

**DIOGO ASSED BASTOS**

**Biomarcadores genômicos e mecanismos de benefício de  
imunoterapia intravesical com Bacilo Calmette-Guérin (BCG) em  
pacientes portadores de carcinoma urotelial não músculo invasivo  
da bexiga**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Anamaria Aranha Camargo

**São Paulo**

**2020**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bastos, Diogo Assed

Biomarcadores genômicos e mecanismos de benefício de imunoterapia intravesical com Bacilo Calmette-Guérin (BCG) em pacientes portadores de carcinoma urotelial não-músculo invasivo da bexiga / Diogo Assed Bastos. -- São Paulo, 2020.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientadora: Anamaria Aranha Camargo.

Descritores: 1.Neoplasias urológicas 2.Bexiga urinária 3.Mycobacterium bovis 4.Imunoterapia 5.Mutação 6.Biomarcadores tumorais

USP/FM/DBD-165/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

**Nome:** BASTOS, Diogo Assed

**Título:** Biomarcadores genômicos e mecanismos de benefício de imunoterapia intravesical com Bacilo Calmette-Guérin (BCG) em pacientes portadores de carcinoma urotelial não músculo invasivo da bexiga.

**Aprovado em:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família e amigos, em especial à minha esposa Bruna Marchetti e aos meus pais Ricardo Bastos e Maria Helena Assed Bastos, por sua compreensão com a dedicação necessária na carreira médica e apoio nas decisões e momentos difíceis.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização e conclusão deste projeto, em especial à Dra. Anamaria Camargo, que além de grande pesquisadora, sempre esteve presente me orientando e guiando nesta jornada.

À todos os pesquisadores do Laboratório de Oncologia Molecular do Hospital Sírio-Libanês, onde foram realizadas as análises moleculares e discussões a respeito dos resultados deste estudo.

Ao Serviço de Urologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, em nome do Prof. Dr. William Carlos Nahas, pela parceria a colaboração mútua em diversos projetos de pesquisa, incluindo este estudo.

Ao Serviço de Patologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, em especial ao Dr Rômulo Mattedi, patologista que prestou grande auxílio na preparação do material biológico e análises anatomopatológicas que permitiram a realização deste trabalho.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, pelo suporte financeiro que permitiu a realização deste estudo.

## NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3. ed. rev. ampl. mod. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2016.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

# SUMÁRIO

Lista de abreviatura e siglas .....	vii
Lista de figuras .....	viii
Lista de quadros e tabelas.....	x
Resumo .....	xi
Abstract.....	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
1.1 Estadiamento, Histologia e Estratificação de Risco.....	3
1.2 Tratamento com BCG Intravesical .....	5
1.3 Biomarcadores de Resposta à Imunoterapia.....	7
1.4 Racional para o Estudo.....	11
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivo Primário.....	13
2.2 Objetivos Secundário .....	13
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1 População do Estudo .....	15
3.1.1 Critérios de Inclusão .....	16
3.1.2 Critérios de Exclusão .....	16
3.2 Definições .....	17
3.3 Coleta De Dados.....	18
3.4 Análises Genômicas .....	19
3.4.1 Análise mutacional, carga mutacional e genes de reparo de DNA.....	21
3.4.2 Tipagem HLA e Predição de Neoantígenos .....	22
3.5 Análise Estatística.....	23
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
4.1 Análise Mutacional .....	27
4.2 Carga Mutacional Tumoral (TMB) E Benefício ao Tratamento com BCG ..	31

4.3	Carga de Neoantígenos (NAL) e Benefício ao Tratamento com BCG.....	40
4.4	Mutações em Genes de Reparo de DNA (DDR) e Benefício ao Tratamento com BCG.....	43
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>71</b>

Tabelas suplementares S1 a S4. Devido ao tamanho das tabelas não foi possível incluí-las de forma descritiva neste documento.

As tabelas originais com todos os dados estão disponíveis no sítio de internet: <https://content.iospress.com/articles/bladder-cancer/blc200289>.

**Tabela S1.** Informações de cobertura do sequenciamento, mutações identificadas e de neoantígenos dos pacientes com carcinoma urotelial não músculo invasivo de bexiga.

**Tabela S2.** Lista dos genes modificadores de cromatina identificados.

**Tabela S3.** Lista dos neoantígenos identificados.

**Tabela S4.** Lista das mutações somáticas deletérias identificadas em genes de reparo de DNA



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ATM</b>	Gene ataxia telangiectasia mutado
<b>BCG</b>	Bacillus Calmette-Guérin
<b>BCG-NR</b>	Não responsivo ao BCG
<b>BCG-R</b>	Responsivo ao BCG
<b>BRCA</b>	Breast cancer susceptibility gene
<b>CD</b>	Grupamento de diferenciação (do inglês, <i>cluster differentiation</i> )
<b>CHEK2</b>	Gene checkpoint kinase 2
<b>CNMIB</b>	Carcinoma urotelial não músculo invasivo da bexiga
<b>CTLA-4</b>	Antígeno citotóxico de linfócito T (do inglês, <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i> )
<b>DDR</b>	Reparo de dano ao DNA
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>FGFR</b>	Receptor do fator de crescimento de fibroblastos
<b>IL</b>	Interleucina
<b>MLH1</b>	Gene de reparo do DNA MutL homolog 1
<b>MSH2</b>	Gene de reparo do DNA MutS homolog 2
<b>MSH6</b>	Gene de reparo do DNA MutS homolog 6
<b>NAL</b>	Carga de neoantígenos
<b>PD-1</b>	Receptor de morte celular programada (do inglês, <i>programmed death receptor 1</i> )
<b>RTUb</b>	Ressecção transuretral de tumor de bexiga
<b>SLR</b>	Sobrevida livre de recorrência
<b>Ta</b>	Tumor não invasivo
<b>Tis</b>	Tumor <i>in situ</i>
<b>TMB</b>	Carga mutacional tumoral (do inglês <i>tumor mutational burden</i> )
<b>TNF</b>	Fator de necrose tecidual (do inglês, <i>tumor necrosis factor</i> )
<b>TP53</b>	Proteína tumoral p53 (do inglês, <i>tumor protein p53</i> )
<b>TR</b>	Taxa de resposta
<b>TRAIL</b>	Ligante indutor de apoptose relacionado a TNF (do inglês, <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> )
<b>WES</b>	Sequenciamento do exoma total (do inglês, <i>whole-exome sequencing</i> )

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estadiamento do tumor localizado de bexiga.....	4
<b>Figura 2</b>	Espectro mutacional dos pacientes portadores de carcinoma urotelial superficial incluídos no estudo.....	28
<b>Figura 3</b>	Padrões de mutações somáticas pontuais.....	29
<b>Figura 4</b>	Mutações em genes modificadores da cromatina .....	30
<b>Figura 5</b>	Carga mutacional tumoral e benefício ao tratamento com BCG...	32
<b>Figura 6</b>	Carga mutacional estimada através de painel compreensivos de genes relacionados ao câncer (MSK-IMPACT) e benefício ao tratamento com BCG.....	37
<b>Figura 7</b>	Carga mutacional tumoral e carga de neoantígenos em tumores com alterações no gene FGFR3 .....	39
<b>Figura 8</b>	Correlação entre a carga mutacional tumoral e a carga de neoantígenos.....	40
<b>Figura 9</b>	Carga total de neoantígenos e benefício ao tratamento com BCG	41
<b>Figura 10</b>	Mutações em genes de reparo de DNA (lista de 34 genes) e benefício ao tratamento com BCG .....	43
<b>Figura 11</b>	Mutações em genes de reparo de DNA (lista de 193 genes) e benefício ao tratamento com BCG .....	45

