



Curso de Pós-Graduação em Ciências da Fundação Antônio Prudente
Área de Oncologia – Mestrado Profissional

**Avaliação dos aspectos moleculares e sua relevância na resposta
terapêutica e prognóstico de pacientes com câncer de bexiga
submetidos a quimioterapia com cisplatina**

Tadeu José Fontenele Leite Campos

Trabalho aplicado apresentado ao Programa de Pós-Graduação de
Mestrado Profissional na área de Cuidados oncológicos centrados
no paciente da Fundação Antônio Prudente para obtenção do
título de mestre

Orientador: Israel Tojal da Silva

São Paulo

2023

Rua Professor Antônio Prudente, 211 • Liberdade • São Paulo / SP • CEP 01509-900

(11) 2189-5000 • www.accamargo.org.br

FICHA CATALOGRÁFICA

CAMPOS, TADEU.

Avaliação dos aspectos moleculares e sua relevância na resposta terapêutica e prognóstico de pacientes com câncer de bexiga submetidos a quimioterapia com cisplatina. / TADEU CAMPOS. São Paulo, 2023.

33f.

Trabalho aplicado (Mestrado Profissional) - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: ISRAEL TOJAL DA SILVA.

1. CÂNCER DE BEXIGA, 2. QUIMIOTERAPIA, 3. EXPRESSÃO GÊNICA

CDU 616

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Tadeu José Fontenele Leite Campos

Título: Avaliação dos aspectos moleculares e sua relevância na resposta terapêutica e prognóstico de pacientes com câncer de bexiga submetidos a quimioterapia com cisplatina

Aprovado em: 20 de Outubro de 2023

Banca examinadora

Orientador: Israel Tojal da Silva

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: José Augusto Rinck Júnior

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Wilson Araújo Silva Júnior

Instituição: Universidade de São Paulo

DEDICATÓRIA

Dedicado este trabalho, especialmente, a minha esposa, Mylena Pessoa Capistrano Campos, que, desde o começo, me incentivou e sempre me apoiou neste projeto profissional. Esteve sempre ao meu lado, me ajudando direta ou indiretamente para que tenhamos chegado a este momento de conclusão de mais um projeto nosso.

Também dedico à minha família, que foi fundamental para o início de toda minha formação acadêmica, me dando educação, princípios e meios para atingir meus objetivos. Agradeço também a todos que souberam compreender os momentos em que precisei me ausentar do convívio social para me dedicar a este trabalho. Por fim, agradeço ao empenho, disponibilidade e paciência do meu orientador neste projeto: Israel Tojal da Silva.

RESUMO

Campos, Tadeu José Fontenele Leite. **Avaliação dos aspectos moleculares e sua relevância na resposta terapêutica e prognóstico de pacientes com câncer de bexiga submetidos a quimioterapia com cisplatina** [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2023.

INTRODUÇÃO: O câncer de bexiga é a 10^a neoplasia maligna mais comum no mundo. O tipo músculo-invasivo tem como tratamento padrão-ouro combinações de quimioterapia e cirurgia. Muitos pacientes, no entanto, não respondem a quimioterapia e são submetidos a uma terapia ineficaz. Identificar quais pacientes não irão se beneficiar da terapia pode reduzir toxicidades e custos. A base de cisplatina, a quimioterapia no tumor de bexiga age através de dano ao DNA. Levantamos a hipótese que pacientes que respondem apresentam mutação ou baixa expressão de genes de reparo ao DNA. **OBJETIVO:** Comparar os aspectos moleculares entre 2 grupos de pacientes com tumor de bexiga submetidos a quimioterapia: um que respondeu adequadamente e outro que não respondeu. Identificar se os genes diferencialmente expressos ou mutados estão associados ao reparo do DNA e, conseqüentemente, com a resposta terapêutica. **MÉTODOS:** O estudo foi realizado através de análise de dados moleculares e clínicos de pacientes com tumor de bexiga músculo-invasivo submetidos a quimioterapia com cisplatina. Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a resposta a quimioterapia: Respondedores e Não respondedores. Realizamos comparação do perfil de expressão gênica, regulação epigenética e mutações entre grupos. Os genes diferencialmente expressos e/ou mutados foram avaliados se estão associados com as vias de reparo do DNA e, conseqüentemente, com a resposta as terapias sistêmicas. Por fim, realizamos análise de sobrevida a fim de avaliar correlação entre expressão dos genes identificados com a sobrevida global dos pacientes. **RESULTADOS:** A casuística foi composta por 63 pacientes. 41 apresentaram resposta a quimioterapia e 22 não responderam. Após análise de expressão gênica diferencial, identificamos expressão significativamente menor dos genes DDB1 e PRPF9, associados as vias de reparo do DNA, no grupo de pacientes respondedores. Na análise de sobrevida, identificamos que a alta expressão do gene DDB1 esteve significativamente associada a uma sobrevida global pior. Na comparação de padrão mutacional, identificamos uma taxa de mutação, significativamente maior, do gene CDK12, associado ao reparo do DNA, no grupo de pacientes respondedores. Esses padrões de expressão ou mutação identificados nestes 3 genes de reparo de dano ao DNA estiveram fortemente associados a uma resposta

satisfatória a quimioterapia. Dessa forma, são potenciais biomarcadores capazes de prever resposta a quimioterapia em câncer de bexiga. **CONCLUSÕES:** Identificamos potenciais biomarcadores associados com a resposta terapêutica e sobrevida após uso de cisplatina em pacientes com tumor de bexiga. Estes, após validações, potencialmente poderão ser agrupado em escores capazes de prever resposta a quimioterapia no câncer de bexiga e auxiliar na tomada de decisão, implicando em redução de toxicidades e custos.

Palavras-chave: Câncer da Bexiga; Quimioterapia; Expressão gênica; Imuno-Histoquímica.

ABSTRACT

Campos, Tadeu José Fontenele Leite. **Evaluation of molecular aspects and their relevance in therapeutic response and prognosis of patients with bladder cancer undergoing chemotherapy with cisplatin** [Dissertation]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2023.

INTRODUCTION: Bladder cancer is the 10th most common malignancy in world. The gold standard treatment for muscle-invasive type is combinations of chemotherapy and surgery. Many patients, however, do not respond to chemotherapy and are subjected to ineffective therapy. Identifying which patients will not benefit from therapy can reduce toxicities and costs. Cisplatin-based chemotherapy in bladder tumors acts through DNA damage. We hypothesize that patients who respond have mutation or low expression of DNA repair genes. **OBJECTIVE:** To compare the molecular aspects between 2 groups of patients with bladder tumors undergoing chemotherapy: one that responded adequately and other that did not respond. Identify whether differentially expressed or mutated genes are associated with DNA repair and, consequently, with therapeutic response. **METHODS:** The study was carried out through the analysis of molecular and clinical data from patients with muscle-invasive bladder tumors undergoing chemotherapy with cisplatin. Patients were divided into two groups according to their response to chemotherapy: Responders and Non-responders. We compared gene expression profile, epigenetic regulation and mutations between groups. Differentially expressed and/or mutated genes were assessed whether they are associated with DNA repair pathways and, consequently, with response to systemic therapies. Finally, we performed a survival analysis in order to evaluate the correlation between the expression of the identified genes and the overall survival of the patients. **RESULTS:** The sample consisted of 63 patients. 41 responded to chemotherapy and 22 did not respond. After differential gene expression analysis, we identified significantly lower expression of the DDB1 and PRPF9 genes, associated with DNA repair pathways, in Responders group. In survival analysis, we identified that high expression of the DDB1 gene was significantly associated with worse overall survival. When comparing the mutational pattern, we identified a significantly higher mutation rate in the CDK12 gene, associated with DNA repair, in Responders group. These expression or mutation patterns identified in these 3 DNA damage repair genes were strongly associated with a satisfactory response to chemotherapy. Therefore, they are potential biomarkers capable of predicting response to chemotherapy in bladder cancer. **CONCLUSIONS:** We identified

potential biomarkers associated with therapeutic response and survival after the use of cisplatin in patients with bladder tumors. These, after validation, could potentially be grouped into scores capable of predicting response to chemotherapy in bladder cancer and assisting in decision-making, resulting in a reduction in toxicities and costs.

