su ligando PD1.

	<b>PD1 (Positivo/Heterogéneo)</b>	<b>PD1 (Negativo)</b>	<b>Total</b>
<b>PD-L1 (Positivo/Het.)</b>	17 (44,7%)	21 (55,3%)	38
<b>PD-L1(Negativo)</b>	3 (13,6%)	19 (86,4%)	22

**Tabla 7: Correlación entre la expresión de PD-L1 y la expresión de PD 1. (P:0,014).**



**Gráfico 6: Expresión gráfica de la correlación entre la expresión de PD-L1 y la expresión de PD-L1.**

## **2. Relaciones del microambiente tumoral con las características clínico-patológicas de los tumores vesicales.**

Se relacionaron las características clínico-patológicas de los tumores con las diferentes moléculas del microambiente celular (agrupamos para el análisis estadístico los casos positivos y heterogéneos frente a los negativos), encontrando que existe una diferencia significativa en la relación entre el estadio y la presencia de PD-L1, apareciendo en un 79,3% de los tumores T2, PD-L1 positivo o heterogéneo, a diferencia de los estadios Ta y T1, en los que solo aparece en un 44,4% de ellos (Tabla 8, Gráfico 7). Estos datos sugieren que los tumores más agresivos utilizan la expresión de PD-L1 como un mecanismo de escape inmunológico para avanzar al estadio T2, hablaremos de ello más detenidamente en la discusión.

Estadio	PD-L1 (Positivo/Heterogéneo)	PD-L1 (Negativo)	Total
Ta y T1	24 (44,4%)	30 (55,5%)	54
T2	23 (79,3%)	6 (21,7%)	29

Tabla 8: Correlación entre el estadio y la expresión de PD-L1. (P=0,002).

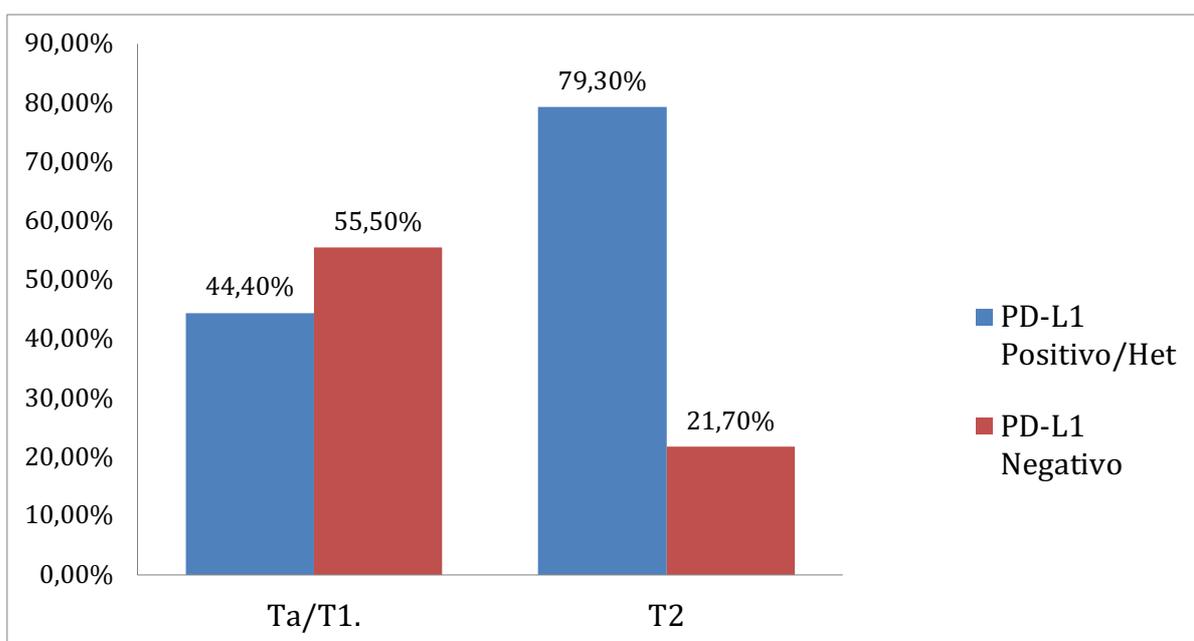


Gráfico 7: Expresión gráfica de la correlación entre el estadio y la expresión de PD-L1.

Así mismo se observó una mayor positividad para infiltrado linfocitario intratumoral en tumores de estadios más avanzados, siendo el resultado significativo (Tabla 9, Grafico 8). Comentaremos las posibles causas de este sorprendente resultado en la discusión.

Estadio	CD3/CD8 (Positivo)	CD3/CD8(Negativo)	Total
Ta y T1	19(41,3%)	27(58,7%)	46
T2	17(70,8%)	7 (29,2%)	24

Tabla 9: Correlación entre el estadio y el infiltrado linfocitario. (P=0,019)

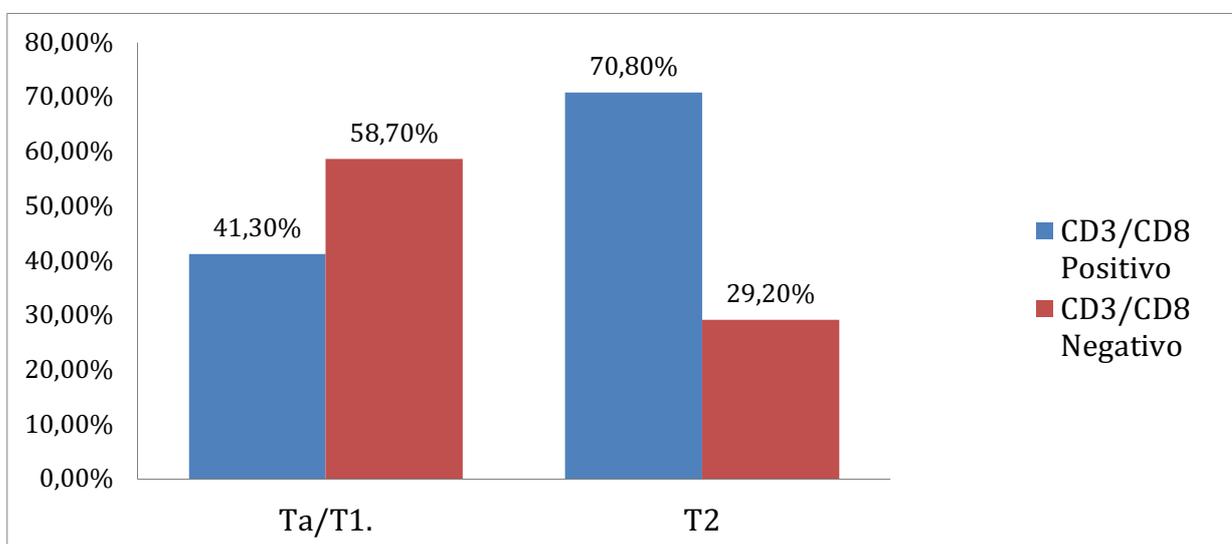


Gráfico 8: Expresión gráfica de la correlación entre el estadio y el infiltrado linfocitario.

No se evidenciaron diferencias entre tumores primarios y recidivas con el resto de características del microambiente celular. Así mismo tampoco se encontraron diferencias significativas entre los TVNMI que recidivaron y/o progresaron a lo largo del seguimiento y las características del microambiente celular.

### **3. Relaciones de la agrupación de HLA-I y PD-L1 con el microambiente tumoral y las características clínico-patológicas de los tumores vesicales.**

Agrupamos las diferentes combinaciones de HLA-I y PD-L1 en 4 grupos y las comparamos con el resto de variables del microambiente y clínico-patológicas (Tabla 10, Gráfico 9).

	Pacientes en los que SI aparece el fenotipo	Pacientes en los que NO aparece el fenotipo
HLA-I (Positivo/Het.) y PD-L1 (Positivo/Het.)	41 (48,8%)	43 (51,2%)
HLA-I (Positivo/Het.) y PD-L1 (Negativo)	28 (33,3%)	56 (66,6%)
HLA-I (Negativo) y PD-L1 (Positivo/Het.)	6 (7,15%)	78 (92,85%)
HLA-I (Negativo) y PD-L1 (Negativo)	9 (10,70%)	75 (89,3%)

Tabla 10: Incidencia de tumores con diferentes expresiones del fenotipo HLA-I/PD-L1.

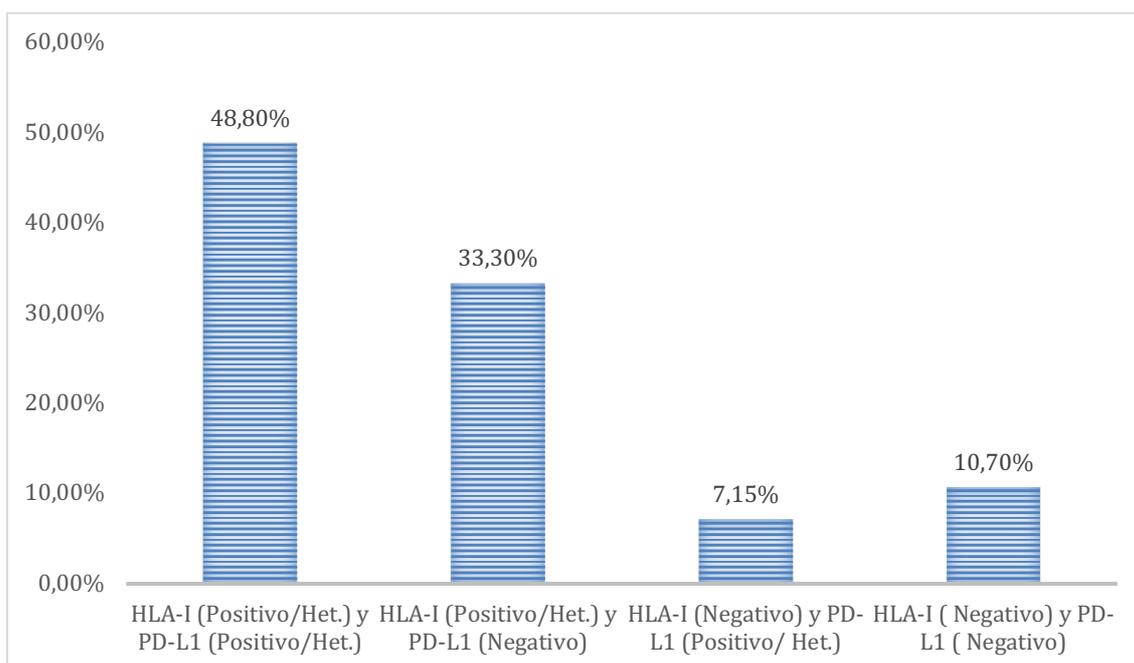


Gráfico 9: Expresión gráfica de la Incidencia de tumores con diferentes expresiones del fenotipo HLA-I/PD-L1.