<b>Figura 12</b>	Descrição gráfica da evolução após o tratamento com BCG dos 35 pacientes (BCG-R e BCG-NR) incluídos neste estudo, de acordo com o seu perfil genômico (TMB, NAL, DDR).....	47
<b>Figura 13</b>	Assinatura mutacional associada ao envelhecimento nos pacientes incluídos no estudo .....	56

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b>	Classificação <i>Tumor, Node, Metastasis</i> (TNM) do carcinoma de bexiga.....	3
<b>Quadro 2</b>	Grupos prognósticos de estadiamento.....	4
<b>Quadro 3</b>	Classificação de risco do tumor superficial de bexiga.....	5
<b>Quadro 4</b>	Classificação de pacientes responsivos (BCG-R) e não responsivos (BCG-NR) ao tratamento com BCG intravesical .....	18
<b>Tabela 1</b>	Características clínico-patológicas dos pacientes incluídos no estudo.....	27
<b>Tabela 2</b>	Análise Univariada e Multivariada da taxa de resposta ao BCG de acordo com características clínicas e genômicas.....	34
<b>Tabela 3</b>	Análise Univariada e Multivariada da sobrevida livre de recorrência após tratamento com BCG de acordo com características clínicas e genômicas.....	35

## RESUMO

Bastos DA. *Biomarcadores genômicos e mecanismos de benefício de imunoterapia intravesical com Bacilo Calmette-Guérin (BCG) em pacientes portadores de carcinoma urotelial não músculo invasivo da bexiga* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

**INTRODUÇÃO E OBJETIVOS:** O tratamento padrão do carcinoma urotelial não músculo invasivo da bexiga (CNMIB) consiste na ressecção transuretral do tumor vesical (RTU) seguida de terapia intravesical com Bacillus Calmette-Guérin (BCG). Entretanto, cerca de 25-45% dos pacientes não apresentam benefício deste tratamento e, até o momento, não há biomarcadores validados para guiar a seleção de pacientes. A identificação de biomarcadores preditivos de resposta é de fundamental importância para maximizar o uso clínico do BCG em pacientes com maior chance de benefício e potencialmente reduzir o risco de desabastecimento do BCG. Os objetivos deste estudo foram identificar biomarcadores genômicos e caracterizar o mecanismo de benefício da imunoterapia com BCG no tratamento do CNMIB. **MÉTODOS:** Trinta e cinco pacientes portadores de CNMIB tratados com BCG intravesical no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo entre 2009 e 2016 foram retrospectivamente identificados. Os pacientes foram classificados como BCG-responsivos (BCG-R) ou não-responsivos (BCG-NR) e material arquivado de tecido tumoral foi obtido para realização do sequenciamento do exoma total. A carga mutacional tumoral (*tumor mutational burden*; TMB) e a carga de neoantígenos (*neoantigen load*; NAL) foram correlacionadas com taxa de resposta (TR) e sobrevida livre de recorrência (SLR). A presença de mutações deletérias em genes de reparo de DNA (DDR) foi comparada entre os grupos BCG-R (N= 17) e BCG-NR (N= 18). **RESULTADOS:** TMB e NAL foram maiores no grupo BCG-R em comparação com BCG-NR, sendo a mediana do TMB de 4,9 vs. 2,8 mutações/Mb ( $P=0,017$ ) e NAL 100 vs. 65 neoantígenos ( $P=0,032$ ). Pacientes com alto TMB apresentaram maior TR e SLR em comparação com TMB baixo (TR 71% vs. 28%,  $P=0,011$  e SLR 38 vs. 15 meses,  $P=0,009$ ) e o mesmo foi observado em pacientes com NAL alto vs. baixo (TR 71% vs. 28%,  $P=0,011$  e SLR 36 vs. 18.5 meses,

$P=0.017$ ). A presença de mutações em genes DDR foi associada a melhor SLR (35.5 vs. 11 meses,  $P=0,017$ ). CONCLUSÕES: Nesta coorte, melhores desfechos de tratamento com BCG intravesical foram observados em pacientes com TMB alto, NAL alto e mutação em genes DDR. Caso estes resultados sejam confirmados em estudos maiores, TMB pode ser validado como biomarcador preditivo de resposta ao BCG e eventualmente poderá ser incorporado a outros potenciais biomarcadores para maximizar resultados do tratamento. Além disto, os resultados deste estudo indicam que o BCG pode induzir resposta imune anti-tumoral através do reconhecimento de neoantígenos. Estes achados aumentam o entendimento dos mecanismos imunogênicos do BCG e suporta investigação clínica com imunoterapia para o CNMIB.

**Descritores:** Neoplasias urológicas; Bexiga urinária; *Mycobacterium bovis*; Imunoterapia; Mutação; Biomarcadores tumorais.

## ABSTRACT

Bastos DA. *Genomic biomarkers and underlying mechanism of benefit from BCG immunotherapy in non-muscle invasive bladder cancer* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

**INTRODUCTION AND OBJECTIVES:** The standard of care therapy for high-risk non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) include complete transurethral resection of the bladder tumor (TURBT) followed by intravesical therapy with Bacillus Calmette-Guérin (BCG). However, 25–45% of the patients will not benefit from BCG immunotherapy and, to date, there is no validated predictive biomarker to guide patient selection. The identification of predictive biomarkers is critical to maximize clinical use in patients more likely to benefit from therapy and potentially reduce the risk of BCG supply shortages. The objectives of this study are to identify genomic biomarkers and characterize the underlying mechanism of benefit from BCG immunotherapy in NMIBC. **METHODS:** We retrospectively identified 35 patients with NMIBC treated with TURBT and intravesical BCG immunotherapy from 2009 to 2016 at the Instituto do Cancer do Estado de São Paulo. Patients were classified as BCG-responsive (BCG-R) and BCG-unresponsive (BCG-UR) and pre-treatment archival index-tumors were obtained for whole-exome sequencing analysis. Tumor mutation burden (TMB) and neoantigen load (NAL) were correlated with BCG response rate (RR) and recurrence-free survival (RFS). The presence of deleterious mutations in DNA damage repair (DDR) genes was also compared between BCG-responsive (BCG-R, N= 17) and unresponsive (BCG-UR, N= 18) subgroups. **RESULTS:** Tumor mutational burden and neoantigen load were higher in BCG-R compared to BCG-UR patients (median TMB 4.9 vs. 2.8 mutations/Mb,  $P=0.017$  and median NAL 100 vs. 65 neoantigens,  $P=0.032$ ). Improved response rate and recurrence-free survival were observed in patients with high vs. low TMB (RR 71% vs. 28%,  $P=0.011$  and RFS 38.0 vs. 15.0 months,  $P=0.009$ ) and with high vs. low NAL (RR 71% vs. 28%,  $P=0.011$  and RFS 36.0 vs. 18.5 months,  $P=0.017$ ). The presence of deleterious mutations in DDR genes was associated with improved RFS (35.5 vs. 11.0 months,  $P=0.017$ ). **CONCLUSIONS:** In our cohort, improved outcomes after BCG

immunotherapy were observed in patients with high TMB, high NAL and deleterious mutations in DDR genes. If these results are confirmed in larger cohorts, TMB could be a predictive biomarker to BCG and hopefully will be integrated to other biomarkers to maximize the benefit to available therapies. Moreover, our study provides evidence that BCG may induce tumor-specific immune response by enhancing the recognition of neoantigens. These findings improve our understanding of the mechanisms behind BCG-mediated immunity and provide further support for clinical investigation of immunotherapy in NMIBC.