Keywords: Bladder cancer; Chemotherapy; Gene expression; Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Divisão dos pacientes em grupos de acordo com a resposta a quimioterapia. (Página 21)

Figura 2 – Análise de enriquecimento funcional e vias enriquecidas a partir da análise de expressão diferencial. (Página 21)

Figura 3 – A: Genes mais comumente mutados no grupo de pacientes respondedores. B: Genes mais comumente mutados no grupo de pacientes não-respondedores. (Página 22)

Figura 4 – Análise comparativa das taxas de mutações dos genes entre os dois grupos de pacientes. (Página 23)

Figura 5 - Gráfico forestplot comparativo do número de mutações, de alguns genes, entre os grupos de pacientes respondedores e não-respondedores. (Página 23)

Figura 6 – Curva de Kaplan-Meier com associação entre sobrevida global e expressão do DDB1. (Página 24)

Figura 7 – Diagrama de Venn identificando grande interseção de genes relacionados com a resposta terapêutica a quimioterapia e com a sobrevida global dos pacientes. (Página 25)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos dos 63 pacientes da casuística deste estudo. (Página 20)

Tabela 2 - Análise comparativa da taxa de resposta a quimioterapia entre pacientes tabagistas e não-tabagistas. (Página 20)

LISTA DE ABREVIATURAS

CB Câncer de bexiga

CBMI Câncer de bexiga músculo-invasivo

NNT Número necessário para tratar

TCGA O Atlas de genoma do câncer (do inglês *The Cancer Genome Atlas*)

DEG Genes diferencialmente expressos (do inglês *Differentially Expressed Genes*)

RE Respondedores

NR Não Respondedores

GSEA Análise de enriquecimento de conjunto genético (do inglês *Gene Set Enrichment Analysis*)

RTU Ressecção transuretral

MVAC Metotrexato, vimblastina, doxorrubicina e cisplatina

GC Gencitabina e cisplatina

RECIST Critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos (do inglês *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivo específicos	15
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1	Casuística	16
3.2	Base de dados	16
3.3	Análise estatística	17
3.4	Análise de expressão gênica	17
4.	RESULTADOS	18
5.	DISCUSSÃO	25
6.	CONCLUSÃO	32
7.	REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

O câncer de bexiga (CB) é a décima neoplasia mais comum no mundo, com uma incidência aproximadamente quatro vezes maior nos homens, em decorrência, em parte, da maior exposição destes aos fatores de risco já bem definidos para essa patologia, tais como o tabagismo e as exposições ocupacionais às aminas aromáticas.^{1,2}

Essa neoplasia maligna pode ser subdividida em dois grandes grupos, com prognósticos e tratamentos bem distintos: tumor de bexiga não músculo-invasivo e tumor de bexiga músculo-invasivo. Este último representa, aproximadamente, 25% de todos os casos e determina a necessidade de tratamentos mais agressivos, normalmente, com combinações de cirurgia de grande porte e terapia sistêmica.³

O câncer de bexiga músculo-invasivo (CBMI) tem como tratamento cirúrgico padrão-ouro, atualmente, a cistectomia radical com linfadenectomia pélvica. Diversos estudos randomizados e revisões sistemáticas demonstraram benefício em sobrevivência da utilização de quimioterapia em adição à cirurgia para estes pacientes, podendo ser neoadjuvante ou adjuvante.^{4,5,6}

A quimioterapia neoadjuvante em tumor de bexiga músculo-invasivo apresenta diversas vantagens para o paciente, tais como: administração da terapia sistêmica mais precoce quando o volume de micrometástases é esperado que seja menor, maior tolerabilidade pelo paciente antes do trauma cirúrgico e redução do volume tumoral com consequente, maior chance de obtenção de margens cirúrgicas negativas.⁷

Os estudos em quimioterapia neoadjuvante para tratamento do tumor de bexiga músculo-invasivo demonstram benefício em termos de sobrevivência global, com ganho absoluto de sobrevivência em 5 anos de 8% (45-53%), correspondendo a um número necessário para tratar (NNT) de 12,5. Atualmente, o uso de quimioterapia neoadjuvante no tumor de bexiga músculo-invasivo é uma recomendação forte para pacientes elegíveis à terapia com combinações de cisplatina, sendo o tratamento padrão-ouro.⁸

A quimioterapia adjuvante também é considerada, segundo os guidelines da sociedade europeia de urologia, recomendação forte para pacientes com tumores de bexiga com massas de crescimento extravesical ou disseminação locorregional, ou seja, estadiamentos T3, T4 ou N+. As principais vantagens da quimioterapia neste cenário são a realização da cirurgia mais

precocemente, sem atrasos e a utilização da terapia sistêmica apenas após um estadiamento patológico acurado.⁸

Tendo em vista a natureza agressiva do CBMI, em muitos casos, ocorre recidiva e/ou progressão de doença após o tratamento primário. Para estes casos, em geral, há indicação de uso de quimioterapia com objetivo de retardar a progressão da doença e aumentar a sobrevida dos pacientes. Considerada paliativa, a quimioterapia neste cenário também deve, preferencialmente, ser realizada a base de cisplatina.^{7,9}

O grande obstáculo relacionado ao uso da quimioterapia nos pacientes com tumor de bexiga é que não há ainda métodos confiáveis e reprodutíveis para prever quais pacientes não irão se beneficiar da terapia e, conseqüentemente, quais deveriam ser submetidos apenas a cirurgia de cistectomia radical.

Identificar o paciente que provavelmente não irá se beneficiar da quimioterapia é de grande valia, tendo em vistas que isto implica diretamente em redução de custos, além de otimização do tratamento do paciente, não expondo-os a toxicidade desnecessária da quimioterapia.

A quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante no tratamento do tumor de bexiga músculo-invasivo deve ser administrado através de combinações de quimioterápicos a base de cisplatina. A cisplatina, da classe das platinas, é considerada uma droga anticâncer citotóxica. Consiste em um agente destruidor do DNA, que age, em parte, pela formação de adutos do DNA que estão associados tanto com a eficácia terapêutica da droga como aos seus efeitos colaterais.^{9,10}

Alguns tumores de bexiga não respondem de forma satisfatória a quimioterapia a base de cisplatina, possivelmente por mecanismos de resistência inerentes ao próprio tumor. Esses mecanismos se devem a alterações específicas, tais como alterações genéticas que aumentam a capacidade de reparo do DNA, aumentando o reparo das lesões do DNA induzidas pela cisplatina.¹¹

Os recentes avanços das técnicas de sequenciamento genético e dos estudos que visam ampliar os conhecimentos acerca dos aspectos moleculares das células tumorais têm possibilitado identificar e avaliar alterações genéticas específicas que podem estar diretamente relacionadas a maior ou menor resistência dos tumores aos tratamentos sistêmicos com quimioterápicos, terapias alvo ou imunoterápicos. Por exemplo, dois estudos seminais do consórcio Atlas de genoma do câncer (TCGA, do inglês The Cancer Genome Atlas) realizaram uma ampla caracterização molecular do câncer de bexiga invasivo muscular de 412 pacientes. Nesse estudo, foram detectados genes frequentemente mutados envolvidos no ciclo celular, regulação da cromatina e em vias de sinalização reguladas pelas quinases, além de ampliar os

grupos Luminal e Basal em 5 subgrupos considerando o perfil de expressão gênica e que estavam associados a sobrevida. Por outro lado, a avaliação da resposta a tratamentos sistêmicos permanece ainda a ser explorada.^{12, 13}

Nesse sentido, identificar, previamente, as alterações genéticas para posterior avaliação via imuno-histoquímica, que estão relacionadas com a resistência à cisplatina, tem potencial impacto na prática clínica para seleção dos pacientes que irão ou não se beneficiar de quimioterapia.

Dessa forma, objetivamos comparar o perfil de expressão gênica e de mutações entre um grupo de pacientes com tumor de bexiga submetidos a quimioterapia que demonstrou resposta e um grupo de pacientes que não respondeu a terapia. Em seguida, avaliaremos, se os genes diferencialmente expressos e/ou mutados estão relacionados ao mecanismo de reparo do DNA e, conseqüentemente, com a resposta e sensibilidade à quimioterapia.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Investigar a apresentação dos aspectos moleculares no momento da biópsia através de ressecção transuretral de tumores de bexiga e sua associação com a resposta a quimioterapia.

2.2 Específicos:

- Elaborar uma revisão integrativa sobre os fatores moleculares preditores de resposta à quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante para tratamento do tumor de bexiga músculo invasivo;
- Montar uma base de dados com informações clínicas, moleculares e de tratamento a partir de estudos conduzidos por consórcios, especificamente o **TCGA**;
- Estratificar dois grupos de pacientes de acordo com a resposta a quimioterapia;
- Comparar o perfil de expressão gênica e o padrão mutacional entre os dois grupos;
- Identificar, neste estudo, quais fatores moleculares do tumor podem estar relacionados com a resposta à quimioterapia e com a sobrevida global dos pacientes
- Discutir os resultados obtidos e as potenciais aplicações e implicações destes na prática clínica e tomada de decisão em pacientes com tumor de bexiga.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

3.1.1 Critérios de inclusão

Pacientes com tumor de bexiga músculo-invasivo submetidos a quimioterapia neoadjuvante, adjuvante ou paliativa a base de cisplatina, que tenham disponíveis o laudo histopatológico da ressecção transuretral, avaliação de resposta a quimioterapia e dados de sobrevida.