Posteriormente comparamos cada uno de los fenotipos con las características clínico-patológicas de los tumores y con el microambiente tumoral, observando los siguientes resultados significativos:

Cuando HLA-I y PD-L1 son positivos o heterogéneos se aprecia una relación significativa con el infiltrado linfocitario, CXCR4 y PD-1 (Tablas 11, 12 y 13). Así mismo cuando se relaciona este fenotipo con las características clínico-patológicas de los tumores hay una asociación significativa con el estadio, siendo tumores que se reparten casi al 50% en musculo-invasivos y no musculo-invasivos (Tabla 14 y Gráfico 10).

	CD3/CD8 (Positivo)	CD3/CD8 (Negativo)	Total
HLA-I (Positivo/Het.) y PD-L1 (Positivo/Het.)	24 (68,6%)	11 (31,4%)	35
Resto	12 (34,3%)	23 (65,7%)	35

Tabla 11. Correlación entre HLA-I positivo / heterogéneo y PD-L1 positivo / heterogéneo con la infiltración de linfocitos. (P=0,004)

	CXCR4 (Positivo/Heterogéneo)	CXCR4 (Negativo)	Total
HLA-I (Positivo/Het.) y PD-L1 (Positivo/Het.)	17 (51,5%)	16 (48,5%)	33
Resto	2 (7,7%)	24 (92,3%)	26

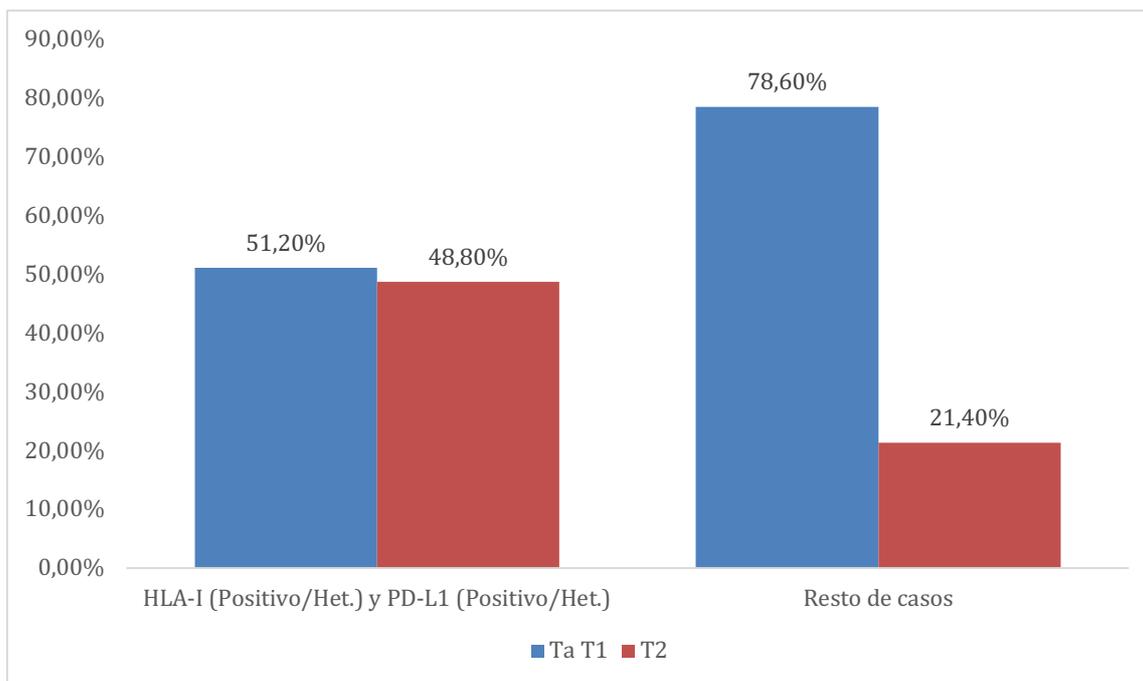
Tabla 12. Correlación entre HLA-I positivo / heterogéneo y PD-L1 positivo / heterogéneo con CXCR4. (P<0,001)

	PD1 (Positivo/Heterogéneo)	PD1 (Negativo)	Total
HLA-I (Positivo/Het.) y PD-L1 (Positivo/Het.)	17 (51,5%)	16 (48,5%)	33
Resto	3 (1,1%)	24 (88,9%)	27

Tabla 13. Correlación entre HLA-I positivo / heterogéneo y PD-L1 positivo / heterogéneo con PD-1. (P=0,001).

	Ta T1	T2	Total
HLA-I (Positivo/Het.) y PD-L1 (Positivo/Het.)	21 (51,2%)	20 (48,8%)	44
Resto	33 (78,6%)	9 (21,4%)	36

Tabla 14. Correlación entre HLA-I positivo / heterogéneo y PD-L1 positivo / heterogéneo con el estadio. (P=0,009)

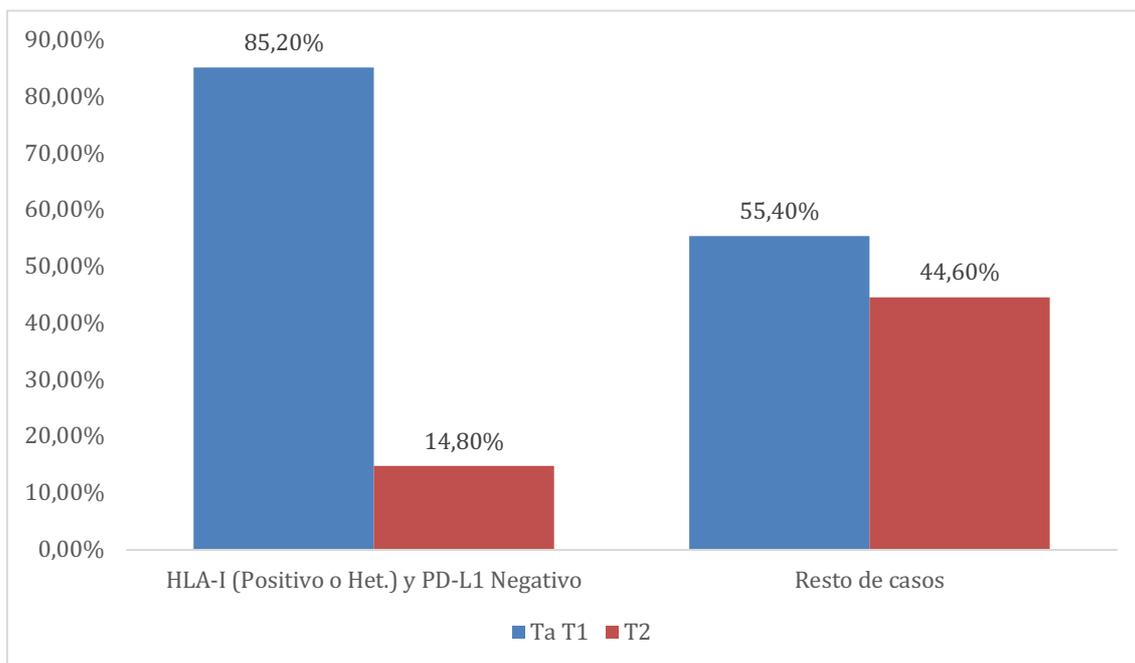


**Gráfico 10. Expresión gráfica de la correlación entre HLA-I positivo / heterogéneo y PD-L1 positivo / heterogéneo con el estadio.**

En los casos que el HLA-I es positivo o heterogéneo y PD-L1 negativo en los tumores hay una asociación significativa con el estadio, apareciendo en un 85,2% de los casos en lo que se encuentra este fenotipo, tumores en estadio no músculo-invasivo (Tabla 15, Gráfico 11). Ocurre lo contrario con respecto a la asociación del estadio y PD-L1 positivos o heterogéneos, de manera que podría indicarnos que PD-L1 podría ser un marcador independiente que nos indique mayor agresividad de los tumores desde estadios tempranos.

	Ta T1	T2	Total
<b>HLA-I (Positivo/Het.) y PD-L1 (Negativo)</b>	23 (85,2%)	4 (14,8%)	27
<b>Resto</b>	31 (55,4%)	25 (44,6%)	56

**Tabla 15. Correlación entre HLA-I positivo / heterogéneo y PD-L1 negativo con el estadio. (P=0,004).**



**Gráfico 11. Expresión gráfica de la correlación entre HLA-I positivo / heterogéneo y PD-L1 negativo con el estadio.**

El resto de fenotipos no arrojaron resultados significativos a excepción de la asociación de HLA-I y PD-L1 negativos con una menor expresión de CD-3 y CD8 (Tabla 16).

	CD3/CD8 (Positivo)	CD3/CD8 (Negativo)	Total
<b>HLA-I (Negativo) y PD-L1 (Negativo)</b>	0 (0%)	6 (100%)	6
<b>Resto</b>	36 (56,3%)	28 (43,8%)	64

**Tabla 16. Correlación entre HLA-I negativo y PD-L1 negativo con la infiltración de linfocitos. (P=0,01).**

# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

Existe evidencia acumulada que indica que el crecimiento y diseminación tumoral no es el resultado de un fallo del sistema inmunológico, sino una consecuencia de diferentes mecanismos que permiten que las células cancerosas escapen del rechazo inmunológico (111). Una de las formas más frecuentes de evasión inmunitaria, que se ha descrito en muchos tipos de cáncer, es la pérdida o regulación a la baja de la expresión de HLA-I del tumor, que es la primera señal que induce el reconocimiento y la eliminación de células malignas por LTC (163).

El papel de la alteración de la presentación de antígenos tumorales y la expresión de HLA-I, está actualmente muy de moda en relación a la resistencia del cáncer a la inmunoterapia, siendo especialmente importantes los inhibidores de puntos de control inmunitarios. Estudios actuales, sugieren que las alteraciones en la presentación de antígenos tumorales pueden ser un mecanismo para evadir la inmunidad antitumoral después del bloqueo de los puntos de control inmunológico.

