



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Doctorado en Cirugía y Ciencias Morfológicas.

**PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA
AL TRATAMIENTO CON BCG
ENDOVESICAL EN PACIENTES
CON CARCINOMA VESICAL NO
MÚSCULO INVASIVO DE ALTO
RIESGO.**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:
ROBERTO HUGO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ



Departamento de Cirugía

Programa de Doctorado de Cirugía y Ciencias Morfológicas.

Facultad de Medicina

**PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON
BCG ENDOVESICAL EN PACIENTES CON CARCINOMA VESICAL NO
MÚSCULO INVASIVO DE ALTO RIESGO.**

Tesis Doctoral presentada por:

Roberto Hugo Martínez Rodríguez

Para optar al título de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad

Autónoma de Barcelona.

Barcelona, 2021

DIRECTORES

Juan Morote Robles

Cecilia Cabrera Navarro

TUTOR

Juan Morote Robles.



El Dr. Juan Morote Robles, catedrático de la Universidad Autónoma de Barcelona y consultor senior del servicio de urología del Hospital Universitario Vall d'Hebron y la Dra. Cecilia Cabrera Navarro, investigadora del instituto de investigación IRSI Caixa.

Certifican:

Que la tesis doctoral titulada “Predicción de la respuesta al tratamiento con BCG endovesical en pacientes con carcinoma vesical no musculo invasivo de alto riesgo”, presentada por D. Roberto Hugo Martínez Rodríguez, ha sido realizada bajo su dirección y cumple los requisitos formales y científicos para su defensa pública.

Para que conste a tales efectos, firmamos la presente certificación en Barcelona,.....

Dr. Juan Morote Robles

Dra. Cecilia Cabrera Navarro

“Jamás se desvía uno tan lejos como cuando cree conocer el camino”.

(Proverbio chino)

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	12
INDICE DE ACRONIMOS	14
RESUMEN	16
INTRODUCCION	26
1. Epidemiología de los tumores vesicales	28
2. Diagnóstico de los tumores vesicales	29
3. Clasificación y estadiaje de los tumores vesicales	31
4. Tumor vesical no musculo invasivo de alto riesgo	35
4.1 Definición y características	
4.2 Tratamiento	
4.3 Evolución	
5. Bases inmunológicas	39
5.1 Sistema inmunológico	
5.2 Inmunoterapia	
5.2.1 Tipos de inmunoterapia	
6. Inmunoterapia y tumor vesical	46
7. Inmunoterapia endovesical con BCG. Mecanismo de acción; dosis; esquema de tratamiento y toxicidad asociada.	48
7.1 Inmunoterapia endovesical mediante BCG.	
7.2 Mecanismo acción BCG.	
7.3 Dosificación, esquema de tratamiento y toxicidad asociada.	
8. Marcadores de respuesta al tratamiento inmunológico	52
9. Justificación del proyecto	55

HIPOTESIS	58
OBJETIVOS	62
MATERIAL Y METODOS	66
1. Publicación 1.	68
1.1. Diseño del estudio y pacientes.	
1.2. Intervención.	
1.3. Análisis estadístico.	
1.4. Consideraciones éticas.	
2. Publicación 2.	74
2.1. Diseño del estudio y pacientes	
2.2. Intervención.	
2.3. Análisis estadístico.	
2.4. Consideraciones éticas.	
RESULTADOS	78
Publicación 1	
Publicación 2	
DISCUSION	110
CONCLUSIONES	124

ANEXO	128
1. Autorizaciones de comités éticos de investigación	
2. Autorización de presentación de tesis doctoral como compendio de publicaciones	
3. Otras publicaciones relacionadas	
BIBLIOGRAFIA	144

AGRADECIMIENTOS

Quiero iniciar este capítulo agradeciendo a mis padres, Pedro y Marcela, el enorme esfuerzo y dedicación empleados en mi educación. Esfuerzo plenamente comprendido cuando la vida te regala la paternidad, poniéndote entonces en su lugar.

A mis abuelos José, Emilia y Basilisa; y a mi tía Lucia, por su apoyo y amor desinteresado.

A mis hermanos Pedro y Virginia, a mi lado siempre.

Agradezco a Joan Palou y Jorge Huguet el haber sembrado en mis años de residencia la pasión por el tumor vesical. A Xavier Ponce de León y Jorge Caffaratti, maestros y amigos, por mostrarme la mejor cara de esta profesión.

A Josep María Saladié, a Luis Ibarz y a Joan Areal, por haber confiado en mí y permitirme desarrollar la investigación durante mis años en Can Ruti. Así como a los compañeros de ese servicio de urología por su apoyo: Oscar Buisan, Montserrat Arzoz, Jose Luis Gago, Mario Alves, Fernando Agreda; Xavi Elias y especialmente a Carlos González, maestro, compañero y amigo.

A Gustavo Tapia por su implicación desde el inicio. A los investigadores de IRSICAixa, especialmente a Cecilia Cabrera Navarro, que supo dar forma a las diferentes ideas que iban surgiendo, materializándolas en proyectos tangibles y viables.

A Juan Morote, sin cuya ayuda y dedicación esto no hubiera sido posible; por su disponibilidad, por su ánimo y por su visión crítica tan necesaria en este proyecto. Gracias a José H. Amón por darme la oportunidad de continuar investigando en el hospital Rio Hortega de Valladolid, y a Antonio Rodríguez Toves por su constante aliento y apoyo para finalizar esta tesis.

Gracias Cristina. Compañera de viaje, cómplice de esta aventura y del resto. Por duro que sea el camino, al teu costat es molt millor.

Dedicado a Hugo y Celia, el mejor regalo del mundo.

INDICE DE ACRONIMOS

BCG: Bacilo Calmette Guerin

CMH: Complejo Mayor de histocompatibilidad.

CMH II: Complejo Mayor de histocompatibilidad tipo II.

CNK: Células Natural Killer

CIS: Carcinoma in situ

EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer.

GATA-3+: Factor de transcripción para la diferenciación de linfocito CD4+ hacia la subpoblación Th2.

GTR: Cociente GATA-3+ (Th2) /T-bet+ (Th1)

IC: Intervalo de confianza

IL: Interleukina

INF: Interferón.

LAK células: Linfocitos activated killers.

LTC: Linfocitos grandes granulares

MAF: factor activador de macrófagos.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PUNLMP: Tumores papilares uroteliales de bajo potencial de malignidad.

RTU: Resección transuretral

RNL: Cociente neutrófilo linfocito

RPL: Cociente plaqueta linfocito.

SLE: Supervivencia libre de enfermedad.

T bet+: Factor de transcripción para la diferenciación de linfocito CD4+ hacia la subpoblación Th1.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

Th1: Linfocito T helper sub Tipo 1

Th2: Linfocito T helper sub Tipo 2

TIL: tumor infiltrating lymphocytes o linfocitos infiltrantes de tumores

TCU: Tomografía computarizada con urografía.

TVNMI: tumor vesical no músculo invasivo.

TVMI: Tumor vesical músculo invasivo.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

VPP: Valor predictivo positivo.

VPN: Valor predictivo negativo.

RESUMEN

Introducción

El cáncer de vejiga es el quinto tumor maligno más frecuente en países industrializado después de los tumores de próstata, pulmón, colorrectal y de estómago. Aproximadamente 357.000 nuevos casos anuales se diagnostican en todo el mundo (274.000 en hombres y 83.000 en mujeres). La presentación más frecuente es el tumor vesical no musculo invasivo. Después de su exéresis endoscópica y en función de características morfológicas (tamaño, numero de tumores, localización) y anátomo-patológicas (grado, estadio y presencia de carcinoma in situ) se establecen grupos de riesgo según su probabilidad de recurrencia y/o progresión.

En aquellos tumores de alto riesgo está indicado el tratamiento complementario mediante inmunoterapia. Esta consiste en instilaciones endovesicales de BCG, con una pauta predefinida y dividida en dos fases, inducción y mantenimiento. No obstante, esto no es garantía de éxito y las recurrencias y o progresiones ocurren hasta en un 30% de los pacientes. Cuando esta recidiva se produce de forma precoz, durante la fase de inducción, las guías europeas y americanas de urología aconsejan considerar el tratamiento radical mediante cistectomía precoz ya que la respuesta a una segunda tanda de inducción es limitada.

Con el fin de poder ofrecer un tratamiento personalizado óptimo; evitando efectos secundarios indeseados de terapias que no serán efectivas, minimizando la demora del tratamiento definitivo y disminuyendo así el riesgo de progresión

y/o diseminación de la enfermedad, la búsqueda de marcadores predictivos de respuesta al tratamiento con BCG ha sido constante durante las últimas décadas.

Hipótesis y Objetivos

La composición de los linfocitos que infiltran el tumor tiene una gran influencia en la supervivencia en pacientes con cáncer y diferentes estudios han demostrado que pueden ser utilizados como marcador pronóstico.

El bacilo de Calmette-Guérin intravesical (BCG) es uno de los tratamientos más eficaces para el cáncer de vejiga no músculo invasivo de alto riesgo. Lamentablemente, no existe un biomarcador validado para predecir el resultado clínico de este tratamiento, por lo que aproximadamente un 30-50% de los pacientes que lo reciben sufren de recidivas y hasta un 15% de ellos progresan.

Aunque el mecanismo exacto de la actividad antitumoral inducida por BCG no se comprende por completo, se sabe que actúa como inmunomodulador local, por lo que la composición inmune de las células infiltrantes en el tumor antes del tratamiento podría estar implicada en la respuesta final del paciente.

Además de los linfocitos infiltrantes del tumor, diversos parámetros inmunológicos sistémicos también se han correlacionado con el resultado clínico en pacientes con cáncer. Se ha sugerido que el recuento absoluto de linfocitos periféricos, así como la proporción de neutrófilos a linfocitos (NLR), una medida de inflamación sistémica, podrían ser utilizados como marcadores pronósticos y/o predictivo de la respuesta al tratamiento en diferentes tipos de cánceres.

Por todo ello la hipótesis de este trabajo es que la composición del sistema inmunitario, tanto local como sistémica de los pacientes con tumor vesical no

musculo-invasivo (TVNMI) de alto grado podría predecir la respuesta al tratamiento con inmunoterapia local basada en la administración intravesical de BCG. Esta composición inmunológica puede cuantificarse de manera sencilla, a nivel local y sistémico, a través del análisis histológico del infiltrado linfocitario peritumoral y de los recuentos de linfocitos, neutrófilos y plaquetas en sangre periférica.

Material y métodos

En primer lugar, se ha evaluado el tejido obtenido durante la resección transuretral del tumor vesical. El análisis de factores solubles detectados en la orina de pacientes tratados con BCG orienta sobre el tipo de respuesta que se produce en la vejiga. Conocedores que tras la instilación con BCG predominan en orina citoquinas como IL-2, IL-12 e interferón γ (IFN γ) frente a la presencia de IL-4 e IL-10 en aquellos pacientes “respondedores” al tratamiento con BCG, apunta hacia el desarrollo de una respuesta tipo Th1.

Hemos realizado un análisis del infiltrado linfocitario peritumoral presente en el momento del diagnóstico y previo al inicio del tratamiento con BCG, caracterizando la población linfocitaria y correlacionándola con la evolución clínica en una muestra de 22 pacientes.

En segundo lugar, en otra cohorte de pacientes afectados de tumor vesical inicial no músculo invasivo con alto riesgo de recidiva y progresión y candidatos a recibir tratamiento endovesical con BCG, hemos evaluado el valor predictivo de respuesta al tratamiento de la ratio neutrófilo linfocito y plaqueta linfocito en sangre periférica obtenidos previamente a la resección transuretral del tumor vesical.

Resultados

Encontramos infiltrado linfocitario peri tumoral en todos los pacientes analizados en el primer estudio (n=22), predominando células GATA-3(Th2) frente a células T-Bet (Th1). La respuesta a la BCG se asoció con un cociente TH1/Th2 más elevada en pacientes respondedores (p=0.02). Analizamos en dicha muestra la inmunidad sistémica (valorada por recuento de linfocitos, neutrófilos y ratio neutrófilo/linfocito) apreciando un cociente levemente más elevado en pacientes no respondedores (p=0.12).

Se analizó la relación entre inmunidad periférica y local con la respuesta a la BCG, mediante la combinación de los cocientes Th2/Th1 y neutrófilo/linfocito, observando un valor más elevado en pacientes respondedores (p=0.004).

En otra cohorte de pacientes de mayor tamaño muestral (n=50) analizamos la inmunidad sistémica (mediante cocientes neutrófilo/linfocito y plaqueta/linfocito) con la respuesta a la BCG sin apreciar relación significativa (p=0.73 y p=0.76 respectivamente).

Conclusiones

La caracterización del infiltrado linfocitario peri tumoral expresada como cociente GATA-3/T-bet y su relación con la capacidad de respuesta inmune periférica expresada como cociente neutrófilo / linfocito, podrían predecir la respuesta al tratamiento endovesical con BCG.

SUMMARY

Introduction

Bladder cancer is the fifth in frequency among men in developed countries (after prostate, lung, colorectal and stomach tumours), with approximately 357,000 new cases a year worldwide (274,000 men and 83,000 women). The commonest presentation is as non-muscular invasive bladder tumour. After treatment by transurethral resection and based on endoscopic findings (size, number of tumours, location) and anatomy-pathological analysis (grade, stage and presence of carcinoma in situ) risk groups are established based on the likelihood of recurrence and/or progression.

Complementary immunotherapy treatment is indicated in high-risk tumours. This consists of BCG instillations in a first induction phase and subsequently in maintenance. However, this is not a guarantee of success and recurrences and/or progressions are up to 30%. When this recurrence occurs early, European and American urology guidelines advice considering radical treatment by early cystectomy as a second induction round reaches limited response rates.

In order to be able to offer an optimal tailored treatment; avoiding side effects of therapies that will not be effective, minimizing the delay of definitive treatment and thus reducing the risk of progression and/or dissemination of the disease, the search for predictive markers of response to BCG treatment has been a challenge over the past few decades.

Hypothesis and objectives

In this work, two papers have been developed to evaluate predictive markers of response to BCG treatment in patients with non-muscle-invasive bladder tumours at high risk of recurrence and progression; one focalized at tissue samples and the other at peripheral blood.

Material and methods

So, the first one evaluates the tissue obtained during transurethral resection of the bladder tumour. Analysis of soluble factors detected in urine in patients treated with BCG focuses on the type of response that occurs in the bladder. Knowing that after Instillation with BCG predominate in cytokine urine such as IL-2, IL-12 and interferon (IFN) versus the presence of IL-4 and IL-10 in patients "responders" to treatment, points towards the development of a Th1 response. Analysis of peritumoral lymphocyte infiltrate present at the time of diagnosis and prior to initiation of BCG treatment, characterizing the lymphocyte population and correlating it with clinical evolution in a sample of 22 patients.

Second, in another cohort of patients with initial non-muscle-invasive bladder tumour with high risk of recurrence and progression and candidates for endovesical BCG treatment, we have evaluated the predictive response value of lymphocyte neutrophil ratio and peripheral blood lymphocyte platelet obtained prior to transurethral resection of the bladder tumour.

Results

We found peritumoral lymphocyte infiltrate in all patients analysed in the first study (n-22), predominating GATA-3(Th2) cells versus T-Bet (Th1) cells. The response to BCG was associated with a higher TH1/Th2 ratio in responding patients (p-0.02). We analysed in this sample systemic immunity (valued by

lymphocyte count, neutrophils and neutrophil/lymphocyte ratio) appreciating a slightly higher ratio in non-responding patients (p-0.12).

The relationship between peripheral and local immunity with the response to BCG was analysed, by combining the Th2/Th1 and neutrophil/lymphocyte ratios, observing a higher value in responding patients (p-0.004).

In another cohort of patients of larger sample size (n-50) we analysed systemic immunity (by neutrophil/lymphocyte ratio and platelet/lymphocyte) with the response to BCG without appreciating significant ratio (p-0.73 and p-0.76 respectively).

Conclusions

Characterization of peritumoral lymphocyte infiltrate expressed as a GATA-3/T-bet ratio and its relationship to the peripheral immune response capacity expressed as neutrophil/lymphocyte ratio could predict the response to endovesical BCG treatment.

INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología de los tumores vesicales

El cáncer de vejiga, con más de 573.000 nuevos casos y más de 213.000 muertes anuales en todo el mundo, es una de las principales causas de mortalidad en hombres¹. En Europa, en 2012, se diagnosticaron 151.297 nuevos casos de cáncer de vejiga con una tasa estandarizada de incidencia de 17,7/100.000 en hombres y 3,5/100.000 en mujeres², con un descenso en 2018 hasta 9,5/100.000 en hombres y 2,4 /100.000 en mujeres¹. En general, la tasa bruta de incidencia anual es de 20,4/100 000. En 2012, se registraron 52.395 muertes por cáncer de vejiga, con una tasa bruta de mortalidad anual de 7,1/100 000². En España existe una de las tasas de incidencia y mortalidad más altas de Europa, con un promedio de 12.200 nuevos casos anuales, siendo el 4º cáncer más frecuente en varones y el 5º en ambos sexos³. Aproximadamente el 70% de los pacientes con cáncer de vejiga son mayores de 65 años⁴.

El consumo de tabaco es el factor de riesgo mejor establecido⁵, aunque también se han descrito la exposición ocupacional, algunos agentes quimioterapéuticos y la radioterapia pélvica como factores que favorecen la carcinogénesis del cáncer vesical⁵.

2. Diagnóstico de los tumores vesicales

La hematuria y la sintomatología miccional de llenado (urgencia e imperiosidad) son frecuentes en pacientes con tumor vesical⁶. La mayoría de los pacientes son diagnosticados mediante exploraciones complementarias (ecografía y/o cistoscopia) realizadas tras haber presentado un primer episodio de hematuria⁷. La hematuria macroscópica es el síntoma más frecuentemente relacionado con el diagnóstico de tumor vesical⁸. Su valor predictivo positivo, a tres años, es 7,4% (IC 95% 6,8-8,1) en varones y 3,4% (IC 95% 2,9-4,0) en mujeres⁹. Por tanto, ante un paciente con hematuria macroscópica se aconseja completar estudio con ecografía reno-vésico-prostática y remitirlo a la consulta de urología. La ecografía reno-vésico-prostática permite detectar lesiones endovesicales mayores de 0,5 cm. Si persiste la sospecha clínica de tumor vesical, a pesar de un estudio ecográfico normal, la siguiente prueba diagnóstica será la cistoscopia¹⁰.

En aquellos pacientes en los que se sospecha un tumor urotelial, la cistoscopia confirmará la afectación del tracto urinario inferior y la tomografía computarizada con urografía (TCU) la del tramo urinario superior. Para la detección de tumor vesical, la TCU y la cistoscopia tienen una sensibilidad de 0,87 y una especificidad de 0,99 y 1 respectivamente. Sus valores predictivos positivos son 0,91 y 0,98, y los valores predictivos negativos 0,98 y 0,98, respectivamente¹¹.

Para mejorar la detección de lesiones endovesicales se han introducido nuevas tecnologías. La cistoscopia con luz azul, previa administración endovesical de hexaminolevulinato (Hexvix[®]) permite mejorar la detección del

carcinoma in situ (Cis), difícil de visualizar al ser una lesión plana¹². La imagen de banda estrecha ha reportado un incremento de la sensibilidad frente a la cistoscopia con luz blanca, aun teniendo menor especificidad y mayor tasa de falsos positivos¹³. El incremento de coste y consumo de tiempo han impedido su generalización en la práctica clínica⁸.

En resumen, el tumor vesical, cuya incidencia y prevalencia es alta¹⁴, constituye un problema de salud importante. Por ello, es lógico pensar en la posibilidad de realizar su detección precoz; sin embargo, no existe evidencia científica que apoye el cribado del tumor vesical en la población general¹⁵, en fumadores, o individuos con exposición ambiental a carcinógenos vesicales¹⁶. Se ha propuesto como método de cribado la detección de microhematuria (>3 hematíes/campo), con tira reactiva en orina; sin embargo, su valor predictivo positivo es bajo¹⁷. En 2015, una revisión sistemática de la Cochrane Library concluyó que la eficacia de los métodos de cribado para el tumor vesical era demasiado baja para su recomendación¹⁸.

3. Clasificación y estadiaje de los tumores vesicales

Una vez extirpado el tejido tumoral mediante la resección transuretral (RTU), el material se remite al laboratorio de anatomía patológica. Allí se realiza un procesamiento de la muestra dirigido a establecer el diagnóstico anatomopatológico, definido a través de la estirpe celular, grado de diferenciación tumoral y profundidad de afectación¹⁹. La idoneidad del informe anatomopatológico, incluyendo factores pronósticos, puede ayudar en la toma de decisiones clínicas²⁰.

La mayoría de los tumores vesicales son uroteliales, presentándose en el momento del diagnóstico como no músculos invasivos en el 75% de los casos, frente a los músculo invasivos o diseminados en el resto²¹. Alrededor de la mitad de los no músculo invasivos son tumores de bajo grado, mientras que los músculo invasivos o diseminados suelen ser de alto grado. El grado celular es el factor pronóstico más importante²².

La primera clasificación anatomopatológica, introducida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1973, clasifica los tumores vesicales según el grado de anaplasia celular²³. La clasificación de alto y bajo grado viene dada por la arquitectura celular y las atipias citológicas. La clasificación de la OMS de 2004⁹ incluye una tercera categoría, la de tumores papilares uroteliales de bajo potencial de malignidad (PUNLMP). La clasificación de la OMS de 2004 es la más utilizada actualmente. La reciente actualización de 2016²⁴ no presenta grandes variaciones respecto a la previa.

Tradicionalmente, los tumores vesicales se habían estadiado según la escala T: Ta, T1, T2, T3 o T4 (Tabla 1). Se considera el tumor músculo infiltrante

cuando alcanza o supera el estadio T2. La nomenclatura actual los divide en no músculo invasivo y músculo invasivo, lo que implica grandes diferencias en cuanto a opciones terapéuticas y pronóstico vital¹³.

Tabla 1: Clasificación TNM del tumor vesical²⁵.

Categoría T: Tumor primario (T).
Tx: No se puede evaluar el tumor primario
T0: No evidencia de tumor primario.
Tis: Carcinoma in situ; tumor plano.
Ta: Carcinoma papilar no invasivo.
T1: Tumor que invade tejido conjuntivo subepitelial.
T2: Tumor que invade la capa muscular.
T2a: Tumor que invade la capa muscular superficial (mitad interna).
T2b: Tumor que invade la capa muscular profunda (mitad externa).
T3: Tumor que invade la grasa perivesical.
T3a: Microscópicamente
T3b: Macroscópicamente (masa extravesical).
T4: Tumor que invade cualquiera de las siguientes estructuras: próstata, útero, vagina, pared pélvica o pared abdominal.
T4a: Tumor que invade la próstata, útero o vagina.
T4b: Tumor que invade las paredes pélvica o abdominal.
Categoría N: Afectación ganglionar(N).
Nx: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.
N0: No se demuestran metástasis ganglionares regionales.
N1: Metástasis en un único ganglio linfático, con diámetro máximo menor o igual a 2 cm.
N2: Metástasis en un único ganglio linfático, con diámetro máximo mayor de 2 cm, pero menor o igual a 5 cm, o en varios ganglios linfáticos, ninguno de ellos mayor de 5 cm de diámetro máximo.
N3: Metástasis en un único ganglio linfático, con diámetro máximo mayor de 5 cm.
Categoría M: Metástasis (M).
Mx: No se puede evaluar la metástasis a distancia.
M0: No hay metástasis a distancia.
M1: Metástasis a distancia.

La localización topográfica del tumor es importante. A nivel trigonal, la lámina propia es más delgada y se funde con la muscular propia, lo que puede inducir a errores en la estadificación tumoral. Además, en ocasiones la muscularis mucosae puede hipertrofiarse dificultando su diferenciación con la

muscular propia²⁶. Discriminar la afectación de la muscularis mucosa, cuya invasión diferencia el T1a del T1b, es importante de cara al pronóstico ya que la afectación de la lámina propia implica capacidad de invasión tumoral²⁷, y debería informarse sistemáticamente²⁸.

La presencia de muscular propia en la muestra remitida al laboratorio de anatomía patológica es un criterio de calidad de la RTU vesical²⁹, ya que de su afectación depende el estadio tumoral y en consecuencia el tratamiento.

La variabilidad inter-observacional en el diagnóstico del tumor vesical es considerable³⁰, por ello deben manejarse otros datos que ayuden en la toma de decisiones terapéuticas. Cuando existen dudas sobre el correcto estadiaje del tumor vesical debe realizarse un re-estadiaje. Ese re-estadiaje del tumor vesical, mediante re-RTU, se realiza habitualmente en los tumores T1 y debería realizarse entre 2 y 4 semanas después de la RTU inicial, con el objetivo de detectar pacientes infraestadiados y en consecuencia candidatos a cistectomía radical precoz³¹ o bien para mejorar los resultados del tratamiento con BCG intravesical³². La indicación de re-RTU debe evaluarse individualmente³³.

En un adecuado y completo informe de anatomía patológica radica uno de los pilares del adecuado tratamiento del tumor vesical. Se han descrito diferentes factores pronósticos anatómicos e histológicos que deberían reportarse en el informe anatomopatológico definitivo. Entre los factores pronósticos anatómicos encontramos: el estadio T1, invasión linfovascular, patrón de crecimiento sólido en vez de papilar³⁴, y profundidad de la invasión³⁵. Una profundidad >1.5mm se ha relacionado con mayor estadio en el espécimen de cistectomía (sensibilidad 81% y especificidad 83%) y con menor supervivencia a 5 años. Entre los factores pronósticos histológicos encontramos

la variante histológica³⁶, especialmente si se trata de micropapilar o “nested”, y presencia de carcinoma in situ asociado³⁷.

4. Tumor vesical no músculo invasivo de alto riesgo

4.1 Definición y características

Los tumores vesicales no musculo invasivos se clasifican, en base a la probabilidad de recurrencia y progresión, en 3 grupos de riesgo: bajo, moderado y alto³⁸.

Las tablas de riesgo y sistema de puntuación fueron desarrolladas por el EORTC genitourinary cancer group³⁹ y están recogidas en las Tablas 2-4. El sistema de puntuación otorga valores numéricos para estimar la probabilidad de recurrencia y progresión, basándose en factores clínicos y patológicos. Entre los factores clínicos se recogen el número de tumores, tamaño y la secuencia de recidiva. Entre los factores patológicos interesan la categoría T, la presencia de Cis y el grado celular del tumor. Este sistema de puntuación queda recogido en la Tabla 2. En función de la puntuación obtenida puede calcularse la probabilidad de recurrencia y de progresión a 1 y 5 años, Tablas 3 y 4.

Tabla 2: Sistema de puntuación desarrolladas por el *EORTC genitourinary cancer group*⁴⁰.

Factor	Recurrencia	Progresión
Numero de tumores		
Único	0	0
2 a 7	3	3
Más o igual a 8	6	3
Diámetro de los tumores		
< 3 cm	0	0
> 3 cm	3	3
Recurrencia/año		
1 o ninguna recurrencia	2	2
Más de una recurrencia	4	2
Categoría		
Ta	0	0
T1	1	4
CIS		
Si	1	6
No	0	0
Grado		
G1	0	0
G2	1	0
G3	2	5
Puntuación total	0-17	0-23

Tabla 3: Probabilidades de recurrencia en función de la puntuación obtenida según escala EORTC⁴⁰.

Puntuaciones, Recurrencia	Probabilidad de recurrencia en 1 año (95% CI)	Probabilidad de recurrencia a los 5 años (95% CI)
0	15% (10 % – 19%)	31% (24% - 37%)
1-4	24% (21% - 26%)	46% (42% - 49%)
5-9	38% (35% - 41%)	62% (58% - 65%)
10-17	61% (55% - 67%)	78% (73% - 84%)

Tabla 4: Probabilidades de progresión en función de puntuación obtenida según escala EORTC⁴⁰.

Puntuaciones, Progresión	Probabilidad de progresión en 1 año (95% CI)	Probabilidad de progresión a los 5 años (95% CI)
0	0.2% (0%- 0.7 %)	0.8% (0% - 1.7%)
2-6	1% (0.4% - 1.6%)	6% (5% - 8%)
7-13	5% (4% - 7%)	17% (14% - 20%)
14- 23	17% (10% - 24%)	45% (35% - 55%)

Los tumores vesicales no musculo invasivos de alto riesgo incluyen los siguientes: tumores T1, tumores de alto grado, carcinoma in situ (Cis), tumores múltiples, recurrentes y de tamaño superior a 3 cm.

La presencia simultánea de tumor T1 de alto grado y Cis, afectación de la uretra prostática^{40,41}, invasión linfocascular⁴² y determinadas variantes anatomopatológicas^{43,44} conforman un subgrupo de riesgo elevado.

4.2 Tratamiento

El tratamiento inicial del tumor vesical superficial es la RTU de todas las lesiones vesicales visibles⁴⁵. El análisis patológico del tejido resecado determinará el grado del tumor y la profundidad de la afectación, lo que establecerá el diagnóstico y el grupo de riesgo⁴⁶.

Después de la RTU todos los pacientes deberían recibir, salvo hematuria franca o perforación vesical, una dosis de quimioterapia endovesical inmediata y destinada a reducir la tasa de recurrencia⁴⁷. Sin embargo, en los tumores de alto riesgo debe realizarse un tratamiento adyuvante para disminuir el riesgo de recidiva y progresión⁴⁸. Este tratamiento consiste en la instilación intravesical de bacillo Calmette Guerin (BCG) vivo y atenuado⁴⁹, que estimulará una respuesta inmunitaria con actividad antitumoral.

4.3 Evolución

A pesar de la extirpación de todas las lesiones tumorales y del tratamiento intravesical con BCG, es frecuente la recidiva tumoral y en ocasiones la progresión, durante los primeros cinco años de seguimiento⁵⁰.

Sabiendo que hasta en un 30-50% de los pacientes va a existir un fracaso del tratamiento en forma de recidiva y que de éstos hasta un 15% pueden progresar, es necesaria la identificación precoz de aquellos pacientes que no van a responder a la BCG-terapia⁵¹, con el objetivo de plantear otras opciones terapéuticas⁵² y no demorar el tratamiento radical⁵³.

5. Bases inmunológicas

5.1 Sistema inmunológico.

Los componentes celulares del sistema inmune se originan en la médula ósea a partir de la célula madre pluripotencial (stem cell), que en presencia de factores de crecimiento y diferenciación específica da lugar a las células hematopoyéticas. El sistema inmunitario se divide en un sistema innato o inespecífico y en un sistema específico o adquirido⁵⁴. Además, existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, la llamada inmunidad celular y la inmunidad humoral.

Las células inmunitarias con un papel más relevante en la respuesta antitumoral son los linfocitos T (inductores/cooperadores), las células NK (Natural Killer), los linfocitos B, y los macrófagos⁵⁵. Dentro de los linfocitos T distinguimos los CD4⁺ o cooperadores, que reconocen antígenos unidos al complejo mayor de histocompatibilidad tipo II [CMH-II], y los CD8⁺ o citotóxicos, que poseen gránulos con capacidad lítica y pueden destruir directamente las células diana y que reconocen antígenos unidos a complejo mayor de histocompatibilidad tipo I [CMH-I]. Los linfocitos T CD4⁺ son los encargados, mediante la secreción de citoquinas, de activar a los linfocitos T CD8⁺, incrementar la producción de anticuerpos por los linfocitos B frente a ciertos antígenos, y activar otras células del sistema inmune como los macrófagos y las células NK. Esta función se realiza a través de la producción de linfoquinas como la Interleukina 2 (IL-2), interferones, factor de necrosis tumoral (TNF) y otros factores estimuladores⁶¹.