3.1.2 Critérios de exclusão

- Pacientes com tumor de bexiga não músculo-invasivo;
- Pacientes sem laudo histopatológico disponível da ressecção transuretral;
- Pacientes sem critérios de avaliação de resposta a quimioterapia;
- Pacientes que não completaram todos os ciclos de cisplatinas propostos;
- Pacientes que foram submetidos a qualquer terapia sistêmica diferente dos esquemas padrões a base de cisplatina.

3.2 Base de Dados

O estudo foi realizado de forma retrospectiva com base em análise de dados histopatológicos das ressecções transuretrais de tumor de bexiga disponíveis nas bases de dados pública, de acesso livre, do TCGA. Foram incluídos os pacientes com tumor de bexiga músculo-invasivo que foram submetidos a quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante apenas a base de cisplatina e que se enquadraram nos critérios de inclusão e exclusão supracitados.¹²

Inicialmente, os pacientes foram divididos em dois grupos: os que responderam a quimioterapia e os que não responderam. A avaliação desta resposta foi realizada por comparação de estadiamento local inicial do tumor ao diagnóstico com o estadiamento local da peça cirúrgica após a cistectomia radical ou através de comparação de exames de imagem antes

e após a quimioterapia. Esse dado consta na coorte de pacientes com tumor de bexiga músculo-invasivo do banco de dados do **TCGA**.

3.3 Análise Estatística

As médias das variáveis quantitativas foram comparadas pelos testes não-paramétricos *Mann Whitney*, ou *t test*. O estimador Kaplan-Meier foi utilizado para análise de sobrevida, em conjunto com o teste *Log-Rank* para comparação entre as curvas. As linguagens de programação R e Python foram utilizadas durante as análises quantitativas, cálculos estatísticos e outros tipos de análise que utilizam grande quantidade de dados.

3.4 Análise de expressão gênica

Os níveis de expressão gênica (RNA-Seq) foram utilizados para detectar os genes diferencialmente expressos (DEG, do inglês Differentially Expressed Genes) entre os grupos, contendo as amostras classificadas como respondedores (**RE**) e os não respondedores (**NR**). Essa etapa foi realizada por meio do pacote **DESeq2** (Lve et al., 2014). Ao final, somente genes com *FoldChange* > 1 e *p-value* ajustado < 0.05 foram considerados diferencialmente expressos. Em seguida, com a lista de genes diferencialmente expressos, foi realizada uma análise de enriquecimento de conjunto genético (**GSEA**, do inglês *Gene Set Enrichment Analysis*) a fim de identificar classes de genes que estão super-representadas em um grande conjunto de genes ou proteínas e podem ter uma associação com fenótipos de doença.^{14, 15}

4. RESULTADOS

Na base de dados do **TCGA** consta uma coorte de 412 pacientes com tumor urotelial de bexiga músculo-invasivo, de alto grau. Destes pacientes, 120 (cento e vinte) foram submetidos a algum tipo de terapia sistêmica, incluindo esquemas diversos de quimioterapia e imunoterapia, neoadjuvante ou adjuvante.

A partir desta coorte, aplicamos os critérios de inclusão e exclusão definidos para nosso estudo. Dessa forma, e baseado nos que ainda são considerados os tratamentos padrão-ouro atualmente em CBMI, selecionamos apenas os pacientes que foram submetidos a quimioterapia a base de cisplatina.⁸

Dos pacientes excluídos deste estudo, temos três pacientes que foram submetidos a imunoterapia e que vinte e nove que foram submetidos a quimioterapia, porém sem uso de cisplatina e, em sua maioria, usando esquemas alternativos a base de carboplatina. Outros pacientes também foram excluídos pelos seguintes motivos: ausência de dados sobre a terapia utilizada, ausência de anátomo-patológico disponível da ressecção transuretral (**RTU**) de bexiga e ausência de dados para avaliação da resposta terapêutica a quimioterapia.

Dessa forma, ao final da aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, chegamos a uma casuística composta por 63 (sessenta e três) pacientes com tumor de bexiga músculo-invasivo que foram submetidos a quimioterapia, neoadjuvante, adjuvante ou paliativa, a base de cisplatina. Destes, doze pacientes foram submetidos a quimioterapia no cenário neoadjuvante e cinquenta e um no cenário adjuvante por doença residual após a cirurgia ou cenário paliativo em caso de recidiva de doença após o tratamento primário cirúrgico.

Inicialmente, realizamos uma análise demográfica dos pacientes selecionados em nosso estudo, a fim de de conhecermos o perfil destes pacientes e compararmos futuramente com pacientes da nossa realidade local.

A idade média dos pacientes no momento do diagnóstico foi de 63,04 anos, variando de 45 a 79 anos. A grande maioria dos pacientes são da raça branca (60) e apenas três (03) negros, correspondendo a 4,76% do total. Nesta amostra, vinte e um pacientes (21) são do sexo feminino, correspondendo a 33,3% do total, e quarenta e dois (42) são do sexo masculino.

O tabagismo, principal fator de risco para o desenvolvimento do tumor de bexiga, foi identificado em quarenta e seis (46) pacientes, correspondendo a 73% do total de pacientes. Em dez pacientes, foi identificada exposição ocupacional a agentes como diesel e produtos de

industriais têxteis, o que corresponde ao segundo fator de risco mais comum no câncer de bexiga. Os dados acerca do perfil demográfico dos pacientes da nossa casuística estão sumarizados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Dados demográficos dos 63 pacientes da casuística deste estudo.

	Média	Variação
IDADE (anos)	63,0	45-79
	Masculino	Feminino
SEXO (n (%))	42 (66,6%)	21 (33,3%)
	Branco	Negro
RAÇA (n (%))	60 (95%)	3 (5%)
	Tabagismo	Exposição
FATOR DE RISCO (n (%))	46 (73%)	10 (16%)

Fonte: Autoria própria.

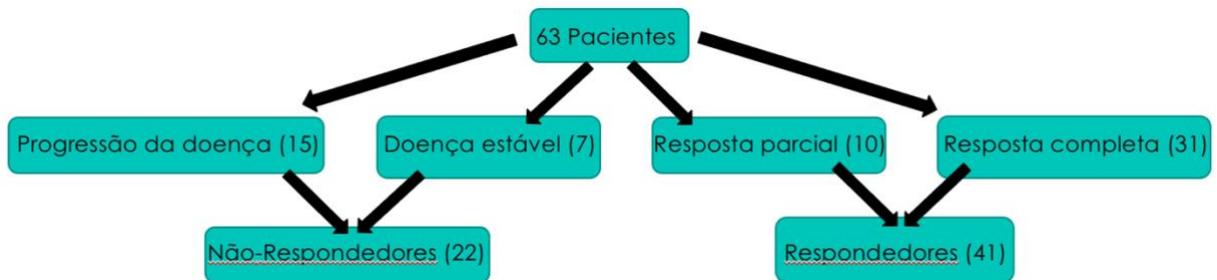
Tabela 2 – Análise comparativa da taxa de resposta a quimioterapia entre pacientes tabagistas e não-tabagistas.

	Respondedores	Não-respondedores
NÃO-TABAGISTA (17)	14 (82%)	3 (18%)
TABAGISTA (46)	27 (58%)	19 (42%)

Fonte: Autoria própria.

O próximo passo foi a divisão dos pacientes, de acordo com a resposta terapêutica a quimioterapia, em dois grupos: os que obtiveram resposta a e os que não tiveram resposta. Quinze pacientes apresentaram progressão da doença na vigência da quimioterapia e sete pacientes apresentaram doença estável, contabilizando vinte e dois pacientes como não-respondedores. Trinta e um pacientes apresentaram resposta completa a quimioterapia e dez pacientes apresentaram resposta parcial, totalizando quarenta e um pacientes como respondedores. (Figura 1)

Interessante notar que no grupo de pacientes tabagistas, a porcentagem de pacientes que respondeu a quimioterapia foi de 58%, em contraste com uma taxa de 82% nos pacientes não tabagistas, sugerindo que o tabagismo pode estar associado a uma pior resposta a quimioterapia no tumor de bexiga.