En este estudio, utilizando inmunohistoquímica, caracterizamos la expresión de moléculas HLA-I y PD-L1 / PD-1, CXCR-4, así como el infiltrado de linfocitario intratumoral en 85 tumores de vejiga y se correlacionó con las características clínico-patológicas de los pacientes. Aunque la mayoría de los tumores fueron positivos para HLA-I, aproximadamente el 17,6% de los tumores demostraron una pérdida total de expresión de HLA-I. Este número es similar al porcentaje informado en otros estudios de pérdida total de HLA-I en tumores de vejiga (25%) (172). Aquí no analizamos la pérdida parcial de un locus o las alteraciones alélicas de HLA-I, ya que usamos solo un anticuerpo que reconoce un complejo de cadena pesada de HLA-I y  $\beta$ 2m en la superficie de las células tumorales (W6 / 32) (225).

Una observación importante de los resultados del estudio es una fuerte correlación entre la expresión de HLA-I y la infiltración tumoral con linfocitos CD3 + y CD8 +. En una publicación reciente se describe una correlación similar en el cáncer de pulmón (164).

La expresión de HLA-I parece ser un factor importante de rechazo tumoral asociado con un aumento de la infiltración de linfocitos intratumorales, y que cambia durante la evolución de la enfermedad tumoral como resultado de la selección y eliminación mediada por linfocitos T de células tumorales positivas para HLA-I y el escape inmune de células negativas para HLA-I (224). Un estadio más avanzado de progresión tumoral se asocia con la pérdida de infiltración de linfocitos intratumorales reducida por HLA-I y también con ciertos cambios en la organización del tejido tumoral, caracterizada por la encapsulación tumoral por un estroma fibroso (224). En este estudio observamos casos similares (Figura 1 y 2 de resultados), sin embargo, en algunos casos observamos una mayor infiltración de linfocitos en los tumores T2, lo que puede explicarse por la inactivación de los linfocitos por las señales inhibitoras del microambiente tumoral, así como la existencia de estadios tumorales de vejiga más avanzados ( T3, T4, M1), lo que se ha demostrado en diferentes tipos de cáncer (223).

En cuanto a la expresión de PD-L1 en el cáncer de vejiga, existen diferentes estudios que describen patrones de inmunomarcaje tanto positivos como negativos. En nuestro estudio, la mayoría de los tumores son positivos o heterogéneos (15,5% y 40,5% respectivamente) para la expresión de PD-L1. Alrededor del 80% de los tumores en estadio tumoral T2 expresaban PD-L1, en comparación con el grupo de tumores Ta + T1 donde esta incidencia fue solo del 44,4%, lo que sugiere que los tumores más agresivos podrían utilizar la expresión de PD-L1 como un mecanismo de escape inmunológico para avanzar a una etapa de invasión más avanzada.

Según la literatura publicada, el valor pronóstico de la expresión de PD-L1 en el tumor es controvertido y existe una falta de consenso sobre la utilidad de las pruebas de PD-L1 como un biomarcador predictivo. En opinión de algunos autores, la expresión de PD-L1 parece tener peor pronóstico y aparecer en estadios tumorales más avanzados a diferencia de los pacientes sin expresión de PD-L1 que parecen que obtienen algún beneficio clínico. Por otro lado, la expresión alta de PD-L1 en el tumor también puede estar asociada con una mayor probabilidad de respuesta a la inmunoterapia con anticuerpos anti-PD-L1, aunque algunos estudios fase III no han demostrado que PD-L1 sea un marcador predictivo útil (226,227).

En base a estudios previos sobre el papel de la expresión de HLA-I en el rechazo tumoral y del eje PD-L1 / PD1 en una regulación negativa inhibiendo la activación de células T, se podría plantear la hipótesis de que el inmunofenotipo tumoral HLA-I + / PD-L1- podría promover el rechazo inmunológico del cáncer en las primeras etapas del desarrollo del cáncer de vejiga. Quizás, en etapas posteriores, la aparición de otro fenotipo tumoral, HLA-I- / PD-L1 +, podría facilitar el escape y la progresión inmune del tumor (223) y la diseminación metastásica. La acumulación de fenotipos tumorales alterados por HLA-I durante la progresión metastásica y la resistencia a la inmunoterapia se han descrito en otros tipos de cáncer, incluidos el cáncer de pulmón y el melanoma (163, 228).

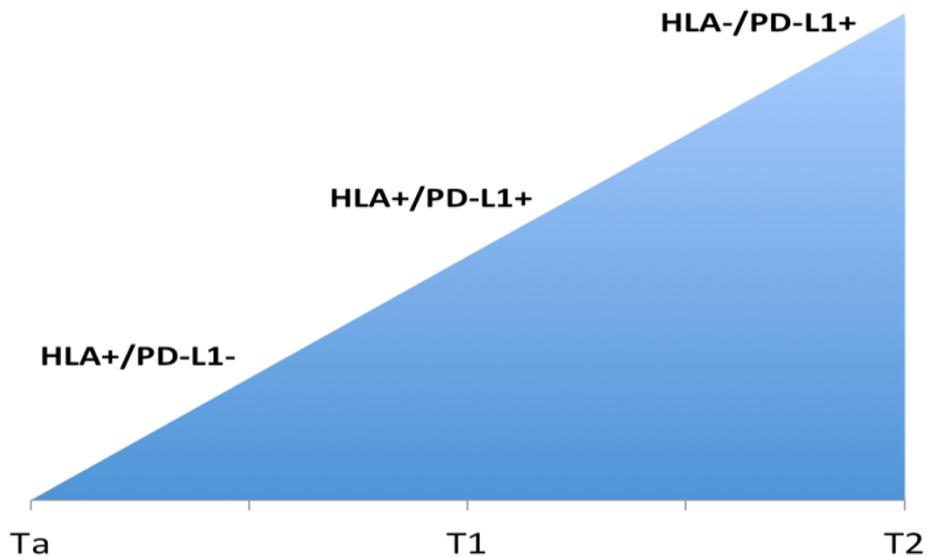
No encontramos ninguna correlación estadísticamente significativa entre HLA-I y PD-L1 analizados de forma independiente. Sin embargo, muchos tumores mostraron un patrón heterogéneo de expresión de HLA-I y PD-L1 y diferentes fenotipos de coexpresión, por lo que clasificamos los tumores en cuatro grupos: HLA-I+ / PD-L1-, HLA-I- / PD -L1+, HLA-I+/PD-L1+ y HLA-I-/PD-L1-. El análisis estadístico reveló que los tumores dobles positivos demostraron un grado significativamente mayor de infiltración de linfocitos tumorales, una mayor expresión de PD1 y CXCR-4. Esto sugiere que estos tumores son inmunológicamente “calientes” desde el punto de vista de la actividad del microambiente tumoral, con una regulación positiva coordinada de varias moléculas proinflamatorias.

En este estudio descubrimos que un alto porcentaje de linfocitos T que se infiltran en el tumor expresan moléculas inhibitoras de PD1, que representa un fenotipo de un “linfocito agotado” y puede tener un papel importante como factor pronóstico de respuesta a inmunoterapia con anticuerpos anti-PD1. Así mismo se observó una correlación significativa entre la negatividad de HLA-I y la nula presencia del marcador PD1, lo cual parece coincidir con la escasa presencia de infiltración linfocitaria intratumoral cuando el HLA-I es negativo. La incidencia de expresión de PD1 / PD-L1 en el tumor en este estudio es similar a otros estudios previos (229). La expresión de PD-L1 tiene una correlación significativa con la respuesta clínica al tratamiento con anticuerpos anti-PD1 / PD-L1 en pacientes con

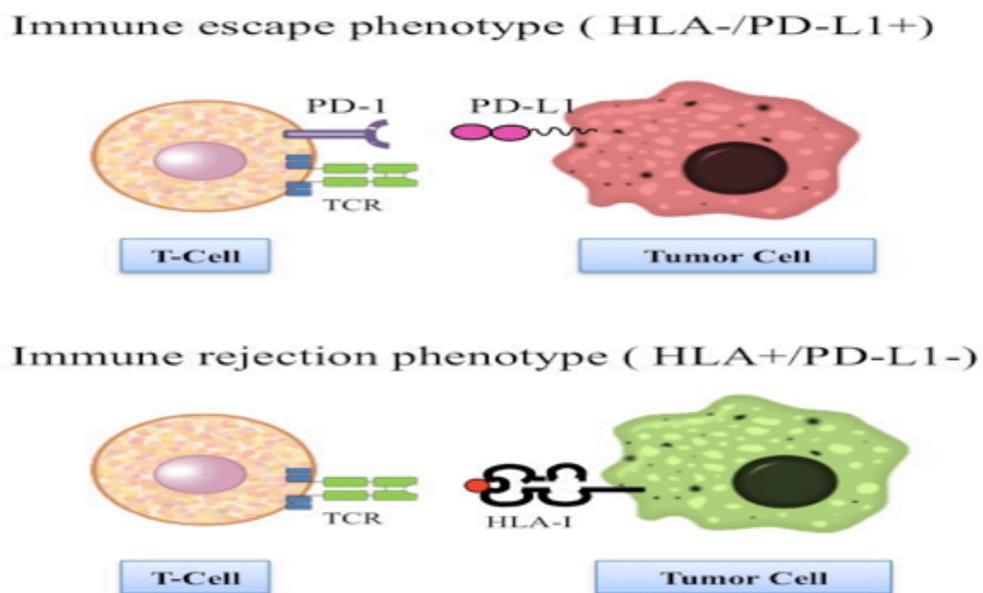
diferentes tipos de tumores como el melanoma, el cáncer renal metastásico o el tumor vesical metastásico (196,199,204).

Los pacientes con tumores HLA-I+/PD-L1- demostraron un mejor pronóstico; siendo este inmunofenotipo más frecuente observado en los TVNMI. Se han comunicado resultados similares en otros tipos de tumores, incluida una asociación con una menor incidencia de recidiva tumoral (230-232). Esto podría sugerir que la ausencia de expresión de PD-L1 es un factor importante de rechazo del cáncer, que también puede servir como un biomarcador predictivo de tumores menos invasivos y un curso de la enfermedad más favorable. Estos datos confirman los resultados que demuestran una correlación positiva entre la expresión de PD-L1 y un estadio tumoral más avanzado. En un pequeño porcentaje de los tumores estudiados (7,15%) detectamos un patrón de coexpresión opuesto, HLA-I- / PD-L1 +, que anteriormente se había informado que estaba asociado con un cáncer de pulmón más avanzado (223), aunque en nuestro estudio no arrojó resultados significativos probablemente debido al escaso número de tumores con este inmunofenotipo en nuestra muestra.