**Descriptors:** Urologic neoplasms; Urinary bladder; *Mycobacterium bovis* Immunotherapy; Mutation; Biomarkers, tumor.



# ***INTRODUÇÃO***

---

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma urotelial de bexiga representa a 6<sup>a</sup> neoplasia maligna mais comum em homens e a 14<sup>a</sup> em mulheres no Brasil, com estimativa de cerca de 7.590 casos em homens e 3.050 casos em mulheres por ano do triênio 2020 a 2022<sup>1</sup>. Em termos de mortalidade no Brasil, em 2017 ocorreram 4.355 óbitos por câncer de bexiga. Mundialmente, estima-se cerca de 549.000 casos novos e 200.000 mortes relacionadas à carcinoma de bexiga por ano<sup>2</sup>. Em relação aos fatores de risco, o tabagismo foi identificado como principal fator associado ao desenvolvimento do câncer de bexiga em cerca de 50% dos casos, além de exposição ocupacional à aminas aromáticas e à radiação ionizante em uma minoria dos casos<sup>3</sup>. Além dos fatores de risco ambientais, pessoas com história familiar de câncer de bexiga tem maior risco de desenvolver a doença, conforme previamente demonstrado em estudos populacionais<sup>4,5</sup>. Estudos recentes de análise genômica demonstram que cerca de 15% a 20% dos pacientes apresentam predisposição hereditária, com identificação de variante germinativa patogênica em genes de alta ou moderada penetrância como BRCA1 e BRCA2 (genes relacionados à síndrome de câncer hereditário de mama e ovário), MLH1, MSH2 e MSH6 (genes associados à síndrome de Lynch), ATM, CHEK2, entre outros<sup>6-8</sup>.

O diagnóstico do câncer de bexiga localizado em geral é realizado através de exames para investigação de sintomas urinários como hematúria indolor ou sintomas de trato urinário inferior. Alguns pacientes assintomáticos podem ter seu diagnóstico a partir de achado incidental de lesão vesical em exame de imagem. Como investigação inicial, são realizados exames de imagem (ultrassonografia, tomografia ou ressonância) e citologia urinária para estadiamento e auxílio na conduta de tratamento. O diagnóstico final é obtido através da cistoscopia com biópsia ou ressecção transuretral de tumor de bexiga (RTUb). O objetivo da RTUb é confirmar o diagnóstico e, se possível, remover completamente todas as lesões visíveis. Neste procedimento, é fundamental para o correto estadiamento e avaliação prognóstica, a obtenção de material representativo da camada muscular da bexiga (músculo detrursor). Deve-se enfatizar a importância de se repetir a RTUb (re-RTUb), que pode encontrar tumor residual após a primeira RTUb e aumentar o estadiamento em até 30% dos casos<sup>9-12</sup>.

## 1.1 ESTADIAMENTO, HISTOLOGIA E ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO

O estadiamento do carcinoma de bexiga é baseado na classificação TNM (*tumor, node, metastasis*) <sup>13</sup>. Cerca de 70% a 75% de todos os casos são diagnosticados como carcinoma urotelial superficial (não músculo invasivo) de bexiga, seja confinado à mucosa ou à submucosa <sup>14</sup>. Especificamente, os carcinomas não músculo invasivos da bexiga (CNMIB) são classificados em Ta (lesões papilíferas não invasivas), Tis (carcinoma *in situ*) ou T1 quando há invasão de submucosa (Quadro 1, Figura 1).

**Quadro 1 - Classificação *Tumor, Node, Metastasis* (TNM) do carcinoma de bexiga.**

<b>Tumor primário (T)</b>	
Tx	Tumor primário não avaliável
T0	Não há evidência de tumor primário
Ta	Carcinoma papilífero não invasivo
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : tumor plano
T1	Tumor invade a lâmina própria (tecido conectivo subepitelial)
T2	Tumor invade a camada muscular própria (músculo detrursor)
pT2a	Tumor invade superficialmente a camada muscular própria (metade interna)
pT2b	Tumor invade profundamente a camada muscular própria (metade externa)
T3	Tumor invade o tecido adiposo perivesical
pT3a	Invasão microscópica do tecido adiposo perivesical
pT3b	Invasão macroscópica do tecido adiposo perivesical (massa extravesical)
T4	Tumor invade órgãos adjacentes ou parede pélvica
T4a	Invasão direta do estroma prostático, vesículas seminais, útero ou vagina
T4b	Invasão da parede pélvica ou parede abdominal
<b>Linfonodos (N)</b>	
Nx	Linfonodos regionais não avaliáveis
N0	Não há evidência de metástase para linfonodos regionais
N1	Metástase para um único linfonodo pélvico
N2	Metástase para 2 ou mais linfonodos pélvicos
N3	Metástase para linfonodo ilíaco comum
<b>Metástases a distância (M)</b>	
Mx	Metástase a distância não avaliável
M0	Não há metástase a distância
M1	Presença de metástase a distância
M1a	Presença de metástase para linfonodos além da cadeia ilíaca comum
M1b	Metástases à distância não linfonodais

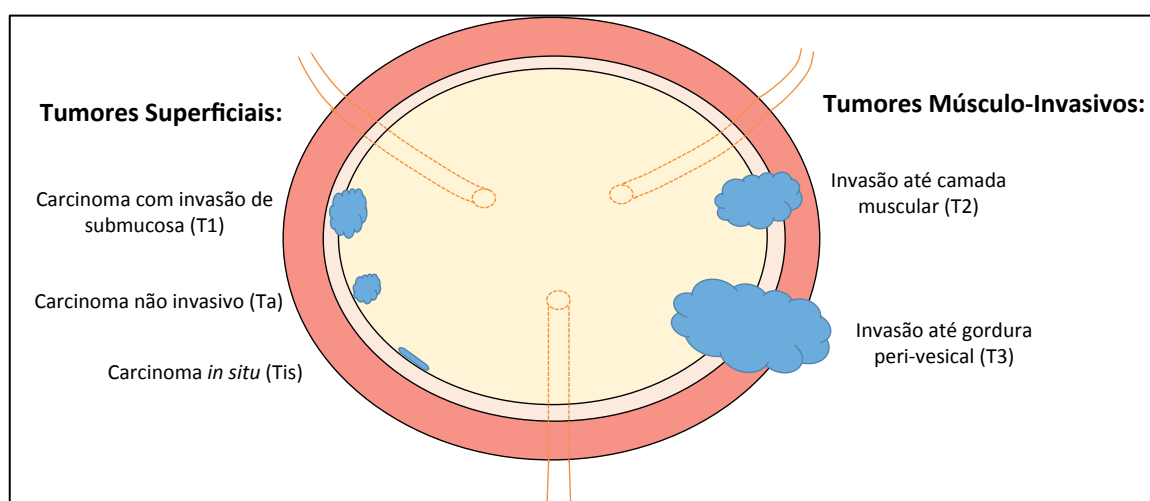
Fonte: Amin et al. <sup>13</sup>.