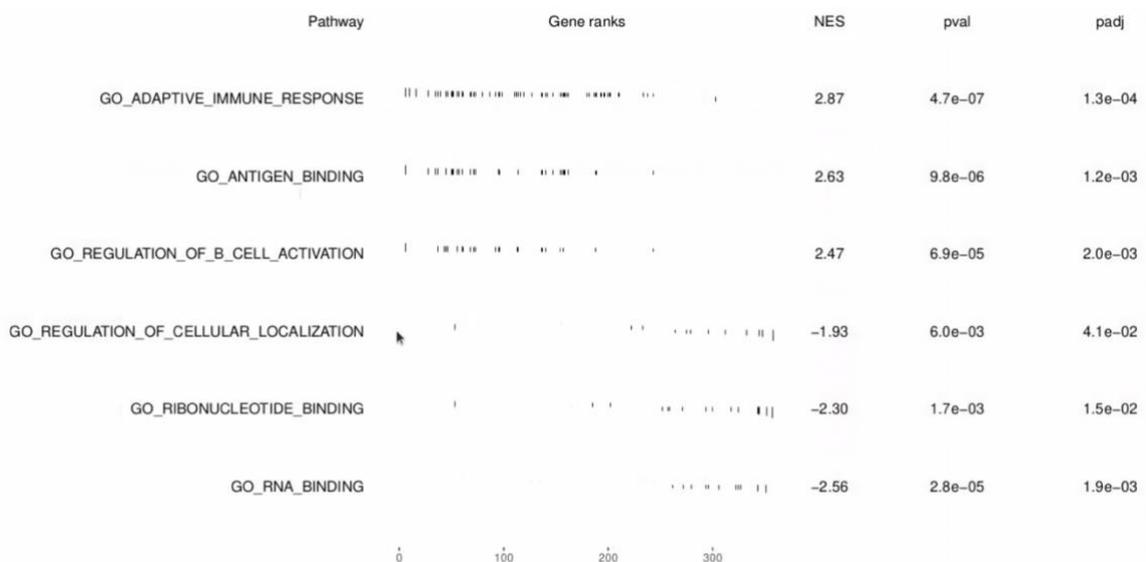


Fonte: Autoria própria.

Figura 1 – Divisão dos pacientes em grupos de acordo com a resposta a quimioterapia.

Em seguida, realizamos análise de expressão gênica diferencial entre os grupos de pacientes respondedores e não-respondedores. Foram, então, identificados 363 genes com expressão diferencial estatisticamente significativa entre os dois grupos.

Os genes diferencialmente expressos foram submetidos à análise de enriquecimento funcional através do *Gene Ontology*. Essa análise destacou que pacientes respondedores apresentam alta expressão de genes que se encontram associados a ativação de resposta imune. Especificamente, entre os genes de alta expressão diferencial no grupo de pacientes não-respondedores, identificamos, entre os mais relevantes, alguns associados as vias de reparo do DNA incluindo a via de reparo de excisão de base e de ribonucleotídeos, como os genes DDB1 (*p-value* 0,018) e PRPF19 (*p-value* 0,03). (Figura 2)

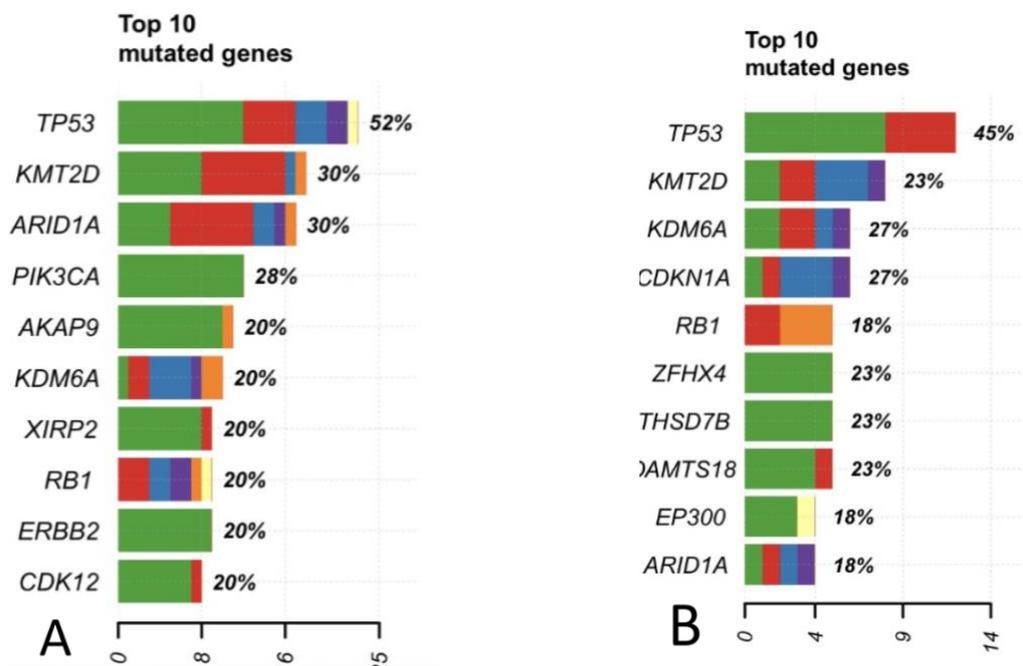


Fonte: Autoria própria.

Figura 2 – Análise de enriquecimento funcional e vias enriquecidas a partir da análise de expressão diferencial.

Em um segundo momento, estendemos a caracterização molecular por meio da avaliação do padrão mutacional nos dois grupos de pacientes. Nessa análise, buscamos detectar os genes mais frequentemente mutados em cada grupo. Adicionalmente, foram avaliados os tipos de mutações mais comuns em cada grupo e as interações somáticas. Nesta análise, identificamos o gene TP53 como o com maior número de mutações tanto nos pacientes respondedores (53%) como nos não-respondedores (48%). Não identificamos, portanto, uma diferença significativa na taxa de mutação deste gene entre os dois grupos de pacientes.

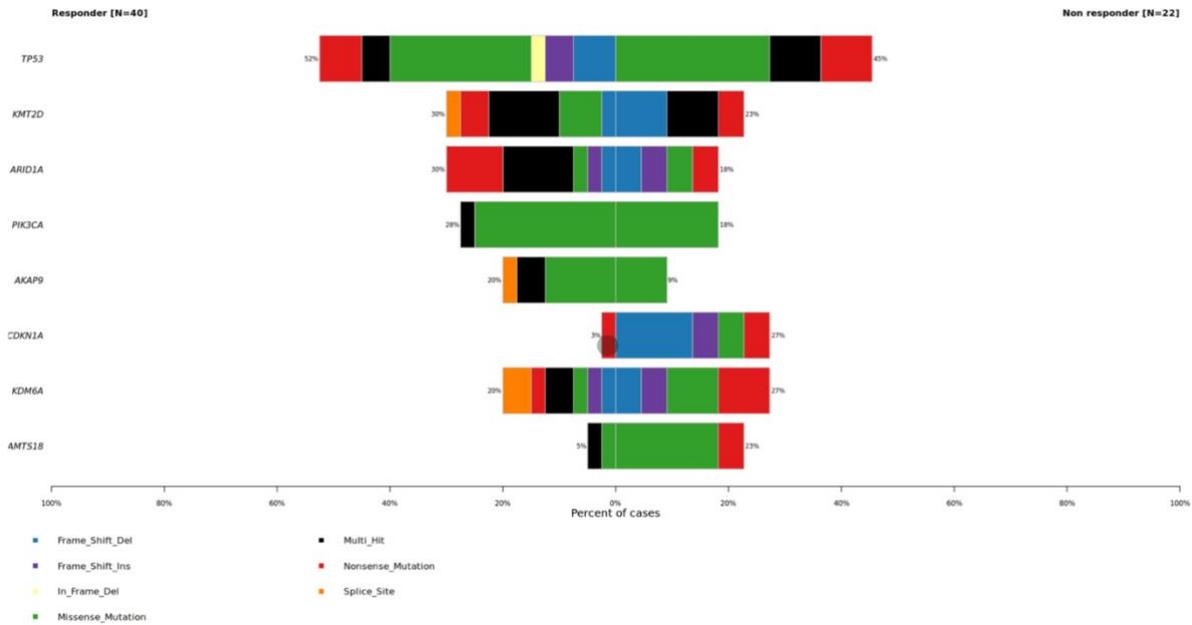
No grupo dos respondedores, os genes mais comumente mutados, em ordem decrescente, foram: TP53, KMT2D, ARID1A, PIK3CA e AKAP9. (Figura 3A) Nos pacientes não-respondedores, os genes mais comumente mutados, em ordem decrescente, foram: TP53, KMT2D, KDM6A, CDKN1A e RB1. (Figura 3B)



Fonte: Autoria própria.

Figura 3 – (A): Genes mais comumente mutados no grupo de pacientes respondedores. (B): Genes mais comumente mutados no grupo de pacientes não-respondedores.