El inmunofenotipo tumoral HLA-I+/PD-L1+, relacionado con las características clínico-patológicas de los tumores tiene una asociación significativa con el estadio, siendo tumores que se reparten casi al 50% en músculo-invasivos y no músculo-invasivos, lo cual puede representar una etapa intermedia en la evolución natural del tumor, como se ha descrito previamente en el melanoma y el cáncer de pulmón (223,233). En etapas tempranas, la expresión de HLA-I positiva puede coincidir con una baja expresión de PD-L1 (fenotipo de rechazo inmune) y progresar a una variante de escape con patrón HLA-I- / PD-L1 + en estadios avanzados (Figuras 1 y 2).



**Figura 1: Correlación entre el inmunofenotipo de coexpresión de HLA-I y PD-L1 y el estadio de progresión del cáncer de vejiga.** Adaptada desde: Flores-Martín JF, Perea F, Exposito-Ruiz M, et al. A Combination of Positive Tumor HLA-I and Negative PD-L1 Expression Provides an Immune Rejection Mechanism in Bladder Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2019 Aug;26(8):2631-2639.



**Figura 2: Representación esquemática del papel de la expresión de HLA-I y PD-L1 en el tumor en el rechazo y / o escape inmunológico del cáncer.** Adaptada desde: Flores-Martín JF, Perea F, Exposito-Ruiz M, et al. A Combination of Positive Tumor HLA-I and Negative PD-L1 Expression Provides an Immune Rejection Mechanism in Bladder Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2019 Aug;26(8):2631-2639

Así mismo, la inmunoterapia parece inducir un escape inmunológico de las células tumorales con alteraciones genéticas estructurales de HLA-I, que no pueden corregirse con citocinas. Anteriormente, se ha publicado, que los tumores de vejiga recurrentes después de la terapia con BCG acumulan más alteraciones genéticas en los genes HLA-I (LOH-6) que los tumores antes del tratamiento, como resultado de la selección inmune mediada por células T (180).

La nueva generación de inmunoterapia contra el cáncer basada en inmuno-checkpoints, se utiliza ampliamente en el cáncer de vejiga metastásico, pero en las primeras etapas todavía esperamos el resultado de múltiples ensayos clínicos en marcha. Nuestros datos sugieren que el análisis simultáneo de la expresión de HLA-I / PD-L1 tumoral podría ayudar a predecir la progresión del cáncer de vejiga y seleccionar pacientes para tratamiento con inmuno-checkpoints.

Entre las limitaciones más importantes del estudio podemos nombrar el bajo número de pacientes que ha podido lastrar alguna relación significativa en los resultados (relaciones de microambiente con recidiva y progresión), que no ha podido realizarse con una muestra homogénea de tumores primarios o tumores recidivados después de BCG con lo que probablemente hubiéramos podido tener unos resultados más interesantes. Así mismo y como se ha comentado anteriormente el haber contado con solo un anticuerpo que reconoce un complejo de cadena pesada de HLA-I y  $\beta$ 2m en la superficie de las células tumorales (W6 / 32), no hemos podido analizar pérdidas parciales de HLA-I.

# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1. La **expresión de HLA-I en células tumorales es un mecanismo importante de la inmunovigilancia tumoral**. Las componentes del microambiente tumoral, en especial los inmuno-checkpoints como son PD-L1/PD1, son otro mecanismo de inmunovigilancia del cáncer y pueden servir potencialmente como un marcador predictivo para el éxito de la inmunoterapia.
2. Una **mayor expresión de HLA-I se asocia con una mayor infiltración de linfocitos tumorales** y, junto con una baja expresión de PD-L1 en las células de cáncer de vejiga, representa un fenotipo de rechazo tumoral y podría usarse como **marcador predictivo de buen pronóstico**.
3. Nuestros resultados muestran que **PD-L1 es un factor independiente de invasividad y mal pronóstico en los tumores vesicales**, lo que sugiere que PD-L1 pueda ser un factor que promueva la progresión de estadios localizados a más avanzados.
4. Encontramos en nuestro estudio que la mayoría de **los tumores HLA-I positivos / PD-L1 negativos se encuentran en una etapa menos avanzada**, lo que vendría a apoyar la importancia del HLA-I y PD-L1 en la evolución de los tumores.
5. En base en los resultados obtenidos, creemos que la **pérdida de HLA-I, junto con la regulación al alza de PD-L1** en los tumores de vejiga, puede estar asociada con un **mal pronóstico y posiblemente con diseminación metastásica**.
6. En caso de TVMI, más agresivos, en los que los que puede aparecer el fenotipo PD-L1-positivo / HLA-I-negativo, la **terapia con anticuerpos anti-PD-L1 / PD1, junto con una regulación al alza de la expresión normal de HLA-I** (inmunoterapia o terapia génica) podría **mejorar los protocolos existentes**

**del tratamiento del cáncer de vejiga**, así como la selección de pacientes para inmunoterapia.

7. Se **necesitan estudios y ensayos clínicos adicionales para confirmar las hipótesis** y determinar otros aspectos en la interrelación de HLA-I y PD-L1.

# REFERENCIAS



## REFERENCIAS

1. Ferlay J, Bray F, Forman D, et al. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010.
2. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2013;63(2):234–41.
3. Compérat E, Larré S, Roupret M, et al. Clinicopathological characteristics of urothelial bladder cancer in patients less than 40 years old. *Virchows Archiv*. 2015;466(5):589-594.
4. Herr H. Natural history of superficial bladder tumors: 10- to 20-year follow-up of treated patients. *World Journal of Urology*. 1997;15(2):84-88.
5. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, et al. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*. 2011 Aug 17;306(7):737-45.
6. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer*. 2000 Apr 15;86(2):289-94.
7. Jiang X, Yuan JM, Skipper PL, et al. Environmental tobacco smoke and bladder cancer risk in never smokers of Los Angeles County. *Cancer Res*. 2007 Aug 1;67(15):7540-5.
8. Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, et al. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract*. 2002 Nov-Dec;10(6):311-22.
9. Harling M, Schablon A, Schedlbauer G, et al. Bladder cancer among hairdressers: a meta-analysis. *Occup Environ Med*. 2010 May;67(5):351-8.
10. Chrouser K, Leibovich B, Bergstralh E, et al. Bladder cancer risk following primary and adjuvant external beam radiation for prostate cancer. *J Urol*. 2005 Jul;174(1):107-10.
11. Nieder AM, Porter MP, Soloway MS. Radiation therapy for prostate cancer increases subsequent risk of bladder and rectal cancer: a population based cohort study. *J Urol*. 2008 Nov;180(5):2005-9.
12. Zamora-Ros R, Sacerdote C, Ricceri F, et al. Flavonoid and lignan intake in relation to bladder cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Br J Cancer*. 2014 Oct 28;111(9):1870-80.
13. Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, et al. Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol*. 2006 Jun;3(6):327-40.

14. Locke JR, Hill DE, Walzer Y. Incidence of squamous cell carcinoma in patients with long-term catheter drainage. *J Urol*. 1985 Jun;133(6):1034-5.
15. (No authors listed.) Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 1994;61:1-241.
16. Gouda I, Mokhtar N, Bilal D, et al. Bilharziasis and bladder cancer: a time trend analysis of 9843 patients. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2007 Jun;19(2):158-62.
17. Salem HK, Mahfouz S. Changing patterns (age, incidence, and pathologic types) of schistosoma-associated bladder cancer in Egypt in the past decade. *Urology*. 2012 Feb;79(2):379-83.
18. Liu S, Yang T, Na R, et al. The impact of female gender on bladder cancer-specific death risk after radical cystectomy: a meta-analysis of 27,912 patients. *Int Urol Nephrol*. 2015 Jun;47(6):951-8.
19. Stenzl A. Words of wisdom. Re: sex and racial differences in bladder cancer presentation and mortality in the US. *Eur Urol*. 2010 Apr;57(4):729.
20. Díaz-García JM. Análisis de microsatélites en el cromosoma 9 en pacientes con cáncer de vejiga. Implicaciones pronósticas. Tesis. Universidad de la laguna 2002.
21. Sobin LH, et al. TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 7th edn. 2009, Wiley-Blackwell.
22. Sauter G, et al. Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. In: WHO classification of classification of tumours of the urinary system and male genital organs., A.F. Sauter G, Amin M, Editors. 2004, IARCC Press: Lyon.
23. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, et al. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol*. 1998 Dec;22(12):1435-48.
24. Ramirez D, Gupta A, Canter D, et al. Microscopic haematuria at time of diagnosis is associated with lower disease stage in patients with newly diagnosed bladder cancer. *BJU Int*. 2016 May;117(5):783-6.
25. Choyke PL. Radiologic evaluation of hematuria: guidelines from the American College of Radiology's appropriateness criteria. *Am Fam Physician*. 2008 Aug 1;78(3):347-52.

26. Trinh TW, Glazer DI, Sadow CA, et al. Bladder cancer diagnosis with CT urography: test characteristics and reasons for false-positive and false-negative results. *Abdom Radiol (NY)*. 2018 Mar;43(3):663-671.
27. Huang L, Kong Q, Liu Z, et al. The Diagnostic Value of MR Imaging in Differentiating T Staging of Bladder Cancer: A Meta-Analysis. *Radiology*. 2018 Feb;286(2):502-511.
28. Panebianco V, Narumi Y, Altun E, et al. Multiparametric Magnetic Resonance Imaging for Bladder Cancer: Development of VI-RADS (Vesical Imaging-Reporting And Data System). *Eur Urol*. 2018 Sep;74(3):294-306.
29. Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, et al. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol*. 2015 Feb;33(2):66.e25-31.
30. Têtu B. Diagnosis of urothelial carcinoma from urine. *Mod Pathol*. 2009 Jun;22 Suppl 2:S53-9.
31. Raitanen MP, Aine R, Rintala E, et al. Differences between local and review urinary cytology in diagnosis of bladder cancer. An interobserver multicenter analysis. *Eur Urol*. 2002 Mar;41(3):284-9.
32. Barkan GA, Wojcik EM, Nayar R, et al. The Paris System for Reporting Urinary Cytology: The Quest to Develop a Standardized Terminology. *Acta Cytol*. 2016;60(3):185-97.
33. Kurth KH, Schellhammer PF, Okajima E, et al. Current methods of assessing and treating carcinoma in situ of the bladder with or without involvement of the prostatic urethra. *Int J Urol*. 1995 Jun;2 Suppl 2:8-22.
34. Suarez-Ibarrola R, Soria F, Abufaraj M, et al. Surgical checklist impact on recurrence-free survival of patients with non-muscle-invasive bladder cancer undergoing transurethral resection of bladder tumour. *BJU Int*. 2019 Apr;123(4):646-650.
35. Mariappan P, Zachou A, Grigor KM et al. Detrusor muscle in the first, apparently complete transurethral resection of bladder tumour specimen is a surrogate marker of resection quality, predicts risk of early recurrence, and is dependent on operator experience. *Eur Urol*. 2010 May;57(5):843-9.
36. Brausi M, Collette L, Kurth K, et al. Variability in the recurrence rate at first follow-up cystoscopy after TUR in stage Ta T1 transitional cell carcinoma of the bladder: a combined analysis of seven EORTC studies. *Eur Urol*. 2002 May;41(5):523-31.
37. Naselli A, Hurle R, Paparella S, et al. Role of Restaging Transurethral Resection for T1 Non-muscle invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol Focus*. 2018 Jul;4(4):558-567.