**Quadro 2 -** Grupos prognósticos de estadiamento.

Tumor primário (T)	Linfonodos (N)	Metástases (M)	Grupo Prognóstico de Estadiamento
Ta	N0	M0	0a
Tis	N0	M0	0is
T1	N0	M0	I
T2a	N0	M0	II
T2b	N0	M0	II
T3a, T3b, T4a	N0	M0	IIIA
T1 – T4a	N1	M0	IIIA
T1 – T4a	N2, N3	M0	IIIB
T4b	Qualquer N	M0	IVA
Qualquer T	Qualquer N	M1a	IVA
Qualquer T	Qualquer N	M1b	IVB

Fonte: Amin et al. <sup>13</sup>.

**Figura 1 -** Estadiamento do tumor localizado de bexiga.



O carcinoma papilífero não invasivo (Ta) em geral se apresenta como doença de baixo grau com tendência de recidiva superficial mas com baixo risco de progressão para doença invasiva <sup>15</sup>. Os tumores Ta de alto grau possuem maior risco de invasão e em geral recebem tratamento com BCG intravesical. A presença de carcinoma *in situ*, com ou sem tumor superficial adjacente, representa um maior risco de progressão com doença invasiva <sup>16</sup>. Os tumores T1 são caracterizados por invasão subepitelial, alta frequência de carcinoma de alto grau, associação com carcinoma *in situ* em até 50% dos casos, e maior risco de recidiva (cerca de 50%) ou progressão com doença músculo invasiva (cerca de 20%) <sup>17,18</sup>.

Em relação à histologia, o tumor de bexiga mais comum é o carcinoma urotelial, que pode ou não se apresentar com componente ou diferenciação de outro

tipo histológico. O carcinoma não urotelial puro inclui vários subtipos, como carcinoma epidermóide, adenocarcinoma, carcinoma sarcomatóide, entre outros. Estes subtipos são menos comuns e em geral se associam a elevado risco de doença invasiva e não são tratados com BCG. Do ponto de vista histológico, o carcinoma urotelial é classificado como de alto ou baixo grau pela Organização Mundial da Saúde e esta classificação se correlaciona com risco de recidiva, progressão e morte por câncer de bexiga <sup>19-21</sup>.

Em termos de estratificação de risco, os pacientes podem ser agrupados em 3 categorias em relação ao risco de recidiva e progressão com doença invasiva (Quadro 3) <sup>14</sup>.

**Quadro 3 -** Classificação de risco do tumor superficial de bexiga <sup>14</sup>.

Classificação de risco	Risco de progressão de doença
<b>Baixo risco (50% dos pacientes):</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ta de baixo grau, e</li> <li>- Tumor único e menor que 3 cm.</li> </ul>	0% a 4%
<b>Risco Intermediário (35% dos pacientes):</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ta multifocal ou recorrente; ou</li> <li>- T1 de baixo grau.</li> </ul>	10% a 15%
<b>Alto risco (15% dos pacientes):</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Carcinoma <i>in situ</i> (Tis); ou</li> <li>- Qualquer tumor de alto grau (Ta ou T1).</li> </ul>	30% a 40%

Além da classificação prognóstica com base nos dados de número/tamanho de lesões e patologia, estudos recentes tem demonstrado associação de alterações genéticas e prognóstico. A presença de mutação no gene do receptor do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR3) se correlacionou com melhor prognóstico em alguns estudos e alterações do gene p53 aparentemente se correlacionam com pior prognóstico <sup>21-26</sup>.

## 1.2 TRATAMENTO COM BCG INTRAVESICAL

O Bacilo Calmette-Guerin (BCG) é uma forma viva atenuada do *Mycobacterium bovis* e representa uma forma de imunoterapia utilizada como tratamento intravesical após RTUv em pacientes portadores de carcinoma urotelial superficial de bexiga. O BCG foi desenvolvido em 1920 por Albert Calmette e

Calmille Guerin e somente em 1976 foi reportado o primeiro estudo em carcinoma urotelial de bexiga que demonstrou redução de recidiva de doença <sup>27,28</sup>.

Inúmeros estudos randomizados e meta-análises demonstraram a superioridade da imunoterapia com BCG em comparação a outros tratamentos intravesicais neste contexto <sup>29-32</sup>. De uma forma geral, recomenda-se tratamento adjuvante com BCG intravesical nos casos de risco intermediário ou alto risco, ou seja, para os pacientes com doença T1, carcinoma *in situ* ou Ta de alto grau <sup>11,14</sup>. Neste cenário, o tratamento com BCG demonstrou redução significativa do risco de recidiva e progressão <sup>29,31,33</sup>. Além disto, o tratamento com BCG demonstrou redução da necessidade de realização de cistectomia radical e aumento de sobrevida câncer-específica <sup>34-37</sup>.

Após completar o tratamento de indução com BCG, geralmente indica-se repetir a cistoscopia com biópsias/RTUb em cerca de 6 a 12 semanas após a última dose de tratamento intravesical. Caso a primeira indução com BCG não seja bem sucedida (biópsia positiva, tumor recorrente Ta ou T1 ou citologia positiva) na cistoscopia de avaliação de resposta em 6 a 12 semanas, pode-se empregar uma nova indução com BCG, exceto nos casos com progressão de doença. Deve-se enfatizar que a persistência de doença (em menor estadiamento e/ou sem progressão) na primeira cistoscopia de controle em 6 a 12 semanas não configura falência ao BCG, o que requer no mínimo 6 meses de acompanhamento aos o final da terapia de indução com BCG <sup>38</sup>. Para os pacientes com resposta completa, indica-se seguimento clínico com cistoscopia e citologia urinária de controle a cada 3 a 6 meses.

Apesar de ser o tratamento padrão após a RTUb nos casos de carcinoma urotelial superficial, o mecanismo de ação exato do BCG não é completamente conhecido. Sabe-se que a instilação intravesical do BCG promove aumento de resposta imune local, o que parece estar relacionada a efetividade do tratamento. Dentre os possíveis mecanismos, destaca-se a indução de infiltrado celular mononuclear local (macrófagos e linfócitos CD4 T), aumento da expressão de interferon-gama e liberação local de interleucinas e fator de necrose tumoral <sup>39-41</sup>. O padrão de expressão de citocinas sugere maior componente de resposta imune T-helper (Th)1, mas também foi observado componente de resposta Th2 <sup>40</sup>.