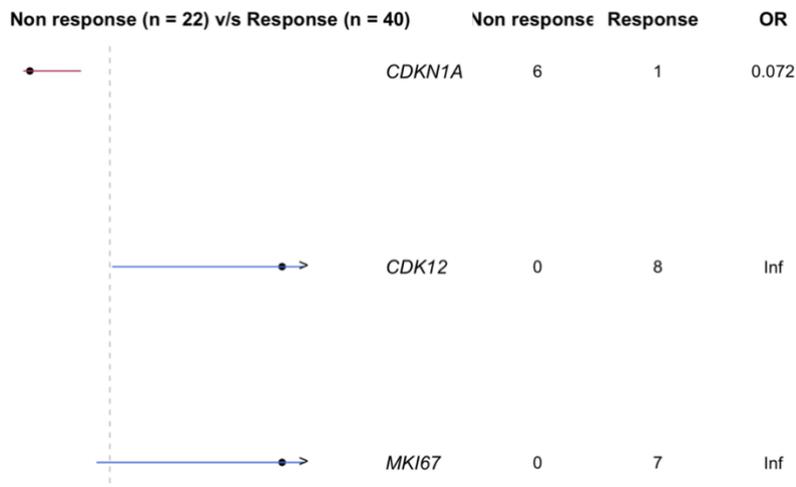
Podemos identificar dois genes significativamente mais mutados no grupo de pacientes não-respondedores: o CDKN1A e AMTS18. Já o gene AKAP9 e o CDK12 estão significativamente mais mutados nos pacientes respondedores. (Figura 4)



Fonte: autoria própria.

Figura 4 – Análise comparativa das taxas de mutações dos genes entre os dois grupos de pacientes.

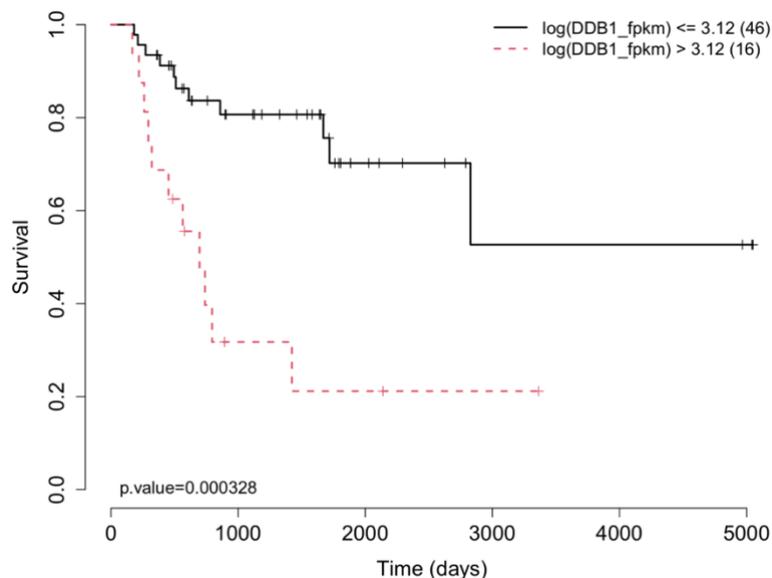
O gene CDK12 foi identificado como mutado em 20% dos pacientes respondedores, correspondendo a 8 (oito) casos. Em contrapartida, no grupo de pacientes não-respondedor, não identificamos nenhuma mutação neste gene, conforme ilustrado no gráfico forestplot abaixo. (Figura 5)



Fonte: Autoria própria.

Figura 5 – Gráfico forestplot comparativo do número de mutações de alguns genes, entre os grupos de pacientes respondedores e não-respondedores.

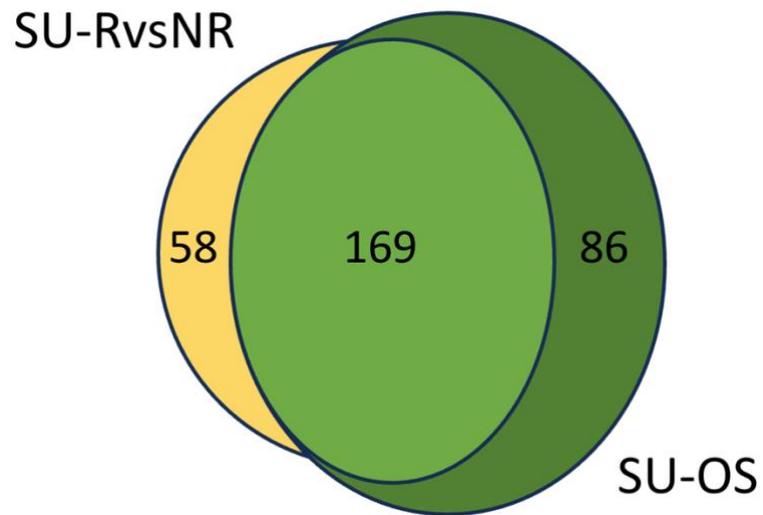
Adicionalmente, após análise da relação da expressão gênica diferencial e do padrão mutacional com a resposta terapêutica a quimioterapia, avaliamos a correlação entre a expressão diferencial de genes do reparo do DNA e a sobrevida dos pacientes. Nesta análise, identificamos que há associação forte entre os sobrevida global dos pacientes e o padrão de expressão do gene DDB1. Especificamente, pacientes que apresentam alta expressão do gene DDB1 no tumor demonstraram uma sobrevida significativamente menor. (Figura 6)



Fonte: Autoria própria.

Figura 6 – Curva de Kaplan-Meier com associação entre sobrevida global e expressão do gene DDB1.

Uma análise adicional incluindo todos os genes diferencialmente expressos, identificou dois conjuntos distintos de genes: um associado a resposta a quimioterapia e outro associado com a sobrevida global dos pacientes. Esta análise mostrou uma grande interseção de genes entre os dois conjuntos, sugerindo que grande parte dos genes que estão associados a resposta terapêutica a quimioterapia, também estão relacionados com a sobrevida global dos pacientes. (Figura 7)



Fonte: Autoria própria.

Figura 7 – Diagrama de Venn identificando grande interseção de genes relacionados com a resposta terapêutica a quimioterapia e com a sobrevida global dos pacientes.

5. DISCUSSÃO

O CBMI, responsável por aproximadamente 25% de todos os tumores de bexiga, é considerado uma doença potencialmente agressiva e, comumente, de prognóstico ruim. A cirurgia de cistectomia radical isoladamente, além de bastante agressiva, está associada a uma sobrevida global baixa, de apenas, aproximadamente, 50% em 5 anos.³

Dessa forma, estudos foram conduzidos com intuito de avaliar o papel de terapias multimodais na melhoria da sobrevida destes pacientes, como a adição de quimioterapia à cirurgia. Esses estudos demonstraram benefício em sobrevida com o uso de quimioterapia a base de cisplatina nos cenários neoadjuvante e adjuvante.^{7,8}

A despeito dos recentes avanços no diagnóstico e tratamento do CBMI, esta doença permanece com considerável taxa de diagnóstico em estadios avançados e sem possibilidade terapêutica curativa. Além disto, em decorrência da agressividade da doença, muitos pacientes tratados com proposta curativa, apresentam recidivas incuráveis. Para estes dois tipos de pacientes, há indicação e benefício do uso de quimioterapia paliativa.³

A quimioterapia neoadjuvante, realizada antes da cirurgia, deve ser administrada sempre a base de cisplatina em combinação com outros quimioterápicos, normalmente, em 4 ou 6 ciclos. Tem indicação em pacientes com estadiamento local de T2 a T4a e não metastáticos. Apresenta as vantagens de administração da terapia sistêmica mais precoce quando o volume de micrometástases é esperado que seja menor, maior tolerabilidade pelo paciente antes do trauma cirúrgico e redução do volume tumoral, com maior chance de obtenção de margens cirúrgicas negativas.⁷

Os estudos em quimioterapia neoadjuvante para tratamento do tumor de bexiga músculo-invasivo demonstram benefício em sobrevida global, com ganho absoluto de sobrevida em 5 anos na ordem de 8% (45-53%), correspondendo a um NNT de 12,5. Dessa forma, a cada cem pacientes submetidos a quimioterapia neoadjuvante, oito pacientes a mais, em comparação com pacientes submetidos apenas a cirurgia, atingem uma sobrevida de 5 anos. Atualmente, o uso de quimioterapia neoadjuvante no tumor de bexiga músculo-invasivo é uma recomendação forte para pacientes elegíveis à cisplatina, sendo o tratamento padrão-ouro.⁸

A quimioterapia adjuvante deve ser administrada após a cirurgia e indicada para pacientes que não foram submetidos a terapia neoadjuvante e que demonstraram estadiamento patológico T3 ou T4 e/ou N+. Também deve ser administrada sempre a base de cisplatina. As

principais vantagens da quimioterapia neste cenário são a realização da cirurgia mais precocemente, sem atrasos decorrentes da neoadjuvância, e a utilização da terapia sistêmica apenas após um estadiamento patológico acurado.⁸