38. Cumberbatch MGK, Foerster B, Catto JWF, et al. Repeat Transurethral Resection in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A Systematic Review. *Eur Urol.* 2018 Jun;73(6):925-933.
39. Grimm MO, Steinhoff C, Simon X, et al. Effect of routine repeat transurethral resection for superficial bladder cancer: a long-term observational study. *J Urol.* 2003 Aug;170(2 Pt 1):433-7.
40. Sfakianos JP, Kim PH, Hakimi AA, et al. The effect of restaging transurethral resection on recurrence and progression rates in patients with nonmuscle invasive bladder cancer treated with intravesical bacillus Calmette-Guérin. *J Urol.* 2014 Feb;191(2):341-5.
41. Baltacı S, Bozlu M, Yıldırım A, et al. Significance of the interval between first and second transurethral resection on recurrence and progression rates in patients with high-risk non-muscle-invasive bladder cancer treated with maintenance intravesical Bacillus Calmette-Guérin. *BJU Int.* 2015 Nov;116(5):721-6.
42. Babjuk M, Burger M, Compérat EM, et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update. *Eur Urol.* 2019 Nov;76(5):639-657
43. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, et al. 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 Mar;49(3):466-5.
44. Brausi M, Collette L, Kurth K, et al. Variability in the recurrence rate at first follow-up cystoscopy after TUR in stage Ta T1 transitional cell carcinoma of the bladder: a combined analysis of seven EORTC studies. *Eur Urol.* 2002 May;41(5):523-31
45. Brocks CP, Büttner H, Böhle A. Inhibition of tumor implantation by intravesical gemcitabine in a murine model of superficial bladder cancer. *J Urol.* 2005 Sep;174(3):1115-8.
46. Soloway MS, Masters S. Urothelial susceptibility to tumor cell implantation: influence of cauterization. *Cancer.* 1980 Sep 1;46(5):1158-63.
47. Sylvester RJ, Oosterlinck W, Holmang S, et al. Systematic Review and Individual Patient Data Meta-analysis of Randomized Trials Comparing a Single Immediate Instillation of Chemotherapy After Transurethral Resection with Transurethral Resection Alone in Patients with Stage pTa-pT1 Urothelial Carcinoma of the Bladder: Which Patients Benefit from the Instillation? *Eur Urol.* 2016 Feb;69(2):231-44.
48. Pode D, Alon Y, Horowitz AT, et al. The mechanism of human bladder tumor implantation in an in vitro model. *J Urol.* 1986 Aug;136(2):482-6

49. Sylvester RJ, Oosterlinck W, Witjes JA. The schedule and duration of intravesical chemotherapy in patients with non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review of the published results of randomized clinical trials. *Eur Urol.* 2008 Apr;53(4):709-19.
50. Shelley MD, Kynaston H, Court J, et al. A systematic review of intravesical bacillus Calmette-Guérin plus transurethral resection vs transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer. *BJU Int.* 2001 Aug;88(3):209-16.
51. Han RF, Pan JG. Can intravesical bacillus Calmette-Guérin reduce recurrence in patients with superficial bladder cancer? A meta-analysis of randomized trials. *Urology.* 2006 Jun;67(6):1216-23.
52. Malmström PU, Sylvester RJ, Crawford DE, et al. 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 Aug;56(2):247-56.
53. Duchek M, Johansson R, Jahnson S, et al. Bacillus Calmette-Guérin is superior to a combination of epirubicin and interferon-alpha2b in the intravesical treatment of patients with stage T1 urinary bladder cancer. A prospective, randomized, Nordic study. *Eur Urol.* 2010 Jan;57(1):25-31.
54. Järvinen R, Kaasinen E, Sankila A, et al. Long-term efficacy of maintenance bacillus Calmette-Guérin versus maintenance mitomycin C instillation therapy in frequently recurrent TaT1 tumours without carcinoma in situ: a subgroup analysis of the prospective, randomised FinnBladder I study with a 20-year follow-up. *Eur Urol.* 2009 Aug;56(2):260-5.
55. Sylvester RJ, Brausi MA, Kirkels WJ, 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 May;57(5):766-73.
56. Böhle A, Bock PR. Intravesical bacille Calmette-Guérin versus mitomycin C in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology.* 2004 Apr;63(4):682-6.
57. Sylvester RJ, Van der Meijden AP, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin 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 Nov;168(5):1964-70.
58. Van der Meijden AP, Sylvester RJ, Oosterlinck W, et al. Maintenance Bacillus Calmette-Guerin 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 Oct;44(4):429-34.
59. Brausi M, Oddens J, Sylvester R, et al. Side effects of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in the treatment of intermediate- and high-risk Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder: results of the EORTC genito-urinary cancers group randomised phase 3 study comparing one-third dose with full dose and 1 year with 3 years of maintenance BCG. *Eur Urol.* 2014 Jan;65(1):69-76.
  60. Danielsson G, Malmström PU, Jahnsen S, et al. Bladder health in patients treated with BCG instillations for T1G2-G3 bladder cancer - a follow-up five years after the start of treatment. *Scand J Urol.* 2018 Oct-Dec;52(5-6):377-384.
  61. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guérin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol.* 1976 Aug;116(2):180-3.
  62. Oddens J, Brausi M, Sylvester R, et al. 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 maintenance. *Eur Urol.* 2013 Mar;63(3):462-72.
  63. Kikuchi E, Hayakawa N, Fukumoto K, et al. Bacillus Calmette-Guérin-unresponsive non-muscle-invasive bladder cancer: Its definition and future therapeutic strategies. *Int J Urol.* 2020 Feb;27(2):108-116.
  64. Kamat AM, Sylvester RJ, Böhle A, et al. Definitions, End Points, and Clinical Trial Designs for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: Recommendations From the International Bladder Cancer Group. *J Clin Oncol.* 2016 Jun 1;34(16):1935-44.
  65. Gómez Del Cañizo C, Rodríguez-Izquierdo Jiménez M, Peña Vallejo E, et al. New immunotherapies for high-risk non-muscle invasive bladder cancer: Current state and future perspectives. *Actas Urol Esp.* 2020 Nov;44(9):574-585.
  66. Balar AV, Kulkarni GS, Uchio EM, et al. Keynote 057: Phase II trial of Pembrolizumab (pembrolizumab) for patients (pts) with high-risk (HR) nonmuscle invasive bladder cancer (NMIBC) unresponsive to bacillus calmette-guérin (BCG). *J Clin Oncol.* 2019;37 Suppl 7:350.
  67. Black PC, Tangen C, Singh P, et al. Phase II trial of atezolizumab in BCG-unresponsive non-muscle invasive bladder cancer: SWOG S1605 (NCT# 02844816). *J Clin Oncol.* 2020;38 Suppl 15:5022.
  68. Wallace DM, Raghavan D, Kelly KA, et al. Neo-adjuvant (pre-emptive) cisplatin therapy in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol.* 1991 Jun;67(6):608-15.

69. Martinez-Piñeiro JA, Gonzalez Martin M, Arocena F, et al. Neoadjuvant cisplatin chemotherapy before radical cystectomy in invasive transitional cell carcinoma of the bladder: a prospective randomized phase III study. *J Urol*. 1995 Mar;153(3 Pt 2):964-73.
70. Rintala E, Hannisdahl E, Fosså SD, et al. Neoadjuvant chemotherapy in bladder cancer: a randomized study. Nordic Cystectomy Trial I. *Scand J Urol Nephrol*. 1993;27(3):355-62.
71. Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: update of a systematic review and meta-analysis of individual patient data advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration. *Eur Urol*. 2005 Aug;48(2):202-5.
72. Yin M, Joshi M, Meijer RP, et al. Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Two-Step Meta-Analysis. *Oncologist*. 2016 Jun;21(6):708-15.
73. Galsky MD, Pal SK, Chowdhury S, et al. Comparative effectiveness of gemcitabine plus cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin as neoadjuvant therapy for muscle-invasive bladder cancer. *Cancer*. 2015 Aug 1;121(15):2586-93.
74. Vetterlein MW, Wankowicz SAM, Seisen T, et al. Neoadjuvant chemotherapy prior to radical cystectomy for muscle-invasive bladder cancer with variant histology. *Cancer*. 2017 Nov 15;123(22):4346-4355.
75. Witjes JA, Bruins HM, Cathomas R, et al. European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2020 Guidelines. *Eur Urol*. 2021 Jan;79(1):82-104.
76. Necchi A, Anichini A, Raggi D, et al. Pembrolizumab as Neoadjuvant Therapy Before Radical Cystectomy in Patients With Muscle-Invasive Urothelial Bladder Carcinoma (PURE-01): An Open-Label, Single-Arm, Phase II Study. *J Clin Oncol*. 2018 Dec 1;36(34):3353-3360.
77. Powles T, Kockx M, Rodriguez-Vida A, et al. Clinical efficacy and biomarker analysis of neoadjuvant atezolizumab in operable urothelial carcinoma in the ABACUS trial. *Nat Med*. 2019 Nov;25(11):1706-1714.
78. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol*. 2001 Feb 1;19(3):666-75.
79. Hautmann RE, Abol-Enein H, Hafez K, et al. Urinary diversion. *Urology*. 2007 Jan;69(1 Suppl):17-49.