Inúmeros estudos avaliaram potenciais biomarcadores de resposta à imunoterapia com BCG, entretanto, até o momento não há nenhum marcador

preditivo de resposta à esta terapia em uso na prática clínica. Um número significativo de estudos avaliaram marcadores obtidos após início do BCG, como: tipo de resposta imune (Th1 vs. Th2) avaliado por imunohistoquímica <sup>42</sup>, níveis de interleucina 2 (IL-2) na urina e sangue <sup>43-46</sup>, interleucina 8 (IL-8) e TRAIL <sup>47</sup>. Outros biomarcadores estudados até o momento incluem expressão de TP53, Ki67 e retinoblastoma (Rb), mas que não demonstraram correlação consistente com benefício de tratamento com BCG <sup>47</sup>. Um estudo avaliando a expressão gênica de 80 pacientes com carcinoma urotelial superficial tratados com BCG demonstrou associação de assinatura genética com 24 genes com recidiva (12 genes) ou progressão de doença <sup>48</sup>.

### 1.3 BIOMARCADORES DE RESPOSTA À IMUNOTERAPIA

A imunoterapia faz parte do arsenal terapêutico contra o câncer há muitos anos, especialmente com uso de interleucina-2 (IL-2) no tratamento do melanoma e carcinoma renal <sup>49,50</sup>. Apesar do potencial de benefício duradouro com IL-2 em altas doses, a alta complexidade e morbidade do tratamento associado a benefício restrito a um número muito pequeno de pacientes (cerca de 5%), tornou a IL-2 pouco utilizada na prática clínica. Mais importante, não há biomarcadores preditivos validados para seleção de pacientes com maior chance de resposta duradoura, que é uma necessidade crescente no tratamento do câncer.

Recentemente, imunoterapia com inibidores de CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) e PD-1 (programmed death receptor 1) têm demonstrado resultados de eficácia significativos em várias neoplasias <sup>51-53</sup>, já sendo estratégias aprovadas após estudos clínicos terem demonstrado respostas duradouras e aumento de sobrevida global <sup>54-58</sup>. No tratamento do carcinoma urotelial de bexiga, estudos de fase II e III com uso de anticorpos anti-PD(L)-1 (pembrolizumab, atezolizumab, nivolumab, durvalumab e avelumab) em pacientes com doença metastática demonstraram eficácia significativa, com taxa de resposta e sobrevida superiores ao esperado para esta população com base em dados históricos <sup>59-63</sup>. No cenário de segunda linha de tratamento após progressão de doença com quimioterapia, o uso de pembrolizumab demonstrou sobrevida global superior em comparação com quimioterapia <sup>59</sup>. A imunoterapia também está sendo investigada em fases mais precoces do carcinoma urotelial, como na doença músculo invasiva

com estudos de fase II demonstrando atividade preliminar de pembrolizumab e atezolizumab <sup>64,65</sup>. No carcinoma de bexiga não músculo invasivo, estudo de fase II com pembrolizumab em pacientes com doença refratária ao BCG demonstrou taxa de resposta completa em 3 meses de cerca de 50%, com respostas duradouras (em 12 meses) em cerca de 25% dos pacientes <sup>66</sup>.

Desta forma, inúmeros estudos demonstraram a eficácia de inibidores de PD-1 e do seu ligante (PD-L1), com ganho de sobrevida global e aprovação regulatória para tratamento de várias neoplasias. Apesar disto, o uso de imunoterapia parece beneficiar um número limitado de pacientes que atingem respostas duradouras, além de não ter a mesma eficácia em todas as neoplasias, demonstrando a importância da identificação de biomarcadores preditivos de resposta a este tratamento. A presença de expressão de PD-1 / PD-L1 nas células neoplásicas ou células imunes no microambiente tumoral tem sido proposta como biomarcadores de benefício. Apesar de a maior parte dos estudos demonstrar associação entre hiper-expressão de PD-1 / PD-L1 por imunohistoquímica e maior taxa de resposta nos estudos clínicos, pacientes que não apresentam esta expressão também podem se beneficiar deste tratamento <sup>67</sup>.

Outro potencial biomarcador preditivo de resposta a imunoterapia é a carga mutacional tumoral. As neoplasias humanas podem apresentar mutações genéticas somáticas, incluindo mutações não sinônimas que alteram os resíduos de aminoácidos de uma proteína. Estes, por sua vez, podem levar a formação de novos epitopos de células T (neoepitopos), que podem servir como neoantígenos capazes de induzir resposta imune anti-tumoral <sup>68-70</sup>. Desta forma, em teoria, quanto maior o número de mutações somáticas não sinônimas do tumor, maior é a formação de neoantígenos capazes de gerar resposta imune anti-tumoral e maior seria a eficácia da imunoterapia no tratamento destes tumores com alta carga mutacional.

Estudos demonstram que a carga mutacional parece se correlacionar com maior taxa de resposta e benefício clínico duradouro em várias neoplasias sólidas tratadas com inibidores de CTLA-4 e anti-PD1 <sup>71-75</sup>. Em relação à terapia com inibidor de CTLA-4, estudo com 110 pacientes portadores de melanoma metastático tratados com ipilimumab demonstrou que pacientes com alta carga mutacional avaliada por sequenciamento do exoma total apresentaram maior benefício clínico com a imunoterapia <sup>73</sup>. Estudo em câncer de pulmão, que é uma doença relacionada à exposição ao tabaco, pacientes tratados com pembrolizumab (anti-PD1) tiveram



seus tumores submetidos à sequenciamento do exoma total para correlação com resultados do tratamento <sup>72</sup>. Neste estudo, a carga de mutações não sinônimas se correlacionou com taxa de resposta objetiva, benefício clínico duradouro com o tratamento e sobrevida livre de progressão de doença. A eficácia do tratamento também se correlacionou com a assinatura molecular relacionada ao tabagismo, alta carga de neoantígenos, mutações em genes de reparo do DNA e todos estes fatores estavam associados à carga mutacional tumoral <sup>72</sup>. Outro estudo avaliou a resposta à imunoterapia com pembrolizumab em relação à deficiência na via de reparo de bases mal emparelhadas (“*MMR deficiency*”) <sup>76</sup>. Neste estudo foi demonstrado que pacientes com deficiência do MMR tem resposta objetiva e benefício duradouro com o tratamento muito superiores que pacientes com proficiência do MMR. Além disto, foi demonstrado que tumores com deficiência nesta via de reparo tem uma carga mutacional tumoral superior (1.782 vs 73 mutações somáticas) avaliada pelo sequenciamento do exoma total e que pacientes com alta carga mutacional tem sobrevida livre de progressão superior em relação aos pacientes com baixa carga mutacional <sup>76</sup>. Outro importante estudo prospectivo avaliou potenciais biomarcadores associados à eficácia de pembrolizumab em múltiplas coortes de tumores sólidos. Neste estudo (Keynote-158), foi demonstrado eficácia anti-tumoral de pembrolizumab em pacientes com tumores não colorretais com instabilidade de microssatélites, com taxa de resposta objetiva de 34,3% e sobrevida global de 23,5 meses <sup>77</sup>. Uma importante análise deste estudo demonstrou que dos 102 pacientes com alta carga mutacional (definido como TMB  $\geq$  10 mutações/Mb), 29% apresentaram resposta objetiva com tratamento com pembrolizumab, incluindo 4% de resposta completa e 50% dos pacientes com respostas duradouras superiores a 2 anos. Após estes estudos, a agência regulatória americana (FDA, *Food & Drug Administration*) aprovou pembrolizumab para tratamento de tumores (independente do sítio primário) com instabilidade de microssatélites ou TMB alto ( $\geq$  10 mutações/Mb) nos Estados Unidos <sup>78,79</sup>.