Apesar de apresentar menor nível de evidência que a quimioterapia neoadjuvante, em virtude do menor número de estudos randomizados, a quimioterapia adjuvante também é considerada recomendação forte segundo os guidelines das principais sociedades de urologia, como o da sociedade europeia de urologia. Uma coorte retrospectiva, incluindo 3974 pacientes, demonstrou ganho de sobrevida global do uso da quimioterapia adjuvante em pacientes com doença localmente avançada e/ou acometimento linfonodal. Da mesma forma, uma grande análise retrospectiva a partir do *National Cancer Data Base*, incluindo 15397 pacientes, demonstrou benefício de sobrevida global para pacientes com doença T3, T4 e/ou N+.^{16,17}

A natureza agressiva do CBMI pode ser corroborada pelas altas taxas de recidiva de doença após o tratamento primário com intenção curativa. Neste cenário, para pacientes com recidiva ou progressão de doença, locorregional ou a distância, há indicação de uso de quimioterapia paliativa com objetivo de retardar a progressão da doença e aumentar a sobrevida do paciente. A quimioterapia neste cenário também deve, preferencialmente, ser realizada a base de cisplatina.⁹

O tratamento dos tumores de bexiga incuráveis mudou pouco nas últimas duas décadas. Após os estudos que evidenciaram ganho de sobrevida global a estes pacientes com o uso da quimioterapia a base de platina, este tornou-se o tratamento padrão-ouro neste cenário e assim persiste até hoje. Mais recentemente, foram conduzidos estudos avaliando o papel da imunoterapia neste cenário, porém estas drogas estão aprovadas, atualmente, apenas para as últimas linhas de tratamento. Dessa forma, a quimioterapia a base de cisplatina persiste como o tratamento padrão-ouro em pacientes com tumores incuráveis e/ou recidivados.⁹

O uso da cisplatina apresenta algumas contraindicações, são elas: insuficiência renal com clearance de creatinina menor que 50 ml/min, performance status maior que 2, insuficiência cardíaca congestiva classe III ou IV da New York Heart Association, perda auditiva moderada e neuropatia periférica grau 2 ou superior.¹⁸

A recomendação atual dos guidelines é que todos os pacientes que apresentam estadiamento que indique o uso de quimioterapia e que não possuem contraindicação a cisplatina, devem ser submetidos a terapia sistêmica. Não há, portanto, até o momento, nenhuma indicação para uso de biomarcadores ou outros métodos para avaliação prévia de resposta a quimioterapia. Dessa forma, muitos pacientes são submetidos a quimioterapia, porém

não apresentam resposta satisfatória e sofrem as consequências da toxicidade de um tratamento ineficaz.⁹

Atualmente, então, as terapias neoadjuvante, adjuvante e paliativa padrão-ouro no tratamento do tumor de bexiga músculo-invasivo são administradas a partir de combinações de quimioterápicos a base de cisplatina. Esta é considerada uma droga anticâncer citotóxica que consiste em um agente destruidor do DNA, agindo, em parte, pela formação de adutos do DNA.
10

As combinações de quimioterápicos utilizados em câncer de bexiga, devem, segundo os guidelines, ser administradas conforme um dos seguintes esquemas: metotrexato, vimblastina, doxorubicina e cisplatina (MVAC) ou gencitabina e cisplatina (GC). Até recentemente, os dois esquemas eram considerados equivalentes em termos de eficácia, não havendo orientação para uso de um em detrimento do outro.

Pfister et al.¹⁹, no estudo VESPER, comparou os dois esquemas e objetivou avaliar qual deve ser considerado o padrão-ouro. Este estudo randomizou 500 pacientes para uso de 6 ciclos de MVAC dose-densa ou 4 ciclos de GC e identificou uma considerável maior sobrevida livre de progressão em 3 anos em favor do grupo MVAC no cenário neoadjuvante. No cenário adjuvante, o estudo não atingiu o desfecho primário, possivelmente, pelo pequeno número de pacientes do estudo neste cenário. Dessa forma, devemos, para uma análise futura, levar em consideração a diferente taxa de uso do esquema MVAC no cenário neoadjuvante entre os grupos de pacientes respondedores e não respondedores, pelo risco de ser um potencial fator confundidor na identificação de biomarcadores de resposta a quimioterapia.¹⁹

Conforme sugerido anteriormente e embasado pela literatura, muitos pacientes submetidos a quimioterapia a base de cisplatina para tratamento do tumor de bexiga não respondem satisfatoriamente. Na análise desta coorte, podemos ver que 35% dos pacientes apresentaram progressão ou estabilidade da doença durante a administração da quimioterapia, configurando pacientes não-respondedores. Nossos achados, portanto, corrobora a necessidade de identificarmos potenciais biomarcadores que possam prever a resposta a quimioterapia nos pacientes com câncer de bexiga.⁸

A identificação de biomarcadores que possam prever a resposta terapêutica a quimioterapia é de grande interesse. Estes podem identificar, previamente, quais pacientes provavelmente não responderão a terapia. Dessa forma, podem auxiliar na tomada de decisão, implicando diretamente em redução de custos e de toxicidades de uma terapia sistêmica ineficaz.

Teo et al.²⁰ avaliou a correlação entre alterações em genes de reparo de dano do DNA e sobrevida de pacientes com tumor de bexiga avançado submetidos a tratamento com quimioterapia exclusiva à base de cisplatina. Este estudo demonstrou que o grupo de pacientes com mutação nos genes de reparo do DNA apresentaram melhor sobrevida global e livre de progressão de doença. A grande limitação deste e de outros estudos semelhantes, segundo o próprio autor, é que a avaliação de sobrevida pode sofrer influência de outros fatores como o próprio prognóstico da biologia tumoral e, conseqüentemente, não retratar diretamente o efeito a resposta terapêutica a quimioterapia. O autor conclui, neste artigo, que mais estudos são necessários para avaliar a relação direta entre genes de reparo do DNA e resposta a quimioterapia.²⁰

Tran et al.²¹ produziu uma revisão sobre os avanços recentes na biologia do tumor de bexiga e seus tratamentos. Nesta, o autor mostra a importância do sequenciamento genético e da caracterização molecular dos tumores para estratificação prognóstica e predição de resposta a terapias sistêmicas. Destacam os comportamentos bastante distintos dos diferentes tipos de tumor no que diz respeito a resposta a quimioterapia e outras terapias sistêmicas. Ao final da revisão, os autores citam, como um dos objetivos futuros, o desenvolvimento de biomarcadores que possam prever resposta a quimioterapia no tratamento do tumor de bexiga.²¹

Em nosso estudo, após análise de expressão gênica diferencial e de enriquecimento funcional, identificamos que no grupo de pacientes não-respondedores, as vias biológicas mais comumente associadas aos genes de maior expressão estão relacionadas as vias de reparo de dano do DNA, com destaque para as vias relacionadas ao reparo de excisão de base e de ribonucleotídeos. Em destaque, temos os genes DDB1 e PRPF19.

O gene DDB1 codifica a grande subunidade da proteína de ligação ao dano do DNA. Este gene, por sua vez, encontra-se associado a uma via específica de reparo de dano do DNA, conhecida como via de reparo de excisão de nucleotídeos. Considerando que a cisplatina age causando danos ao DNA, podemos esperar que alterações em genes associados as vias de reparo do DNA devem interferir na resposta do tumor à quimioterapia. Não obstante, nossos resultados reforçam achados anteriores. Por exemplo, Somuncu et al.²² demonstraram e corroboraram que a capacidade de reparo de excisão de base, um dos mecanismos de reparo do DNA, encontra-se aumentada nos tumores de bexiga e está diretamente associada ao prognóstico e, possivelmente, à resposta as terapias citotóxicas. O autor sugere que novos estudos são necessários para avaliar o papel da capacidade total de reparo de excisão de base como um possível biomarcador em prever resposta a terapias sistêmicas no tumor de bexiga.²²

O gene PRPF19 codifica uma proteína, o fator de processamento de pré-mRNM 19, que tem funções na recombinação e no reparo do DNA. De acordo com a nossa hipótese, a hiperexpressão deste gene deve estar associado com resistência a quimioterapia, fato corroborado em nosso estudo onde identificamos este gene significativamente mais expresso no grupo de pacientes não respondedores. Um estudo realizado em tumores de língua, por He et al.²³, demonstrou que a hiperexpressão deste gene esteve associada a um pior prognóstico deste tumor e com uma maior resistência a quimioterapia e radioterapia.²³

Na avaliação comparativa do padrão mutacional entre os dois grupos de pacientes do nosso estudo, detectamos os genes mais frequentemente mutados em cada grupo. Nesta análise, podemos identificar que o gene TP53 esteve fortemente mutado, de forma similar, nos dois grupos de pacientes. Identificamos também dois genes significativamente mais mutados no grupo de pacientes não-respondedores: o CDKN1A e AMTS18. Já os genes AKAP9 e CDK12 estiveram significativamente mais mutados nos pacientes respondedores.