Las células NK son linfocitos incluidos en los mecanismos de defensa antitumoral innata. La IL-2 modula su maduración e incrementa

considerablemente su función de destrucción de células tumorales, eliminando aquellas que escapan a otros linfocitos (linfocitos T citotóxicos) por pérdida de antígenos CMH tipo I. La destrucción celular esta mediada por la unión, mediante moléculas de adhesión, de las células NK a las células tumorales y la consiguiente liberación de gránulos de citolisinas.

Los macrófagos comprenden un grupo heterogéneo de células de gran plasticidad y son capaces de desempeñar una amplia gama de funciones, entre ellas la fagocitosis de células y microorganismos, eliminación de células senescentes, detritus y cuerpos extraños, regulación de la hematopoyesis, presentación de antígenos para montar una respuesta inmunitaria específica, secreción de más de 100 productos biológicamente activos, actividad antitumoral (citotóxica y citostática) y la reparación de tejidos⁵⁶. Los macrófagos se diferencian en distintos tipos funcionales, entre los cuales destacan los macrófagos M1 (clásicamente activados) y los macrófagos M2 (alternativamente activados⁶²). De forma general, los macrófagos asociados a tumores presentan un fenotipo M2 y muestran principalmente una acción oncogénica, facilitando la supervivencia, la proliferación y la diseminación de las células malignas. La presencia de un elevado número de estos suele relacionarse con un mal pronóstico⁶².

La inmunidad humoral es aquella mediada por anticuerpos, en la que podemos englobar la activación del complemento y la facilitación de la toxicidad celular.

El sistema inmunológico, sin embargo, no es infalible ya que las células tumorales han desarrollado una serie de mecanismos de escape⁵⁷, entre otros la generación de células T supresoras tras la aparición del tumor que inhiben la actividad de las células efectoras, la liberación de sustancias inmunosupresoras como la Prostaglandina E-PGE2, la presentación inadecuada o ausencia de los antígenos a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, y por último el concepto de heterogeneidad tumoral.

La heterogeneidad tumoral se basa en el hecho de que una neoplasia está formada por un amplio grupo de subclones tumorales, heterogéneos en cuanto a su malignidad, capacidad oncogénica y también en su relación con el sistema inmune. Este hecho incrementa la dificultad del sistema inmune para reconocer todos los antígenos y la posibilidad de escape y progresión tumoral.

5.2 Inmunoterapia.

Definimos inmunoterapia como el tratamiento destinado a estimular o restaurar la capacidad del sistema inmunitario para luchar contra el cáncer, las infecciones o cualquier otra enfermedad⁵⁸. La asociación entre inmunoterapia y oncología se remonta a finales del siglo XIX, cuando en 1890 el cirujano William Coley trató de inducir remisiones en sarcomas mediante una inyección intratumoral de toxinas de *Staphylococcus* o *Serratia marcescens* (vivas o inactivadas), tras observar remisiones en pacientes que desarrollaban sarcomas después de contraer la erisipela⁵⁹.

En 1976 Álvaro Morales divulgó el uso del bacilo Calmette-Guerin, cepa viva atenuada del *Mycobacterium bovis* desarrollada en 1921 como vacuna de la tuberculosis, en el tratamiento del tumor vesical⁶⁰. En el caso de la neoplasia vesical, con la inmunoterapia local lo que se pretendía conseguir era que el sistema inmune del paciente fuera capaz de destruir selectivamente las células tumorales, eliminando así los efectos que sobre las células normales tienen la radioterapia y la quimioterapia⁶¹.

5.2.1 Tipos de inmunoterapia

Distinguimos entre inmunoterapia activa e inmunoterapia pasiva. La inmunoterapia activa pretende estimular el sistema inmunitario del propio paciente para favorecer una respuesta efectiva frente al tumor. Se divide en inmunoterapia activa inespecífica e inmunoterapia activa específica. La inmunoterapia activa inespecífica actúa mediante la activación de todo el sistema inmunitario, asumiendo que de forma secundaria se provocará la destrucción tumoral. La respuesta global se amplifica de manera inespecífica (estimulando a macrófagos, células NK, linfocitos T,...etc.)⁶². Una de las formas más antiguas y eficaces de inmunoterapia activa inespecífica ha sido la utilización de BCG, que produce una estimulación inespecífica del sistema retículo endotelial. Sin embargo, su uso quedó restringido al tratamiento del carcinoma vesical no músculo infiltrante. Otra forma de este tipo de inmunoterapia activa inespecífica es el uso de citoquinas que, aunque son proteínas producidas normalmente por nuestro organismo, actualmente también se pueden producir *in vitro* con tecnología recombinante. El uso de citoquinas se considera estándar en algunas situaciones, por ejemplo, el interferón alfa es eficaz en leucemia mieloide crónica,

tricoleucemia, linfomas de bajo grado, mielomas, melanomas, tumores carcinoides e hipernefomas. La IL-2 es eficaz en algunos tumores sólidos como el hipernefoma y melanoma, aunque su toxicidad y eficacia limitada impiden un uso clínico más amplio⁶³. La inclusión del levamisol, antihelmíntico con capacidad inmunomoduladora, en los tratamientos del cáncer de colon con 5-FU demostró incrementos relevantes de supervivencia⁶⁴.

Frente a la inmunoterapia activa inespecífica encontramos la inmunoterapia activa específica, la cual pretende una estimulación del sistema inmune dirigida contra antígenos específicos expresados por las células tumorales del propio paciente. Esto permitiría un incremento de la actividad, y teóricamente, del control del sistema inmune sobre la enfermedad subclínica restante, disminuyendo la posible recidiva. El ejemplo más actual de inmunoterapia activa específica son las vacunas. Sin embargo, el concepto de vacunas de enfermedades neoplásicas⁶⁵ es claramente diferente al concepto de vacunas en enfermedades infecciosas. Mientras en estas enfermedades la vacuna se dirige contra un antígeno bien conocido, muy inmunogénico y con un fin claramente preventivo, en el caso de los tumores el antígeno no siempre es conocido, es débilmente inmunogénico y la primera intención es terapéutica, aunque también se pretendan evitar recidivas y/o recurrencias. En la actualidad es un campo en continua investigación⁶⁶, con el problema fundamental de los mecanismos de escape tumoral.

La inmunoterapia pasiva pretende el control del tumor mediante la administración al paciente de mediadores con capacidad de destrucción celular intrínseca e independiente de la situación del sistema inmune del paciente, es decir, mediadores diseñados *in vitro*, específicamente diseñados para luchar

contra una determinada célula tumoral. Fundamentalmente encontramos la administración de anticuerpos monoclonales y la transferencia de células inmunes. Los anticuerpos monoclonales actúan a nivel del dominio extracelular del receptor, compitiendo con la unión del ligando natural, y de esta forma bloquean la activación del receptor y de las vías de señalización dependientes del mismo. Su uso se extiende frente a múltiples tumores sólidos y hematológicos. Sirvan de ejemplo, frente al cáncer de mama (*Trastuzumab*⁶⁷), frente al cáncer colorectal avanzado (*Cetuximab*⁶⁸, *Panitumumab*⁵⁷), frente a linfomas no Hodgkin de células B (*Rituximab*⁵⁷), frente al cáncer colorrectal, mama y pulmón no microcítico⁶⁹ (*Bevacizumab*⁵⁷), y frente al melanoma metastásico (*Ipilimumab*⁷⁰). En el campo urológico destacamos *Atezolizumab*, *Avelumab* y *durvalumab*⁷¹, anticuerpos que actúan bloqueando PD-L1 y que se usan como segunda línea de tratamiento frente al tumor vesical⁷² y *Nivolumab*⁷³ y *Prembolizumab*⁷⁴, anticuerpos monoclonales anti PD-1. La transferencia celular, conocida como inmunoterapia adoptiva, se define como la transferencia a portadores de tumores de células inmunológicamente reactivas que pueden mediar directa o indirectamente una actividad antitumoral. El objetivo consiste en identificar, en el paciente, células capaces de reconocer y eliminar las células tumorales, expandirlas *in vitro* a gran escala, y volver a inyectárselas de nuevo al paciente⁷⁵. Los dos tipos de células usadas hasta ahora⁷⁶ son las células lymphokine activated killers (LAK) y los linfocitos infiltrantes de tumores (TILs). Los LAK son células linfoides activadas tras incubación con IL-2, con gran capacidad para eliminar células tumorales, y que se han utilizado en carcinoma renal y melanoma. Los linfocitos TILs son células linfoides de tipo T que infiltran

tumores sólidos tras ser estimuladas por IL-2. Necesitan ser sensibilizados previamente contra antígenos tumorales, luchando contra ellos.

6. Inmunoterapia y tumor vesical

En los estudios anatomopatológicos del tumor vesical se describe un infiltrado linfocitario peritumoral⁷⁷. Esta presencia inmunitaria permite suponer una eficacia del tratamiento con inmunoterapia. Dicha estimulación inmunitaria, por parte del tumor, nos permite usar el propio sistema inmunitario en la lucha contra el tumor⁷⁸. La inmunoterapia activa inespecífica y la inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales son las principales líneas de tratamiento.

Como se ha descrito anteriormente, la inmunoterapia activa inespecífica basada en la utilización de BCG es uno de los principales tratamientos del tumor vesical no musculo invasivo de alto grado⁷⁹. Los mecanismos de acción, dosis y esquemas de tratamiento son expuestos a continuación en el apartado 1.7.

La Inmunoterapia pasiva mediante el uso de anticuerpos monoclonales se basa fundamentalmente en *Atezolizumab*, *Avelumab* y *durvalumab*, anticuerpos que actúan bloqueando el PD-L1 a nivel de sus receptores PD-1 y B7.1, y que se usan como segunda línea frente al tumor vesical^{60,61}.

En la tabla 5 se recogen los principales fármacos utilizados en el carcinoma vesical metastásico y los estudios que apoyan su uso.

Tabla 5: Inmunoterapia en tumor vesical metastásico, obtenido de “Inmunoterapia en tumor vesical: Presente y futuro”⁸⁰

Fármaco	Estudios	Recomendaciones Guías Europeas 2020
<u>Atezolizumab/Tecentric</u>	IMvigor 210 IMvigor 211 IMvigor 130	Ofrecer Atezolizumab en 1ª línea en pacientes no candidatos a terapias con platino y si PDL-1>5% Ofrecer Atezolizumab en 2ª línea de tratamiento en pacientes que hayan progresado a terapias con Platino y mantengan adecuada función renal Ofrecer Atezolizumab como 3ª línea de tratamiento si no ha sido utilizada inmunoterapia previamente, PS 0-1
<u>Nivolumab/Opdivo</u>	Checkmate 275	Ofrecer Nivolumab en 2ª línea de tratamiento en pacientes que hayan progresado a terapias con platino y mantengan adecuada función renal Ofrecer Nivolumab como tercera línea de tratamiento si no ha sido utilizada inmunoterapia previamente, PS 0-1
<u>Pembrolizumab/Keytruda</u>	Key-note 045	Ofrecer Pembrolizumab en 1ª línea en pacientes no candidatos a terapias con platino y si PDL-1>5% Ofrecer Pembrolizumab en 2ª línea de tratamiento en pacientes que hayan progresado a terapias con Platino y mantengan adecuada función renal Ofrecer pembrolizumab como 3ª línea de tratamiento si no ha sido utilizada inmunoterapia previamente y PS 0-1

El uso simultaneo de BCG intravesical y anti PD-L1 está actualmente en evaluación en diversos ensayos clínicos⁸¹.

7. Inmunoterapia endovesical con BCG. Mecanismo de acción, dosis, esquema de tratamiento y toxicidad.

7.1 Inmunoterapia endovesical mediante BCG.

BCG, como se ha comentado anteriormente, es una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, inicialmente desarrollada como una vacuna contra la infección por *Mycobacterium tuberculosis*⁸². Aunque el uso de BCG en la lucha contra la tuberculosis ha tenido el problema de la resistencia⁸³, esta cepa también ha sido utilizada como un agente inmunoterapéutico para una variedad de enfermedades, incluyendo el cáncer colorrectal, el melanoma y el cáncer superficial de vejiga⁸⁴. Los primeros trabajos en su uso contra el melanoma demostraron que inyecciones intralesionales de BCG producían una disminución de la recurrencia de un 90% y una reducción apreciable de las lesiones no tratadas que se encontraban en el mismo canal de drenaje linfático⁸⁵, lo que sugirió que la reducción en la carga tumoral estaba relacionada con una respuesta inmune inducida por BCG. El tratamiento con BCG intravesical está indicado en pacientes con tumores de alto riesgo de recidiva y/o progresión desde el año 1976^{86,87}, siendo más eficaz en la prevención o el retraso de la recidiva tumoral^{88,89,90,91} y la progresión⁹² que otro tipo de tratamientos. Pese a que no se conoce con exactitud las causas de esta eficacia, se han ofrecido diferentes explicaciones teóricas: el tratamiento con BCG induce una respuesta inmunológica que puede persistir durante más tiempo y es capaz de penetrar profundamente dentro del músculo detrusor⁹³, mientras que el efecto de la quimioterapia depende de la difusión simple, por lo que tiene muy poco poder de penetración en la mucosa⁹⁴.

7.2 Mecanismo acción BCG

El mecanismo exacto de acción de la terapia con BCG sigue sin conocerse con exactitud. Durante la instilación endovesical con BCG, las micobacterias son internalizadas por las células epiteliales⁹⁵ iniciando una respuesta inmune inflamatoria, con un infiltrado de células T, tanto CD4 como CD8, macrófagos y NK⁹⁶. Las células T CD4⁺ y CD8⁺ parece que son células efectoras esenciales para la eliminación del tumor, y se ha observado que un sistema inmune intacto es un requisito para la respuesta⁹⁷.

Las células T CD8⁺ y las células NK destruirían las células infectadas por la micobacteria y las células T CD4⁺ contribuirían mediante la secreción de citoquinas. Muchas de estas citoquinas pueden detectarse en la orina y sus niveles aumentan con cada instilación intravesical de BCG⁹⁸. Pese a todos estos datos, se desconoce si el efecto antitumoral de BCG es debido a una respuesta específica de antígeno. El hecho de que la inflamación de la vejiga tras la radioterapia o por infecciones del tracto urinario no tenga el mismo efecto, ha sugerido especificidad aunque un efecto “bystander” no-específico probablemente también es importante en el proceso anti-tumoral⁹⁹.

7.3 Dosificación, esquema de tratamiento y toxicidad asociada.

No hay un consenso sobre el esquema y dosis óptima de tratamiento con BCG intravesical. El tratamiento actualmente recomendado por la Asociación Española de Urología es un ciclo inicial de BCG con una instilación semanal, con 81 mg de producto, durante 6 semanas (tratamiento de inducción). Este tratamiento de inducción se continúa con un tratamiento de mantenimiento, que

consiste en 3 bloques de tres instilaciones semanales, con 3 y 6 meses de separación entre cada bloque y un año de tratamiento¹⁰⁰. El uso del tratamiento de mantenimiento se ha asociado con una disminución en las tasas de recurrencia, 76,8 meses en pacientes tratados con mantenimiento frente a 35,7 meses en pacientes tratados solamente con inducción, y también con una menor tasa de progresión¹⁰¹. Sin embargo, el tratamiento de mantenimiento se ve en muchas ocasiones limitado por los efectos adversos asociados con el tratamiento prolongado con BCG¹⁰².

El efecto toxico¹⁰³ de las instilaciones intravesicales con BCG puede presentarse tanto local como sistémicamente¹⁰⁴. La mayoría de los pacientes experimentan un síndrome miccional irritativo auto limitado, que puede requerir tratamiento¹⁰⁵. Generalmente se presenta en las primeras cuatro horas posteriores a la instilación, desapareciendo habitualmente en las siguientes 48 horas sin tratamiento, aunque en algunos casos puede prolongarse días o semanas. Las manifestaciones generales son las propias de una respuesta inflamatoria sistémica, apareciendo en un periodo de tiempo similar y caracterizándose por fiebre, escalofríos e incluso artralgias. La febrícula y la sensación de malestar leve pueden afectar a un porcentaje significativo de pacientes (hasta un 90%)¹⁰⁶. No es infrecuente una artralgia reactiva posterior a instilaciones intravesicales de BCG. También se pueden encontrar casos donde exista el paso de la BCG al torrente sanguíneo resultando en un proceso mucho más grave y con síntomas severos¹⁰⁷, denominado BCGosis, o casos extremos de infección por la propia manipulación (infección bacteriana) o por la propia BCG (BCGitis) donde el paciente ha de ser hospitalizado¹⁰⁸ y en algunas ocasiones muere¹⁰⁹.

La tendencia es buscar nuevos tratamientos intravesicales que evitasen los efectos adversos asociados a BCG, manteniendo la mejora en la recidiva y progresión, aportando una significativa mejora en la calidad de vida de los pacientes con cáncer superficial de vejiga.

8. Marcadores de respuesta al tratamiento inmunológico

Tras más de 25 años de investigación clínica no se ha identificado ningún único factor pronóstico fiable de la respuesta al tratamiento del tumor vesical con BCG. Varios estudios han sugerido que algunos factores de los pacientes, tales como la edad, el sexo, y los eventos adversos están asociados con la respuesta a BCG, pero otros estudios con un mayor número de pacientes no pudieron confirmar estos hallazgos¹¹⁰. Sin embargo, estos factores pronóstico tradicionales no son de valor en la práctica clínica. Nuevos factores basados en las características moleculares del tumor proporcionan información pronóstica adicional, como por ejemplo el marcador p53, cuya expresión pudiera utilizarse para ayudar en la toma de decisiones clínicas¹¹¹.

Como se ha comentado, los mecanismos exactos de funcionamiento de la BCG continúan siendo desconocidos, pero se han publicado interesantes conclusiones en los últimos años que ayudan a entender su vía de actuación y contribuyen a predecir (aunque no con la precisión deseada) la respuesta clínica. Puesto que la terapia con BCG se considera una forma de inmunoterapia, es lógico suponer que parámetros inmunológicos puedan utilizarse como marcadores pronósticos, y ya el nivel de algunas citoquinas tales como la IL-2 o IL-18 en orina se han relacionado con el tiempo de recidiva^{112,113}.

Ardelt et al. demostraron una respuesta inmune humoral contra HSP-65 en el momento de la re-evaluación tras el ciclo de inducción como un predictor individual positivo de respuesta a la inmunoterapia con BCG. Los títulos de IgA e IgG medidos antes y después del ciclo de inducción predecían el éxito del tratamiento, proponiendo que la monitorización de títulos de anti-HSP-65 durante

el ciclo de inducción podría ser una herramienta útil para detectar precozmente aquellos pacientes no respondedores¹¹⁴

Kamat et al. presentaron una prometedora herramienta de predicción de recurrencias con tasas de detección superiores al 80%¹¹⁵ basada en citocinas urinarias. Sin embargo, debemos tener presente la enorme variabilidad de producción, liberación y detección de dichas citocinas, lo que puede dificultar su aplicación clínica. Tal y como apuntaban Zuiverloon y Zwarthoff¹¹⁶ en su comentario al citado artículo, en la búsqueda del citado marcador deben entrar en consideración la posibilidad de determinación de dichas citocinas en el laboratorio básico del hospital y su coste derivado.

La administración intravesical de BCG actúa como potente inmunomodulador local polarizando la respuesta de las células T hacia células del tipo Th1 y liberando moléculas inflamatorias. Esta respuesta es mayor según el tipo de cepa utilizada, observándose que la *BCG de la cepa connaugh* es significativamente más efectiva en términos de supervivencia libre de recurrencia¹¹⁷.

A nivel celular, se ha observado que la polarización de las células T de Th1 frente a Th2 en el tumor antes del tratamiento con BCG podría ser un marcador de respuesta al tratamiento¹¹⁸ (primer objetivo de este trabajo) o valores elevados de macrófagos de tipo M2 antes y después del tratamiento podrían correlacionarse con una mayor recurrencia¹¹⁹.

La evaluación de la respuesta inflamatoria sistémica a nivel periférico mediante la cuantificación del cociente neutrófilo/linfocito¹²⁰ y plaqueta/linfocito se ha descrito en algunos trabajos como un marcador pronóstico individual¹²¹; sin embargo, dicho marcador carece de la potencia y reproducibilidad suficiente

como para poder ser considerado de rutina en la práctica clínica (segundo objetivo de este trabajo).

9. Justificación del proyecto

La alta recurrencia del cáncer de vejiga obliga a llevar a cabo tratamientos preventivos, multitud de controles periódicos y cirugías transuretrales en cada recurrencia. Todo ello afecta tanto a la calidad de vida del paciente como al coste económico de la enfermedad. En cáncer de vejiga es el noveno cáncer en cuanto a gasto sanitario se refiere^{122,123}. Sin embargo, la atención continuada al paciente hace que, si se calcula el gasto por paciente, el cáncer de vejiga sea el cáncer que más recursos sanitarios consume muy por encima de cánceres con mayor prevalencia como los de mama, colon o próstata¹²⁴.

El tratamiento de inducción con BCG intravesical dura al menos dos meses, y comporta un número relevante de efectos secundarios. Además, en aquellos pacientes en los que no hay respuesta al tratamiento, existe una demora hasta el tratamiento definitivo mediante cistectomía¹²⁵ con el riesgo asociado de diseminación metastásica. Por tanto, se necesitan urgentemente marcadores tempranos de respuesta.

Un marcador pronóstico temprano tendría un valor incalculable para la identificación de aquellos pacientes que responderían al tratamiento intravesical con BCG, lo que resultaría en: una disminución de recurrencia, progresión y mortalidad. Además de un beneficio en la calidad de vida de los pacientes, disminuyendo las complicaciones y evitando los efectos secundarios, y un ahorro substancial en el gasto económico para el sistema nacional de salud.

Por todo ello, en este trabajo nos proponemos analizar si una prueba inmunológica simple como es la determinación de células T peritumorales y una determinación analítica sencilla como el cociente neutrófilo linfocito, podrían ser

útiles para identificar aquellos pacientes que no responderán al tratamiento presentando un mayor riesgo de recidiva y progresión.

HIPOTESIS DE TRABAJO

HIPÓTESIS DE TRABAJO

HIPOTESIS DE TRABAJO

La capacidad inmunológica del paciente con tumor vesical no musculo-invasivo (TVNMI) de alto grado predice la respuesta al tratamiento con inmunoterapia local basada en la administración intravesical de BCG. Esta capacidad inmunológica puede objetivarse, a nivel local y sistémico, a través del análisis histológico del infiltrado linfocitario peritumoral y de los recuentos de linfocitos, neutrófilos y plaquetas en sangre periférica.

OBJETIVOS

1. Caracterizar la expresión de los linfocitos peri tumorales, a través de tinciones inmunohistoquímicas de los factores de transcripción GATA-3 y T-Bet, en el tejido procedente de la resección transuretral del tumor vesical no músculo invasivo (TVNMI) de alto grado en pacientes que recibieron tratamiento con BCG intravesical.
2. Analizar la asociación entre la expresión de la infiltración linfocitaria peritumoral y la respuesta al tratamiento con BCG intravesical.
3. Evaluar la expresión de PD-L1 en células tumorales y en los linfocitos infiltrantes peritumorales y analizar su relación con la respuesta al tratamiento con BCG intravesical.
4. Caracterizar la asociación entre los cocientes neutrófilos/linfocitos y plaquetas/linfocitos, en sangre periférica, y la respuesta al tratamiento con BCG intravesical.
5. Analizar si la inmunidad local y sistémica están relacionadas, y definir su asociación con la respuesta al tratamiento con BCG intravesical.

MATERIAL Y METODOS

Los materiales y métodos utilizados en este proyecto se presentan para cada una de las dos publicaciones realizadas.

1. Publicación 1

Combined assessment of peritumoral Th1/Th2 polarization and peripheral immunity as a new biomarker in the prediction of BCG response in patients with high-risk NMIBC.

Roberto Martínez, Gustavo Tapia, Silvia de Muga, Alba Hernández, María González Cao, Cristina Teixidó, Víctor Urrea, Elisabeth García, Sonia Pedreño-López, Luis Ibarz, Julia Blanco, Bonaventura Clotet, Cecilia Cabrera.

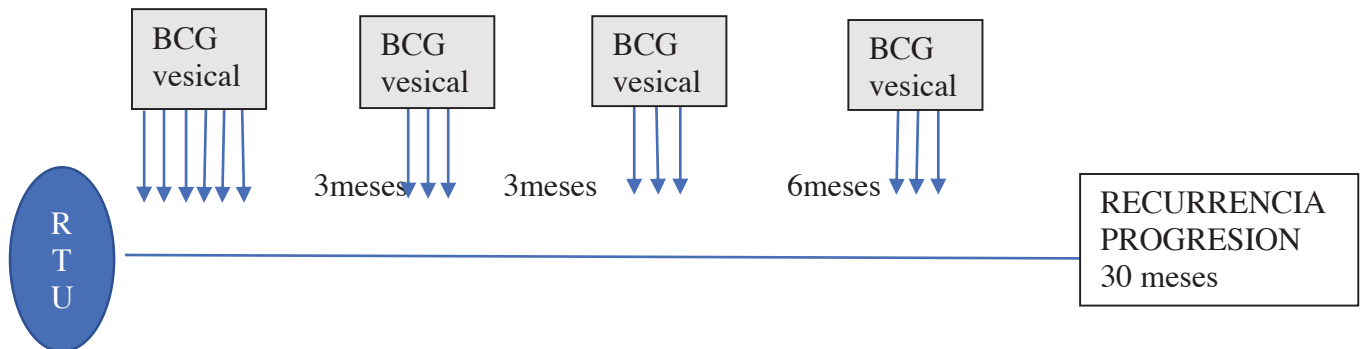
Oncolmmunology, 8:8, 1602460, DOI: 10.1080/2162402X.2019.1602460

1.1. Diseño del estudio y pacientes

Se trata de un estudio retrospectivo, observacional y descriptivo realizado en 22 pacientes con TVNMI de alto grado (T1AG), sin carcinoma in situ (Cis) asociado, tratados con resección transuretral completa y que recibieron tratamiento con BCG intravesical durante un periodo de un año. El tratamiento de inducción con BCG consistió en una instilación vesical semanal de BCG (81 mg, cepa Connaught), durante 6 semanas y posteriormente se realizó un mantenimiento con un esquema de 3 instilaciones semanales a los 3, 6 y 12 meses de haber finalizado la inducción. Los pacientes fueron estratificados según su respuesta al tratamiento como respondedores y no respondedores en función de haberse detectado o no recurrencia y/o progresión durante un periodo

de seguimiento de 30 meses después el inicio del tratamiento con BCG intravesical (Figura 1).

Figura 1. Esquema de tratamiento y seguimiento



Criterios de selección de los pacientes

Para ser elegible para participar en este estudio, los pacientes debían cumplir:

- 1.- Edad mayor de 18 y menor de 70 años.
- 2.- Estar afectado de carcinoma primario de células transicionales de vejiga de alto grado en estadios T1 sin carcinoma in situ y confirmado mediante histopatología. La clasificación histológica se realizó por el servicio de Anatomía Patológica basado en el sistema TNM²⁴ y clasificados de acuerdo con los criterios de la OMS de 2004⁹.
- 3.- Resección transuretral (RTU) completa del tumor.
- 4.- Indicación de terapia intravesical con BCG

Para ser elegible para participar en este estudio, los pacientes no debían:

- 1.- Tener enfermedades concomitantes graves que podrían limitar el cumplimiento o ejecución del protocolo.
- 2.- Estar afecto de otras neoplasias.
- 3.- Haber recibido con anterior inmunoterapia intravesical.

- 4.- Tener otra enfermedad maligna que pueda afectar a la supervivencia de 3 años o pueda ser potencialmente confundida con carcinoma de células transicionales.
- 5.- Tener inmunodeficiencia congénita o adquirida.
- 6.- Haber recibido fármacos citotóxicos o corticosteroides sistémicos hasta 8 semanas antes de recibir la primera administración de BCG.
- 7.- Haber recibido radioterapia para el cáncer de vejiga o irradiación pélvica en los 4 meses anteriores al ingreso en el estudio.
- 8.- Tener infecciones activas, tanto virales, bacterianas o micóticas (incluyendo infecciones del tracto urinario) que requieran tratamiento, Ser VIH sero-positivo, tener una enfermedad febril concomitante o hematuria macroscópica o cualquier otro factor que pueda influir en la tolerancia a la inmunoterapia intravesical con BCG.

1.2. Intervención.

Se analizó la muestra anatomopatológica obtenida durante la resección transuretral del tumor vesical. Se realizó el análisis inmunohistoquímico, en secciones en serie de 4 µm de tejidos tumorales de vejiga fijados en formalina, embebidos en parafina (FFPE).

Se evaluó la expresión de la proteína GATA-3, T-bet y PD-L1 por inmunohistoquímica (IHC) en células peritumorales. Se usaron anticuerpos monoclonales específicos para el factor de transcripción asociado a Th2 GATA-3 (clon L50-823, Ventana Medical Systems) o el factor de transcripción asociado a Th1 T-bet (clon H-210, Santa Cruz Biotechnology). La tinción de inmunohistoquímica se realizó usando un inmunotintador automático (Ventana

e1602460-6 Medical Systems Inc.) según el protocolo del fabricante. El número total de células peritumorales GATA-3 y T-bet-positivas fueron contadas manualmente en 5 campos de alta potencia por tres observadores independientes que desconocían la evolución de los pacientes, y se obtuvieron los valores medios. La inmunohistoquímica PD-L1 se realizó usando el ensayo Ventana SP142 (Ventana Medical Systems Inc.). La expresión de PD-L1 se evaluó tanto en células tumorales (TC) como en TIL peritumorales. Los porcentajes de > 1% se consideraron positivos para PD-L1. Los linfocitos peritumorales se definieron como linfocitos que rodean la masa tumoral.

Evaluación de valores de neutrófilos, linfocitos y plaquetas en sangre periférica. Se recogieron los recuentos totales de neutrófilos, linfocitos y plaquetas de la historia clínica en las muestras de sangre de las pruebas de pretratamiento (pre-RTU) utilizando un analizador de hematología automatizado que mide el volumen y el tamaño de las células utilizando impedancia, conductividad y dispersión de la luz. Los valores se muestran como el número de recuentos de neutrófilos y linfocitos $\times 10^9/L$ de sangre y se definieron los cocientes neutrófilo/linfocito y plaqueta/linfocito.

También se registraron datos clínicos (índice de masa corporal, enfermedades y medicamentos concomitantes) y datos demográficos (edad, sexo) recogidos en las historias clínicas de los pacientes.

1.3. Análisis estadístico.

Las variables continuas se expresaron como medianas y rangos intercuartiles. Se compararon mediante pruebas no paramétricas (prueba U de Mann-Whitney de dos colas). Las variables discretas se describieron como porcentajes y se analizaron utilizando las pruebas Chi cuadrada y exacta de Fisher cuando fue necesario. Se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman para identificar asociaciones entre variables cuantitativas. Estos análisis y representaciones gráficas se realizaron en Graph-Pad Prism v 5.0a (GraphPad Software, Inc.). Se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y comparaciones mediante el test log-rank. El valor pronóstico se estimó mediante la odds ratio y su 95% del intervalo de confianza. La sensibilidad, especificidad y valores predictivos se determinaron para distintos puntos de corte. En todos los análisis se consideró valores estadísticamente significativos cuando el valor p fue inferior a 0.05.

1.4. Consideraciones éticas.

El CEIm del Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona, aprobó este estudio (PI18:137). Los métodos se llevaron a cabo de conformidad con la Declaración de Helsinki. También se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes que participaron en el estudio.

2. Publicación 2

Ratios neutrófilo linfocito y plaqueta linfocito: ¿Se asocian con la respuesta al tratamiento mediante BCG en pacientes con tumor vesical no músculo invasivo de alto riesgo?