80. Ayres BE, Gillatt D, McPhail S, et al. A delay in radical cystectomy of >3 months is not associated with a worse clinical outcome. *BJU Int.* 2008 Sep;102(8):1045.
81. Gore JL, Lai J, Setodji CM, et al. Mortality increases when radical cystectomy is delayed more than 12 weeks: results from a Surveillance, Epidemiology, and End Results-Medicare analysis. *Cancer.* 2009 Mar 1;115(5):988-96.
82. Stenzl, A, Nagele U, Kuczyk M, et al. Cystectomy – Technical Considerations in Male and Female Patients. *EAU Update Series*, 2005. 3: 138-146.
83. Dhar NB, Klein EA, Reuther AM, et al. Outcome after radical cystectomy with limited or extended pelvic lymph node dissection. *J Urol.* 2008 Mar;179(3):873-8.
84. Zlotta AR. Limited, extended, superextended, megaextended pelvic lymph node dissection at the time of radical cystectomy: what should we perform? *Eur Urol.* 2012 Feb;61(2):243-4.
85. Bruins HM, Veskimae E, Hernandez V, et al. The impact of the extent of lymphadenectomy on oncologic outcomes in patients undergoing radical cystectomy for bladder cancer: a systematic review. *Eur Urol.* 2014 Dec;66(6):1065-77.
86. Gschwend JE, Heck MM, Lehmann J, et al. Extended Versus Limited Lymph Node Dissection in Bladder Cancer Patients Undergoing Radical Cystectomy: Survival Results from a Prospective, Randomized Trial. *Eur Urol.* 2019 Apr;75(4):604-611.
87. Novara G, Catto JW, Wilson T, et al. Systematic review and cumulative analysis of perioperative outcomes and complications after robot-assisted radical cystectomy. *Eur Urol.* 2015 Mar;67(3):376-401.
88. Parekh DJ, Reis IM, Castle EP, et al. Robot-assisted radical cystectomy versus open radical cystectomy in patients with bladder cancer (RAZOR): an open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet.* 2018 Jun 23;391(10139):2525-2536
89. Giacalone NJ, Shipley WU, Clayman RH, et al. Long-term Outcomes After Bladder-preserving Tri-modality Therapy for Patients with Muscle-invasive Bladder Cancer: An Updated Analysis of the Massachusetts General Hospital Experience. *Eur Urol.* 2017 Jun;71(6):952-960.
90. Ploussard G, Daneshmand S, Efstathiou JA, et al. Critical analysis of bladder sparing with trimodal therapy in muscle-invasive bladder cancer: a systematic review. *Eur Urol.* 2014 Jul;66(1):120-37.

91. Leow JJ, Martin-Doyle W, Rajagopal PS, et al. Adjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer: a 2013 updated systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Eur Urol*. 2014 Jul;66(1):42-54.
92. Rosenberg JE, Carroll PR, Small EJ. Update on chemotherapy for advanced bladder cancer. *J Urol*. 2005 Jul;174(1):14-20.
93. Sternberg CN, Vogelzang NJ. Gemcitabine, paclitaxel, pemetrexed and other newer agents in urothelial and kidney cancers. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003 Jun 27;46 Suppl:S105-15.
94. Von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Jul 20;23(21):4602-8.
95. Von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, et al. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol*. 2000 Sep;18(17):3068-77.
96. Bellmunt J, von der Maase H, Mead GM, et al. Randomized phase III study comparing paclitaxel/cisplatin/gemcitabine and gemcitabine/cisplatin in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer without prior systemic therapy: EORTC Intergroup Study 30987. *J Clin Oncol*. 2012 Apr 1;30(10):1107-13.
97. Galsky MD, Hahn NM, Rosenberg J, et al. Treatment of patients with metastatic urothelial cancer "unfit" for Cisplatin-based chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2011 Jun 10;29(17):2432-8.
98. De Santis M, Bellmunt J, Mead G, et al. Randomized phase II/III trial assessing gemcitabine/ carboplatin and methotrexate /carboplatin /vinblastine in patients with advanced urothelial cancer "unfit" for cisplatin-based chemotherapy: phase II--results of EORTC study 30986. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 20;27(33):5634-9.
99. Powles T, Park SH, Voog E, et al. Avelumab Maintenance Therapy for Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*. 2020 Sep 24;383(13):1218-1230.
100. Balar AV, Castellano D, O'Donnell PH, et al. First-line pembrolizumab in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and unresectable or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-052): a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2017 Nov;18(11):1483-1492.
101. Balar AV, Galsky MD, Rosenberg JE, et al. Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and

- metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*. 2017 Jan 7;389(10064):67-76.
102. Albers P, Park SI, Niegisch G, et al. Randomized phase III trial of 2nd line gemcitabine and paclitaxel chemotherapy in patients with advanced bladder cancer: short-term versus prolonged treatment [German Association of Urological Oncology (AUO) trial AB 20/99]. *Ann Oncol*. 2011 Feb;22(2):288-94.
  103. Fradet Y, Bellmunt J, Vaughn DJ, et al. Randomized phase III KEYNOTE-045 trial of pembrolizumab versus paclitaxel, docetaxel, or vinflunine in recurrent advanced urothelial cancer: results of >2 years of follow-up. *Ann Oncol*. 2019 Jun 1;30(6):970-976.
  104. Vaughn DJ, Bellmunt J, Fradet Y, et al. Health-Related Quality-of-Life Analysis From KEYNOTE-045: A Phase III Study of Pembrolizumab Versus Chemotherapy for Previously Treated Advanced Urothelial Cancer. *J Clin Oncol*. 2018 Jun 1;36(16):1579-1587.
  105. Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal of Clinicians*, 65 (1), 5–29.
  106. Burnet FM. The concept of immunologic surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13:1-27.
  107. Thomas L. Discussion. In: Lawrence H.S., editor. *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*. Hoeber-Harper; New York, NY, USA: 1959. pp. 529–533.
  108. Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science*. 1974 Feb 8;183(4124):534-6.
  109. Mumberg D, Wick M, Schreiber H. Unique tumor antigens redefined as mutant tumor-specific antigens. *Semin Immunol*. 1996 Oct;8(5):289-93.
  110. Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991 Dec 13;254(5038):1643-7.
  111. Aptsiauri N, Cabrera T, Garcia-Lora A, et al. MHC class I antigens and immune surveillance in transformed cells. *Int Rev Cytol*. 2007;256:139-89.
  112. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999 Jul 30;285(5428):727-9.

113. Groh V, Bahram S, Bauer S, et al. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 29;93(22):12445-50.
114. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, et al. Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. *Int J Cancer*. 2003 Apr 10;104(3):354-61.
115. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):991-8.
116. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1565-70.
117. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol*. 2006;90:1-50.
118. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 2007 Dec 6;450(7171):903-7.
119. Restifo NP, Antony PA, Finkelstein SE, et al. Assumptions of the tumor 'escape' hypothesis. *Semin Cancer Biol*. 2002 Feb;12(1):81-6.
120. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329-60.
121. Liu Y, Cao X. Immunosuppressive cells in tumor immune escape and metastasis. *J Mol Med (Berl)*. 2016 May;94(5):509-22.
122. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev*. 2001 Aug;182:18-32.
123. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, et al. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol*. 2000;74:181-273.
124. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002 Oct 17;419(6908):734-8.
125. Okazaki T, Honjo T. The PD-1/PDL-1 pathway in immunological tolerance. *TRENDS in Immunology* 2006, 27: 195-201.
126. Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem*. 1990;59:253-88.

127. Shawar SM, Vyas JM, Rodgers JR, et al. Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:839-80.
128. Townsend A, Elliott T, Cerundolo V, et al. Assembly of MHC class I molecules analyzed in vitro. *Cell.* 1990 Jul 27;62(2):285-95.
129. Yang Y. Generation of major histocompatibility complex class I antigens. *Microbes Infect.* 2003 Jan;5(1):39-47.
130. Johnsen AK, Templeton DJ, Sy M, et al. Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis. *J Immunol.* 1999 Oct 15;163(8):4224-31.
131. Cresswell P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:259-93.
132. Crowley NJ, Darrow TL, Quinn-Allen MA, et al. MHC-restricted recognition of autologous melanoma by tumor-specific cytotoxic T cells. Evidence for restriction by a dominant HLA-A allele. *J Immunol.* 1991 Mar 1;146(5):1692-9.
133. Aptsiauri N, Cabrera T, Mendez R, Garcia, et al. Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression. *Adv Exp Med Biol.* 2007;601:123-31.
134. Campoli M, Chang CC, Ferrone S. HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection. *Vaccine.* 2002 Dec 19;20 Suppl 4:A40-5.
135. Chang CC, Campoli M, Restifo NP, et al. Immune selection of hot-spot beta 2-microglobulin gene mutations, HLA-A2 allospecificity loss, and antigen-processing machinery component down-regulation in melanoma cells derived from recurrent metastases following immunotherapy. *J Immunol.* 2005 Feb 1;174(3):1462-71.
136. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today.* 1997 Feb;18(2):89-95.
137. Ploegh HL. Viral strategies of immune evasion. *Science.* 1998 Apr 10;280(5361):248-53.
138. Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol.* 2003 Jun;195(3):346-55.
139. Seliger B, Cabrera T, Garrido F, et al. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol.* 2002 Feb;12(1):3-13.

140. Bernal M, Ruiz-Cabello F, Concha A, et al. Implication of the  $\beta$ 2-microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes. *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Sep;61(9):1359-71.
141. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today.* 2000 Sep;21(9):455-64.
142. Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol.* 2008 Aug;8(8):607-18.
143. Méndez R, Rodríguez T, Del Campo A, et al. Characterization of HLA class I altered phenotypes in a panel of human melanoma cell lines. *Cancer Immunol Immunother.* 2008 May;57(5):719-29.
144. Mendez R, Aptsiauri N, Del Campo A, et al. HLA and melanoma: multiple alterations in HLA class I and II expression in human melanoma cell lines from ESTDAB cell bank. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Sep;58(9):1507-15.
145. Garrido F, Cabrera T, Aptsiauri N. "Hard" and "soft" lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. *Int J Cancer.* 2010 Jul 15;127(2):249-56.
146. Romero JM, Jiménez P, Cabrera T, et al. Coordinated downregulation of the antigen presentation machinery and HLA class I/ $\beta$ 2-microglobulin complex is responsible for HLA-ABC loss in bladder cancer. *Int J Cancer.* 2005 Feb 10;113(4):605-10.
147. López-Nevot MA, Esteban F, Ferrón A, et al. HLA class I gene expression on human primary tumours and autologous metastases: demonstration of selective losses of HLA antigens on colorectal, gastric and laryngeal carcinomas. *Br J Cancer.* 1989 Feb;59(2):221-6.
148. Garrido F, Algarra I. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res* 2001;83:117-58.
149. Martini M, Testi MG, Pasetto M, et al. IFN-gamma-mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. *Vaccine.* 2010 Apr 30;28(20):3548-57.
150. Rodríguez T, Méndez R, Del Campo A, et al. Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. *BMC Cancer.* 2007 Feb 23;7:34.
151. Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, et al. Rexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer.* 2001 Oct 15;94(2):243-51.