O gene TP53 é considerado um gene supressor tumoral que age codificando a proteína p53 a qual se liga especificamente ao DNA, sendo responsável pelo reparo deste quando sofre algum dano. Muitos tumores demonstram altas taxas de mutação neste gene. Alguns estudos sugerem que a presença de mutação deste gene pode ter correlação com o prognóstico do câncer em questão, como no caso do tumor de estômago. Em nosso estudo, o grupo de pacientes respondedores demonstrou uma taxa maior de mutação no gene TP53, o que seria esperado pelas nossas hipóteses, visto que se trata de um gene de reparo do DNA. Porém, a taxa de mutação no grupo de pacientes não respondedores também foi alta e sem diferença significativa com o outro grupo (53% x 48%).²⁴

O gene CDK12 apresentou-se mutado em 8 (oito) dos pacientes do grupo de respondedores, correspondendo a 20% do total de pacientes deste grupo. Em contrapartida, nenhum dos pacientes do grupo de não-respondedores apresentou mutação neste gene. Dessa forma, chama a atenção esta diferença bastante significativa na taxa de mutação deste gene ao compararmos os dois grupos de pacientes.

Localizado no braço longo do cromossomo 17, o gene CDK12 está diretamente envolvido nos processos de replicação, recombinação e reparo do DNA, especialmente relacionado com a resposta ao dano do DNA. Estudos recentes sugerem que tumores que apresentam mutação ou baixa expressão deste gene possuem maior potencial de agressividade. Por outro lado, estes tumores tendem a apresentar maior sensibilidade e melhor resposta a terapias sistêmicas que agem através do dano ao DNA, como no caso da quimioterapia a base de cisplatina. Dessa forma, temos que o achado do nosso estudo, no qual identificamos uma

expressiva taxa de mutação deste gene no grupo de pacientes que responderam a quimioterapia a base de cisplatina, está de acordo com nossa hipótese inicial e é corroborado por outros estudos em outros tipos de tumores. Sendo assim, temos aqui mais um potencial biomarcador de prognóstico e de resposta a quimioterapia a base de cisplatina.²⁵

O gene CDKN1A foi identificado como significativamente mais mutado no grupo de pacientes não respondedores em comparação aos respondedores (27% x 3%). Este gene codifica a proteína p21 que possui uma função inibitória da proliferação celular, sendo supressora tumoral. Dessa forma, este gene tem função de reparo de danos ao DNA. De forma inicial, a mutação deste gene, segundo nossa hipótese inicial, deveria estar associada a uma maior resposta a quimioterapia, porém identificamos um resultado, a princípio, contraditório. No entanto, há um estudo publicado por Sikder et al.²⁶ que identificou que diferentes tipos de mutações do CDKN1A estão associadas a perfis diferentes de sensibilidade a quimioterapia, com um tipo específico estando associada a resistência a quimioterapia, como em nossa análise. Uma avaliação mais profunda deste tópico em nosso estudo necessita ser realizada para avaliarmos esta possível associação identificada no estudo citado acima.²⁶

Até o momento, não identificamos correlação funcional entre as alterações que identificamos nos genes AKAP9 e AMTS18 com a resposta a terapia sistêmica citotóxica, no caso, a quimioterapia.

Adicionalmente, avaliamos a correlação entre expressão de genes de reparo do dano do DNA e sobrevida dos pacientes. Nesta análise, identificamos que pacientes com hiperexpressão do gene DDB1 apresentaram curva de sobrevida significativamente inferior aos demais pacientes. Esse resultado, a princípio, é compatível com o fato de que esses pacientes obtiveram melhor resposta a quimioterapia e apresentam uma tendência a evoluir melhor, com melhor prognóstico e sobrevida.

A sobrevida global destes pacientes, no entanto, pode sofrer influências de diversos outros fatores, além da resposta terapêutica a quimioterapia, como os relacionados com a própria biologia tumoral. Desta forma, a melhor sobrevida identificada nos pacientes com hiperexpressão do gene DDB1 pode não retratar diretamente a resposta as terapias sistêmicas. Faz-se, então, necessária uma análise mais profunda e multivariada, considerando variáveis clínicas e moleculares com possível impacto no prognóstico dos pacientes. O objetivo é identificar o real impacto da resposta terapêutica a quimioterapia, e da expressão genica do DDB1, na sobrevida dos pacientes.

Ainda em relação a avaliação prognóstica e de sobrevida, uma análise adicional, incluindo todos os genes diferencialmente expressos, identificou dois grupos de genes: um

associado com a resposta terapêutica a quimioterapia e outro relacionado com a sobrevida global dos pacientes. Como podemos ver na Figura 7, houve uma grande interseção entre os genes, ou seja, um grande número de genes (169) está presente nos dois grupos, sendo este um resultado de potencial interesse. Esse dado sugere, fortemente, assim como o resultado da análise de sobrevida isolada do gene DDB1, que os genes (e seus diferentes perfis de expressão e mutação) relacionados com a resposta a quimioterapia, em grande parte, também tem relação direta com a sobrevida global dos pacientes.

Coletivamente, identificamos aqui potenciais biomarcadores que podem estar associados com a resposta terapêutica a quimioterapia e com a sobrevida de pacientes portadores de tumor de bexiga músculo-invasivo. Apesar de a maioria dos pacientes desta coorte terem sido submetidos a quimioterapia adjuvante, os esquemas quimioterápicos utilizados são os mesmos do cenário neoadjuvante. Dessa forma, tais biomarcadores também devem estar associados a resposta a quimioterapia neoadjuvante. Pretendemos, futuramente, validar a eficácia destes biomarcadores em prever resposta a quimioterapia em outras coortes, incluindo alguma com pacientes submetidos exclusivamente a quimioterapia neoadjuvante.

Por fim, tais biomarcadores poderão ser avaliados, através de análise de imunohistoquímica, no material proveniente da RTU da bexiga (biópsia). A partir desta análise direcionada, poderemos identificar quais pacientes poderão se beneficiar mais ou menos do uso da quimioterapia, auxiliando na tomada de decisão quanto ao uso ou não desta terapia sistêmica em alguns pacientes e, possivelmente, implicando em redução de custos aos sistemas de saúde e de toxicidades aos pacientes.

Devemos destacar que, apesar de a quimioterapia ainda ser a terapia sistêmica padrão-ouro em todos os cenários de tratamento do câncer de bexiga músculo invasivo, a imunoterapia vem ganhando destaque nos últimos anos. Diversos estudos vêm demonstrando que a imunoterapia, nos cenários de neoadjuvância, adjuvância e de doença paliativa, apresenta benefícios em termos de ganho de sobrevida com toxicidade reduzida. Como exemplo, o estudo CheckMate 274, randomizado e fase III, identificou importante benefício, em comparação ao placebo, do uso do inibidor de PD-1 (Nivolumabe) no cenário adjuvante do CBMI em pacientes com alto risco de recidiva.²⁷

Dessa forma, os resultados dos estudos em imunoterapia no CBMI são promissores e existe uma expectativa que, após estudos mais robustos e de longo prazo, a imunoterapia venha a suplantará a quimioterapia e tornar-se padrão-ouro. Porém, ainda deve demandar tempo para que isto aconteça e a quimioterapia vai permanecer sendo padrão-ouro e largamente utilizada por considerável período. Em consequência disto, é muito importante que continuemos

dispensando esforços em otimizar as indicações do uso da quimioterapia no câncer de bexiga.

Nosso estudo apresenta algumas limitações que serão discutidas a seguir. Primeiramente, devemos levar em consideração a natureza retrospectiva do estudo e os vieses inerentes a este tipo de análise. Segundo, neste estudo, incluímos pacientes que foram submetidos a quimioterapia neoadjuvante, adjuvante e paliativa. Apesar de os esquemas de quimioterapia utilizados serem os mesmos, a base de cisplatina, a análise global pode ficar mais heterogênea. Terceiro, visto que nosso objetivo primordial foi identificar biomarcadores de resposta a quimioterapia, incluímos, no grupo de pacientes respondedores, pacientes com resposta completa e também com resposta parcial a quimioterapia. Porém, devemos destacar que apenas os pacientes com resposta completa realmente apresentam ganho de sobrevida global. Dessa forma, devemos, em um segundo momento, realizar validação desses biomarcadores em grupos de pacientes respondedores que incluam apenas pacientes com resposta completa para, também, identificar o potencial dos biomarcadores em prever sobrevida destes pacientes.