Roberto Martínez, Leire Portilla, Mario Alves, Xavier Elias, Joan Areal, José H. Amón.

Archivos españoles de urología (aceptado para su publicación)

2.1 Diseño del estudio y pacientes.

Se realizó un estudio multicéntrico, observacional, descriptivo y retrospectivo analizando las características de los pacientes de los servicios de urología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol y del Hospital Universitario Río Hortega, diagnosticados de TVNMI inicial de alto grado (T1AG), tratados con resección transuretral completa y que recibieron tratamiento con BCG intravesical durante un año entre 2016 y 2017, siendo seguidos durante un período mínimo de 24 meses.

Los informes anatomopatológicos se realizaron según la clasificación TNM de 2009²⁴ y el sistema de clasificación de la OMS de 2004⁹. Todos los pacientes tuvieron un tumor urotelial puro y muestra de capa muscular no afectada.

Se excluyeron los pacientes con Cis asociado, enfermedades autoinmunes, tratamiento crónico con corticoesteroides, y aquellos que no cumplieron el seguimiento. Finalmente, se seleccionaron los pacientes clasificados de alto riesgo según las guías europeas de urología⁴⁰ y que

recibieron tratamiento adyuvante con BCG intravesical. Las instilaciones se realizaron con BCG Connaught, a dosis de 81mg, en cronograma de inducción durante 6 semanas y posterior mantenimiento, 1 instilación por semana durante 3 semanas a los 3,6 y 12 meses.

2.2. Intervención.

Se obtuvo el recuento de neutrófilos y linfocitos en sangre periférica entre 3 y 4 semanas antes de la resección transuretral. Las características demográficas, biométricas y los datos inmunológicos, edad, sexo, índice de masa corporal y número de neutrófilos y linfocitos, se recuperaron de los registros clínicos. Los recuentos de neutrófilos y linfocitos se obtuvieron a partir de los análisis de sangre rutinarios realizados, utilizando un analizador de hematología automatizado que mide el volumen y el tamaño de las células utilizando impedancia, conductividad y dispersión de la luz. Los valores se mostraron como el número de recuentos de neutrófilos y linfocitos $\times 10^9/L$ de sangre.

Se define respuesta al tratamiento cuando no existió recurrencia y/o progresión del tumor, considerando en su caso el tiempo de aparición de la misma desde el inicio del tratamiento con BCG intravesical. El seguimiento se realizó mediante cistoscopia y citología cada 3 meses durante los primeros 2 años de seguimiento, También se realizó un estudio de tramo urinario superior mediante uroTC o urografía intravenosa, según disponibilidad del centro.

Se analizaron los recuentos totales de neutrófilos, plaquetas y linfocitos, así como los cocientes derivados. También se registraron datos clínicos (índice

de masa corporal, enfermedades y medicamentos concomitantes) y datos demográficos (edad, sexo).

2.3 Análisis estadístico

La recogida de los datos se diseñó en un libro de Excel. Posteriormente, los datos fueron exportados a SPSS v. 15.0 (SPSS Inc.) en el que se realizó el análisis estadístico. La normalidad de las variables cuantitativas fue analizada a partir de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables de distribución normal fueron descritas como media y desviación estándar (DE) y las de distribución no normal y/o discretas como mediana y rango intercuartílico (RIC). Las variables cualitativas fueron descritas mediante la tabla de frecuencias absolutas y relativas (porcentajes) de sus categorías. Para analizar la asociación entre variables cualitativas se utilizó la prueba de Chi-cuadrada con test exacto de Fisher, dependiendo de sus condiciones de aplicación (frecuencia esperada < 5 en más del 20% de las casillas). Para analizar las diferencias entre medias se utilizó la prueba t de Student o U de Mann-Whitney, dependiendo de las condiciones de aplicación para 2 grupos, y ANOVA o Kruskal-Wallis, dependiendo de las condiciones de aplicación (normalidad), para más de 2 o más grupos. El nivel de significación fue informado en todos los casos y se estableció, para todas las pruebas, cuando el valor p fue inferior a 0,05. Se realizó análisis de regresión logística para definir predictores de recurrencia y/o la progresión, incluyéndose como variables predictoras la edad, el sexo, las variables que resulten asociadas a la variable en estudio en el análisis bivalente y las variables a estudio (RNL y RPL), categorizadas en función del análisis de las curvas receiver operating characteristics (ROC). El modelo inicial fue

ajustado hasta obtener un modelo final, en el que se calculó el nivel de significación, el porcentaje de acierto (puede desglosarse en sensibilidad y especificidad) y el área bajo la curva de la probabilidad pronosticada por el modelo final, así como el nivel de significación, la odds ratio y su 95% de intervalo de confianza.

2.4. Consideraciones éticas

Este proyecto se llevó a cabo de conformidad con las leyes y normativas aplicables, de acuerdo a los principios éticos internacionales, fundamentalmente la Declaración de Helsinki (versión Fortaleza, Brasil, 2013) y las Normas de Buena Práctica Clínica Epidemiológicas de la ICH (International Conference of Harmonization). Todos los pacientes participantes fueron identificados mediante un código. Los datos fueron anonimizados y protegidos, según la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, y el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD) y cualesquiera otras disposiciones que las complementen o las sustituyan en el futuro. El proyecto fue aprobado por los CEIm de los dos hospitales participantes (PI20: 156 y PI20: 115). No existió por parte de ningún investigador conflicto de intereses, sin existir financiación para su realización.

RESULTADOS

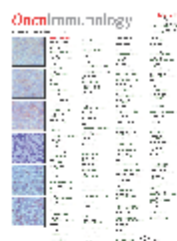
Siguiendo la misma sistemática que en el apartado de material y métodos, los resultados obtenidos en este proyecto se presentan para cada una de las dos publicaciones realizadas.

1. Publicación 1

1 Combined assessment of peritumoral Th1/Th2 polarization and peripheral immunity as a new biomarker in the prediction of BCG response in patients with high risk NMIBC .

Roberto Martínez, Gustavo Tapia, Silvia de Muga, Alba Hernández, María González Cao, Cristina Teixidó, Víctor Urrea, Elisabeth García, Sonia Pedreño-López, Luis Ibarz, Julia Blanco, Bonaventura Clotet, Cecilia Cabrera.

Oncolmunology, 8:8, 1602460, DOI: 10.1080/2162402X.2019.1602460



OncImmunity

ISSN: (Print) 2162-402X (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/koni20>

Combined assessment of peritumoral Th1/Th2 polarization and peripheral immunity as a new biomarker in the prediction of BCG response in patients with high-risk NMIBC

Roberto Martínez, Gustavo Tapia, Silvia De Muga, Alba Hernández, María González Cao, Cristina Teixidó, Víctor Urrea, Elisabet García, Sònia Pedreño-López, Luis Ibarz, Julià Blanco, Bonaventura Clotet & Cecilia Cabrera

To cite this article: Roberto Martínez, Gustavo Tapia, Silvia De Muga, Alba Hernández, María González Cao, Cristina Teixidó, Víctor Urrea, Elisabet García, Sònia Pedreño-López, Luis Ibarz, Julià Blanco, Bonaventura Clotet & Cecilia Cabrera (2019): Combined assessment of peritumoral Th1/Th2 polarization and peripheral immunity as a new biomarker in the prediction of BCG response in patients with high-risk NMIBC, *OncImmunity*, DOI: [10.1080/2162402X.2019.1602460](https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1602460)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1602460>

 [View supplementary material](#)

 Published online: 13 Apr 2019.

 [Submit your article to this journal](#)

 [View Crossmark data](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=koni20>

Combined assessment of peritumoral Th1/Th2 polarization and peripheral immunity as a new biomarker in the prediction of BCG response in patients with high-risk NMIBC

Roberto Martínez^a, Gustavo Tapia^b, Silvia De Muga^c, Alba Hernández^b, María González Cao^d, Cristina Teixidó^{ef}, Víctor Urrea^c, Elisabet García^c, Sònia Pedreño-López^c, Luis Ibarz^g, Julià Blanco^{c,g}, Bonaventura Clotet^{c,g}, and Cecilia Cabrera^c

^aUrology Department, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, IGTP, UAB, Badalona, Spain; ^bPathology Department, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, IGTP, UAB, Badalona, Spain; ^cIrsiCaixa AIDS Research Institute, Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP) UAB, Badalona, Spain; ^dDr. Rosell Oncology Institute, Quirón Dexeus University Hospital, Barcelona, Spain; ^ePangaea Biotech, Quirón Dexeus University Hospital, Barcelona, Spain; ^fPathology Department, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; ^gAIDS and Related Illnesses, Centre for Health and Social Care Research (CESS), Faculty of Medicine, University of Vic – Central University of Catalonia (UVic – UCC), Vic, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Intravesical Bacille Calmette-Guérin (BCG) remains the most effective treatment for high-risk non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC), unfortunately there is no validated biomarker to predict clinical outcome. Here we tried to explore the possibility that a combination of the density of peritumoral infiltrating cells (Th1, Th2 and PD-L1) and the composition of peripheral immune cells (neutrophil and lymphocyte counts) could generate a more reliable prognostic biomarker. Twenty-two patients with high-risk NMIBC treated with BCG (10 BCG nonresponders and 12 BCG responders) were selected. BCG responders had significantly lower level of peritumoral T-bet⁺ cells with an associated higher GATA-3⁺/T-bet⁺ ratio ($p = 0.04$, $p = 0.02$, respectively). Furthermore, the immune polarization in tissue (GATA-3⁺/T-bet⁺ ratio) adjusted for the systemic inflammation (neutrophil-to-lymphocyte ratio) showed a significantly higher association with the BCG response ($p = 0.004$). A survival analysis demonstrated prolonged recurrence-free survival (RFS) in patients with a lower T-bet⁺/Lymphocyte ratio and higher GTR/NLR ($p = 0.01$). No association was observed between peritumoral PD-L1⁺ expression and the BCG response. In conclusion, alterations in overall immune function, both local and systemic, may influence the therapeutic response to BCG, therefore a combined analysis of tumoral (Th2/Th1 ratio) and peripheral (NLR) immune composition prior to treatment may be a promising approach to predict the BCG response in high-risk NMIBC patients.

ARTICLE HISTORY

Received 29 November 2018
Revised 17 January 2019
Accepted 29 March 2019

KEYWORDS

NMIBC; BCG
immunotherapy; GATA-3;
T-bet; NLR; biomarker

Introduction



In patients with high-risk non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC), immunotherapy with Bacillus Calmette-Guérin (BCG) is the most successful adjuvant treatment;¹ nevertheless, the reported response rate is only 60% with 5-year recurrence rates of 30% to 40% and progression rates from 9% to 13%.² Despite many efforts, no biomarkers are currently able to predict patient prognosis to discriminate individuals who will respond to BCG treatment from individuals who would be best served by more aggressive therapies, such as cystectomy.³


Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) have a strong influence on cancer-specific survival.⁴ In patients with metastatic urothelial carcinoma (UC) receiving platinum-based chemotherapy, a recent study has shown that TILs perform as a significant prognostic factor,⁵ which is in line with other studies demonstrating the positive prognostic value of tumor-infiltrating CD3⁺ and CD8⁺ T cells in survival.^{6,7} Nevertheless, the impact will depend on the phenotype, localization and density of the immune cells present in the tumor,⁸ with peritumoral

cells exhibiting a more critical role than intratumoral cells in the clinical outcome of UC,⁵ melanoma⁹ and breast cancer.¹⁰

Although the exact mechanism of BCG-induced antitumor activity is not fully understood, it is known that BCG acts as a localized Th1-polarizing immunomodulator;^{11,12} therefore, one emerging concept in this respect relates to the prognostic and/or predictive value that the pretreatment Th1/Th2 polarization of infiltrating cells may have on the BCG response. Interestingly, in a mixed NMIBC population (Ta, T1 and CIS)¹³ and a group of patients with carcinoma in situ,¹⁴ an increased density of intratumoral Th2 cells and a higher Th2/Th1 ratio in BCG responders prior treatment have been described, which suggests that BCG is effective only when the tumor microenvironment converts from Th2 to Th1.

Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) is abundantly present in the tumor microenvironment, where it is expressed by many malignant cells, as well as immune cells. The expression of this inhibitor receptor suppresses anti-tumor immunity and promotes tumor progression.¹⁵ In contrast, PD-L1 expression in TILs has been correlated with improved overall survival in

CONTACT Cecilia Cabrera  ccabrera@irsicaixa.es  Institut de Recerca de la SIDA-IrsiCaixa, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (IGTP), Caretem del Canyet S/N. 08916 Badalona, Barcelona, Spain

 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

© 2019 Taylor & Francis Group, LLC

patients with UC who developed metastatic disease.¹⁶ In NMIBC, the role of PD-L1 expression in the tumor prior to BCG treatment has not previously been characterized; however, a high expression of PD-L1 within BCG-induced granulomas has been associated with resistance to the therapy.¹⁷ These data suggest that the accumulation of PD-L1-expressing cells in bladder tissues could abrogate the effectiveness of BCG immunotherapy, a hypothesis reinforced by the recent finding that BCG and anti-PD-L1 combination therapy enhance the antitumor immunity in an animal model.¹⁸

In addition to TILs, systemic immunological parameters have also been correlated with cancer outcome. The peripheral absolute lymphocyte count has been suggested to not only be a prognostic factor of survival in several tumor types¹⁹ but also a predictor of treatment efficacy.²⁰ Furthermore, the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), a measure of systemic inflammation and a strong predictor for prognosis in patients with different diseases,^{21,22} has been suggested to be a prognostic predictor for overall survival and disease free survival and a predictive marker of the response to treatment in many cancers.²³ In bladder cancer, high NLR has been associated with poor clinical outcome in individuals with muscle-invasive bladder cancer (MIBC);^{24,25} it has been postulated as a prognostic factor for individuals with MIBC undergoing neoadjuvant chemotherapy²⁶⁻²⁸ and it correlates with disease progression and recurrence in individuals with NMIBC.^{29,30}

Overall, immune biomarkers based on TILs or blood cells have been independently described in cancer patients; however, the possibility that a combination of both factors could generate a more reliable prognostic biomarker has not previously been explored. In recent years, the hypothesis that the ratios between different immune subsets, such as CD4/CD8 or NLR, are more predictive of prognosis has gained substantial attention as these ratios may provide a more comprehensive view of the complexity of the immune system. Therefore, the aim of our study was to determine the densities of Th1 (T-bet⁺), Th2 (GATA-3⁺) and PD-L1⁺ peritumoral cells in bladder tissue samples, as well as the systemic immunity (absolute neutrophil and lymphocyte counts) prior to BCG treatment in a homogeneous population of high-risk NMIBC patients to elucidate whether a combination of these immune parameters could generate a new biomarker useful for predicting the response to BCG.

Results

Participant characteristics

Twenty-two individuals with primary T1HG NMIBC were included in the study. The median age was 70.5 years (IQR: 62-78), and all patients, except for one patient, were men (96%). Ten individuals were classified as BCG nonresponders with a median (range) time to recurrence of 3.5 (2-6) months, and 12 individuals were characterized as BCG responders (median to recurrence not reached) after at least 30 months of follow-up. Both groups were similar in age, gender and BMI and did not exhibit significant differences in the peripheral neutrophil and lymphocyte counts (Table 1).

Table 1. Participant Characteristics.

	BCG Responders (n = 12)	BCG Nonresponders (n = 10)	p-value ^a
Age (years); median (IQR)	67 (61-78)	72 (66-80)	0.41
Gender (male); n (%)	12 (100%)	9 (90%)	0.45 ^b
BMI (kg/m ²); median (IQR)	28.2 (26.1-30.4)	28.7 (26.7-34.6)	0.41
Time to tumor recurrence; months (range)	Not reached	3.5 (2-6)	
Absolute neutrophils count (x10 ⁹ /L); median (IQR)	4.5 (3.3-4.8)	4.6 (4-6)	0.37
Absolute lymphocyte count (x10 ⁹ /L); median (IQR)	2.1 (1.6-2.6)	1.8 (1.3-2.4)	0.32
NLR; median (IQR)	1.9 (1.6-2.7)	2.3 (1.8-4.2)	0.12

BMI: Body Mass Index. NLR: neutrophil-to-lymphocyte ratio. ^aMann-Whitney U-test. ^bFisher exact test

Tumor-infiltrating Th1 and Th2 polarized lymphocytes

The expression of transcription factor T-bet (Th1) and GATA-3 (Th2) was found in the peritumoral tissues prior to BCG treatment in all individuals tested. A significantly higher infiltration of Th2 cells than Th1 cells was identified, with a median (IQR) number of total GATA-3⁺ and T-bet⁺ cells of 644 (369-1064) and 170 (64-277), respectively (p < 0.0001, Figure 1(a)), and a GATA-3⁺/T-bet⁺ ratio (GTR) of 4.9 (2.4-8.4). There was no significant correlation between the total density of peritumoral GATA-3⁺ cells and T-bet⁺ cells in all patients (Spearman r = 0.3; p = 0.15, Figure 1(b)). When BCG response was taken into account, we observed that the response was significantly associated with a lower level of peritumoral T-bet⁺ cells, with no changes in the total density of peritumoral GATA-3⁺ cells (median 134 and 246 cells; p = 0.04 and 708 and 604 cells; p = 0.4 in BCG responders and BCG nonresponders, respectively, Figure 2(a,b)). Furthermore, a higher GTR was identified in the BCG responders than in the BCG nonresponders (7.2 and 2.6, respectively; p = 0.02, Figure 2(c)). Representative immunohistochemical stainings of GATA-3, T-bet and hematoxylin-eosin in bladder tissue obtained in the RTU prior to BCG treatment of a BCG responder (left) and a BCG nonresponder (right) are shown in Figure 3. Lower level of T-bet⁺ cells in the BCG responder than in the nonresponder (111 vs 325 T-bet⁺ cells, respectively), similar values of GATA-3⁺ cells (1090 vs 908 cells, respectively) and higher GTR (9.8 vs 2.7, respectively) can be observed.

Relationship between systemic immunity and bladder immune infiltration and their association with the response to subsequent BCG treatment

The levels of peripheral absolute lymphocytes, neutrophils, and the systemic inflammatory marker NLR prior to BCG treatment were obtained for all individuals (Table 1). The levels of neutrophils, lymphocytes and the NLR were 4.5 x 10⁹ cells/L, 1.9 x 10⁹ cells/L and 2.3, respectively, in the total population with no significant differences in any of these parameters between the two treatment groups; however, a slightly higher NLR in the BCG nonresponder population was observed (median 1.9 vs 2.3 for responders and nonresponders, respectively; p = 0.12, Table 1). Spearman

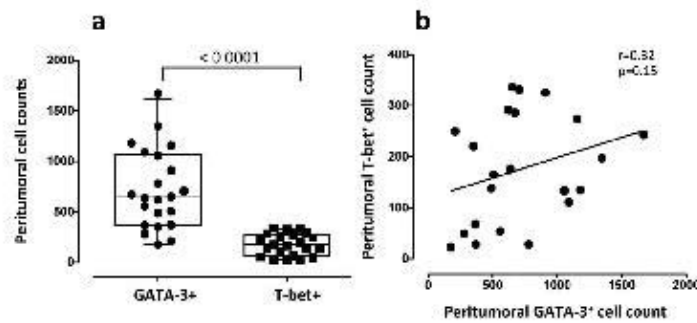


Figure 1. Tumor-infiltrating Th1 (T-bet) and Th2 (GATA-3) lymphocytes in bladder tissues prior to BCG treatment in high-risk NMIBC patients. (a) Total density of peritumoral T-bet⁺ and GATA-3⁺ cells in all patients. The boxes represent the median and interquartile range of the values. Individual data of all subjects is displayed. The median values were compared using a non-parametric Mann-Whitney U-test. (b) Correlation analysis of peritumoral GATA-3⁺ and T-bet⁺ cells. Linear correlation (Spearman) *r* and *p*-values are shown.

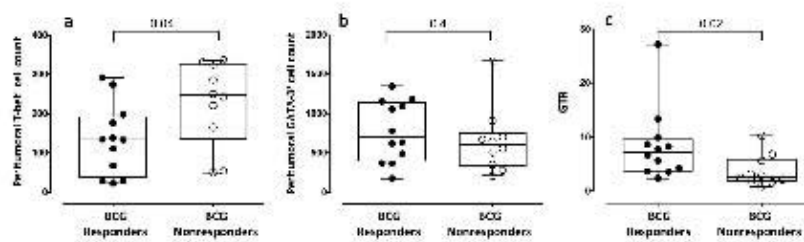


Figure 2. Peritumoral lymphocytes in bladder tumors prior to BCG treatment in responders and nonresponder to BCG. (a) Total density of T-bet⁺ cells and (b) GATA-3⁺ cells in the tumor before BCG treatment in responders and nonresponder to BCG. (c) GTR in BCG responders and nonresponders. Median and IQR values are shown. Nonparametric Mann-Whitney U test was used to analyze differences between both groups. GTR (GATA-3⁺/T-bet⁺ ratio).

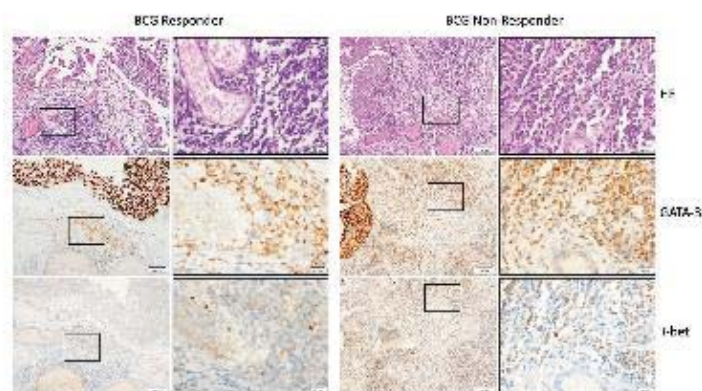


Figure 3. Immunohistochemistry analysis of peritumoral TILs and hematoxylin/eosin (HE) staining. Representative images of bladder tissue stained with anti-GATA-3, anti-T-bet and HE in a BCG responder and a BCG nonresponder patient. 10X and 40X magnification (left and right part of each patient, respectively) are shown.

correlation analysis between the peripheral and local immunity prior to BCG treatment showed that the peritumoral density of T-bet⁺ and GATA-3⁺ cells was not correlated with the peripheral absolute neutrophil or lymphocyte counts

in the total population, the BCG responders or the nonresponders (Figure S1). However, when the T-bet⁺ and GATA-3⁺ cell density was normalized with the absolute lymphocyte count, a significantly lower T-bet⁺/Lymphocyte ratio was

identified in the individuals with a BCG response (median (IQR): 53 (23–95) and 141 (78–211) in BCG responders and nonresponders, respectively; $p = 0.04$, Figure 4(a)), with no differences between the normalized GATA-3⁺ cell levels between both groups (median (IQR): 321 (214–490) and 403 (197–597) in BCG responders and nonresponders, respectively; $p = 0.77$, Figure 4(b)). In addition, when a new immune score GTR/NLR was calculated by combining the local immune polarization (GATA-3⁺/T-bet⁺ ratio) with the systemic inflammation using the NLR value, BCG responders had a significantly higher ratio than BCG nonresponders (median (IQR): 3.6 (1.5–5.6) and 0.78 (0.63–1.8), respectively; $p = 0.004$, Figure 4(c)).

Influence of pretreatment immunity on recurrence-free survival (RFS) after BCG therapy

To perform survival analyses, all individuals were divided into two groups (low vs high counts), based on the median value of the different variables analyzed (median cell density: 170 for T-bet⁺ cell count; 644 for GATA-3⁺ cell count; 4.95 for GTR; 4.45×10^9 cells/L for neutrophils; 1.85×10^9 cells/L for lymphocytes; 90.81 for T-bet⁺/Lymphocyte ratio, 2.26 for NLR, 1.69 for GTR/NLR ratio, and 70.5 years for age). The individuals with a lower level of peritumoral T-bet⁺ cells showed a trend towards better RFS, although significance was not reached ($p = 0.11$, Figure 5(a)). The inclusion of systemic immunity showed that

patients with a low T-bet⁺/Lymphocyte ratio prior to BCG treatment had a significantly prolonged RFS compared with the individuals with a high ratio (HR = 5.3; 95% CI:1.4–19.9; $p = 0.01$, Figure 5(b)). The same significant difference in RFS was identified when the GTR/NLR index was evaluated, with a prolonged RFS in the patients with a higher index (HR = 0.18; 95% CI:0.05–0.7; $p = 0.01$, Figure 5(c)). The difference in RFS between individuals with low and high T-bet⁺/Lymphocyte ratios was maintained even when data was separated by age. However, the difference was not significant, likely because of the low number of individuals in each group (Figure S2). The sensitivity ranged from 66.7% (95% CI: 34.9–90.1%) for peritumoral T-bet⁺ cell count to 75% (95% CI: 42.8–94.5%) for T-bet⁺/Lymphocyte ratio and GTR/NLR index and the specificity ranged from 70% (95% CI: 34.8–93.3%) for peritumoral T-bet⁺ cell count to 80% (95% CI: 44.4–97.5%) for T-bet⁺/Lymphocyte ratio and GTR/NLR index. No association was identified for other parameters, such as age, GATA-3⁺ cells, neutrophils, lymphocytes or NLR.

PD-L1 expression in tumoral cells and peritumoral infiltrating immune cells

The PD-L1 expression in tumor cells prior to BCG treatment was mostly negative with only 2 individuals (9%) being positives in the population. In contrast, 16 of the 22 samples (73%) had positive PD-L1 expression ($\geq 1\%$) in peritumoral

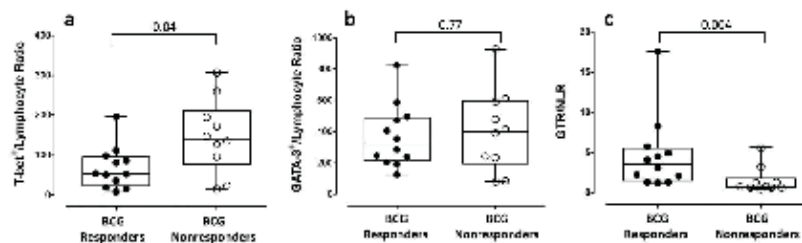


Figure 4. Combination of local and systemic immunity biomarkers in BCG responders and BCG nonresponders. (a) Total cell density of T-bet⁺ cells and (b) GATA-3⁺ cell normalized to the absolute lymphocyte counts. (c) The GTR/NLR immune score was obtained by normalizing the immune polarization in the tissue to the level of systemic inflammation (NLR). Differences were tested using Mann-Whitney U nonparametric test. GTR (GATA-3⁺/T-bet⁺ ratio). NLR (neutrophil-to-lymphocyte ratio).

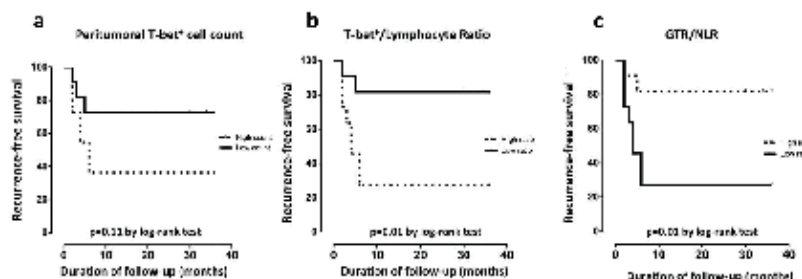


Figure 5. Kaplan Meyer survival curves for recurrence-free survival (RFS) in months. RFS according to (a) total peritumoral T-bet⁺ cells, (b) T-bet⁺/Lymphocyte ratio and (c) the immune score GTR/NLR stratified by high or low count based on the median (<median = low count; >median = high count). P values by log-rank test.

infiltrating immune cells. Thirteen (59%), 9 (41%), 8 (36%), 5 (23%) and 2 (9%) samples had expressions of $\geq 5\%$, $\geq 10\%$, $\geq 20\%$, $\geq 25\%$ and $\geq 35\%$, respectively. Representative IHC staining is shown in Figure S3. No differences in the expression pattern of PD-L1 were identified between the BCG responder and nonresponder individuals. Expression was observed in 70% (7 of 10) of the BCG responders and 75% (9 of 12) of the BCG nonresponders with the same distribution among the different levels of positivity (data not shown). To evaluate the relationship between PD-L1 in tissue, systemic and other tissue immune cells, samples were classified according to their PD-L1 level of expression as ($\leq 10\%$ or $>10\%$) and according to BCG response. The individuals with the highest percentages of peritumoral PD-L1⁺ cells had a significantly lower number of peripheral blood lymphocytes ($p = 0.04$, Table 2), however no association with age, other systemic or local immune parameters or BCG response was found (Table 2).

Discussion

The search for predictive markers of the clinical response to intravesical BCG in NMIBC has been a constant feature in urological research in recent years. Given that up to 30-50% of patients will experience treatment failure, and up to 15% of these cases can progress, the early identification of patients who will not respond to BCG instillations is essential, so that other treatments can be used and/or radical treatments (early cystectomy) are not delayed.

Several studies have indicated that TILs have a major impact on the clinical course of several cancers (for a review, see ref. 4). In our study, the total cell density of peritumoral cells in bladder tissues prior to BCG treatment was evaluated, as it has been reported that cells surrounding the tumor (peritumoral TILs) are more crucial than intratumoral TILs for survival.^{3,9} Regarding phenotype, we observed a predominant GATA-3⁺ (Th2) over T-bet⁺ (Th1) peritumoral infiltrate. This Th1/Th2 imbalance is in accordance with other reports that evaluated tissues from NMIBC patients^{13,14,31} or other cancer types in which the imbalance was described not only in tissues but also in peripheral blood mononuclear cells and cytokine production.^{32,33} We found no correlation between the density of tumor-infiltrating GATA-3⁺ and the density of T-bet⁺, which suggests that although

they are mutually antagonistic,³⁴ other cytokines/chemokines produced within the tumor microenvironment are tipping the observed immune imbalance.³⁵

The influence of the presence of different TIL subpopulations in the tissue prior to treatment on the BCG response in homogeneous populations of high-risk NMIBC patients has not been fully investigated. Increased intratumoral CD4⁺, GATA-3⁺ T-cells and GTR have been associated with the BCG response and a longer RFS in a mixed population of low and high-risk NMIBC (Ta, T1 and CIS).¹³ A similar tendency towards increased numbers of GATA-3⁺ cells in BCG responders has also been reported by the same authors, although only 4 BCG nonresponders were evaluated.³¹ Consistent with these data, the GTR has been described as a predictor of the BCG response in one study restricted to CIS patients.¹⁴ These observations led authors to propose that an intratumoral Th2 predisposition prior to treatment determined the clinical response to BCG. In our population of high-risk NMIBC patients (T1HG), we observed the same significant association of GTR with the BCG response. However, a significantly lower level of T-bet⁺ cells was identified in BCG responders without significant changes in the total density of peritumoral GATA-3⁺ cells; these findings indicate that the total density of T-bet⁺ cells, rather than the density of peritumoral GATA-3⁺ cells, is the determinant factor for treatment response. These data provide novel arguments to reinforce the hypothesis that in high-risk NMIBC patients, tumor-infiltrating Th1 cells present prior to BCG treatment could be a population of inactive cells, due to immune escape or tolerance, and therefore, the expansion of these cells after the addition of BCG is unlikely to be effective.^{14,31} We can speculate that the detection of those cells is indicating the presence of a paradoxically immunosuppressive environment. In line with this hypothesis is the fact that, although T-bet is a transcription factor required for differentiation of and IFN- γ secretion by CD4⁺ Th1 T cells, some activated Treg cells express T-bet, which have been suggested to provide Treg cells with enhanced suppressive capacity.^{36,37} Although this T-bet⁺Treg are currently a subject of research, it has been described that despite the T-bet expression, this T-bet⁺Treg subtype is characterized by regulatory, rather than pro-inflammatory properties, producing less IFN- γ and TNF- α as compared with regular T-bet⁺ Th1 cells³⁸ and therefore, in patients with high-risk NMIBC

Table 2. Relationship between PD-L1 in tissue and other immune parameters.