Um ponto que deve ser enfatizado é que a maior parte dos estudos iniciais que correlacionaram alta carga tumoral e maior benefício com imunoterapia com inibidores de CTLA-4 e anti-PD1 utilizaram o sequenciamento do exoma total para avaliação da carga mutacional tumoral. Estudo realizado pelo Centro de Oncologia Molecular do Hospital Sírio-Libanês em São Paulo avaliou se a carga mutacional tumoral, determinada através de plataformas de sequenciamento de genes

relacionados ao câncer, Foundation One (FM-CGP) e do Hospital Sírio-Libanês (HSL-CGP), poderiam também se correlacionar com benefício com estas terapias. Neste estudo, foi demonstrado que os painéis de sequenciamento genético (FM-CGP e HSL-CGP) tiveram acurácia semelhante ao sequenciamento do exoma total em prever a carga mutacional tumoral, e também demonstraram associação entre alta carga tumoral e benefício com imunoterapia <sup>80</sup>. Estudos recentes confirmam a existência de associação linear entre TMB calculado por plataformas de sequenciamento de genes relacionados ao câncer e por WES <sup>81</sup>. Entretanto, devido à potencial variabilidade entre estas plataformas, há a necessidade de estabelecimento de harmonização das análises e interpretações entre os métodos de cálculo do TMB <sup>82,83</sup>.

O carcinoma urotelial de bexiga, assim como o câncer de pulmão, tem forte associação com o tabagismo e exposição a agentes carcinógenos do cigarro, se apresentando com elevada frequência de alterações genômicas <sup>84</sup>. Em um estudo com 97 casos de carcinoma urotelial de alto grau, foi identificado ao menos uma mutação em 65% dos pacientes utilizando painel de sequenciamento de genes relacionados ao câncer, sendo as mais comuns as alterações nos genes TP53 (34%), PIK3CA (18%) e FGFR3 (13%) <sup>85</sup>. De uma forma geral, inúmeros outros estudos avaliaram o perfil mutacional de pacientes portadores de carcinoma urotelial de bexiga <sup>86-90</sup>. O mais importante destes estudos foi realizado pelo Grupo de Pesquisa do Genoma do Câncer (TCGA; The Cancer Genome Atlas Research Network), que avaliou o espectro de alterações moleculares, incluindo sequenciamento do exoma total, de 131 pacientes com carcinoma de bexiga, a maior parte com diagnóstico de doença músculo invasiva <sup>87</sup>. Neste estudo, foi reportado uma frequência de cerca de 300 mutações somáticas por amostra, com média de 7,7 mutações por megabase, sendo a terceira neoplasia com maior carga mutacional, somente abaixo de melanoma e câncer de pulmão <sup>84,87</sup>. Também foram identificadas mutações recorrentes em 32 genes, dentre os quais estão genes de regulação do ciclo celular, regulação de cromatina e genes associados a diferentes vias de sinalização intracelular, sendo os mais comumente alterados: TP53 (49%), MDM2 (38%), MLL2 (27%), PIK3CA (20%), CDKN1A (14%), FGFR3 (12%), ERCC2 (12%), entre outros <sup>87</sup>.

## 1.4 RACIONAL PARA O ESTUDO

O tratamento intravesical com BCG é conduta padrão após a RTU<sub>b</sub> em pacientes com carcinoma urotelial de bexiga superficial de risco intermediário e alto. O objetivo deste tratamento é prevenir recidiva e progressão de doença com necessidade de cistectomia radical, e também evitar a progressão para doença metastática e morte por carcinoma de bexiga. Entretanto, sabe-se que somente uma parcela dos pacientes tem benefício com esta estratégia e alguns pacientes podem apresentar recidiva ou progressão mesmo após o tratamento com BCG. Assim, torna-se fundamental a identificação de biomarcadores preditivos de eficácia deste tratamento para selecionar os pacientes com maior chance de resposta e eventualmente propor tratamentos alternativos aos pacientes com menor chance de benefício.

Conforme discutido anteriormente, a imunoterapia com inibidores de PD-1 e PD-L1 tem demonstrado resultados de eficácia significativos, especialmente em neoplasias com alta carga mutacional como melanoma, câncer de pulmão e tumores com deficiência na via de reparo de bases mal emparelhadas (MMR). Nestas neoplasias, foi identificado que pacientes com alta carga mutacional tiveram maior benefício com a imunoterapia, incluindo maior taxa de resposta e sobrevida livre de progressão, se constituindo como um biomarcador preditivo de benefício com imunoterapia. Em relação ao carcinoma de bexiga, estudos de fase II e III de tratamento com anti-PD-L1 e anti-PDL1 em pacientes metastáticos demonstrou resultados de eficácia consistentes, com respostas duradouras para uma proporção significativa de pacientes. Estudos recentes demonstram que em pacientes com carcinoma urotelial avançado, a alta carga mutacional e presença de mutações em genes de reparo do DNA estão associadas à maior resposta com a imunoterapia <sup>91-93</sup>.

Desta forma, existe um forte racional para a avaliação da carga mutacional tumoral de forma integrada à análise da carga de neoantígenos e mutações em genes de reparo do DNA como biomarcadores preditivos de resposta à imunoterapia com BCG intravesical em pacientes portadores de carcinoma urotelial superficial de bexiga.

## ***OBJETIVOS***

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Correlacionar a carga mutacional tumoral (TMB) com resposta à imunoterapia com BCG intravesical.

### 2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- 1 Correlacionar a carga mutacional tumoral (TMB) com a sobrevida livre de recorrência.
- 2 Descrever as principais alterações genômicas identificadas em pacientes com carcinoma superficial de bexiga.
- 3 Correlacionar a presença de alterações em genes de reparo de DNA com resposta ao BCG.
- 4 Correlacionar a presença de alterações em genes de reparo de DNA com a sobrevida livre de recorrência.
- 5 Correlacionar a carga de neoantígenos (NAL) com resposta ao BCG.
- 6 Correlacionar a carga de neoantígenos (NAL) com a sobrevida livre de recorrência.

# ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo para análise genômica de pacientes portadores de carcinoma urotelial superficial de bexiga tratados com imunoterapia com BCG intravesical. A coleta de dados foi feita através da análise de prontuário de pacientes tratados no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP).

#### 3.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A partir de um banco de dados de pacientes com diagnóstico de carcinoma urotelial de bexiga tratados com BCG intravesical (cepa Moreau<sup>94</sup>) no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) no período de 2009 a 2016, foram identificados 83 pacientes portadores de carcinoma urotelial não músculo invasivo que haviam sido submetidos à ressecção transuretral de bexiga, re-RTU e com material da RTU pré-BCG arquivado no serviço de anatomia patológica do ICESP. Destes 83 pacientes inicialmente selecionados, análise genômica bem sucedida foi realizada em 35 pacientes (42%) e as demais amostras de tumor arquivado (48 pacientes) apresentaram altos níveis de fragmentação e de modificação química do DNA, não sendo possível a realização bem sucedida do sequenciamento do exoma total. Desta forma, este estudo incluiu uma amostra de 35 pacientes portadores de CNMIB tratados com BCG intravesical. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Protocolo NP852/15) e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os pacientes, exceto daqueles que haviam falecido, mediante isenção de aplicação do TCLE aprovado pelo CEP.