152. Maleno I, Cabrera CM, Cabrera T, et al. Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Immunogenetics*. 2004 Jul;56(4):244-53.
153. Maleno I, Romero JM, Cabrera T, et al. LOH at 6p21.3 region and HLA class I altered phenotypes in bladder carcinomas. *Immunogenetics*. 2006 Jul;58(7):503-10.
154. Jiménez P, Cabrera T, Méndez R, et al. A nucleotide insertion in exon 4 is responsible for the absence of expression of an HLA-A\*0301 allele in a prostate carcinoma cell line. *Immunogenetics*. 2001 Sep;53(7):606-10
155. Rosa F, Berissi H, Weissenbach J, et al. The beta2-microglobulin mRNA in human Daudi cells has a mutated initiation codon but is still inducible by interferon. *EMBO J*. 1983;2(2):239-43.
156. D'Urso CM, Wang ZG, Cao Y, et al. Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression. *J Clin Invest*. 1991 Jan;87(1):284-92.
157. Browning M, Petronzelli F, Bicknell D, et al. Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tissue Antigens*. 1996 May;47(5):364-71.
158. Cabrera CM, Jiménez P, Cabrera T, et al. Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens*. 2003 Mar;61(3):211-9.
159. Hsieh CH, Hsu YJ, Chang CC, et al. Total HLA class I loss in a sarcomatoid renal carcinoma cell line caused by the coexistence of distinct mutations in the two encoding beta2-microglobulin genes. *Cancer Immunol Immunother*. 2009 Mar;58(3):395-408.
160. Chen HL, Gabrilovich D, Tampé R, et al. A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nat Genet*. 1996 Jun;13(2):210-3.
161. Seliger B, Ritz U, Abele R, et al. Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway. *Cancer Res*. 2001 Dec 15;61(24):8647-50.
162. Rodriguez T, Méndez R, Roberts CH, et al. High frequency of homozygosity of the HLA region in melanoma cell lines reveals a pattern compatible with extensive loss of heterozygosity. *Cancer Immunol Immunother*. 2005 Feb;54(2):141-8.

163. Garrido F, Aptsiauri N, Doorduijn EM, et al. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2016 Apr;39:44-51.
164. Perea F, Bernal M, Sánchez-Palencia A, et al. The absence of HLA class I expression in non-small cell lung cancer correlates with the tumor tissue structure and the pattern of T cell infiltration. *Int J Cancer*. 2017 Feb 15;140(4):888-899.
165. Garrido F, Perea F, Bernal M, et al. The Escape of Cancer from T Cell-Mediated Immune Surveillance: HLA Class I Loss and Tumor Tissue Architecture. *Vaccines (Basel)*. 2017 Feb 27;5(1):7.
166. Hams E, Aviello G, Fallon PG. The schistosoma granuloma: friend or foe? *Front Immunol*. 2013 Apr 15;4:89.
167. Kaneko K, Ishigami S, Kijima Y, et al. Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer. *BMC Cancer*. 2011 Oct 20;11:454.
168. Morabito A, Dozin B, Salvi S, et al. Analysis and clinical relevance of human leukocyte antigen class I, heavy chain, and beta2-microglobulin downregulation in breast cancer. *Hum Immunol*. 2009 Jul;70(7):492-5.
169. Madjd Z, Spendlove I, Pinder SE, et al. Total loss of MHC class I is an independent indicator of good prognosis in breast cancer. *Int J Cancer*. 2005 Nov 1;117(2):248-55.
170. Kikuchi E, Yamazaki K, Torigoe T, et al. HLA class I antigen expression is associated with a favorable prognosis in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*. 2007 Sep;98(9):1424-30.
171. Levin I, Klein T, Goldstein J, et al. Expression of class I histocompatibility antigens in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in relation to survival. *Cancer*. 1991 Dec 15;68(12):2591-4.
172. Cabrera T, Pedrajas G, Cozar JM, et al. HLA class I expression in bladder carcinomas. *Tissue Antigens*. 2003 Oct;62(4):324-7.
173. Aptsiauri N, M. García-Lora, and T. Cabrera. *MHC Class I Antigens In Malignant Cells: Immune Escape and Response to Immunotherapy*. 2013. Springer.
174. Wang E, Monaco A, Monsurró V, et al. Antitumor vaccines, immunotherapy and the immunological constant of rejection. *IDrugs*. 2009 May;12(5):297-301.
175. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med*. 2004 Sep;10(9):909-15.

176. Schlom J. Recent advances in therapeutic cancer vaccines. *Cancer Biother Radiopharm.* 2012 Feb;27(1):2-5.
177. Cabrera T, Lara E, Romero JM, et al. HLA class I expression in metastatic melanoma correlates with tumor development during autologous vaccination. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 May;56(5):709-17.
178. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006 Oct;6(10):715-27.
179. Carretero R, Romero JM, Ruiz-Cabello F, et al. Analysis of HLA class I expression in progressing and regressing metastatic melanoma lesions after immunotherapy. *Immunogenetics.* 2008 Aug;60(8):439-47.
180. Carretero R, Cabrera T, Gil H, et al. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of bladder cancer induces selection of human leukocyte antigen class I-deficient tumor cells. *Int J Cancer.* 2011 Aug 15;129(4):839-46.
181. Carosella ED, Ploussard G, LeMaoult J, et al. A Systematic Review of Immunotherapy in Urologic Cancer: Evolving Roles for Targeting of CTLA-4, PD-1/PD-L1, and HLA-G. *Eur Urol.* 2015 Aug;68(2):267-79.
182. Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJ, et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity.* 2002 Aug;17(2):201-10.
183. Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev.* 2009 May;229(1):12-26.
184. Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:65-97.
185. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:233-58.
186. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016 Feb;39(1):98-106.
187. Vaddepally RK, Kharel P, Pandey R, et al. Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers (Basel).* 2020 Mar 20;12(3):738.
188. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015 Jul 2;373(1):23-34.

189. Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF, et al. Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in first-line treatment for advanced renal cell carcinoma: extended follow-up of efficacy and safety results from a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2019 Oct;20(10):1370-1385.
190. Modest DP, Pant S, Sartore-Bianchi A. Treatment sequencing in metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2019 Mar;109:70-83.
191. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000 Oct 2;192(7):1027-34.
192. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med.* 2001 Apr 2;193(7):839-46.
193. Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002 Aug;8(8):793-800.
194. Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, et al. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol.* 2013 Dec;14(12):1212-8.
195. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12:492-499.
196. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015 Apr;16(4):375-84.
197. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015 Jul 9;373(2):123-35.
198. Antonia SJ, López-Martin JA, Bendell J, et al. Nivolumab alone and nivolumab plus ipilimumab in recurrent small-cell lung cancer (CheckMate 032): a multicentre, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet Oncol.* 2016 Jul;17(7):883-895.
199. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2015 Nov 5;373(19):1803-13.
200. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2015 Jan 22;372(4):311-9.

201. Ferris RL, Blumenschein G Jr, Fayette J, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2016 Nov 10;375(19):1856-1867.
202. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2017 Sep;18(9):1182-1191.
203. El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet*. 2017 Jun 24;389(10088):2492-2502.
204. Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, et al. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Mar;18(3):312-322.
205. Robert C, Ribas A, Wolchok JD, et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet*. 2014 Sep 20;384(9948):1109-17.
206. Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016 Apr 9;387(10027):1540-1550.
207. Seiwert TY, Burtness B, Mehra R, Weiss J, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol*. 2016 Jul;17(7):956-965.
208. Chen R, Zinzani PL, Fanale MA, et al. Phase II Study of the Efficacy and Safety of Pembrolizumab for Relapsed/Refractory Classic Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2017 Jul 1;35(19):2125-2132.
209. Fuchs CS, Doi T, Jang RW, et al. Safety and Efficacy of Pembrolizumab Monotherapy in Patients With Previously Treated Advanced Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer: Phase 2 Clinical KEYNOTE-059 Trial. *JAMA Oncol*. 2018 May 10;4(5):e180013.
210. Chung HC, Ros W, Delord JP, et al. Efficacy and Safety of Pembrolizumab in Previously Treated Advanced Cervical Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol*. 2019 Jun 10;37(17):1470-1478.
211. Zhu AX, Finn RS, Edeline J, et al. Pembrolizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib (KEYNOTE 224):

- a non-randomised, open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2018 Jul;19(7):940-952.
212. Rini BI, Plimack ER, Stus V, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2019 Mar 21;380(12):1116-1127.
213. Migden MR, Rischin D, Schmultz CD, et al. PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2018 Jul 26;379(4):341-351.
214. Kaufman HL, Russell J, Hamid O, et al. Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016 Oct;17(10):1374-1385.
215. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, et al. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2019 Mar 21;380(12):1103-1115.
216. Massard C, Gordon MS, Sharma S, et al. Safety and Efficacy of Durvalumab (MEDI4736), an Anti-Programmed Cell Death Ligand-1 Immune Checkpoint Inhibitor, in Patients With Advanced Urothelial Bladder Cancer. *J Clin Oncol.* 2016 Sep 10;34(26):3119-25.
217. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N Engl J Med.* 2018 Dec 13;379(24):2342-2350.
218. Von Pawel J, Bordoni R, Satouchi M, et al. Long-term survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with atezolizumab versus docetaxel: Results from the randomised phase III OAK study. *Eur J Cancer.* 2019 Jan;107:124-132.
219. Horn L, Mansfield AS, Szczyńska A, et al. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018 Dec 6;379(23):2220-2229.
220. Schmid P, Adams S, Rugo HS, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018 Nov 29;379(22):2108-2121.
221. Rodig SJ, Gusenleitner D, Jackson DG, et al. MHC proteins confer differential sensitivity to CTLA-4 and PD-1 blockade in untreated metastatic melanoma. *Sci Transl Med.* 2018;10(450):pii: eaar3342.
222. Garrido F, Cabrera T, Accolla RS, et al. HLA and cancer: 12th International Histocompatibility Workshop study. In: Charron D, ed. Genetic diversity of HLA. Functional and medical implication. In: Proceedings of the 12th

international histocompatibility workshop and conference, Vol. II. Sevres: EDK; 1997. pp. 445–52.