	PD-L1 expression in Peritumoral immune cells						p-value ^a
	$\leq 10\%$ (n = 14)			$> 10\%$ (n = 8)			
	BCG Responders (n = 8)	BCG Nonresponders (n = 6)	p-value ^b	BCG Responders (n = 4)	BCG Nonresponders (n = 4)	p-value ^b	
Age (years); median (IQR)	63 (60-77)	72 (61-78)	0.6	74 (64-85)	75 (66-84)	1	0.12
Absolute neutrophils count ($\times 10^9/L$); median (IQR)	4.5 (3.3-4.8)	4.6 (4-5.6)	0.6	4 (2.8-5.1)	5.4 (3-8.7)	0.6	0.9
Absolute lymphocyte count ($\times 10^9/L$); median (IQR)	2.1 (1.7-2.5)	2.1 (1.7-2.8)	1	2 (1.4-2.6)	1.2 (1.1-1.7)	0.1	0.04
NLR; median (IQR)	1.8 (1.6-2.7)	2 (1.8-2.6)	0.5	2.3 (1.3-3)	4.5 (2.7-5.2)	0.1	0.07
Total Peritumoral GATA-3 ⁺ cells; median (IQR)	630 (400-1012)	454(262-757)	0.2	1105 (395-1173)	662 (543-1420)	0.9	0.18
Total Peritumoral T-bet ⁺ cells; median (IQR)	123(38-192)	235 (53-327)	0.2	134 (50-239)	265 (185-324)	0.1	0.6
GTR ratio; median (IQR)	6.2 (3.6-12.5)	2.5(1.5-6.8)	0.08	8 (5.1-8.6)	2.8 (2-6)	0.06	0.9

^aComparison of low PD-L1 expression ($\leq 10\%$) and high PD-L1 expression ($> 10\%$); ^bComparison of BCG responders and BCG nonresponders.

the presence of those cells in the tissue could be contributing to the BCG failure. Thus, the development of new therapeutics targeting these cells prior to BCG treatment could be a new strategy to improve BCG's response.

In addition to local immunity, the peripheral absolute lymphocyte count has been associated with an inferior outcome in various cancers.¹⁹ Furthermore, peripheral NLR has been postulated to be a prognostic factor for individuals with MIBC²⁶⁻²⁸ and higher values of NLR have been associated with an increased risk of disease recurrence and overall survival in NMIBC.^{29,30} In the present study and consistent with a recently published report,³⁹ a higher NLR prior to BCG treatment value was identified in BCG nonresponders, although the difference did not reach significance.

As indicated, immune alterations at both the tumor site and in peripheral circulation may be present in individuals with cancer. Nevertheless, the relationship between peripheral and tumor-infiltrating immune cells prior treatment and the development of an immune score that takes into account systemic and local immune markers has not been previously evaluated. In our population of high-risk NMIBC patients, no correlation was identified between TILs (GATA-3⁺ or T-bet⁺) and peripheral cells (neutrophils or lymphocytes) prior to BCG treatment. These data are in agreement with previous work in ovarian cancer, in which no association was found between the lymphocyte count and infiltrating CD8⁺ or CD20⁺ cells;⁴⁰ thus, the tumor infiltration is not directly associated with the level of peripheral cells. Interestingly, however, the value of infiltrating T-bet⁺ cells, normalized to the peripheral blood lymphocyte levels, was significantly associated with recurrence-free survival. Furthermore, the immune polarization in tissue (GTR) adjusted for the systemic inflammation (NLR) showed a significantly higher difference between BCG responders and nonresponders, with a positive association between an increased GTR/NLR immune score and a higher RFS. These results show that the tumor-infiltrating immune cell profile and systemic inflammation play important roles in the response to BCG; therefore, an immune biomarker that includes both parameters could increase the accuracy of the prediction of clinical outcome after BCG treatment.

Finally, the levels of PD-L1 expression in tumor cells have been shown to predict localized UC stage progression.¹⁷ Moreover, PD-L1 expression has been associated with increased resistance to BCG therapy, with high expression of this marker within BCG-induced bladder granulomata in patients failing the therapy.¹⁷ In contrast, PD-L1 expression in tissue prior BCG treatment was not significantly associated with BCG response in our study cohort. However, a higher local PD-L1 expression was observed in individuals with lower peripheral lymphocyte counts and higher NLR, although this last association was not statistically significant. These data could suggest a relationship between systemic inflammation and local immunosuppression and, therefore, an unfavorable clinical outcome in NMIBC patients. In individuals with cholangiocarcinoma, Sangchamanon et al. found that an increased PD-L1 expression was also associated with a higher NLR,⁴¹ although this association, to our knowledge, has not been previously described in patients with NMIBC.

The limitations of this study are primarily associated with its retrospective design and small patient number, which decrease

the statistical power. However, the high-risk population investigated is highly homogeneous and includes a relatively high number of nonresponders compared to similar studies.^{14,51}

Further prospective studies with larger populations are required to validate these preliminary findings. In addition, the expression of PD-L1 could be slightly lower than the expression reported in other studies, as differences in the percentage of positive cells have been described for different anti PD-L1 antibody clones.⁴²

In conclusion, the BCG response in high-risk NMIBC patients is associated with local and systemic immune alterations in the bladder tissue prior to BCG treatment. Our results suggest the potential predictive value of the combined assessment of peritumoral Th1/Th2 polarization and peripheral immunity composition for the identification of individuals who will obtain more benefit from BCG treatment.

Patients and methods

Study subjects

This retrospective study included 22 patients treated by complete transurethral resection (TUR) and with high-grade (T1HG) NMIBC, without associated *in situ* carcinoma and who received treatment with BCG. The BCG treatment consisted of once-weekly instillation of BCG for 6 weeks with a maintenance course with 3 weekly instillations at 3, 6 and 12 months after the initial induction course. Patients were stratified based on their response to BCG treatment. BCG responders were defined as patients without a recurrence or progression based on follow-up cystoscopy and urinary cytology for at least 30 months after BCG treatment initiation. Neutrophil and lymphocyte counts were obtained 3–4 weeks before surgery. Demographic, biometric characteristics and immunological data, including age, gender, Body Mass Index, and numbers of neutrophils and lymphocytes, were retrieved from medical records. The neutrophil and lymphocyte counts have been obtained from the routine blood tests realized before the TUR using an automated haematology analyser that measures the volume and the size of the cells using impedance, conductivity and light scatter. The values are shown as the numbers of neutrophil and lymphocyte counts $\times 10^9/L$ of blood.

The institutional review board and the ethical committee of the Hospital Germans Trias i Pujol approved the study (code: PI-18-137). The methods were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all participants.

Evaluation of GATA-3, T-bet and PD-L1 protein expression by immunohistochemistry (IHC) in peritumoral cells

Immunohistochemical analysis was conducted on 4 μ m serial sections from archived formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) bladder tumor tissues. Monoclonal antibodies specific for the Th2-associated transcription factor GATA-3 (clone L50-823, Ventana Medical Systems) or the Th1-associated transcription factor T-bet (clone H-210, Santa Cruz Biotechnology) were used. IHC staining was performed using an automated immunostainer (Ventana

Medical Systems Inc.) according to the manufacturer's protocol. The total numbers of peritumoral GATA-3 and T-bet-positive cells were manually counted in 5 high-power fields by three independent observers unaware of the evolution of the patients, and the mean values were obtained. PD-L1 immunohistochemistry was performed using the Ventana SP142 assay (Ventana Medical Systems Inc.). The PD-L1 expression was evaluated on both tumor cells (TC) and peritumoral TILs. Percentages of >1% were considered positive for PD-L1. Peritumoral lymphocytes were defined as lymphocytes surrounding the tumor mass.

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as the medians with interquartile ranges and were compared using nonparametric tests (two-tailed Mann-Whitney U-test). Discrete variables were described as percentages and were analyzed using the chi-square or Fisher's exact tests. Spearman's correlation coefficient was calculated to identify associations between variables. All analyses and graphical representations were performed in Graph-Pad Prism v5.0a (GraphPad Software, Inc.). The median values of each parameter were used as a cut-off point for the Kaplan-Meier survival analysis and comparison by the log-rank test. The prognostic value was calculated using the HR and 95% CIs. Sensitivity and specificity were determined for different cut-offs to predict recurrence. 95% CI were also calculated. All statistical analyses used 2-sided p-values of ≤ 0.05 to define statistically significant differences.

Acknowledgments

We are grateful to Pangea Biotech for the PD-L1 stainings and the technical staff of the Pathology Department for their help with all Immunohistochemical analyses. The authors would like to thank all individuals who were participants in the study and the clinical staff of the Urology Department. IrsiCaixa and IGTP are part of the CERCA Program/Generalitat de Catalunya.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Funding

This study was funded by funds generated at the Institut de Recerca de la SIDA-IrsiCaixa. PD-L1 immunohistochemistry was funded by Pangea Biotech. JB and CC are researchers at the Fundació Institut de Recerca en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol supported by the Health Department of the Catalan Government/Generalitat de Catalunya and ISCIII grant numbers PII401307 (to JB) and PI15/01053 (to CC).

References

- Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn BWG, Compérat E, Sylvester RJ, Kaasinen E, Böhle A, Palou Redorta J, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol*. 2013;64(4):639-653. doi:10.1016/j.eururo.2013.06.003.
- Gambier S, Sylvester RJ, Collette L, Gontero P, Brausi MA, van Andel G, Kirkels WJ, Silva FCD, Oosterlinck W, Prescott S, et al. EORTC nomograms and risk groups for predicting recurrence, progression, and disease-specific and overall survival in Non-muscle-invasive stage Ta-T1 urothelial bladder cancer patients treated with 1-3 years of maintenance bacillus calmette-guérin. *Eur Urol*. 2016;69:60-69. doi:10.1016/j.eururo.2015.06.045.
- Kamat AM, Li R, O'Donnell MA, Black PC, Rouprêt M, Catto JW, Compérat E, Ingersoll MA, Witjes WP, McConkey DJ, et al. Predicting response to intravesical bacillus calmette-guérin immunotherapy: are we there yet? A systematic review. *Eur Urol*. 2018;73(5):738-748. doi:10.1016/j.eururo.2017.10.003.
- Gooden MJM, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2011;105:93-103. doi:10.1038/bjc.2011.189.
- Huang H-S, Su HY-L, Li P-H, Chiang P-H, Huang C-H, Chen C-H, Hsieh M-C. Prognostic impact of tumor infiltrating lymphocytes on patients with metastatic urothelial carcinoma receiving platinum based chemotherapy. *Sci Rep*. 2018;8:7485. doi:10.1038/s41598-018-25944-1.
- Sharma P, Shen Y, Wen S, Yamada S, Jungbluth AA, Gnjatic S, Bajorin DF, Reuter VE, Herr H, Old LJ, et al. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:3967-3972. doi:10.1073/pnas.0611618104.
- Faraj SF, Munari E, Guner G, Taube J, Anders R, Hicks J, Meeker A, Schoenberg M, Bivalacqua T, Drake C, et al. Assessment of tumoral PD-L1 expression and intratumoral CD8 + T cells in urothelial carcinoma. *Urology*. 2015;85:703.e1-6. doi:10.1016/j.urology.2014.10.020.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Gabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313:1960-1964. doi:10.1126/science.1129139.
- Park CK, Kim SK. Clinicopathological significance of intratumoral and peritumoral lymphocytes and lymphocyte score based on the histologic subtypes of cutaneous melanoma. *Oncotarget*. 2017;8:14759-14769. doi:10.18632/oncotarget.14736.
- Perez EA, Ballman KV, Tenner KS, Thompson EA, Badve SS, Bailey H, Baehner FL. Association of stromal tumor-infiltrating lymphocytes with recurrence-free survival in the N9831 adjuvant trial in patients with early-stage HER2-positive breast cancer. *JAMA Oncol*. 2016;2:56-64. doi:10.1001/jamaoncol.2015.3239.
- Saint F, Patard J, Groux Muscatelli B, Lefrère Belda MA, Gil Diaz de Medina S, Abbou CC, Chopin DK. Evaluation of cellular tumour rejection mechanisms in the peritumoral bladder wall after bacillus Calmette-Guérin treatment. *BJU Int*. 2001;88:602-610. PMID:11678759.
- Kamat AM, Briggman J, Urbauer DL, Svatek R, Nogueras Gonzalez GM, Anderson R, Grossman HB, Prat F, Dinney CP. Cytokine panel for response to intravesical therapy (CyPRIT): nomogram of changes in urinary cytokine levels predicts patient response to bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol*. 2016;69:197-200. doi:10.1016/j.eururo.2015.06.023.
- Pichler R, Fritz J, Zavadil C, Schäfer G, Culig Z, Brunner A. Tumor-infiltrating immune cell subpopulations influence the oncologic outcome after intravesical bacillus calmette-guérin therapy in bladder cancer. *Oncotarget*. 2016;7(26):39916-39930. doi:10.18632/oncotarget.9537.
- Nunez-Nateras R, Castle EP, Protheroe CA, Stanton ML, Ocal TI, Ferrigni EN, Ochikur SI, Jacobsen EA, Hou Y-X, Andrews PE, et al. Predicting response to bacillus Calmette-Guérin (BCG) in patients with carcinoma in situ of the bladder. *Urol Oncol*. 2014;32(1):45.e23-30. doi:10.1016/j.urolonc.2013.06.008.
- Ostrand-Rosenberg S, Horn LA, Haile ST. The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity. *J Immunol*. 2014;193:3835-3841. doi:10.4049/jimmunol.1401572.

16. Bellmunt J, Millane SA, Werner I, Fay AP, Calleja M, Leow JJ, Taplin ME, Choueiri TK, Hodi FS, Freeman GJ, et al. Association of PD-L1 expression on tumor-infiltrating mononuclear cells and overall survival in patients with urothelial carcinoma. *Ann Oncol*. 2015;26:812-817. doi:10.1093/annonc/mdv009.
17. Inman BA, Sebo TJ, Frigola X, Dong H, Bergstrahl EJ, Frank I, Pradet Y, Lacombe I, Kwon ED. PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granuloma: associations with localized stage progression. *Cancer*. 2007;109:1499-1505. doi:10.1002/ncr.22588.
18. Wang Y, Liu J, Yang X, Liu Y, Liu Y, Li Y, Sun L, Yang X, Niu H. Bacillus Calmette-Guérin and anti-PD-L1 combination therapy boosts immune response against bladder cancer. *Oncotargets Ther*. 2018;11:2891-2899. doi:10.2147/OTT.S165840.
19. Ray-Coquard I, Crozet C, Van Glabbeke M, Sebban C, Le Cesne A, Judson I, Tredan O, Verweij J, Biron P, Labidi I, et al. Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. *Cancer Res*. 2009;69:5383-5391. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3845.
20. Lisoni P, Brivio F, Fumagalli I, Messina G, Ghezzi V, Frontini L, Giani L, Vaghi M, Ardizzone A, Gardani GS. Efficacy of cancer chemotherapy in relation to the pretreatment number of lymphocytes in patients with metastatic solid tumors. *Int J Biol Markers*. 2004;19:135-140. PMID:15255546. doi:10.1177/17246008041900208.
21. Bhat TM, Afari ME, Garcia LA. Neutrophil lymphocyte ratio in peripheral vascular disease: a review. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2016;14:871-875. doi:10.1586/1477907.2.2016.1165091.
22. Djordjevic D, Rondovic G, Sarbatovic M, Stanojevic I, Udovicic I, Andjelic T, Zeba S, Milosavljevic S, Stankovic N, Abazovic D, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, monocyte-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio, and mean platelet volume-to-platelet count ratio as biomarkers in critically ill and injured patients: which ratio to choose to predict outcome and nature of bacteremia? *Mediators Inflamm*. 2018;2018:3758068. doi:10.1155/2018/3758068.
23. Templeton AJ, McNamara MG, Sreraga B, Vera-Badillo FE, Anaja P, Ocaña A, Leibowitz-Amit R, Sonpavde G, Knox JJ, Tran B, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(6):djul24. doi:10.1093/jnci/dju124.
24. Gondo T, Nakashima J, Ohno Y, Choichiro O, Horiguchi Y, Namiki K, Yoshioka K, Ohori M, Hatano T, Tachibana M. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio and establishment of novel preoperative risk stratification model in bladder cancer patients treated with radical cystectomy. *Urology*. 2012;79:1085-1091. doi:10.1016/j.urol.2011.11.070.
25. Viers BR, Boorjian SA, Frank I, Tarrell RF, Thapa P, Karnes RJ, Thompson RH, Tollefson MK. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with advanced pathologic tumor stage and increased cancer-specific mortality among patients with urothelial carcinoma of the bladder undergoing radical cystectomy. *Eur Urol*. 2014;66:1157-1164. doi:10.1016/j.eururo.2014.02.042.
26. Buisan O, Orsola A, Oliveira M, Martinez R, Etxaniz O, Areal J, Ibarz L. Role of inflammation in the perioperative management of urothelial bladder cancer with squamous-cell features: impact of neutrophil-to-lymphocyte ratio on outcomes and response to neoadjuvant chemotherapy. *Clin Genitourin Cancer*. 2017;15:e697-e706. doi:10.1016/j.jdg.2017.01.024.
27. Buisan O, Orsola A, Areal J, Font A, Oliveira M, Martinez R, Ibarz L. Low pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts for good outcomes in patients receiving neoadjuvant chemotherapy before radical cystectomy for muscle invasive bladder cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2017;15:145-151.e2. doi:10.1016/j.jdg.2016.05.004.
28. Kaiser J, Li H, North SA, Leibowitz-Amit R, Seah J-A, Morshed N, Chau C, Lee-Ying R, Heng DY, Sridhar S, et al. The prognostic role of the change in neutrophil-to-lymphocyte ratio during neoadjuvant chemotherapy in patients with muscle-invasive bladder cancer: a retrospective, multi-institutional study. *Bladder Cancer*. 2018;4:185-194. doi:10.3233/BLC-170133.
29. Vartolomei MD, Porav-Hodade D, Ferro M, Mathieu R, Abufaraj M, Foerster B, Kimura S, Shariat SF. Prognostic role of pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in patients with non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC): A systematic review and meta-analysis. *Urol Oncol*. 2018;S1078-1439(18)30166-2. doi:10.1016/j.urolonc.2018.05.014.
30. Kang M, Jeong CW, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Preoperative neutrophil-lymphocyte ratio can significantly predict mortality outcomes in patients with non-muscle invasive bladder cancer undergoing transurethral resection of bladder tumor. *Oncotarget*. 2017;8:12891-12901. doi:10.18632/oncotarget.14179.
31. Pichler R, Gruenbacher G, Culig Z, Brunner A, Fuchs D, Fritz J, Gander H, Rahm A, Thurnher M. Intratumoral Th2 predisposition combines with an increased Th1 functional phenotype in clinical response to intravesical BCG in bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66:427-440. doi:10.1007/s00262-016-1945-z.
32. Mori T, Takada R, Watanabe R, Okamoto S, Ikeda Y. T-helper (Th) 1/Th2 imbalance in patients with previously untreated B-cell diffuse large cell lymphoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2001;50:566-568. PMID:11776379. doi:10.1007/s00262-001-0232-8.
33. Protti MP, De Monte L. Immune infiltrates as predictive markers of survival in pancreatic cancer patients. *Front Physiol*. 2013;4:210. doi:10.3389/fphys.2013.00210.
34. Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC, Murphy KM. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity*. 1998;9:745-755. PMID:9846495. doi:10.1016/S1074-7613(00)80671-8.
35. Burkholder B, Huang R-Y, Burgess R, Luo S, Jones VS, Zhang W, Lv Z-Q, Gao C-Y, Wang B-L, Zhang Y-M, et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1845:182-201. doi:10.1016/j.bbcan.2014.01.004.
36. Koch M, Tucker-Heard G, Perdue N, Killebrew J, Urdahl K, Campbell D. T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type-1 inflammation. *Nat Immunol*. 2009;10(6):595-602. doi:10.1038/ni.1731.
37. Levine A, Medoza A, Hemmers S, Moltedo B, Niec RE, Schizas M, Hoyos BE, Putintseva EV, Chaudhry A, Dilley S et al. Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. *Nature*. 2017;546(7658):421-425. doi:10.1038/nature22360.
38. Kachler K, Holzinger C, Trüfa D, Sirbu H, Finotto S. The role of Foxp3 and Thet co-expressing Treg cells in lung carcinoma. *Onc Immunology*. 2018;7:8. doi:10.1080/2162402X.2018.1456612.
39. Di Gianfrancesco I, Racioppi M, Ragonese M, Palermo G, Sacco E, Pf B. Neutrophil-to-lymphocyte ratio: A new prognostic factor in high risk non muscle invasive bladder cancer treated with BCG? *Eur Urol Suppl*. 2018;17(4):e2078. Modena, Italy.
40. Milne K, Alexander C, Webb JR, Sun W, Dillon K, Kalliger SE, Gilks CB, Clarke B, Köbel M, Nelson BH. Absolute lymphocyte count is associated with survival in ovarian cancer independent of tumor-infiltrating lymphocytes. *J Transl Med*. 2012;4:033. doi:10.1186/1479-5876-10-33.
41. Sanghmanon S, Jongpairat P, Sookprasert A, Wirasorn K, Titapun A, Pughem A, Ungareevitaya P, Chindaprasit J. Programmed Death-Ligand C1 (PD-L1) expression associated with a high neutrophil/lymphocyte ratio in cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18:1671-1674. doi:10.22034/APJCP.2017.18.6.1671.
42. Hodgson A, Slodkowska E, Jungbuth A, Liu SK, Vesprini D, Enepekides D, Higgins K, Katabi N, Xu B, Downes MR. PD-L1 immunohistochemistry assay concordance in urothelial carcinoma of the bladder and hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(8):1059-1066. doi:10.1097/PAS.0000000000001084.

2. Publicación 2

Ratio neutrófilo/linfocito y plaqueta/linfocito: ¿Se asocian con la respuesta al tratamiento con BCG en tumores vesicales no músculo invasivos de alto riesgo?

Roberto Martínez, Leire Portilla, Mario Alves, Xavier Elias, Joan Areal, José H. Amón.

Archivos españoles de urología.

ARCHIVOS ESPAÑOLES DE UROLOGIA
RATIOS NEÚTROFILO-LINFOCITO Y PLAQUETA LINFOCITO: ¿SE ASOCIAN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON BCG EN TUMORES VESICALES NO MUSCULOINVASIVOS DE ALTO GRADO?

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	Arch-Esp-Urol-D-20-00145R3
Full Title:	RATIOS NEÚTROFILO-LINFOCITO Y PLAQUETA LINFOCITO: ¿SE ASOCIAN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON BCG EN TUMORES VESICALES NO MUSCULOINVASIVOS DE ALTO GRADO?
Short Title:	¿Can a single value of a peripheric inflammatory response marker predict the response to bcg?
Article Type:	Artículo Original / Original Article
Keywords:	Tumor vesical no músculo invasivo; BCG; predictor de respuesta; ratio neutrófilo/linfocito; ratio plaqueta/linfocito
Manuscript Region of Origin:	SPAIN
Abstract:	<p>Objetivos : Evaluar la asociación de la ratio neutrófilo/linfocito (RNL) y ratio plaqueta/linfocito (RPL) con la respuesta al tratamiento mediante instilaciones de Bacilo Calmette Guérin (BCG) intravesical, en pacientes con diagnóstico inicial de tumor vesical no músculo-invasivos (TVNM) de alto riesgo.</p> <p>Material y métodos : Estudio retrospectivo multicéntrico de pacientes intervenidos de tumor vesical y sometidos a instilaciones endovesicales con BCG entre enero 2016 y diciembre 2017. Se seleccionaron 74 pacientes con tumor vesical inicial. Se excluyeron aquellos sin estrepe urotelial pura, con carcinoma in situ asociado, con tratamientos corticoideos crónicos y perdidos durante el seguimiento. Instilamos dosis completa de BCG (81mg) con pauta de inducción (6 dosis) y mantenimiento (9 dosis) durante un año. Se recogieron variables demográficas y analíticas (RNL y RPL) previas al inicio del tratamiento con BCG. Definimos respuesta al tratamiento como ausencia de recidiva y/o progresión; se recogieron también tiempo libre de enfermedad (hasta recidiva). Se realizó análisis estadístico mediante t de student , Chi cuadrado, ANOVA y curvas ROC.</p> <p>Resultados : La cohorte del estudio incluyó finalmente 50 pacientes: 10 mujeres y 40 varones, con una edad media de 70 años. Todos los pacientes tenían tumor urotelial puro alto grado, 12 de ellos estado Ta y 38 estado T1. El seguimiento mínimo fue de 24 meses, presentando recidiva tumoral un 28% de los pacientes. No se encontró relación entre RNL y éxito de la BCG(p=0.738) ni entre RPL y éxito de BCG(p=0.768). Tampoco pudimos establecer un punto de corte mediante curvas ROC.</p> <p>En el análisis multivariante, no encontramos significación estadística entre la recidiva tumoral y los datos analizado. Variables demográficas: Edad y sexo y variables analíticas: RNL,RPL.</p> <p>Conclusión: Pese a lo descrito en la literatura, no hemos encontrado significación estadística en la RNL ni RPL como predictor de respuesta al tratamiento con BCG en tumores vesicales no músculo invasivos.</p>
Opposed Reviews:	
Response to Reviews:	
First Author:	Roberto Hugo Martínez
Corresponding Author:	Roberto Hugo Martínez Hospital Universitario Rio Hortega Valladolid, SPAIN
Corresponding Author E-Mail:	dr.martinez@yahoo.es
Corresponding Author's Institution:	Hospital Universitario Rio Hortega

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aries Systems Corporation

Corresponding Author's Secondary Institution:	
Other Authors:	Laira Portilla
	Mario Alves Oliveira
	Xavier Elias
	Juan Arsal
	Jose H. Aman
Order of Authors:	Roberto Hugo Martinez
	Laira Portilla
	Mario Alves Oliveira
	Xavier Elias
	Juan Arsal
	Jose H. Aman

RATIOS NEUTRÓFILO/LINFOCITO Y PLAQUETA/LINFOCITO: ¿SE ASOCIAN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON BCG EN TUMORES VESICALES NO MÚSCULOINVASIVOS DE ALTO GRADO?

Martínez-Rodríguez, R^{1,3}; Portilla, L¹; Alves, M²; Elias, X²; Areal, J^{2,3}; Amón, H¹.

1. Servicio de Urología Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid.
2. Servicio de Urología Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Badalona.
3. Universidad Autónoma de Barcelona.

Objetivos:

Evaluar la asociación de la ratio neutrófilo/linfocito (RNL) y ratio plaqueta/linfocito (RPL) con la respuesta al tratamiento mediante instilaciones de Bacilo Calmette Guerin (BCG) intravesical, en pacientes con diagnóstico inicial de tumor vesical no músculo-invasivos (TVNMI) de alto riesgo.

Material y métodos:

Estudio retrospectivo multicéntrico con pacientes diagnosticados de tumor vesical inicial de alto riesgo y sometidos a instilaciones endovesicales con BCG entre enero 2016 y diciembre 2017. Inicialmente se recogieron 74 pacientes con tumor vesical inicial. Se excluyeron aquellos sin estirpe urotelial pura, con carcinoma in situ (Cis) asociado, con tratamientos corticoideos crónicos y perdidos durante el seguimiento. Instilamos dosis completa de BCG (81mg) con pauta de inducción (6 dosis) y mantenimiento (9 dosis) durante un año. Se recogieron variables demográficas (sexo, edad e índice de masa corporal) y analíticas (RNL y RPL) previas al inicio del tratamiento con BCG. Definimos respuesta al tratamiento como ausencia de recidiva y/o progresión. Se realizó análisis estadístico mediante t de student, Chi cuadrado, ANOVA y curvas ROC.

Resultados:

La cohorte del estudio incluyó finalmente 50 pacientes: 10 mujeres y 40 varones, con una edad media de 70 años. Todos estos pacientes tenían tumor urotelial puro alto grado, 12 de ellos estadio Ta y 38 estadio T1. El seguimiento mínimo fue de 24 meses, presentando recidiva tumoral un 28% de los pacientes. No se encontró relación entre RNL y éxito de la BCG ($p=0.738$) ni entre RPL y éxito de BCG ($p=0.768$). Tampoco pudimos establecer un punto de corte mediante curvas ROC.

En el análisis multivariante, no encontramos significación estadística entre la recidiva tumoral y los datos analizados (Variables demográficas: Edad, sexo, índice de masa corporal y variables analíticas: RNL/RPL).

Conclusión:

Pese a lo descrito en la literatura, no hemos encontrado asociación entre la RNL ni la RPL con la respuesta al tratamiento con BCG en TVNMI de alto riesgo.

Palabras clave: "Tumor vesical no músculo invasivo; BCG; ratio neutrófilo/linfocito; ratio plaqueta/linfocito"

INTRODUCCIÓN

El cáncer de vejiga es el quinto tumor en frecuencia en países desarrollados (tras los tumores de próstata, pulmón, colorrectales y de estómago), con aproximadamente 357.000 nuevos casos al año en todo el mundo (274.000 hombres y 83.000 mujeres)¹.

La presentación más frecuente (75%) es en forma de TVNMI. El tratamiento inicial consiste en la resección transuretral (RTU) de todas las lesiones visibles y la toma de muestras de mucosa vesical (Biopsia múltiple normatizada-BMN-), complementándose posteriormente con quimioterapia o inmunoterapia endovesical adyuvante².

Las tablas de riesgo definidas por la *European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC)*³ proponen la estratificación de pacientes en bajo, moderado o alto riesgo de recidiva y progresión, con la correspondiente estrategia de tratamiento.

Las actuales guías de tratamiento recomiendan el uso de inmunoterapia en pacientes de moderado y alto riesgo para disminuir el riesgo de recidiva y progresión². Esta consiste en instilaciones endovesicales de BCG en una primera fase de inducción durante 6 semanas y posteriormente un esquema de mantenimiento durante al menos un año.

A pesar de dicho tratamiento, en torno a un 40-50% de estos pacientes recaen. El fracaso a la BCG representa un desafío en la práctica clínica, por lo que implica en cuanto a la búsqueda y elección de la terapia más adecuada a cada paciente⁴. Hasta la fecha no hay claros indicadores que puedan predecir la respuesta a la BCG de los pacientes de alto riesgo, de tal forma que otros tratamientos u opciones más radicales pudieran ser planteadas, y acortar así el tiempo al tratamiento definitivo y el riesgo de diseminación de la enfermedad.

La RNL ha sido considerada como un marcador de capacidad de respuesta inflamatoria⁵, y sus valores se han relacionado con el pronóstico de tumores de mama, colon, nasofaríngeo y mieloma múltiple entre otros. La RPL pretratamiento se ha asociado a un peor pronóstico en pacientes afectados de tumor vesical⁶.

Si bien su papel en el pronóstico del tumor vesical músculo invasivo (TVMI) está ampliamente recogido en la literatura, su valor en caso del TVNMI es más reciente¹. Pocos son los trabajos que han tratado de asociar este valor (RNL y RPL) con la respuesta al tratamiento con BCG.

Nuestro objetivo es evaluar la asociación de la RNL y RPL en pacientes con TVNMI de alto riesgo, candidatos a recibir tratamiento con BCG, y la respuesta a dicho tratamiento.

PACIENTES Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio.