Os pacientes tiveram seu tratamento conforme protocolo de tratamento do carcinoma urotelial do ICESP, com visitas médicas a cada 3 a 6 meses, citologia urinária e cistoscopia realizadas a cada cerca de 6 meses durante os 3 primeiros anos de seguimento e anualmente após este período. Nas avaliações por cistoscopia, biópsias randômicas de rotina não foram realizadas, exceto em pacientes com citologia urinária positiva. Em pacientes com áreas suspeitas ou lesões papilíferas, biópsia ou ressecção da lesão era realizada de acordo com as diretrizes de tratamento institucionais.

### 3.1.1 Critérios de Inclusão

- Pacientes com diagnóstico histológico de carcinoma urotelial superficial de alto grau (não músculo invasivo), incluindo aqueles com estadiamento do tumor pTa e pT1, com ou sem carcinoma *in situ* associado.
- Pacientes submetidos a RTUb diagnóstica e repetido a RTUb (re-RTUb) para confirmação de doença superficial (com amostragem de camada muscular na patologia) antes de iniciar o tratamento com BCG intravesical.
- Pacientes com seguimento de pelo menos 2 anos após o tratamento com BCG, sem recidiva ou progressão ou tenham apresentado recidiva ou progressão em qualquer momento no seguimento.
- Pacientes com tecido de tumor obtido por biópsia ou RTUb arquivado para análise.
- Pacientes que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido do estudo, permitindo o sequenciamento genético.
- Pacientes que realizaram tratamento de indução com BCG intravesical semanal (pelo menos 6 aplicações).

### 3.1.2 Critérios de Exclusão

- Pacientes com diagnóstico histológico de carcinoma não urotelial de bexiga. A presença de carcinoma urotelial com componente não urotelial não foi considerado critério de exclusão.
- Não realização de tratamento com BCG intravesical semanal por pelo menos 6 semanas.
- Não realização de re-RTUb.
- Presença de carcinoma com invasão de camada muscular própria antes do tratamento com BCG.
- Pacientes com história de doença auto-imune ou imunossupressão foram excluídos. Pacientes em uso de corticoterapia crônica também foram excluídos do estudo.
- Impossibilidade de obtenção do material de biópsia e/ou RTUb prévia ao tratamento com BCG intravesical.



- Pacientes sem evidência de recidiva e/ou progressão de doença que não apresentaram seguimento adequado de pelo menos 2 anos.
- Pacientes sem dados de prontuário com informações demográficas e do diagnóstico do carcinoma urotelial acessíveis para o estudo.
- Pacientes que não concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido para inclusão no estudo.

### 3.2 DEFINIÇÕES

A progressão de doença foi definida de acordo com os critérios do *International Bladder Cancer Group* <sup>95,96</sup>:

- aumento na categoria T do estadiamento (Tis ou Ta para T1)
- aumento de carcinoma de baixo grau para alto grau
- desenvolvimento de doença músculo invasiva (T2)
- desenvolvimento de metástases para linfonodos regionais (N1, N2 ou N3) ou metástase a distância (M1).

Os pacientes foram classificados como responsivos ao BCG (BCG-R) ou não responsivos ao BCG (BCG-NR) com base nos seguintes critérios <sup>96,97</sup>:

- **BCG-R:** pacientes que apresentaram resposta completa após RTUb e indução com BCG e que não apresentaram recidiva/progressão de doença por pelo menos 2 anos de seguimento após completar a indução com BCG.
- **BCG-NR:** serão classificados nas seguintes categorias:
  - BCG-refratário: persistência de doença de alto grau em 6 meses apesar do BCG ou qualquer progressão de estágio (T) ou grau histológico após 3 meses do início do BCG (inclui os pacientes com progressão para doença músculo invasiva);
  - BCG-recidivante: qualquer recidiva após resposta completa com curso inicial de BCG: estratificada em recidiva precoce (< 12 meses), intermediária (12-24 meses) ou tardia (> 24 meses).

**Quadro 4 -** Classificação de pacientes responsivos (BCG-R) e não responsivos (BCG-NR) ao tratamento com BCG intravesical.

BCG-Responsivo (R)	BCG-Não Responsivo (NR)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Resposta completa após RTUe e indução com BCG;</li> <li>- Ausência de recidiva/progressão de doença por pelo menos 2 anos de seguimento</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><u>BCG-refratário:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- persistência de doença de alto grau em 6 meses apesar do BCG</li> <li>- qualquer progressão após 3 meses do início do BCG;</li> </ul>
	<p style="text-align: center;"><u>BCG-recidivante:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o qualquer recidiva após resposta completa com curso inicial de BCG</li> </ul>

### 3.3 COLETA DE DADOS

Os seguintes dados foram coletados, de forma retrospectiva, do prontuário médico eletrônico do ICESP.

- Dados demográficos
  - o Data de nascimento
  - o Gênero
  - o Peso
  - o Altura
  
- Dados relacionados ao diagnóstico e tratamento da neoplasia
  - o Data do diagnóstico
  - o Sintoma inicial
  - o Creatinina sérica ao diagnóstico
  - o Karnofsky performance status (KPS) ao diagnóstico
  - o Estadiamento clínico pelo exame de imagem (cTx, cT1, cT2, cT3, cT4)
  - o Presença de componente não urotelial
  - o Número de tumores na cistoscopia do diagnóstico
  - o Tamanho do maior tumor
  - o Grau da neoplasia (alto versus baixo grau)
  - o Presença de carcinoma *in situ* associado
  - o Presença de invasão linfovascular

- Representação do músculo detrussor representado na amostra da RTU<sub>b</sub>
  - Estadiamento da RTU diagnóstica (pT0, pTis, pTa, pT1, pT2, ≥pT3)
  - Ressecção completa na RTU<sub>b</sub>
  - Estadiamento da re-RTU (pT0, pTis, pTa, pT1, pT2, ≥pT3)
  - Data do início do tratamento com BCG intravesical
  - Dose de BCG intravesical utilizada
  - Numero de aplicações da etapa de indução de BCG
  - Tratamento com BCG de manutenção
  - Duração de BCG manutenção
  - Redução ou interrupção do tratamento com BCG por toxicidade
- Desfechos clínicos de tratamento oncológico
- Tipo de resposta à indução com BCG (resposta completa versus persistência de doença versus progressão)
  - Apresentou recidiva/progressão até o último seguimento?
  - Data da recidiva/progressão
  - Estadiamento “T” da doença na recidiva (pTis, pTa, pT1, pT2, ≥pT3)
  - Doença N+ ou M1 na recidiva?
- Seguimento:
- Data do último seguimento
  - Status (vivo, falecido, desconhecido)
  - Causa do óbito, se aplicável

### 3.4 ANÁLISES GENÔMICAS

A detecção de mutações somáticas foi realizada através do sequenciamento do exoma humano em tecidos tumorais preservados em parafina. Os blocos de parafina arquivados foram obtidos junto ao laboratório de anatomia-patológica do ICESP após aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e após obtenção de assinatura do termo consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelos pacientes incluídos no estudo. Após a retirada da amostra necessária para o estudo, o material restante foi devolvido ao laboratório de patologia do ICESP, responsável pela guarda das amostras. Todos os casos foram revisados por um patologista especialista em tumores genitourinários (Dr Rômulo Mattedi) para confirmação da histologia urotelial, grau histológico e estágio do tumor. Com o objetivo de enriquecer a amostra com tecido tumoral, foi realizada macrodissecção das regiões tumorais

antes da extração do DNA. Para inclusão no estudo, a amostra deveria conter pelo menos 60% de núcleos de células tumorais e menos de 20% de necrose.