223. Perea F, Sanchez-Palencia A, Gomez-Morales M, et al. HLA class I loss and PD-L1 expression in lung cancer: impact on T-cell infiltration and immune escape. *Oncotarget*. 2018;9(3):4120–33.
224. Aptsiauri N, Ruiz-Cabello F, Garrido F. The transition from HLA-I positive to HLA-I negative primary tumors: the road to escape from T-cell responses. *Curr Opin Immunol*. 2018;51:123–32.
225. Maleno I, Aptsiauri N, Cabrera T, et al. Frequent loss of heterozygosity in the b2-microglobulin region of chromosome 15 in primary human tumors. *Immunogenetics*. 2011;63(2):65–71.
226. Stenehjem D, Tran D, Nkrumah MA, et al. PD1/PDL1 inhibitors for the treatment of advanced urothelial bladder cancer. *Onco Targets Ther*. 2018;11: 5973–5989.
227. Ghatalia P, Zibelman M, Geynisman DM, et al. Approved checkpoint inhibitors in bladder cancer: which drug should be used when? *Ther Adv Med Oncol*. 2018;10: 1758835918788310.
228. Gettinger S, Choi J, Hastings K, et al. Impaired HLA class I antigen processing and presentation as a mechanism of acquired resistance to immune checkpoint inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov*. 2017;7(12):1420–35.
229. Galatica Z, Snyder C, Maney T, et al. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer Epidemiol Biomark Prevent*. 2014;23(12):2965–70.
230. Umemoto Y, Okano S, Matsumoto Y, et al. Prognostic impact of programmed cell death 1 ligand 1 expression in human leukocyte antigen class I-positive hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *J Gastroenterol*. 2015;50(1):65–75.
231. Ryschich E, Notzel T, Hinz U, et al. Control of T-cell-mediated immune response by HLA class I in human pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11(2 Pt 1):498–504.
232. Sabbatino F, Villani V, Yearley JH, et al. PD-L1 and HLA Class I antigen expression and clinical course of the disease in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2016;22(2):470–78.
233. Del Campo AB, Kyte JA, Carretero J, et al. Immune escape of cancer cells with beta2-microglobulin loss over the course of metastatic melanoma. *Int J Cancer*. 2014;134(1):102–13

234. Flores-Martín JF, Perea F, Exposito-Ruiz M, et al. A Combination of Positive Tumor HLA-I and Negative PD-L1 Expression Provides an Immune Rejection Mechanism in Bladder Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2019 Aug;26(8):2631-2639.



# ANEXOS



## ANEXOS

### 1. **Producción científica derivada de la tesis**

- **1 artículo publicado en revista internacional con factor de impacto**
  - Flores-Martín JF, Perea F, Exposito-Ruiz M, et al. A Combination of Positive Tumor HLA-I and Negative PD-L1 Expression Provides an Immune Rejection Mechanism in Bladder Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2019 Aug;26(8):2631-2639.
    - ISSN: 1068-9265
    - Factor de Impacto 2019: 4,179
    - Q1 de Cirugía y Q2 de Oncología
  
- **3 comunicaciones o posters en congresos regionales, nacionales o internacionales**
  - **La combinación de HLA-I positivo y de PD-L1 negativo en células tumorales, proporciona un mecanismo de rechazo inmune en cáncer de vejiga.** José Francisco Flores-Martín, Francisco Perea, Manuela Exposito-Ruiz, Francisco Javier Carretero, Teresa Rodríguez, Marina Villamediana Abad, Francisco Ruiz-Cabello, Juan Moreno Jimenez , Federico Garrido , José Manuel Cózar-Olmo , Natalia Aptsiauri. Congreso Andaluz de Urología 2019.
  - **A combination of positive tumor HLA-I and negative PD-L1 expression provides an immune rejection mechanism in bladder cancer.** Flores Martín J., Salas Moreno M.C.<sup>1</sup>, Ramos Alaminos C.I., Perea F., Expósito-Ruiz M., Javier Carretero F., Rodríguez T., Villamediana Abad M., Ruiz-Cabello F. Garrido F., Cózar-Olmo J.M., Moreno Jiménez J., Aptsiauri N. Congreso Europeo de Urología 2020. Amsterdam.
  - **La combinación de HLA-I y PD-L1 en tumores vesicales como nuevo biomarcador predictivo de invasividad tumoral.** Flores Martín, J.F.; Perea, F.; Exposito Ruiz, M.; Carretero, F.J.; Rodríguez, T.; Villamediana Abad, M.; Ruiz Cabello, F.; Moreno Jimenez, J.; Garrido, F.; Cozar Olmo, J.M.; Aptsiauri, N. Grupo de Urología Oncologica 2020
  
- **1 premio en congreso a nivel regional**
  - *Primer premio a la mejor comunicación oral:* **La combinación de HLA-I positivo y de PD-L1 negativo en células tumorales, proporciona un mecanismo de rechazo inmune en cáncer de vejiga.** José Francisco Flores-Martín y cols. Congreso Andaluz de Urología 2019.

## 2. Lista de tablas, gráficos y figuras

### Introducción

- **Tabla 1:** Clasificación TNM
- **Tabla 2:** Grupos de riesgo TVNMI
- **Figura 1:** Reconocimiento de la Célula tumoral por el LTC
- **Figura 2:** Fases de la Inmunoedición
- **Figura 3:** Estructura del HLA-I
- **Figura 4:** Maquinaria de procesamiento antigénico
- **Figura 5:** Fenotipos alterados de HLA-I
- **Figura 6:** Cambios en la arquitectura tumoral durante la respuesta del sistema inmune
- **Figura 7:** Inmunoselección tumoral
- **Figura 8:** Mecanismo de acción de CTLA-4
- **Figura 9:** Mecanismo de acción de PD1 y PD-L1
- **Figura 10:** Bloqueo de las vías CTLA-4 y PD-1

### Material y Métodos

- **Tabla 1:** Características clínico-patológicas de los pacientes del estudio

### Resultados

- **Figura 1:** Imágenes representativas de la inmunotinción de una de las muestras de cáncer de vejiga con anticuerpos dirigidos contra HLA-I (mAb w6 / 32), PD-L1, CD8.
- **Figura 2:** Imágenes representativas de inmunotinción de una de las muestras de cáncer de vejiga con anticuerpos dirigidos contra HLA-I (mAb w6 / 32), PD-L1, PD-1, CD8, CXCR4.
- **Tabla 1:** Resumen del análisis inmunohistoquímico de los tumores de vejiga con diferentes tipos de anticuerpos.
- **Tabla 2:** Correlación entre la expresión de HLA de clase I y la infiltración tumoral con linfocitos T CD3 + y CD8 +.
- **Gráfico 1:** Expresión gráfica de la correlación entre la expresión de HLA de clase I y la infiltración tumoral con linfocitos T CD3 + y CD8 +.
- **Tabla 3:** Correlación entre la infiltración inmunitaria tumoral y la expresión de PD1.
- **Gráfico 2:** Expresión gráfica de la correlación entre la infiltración inmunitaria tumoral y la expresión de PD1.
- **Tabla 4:** Correlación entre la infiltración inmunitaria tumoral y la expresión de PD-L1.
- **Gráfico 3:** Expresión gráfica de la correlación entre la infiltración inmunitaria tumoral y la expresión de PD-L1.
- **Tabla 5:** Correlación entre la expresión de HLA de clase I y la expresión de PD-L1
- **Gráfico 4:** Expresión gráfica de la correlación entre la expresión de HLA de clase I y la expresión de PD-L1.

- **Tabla 6:** Correlación entre la expresión de HLA de clase I y la expresión de PD 1.
- **Gráfico 5:** Expresión gráfica de la correlación entre la expresión de HLA de clase I y la expresión de PD1.
- **Tabla 7:** Correlación entre la expresión de PD-L1 y la expresión de PD 1
- **Gráfico 6:** Expresión gráfica de la correlación entre la expresión de PD-L1 y la expresión de PD-L1.
- **Tabla 8:** Correlación entre el estadio y la expresión de PD-L1
- **Gráfico 7:** Expresión gráfica de la correlación entre el estadio y la expresión de PD-L1.
- **Tabla 9:** Correlación entre el estadio y el infiltrado linfocitario
- **Gráfico 8:** Expresión gráfica de la correlación entre el estadio y el infiltrado linfocitario
- **Tabla 10:** Incidencia de tumores con diferentes expresiones del fenotipo HLA-I/PD-L1.
- **Gráfico 9:** Expresión gráfica de la Incidencia de tumores con diferentes expresiones del fenotipo HLA-I/PD-L1.
- **Tabla 11:** Correlación entre HLA-I positivo / heterogéneo y PD-L1 positivo / heterogéneo con la infiltración de linfocitos
- **Tabla 12:** Correlación entre HLA-I positivo / heterogéneo y PD-L1 positivo / heterogéneo con CXCR4.
- **Tabla 13:** Correlación entre HLA-I positivo / heterogéneo y PD-L1 positivo / heterogéneo con PD-1.
- **Tabla 14:** Correlación entre HLA-I positivo / heterogéneo y PD-L1 positivo / heterogéneo con el estadio
- **Gráfico 10:** Expresión gráfica de la correlación entre HLA-I positivo / heterogéneo y PD-L1 positivo / heterogéneo con el estadio.
- **Tabla 15:** Correlación entre HLA-I positivo / heterogéneo y PD-L1 negativo con el estadio.
- **Gráfico 11:** Expresión gráfica de la correlación entre HLA-I positivo / heterogéneo y PD-L1 negativo con el estadio.
- **Tabla 16:** Correlación entre HLA-I negativo y PD-L1 negativo con la infiltración de linfocitos

## Discusión

- **Figura 1:** Correlación entre el inmunofenotipo de coexpresión de HLA-I y PD-L1 y el estadio de progresión del cáncer de vejiga
- **Figura 2:** Representación esquemática del papel de la expresión de HLA-I y PD-L1 en el tumor en el rechazo y / o escape inmunológico del cáncer