Se realiza un estudio multicéntrico, observacional, descriptivo y retrospectivo analizando los datos de pacientes de dos Servicios de Urología de Hospitales Universitarios, diagnosticados de TVNMI inicial de alto riesgo en el periodo enero 2016-diciembre 2017, asegurando así un seguimiento mínimo de 24 meses.

2. Muestra a estudio.

Se incluyeron aquellos pacientes sometidos a RTU de acuerdo con la práctica clínica habitual de cada centro. Los informes anatomopatológicos se presentaron de acuerdo con la clasificación TNM de 2009^{II} y el sistema de clasificación de la OMS de 2004^{III}. Todos los pacientes presentaban informes histológicos con un tumor urotelial puro y muestra de músculo no afectado.

Se excluyeron los pacientes con Cis asociado, enfermedades autoinmunes, tratamiento crónico con corticoesteroides y aquellos que se perdieron durante el seguimiento.

Se seleccionaron finalmente aquellos pacientes clasificados de alto riesgo según las directrices europeas de urología² y que recibieron tratamiento adyuvante con instilación endovesical de BCG.

Las instilaciones se realizaron con BCG Connaught, a dosis de 81mg, en cronograma de inducción durante 6 semanas y posterior mantenimiento (1 instilación por semana / 3 semanas) a 3,6 y 12 meses.

3. Variables.

Se recogieron recuentos totales de neutrófilos, linfocitos y plaquetas obtenidos en la analítica pre-RTU y se calcularon las RNL y RPL. Se registraron datos clínicos (índice de masa corporal -IMC-, enfermedades y medicamentos concomitantes) y datos demográficos (edad, sexo).

La recurrencia se definió como reaparición de TVNMI y la progresión como el desarrollo de TVMI, recogiendo el tiempo transcurrido desde la primera dosis de BCG.

4. Seguimiento.

El seguimiento se ha realizado mediante cistoscopia y citología cada 3 meses durante los primeros 2 años, con un estudio del tracto urinario superior utilizando uroTC o urografía según la disponibilidad y los protocolos de práctica clínica habitual establecidos previamente en cada centro.

RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE DATOS

Para la recogida de los datos se diseñó una base de datos a tal efecto en el programa Excel. Los datos fueron introducidos por una sola persona en cada centro y revisados por un experto. Posteriormente, fueron exportados al programa estadístico SPSS v. 15.0 (SPSS Inc. 1989-2006).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó análisis de regresión logística para explicar la recurrencia y la progresión (variables dependientes), utilizando como variables independientes la edad, el sexo y el IMC. Las variables a estudio (RNL y RPL) se categorizaron en función del resultado de un análisis de curvas ROC.

ASPECTOS ÉTICOS

Este trabajo se llevó a cabo de conformidad con todas las leyes y normativas aplicables, de acuerdo a los principios éticos internacionales, fundamentalmente la Declaración de Helsinki (versión Fortaleza, Brasil, 2013) y las Normas de Buena Práctica Clínica Epidemiológicas de la ICH (International Conference of Harmonization). El estudio se realizó según lo establecido en este protocolo, habiendo sido evaluado y aprobado por ambos comités éticos de los hospitales referidos (PI-20-156 y PI 115-20).

No existe conflicto de intereses ni se dispone de financiación por organismos públicos o privados.

RESULTADOS

De los 74 pacientes iniciales, se excluyeron: Catorce pacientes con Cis; tres pacientes con diferenciación anatomopatológica sarcomatoide, microcítica y plasmocitoide; un paciente afecto de Linfoma no Hodgkin y seis pacientes perdidos durante el seguimiento.

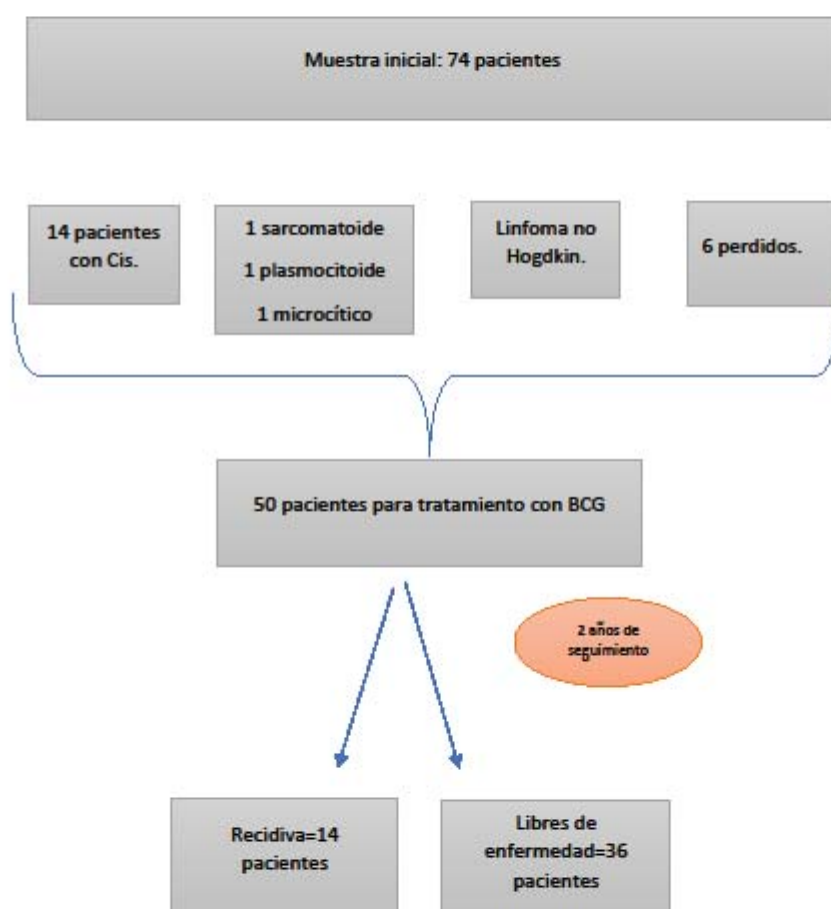


Fig.1: Visión esquemática de pacientes recogidos, excluidos y analizados con su evolución.

La cohorte final del estudio incluye 50 pacientes: 10 mujeres y 40 varones, con una edad media de 70 años. Todos los pacientes tenían tumor urotelial puro alto grado, 12 de ellos estadio Ta y 38 estadio T1.

Catorce pacientes sufrieron recidiva (28 durante %) durante los 24 meses de seguimiento: 42,9% los primeros 6 meses; 21,4% entre el 7º y 12º mes; y un 35,7% presentaron recidiva entre el 12º y 24º mes.

De los 14 pacientes que presentaron recidiva; 12 inicialmente correspondían a estadio T1 y dos a estadio Ta. Los 36 pacientes restantes (72% de la muestra estudiada) finalizaron el seguimiento completo sin signos de recidiva tumoral.

Fig.2: Características de los pacientes analizados:

IMC: Índice de masa corporal; RNL: ratio neutrófilo linfocito; RPL: ratio plaqueta linfocito.

	Respondedores a BCG	No respondedores a BCG		
N.º de pacientes	36	14		
Tiempo hasta recurrencia en meses. Pacientes. Porcentaje.	-----	<6m. 6 42.9%	7-12 m. 3 21.4%	12-24 m. 5 35.7%
Edad(años); Intervalo	69 48-83	72 57-85	72 66-83	72 58-80
Sexo(varones); n (%)	28(77,8%)	6(100%)	3(100%)	3(60%)
IMC(Kg/m ²); Intervalo	27,81 20,28-33,26	27,42 24,77-31,8	26,65 25,81-28,26	27,12 25,14-30,12
Estadio tumoral	Ta:10 T1:26	Ta:1 T1:5	T1:3	Ta:1 T1:4
Grado tumoral	AG	AG	AG	AG
RNL	2,06	2,00	2,05	2,43
RPL	103,06	105,77	110,13	104,69

Analizamos media, mediana y desviación estándar de las RNL y RPL:

Para la RNL: media de 2,09 con una mediana de 1.81 y con una desviación estándar de 0.96. Media de RNL en pacientes respondedores 2,06 frente a 2,16 en pacientes no respondedores a la BCG.

Para la RPL: media de 103.56 con una mediana de 97.60 y con una desviación estándar de 39.74. Media de RPL en pacientes respondedores 103,06 frente a 106,86 en pacientes no respondedores a la BCG.

Para establecer la asociación RNL/recidiva y RPL/recidiva se realizó análisis estadístico t de student y Chi cuadrado, sin hallar diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las variables (RNL/recidiva $p = 0.738$ y RPL/recidiva $p = 0.768$).

Estratificamos la variable recidiva en < o > de 12 meses y utilizamos el test de ANOVA, sin apreciar tampoco significación estadística ($p = 0.540$).

Las curvas ROC, tanto para la RNL como para la RPL, mostraron pendientes y áreas bajo la curva 0.506 y 0.526 respectivamente, sin significación estadística. Independientemente del punto de corte utilizado, no apreciamos asociación entre el valor de RNL y RPL con la respuesta al tratamiento con BCG.

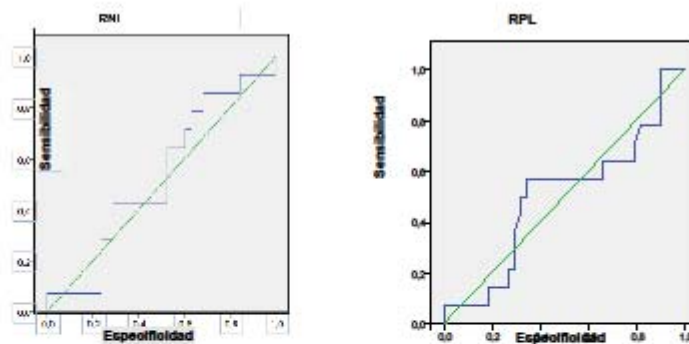


Fig3. Curvas ROC de RNL y RPL

DISCUSION

El tratamiento de los TVNMI de alto riesgo ha supuesto un reto para los urólogos desde el momento de su diagnóstico.

Algunos autores^I recomendaron un tratamiento radical de inicio mediante cistectomía precoz frente a la opción de inmunoterapia con BCG; pero dado que las tasas de progresión se situaban en un 30% y ante la escasa diferencia de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años^{II}, la balanza se decantó por el tratamiento complementario con BCG tras la RTU completa de los tumores vesicales.

En 1976 Morales et al. Utilizan con éxito la BCG en el tratamiento del TVNMI de alto riesgo, pero no es hasta 1990 cuando la FDA aprueba su uso. Aun no se conocen los mecanismos exactos de funcionamiento, si bien sabemos que actúan activando una respuesta inmunitaria tanto innata como adquirida que involucra a linfocitos CD4, CD 8, células natural Killer, granulocitos, macrófagos y células dendríticas^{III}.

Se han argumentado diferentes motivos por los que el tratamiento con BCG pudiese fracasar^{IV}: infraestadiaje del tumor, respuesta inmunitaria del huésped inapropiada, alteraciones de los macrófagos (NRAMP-1) y características biológicas del tumor entre otras.

En aras de ofrecer un tratamiento definitivo a la mayor brevedad posible y evitar así la posible progresión y/o diseminación de la enfermedad, la búsqueda de marcadores predictivos de respuesta al tratamiento con BCG ha sido continua.

La respuesta al tratamiento con BCG depende tanto de características del tumor como de características del propio paciente. El grupo CUETO^V establece el sexo femenino, los tumores recurrentes, la multiplicidad y la presencia de Cis como principales factores predictivos de recurrencia; mientras que el alto grado, el estadiaje T1, los tumores recurrentes y la recurrencia a los 3 meses son factores predictivos de progresión.

La capacidad de respuesta inmunitaria del paciente desempeña un papel fundamental en el éxito del tratamiento. Se han descrito diversos

Se han descrito diversos biomarcadores previos y durante el tratamiento: Las alteraciones genómicas en células urinarias detectadas mediante fluorescencia hibridación in situ durante el tratamiento con BCG, pese a su baja sensibilidad, implican un incremento del riesgo de recidiva y progresión. La detección de citoquinas urinarias (IL-2, IL-6; IL-8; IL-10; IL-12; IL-18; INF alfa; TNF alfa) así como un nomograma de 9 citoquinas (CyPRIT) ha sido capaz de predecir recurrencia con una precisión del 85%¹. El análisis del tejido peritumoral obtenido durante la RTU, identificando los linfocitos peritumorales Th1/Th2 y su correlación con el éxito del tratamiento con BCG ha mostrado resultados esperanzadores². El análisis de indicadores de respuesta inflamatoria sistémica periférica en determinaciones analíticas basales del paciente previo a la RTU, ha sido descrita en diferentes trabajos como un posible predictor de recurrencia y progresión; pero su valor como predictor de respuesta al tratamiento inmunoterápico es más controvertido³.

D'Andrea et al. apuntaba esta idea en un estudio retrospectivo⁴, siendo posteriormente confirmada en otras revisiones sistemáticas bien diseñadas en las que la RNL constituye un factor independiente predictor de recurrencia y progresión⁵, estableciendo un punto de corte de 3⁶. A mayor ratio, peor pronóstico. Sin embargo, otros autores no han obtenido resultados tan consistentes pese a disminuir los puntos de corte⁷. En nuestro trabajo, el análisis estadístico de la asociación de los marcadores de inflamación sistémica periféricos (RNL y RPL), con el éxito del tratamiento con BCG no mostró significación estadística.

Se ha sido estricto en la selección de pacientes en cuanto a características del tumor (estirpe urotelial pura, sin diferenciación), características de pacientes (excluidos aquellos que reciben tratamientos corticoideo) y homogeneidad del tratamiento recibido (cepa de BCG, dosis y pauta de instilaciones). Pese a ello no hemos podido reproducir los resultados obtenidos por otros colegas. Es sabido que el diablo está en los detalles, y es posible que estemos obviando variaciones interpersonales y/o características tumorales que desconozcamos y que influyan en los resultados; ya que, por ejemplo, algunos de los artículos revisados incluyen pacientes tratados con quimioterapia⁸

Los actuales conocimientos sobre los mecanismos de acción de la inmunoterapia orientan a pensar que los marcadores predictivos de respuesta pretratamiento pudieran tener una precisión limitada. Los cambios que se producen en la célula tumoral y en las células inmunitarias tras la inducción con BCG son mucho más precisos para predecir la respuesta al tratamiento.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El carácter retrospectivo del estudio limita los resultados obtenidos.

Pese a la homogeneidad de los pacientes incluidos en el estudio, el limitado tamaño muestral puede condicionar los resultados obtenidos.

No se efectuó reRTU en todos los pacientes estudiados, lo que según algunos autores podría relacionarse con la respuesta posterior a la BCG.

CONCLUSIONES

En nuestro trabajo, no hemos podido establecer una asociación entre la RNL ni RPL con la respuesta al tratamiento con BCG.

Es difícil que un solo marcador pueda adquirir validez universal y tenga la suficiente potencia estadística para predecir por sí solo el éxito o fracaso del tratamiento, por lo que los modelos que incluyen varios de ellos son los que mayor precisión y más utilidad clínica pudiesen presentar. Los esfuerzos por encontrar dichos predictores de respuesta han de continuar y motivar nuestro trabajo.

- ⁸ Wang X, Ni X, Tang G. Prognostic Role of Platelet-to-Lymphocyte Ratio in Patients with Bladder Cancer: A Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2019; 9:757.
- ⁹ Radioppi M¹, Di Gianfrancesco L¹, Ragonese M¹, Palermo G¹, Sacco E¹ and Bassi PF¹. Can Neutrophil-to-Lymphocyte ratio predict the response to BCG in high-risk non muscle invasive bladder cancer? *Int Braz J Urol*. 2019 Mar-Apr;45(2):315-324.
- ¹⁰ AJCC Cancer Staging Manual. 7. New York, NY: Springer; 2010.
- ¹¹ Montironi R, Lopez-Beltran A. The 2004 WHO classification of bladder tumours: a summary and commentary. *Int J Surg Pathol*. 2005 Apr;13(2):143-53.
- ¹² Kulkarni GS, Finelli A, Fleshner NE, Jewett MA, Lopushinsky SR and Alibhai SM. Optimal management of high-risk T1G3 bladder cancer: a decision analysis. *PLoS Med*2007;4:e284.
- ¹³ Kakilashvili D, Van Rhijn B, Azuero J, et al. Long-term follow-up for primary high-grade T1 bladder cancer. Does BCG really prevent progression? *Eur Urol Suppl* 2009;8: A645.
- ¹⁴ Böhle A, Brandau S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol*. 2003 Sep;170(3):964-9.
- ¹⁵ Ziotta A; Fleshner E and Jewett M. The management of BCG failure in non-muscle-invasive bladder cancer: an update. *CUAJ - December 2009 - Volume 3, Issue 6(Suppl4)*
- ¹⁶ Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Urida M, Martinez-Piñeiro L, Gonzalez M et al. Predicting nonmuscle invasive bladder cancer recurrence and progression in patients treated with bacillus Calmette-Guérin: the CUETO scoring model. *J Urol*. 2009 Nov;182(5):2195-203.
- ¹⁷ Kamat AM, Briggman J, Urbauer DL, Svatek R, Nogueiras Gonzalez GM, Anderson R et al. Cytokine panel for response to intravesical therapy (CyPRIT): nomogram of changes in urinary cytokine levels predicts patient response to bacillus Calmette Guérin. *Eur Urol* 2016; 69:197-200.
- ^{18,19} Martínez R, Tapia G, De Muga S, Hernández A, Cao MG, Tebbidó C, et al. Combined assessment of peritumoral Th1/Th2 polarization and peripheral immunity as a new biomarker in the prediction of BCG response in patients with high-risk NMIBC. *Oncotmmunology*. 2019 Apr 13;8(8)
- ²⁰ Yuk HD, Ku JH. Role of Systemic Inflammatory Response Markers in Urothelial Carcinoma. *Front Oncol*. 2020; 10:1473.
- ^{21,22} D'Andrea D¹, Moschini MP, Gust K¹, Abufaraj M¹, Özsoy M¹, Mathieu R¹, et al. Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Primary Non-muscle-invasive Bladder Cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2017 Oct;15(5): e755-e764.
- ^{23,24} Vartolomei MD¹, Forav-Hodade D², Ferro M³, Mathieu R⁴, Abufaraj M⁵, Foerster B⁶, et al. Prognostic role of pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in patients with non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC): A systematic review and meta-analysis. *Urol Oncol*. 2018 Sep;36(9):389-399.
- ^{25,26} Vartolomei MD¹, Ferro M², Cantello F³, Lucarelli G⁴, Di Stasi S⁵, Hurle R⁶, et al. Validation of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in a Multi-institutional Cohort of Patients with T1G3 Non-muscle-invasive Bladder Cancer. *Clin Genitourinary Cancer*. 2018 Dec;16(6):445-452.

²¹Yuk HD¹, Jeong CW², Kwak C³, Kim HH⁴, Ku JH⁵. Elevated Neutrophil to Lymphocyte Ratio Predicts Poor Prognosis in Non-muscle Invasive Bladder Cancer Patients: Initial Intravesical Bacillus Calmette-Guerin Treatment After Transurethral Resection of Bladder Tumour Setting. *Front Oncol.* 2019 Jan 17;8:542.

²² Cantello F¹, Russo GP, Ventolomei MD², Farhan ARA¹, Terracciano D³, Musi G³, et al. Systemic Inflammatory Markers and Oncologic Outcomes in Patients with High-risk Non-muscle-invasive Urothelial Bladder Cancer. *Eur Urol Oncol.* 2018 Oct;1(5):403-410.

²³ Song D¹, Powles TW², Shi L¹, Zhang L³, Ingersoll MAM⁴, Lu YJ^{1,5}. Bladder cancer, a unique model to understand cancer immunity and develop immunotherapy approaches. *J Pathol.* 2019 Oct;249(2):151-165.

DISCUSION

DISCUSIÓN

Los avances en el conocimiento del potencial biológico del TVNMI nos han permitido distinguir varios patrones de comportamiento clínico. Estos patrones son difíciles de predecir al existir factores aún desconocidos que determinan su comportamiento¹²⁶. Establecer modelos predictivos puede ser de utilidad, especialmente para identificar pacientes resistentes a los tratamientos convencionales y poder indicar una cistectomía radical precoz que podría permitir su curación¹²⁷.

El infiltrado inmunitario peritumoral en el TVNMI de alto riesgo, que puede caracterizarse en el tejido procedente de la resección transuretral, permite analizar la estimulación inmunológica que el tumor provoca en el huésped¹²⁸. Debido a la relación directa por proximidad, los cambios observados en el infiltrado linfocitario peritumoral pueden ser atribuidos únicamente al tumor y a la capacidad de respuesta inmunitaria individual. Por todo ello su caracterización podría predecir la respuesta del paciente al tratamiento local con BCG intravesical¹²⁸.

La relación inmunidad-tumor se desarrolla básicamente en tres fases. En una fase inicial el sistema inmunitario lucha contra el tumor, posteriormente existe una fase de convivencia o equilibrio, y por último, el sistema inmunitario permite la progresión y diseminación tumoral¹²⁹. Mientras que en la primera fase se podrían llegar a eliminar las células tumorales, y es clínicamente silente, en la segunda y tercera fases es cuando el tumor puede progresar y diseminarse.

Durante estas etapas podemos encontrar células inmunitarias, tanto a nivel intratumoral como peritumoral, y se produce el llamado fenómeno “de reclutamiento” por el que determinadas células reclaman la presencia de más efectivos para la lucha anticancerígena¹²⁹. Este fenómeno de “reclutamiento” podría afectar también a la inmunidad periférica representada por los recuentos totales de neutrófilos, linfocitos y plaquetas entre otros¹²⁹.

En nuestro primer estudio, se analizó la densidad total de células peritumorales en el tejido tumoral antes del tratamiento con BCG intravesical. Identificamos linfocitos, macrófagos, neutrófilos y monocitos entre otros. Se ha descrito que los linfocitos TIL peritumorales son más representativos que los linfocitos TIL intratumorales para predecir la respuesta al tratamiento^{130,131}. Los tipos de linfocitos peritumorales predominantes son los linfocitos T CD4+, los cuales en función del estímulo recibido expresarán un factor de transcripción determinado (T-Bet+ o GATA-3+), diferenciándose hacia una subpoblación u otra (Th1 o Th2 respectivamente). En relación al fenotipo que observamos en el infiltrado linfocitario peritumoral de los pacientes de nuestra muestra, predominan GATA-3 + (Th2) sobre T-bet + (Th1). Esta diferencia entre Th1 y Th2 ya había sido descrita previamente por otros autores^{132,133} en el tejido peritumoral de pacientes con TVNMI¹³⁴ y con otros tipos tumorales. Del mismo modo, la evaluación de la inmunidad periférica mediante recuentos y cocientes entre células mononucleares de sangre periférica también ha sido evaluada en tumores hematológicos y pancreáticos^{135,136}.

En nuestro estudio no hemos encontrado una asociación entre la densidad de linfocitos GATA-3+ y la de linfocitos T-bet+. Este hecho puede sugerir que aunque ambos son mutuamente antagónicos¹³⁷, la expresión de T-Bet+ estimula la diferenciación del linfocito TCD4+ hacia Th1 e inhibe teóricamente la diferenciación hacia Th2 y Th17, otras citocinas o quimiocinas producidas en el microambiente tumoral están influyendo en el desequilibrio inmune observado¹³⁸.

La influencia de las diferentes subpoblaciones de linfocitos TIL presentes en el tejido peritumoral en la respuesta al tratamiento con BCG intravesical, en poblaciones homogéneas de pacientes con TVNMI de alto riesgo no está aún bien definida¹²⁹. Un mayor número de linfocitos T CD 4+, Th2 y una GTR más elevada se asoció con la respuesta a BCG y con una supervivencia libre de progresión mayor en una población mixta de pacientes con TVNMI, de bajo y alto riesgo (Ta, T1 y CIS)¹⁴⁷. Los mismos autores apuntaban, en otra publicación, que un mayor número de GATA-3+ se asociaba con la respuesta a BCG intravesical, pero en dicha publicación sólo se evaluaron cuatro pacientes no respondedores a BCG¹⁴⁹. En consonancia con estos datos, la GTR ha sido descrita como un predictor de la respuesta al tratamiento con BCG intravesical en otro estudio con un número limitado de pacientes con Cis¹⁴⁸.

Basándonos en las observaciones anteriores, sugerimos que un gradiente favorable a GATA-3+ previo al tratamiento endovesical con BCG podría asociarse a una buena respuesta. En nuestra población de pacientes con TVNMI de alto riesgo, hemos observado una asociación entre la GTR y la respuesta al

tratamiento con BCG endovesical. Además, se identificó un nivel significativamente inferior de linfocitos T-bet+ en los pacientes con buena respuesta a BCG, sin observarse cambios significativos en la densidad total de linfocitos peritumorales GATA-3 +. Estos hallazgos sugieren que la densidad total de linfocitos T-bet +, en vez de la densidad de los linfocitos peritumorales GATA-3 +, podría ser el factor predictor de buena respuesta al tratamiento con BCG intravesical.

Estos datos proporcionan nuevos argumentos para reforzar la hipótesis de que, en los pacientes con TVNMI de alto riesgo, los linfocitos Tbet+ presentes en el tejido peritumoral antes del tratamiento con BCG podrían ser una población de células inactivas, bien por mecanismos de escape o tolerancia inmunes. Por tanto, su estimulación con la BCG es poco probable que sea eficaz^{139,148}. Podríamos incluso sugerir que la detección de Tbet+ pretratamiento indicaría la presencia de un entorno paradójicamente inmunosupresor. En línea con la teoría del entorno inmunosupresor y la detección de T-bet +, es necesario definir otro tipo celular. Recordemos que la respuesta inmunitaria frente a un antígeno externo se basa en la acción de células colaboradoras y células reguladoras¹²⁹. Las células colaboradoras se encargan de coordinar la respuesta inicial frente al patógeno mediante secreción de citocinas. Hay varios tipos: Th1, Th2 y Th17 principalmente¹⁴⁰. La expresión de una inhibe parcialmente la expresión de otras¹⁴¹, concepto de antagonismo referido previamente. Las células reguladoras velan por el respeto a la integridad de lo propio desmontando la respuesta, una vez controlado el patógeno. Entre estas células reguladoras encontramos al linfocito Treg¹⁴², con fenotipo CD4+CD25+. Este linfocito Treg expresa T bet+¹⁴³

al igual que el linfocito Th1. Al compartir Th1 y Treg dicha expresión, la detección de T bet + en el tejido peritumoral podría indicarnos un entorno inmunosupresor, con el consecuente fracaso de la terapia con BCG intravesical. Por ello, el desarrollo de nuevas terapias dirigidas contra estas células, antes del tratamiento con BCG, podría ser una nueva estrategia para mejorar su respuesta. Además de la inmunidad local, el recuento absoluto de linfocitos periféricos parece ser predictor de respuesta en varios tumores¹⁴⁴. Se ha postulado que la RNL periférica es un factor pronóstico para los pacientes con TVMI^{145,146}. Se han asociado valores más altos de RNL con mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad¹⁴⁷ y de supervivencia global en los TVNMI¹⁴⁸.

En nuestro primer estudio y en consonancia con otras publicaciones¹⁴⁹, se identificó un valor de RNL más alto antes del tratamiento con BCG en los no respondedores a BCG, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística. Con el objeto de evaluar el valor pronóstico de dicha RNL se diseñó el estudio de validación con una muestra más amplia de pacientes.

Como hemos indicado previamente, en pacientes con cáncer las alteraciones inmunológicas pueden apreciarse tanto a nivel local como en la circulación periférica. No obstante, hasta donde conocemos, la relación entre marcadores inmunitarios sistémicos y locales y su relación con la respuesta a la BCG intravesical, no ha sido evaluada previamente. En nuestra población de pacientes con TVNMI de alto riesgo, no se identificó ninguna correlación entre los TIL, GATA-3 + o T-bet +, y las células periféricas, neutrófilos o linfocitos, antes del tratamiento con BCG. Estos datos concuerdan con los de estudios

previos realizados en pacientes con cáncer de ovario, en los que no se encontró asociación entre el recuento de linfocitos y las células CD8+ o CD20+ infiltrantes¹⁵⁰. Por tanto, la infiltración peritumoral no parece asociarse directamente con el conteo de células periféricas. Sin embargo, el valor de células T-bet + en el infiltrado peritumoral, normalizado a los niveles de linfocitos de sangre periférica, se asoció significativamente con la supervivencia libre de enfermedad (SLE).

La polarización inmune en el tejido (GTR), ajustada para la inflamación sistémica (NLR), mostró una diferencia significativamente mayor entre pacientes respondedores y no respondedores a BCG intravesical, encontrándose una asociación positiva entre una puntuación inmunológica GTR/NLR aumentada y una SLE más alta. Estos resultados sugieren que el perfil de las células inmunes que infiltran el tumor y la inflamación sistémica juegan un papel importante en la respuesta a BCG. Por tanto, un biomarcador inmunológico que incluya ambos parámetros podría aumentar la predicción de la respuesta al tratamiento con BCG intravesical.

Se ha descrito que los niveles de expresión de PD-L1 en células tumorales predicen la progresión del carcinoma urotelial y se asocian con una mayor resistencia a la terapia con BCG intravesical¹⁵¹. Sin embargo, en nuestra cohorte de pacientes, la expresión de PD-L1 en el tejido peritumoral no se asoció con la respuesta a BCG. Sí que observamos una mayor expresión local de PD-L1 en pacientes con menor recuento de linfocitos periféricos y mayor NLR, sin llegar a ser estadísticamente significativa. Estos datos podrían sugerir una relación entre

la inflamación sistémica y la inmunosupresión local, y por tanto un resultado clínico desfavorable en los pacientes con TVNMI. Sangkhamanon et al., en pacientes con colangiocarcinoma, encontraron que un aumento de la expresión de PD-L1 también se asoció con un mayor NLR¹⁵², aunque esta asociación no se ha descrito previamente en pacientes con TVNMI. Las limitaciones de este estudio se asocian principalmente con su diseño retrospectivo y el pequeño número de pacientes. Sin embargo, la población de alto riesgo investigada es muy homogénea e incluye un número relativamente alto de no respondedores en comparación con estudios similares^{131,133}. Estudios prospectivos con mayor tamaño muestral serían necesarios para validar estos hallazgos preliminares. Además, la expresión de PD-L1 podría ser ligeramente menor que la expresión informada en otros estudios, ya que se han descrito diferencias en el porcentaje de células positivas para diferentes clones de anticuerpos anti PD-L1¹⁵³.

Nuestro segundo estudio se diseñó con el objeto de profundizar en el análisis de marcadores periféricos de respuesta inmunitaria y su asociación con la respuesta a la BCG en pacientes con TVNMI de alto riesgo. Se fue restrictivo en los criterios de inclusión, intentando que la muestra fuera lo más homogénea posible, y excluyendo aquellas condiciones que implicasen a priori un comportamiento clínico diferente, tales como la presencia concomitante de Cis o la afectación de uretra prostática, así como afecciones del paciente que pudieran modificar su respuesta inmunitaria como enfermedades hematológicas, uso de corticoesteroides, etc.

La relación entre BCG intravesical y tumor vesical tiene más de 40 años de historia. En 1976, Morales et al. utilizaron con éxito BCG intravesical en el tratamiento del TVNMI de alto riesgo. Sin embargo, no fue hasta 1990 que la FDA aprobó su uso clínico. Aun no se conocen sus mecanismos exactos de funcionamiento, si bien sabemos que actúan activando una respuesta inmunitaria tanto innata como adquirida que involucra a linfocitos CD 4, CD 8, células natural Killer, granulocitos, macrófagos y células dendríticas¹⁵⁴. Se han argumentado diferentes motivos por los que el tratamiento con BCG intravesical puede fracasar¹⁵⁵ como el infraestadiaje del tumor, una respuesta inmunitaria del huésped inapropiada, alteraciones de los macrófagos (NRAMP-1) y las características biológicas del tumor entre otras.