Por fim, ainda sobre as limitações do nosso estudo, temos que as avaliações de resposta a quimioterapia, assim como em outros estudos semelhantes, podem não ter sido totalmente precisas, tanto nos casos de avaliação por exames de imagem como nos casos de avaliação por resposta patológica. A avaliação através de comparação de exames de imagem pode sofrer interferências da própria imprecisão dos exames e da variação de interpretação entre avaliadores. Esta última, porém, é minimizada por protocolos e guidelines de avaliação de resposta oncológica de tumores sólidos, como o Critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos (**RECIST**, do inglês *Response Evaluation Criteria in Solid Tumor*).²⁸

A avaliação por resposta patológica também pode ser imprecisa. Esta pode não retratar diretamente a resposta a quimioterapia, visto que o *downstaging* identificado no anátomo-patológico da peça cirúrgica final da cistectomia radical, pode decorrer, em parte, da redução tumoral decorrente da ressecção transuretral inicial e, conseqüentemente, não ser uma ação exclusiva da quimioterapia. Apesar de bastante incomum, os casos de ausência de tumor na peça da cistectomia radical em pacientes que não foram submetidos a quimioterapia, corroboram o fato de que a RTU de bexiga pode, em parte, contribuir para o *downstaging*. (29

A despeito destas limitações inerentes a este tipo de estudo, identificamos e apresentamos resultados que corroboraram nossa hipótese inicial e que são compatíveis com alguns outros estudos semelhantes em outros tipos de tumores e alguns em tumor de bexiga, porém com metodologias distintas do nosso. Apesar de resultados animadores e condizentes

com a com as teorias hipotetizadas para este cenário, precisamos validar nossos resultados em outras coortes para, finalmente, chegarmos a uma conclusão definitiva.

6. CONCLUSÃO

O câncer de bexiga músculo-invasivo é uma patologia, em geral, agressiva e que demandada tratamentos multimodais, com combinações de cirurgia e terapias sistêmicas, para atingir uma sobrevida aceitável. Apesar do ganho de sobrevida proveniente da quimioterapia, muitos pacientes não respondem e não se beneficiam da terapia sistêmica. Este tem sido um dos maiores empecilhos no manejo destes pacientes e tivemos poucos avanços concretos neste sentido.^{3, 4, 20}

Neste estudo, a partir de uma coorte de pacientes com tumor de bexiga músculo-invasivo submetidos a cirurgia e quimioterapia a base de cisplatina, identificamos potenciais biomarcadores que podem prever a resposta a quimioterapia. Tais biomarcadores apresentam potencial para serem utilizados a fim de identificar pacientes que possuem maior ou menor chance de responder a esta quimioterapia e, conseqüentemente, auxiliar na tomada de decisão quanto a instituição da terapia sistêmica, podendo implicar em redução de custos e toxicidades.

Dando seqüência a este estudo, pretendemos validar a eficácia destes biomarcadores em prever resposta a quimioterapia em outras coortes, incluindo alguma com pacientes submetidos exclusivamente a quimioterapia neoadjuvante. Devemos também realizar um levantamento de pacientes do Hospital AC Camargo que preencham os nossos critérios e, posteriormente, realizar, nestes pacientes, avaliação imuno-histoquímica dos genes identificados nesta nossa análise, com o objetivo de realizar mais uma validação dos resultados deste estudo.

Após validação dos nossos resultados, pretendemos produzir um escore a partir dos genes selecionados e confirmados como preditores de resposta a quimioterapia identificados. O objetivo é desenvolvermos um escore onde serão alocados, em um algoritmo, os genes selecionados, a fim de estratificar os pacientes quanto a sensibilidade a quimioterapia, auxiliando na tomada de decisão quanto a indicação desta terapia.

7. REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer* 2021 Apr;149(4):778-789.
2. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P. et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 2013 Feb;63(2):234-241.
3. Bosetti C, Bertuccio P, Chatenoud L, Negri E, La Vecchia C, Levi F. et al. Trends in mortality from urologic cancers in Europe, 1970-2008. *Eur Urol* 2011 Jul;60(1):1-15.
4. 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 Aug;349(9):859-866.
5. Sherif A, Holmberg L, Rintala E, Mestad O, Nilsson J, Nilsson S. et al. Neoadjuvant cisplatinum based combination chemotherapy in patients with invasive bladder cancer: a combined analysis of two Nordic studies. *Eur Urol* 2004 Mar; 45(3):297-303.
6. Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis collaboration. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: update of a systematic review and meta-analysis of individual patient data advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration. *Eur Urol* 2005 Aug;48(2):202-205.
7. Guzzo TJ, Christodouleas JP, Vaughn DJ. Management of muscle-invasive and metastatic bladder cancer. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Partin AW, Peters CA. *Campbell-Walsh Urology*. 11 th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2016. P 3112-3119.
8. Yin M, Joshi M, Meier RP, Glantz M, Holder S, Harvey HA. et al. Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Two-Step Meta-Analysis. *Oncologist* 2016 Jun;21(6):708-715.
9. Witjes JA, Rink M, Van Der Heijden AG, Bruins HM, Carrion A, Cathomas R. et al. Guidelines on Muscle-invasive and metastatic bladder cancer. In: *EAU Guidelines published at the 38th Annual Congress Milan 2023*. European Association of Urology Guidelines Office, Arnhem, the Netherlands.
10. Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. The next generation of platinum drugs: targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery, and Pt(IV) prodrugs. *Chem Rev* 2016 Mar;116(5):3436–3486.

11. Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 2008 Mar;14(5):1291–1295.
12. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD. et al. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell* 2017 Oct;171(3):540-556.
13. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 2014 Mar;507(7492):315-322.
14. Lve MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014 Dec;15(12):550.
15. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Oct;102(43):15545-15550.
16. Svatek RS, Shariat SF, Lasky RE, Skinner EC, Novara G, Lerner SP. et al. The effectiveness of off-protocol adjuvant chemotherapy for patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2010 Sep;16(17):4461-4467.
17. Berg S, D'Andrea D, Vetterlein MW, Cole AP, Fletcher SA, Krimphove MJ. et al. Impact of adjuvant chemotherapy in patients with adverse features and variant histology at radical cystectomy for muscle-invasive carcinoma of the bladder: Does histologic subtype matter? *Cancer* 2019 May;125(9):1449-1458.
18. Gold JM, Raja A. Cisplatin. [Updated 2023 May 22]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. Disponible em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547695/> [2023 21 Ago]
19. Pfister C, Gravis G, Fléchon A, Chevreau C, Mahammedi H, Laguerre B. et al. Dose-Dense Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin or Gemcitabine and Cisplatin as Perioperative Chemotherapy for Patients With Nonmetastatic Muscle-Invasive Bladder Cancer: Results of the GETUG-AFU V05 VESPER Trial. *J Clin Oncol* 2022 Jun;20(18):2013-2022.
20. Teo MY, Bambury RM, Zabor EC, Jordan E, Al-Ahmadie H, Boyd ME. et al. DNA Damage Response and Repair Gene Alterations Are Associated with Improved Survival in Patients with Platinum-Treated Advanced Urothelial Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2017 Jul;23(14):3610-3618.
21. Tran L, Xiao JF, Agarwal N, Duex JE, Theodorescu D. Advances in bladder cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* 2021 Feb;21(2):104-121.

22. Somuncu B, Keskin S, Antmen FM, Saglican Y, Ekmekcioglu A, Ertuzun T. et al. Non-muscle invasive bladder cancer tissues have increased base excision repair capacity. *Sci Rep* 2020 Oct;10(1):16371.
23. He Y, Huang C, Cai K, Liu P, Chen X, Xu YI. et al. PRPF19 promotes tongue cancer growth and chemoradiotherapy resistance. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2021 Jul;53(7):893-902.
24. Deng W, Hao Q, Vadgama J, Wu Y. Wild-Type TP53 Predicts Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer. *J Cancer Sci Clin Ther* 2021 Mar;5(1):134-153.
25. Lui GYL, Grandori C, Kemp CJ. CDK12: an emerging therapeutic target for cancer. *J Clin Pathol* 2018 Nov;71(11):957-962.
26. Sikder RK, Ellithi M, Uzzo RN, Weader DJ, Metz AL, Behbahani A. et al. Differential Effects of Clinically Relevant N- versus C-Terminal Truncating CDKN1A Mutations on Cisplatin Sensitivity in Bladder Cancer. *Mol Cancer Res* 2021 Mar;19(3):403-413.
27. Bajorin DF, Witjes JA, Gschwend JE, Schenker M, Valderrama BP, Tomita Y. et al. Adjuvant Nivolumab versus Placebo in Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med* 2021 Jun;384(22):2102-2114.
28. Schwartz LH, Litière S, de Vries E, Ford R, Gwyther S, Mandrekar S. et al. RECIST 1.1-Update and clarification: From the RECIST committee. *Eur J Cancer* 2016 Jul;62:132-137.
29. Herr HW. Transurethral resection of muscle-invasive bladder cancer: 10-year outcome. *J Clin Oncol* 2001 Jan;19(1):89-93.