En aras de ofrecer un tratamiento definitivo a la mayor brevedad posible y evitar la progresión y diseminación de la enfermedad, la búsqueda de marcadores predictivos de respuesta al tratamiento con BCG ha sido constante. La respuesta al tratamiento con BCG intravesical depende de las características del tumor y del paciente. El grupo CUETO¹⁵⁶ ha establecido el sexo femenino, los tumores recurrentes, la multiplicidad y la presencia de Cis como principales factores predictivos de recurrencia; mientras que el alto grado, el estadiaje T1, los tumores recurrentes y la recurrencia a los 3 meses son factores predictivos de progresión. La capacidad de respuesta inmunitaria del paciente desempeña un papel fundamental en el éxito del tratamiento. Se han descrito diversos biomarcadores previos y durante el tratamiento: Las alteraciones genómicas en células urinarias detectadas mediante fluorescencia hibridación in situ durante el tratamiento con BCG intravesical, pese a su baja

sensibilidad, implican un incremento del riesgo de recidiva y progresión. La detección de citoquinas urinarias como IL-2; IL-6 IL-8; IL-10; IL-12; IL-18; INF alfa e TNF alfa, así como un nomograma de 9 citoquinas (CyPRIT) ha sido capaz de predecir recurrencia con una precisión del 85%¹⁵⁷. Previamente hemos descrito como la identificación de linfocitos peritumorales Th1/Th2 en tejido peritumoral obtenido durante la RTU, se relaciona con la respuesta al tratamiento con BCG endovesical¹⁵⁸.

El análisis de indicadores de respuesta inflamatoria sistémica periférica en determinaciones analíticas basales, antes de la resección transuretral del tumor vesical, ha sido descrito como predictor de recurrencia y progresión en diversas publicaciones. Sin embargo, su valor como predictor de la respuesta al tratamiento inmunoterápico, basado en BCG intravesical, es controvertido¹⁵⁹. D'Andrea et al., han sugerido su utilidad después de un estudio retrospectivo¹⁶⁰, siendo posteriormente confirmada en otras revisiones sistemáticas en las que la RNL sería un factor independiente para predecir la recurrencia y progresión del tumor vesical¹⁶¹. Los autores han establecido un punto de corte de 3¹⁶², de manera que a mayor cociente existe peor pronóstico. Sin embargo, otros autores no han observado resultados tan consistentes a pesar de disminuir ese punto de corte¹⁶³. Estas diferencias de resultados podrían explicarse por la heterogeneidad de las poblaciones analizadas, ya que en algunos de los trabajos se incluyeron pacientes tratados con quimioterapia intravesical¹⁶⁴. En nuestro estudio no encontramos una asociación entre los marcadores de inflamación sistémica periféricos, RNL y RPL, la respuesta al tratamiento con BCG endovesical.

El conocimiento actual de los mecanismos de acción de la inmunoterapia sugiere que los marcadores predictivos de respuesta, previos al tratamiento con BCG, pueden tener una eficacia limitada. Los cambios que se producen en la célula tumoral y en las células inmunitarias después de la inducción con BCG intravesical parecen ser más precisos para predecir la respuesta al tratamiento¹⁶⁵.

Aunque en nuestro estudio incluimos un grupo de pacientes homogéneo, su diseño retrospectivo y su reducido tamaño muestral pueden limitar los resultados observados. Además, no se realizó re-RTU en todos los pacientes incluidos, lo cual según algunos autores, podría relacionarse con la respuesta posterior a la BCG intravesical.

Podríamos considerar la determinación sistemática de tinciones inmunológicas en el análisis del tejido obtenido durante la resección transuretral; su inclusión en el informe anatomopatológico ayudaría en la toma de decisiones clínicas. Este análisis inmunológico podría ofrecer la posibilidad de incorporar tratamientos dirigidos a mediar en el ambiente inmunosupresor de pacientes no respondedores al tratamiento con BCG intravesical, por ejemplo, con tratamientos moduladores del linfocito Treg. Profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción del tratamiento con BCG intravesical puede permitir el hallazgo de potenciadores de la respuesta inmunológica selectiva contra células tumorales, reduciéndose además los efectos adversos asociados al tratamiento con BCG.

Para concluir, creemos que la respuesta al tratamiento con BCG intravesical en pacientes con TVNMI de alto riesgo se asocia con alteraciones inmunitarias locales y sistémicas. Nuestros resultados sugieren el potencial valor de la evaluación combinada de la inmunidad local (GTR) y periférica (NLR) como biomarcador predictor de respuesta al tratamiento con BCG intravesical. De momento no existe un único parámetro con la suficiente eficacia para predecir la evolución tumoral y poder modificar o modular las alternativas terapéuticas. Actualmente se pueden aplicar diversos y variados indicadores de respuesta al tratamiento en poblaciones de pacientes, sin embargo, la respuesta individualizada es difícilmente predecible.

CONCLUSIONES

1. El tumor vesical no musculo invasivo (TVNMI) de alto grado presenta un infiltrado linfocitario peritumoral, caracterizado tanto por la presencia de linfocitos Th2 (GATA-3⁺) como de linfocitos Th1 (T-bet⁺). Sin embargo, se observa una infiltración predominante de linfocitos de tipo Th2 sobre los linfocitos de tipo Th1, sin una correlación entre la densidad peritumoral de células GATA-3⁺ y T-bet⁺.
2. En los pacientes con TVNMI de alto grado, la mejor respuesta al tratamiento con BCG intravesical se asoció con una menor presencia de células peritumorales Th1 y con un mayor cociente de linfocitos peritumorales Th2/Th1.
3. No hemos observado una asociación entre la expresión peritumoral de PD-L1 y la respuesta al tratamiento con BCG intravesical.
4. No se ha observado ninguna asociación entre los cocientes neutrófilos/linfocitos ni plaquetas/linfocitos, en sangre periférica, con la respuesta al tratamiento con BCG intravesical.
5. La densidad de linfocitos Th1 y Th2 peritumoral no se relacionó con los contajes totales de neutrófilos, linfocitos y plaquetas en sangre periférica. Sin embargo, al ajustar la respuesta inmunológica local y la respuesta inflamatoria sistémica, a través de los cocientes Th2/Th1 (GTR) y neutrófilos/linfocitos (NLR), hemos observado que fueron significativamente superiores en pacientes con TVNMI de alto grado y buena respuesta al tratamiento con BCG intravesical.

Esta asociación se corroboró en un análisis de supervivencia demostrando una supervivencia libre de enfermedad mayor en pacientes con una relación T-bet/linfocitos más baja y un cociente GTR / NLR más alto.

Las alteraciones de la función inmune, tanto locales como sistémicas, pueden influir en la respuesta al tratamiento con BCG. Por lo tanto, la relación entre la composición inmune local y sistémica podría ser un biomarcador de respuesta al tratamiento con BCG intravesical en pacientes con TVNMI de alto grado.

ANEXO

1 1. Autorización de comités éticos de investigación.



Germans Trias i Pujol
Hospital

Comitè d'Ètica de la Investigació



Institut de Recerca de la Sida iH3Caixa

DICTAMEN DEL COMITÈ DE ÈTICA DE LA INVESTIGACIÓ

El Dr. Magí Farré Albaladejo, President del Comitè de Ètica de la Investigació del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

CERTIFICA

Que este Comitè ha evaluado la proposta de realització del projecte de investigació:

CÓDIGO	TIC3/TI12	REF.CEI	PI-08-037
TÍTULO	Marcadores de respuesta a la terapia con BCG en cáncer de vejiga. Versión 1 (25/05/2018)		
PROMOTOR	Institut de Recerca de la Sida iH3Caixa		
	Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado versión 1 (05/07/2018)		

y considera que:

- > Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y que el estudio cumple con los aspectos que se recogen en la Ley de Investigación Biomédica 14/2007.
- > El procedimiento para obtener el consentimiento informado, incluyendo la hoja de información para los sujetos y el plan de reclutamiento de sujetos previstos son adecuados.
- > El procedimiento previsto para el manejo de datos personales es adecuado.
- > La capacidad del investigador y sus colaboradores, así como los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el proyecto.
- > En caso de obtención y procesamiento de muestras biológicas, ésta se adecuará a lo previsto en el Real Decreto 1716/2011.

Que este Comitè ha decidido emitir **DICTAMEN FAVORABLE** en la reunión celebrada el día 6 de julio de 2018 aceptando que dicho estudio sea realizado en el Hospital Universitari Germans Trias i Pujol por la **Dra. Cècilia Cabrera Navarro** del Institut de Recerca de la Sida iH3Caixa como investigadora principal.

Que en dicha reunió se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente para que la decisión del citado CEI sea válida.

Que el CEI del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CIMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEI es la indicada en el anexo I.

Que en el supuesto que algún miembro del CEI sea investigador principal o colaborador del estudio evaluado, éste se ausentará de la reunión durante la deliberación y toma de decisión.

Lo que firmo en Barcelona, a 6 de julio de 2018



Dr. Magí Farré Albaladejo




Germans Trias i Pujol
Hospital

Comitè d'Ètica de la Investigació

REF.CEI: PI-08-037
Pàgina 1 de 2



Germans Trias i Pujol
Hospital

Comitè d'Ètica de la Investigació



ANEXO I: COMPOSICIÓN CEI HOSPITAL UNIVERSITARI GERMANS TRIAS I PUJOL

Presidente

Farré Albaladejo, Magí. Farmacología Clínica

Vicepresidenta

Balañá Quintero, Carme. Oncología Médica [ICO]

Secretaria Técnica

Fortes Villegas, Àngels. (IGTP)

Vocales

Alonso Fernández, Sergio. Enfermería

Avecilla Palau, M^{re} Àngels. Ginecología y Obstetricia [BSA]

Bayés Genís, Beatriu. Direcció de Centre

Bret Garriga, Esteve. Representante del Paciente

Cabrera Jaime, Sandra. Enfermería

Casanovas Cuellar, Cristina. Enfermería

Dachary Jiménez, Natàlia. Jurista

Jiménez López, Irene. Unidad de Atención a la Ciudadanía

López Andrés, Arna. Farmacología Clínica (IGTP)

Montané Esteve, Eva. Farmacología Clínica

Moreira Porta, Berna. Representante del Paciente

Oriol Rocafiguera, Albert. Hematología y Hemoterapia [ICO]

Peláez de Loño, Jordi. Farmacia (CATSALUT)

Puyalto de Pablo, Paloma. Radiología

Ramo Tello, Cristina. Neurología

Romeu Fontaniñas, Joan. Medicina Interna-VIH

Sánchez Fernández, Mayka. Biología-Genética [UC]

Solà Suárez, Montserrat. Medicina Nuclear

Vilaró Jaques, Lala. Farmacia

**INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS (CEIm)
ÁREA DE SALUD VALLADOLID OESTE**

Dña. ROSA CONDE VICENTE, Secretario Técnico del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm) del Área de Salud de Valladolid Oeste

CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado el Proyecto de investigación con Ref.: PI115-20

Título: "Valor pronóstico de la ratio neutrófilo-linfocito como factor predictor de respuesta al tratamiento con BCG en tumores vesicales no musculoinvasivos de alto grado"

- Protocolo versión 0.3

Y considera que:

- Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio, y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Se considera adecuado el procedimiento previsto para la información y obtención del consentimiento informado o, alternativamente, se acepta la exención de consentimiento propuesta para este estudio.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIm acepta que dicho estudio sea realizado en el Hospital Universitario Río Hortega, por el Dr. Roberto Martínez Rodríguez como Investigador Principal.

Dña. ROSA CONDE VICENTE, Secretario Técnico del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm) del Área de Salud de Valladolid Oeste

HACE CONSTAR QUE:

En la reunión celebrada el día 2 de Julio de 2020, Acta 19/2020, el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm) decidió emitir INFORME FAVORABLE al estudio, cumpliéndose los requisitos establecidos en la Legislación vigente para que la citada decisión sea válida.

El CEIm del Hospital Universitario del Río Hortega, tanto en su composición como en los PNT, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y en la actualidad lo conforman los siguientes miembros:

PRESIDENTE: D. Antonio Dueñas Laita (Médico, Farmacólogo Clínico).

VICEPRESIDENTE: D. Manuel González Sagrado (Médico, Unidad de Apoyo a la Investigación. Representante de la Comisión de Investigación)

SECRETARIO TÉCNICO. D^a Rosa M^a Conde Vicente (Doctora en Investigación en Ciencias de la Salud).

VOCALES:

D. Juan Manuel Alonso Fernández (Diplomado Universitario en Enfermería).

D^a Adelina del Olmo Revuelto (Farmacéutico).

D. Mariano Fuentesebro Virseda (Licenciado en Derecho. Miembro ajeno a profesión sanitaria).

D^a Berta López Cabezas (Licenciado en Derecho. Miembro experto en Protección de Datos).

D. Alberto Olalla Ubierna (Miembro ajeno a profesión sanitaria).

D. José Luis Pérez Castañón (Médico, Medicina Interna).

D. Baltasar Pérez Saborido (Médico, Cirugía General y Aparato Digestivo).

D. José Manuel Rodríguez Valencia (Médico, Medicina Familiar y Comunitaria).

D. Álvaro Sanz Rubiales (Médico, Oncología. Representante del Comité de Ética Asistencial)

Lo que firmo en Valladolid, a 03 de Julio de 2020

ROSA CONDE VICENTE
SECRETARIO TÉCNICO
CEIM

Fdo. Dña. Rosa M^a Conde Vicente
Secretario Técnico CEIm

2. Autorización al compendio de publicaciones



Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Doctorat de Cirurgia i Ciències Morfològiques

Roberto Hugo Martínez Rodríguez
Carrer Girona 164, 3r 1a
08037 Barcelona

Vista la instància presentada per en/na Roberto Hugo Martínez Rodríguez de sol·licitud de presentació de tesi doctoral com a compendi de publicacions,

De conformitat amb el que disposa la Normativa acadèmica de la UAB aplicable als estudis universitaris regulats de conformitat amb el RD 1393/2007, de 29 d'octubre, modificat pel RD 861/2010, de 2 de juliol (text refós aprovat per l'Acord de Consell de Govern de 2 de març de 2011),

RESOLC

Acceptar la presentació de la tesi doctoral de Roberto Hugo Martínez Rodríguez com a compendi de publicacions amb els articles següents:

1. **Títol:** *Combined assessment of peritumoral Th1/Th2 polarization and peripheral immunity as a new biomarker in the prediction of BCG response in patients with high-risk NMIBC.*
Autors: Roberto Martínez, Gustavo Tapia, Silvia de Muga, Alba Hernández, María González Cao, Cristina Teixidó, Víctor Urrea, Elisabeth García, Sonia Pedreño-López, Luis Ibarz, Julia Blanco, Bonaventura Clotet, Cecilia Cabrera.
Dades de la publicació: *Oncoimmunology*. Volum: 8. Número: 8. Publicació: Agost 2019.
DOI: 10.1080/2162402X.2019.1602460

2. **Títol:** *Ratios neutrófilo linfocito y plaqueta linfocito: ¿Se asocian con la respuesta al tratamiento mediante BCG en pacientes con tumor vesical no músculo invasivo de alto riesgo?*
Autors: Roberto Martínez, Leire Portilla, Mario Alves, Xavier Elias, Joan Areal, José H. Amón. Ibarz, Julia Blanco, Bonaventura Clotet, Cecilia Cabrera.
Dades de la publicació: *Archivos españoles de urología*. Data acceptació: 23/02/2021

Passatge de la Vall d'Hebron, 119 - 129 - 08035 Barcelona, Spain
Tel: 34 - 93 428 56 21 - Fax: 34 - 93 428 32 64
doctorat.cirurgia@uab.cat
<https://doctoratcirurgia.uab.cat/>

3 Otras publicaciones relacionadas

Document downloaded from <http://www.elsevier.es>, day 06/06/2018. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

ACURO-1065; No. of Pages 2

ARTICLE IN PRESS

Actas Urol Esp. 2018;xxx(x):xxx-xxx



Actas Urológicas Españolas

www.elsevier.es/actasuro



EDITORIAL

¿Podemos basar la indicación de cistectomía precoz en algo más que características clínico patológicas?

Can we base the indication of early cystectomy on more than clinical-pathological characteristics?

En referencia al excelente artículo de revisión de Cogorno Wasylkowski et al.¹ sobre la indicación de la cistectomía precoz en el cáncer vesical no músculo infiltrante, y que concluyen con la necesidad de basar la decisión en el riesgo individualizado de cada paciente, deberíamos considerar la posibilidad de incluir marcadores moleculares en la toma de decisiones.

El impacto socioeconómico del tumor vesical es alto. Es el sexto tipo de cáncer en la Unión Europea, con 124.000 diagnosticados y > 40.000 defunciones por año. El coste total estimado en el 2012 en toda la Unión Europea fue de 4,9 billones de euros. Para el 2030 la incidencia anual estimada se incrementará hasta 219.000, lo que invita tanto a poner en marcha una buena prevención epidemiológica como a mejorar la eficiencia de los tratamientos y las herramientas diagnósticas².

La búsqueda de biomarcadores predictivos de respuesta clínica al tratamiento con inmunoterapia intravesical en tumores vesicales no músculo-invasivo de alto grado ha sido una constante en la investigación urológica en los últimos años.

Sabiendo que hasta en un 30-50% de los pacientes va a fracasar el tratamiento y que de estos hasta un 15% puedan presentar progresión, el identificar precozmente aquellos pacientes que no van a responder a las instilaciones es necesario para intentar otras terapias y/o no demorar un tratamiento radical (cistectomía precoz).

Los mecanismos exactos de funcionamiento de la BCG continúan desconocidos, pero se han publicado interesantes conclusiones en los últimos años que ayudan a entender su vía de actuación y contribuyen a predecir (aunque no con la precisión deseada) la respuesta clínica.

La administración intravesical de BCG actúa como potente inmunomodulador local polarizando la respuesta Th1 y liberando células inflamatorias. Esta respuesta es mayor según el tipo de cepa utilizada, observándose que la BCG Connaught es significativamente más efectiva en términos de supervivencia libre de recurrencia³.

Ardelt et al. demostraron una respuesta inmune humoral contra HSP-65 en el momento de re-evaluación tras el ciclo de inducción como un predictor individual positivo de respuesta a la inmunoterapia con BCG. Los títulos de IgA e IgG medidos antes y después del ciclo de inducción predicen el éxito del tratamiento, proponiendo que la monitorización de títulos anti-HSP-65 durante el ciclo de inducción podría ser una herramienta útil para detectar precozmente aquellos pacientes no respondedores⁴.

Kamat et al. presentaron una prometedora herramienta de predicción de recurrencias con tasas de detección superiores al 80%⁵. Sin embargo, debemos tener presente la enorme variabilidad de producción, liberación y detección de dichas citocinas, lo que puede dificultar su aplicación clínica.

Los distintos subtipos de tumor (luminal/basal) han demostrado diferentes comportamientos clínicos y respuesta a la quimioterapia.

Es cierto que actualmente ningún marcador biológico y/o de ciclo celular mejora a los modelos clínicos predictivos de riesgo de recurrencia y progresión promovidos por el grupo CUETO y EORTC⁶.

Es cierto que la tecnología necesaria y los costes derivados de los análisis moleculares y biomarcadores en el laboratorio básico del hospital dificultan su generalización.

<https://doi.org/10.1016/j.acuro.2018.02.001>

0210-4806/© 2018 AEJ. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Cómo citar este artículo: Martínez-Rodríguez R. ¿Podemos basar la indicación de cistectomía precoz en algo más que características clínico patológicas? Actas Urol Esp. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.acuro.2018.02.001>



Review

Bladder cancer: Present and future[☆]Roberto Hugo Martínez Rodríguez^{*}, Oscar Buisan Rueda, Luis Ibarz

Servicio de Urología, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 April 2017
Accepted 8 June 2017
Available online 4 November 2017

Keywords:
Bladder cancer
Urothelial
Calmette-Guérin bacillus
Immunotherapy
Haematuria
Cystectomy

ABSTRACT

Bladder cancer has a high incidence and involves high associated morbidity and mortality. Since its initial clinical suspicion, early diagnostic confirmation and multimodal treatment involve different medical specialties. For this reason, we consider it important to spread the current consensus for its management. Recent advances in immunology and Chemotherapy make it necessary to expose and reflect on future perspectives.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Palabras clave:
Tumor vesical
Urotelio
Bacilo Calmette-Guérin
Inmunoterapia
Hematuria
Cistectomía

Tumor vesical: presente y futuro

RESUMEN

El tumor vesical presenta una elevada incidencia en nuestro medio y comporta una alta morbimortalidad asociada. Desde su sospecha clínica inicial, la confirmación diagnóstica precoz y el tratamiento multimodal involucran a diferentes especialidades médicas. Por ello consideramos importante difundir el consenso actual para su manejo. Los recientes avances en inmunología y quimioterapia hacen necesario exponer y reflexionar sobre las perspectivas futuras.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Introduction

Bladder cancer, with more than 357,000 new cases and more than 130,000 deaths annually worldwide, is one of the leading causes of mortality in men. In Europe, in 2012, 151,297 new cases of bladder cancer were diagnosed with a standardized incidence rate (per 100,000 people) of 17.7 for men and 3.5 for women. In general, the crude gross incidence rate is 20.4/100,000. In 2012 there were 52,395 deaths from bladder cancer with an annual gross mortality rate of 7.1/100,000.¹

Spain has one of the highest incidence and mortality rates in Europe with an average of 12,200 new cases per year, 4th more

frequent cancer in men and 5th in both sexes. Approximately 70% of patients with bladder cancer are older than 65 years of age. Tobacco use is the best-established risk factor, although occupational exposure, chemotherapeutic agents and pelvic radiation therapy have also been described as causative factors in the development of bladder cancer.

In order to promote and improve the management of these patients, we present this review on the current treatment of bladder cancer and its future prospects.

Clinical manifestations

Haematuria, urinary voiding symptoms (urgency and imperiousness) and recurrent urinary tract infections are the most frequent symptoms in patients with bladder cancer. Most patients are diagnosed by complementary examinations (ultrasound/cystoscopy) requested after presenting a first episode of hematuria.² Macroscopic haematuria is the symptom most strongly

[☆] Please cite this article as: Martínez Rodríguez RH, Buisan Rueda O, Ibarz L. Tumor vesical: presente y futuro. Med Clin (Barc). 2017;149:449–455.

^{*} Corresponding author.
E-mail address: dr.martinez@yahoo.es (R.H. Martínez Rodríguez).

correlated with the diagnosis of bladder cancer; with a positive predictive value at 3 years is 7.4% (95% CI: 6.8–8.1) in men and 3.4% (2.9–4) in women.³ Therefore, in the case of a patient with macroscopic haematuria, it is recommended to complete the study with ultrasound and refer the patient to urological examination. Ultrasound can detect intravesical lesions larger than 0.5 cm. If clinical suspicion of bladder cancer persists despite a normal ultrasound examination, cystoscopy will be the next diagnostic test.

Screening

Bladder cancer is an important health problem, has a high incidence and prevalence but also a reliable and efficient treatment. Despite the above, there is no scientific evidence to support a bladder cancer screening program in the general population. Not even in major smokers or individuals with environmental exposure to bladder carcinogens.⁴ Initially, the urine test strip was proposed as a method of screening for microhematuria (>3 red cells/field), but its positive predictive value is low. In 2015, an analysis of the *Cochrane Library* concluded that the quality of screening methods was too low to support any recommendations.⁵

Diagnosis

In those patients in whom urothelial tumour is suspected, cystoscopy will confirm the involvement of the lower urinary tract and computed tomography with urography that of the upper urinary tract. For the detection of bladder cancer, computed tomography with urography and cystoscopy have a sensitivity of 0.87 and 0.87 respectively, specificities of 0.99 and 1, positive predictive value of 0.91 and 0.98, and negative predictive value of 0.98 and 0.98.⁶

To improve the detection of intravesical lesions new technologies have been introduced, although their use has not become widespread:

Blue light cystoscopy with prior intravesical administration of hexaminolevulinate (Hexvix®) allows to improve the detection rates of carcinoma *in situ* (flat lesions).

Narrow-band imaging allows better vision of blood vessels and detects intravesical lesions more easily.

The increase in costs and the time required for its use have prevented its generalization in clinical practice.

Urinary markers

To date, the role of urinary molecular markers or cytology in the initial diagnosis of bladder cancer is very limited. In the past decade, the joint determination of NMP22 and cytokeratin markers (CYFRA 21-1 or UBC) was proposed as an alternative to urinary cytology.⁷ A review⁸ designed to compare urinary cytology and urinary molecular markers, showed a low sensitivity (34–55%) for cytology, especially in low grade tumours, but a high specificity (>90%), as well as poor inter- and intra-observer reproducibility. The pooled sensitivity of most molecular markers varies between 50% and 80%, higher than that of urine cytology, and the specificity of most of these markers ranges from 70% to 90%, lower than urinary cytology.

Currently, there is no molecular marker available with enough sensitivity and specificity to replace cystoscopy. The combination of cystoscopy and cytology is the most reliable method.

Bladder tumour grading and staging

Most bladder cancers are urothelial, presenting as non-muscle-invasive (75%) at the time of diagnosis as opposed to muscle-invasive or disseminated (25%). About half of

Table 1
TNM Staging according to the European Association of Urology.

Category T: Primary tumour (T)	
TX:	Primary tumour cannot be assessed
T0:	No evidence of primary tumour
Tis:	Carcinoma <i>in situ</i> : "flat tumour"
Ta:	Non-invasive papillary carcinoma
T1:	Tumour invades subepithelial connective tissue
T2:	Tumour invades muscular layer
T2a:	Tumour invades superficial muscular layer
T2b:	Tumour invades deep muscular layer
T3:	Tumour invades perivesical/fat
T3a:	Microscopically
T3b:	Macroscopically
T4:	Tumour invades any of the following structures: prostate, uterus, vagina, pelvic wall, or abdominal wall
T4a:	Tumour invades prostate, uterus, or vagina
T4b:	Tumour invades pelvic or abdominal wall
Category N: Lymph node involvement (N)	
Nx:	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0:	Regional lymph node metastases are not demonstrated
N1:	Metastasis in a single lymph node, maximum diameter ≤ 2 cm
N2:	Metastasis in a single lymph node, maximum diameter >2 cm, but ≤ 5 cm or in various lymph nodes, none of them >5 cm of maximum diameter
N3:	Metastasis in a single lymph node, maximum diameter >5 cm
Category M: Metastasis (M)	
Mx:	Distant metastases cannot be assessed
M0:	No distant metastases
M1:	Distant Metastasis

non-musculoskeletal tumours are low-grade tumours, while the muscle-invasive or disseminated tumours are high-grade. Cellular grade is the most important prognostic factor.

The first anatomopathological classification introduced by WHO dates back to 1973 and classifies them numerically as 1, 2 or 3 according to cellular anaplasia.

The classification of high or low grade is given by cellular architecture and cytological atypia. The WHO classification⁹ of 2004 includes a third category, that of urothelial papillary tumours with low malignant potential. The WHO 2004 classification is the most widely used at present. The recent update of the WHO classification in 2016¹⁰ does not present great variations with respect to the previous one.

Traditionally bladder cancers had been staged according to the T scale: Ta, T1, T2, T3 or T4 (Table 1), considering a muscle-invasive tumour the one which reaches or surpasses stage T2. The current nomenclature divides them into non-muscle-invasive or muscle-invasive, which implies large differences in therapeutic options and vital prognosis. Among non-muscle-invasive tumours those classified as T1 (involvement of the lamina propria) deserve a special consideration, since this involvement illustrates the invasive nature of bladder cancer. As the inter-observer variability is quite significant,¹¹ other data should be used when making therapeutic decisions.

Prognostic factors for T1: vascular invasion and growth pattern (solid vs papillary)¹²; depth of invasion,¹³ the one greater than 1.5 mm was associated with a higher staging of the cystectomy specimen (sensitivity of 81% and specificity of 83%) and with 5-year survival.

If doubts still exist, re-staging may be considered. Re-staging by repeat transurethral resection (TUR) of the T1 should be performed at 2–4 weeks to select candidates for early cystectomy¹⁴ or improve the results of Calmette–Guérin bacillus (BCG) treatment¹⁵; this re-staging is not always indicated when muscle invasion is present in the specimen submitted, rather, it should be evaluated individually.¹⁶

Genetic characteristics of bladder cancer

Papillary and non-papillary tumours

Bladder tumours can be classified as papillary and non-papillary according to genetic alterations, of which the most significant are active fibroblast growth factor 3 mutations in papillary tumours and mutations that inactivate TP53 and RB1 suppressor genes in non-papillary tumours. Recently, in 2014, *The Cancer Genome Atlas* (TCGA)¹⁷ and other groups have identified additional mutations that distinguish both subtypes.

Basal and luminal subtype

The basal subtype would correspond to histopathological findings similar to the squamous and sarcomatoid, and shows overexpression of epidermal growth factor 3. They are frequently metastatic at the time of diagnosis. This subtype responds best to treatments combined with methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin along with bevacizumab.

The luminal subtype is similar to the papillary ones and has gene mutations common to the non-muscle invasive type. It shows overexpression of fibroblast growth factor 3, ERBB3, epidermal growth factor (ERMM2) and is associated with a worse response to chemotherapeutic treatments.¹⁸

Treatment of non-muscle-invasive bladder cancer

Transurethral resection

The initial standard treatment of superficial bladder cancer is a TUR of all visible bladder lesions. The pathologic analysis of the resected tumour will determine the tumour grade and the depth of involvement, which will complete the diagnosis.

Stratification of the risk of recurrence and progression

After the initial bladder cancer TUR treatment, the probability of 5-year recurrence is between 50% and 70%, with a risk of progression of 10–30%. Factors associated with increased risk of recurrence and progression are known: high grade, stage, tumour size, multifocality, previous recurrences, lymphovascular invasion and concomitant carcinoma *in situ*. The depth of involvement of the lamina propria, involvement of the prostatic urethra and specific histopathological variants (micropapillary) are also identified as risk factors for progression.

The patient is then classified into a risk group as shown in Table 2. These risk categories have their own post-TUR treatment recommendations associated with decreasing rates of recurrence and progression. Fig. 1 shows a therapeutic algorithm for the management of bladder cancer according to the European Association of Urology.

Intravesical treatment: chemotherapy and immunotherapy

Immediate intravesical chemotherapy

Among the chemotherapeutic drugs (mitomycin C, epirubicin or doxorubicin) no agent is superior to another regarding efficacy. The most widely used is mitomycin C. Intravesical mitomycin administered during the first hours (6–24 h) after TUR has been shown to decrease early recurrences around 20%, with a level of evidence 1a.

It should be administered to all patients unless there is significant haematuria (due to the risk of hematogenous diffusion) and/or bladder perforation (due to the risk of local toxicity).

Intravesical immunotherapy: Calmette-Guérin bacillus

BCG is an attenuated strain of *Mycobacterium bovis*, initially developed as a vaccine against *Mycobacterium tuberculosis*. Although the use of BCG in the fight against tuberculosis has faced the problem of resistance, this strain has also been used as an immunotherapeutic agent for a variety of diseases, including colorectal cancer, melanoma and superficial bladder cancer.¹⁹ Early studies on its use against melanoma showed that intravesical BCG injections resulted in a 90% decrease in recurrence, with a significant reduction of untreated lesions that were in the same lymphatic drainage channel, showing that the tumour burden reduction was related to a BCG-induced immune response.²⁰ Intravesical BCG treatment has been indicated for superficial bladder cancer since 1976 in patients with tumours at high risk of recurrence and/or progression,²¹ being more effective in preventing or delaying tumour recurrence and progression than other types of treatments. Although the causes of this superiority are not exactly known, different theories have been offered: Treatment with BCG induces an immune response that can persist for longer periods and is able to penetrate deep into the detrusor muscle, whereas chemotherapy depends on simple diffusion and, therefore, has very little penetration power in the mucosa.

Calmette-Guérin bacillus treatment response markers. The search for predictive markers of clinical response to treatment with intravesical immunotherapy in high-grade non-muscle-invasive bladder cancers has been a constant feature in urological research in recent years.

Knowing that up to 30–50% of patients will experience treatment failure and that up to 15% of these can progress, early identification of those patients who will not respond to instillations is essential, so that other treatments can be tried and/or radical treatment (early cystectomy) is not delayed.

The exact mechanisms of BCG functioning remain unknown, but interesting conclusions have been published in the last few years that help to understand their action mechanism, contributing to predict (but not with the desired precision) clinical response.

Ardelt et al. demonstrated a humoral immune response against HSP-65 at the time of re-evaluation following the induction cycle as an individual predictor of positive response to BCG immunotherapy. IgA and IgG titres measured before and after the induction cycle predicted treatment success, suggesting that monitoring of anti-HSP-65 titres during the induction cycle could be a useful tool for early detection of non-responders.²²

Kamat et al. demonstrated a promising prediction tool for recurrences with detection rates above 80%²³ based on urinary cytokines. However, we must consider the enormous variability of production, release and detection of these cytokines, which may hinder their clinical application. As Zuiverloon and Zwarthoff pointed out²⁴ in their commentary about the previously mentioned article, determination of these cytokines in the basic hospital laboratory and its derived cost should be considered in the search for the said marker.

Intravesical administration of BCG acts as a potent local immunomodulator by polarizing the Th1 response and releasing inflammatory cells. This response is greater according to the type of strain used, observing that BCG Connaught is significantly more effective in terms of recurrence-free survival.²⁵

Peritumoural tissue staining obtained during the diagnostic TUR with monoclonal antibodies specific for both Th1 and Th2 has allowed to observe the relationship between the Th2/Th1 ratio and the initial clinical response. Probably the solution lies in combining peritumoural tissue markers, urinary determinations and immune response capacity in peripheral blood.

Table 2
Risk group, characteristics and treatment recommendations for bladder cancer.

Risk group	Characteristics	Recommended treatment
Low risk	Primary, single tumour, <3 cm, low grade, absence of carcinoma in situ	Single dose of mitomycin
Intermediate risk	All tumours not defined in the previous category or in the next category	Mitomycin/BCG
High risk	Any of the following: T1 High grade Carcinoma in situ Low-grade Ta, multiple, recurrent and/or >3 cm Higher risk subgroup: Associated T1 high-grade carcinoma in situ High-grade multiple T1 Carcinoma in situ in prostatic urethra Micropapillary variant Lymphovascular invasion	BCG BCG Cystectomy

BCG: Calmette-Guérin bacillus.

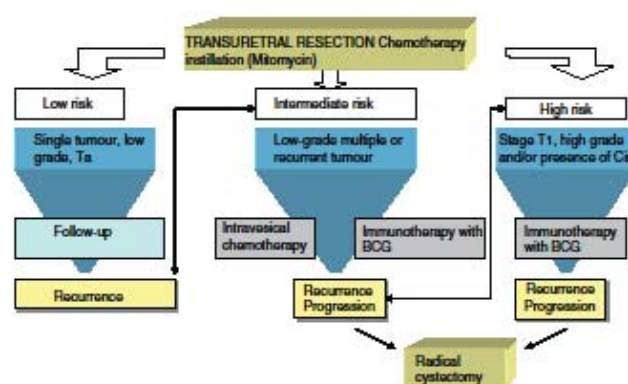


Fig. 1. Therapeutic algorithm for the management of the bladder cancer according to the European Association of Urology.

Early cystectomy. It is considered early cystectomy the one performed in the presence of a non-muscle-invasive bladder cancer when muscle-invasive progression is thought to be imminent.

It is recommended in patients with BCG-refractory tumours, defined as:

- Recurrence of high-grade non-muscle-invasive papillary tumour within 3 months after treatment.
- Presence of carcinoma *in situ* at 3 or 6 months.
- High grade papillary tumour recurrence during treatment with BCG.
- Recurrence of high grade papillary tumour after BCG maintenance treatment, despite initial response.

The therapeutic approach to be followed should be considered individually and agreed with the patient in each case.

Treatment of muscle-invasive urothelial bladder carcinoma

Fig. 2 shows a therapeutic algorithm for the management of muscle-invasive bladder cancer according to the European Association of Urology.

Radical cystectomy with pelvic lymphadenectomy is currently the first-line treatment in muscle-invasive bladder carcinomas higher than or equal to T2.²⁶ In male patients it must be

accompanied by the removal of the prostate and seminal vesicles while in women it should be associated with excision of the uterus and anterior vaginal wall. Despite improvements in the surgical technique, it continues to be associated with a mortality of around 9% within the first 90 days and a morbidity ranging from 30% to 90%.²⁷

Strategies such as laparoscopic or robotic surgery, in those centres where this is possible, have resulted in a reduction of bleeding, although hospital stay or morbidity have remained the same. In this sense multimodal rehabilitation programs have provided greater benefits regardless of the surgical technique used.²⁸

Techniques have been designed with the intention of reducing the side effects of the same, aiming at the preservation of the prostatic capsule as well as the seminal vesicles, although these are not recommended in locally advanced tumours and their oncological safety is not clearly demonstrated since up to 40% of cases will experience infiltration of the prostate by the urothelial carcinoma or the prostatic adenocarcinoma.²⁹

The urinary diversion following bladder removal will depend not only on the patient's wishes but also oncological criteria. The presence of tumour in the prostatic urethra initially contraindicates performing an orthotopic continent urinary diversion, although, if the patient so wishes, a histological study of the urethral margin should be performed to evaluate the presence or not of tumour at this site.

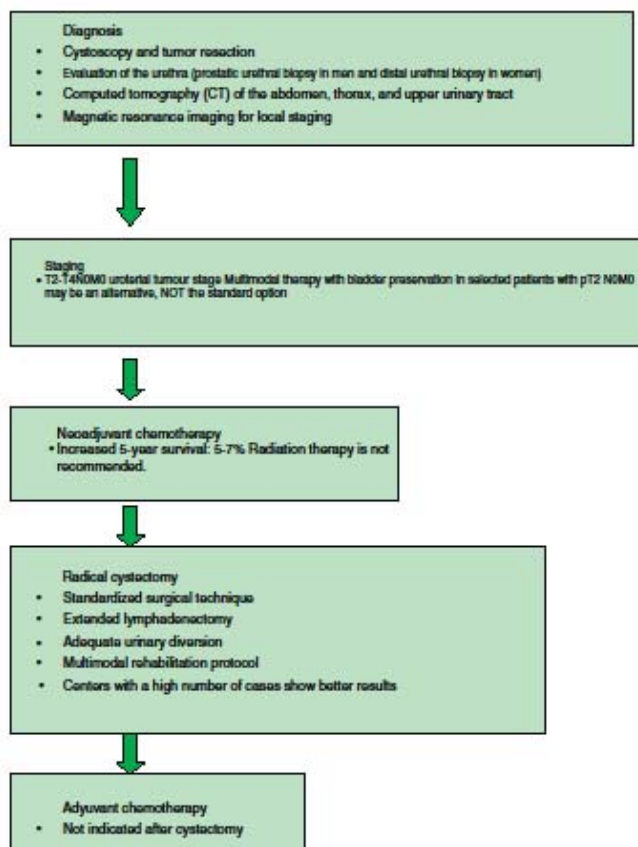


Fig. 2. Therapeutic algorithm for the management of muscle-invasive bladder cancer according to European Association of Urology.

The study of the ureteral margins prior to urinary diversion has also been extensively studied and, although it does not appear to be routinely performed, its use in specific cases seems to be useful regarding the widening of margins.

Regarding the extension of lymphadenectomy, a significant percentage of patients will present regional lymph node involvement at the time of cystectomy. Therefore, lymphadenectomy is essential and its extension has also been the subject of analysis. The different studies have demonstrated improved survival by performing an extended lymphadenectomy versus reduced lymphadenectomy regardless of adjuvant treatments that may be used. Therefore, lymphadenectomy should not only be performed for the correct staging of the patient, but also for its benefit in survival *per se*.³⁰ The SWOG S1011 study assessed the benefit in survival and recurrence according to the extent of lymphadenectomy, showing a more favourable outcome in extended lymphadenectomy.

In patients with T4b disease or with metastases at the time of diagnosis, radical cystectomy is not indicated, since it does not

imply any benefit in survival, although it may help to control local symptoms in a palliative strategy.³¹

Bladder preservation treatments in muscle-invasive bladder carcinoma

In patients who wish to preserve the bladder, protocols based on radiotherapy have been designed, provided the aggressiveness of the tumour so permits.

Thus, several prospective trials support the possibility of preserving the bladder provided that the tumour TUR is complete, with no histological variants, in the absence of ureterohydronephrosis, and with a tumour of less than 3 cm.

In this type of patients, a strategy with chemoradiotherapy is superior to radiotherapy and 70% of the patients will preserve their bladder after 5 years of follow-up. Cystoscopy is imperative in the oncological control and, in case of recurrence, radical cystectomy is essential.³²

The toxicity of chemoradiotherapy in these patients is acceptable and the vast majority preserve an optimal bladder function at the end of treatment.

Neoadjuvant chemotherapy

There is currently sufficient evidence to recommend neoadjuvant chemotherapy based on cisplatin, including combination therapy with methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin, and cisplatin, methotrexate, and vinblastine for higher-than-T2 urothelial cell carcinoma with complete response rates around 30% and a survival benefit of 5–8% at 5 years.²³ Despite the recommendations of the guidelines and the fact that an increase in postoperative cystectomy complications are not observed, it is not widely accepted among urologists and in many centres, cystectomy continues to be performed as initial intervention, reserving chemotherapy as an adjuvant treatment.³⁴

Adjuvant treatments

Adjuvant radiotherapy

20–45% of patients with locally advanced bladder neoplasm treated with radical cystectomy will present local recurrence within 5 years after treatment. It would therefore seem logical to think that adjuvant radiotherapy could reduce these rates. Although at present there is no evidence that this is so, a phase 2 study (NRG-GU001) is currently underway to clarify this point.

In this sense, it would seem logical that patients with histological variants such as squamous differentiation, with higher local recurrence rates and evidence of response to radiotherapy at other sites (rectum or cervix), could benefit from these treatments.³⁵

Adjuvant chemotherapy

Sternberg et al. performed a phase 3 study with adjuvant chemotherapy based on cisplatin, showing a statistically significant 5-year progression-free survival benefit (48 vs 32%) when comparing immediate versus delayed adjuvant chemotherapy, although this benefit could not be applied to overall survival (57% versus 47%).³⁶

A meta-analysis of all adjuvant chemotherapy trials demonstrates a 25% reduction in the risk of death, although most experts believe that the evidence is insufficient to recommend it for routine practice.

Treatment of metastatic bladder cancer

Currently the treatment of choice in the patient with metastatic disease is cisplatin-based chemotherapy (cisplatin, methotrexate and vinblastine, or cisplatin+gemcitabine), achieving a median survival of around 14 months, similar to the combined treatment with methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin, although with a lower rate of adverse effects. In non-candidates for cisplatin, carboplatin is the drug of choice but with lower response rates.³⁷

For those patients who, after having received treatment with cisplatin, still experience progression, the use of pembrolizumab immunotherapy has recently been approved, with an improvement in survival against other chemotherapies of about 3 months, such as paclitaxel, docetaxel or vinflunine.

Future perspectives

In recent years, tremendous advances have been made in the molecular subclassification of a multitude of tumours, including urothelial carcinoma. The TCGA project allowed us to know 2

subtypes of basal and luminal urothelial carcinomas, with different prognosis and response to chemotherapy. Thanks to these findings, studies such as COXEN should allow us to select patients with a better response to neoadjuvant chemotherapy, since, so far, we did not have sufficiently potent prognostic factors.^{38,39}

On the other hand, the role of inflammatory markers (lymphocyte/neutrophil ratio) and their relation to the prognosis of patients with invasive bladder cancer as well as their correlation with findings in normal peritumoural tissue.^{40,41}

In addition, immunotherapy is acquiring an increasing role in the adjuvant treatment of patients with urothelial carcinoma and is even being tested as a neoadjuvant treatment for radical cystectomy which is likely to become an alternative to chemotherapy or as a second line treatment in the near future.^{42,43}

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Available from: <http://globocan.iarc.fr> [last accessed 18.2.14].
2. Kamta A, Hahn N, Elstathiou J, Lerner SP, Malmstrom PJ, Choi W, et al. Bladder cancer. *Lancet*. 2016;388:2796–810.
3. Jones R, Lalinovi R, Charlton J, Gulliford MC. Alarm symptoms in early diagnosis of cancer in primary care: cohort study using General Practice Research Database. *BMJ*. 2007;334:1040.
4. Pesch B, Nasterlack M, Eberle F, Bomberg N, Taeger D, Leng C, et al., and the Uroscreen Group. The role of haematuria in bladder cancer screening among men with former occupational exposure to aromatic amines. *BJU Int*. 2011;108:546–52.
5. Krugliob LT, Jorgensen KJ, Gotsche PC. Screening with urinary dipsticks for reducing morbidity and mortality. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;1:CD010007.
6. Helenius M, Breikán E, Dahlman P, Lonnemark M, Magnusson A. Bladder cancer detection in patients with gross haematuria: computed tomography urography with enhancement-triggered scan versus flexible cystoscopy. *Scand J Urol*. 2015;49:377–81.
7. Sanchez-Carbayo M, Urrutia M, Hernandez-Cerdeño MI, González de Buitrago JM, Navajo JA. Citoqueratinas (UBC y CYFRA 21-1) y proteínas de la matriz nuclear (NMP22) como marcadores tumorales en la orina en el diagnóstico del cáncer vesical. *Med Clin (Barc)*. 2000;114:361–6.
8. Schmitz-Dräger BJ, Dröbler M, Lokeshwar VB, Lotan Y, Hudson MA, van Rhijn BW, et al. Molecular markers for bladder cancer screening, early diagnosis, and surveillance: the WHO/IUOJ consensus. *Urol Int*. 2015;94:1–24.
9. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I. Tumours of the urinary system. In: *World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs*. Lyon, France: IARC Press; 2004. p. 89–123.
10. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE. Tumors of the urinary tract. In: *World Health Organization classification of tumours of the urinary system and male genital organs*. 4th edn Lyon, France: IARC Press; 2016. p. 77–133.
11. Tosoni I, Wagner U, Sauter G, Egloff M, Knosagel H, Alami G, et al. Clinical significance of interobserver differences in the staging and grading of superficial bladder cancer. *BJU Int*. 2000;85:48–53.
12. Andrus P, Johansson SL, Holmång S. Prognostic factors in stage T1 bladder cancer: tumor pattern (solid or papillary) and vascular invasion more important than depth of invasion. *Urology*. 2007;70:758–62.
13. Cheng L, Weaver AL, Bostwick DG. Predicting extravesical extension of bladder carcinoma: a novel method based on micrometer measurement of the depth of invasion in transurethral resection specimens. *Urology*. 2000;55:668–72.
14. Herr HW, Donat SM, Dalagni G. Can restaging transurethral resection of T1 bladder cancer select patients for immediate cystectomy? *J Urol*. 2007;177:75–9.
15. Herr HW. Restaging transurethral resection of high risk superficial bladder cancer improves the initial response to bacillus Calmette-Guérin therapy. *J Urol*. 2005;174:2134–7.
16. Gaya JM, Palou J, Cosentino M, Patiño D, Rodríguez Faba O, Villavicencio H. A second transurethral resection could be not necessary in all high grade non-muscle-invasive bladder tumors. *Actas Urol Esp*. 2012;36:539–44.
17. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 2014;507:315–22.
18. Choi W, Czerniak B, Ochoa A, Su X, Siefker Radtke A, Dinney C, et al. Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2014;11:400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24960601>
19. Lamm DL. Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for bladder cancer. *J Urol*. 1985;134:40–7.
20. Krege S, Giani G, Meyer R, Okto T, Rubben H. A randomized multicenter trial of adjuvant therapy in superficial bladder cancer: transurethral resection only

- versus transurethral resection plus mitomycin C versus transurethral resection plus bacillus Calmette-Guérin. Participating clinics. *J Urol*. 1996;156:962-6.
21. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guérin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol*. 1976;116:180-3.
 22. Ardell P, Kneitz B, Adam P, Reiss C, Kocot A, Fensterle J, et al. Reactive antibodies against Bacillus Calmette-Guérin heat-shock protein-65 potentially predict the outcome of immunotherapy for high-grade transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer*. 2010;116:500-9.
 23. Kamat AM, Briggman J, Urbauer DL, Svatek R, Noguera Gonzalez GM, Anderson R, et al. Cytokine panel for response to intravesical therapy (CyPRIT): nomogram of changes in urinary cytokine levels predicts patient response to bacillus Calmette Guérin. *Eur Urol*. 2016;69:197-200.
 24. Zilverloot T, Zwarthoff E. Predicting response to intravesical Bacillus Calmette Guérin immunotherapy: are we moving forward? *Eur Urol*. 2016;69:201-3.
 25. Bentsch CA, Birkhäuser FD, Biot C, Gosper JR, Bisiaux A, Weisauer C, et al. Bacillus Calmette-Guérin strain differences have an impact on clinical outcome in bladder cancer immunotherapy. *Eur Urol*. 2014;66:677-88.
 26. Alfred Wijles J, Lebrat T, Comperat EM, Cowan NC, de Santis M, Bruins HM, et al. Updated 2016 EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer. *Eur Urol*. 2017;71:462-75.
 27. Sood A, Kachroo N, Abdollah F, Samton JD, Loppenberg B, Jindal T, et al. An evaluation of the timing of surgical complications following radical cystectomy: data from the American College of Surgeons National Surgical Quality Improvement Program. *Urology*. 2017;103:91-8.
 28. Casals-Frances R, Roberto-Alcacer AT, Garcia-Lecina AC, Ferrer-Ferrer MI, Subira-Rios J, Guillen-Anton J. Impact of an enhanced recovery after surgery programme in radical cystectomy. A cohort-comparative study. *Rev Esp Anestesiol Reanim*. 2017;54:313-22.
 29. Huguet J. Prostatic involvement by urothelial carcinoma in patients with bladder cancer and their implications in the clinical practice. *Actas Urol Esp*. 2012;36:545-53.
 30. Froelmer M, Novolny V, Heberling U, Rutsch L, Uitz RJ, Hubler M, et al. Relationship of the number of removed lymph nodes to bladder cancer and overall mortality after radical cystectomy. *Eur Urol*. 2014;66:987-90.
 31. Liberman D, Alasker A, Sun M, Ismail S, Lughezzani G, Jeldres C, et al. Radical cystectomy for patients with pT4 urothelial carcinoma in a large population-based study. *BJU Int*. 2011;107:905-11.
 32. Plioussant G, Danestmand S, Elstathiou JA, Herr HW, James ND, Rodel CM, et al. Critical analysis of bladder sparing with trimodal therapy in muscle-invasive bladder cancer: a systematic review. *Eur Urol*. 2014;66:120-37.
 33. Grossman HB, Natale RB, Tangen CM, Speights VO, Vogelzang NJ, Trump DL, et al. Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N Engl J Med*. 2003;349:850-59.
 34. Martini T, Gilfrich C, Mayr R, Burger M, Pycha A, Aziz A, et al. The use of neoadjuvant chemotherapy in patients with urothelial carcinoma of the bladder: current practice among clinicians. *Clin Genitourin Cancer*. 2017;15:356-62.
 35. Christodouleas JP, Hwang WT, Baumann BC. Adjuvant radiation for locally advanced bladder cancer? A question worth asking. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2016;94:1040-2.
 36. Sternberg CN, Siroveczma I, Kerst JM, Albers P, Fossa SD, Agerbaek M, et al. Immediate versus deferred chemotherapy after radical cystectomy in patients with pT3-pT4 or N+ M0 urothelial carcinoma of the bladder (EORTC 30994): an intergroup, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16:76-86.
 37. Milowsky ML, Rumble RB, Boehm CM, Gilligan T, Eapen LJ, Hauke RJ, et al. Guideline on muscle-invasive and metastatic bladder cancer (European Association of Urology Guideline): American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement. *J Clin Oncol*. 2016;34:1945-52.
 38. Adam RM, DeGraff DJ. Molecular mechanisms of squamous differentiation in urothelial cell carcinoma: a paradigm for molecular subtyping of urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urol Oncol*. 2015;33:444-50.
 39. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell*. 2014;25:152-65.
 40. Buisan O, Orsola A, Areal J, Font A, Oliveira M, Martinez R, et al. Low pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts for good outcomes in patients receiving neoadjuvant chemotherapy before radical cystectomy for muscle-invasive bladder cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2017;15:145-51.e2.
 41. Bellmunt J, Mullane SA, Werner L, Fay AP, Callea M, Leow JJ, et al. Association of PD-L1 expression on tumor-infiltrating mononuclear cells and overall survival in patients with urothelial carcinoma. *Ann Oncol*. 2015;26:812-7.
 42. Powles T, Eder JP, Fine GD, Braiteh FS, Loriot Y, Cruz C, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*. 2014;515:558-62.
 43. Bellmunt J, Powles T, Vogelzang NJ. A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: the future is now. *Cancer Treat Rev*. 2017;54:58-67.



The search of new biomarkers in the prediction of BCG response in patients with high-risk NMIBC

Roberto H. Martínez Rodríguez¹ · José H. Amon Sesmero¹

Received: 23 March 2020 / Accepted: 10 March 2020
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Dear Editor,

Bladder cancer is the sixth leading cause of cancer in the EU with 124,000 people diagnosed and over 40,000 people dying from the disease each year. The estimated total cost of bladder cancer across EU in 2012 was 4.9 billion of Euros [1]. By 2030, the annual incidence is projected to be almost duplicated (219,000); so epidemiologic efforts as well as improvements in cost-effective treatments and diagnosis are required.

Bacillus Calmette Guérin (BCG) is the first line treatment for the NMIBC to prevent recurrence and progression.

Despite treatment, 30–50% of patients fail to respond and 15% experience progression to MIBC; so predicting patients who might not benefit from BCG treatment is necessary, so other therapies such as chemohyperthermia or radical cystectomy could be performed.

Identification of the BCG response markers that are clinically significant, disease relevant, reproducible and easily accessible in the clinical settings is challenging up to date.

In this paper, Aydin et al. [2], even despite an adequate statistical analysis, a large sample and a considerable follow-up, did not find statistical relation between PD-L1 expression and response to BCG treatment. As they cited in this paper, our experience agrees with their findings [3]; so, how to explain the wide variability of results reports by different groups? Devil is on details, and this heterogeneity of results could be explained by the strain and dose of BCG used, the inclusion or not in the study of patients with carcinoma *in situ*, the immunohistochemical staining method used as

well as the determination of the place of PD-L1 (inflammatory or neoplastic cells).

Intravesical administration of BCG is hypothesized to act as a localized Th1-polarizing immunomodulator that induces massive influx of inflammatory cells. As Rentsch et al. reported, BCG Connaught appears to be a stronger inducer of a Th1 polarized response compared with BCG Tice, and it was significantly more effective in terms of recurrence-free survival [4].

Kamer et al. [5] presented a promising tool to predict recurrences with an 80% accuracy. However, we have to consider the high variability of production, liberation and detection of such cytokines, which could be difficult in the clinical application of that cytokine panel. We have also to consider if the assay is feasible to perform at a hospital-based laboratory, as well as the involved costs.

The search of prognostic factors goes on, and Aydin et al. open other paths to get the wished prognosis tool. Probably the solution will be to combine clinical pathology, cellular, genetic, epigenetic and molecular markers.

Author contributions RM: project development and manuscript writing. JHA: manuscript editing.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Roberto H. Martínez Rodríguez and José H. Amon Sesmero certifies that all conflicts of interest, including specific financial interests and relationships and affiliations relevant to the subject matter or materials discussed in this editorial letter are the following none.

References

1. Laati L, Luoma-Farmacher R, Sullivan R, Wittges A (2016) Economic burden of bladder cancer across the European Union. *Int J Urol* 69:436–447

This comment refers to the article available at <https://doi.org/10.1007/s12145-020-01195-y>.

✉ Roberto H. Martínez Rodríguez
 dr.martinez@paho.es

¹ Urology Department, University Hospital Rio Hortega, Valladolid, Spain

Published online: 04 April 2020

Springer

BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov; 68:394-424.
- ² Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence worldwide in 2012.
- ³ www.aecc.es
- ⁴ www.cancer.net
- ⁵ Amling CL. Diagnosis and management of superficial bladder cancer. *Curr Probl Cancer* 2001; 25: 219–78.
- ⁶ PATRIKC C. WALSH: “Campbell: Urología”. 8ª ed. Tomo 4. Medica Panamericana. Buenos Aires-Argentina 2004.
- ⁷ Kamta A, Hahn N, Efstathiou J, Lerner SP, Malmstrom PU, Choi W et al. Bladder cancer. *Lancet* 2016;388:2796-810.
- ⁸ Khadra MH, Pickard RS, Charlton M, Powell PH, Neal DE. A prospective analysis of 1,930 patients with haematuria to evaluate current diagnostic practice. *J Urol.* 2000 Feb; 163:524-7.
- ⁹ Jones R, Latinovi R, Charlton J, Gulliford MC. Alarm symptoms in early diagnosis of cancer in primary care: cohort study using General Practice Research Database. *BMJ* 2007; 334:1040
- ¹⁰ Martinez R, Buisan O and Ibarz L. Tumor vesical: Presente y futuro. *Med Clin* 201; 149;449-55.
- ¹¹ Helenius M, Brekkan E, Dahlman P, Lonnemark M, Magnusson A. Bladder cancer detection in patients with gross haematuria: Computed tomography urography with enhancement-triggered scan versus flexible cystoscopy. *Scand J Urol* 2015; 49:377-81.
- ¹² Abascal Junquera, José M., Hevia Suárez, Miguel, Abascal García, José M., Estébanez, Cristina, Astudillo, Aurora, & Abascal, Ramón. (2008). Experiencia inicial en el diagnóstico y tratamiento del tumor vesical superficial con Hexvix®. *Archivos Españoles de Urología* 2008; 61: 475-83.
- ¹³ Hsueh TY, Chiu AW. Narrow band imaging for bladder cancer. *Asian J Urol.* 2016; 3:126-29.

-
- ¹⁴ Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [published correction appears in *CA Cancer J Clin*. 2020 Jul;70(4):313]. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68:394-424.
- ¹⁵ https://www.cancer.gov/types/bladder/hp/bladder-screening-pdq#_20_toc
- ¹⁶ Pesch B, Nasterlack M, Eberle F, Bomberg N, Taeger D, Leng G et al. and the Uroscreen Group. The role of haematuria in bladder cancer screening among men with former occupational exposure to aromatic amines. *BJU Int* 2011; 108:546-52.
- ¹⁷ Messing EM, Young TB, Hunt VB, Gilchrist KW, Newton MA, Bram LL, Hisgen WJ, Greenberg EB, Kuglitsch ME, Wegenke JD. Comparison of bladder cancer outcome in men undergoing haematuria home screening versus those with standard clinical presentations. *Urology*. 1995 Mar; 45:387-96; discussion 396-7.
- ¹⁸ Krogsboll LT, Jorgensen KJ, Gotzsche PC. Screening with urinary dipsticks for reducing morbidity and mortality. *Cochrane Database Syst rev* 2015;1:CD010007.
- ¹⁹ Metts MC, Metts JC, Milito SJ, Thomas CR Jr. Bladder cancer: a review of diagnosis and management. *J Natl Med Assoc*. 2000; 92:285-94.
- ²⁰ Hansel DE, Miller JS, Cookson MS, Chang SS. Challenges in the pathology of non-muscle-invasive bladder cancer: a dialogue between the urologic surgeon and the pathologist. *Urology*. 2013 Jun; 81:1123-30.
- ²¹ Babjuk M; Burger M; Compérat E; Gontero P; Mostafid A, Palou J et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update *Eur Urol*. *Eur Urol* 2019 Nov;76:639-57.
- ²² Herr HW: Tumor progression and survival of patients with high grade, noninvasive papillary (TaG3) bladder tumors: 15-year outcome. *J Urol* 163 : 60-1; discussion 61-2, 2000.
- ²³ Mostofi FK, Sobin LH, Torloni H (1973) Histological typing of urinary bladder tumours. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- ²⁴ Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE. Tumours of the urinary tract. In: World Health Organization classification of tumours of the urinary

system and male genital organs. 4th ed. Lyon, France: IARC Press, 2016:77-133.

²⁵ AJCC Cancer Staging Manual. 7. New York, NY: Springer; 2010.

²⁶ Paner GP, Wojcik EM, Datta MW. Further characterization of the muscle layers of the urinary bladder by systematic histologic mapping: Implications for pathologic staging. *Modern Pathology Annual Meeting Abstracts 2006*; 19:154

²⁷ Orsola, A., Werner, L., de Torres, I., Martin-Doyle, W., Raventos, C. X., Lozano, F., Mullane, S. A., Leow, J. J., Barletta, J. A., Bellmunt, J., & Morote, J. Reexamining treatment of high-grade T1 bladder cancer according to depth of lamina propria invasion: a prospective trial of 200 patients. *British journal of cancer*, 2015;112, 468–74.

²⁸ Trias, I., Orsola, A., Español, I., Vidal, N., Raventós, C.X., & Bucar, S. Carcinoma urotelial de vejiga estadio T1: subestadiaje, patrones morfológicos de invasión y su significado pronóstico. *Actas Urológicas Españolas*, 2007; 31, 1002-08.

²⁹ Herr HW, Donat SM. Quality control in transurethral resection of bladder tumours. *BJU Int* 2008; 102:1242-6.

³⁰ Tosoni I, Wagner U, Sauter G, Egloff M, Knonagel H, Alund G et al. Clinical significance of interobserver differences in the staging and grading of superficial bladder cancer. *BJU Int* 2000; 85:48–53.

³¹ Herr HW, Donat SM, Dalbagni G. Can restaging transurethral resection of T1 bladder cancer select patients for immediate cystectomy? *J Urol* 2007; 177:75–79.

³² Herr HW. Restaging transurethral resection of high-risk superficial bladder cancer improves the initial response to bacillus Calmette-Guerin therapy. *J Urol* 2005; 174:2134–37.

³³ Gaya JM, Palou J, Cosentino M, Patiño D, Rodríguez Faba O and Villavicencio H. A second transurethral resection could be not necessary in all high-grade non-muscle-invasive bladder tumors. *Actas Urol Esp* 2012, 36:539-44.

³⁴ Andius P, Johansson SL, Holmäng S. Prognostic factors in stage T1 bladder cancer: tumor pattern (solid or papillary) and vascular invasion more important than depth of invasion. *Urology* 2007; 70:758–62.

-
- ³⁵ Cheng L, Weaver AL, Bostwick DG. Predicting extravesical extension of bladder carcinoma: a novel method based on micrometer measurement of the depth of invasion in transurethral resection specimens. *Urology* 2000; 55:668–72.
- ³⁶ Abufaraj M, Shariat SF, Foerster B, et al. Accuracy and prognostic value of variant histology and lymphovascular invasion at transurethral resection of bladder. *World J Urol* 2018; 36:231-40.
- ³⁷ Chang SS, Boorjian SA, Chou R, Clark PE, Daneshmand S, Konety BR, Pruthi R, Quale DZ, Ritch CR, Seigne JD, Skinner EC, Smith ND, McKiernan JM. Diagnosis and Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: AUA/SUO Guideline. *J Urol*. 2016 Oct;196:1021-9.
- ³⁸ Lamm DL. Long-term results of intravesical therapy for superficial bladder cancer. *Urol. Clin. North Am.* 1992; 19:573–580.
- ³⁹ Martínez-Piñero JA, Jiménez León J, Martínez-Piñero L, Jr, Fiter L, Mosteiro JA, Navarro J, García Matres MJ, Cárcamo P. Bacillus Calmette-Guerin versus doxorubicin versus thiotepa: a randomized prospective study in 202 patients with superficial bladder cancer. *J. Urol.* 1990; 143:502–6.
- ³⁸ EAU Guidelines. Ed. presented at the EAU Annual Congress Amsterdam 2020. ISBN 978-94-92671-07-3.
- ³⁹ Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, Newling DW, Kurth K . Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using eortc risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006; 49: 466–5, discussion 475-77.
- ⁴⁰ Palou J, Sylvester RJ, Faba OR, Parada R, Peña JA, Algaba F, Villavicencio H. Female gender and carcinoma in situ in the prostatic urethra are prognostic factors for recurrence, progression, and disease-specific mortality in T1G3 bladder cancer patients treated with bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol*. 2012; 62:118-25.
- ⁴¹ Huguet J. Afectación prostática por carcinoma urotelial en pacientes con tumor vesical y sus implicaciones en la práctica clínica. *Actas Urol Esp*. 2012 Oct;36:545-53.
- ⁴² Kim HS, Kim M, Jeong CW, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Presence of lymphovascular invasion in urothelial bladder cancer specimens after

-
- transurethral resections correlates with risk of upstaging and survival: a systematic review and meta-analysis. *Urol Oncol.* 2014; 32:1191-9.
- ⁴³ Compérat E, Roupret M, Yaxley J, Reynolds J, Varinot J, Ouzaid I, Cussenot O, Samaratunga H. Micropapillary urothelial carcinoma of the urinary bladder: a clinicopathological analysis of 72 cases. *Pathology.* 2010; 42:650-4.
- ⁴⁴ Kaimakliotis HZ, Monn MF, Cary KC, Pedrosa JA, Rice K, Masterson TA, Gardner TA, Hahn NM, Foster RS, Bihle R, Cheng L, Koch MO. Plasmacytoid variant urothelial bladder cancer: is it time to update the treatment paradigm? *Urol Oncol.* 2014;32:833-8
- ⁴⁵ Babjuk M, Böhle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat EM, Hernández V, Kaasinen E, Palou J, Roupret M, van Rhijn BWG, Shariat SF, Soukup V, Sylvester RJ, Zigeuner R. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol.* 2017 Mar;71:447-61.
- ⁴⁶ Paner GP, Montironi R, Amin MB. Challenges in Pathologic Staging of Bladder Cancer: Proposals for Fresh Approaches of Assessing Pathologic Stage in Light of Recent Studies and Observations Pertaining to Bladder Histoanatomic Variances. *Adv Anat Pathol.* 2017 May;24:113-27.
- ⁴⁷ Palou-Redorta J, Roupret M, Gallagher JR, Heap K, Corbell C, Schwartz B. The use of immediate postoperative instillations of intravesical chemotherapy after TURBT of NMIBC among European countries. *World J Urol.* 2014 Apr; 32:525–30.
- ⁴⁸ Shelley MD, Kynaston H, Court J, Wilt TJ, Coles B, Burgon K, Mason MD. 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;88:209-16.
- ⁴⁹ Lamm D.L., Thor D.E., Harris S.C., Reyna J.A., Stogdill V.D., Radwin H.M. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of superficial bladder cancer. *J. Urol.* 1980; 124:38–40.
- ⁵⁰ Cambier S, Sylvester RJ, Collette L, Gontero P, Brausi MA, van Andel G, Kirkels WJ, Silva FC, Oosterlinck W, Prescott S, Kirkali Z, Powell PH, de Reijke TM, Turkeri L, Collette S, Oddens J. EORTC Nomograms and Risk Groups for Predicting Recurrence, Progression, and Disease-specific and Overall Survival in Non-Muscle-invasive Stage Ta-T1 Urothelial Bladder Cancer Patients

Treated with 1-3 Years of Maintenance Bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol.* 2016 Jan;69:60-9.

⁵¹ Shirakawa H, Kikuchi E, Tanaka N, Matsumoto K, Miyajima A, Nakamura S, Oya M. Prognostic significance of Bacillus Calmette-Guérin failure classification in non-muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int.* 2012 Sep; 110(6 Pt B): E216-21.

⁵² Hassler MR, Shariat SF, Soria F. Salvage therapeutic strategies for bacillus Calmette-Guérin failure. *Curr Opin Urol.* 2019 May;29:239-46.

⁵³ Huguet J, Crego M, Sabaté S, Salvador J, Palou J, Villavicencio H. Cystectomy in patients with high-risk superficial bladder tumours who fail intravesical BCG therapy: pre-cystectomy prostate involvement as a prognostic factor. *Eur Urol.* 2005 Jul;48:53-9; discussion 59.

⁵⁴ Barocas DA, Globe DR, Colayco DC, Onyenwenyi A, Bruno AS, Bramley TJ, Spear RJ. Surveillance and treatment of non-muscle-invasive bladder cancer in the USA. *Adv Urol.* 2012; 2012:421709.

⁵⁵ Robert R. Rich, Thomas A. Fleisher, William T Shearer, MD PhD, Harry Schroeder, Anthony J Frew, MD Frcp, Cornelia M Weyand, MD PhD
Inmunología clínica: Principios y práctica.

Elsevier Health Sciences

⁵⁶ Laleh Sharifi, Mohammad Reza Nowroozi, Erfan Amini, Masoumeh Kourosh Arami, Mohsen Ayati, Monireh Mohsenzadegan. A review on the role of M2 macrophages in bladder cancer; pathophysiology and targeting. *International Immunopharmacology.* 2019;76:105880,

⁵⁷ Chow MT, Möller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2012; 22: 23- 32.

⁵⁸<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia>

⁵⁹ Coley W B., II Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Annals of surgery.* 1891; 14:199–220.

⁶⁰ Morales A, Eiding D, Bruce AW. Intracavitary bacillus Calmette–Guerin in the treatment of superficial bladder tumours. *J Urol.* 1976; 116:180–83.

⁶¹ Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol.* 2012; 23 : 6-9

⁶² Mellman I1, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature.* 2011 Dec 21; 480(7378):480-9.

-
- ⁶³ Chen DS, Mellman I. Oncology Meets Immunology: The cancer-Immunity Cycle. *Immunity*. 2013 Jul 25;39:1-10.
- ⁶⁴ Varghese A. Chemotherapy for Stage II Colon Cancer. *Clin Colon Rectal Surg*. 2015;28:256-61.
- ⁶⁵ Batty CJ, Tiet P, Bachelder EM, Ainslie KM. Drug Delivery for Cancer Immunotherapy and Vaccines. *Pharm Nanotechnol*. 2018; 6:232-44.
- ⁶⁶ <http://www.clinicaltrials.gov> Novel Therapeutic Approaches for Recurrent Non-Muscle Invasive Bladder Cancer
- ⁶⁷ Barok M, Joensuu H, Isola J. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res*. 2014; 16:209.
- ⁶⁸ <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia>
- ⁶⁹ Botrel TEA, Clark LGO, Paladini L, Clark OAC. Efficacy and safety of bevacizumab plus chemotherapy compared to chemotherapy alone in previously untreated advanced or metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2016; 16:677.
- ⁷⁰ Ramagopal UA, Liu W, Garrett-Thomson SC, Bonanno JB, Yan Q, Srinivasan M, Wong SC, Bell A, Mankikar S, Rangan VS, Deshpande S, Korman AJ, Almo SC. Structural basis for cancer immunotherapy by the first-in-class checkpoint inhibitor ipilimumab. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 May 23;114: E4223-E4232
- ⁷¹ Kim HS, Seo HK. Immune checkpoint inhibitors for urothelial carcinoma. *Investig Clin Urol*. 2018; 59:285-96.
- ⁷² Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*. 2016 May 7; 387(10031):1909-20.
- ⁷³ Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, Baron A, Necchi A, Bedke J, Plimack ER, Vaena D, Grimm MO, Bracarda S, Arranz JÁ, Pal S, Ohyama C, Saci A, Qu X, Lambert A, Krishnan S, Azrilevich A, Galsky MD. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (Checkmate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Mar; 18:312-22.
- ⁷⁴ Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee JL, Fong L, et al. KEYNOTE-045 Investigators. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*. 2017 Mar 16; 376:1015-26.

-
- ⁷⁵ Bajwa R, Cheema A, Khan T, Amirpour A, Paul A, Chaughtai S, et al. Adverse Effects of Immune Checkpoint Inhibitors (Programmed Death-1 Inhibitors and Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein-4 Inhibitors): Results of a Retrospective Study. *J Clin Med Res*. 2019 Apr; 11:225-36.
- ⁷⁶ Geller MA, Miller JS. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy. *Immunotherapy*. 2011; 3:1445-59.
- ⁷⁷ Ingersoll MA, Albert ML. From infection to immunotherapy: host immune responses to bacteria at the bladder mucosa. *Mucosal Immunol*. 2013 Nov; 6:1041-53.
- ⁷⁸ Smith SG, Zaharoff DA. Future directions in bladder cancer immunotherapy: towards adaptive immunity. *Immunotherapy*. 2016;8:351-65.
- ⁷⁹ Carretero R, Cabrera T, Gil H, Saenz-Lopez P, Maleno I, Aptsiauri N, Cozar JM, Garrido F. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of bladder cancer induces selection of human leukocyte antigen class I-deficient tumor cells. *Int J Cancer*. 2011 Aug 15; 129:839-46.
- ⁸⁰ Poza del Val M., Martínez-Rodríguez R. H., Amón Sesmero J. H. Inmunoterapia en Cáncer Vesical. Presente y Futuro. *Rev Mex Urol*. 2020;80:pp 1-19
- ⁸¹ Wang Y, Liu J, Yang X, Liu Y, Liu Y, Li Y, et al. Bacillus Calmette-Guérin and anti-PD-L1 combination therapy boosts immune response against bladder cancer. *Onco Targets Ther*. 2018 May 16; 11:2891-99.
- ⁸² Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J, Rouprêt M; European Association of Urology (EAU). EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. *Eur Urol*. 2011 Jun; 59:997-1008.
- ⁸³ Gontero P, Bohle A, Malmstrom PU, O'Donnell MA, Oderda M, Sylvester R, Witjes F. The role of bacillus Calmette-Guérin in the treatment of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur. Urol* 2010; 57:410–29.
- ⁸⁴ Lamm DL. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for bladder cancer. *J. Urol*. 1985; 134:40–47.
- ⁸⁵ Spitler LE. Malignant melanoma. *J Invest Dermatol*. 1976 Sep; 67:435-41.
- ⁸⁶ Herr HW, Pinsky CM, Whitmore WF, Jr, Sogani PG, Oettgen HF, Melamed MR. Experience with intravesical bacillus Calmette-Guèrin therapy of superficial bladder tumours. *Urology* 1985; 25:119–23.

-
- ⁸⁷ Herr HW, Pinsky CM, Whitmore WF Jr, Sogani PC, Oettgen HF, Melamed MR. Long-term effect of intravesical bacillus Calmette-Guerin on flat carcinoma in situ of the bladder. *J. Urol.* 1986; 135: 265–67.
- ⁸⁸ Herr HW, Laudone VP, Badalament RA, Oettgen HF, Sogani PC, Freedman BD, Melamed MR, Whitmore WF Jr. Bacillus Calmette-Guérin therapy alters the progression of superficial bladder cancer. *J. Clin. Oncol.* 1988; 6:1450–55.
- ⁸⁹ Pagano F, Bassi P, Milani C, Meneghini A, Maruzzi D, Garbeglio A. A low dose bacillus Calmette-Guerin regimen in superficial bladder cancer therapy: is it effective? *J. Urol.* 1991; 146:32–35.
- ⁹⁰ Lamm DL. Long-term results of intravesical therapy for superficial bladder cancer. *Urol. Clin. North Am.* 1992; 19:573–80.
- ⁹¹ Martínez-Piñeiro JA, Jiménez León J, Martínez-Piñeiro L, Jr, Fiter L, Mosteiro JA, Navarro J, García Matres MJ, Cárcamo P. Bacillus Calmette-Guerin versus doxorubicin versus thiotepa: a randomized prospective study in 202 patients with superficial bladder cancer. *J. Urol.* 1990; 143:502–06.
- ⁹² Palou J, Rodríguez-Villamil L, Andreu-Crespo A, Salvador-Bayarri J, Vicente-Rodríguez J. Intravesical treatment of severe bacillus Calmette-Guerin cystitis. *Int Urol Nephrol* 2001; 33:485–89
- ⁹³ Shelley MD, Court JB, Kynaston H, Wilt TJ, Coles B, Mason M. Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for Ta and T1 bladder cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003; CD003231.
- ⁹⁴ Mangiarotti B, Trinchieri A, Del Nero A, Montanari E. A randomized prospective study of intravesical prophylaxis in non-muscle invasive bladder cancer at intermediate risk of recurrence: mitomycin chemotherapy vs BCG immunotherapy. *Arch Ital Urol Androl.* 2008 Dec; 80:167-71.
- ⁹⁵ Ratliff TL. Bacillus Calmette-Guérin (BCG): mechanism of action in superficial bladder cancer. *Urology.* 1991;37(5 Suppl):8-11.
- ⁹⁶ Ratliff TL, Gillen D, Catalona WJ. Requirement of a thymus dependent immune response for BCG-mediated antitumor activity. *J Urol.* 1987 Jan;137:155-8.
- ⁹⁷ Ratliff TL, Ritchey JK, Yuan JJ, Andriole GL, Catalona WJ. T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer. *J Urol.* 1993 Sep;150:1018-23.

-
- ⁹⁸ Jackson AM, Alexandroff AB, Kelly RW, et al. Changes in urinary cytokines and soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in bladder cancer patients after bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy. *Clin Exp Immunol.* 1995; 99:369–75.
- ⁹⁹ Biot C, Rentsch CA, Gsponer JR, Birkhauser FD, Jusforgues-Saklani H, et al. Preexisting BCG-specific T cells improve intravesical immunotherapy for bladder cancer. *Sci Transl Med* 4. 2012.
- ¹⁰⁰ Palou-Redorta J, Solsona E, Angulo J, Fernández JM, Madero R, Unda M, et al. Retrospective study of various conservative treatment options with bacille Calmette-Guérin in bladder urothelial carcinoma T1G3: Maintenance therapy. *Actas Urol Esp.* 2016;40:370-7.
- ¹⁰¹ García Rodríguez J, Fernández Gómez JM, Escaf Barmadah S, González Álvarez RC, Jalón Monzón A, Martínez Gómez FJ, et al. Terapia endovesical: influencia sobre la recidiva en el cáncer vesical superficial. *Archiv Esp Urol*, 2007 feb; 60, 36-42.
- ¹⁰² Sánchez González Á, Rodríguez Faba O, Mosquera L, Sabiote L, Breda A, Palou Redorta J. BCG y cáncer de vejiga: pasado, presente y futuro. *Arch Esp Urol.* 2018 May;71:332-41.
- ¹⁰³ Lamm DL, Stogdill VD, Stogdill BJ, Crispin RG. Complications of bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in 1,278 patients with bladder cancer. *J. Urol.* 1986; 135:272-74.
- ¹⁰⁴ Lukacs S, Tschobotko B, Szabo N and Symes A. Systemic BCG-Osis as a Rare Side Effect of Intravesical BCG Treatment for Superficial Bladder Cancer. *Case Rep Urol* 2013:821526.
- ¹⁰⁵ Palou J, Rodríguez-Villamil L, Andreu-Crespo A, Salvador-Bayarri J, Vicente-Rodríguez J. Intravesical treatment of severe bacillus Calmette-Guérin cystitis. *Int Urol Nephrol.* 2001;33:485-9.
- ¹⁰⁶ Rodríguez F, Palou J, Martínez R, Rodríguez O, Rosales A, Huguet J, Villavicencio H. Esquema práctico del manejo de los efectos adversos asociados con la instilación de BCG. *Arch Esp Urol.* 2008 Jun;61:591-6.
- ¹⁰⁷ Rawls WH, Lamm DL, Lowe BA, Crawford ED, Sarosdy MF, Montie JE, Grossman HB, Scardino PT. Fatal sepsis following intravesical bacillus Calmette-Guérin administration for bladder cancer. *J. Urol.* 1990; 144:1328–30.

-
- ¹⁰⁸ To U, Kim J, Chia D. Disseminated BCG: Complications of Intravesical Bladder Cancer Treatment. *Case Rep Med*. 2014; 2014:362845.
- ¹⁰⁹ Del Castillo Duran Y, Bodí Santos F, Catander Serentill D; Jubert Montaperto F; Espinosa Valencia P y Rabassó Solé C. Tuberculosis miliar en paciente tratado con instilaciones intravesicales de bacilo de Calmette-Guérin. *Med Intensiva*. 2006;30:116-9.
- ¹¹⁰ Saint F, Salomon L, Quintela R, Cicco A, Hoznek A, Abbou CC, Chopin DK. Do prognostic parameters of remission versus relapse after Bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy exist? analysis of a quarter century of literature. *Eur Urol*. 2003 Apr;43:351-60; discussion 360-1.
- ¹¹¹ Zlotta AR, Noel JC, Fayt I, Drowart A, Van Vooren JP, Huygen K, Simon J, Schulman CC. Correlation and prognostic significance of p53, p21WAF1/CIP1 and Ki-67 expression in patients with superficial bladder tumors treated with bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy. *J Urol*. 1999 Mar;161:792-8.
- ¹¹² Saint F, Patard JJ, Maille P, Soyeux P, Hoznek A, Salomon L, et al. Prognostic value of a T helper 1 urinary cytokine response after intravesical bacillus Calmette-Guerin treatment for superficial bladder cancer. *J Urol* 2002;167:364-7.
- ¹¹³ Thalmann GN, Sermier A; Rentsch C; Möhrle K; Cecchini MG; Studer UE. Urinary Interleukin-8 and 18 predict the response of superficial bladder cancer to intravesical therapy with bacillus Calmette-Guerin. *J Urol*. 2000; 164:2129-33.
- ¹¹⁴ Ardelt P, Kneitz B, Adam P, Reiss C, Kocot A, Fensterle J et al. Reactive Antibodies Against Bacillus Calmette-Guerin Heat –Shock Protein-65 potentially predict the outcome of immunotherapy for high-grade Transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 2010, Feb 1;116:600-9.
- ¹¹⁵ Kamat AM, Briggman J, Urbauer DL, Svatek R, Noguerras Gonzalez GM, Anderson R et al. Cytokine panel for response to intravesical therapy (CyPRIT): nomogram of changes in urinary cytokine levels predicts patient response to bacillus Calmette Guerin. *Eur Urol* 2016; 69:197-200.
- ¹¹⁶ Zuiverloon T, Zwarthoff E. Predicting response to intravesical Bacillus calmette Gerin immunotherapy: Are we moving forward? *Eur Urol* 2016: 69:201-3.

-
- ¹¹⁷ Rentsch CA, Birkhauser FD, Biot C, Gsponer JR, Bisiaux A, Wetterauer C et al. Bacillus Calmette Guerin strain differences have an impact on clinical outcome in bladder cancer immunotherapy. *Eur Urol* 2014; 66:677-88.
- ¹¹⁸ Nunez-Nateras R, Erik P. Castle, Cheryl A. Protheroe,^b Melissa L. Stanton, Tolgay I. Ocal, Erin N. Ferrigni, et al. Predicting response to bacillus Calmette-Guérin (BCG) in patients with carcinoma in situ of the bladder. *Urol Oncol*. 2014 Jan; 32: 45.e23–45. e30.
- ¹¹⁹ Suriano F, Santini D, Perrone G, Amato M, Vincenzi B, Tonini G, et al. Tumor associated macrophages polarization dictates the efficacy of BCG instillation in non-muscle invasive urothelial bladder cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2013; 32:87.
- ¹²⁰ Racioppi M¹, Di Gianfrancesco L¹, Ragonese M¹, Palermo G¹, Sacco E¹ and Bassi PF¹. Can Neutrophil-to-Lymphocyte ratio predict the response to BCG in high-risk non muscle invasive bladder cancer? *Int Braz J Urol*. 2019 Mar-Apr;45:315-24.
- ¹²¹ Mbeutcha A¹, Shariat SF², Rieken M³, Rink M⁴, Xylinas E⁵, Seitz C⁶, et al. Prognostic significance of markers of systemic inflammatory response in patients with non-muscle-invasive bladder cancer. *Urol Oncol*. 2016 Nov;34: 483.e17-483.e24.
- ¹²² Barocas DA, Globe DR, Colayco DC, Onyenwenyi A, Bruno AS, Bramley TJ, Spear RJ. Surveillance and treatment of non-muscle-invasive bladder cancer in the USA. *Adv Urol*. 2012; 2012:421709.
- ¹²³ Leal J, Luengo-Fernandez R, Sullivan R, Witges A. Economic burden of bladder cancer across the european union. *Eur Urol*. 2016; 69:438-47.
- ¹²⁴ <http://www.cancer.gov/aboutnci/servingpeople/cancer-statistics/costofcancer>.
- ¹²⁵ Cogorno Wasylkowski L, Rios-Gonzalez E, Linares Espinos E, Leibar Tamayo A, Martinez Pineiro L. Indicación de cistectomía precoz en el cáncer vesical no músculo infiltrante. Revisión de la literatura. *Actas Urol Esp*. 2018; 42:17-24.
- ¹²⁶ Chen C, Qi XJ, Cao YW, Wang YH, Yang XC, Shao SX, Niu HT. Bladder Tumor Heterogeneity: The Impact on Clinical Treatment. *Urol Int*. 2015;95:1-8.

-
- ¹²⁷ Martínez-Rodríguez R. Can we base the indication of early cystectomy on more than clinical-pathological characteristics? *Actas Urol Esp.* 2018 Mar 7: S0210-4806(18)30024-X.
- ¹²⁸ Joseph M, Enting D. Immune Responses in Bladder Cancer-Role of Immune Cell Populations, Prognostic Factors and Therapeutic Implications. *Front Oncol.* 2019 Nov 20; 9:1270.
- ¹³⁰ Huang H-S, Su HY-L, Li P-H, Chiang P-H, Huang C-H, Chen C-H, Hsieh M-C. Prognosis impact of tumour infiltrating lymphocytes on patients with metastatic urothelial carcinoma receiving platinum based chemotherapy. *Sci Rep.* 2018; 8:7485.
- ¹³¹ Park CK, Kim SK. Clinicopathological significance of intratumoral and peritumoral lymphocytes and lymphocyte score based on the histologic subtypes of cutaneous melanoma. *Oncotarget* 2017; 8:14759-69.
- ¹³² Pichler R., Fritz J., Zavadil C., Schäfer G., Culig Z., Brunner A. Tumor-infiltrating immune cell subpopulations influence the oncologic outcome after intravesical Bacillus Calmette-Guérin therapy in bladder cancer. *Oncotarget.* 2016; 7: 39916-30.
- ¹³³ Nunez-Nateras R, Castle E, Protheroe C, Stanton M, Ocal T, Ferrigni E, et al. Predicting response to bacillus Calmette-Guérin (BCG) in patients with carcinoma in situ of the bladder, *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 2014;32,1: 45.e23-45. e30,
- ¹³⁴ Pichler, R., Gruenbacher, G., Culig, Z. et al. Intratumoral Th2 predisposition combines with an increased Th1 functional phenotype in clinical response to intravesical BCG in bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother* 66, 427–440 (2017).
- ¹³⁵ Mori T, Takada R, Watanabe R, Okamoto S, Ikeda Y. T-helper (Th)1/Th2 imbalance in patients with previously untreated B-cell diffuse large cell lymphoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2001 Dec;50:566-8.
- ¹³⁶ Pia Protti M, De Monte L. Immune infiltrates as predictive markers of survival in pancreatic cancer patients. *Front Physiol.* 2013.4:210.
- ¹³⁷ Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Brattacharya D, Murphy TL, Sha WC, Murphy KM. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4 independent mechanism. *Immunity* 1998; 9:745-55.

-
- ¹³⁸ Brett Burkholder, Ren-Yu Huang, Rob Burgess, Shuhong Luo, Valerie Sloane Jones, Wenji Zhang, Zhi-Qiang Lv, et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochim Biophys Acta* .2014;1845: 182-201.
- ¹³⁹ Pichler R, Gruenbacher G, Culig Z, Brunner A, Fuchs D, Fritz J, Gander H, Rahm A, Thurnher M. Intratumoral Th2 predisposition combines with an increased Th1 functional phenotype in clinical response to intravesical BCG in bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2017; 66:427–40.
- ¹⁴⁰ Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol*. 2000 Dec 1;165:6107-15.
- ¹⁴¹ Gajewski TF, Schell SR, Nau G, Fitch FW. Regulation of T-cell activation: differences among T-cell subsets. *Immunol Rev*. 1989 Oct; 111:79-110.
- ¹⁴² Koch M, Tucker-Heard G, Perdue N, Killebrew J, Urdahl K, Campbell D. T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type-1 inflammation. *Nat Immunol*. 2009;10 :595–602.
- ¹⁴³ Levine A, Medoza A, Hemmers S, Moltedo B, Niec RE, Schizas M, Hoyos BE, Putintseva EV, Chaudhry A, Dikiy S et al. Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. *Nature*. 2017;546(7658):421–25.
- ¹⁴⁴ Ray-Coquard I, Cropet C, Van Glabbeke M, Sebban C, Le Cesne A, Judson I, Tredan O, Verweij J, Biron P, Labidi I, et al. Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. *Cancer Res*. 2009; 69:5383–91.
- ¹⁴⁵ Buisan O, Orsola A, Areal J, Font A, Oliveira M, Martinez R, Ibarz L. Low pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts for good outcomes in patients receiving neoadjuvant chemotherapy before radical cystectomy for muscle invasive bladder cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2017; 15:145–151.e2.
- ¹⁴⁶ Buisan O, Orsola A, Oliveira M, Martinez R, Etxaniz O, Areal J, Ibarz L. Role of inflammation in the perioperative management of urothelial bladder cancer with squamous-cell features: impact of neutrophil-to-lymphocyte ratio on outcomes and response to neoadjuvant chemotherapy. *Clin Genitourin Cancer*. 2017;15: e697–e706.
- ¹⁴⁷ Vartolomei MD, Porav-Hodade D, Ferro M, Mathieu R, Abufaraj M, Foerster B, Kimura S, Shariat SF. Prognostic role of pretreatment neutrophil-to-

lymphocyte ratio (NLR) in patients with non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC): A systematic review and meta-analysis. *Urol Oncol.* 2018; S1078–1439(18)30166-2.

¹⁴⁸ Kang M, Jeong CW, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Preoperative neutrophil-lymphocyte ratio can significantly predict mortality outcomes in patients with non-muscle invasive bladder cancer undergoing transurethral resection of bladder tumor. *Oncotarget.* 2017; 8:12891–901.

¹⁴⁹ Di Gianfrancesco L, Racioppi M, Ragonese M, Palermo G, Sacco E, Pf B. Neutrophil-to-lymphocyte ratio: A new prognostic factor in high risk non muscle invasive bladder cancer treated with BCG? *Eur Urol Suppl.* 2018;17: e2078. Modena, Italy.

¹⁵⁰ Milne K, Alexander C, Webb JR, Sun W, Dillon K, Kalloger SE, Gilks CB, Clarke B, Köbel M, Nelson BH. Absolute lymphocyte count is associated with survival in ovarian cancer independent of tumor-infiltrating lymphocytes. *J Transl Med.* 2012; 10:33.

¹⁵¹ Inman BA, Sebo TJ, Frigola X, Dong H, Bergstralh EJ, Frank I, Fradet Y, Lacombe L, Kwon ED. PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granuloma: associations with localized stage progression. *Cancer.* 2007; 109:1499–1505.

¹⁵² Sangkhamanon S, Jongpairat P, Sookprasert A, Wirasorn K, Titapun A, Pugkhem A, Ungareevittaya P, Chindaprasirt J. Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) expression associated with a high neutrophil/lymphocyte ratio in cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017; 18:1671–74.

¹⁵³ Hodgson A, Slodkowska E, Jungbluth A, Liu SK, Vesprini D, Enepekides D, Higgins K, Katabi N, Xu B, Downes MR. PD-L1 immunohistochemistry assay concordance in urothelial carcinoma of the bladder and hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2018; 42:1059–1066.

¹⁵⁴ Böhle A, Brandau S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol.* 2003 Sep; 170:964-9.

¹⁵⁵ Zlotta A; Fleshner E and Jewett M. The management of BCG failure in non-muscle-invasive bladder cancer: an update. *CUAJ* • December 2009 • Volume 3, Issue 6(Suppl4)

¹⁵⁶ Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez-Piñeiro L, Gonzalez M et al. Predicting Nonmuscle invasive bladder cancer recurrence

and progression in patients treated with bacillus Calmette-Guerin: the CUETO scoring model. *J Urol*. 2009 Nov;182:2195-203.

¹⁵⁷ Kamat AM, Briggman J, Urbauer DL, Svatek R, Nogueras Gonzalez GM, Anderson R et al. Cytokine panel for response to intravesical therapy (CyPRIT): nomogram of changes in urinary cytokine levels predicts patient response to bacillus Calmette Guerin. *Eur Urol* 2016; 69:197-200.

¹⁵⁸ Martínez R, Tapia G, De Muga S, Hernández A, Cao MG, Teixidó C, et al. Combined assessment of peritumoral Th1/Th2 polarization and peripheral immunity as a new biomarker in the prediction of BCG response in patients with high-risk NMIBC. *Oncoimmunology*. 2019 Apr 13;8(8)

¹⁵⁹ Yuk HD, Ku JH. Role of Systemic Inflammatory Response Markers in Urothelial Carcinoma. *Front Oncol*. 2020; 10:1473.

¹⁶⁰ D'Andrea D, Moschini M, Gust K, Abufaraj M, Özsoy M, Mathieu R, et al. Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Primary Non-muscle-invasive Bladder Cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2017 Oct;15: e755-e764.

¹⁶¹ Vartolomei MD, Porav-Hodade D, Ferro M, Mathieu R, Abufaraj M, Foerster B, et al. Prognostic role of pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) in patients with non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC): A systematic review and meta-analysis. *Urol Oncol*. 2018 Sep;36:389-99.

¹⁶² Vartolomei MD, Ferro M, Cantiello F, Lucarelli G, Di Stasi S, Hurle R, et al. Validation of Neutrophil-to-lymphocyte Ratio in a Multi-institutional Cohort of Patients with T1G3 Non-muscle-invasive Bladder Cancer. *Clin Genitourinary Cancer*. 2018 Dec;16:445-52.

¹⁶³Yuk HD, Jeong CW, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Elevated Neutrophil to Lymphocyte Ratio Predicts Poor Prognosis in Non-muscle Invasive Bladder Cancer Patients: Initial Intravesical Bacillus Calmette-Guerin Treatment After Transurethral Resection of Bladder Tumour Setting. *Front Oncol*. 2019 Jan 17;8:642.

¹⁶⁴ Cantiello F, Russo GI, Vartolomei MD, Farhan ARA, Terracciano D, Musi G, et al. Systemic Inflammatory Markers and Oncologic Outcomes in Patients with High-risk Non-muscle-invasive Urothelial Bladder Cancer. *Eur Urol Oncol*. 2018 Oct;1:403-10.

¹⁶⁵ Song D, Powles T, Shi L, Zhang L, Ingersoll MA, Lu YJ. Bladder cancer, a unique model to understand cancer immunity and develop immunotherapy approaches. *J Pathol.* 2019 Oct;249:151-65.