Cortes de 5  $\mu\text{m}$  foram retirados a partir dos blocos de parafina e o tecido tumoral foi recuperado após processo de desparafinização com incubações sucessivas em xilol e etanol. O DNA tumoral foi extraído com o uso do *GeneRead DNA FFPE Kit* (Qiagen), contendo Uracyl-D glicosilase, seguindo as especificações do fornecedor. A concentração do DNA foi determinada usando o *dsDNA BR Assay Kit* (Thermo Fischer Scientific) no fluorômetro Qubit (Thermo Fischer Scientific). Após a determinação da densidade óptica e quantificação, o material foi armazenado em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização.

A detecção de mutações nos genes selecionados foi realizada através da captura do exoma humano com sondas comerciais de RNA (SureSelect Clinical Research Exome V2- Agilent) e sequenciamento na plataforma NextSeq Illumina. O procedimento de captura do exoma humano foi realizado conforme as especificações do fabricante. Resumidamente, o protocolo foi iniciado com a fragmentação do DNA proveniente das amostras de pacientes. Estas moléculas de DNA tiveram suas extremidades reparadas e em seguida foram ligados adaptadores de forma a permitir, posteriormente, o sequenciamento na plataforma NextSeq. Para que apenas as moléculas de DNA do tamanho desejado fossem utilizadas no sequenciamento, foi feita uma seleção de fragmentos de acordo com o tamanho com uso de esferas magnéticas (AMPure Beads - Agencourt). As moléculas selecionadas foram amplificadas por PCR e então, hibridizadas com as sondas de RNA. Os fragmentos de DNA de interesse foram recuperados com esferas magnéticas cobertas com estreptavidina. A seguir as moléculas selecionadas foram amplificadas por PCR na qual ocorreu a incorporação de sequências índices conhecidas que permite o sequenciamento simultâneo de diversas amostras. As moléculas de DNA selecionadas e preparadas com adaptadores próprios para o sequenciamento na plataforma *Illumina* (biblioteca de DNA) tiveram sua concentração avaliada por método fluorimétrico (Qubit-ThermoScientific) e seu perfil de tamanho avaliado em eletroforese de alta resolução (Bioanalyzer- Agilent). O sequenciamento *paired-end* de 150 pares de bases foi feito com *NextSeq 500 Highoutput kit 300 cycles* (Illumina). Os dados do sequenciamento foram depositados no European Nucleotide Archive (ENA) com o número de acesso PRJEB31851.

### 3.4.1 Análise mutacional, carga mutacional tumoral e genes de reparo de DNA

As sequências geradas na plataforma *NextSeq* foram filtradas em relação a qualidade e alinhadas contra a sequência de referência do genoma humano (GRCh38/hg38) utilizando os parâmetros padrões do programa *BWA* (v.0.7.9) <sup>98</sup>. Foram excluídas leituras de baixa qualidade ( $Q < 30$ ) utilizando a ferramenta *SAMtools* (v.1.6) <sup>99</sup> e potenciais duplicatas de PCR foram marcadas através da ferramenta *Picard* (v.1.114) *MarkDuplicates* (<https://broadinstitute.github.io/picard>). Métricas de sequenciamento (cobertura e profundidade) foram determinadas utilizando *SAMtools* e algoritmos em *Pearl* ([www.pearl.org.br](http://www.pearl.org.br)). A recalibração dos valores de qualidade das bases foi realizada utilizando o *BaseRecalibrator* do GATK (do inglês *Genome Analysis Tool Kit*) e o *PrintReads*. Para tanto foram usadas as variantes do *dbSNP* (v.146) e as *indels padrão do 1000 Genome* fornecidas pelo GATK <sup>100</sup>. Variantes genéticas foram identificadas utilizando o *HaplotypeCaller* do GATK seguindo as recomendações para análise conjunta de genotipagens. Variantes de baixa qualidade foram excluídas usando o protocolo do *Variant Quality Score Recalibrator* do GATK. As variantes genéticas foram anotadas com o *AnnoVar* <sup>101</sup>, utilizando informações funcionais relacionadas ao câncer e informações de frequências alélicas populacionais disponíveis nos bancos de dados *COSMIC* (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* V.70) <sup>102</sup>, *ExAC* (*Exome Sequence Aggregation Consortium*) <sup>103</sup> e *1000 Genomes Project Phase3* v.5 <sup>104</sup>.

Como neste estudo não foi analisado o DNA germinativo dos pacientes, foram utilizados bancos de dados públicos com informação de frequências alélicas populacionais de SNVs conhecidas e a base de dados de frequência mutacional do *COSMIC*, para filtrar as variantes germinativas nas amostras do estudo. Todas as variantes presentes nas bases de dados *ExAC* e *1000 Genomes* foram filtradas, exceto se a variante estivesse catalogada na base *COSMIC* e detectada em mais de 3 amostras de qualquer tipo de tumor nesta base de dados. Também foram excluídas todas as variantes genéticas localizadas fora das regiões exônicas ou sítios de *splicing*, além das variantes exibindo frequências alélicas menor que 20% e presentes em regiões genômicas representadas por menos de 30 sequências.

Genes com excesso significativo de mutações não sinônimas em comparação com a densidade estimada de mutações de fundo foram identificados usando o programa *MutSig2.0* <sup>105</sup>. Foram realizadas decomposições sistemáticas das assinaturas mutacionais (*COSMIC*) utilizando o *Mutalisk* <sup>106</sup>, através do método de

estimativa de máxima verossimilhança. Utilizamos modelo de regressão linear e todas as 30 assinaturas mutacionais do COSMIC. O resultado foi composto com uma compilação dos melhores métodos de decomposição, ranqueados com base nos critérios de informação Bayesiana para minimizar o sobre ajuste.

A carga mutacional tumoral (TMB), neste estudo, foi estimada dividindo o número total de mutações somáticas (mutações pontuais sinônimas e não-sinônimas, mutações em regiões de *splicing* e *indels*) pelo tamanho da região alvo de sequenciamento do exoma em megabases (Mb). TMB alto foi definido como igual ou acima da mediana do TMB da coorte do estudo (3 mutações/Mb no WES e 4,4 mutações/Mb na análise do painel MSK-IMPACT).

Para as associações com alterações em genes de reparo do DNA (DDR), foi utilizada lista de 34 genes DDR previamente associados à benefício com imunoterapia em carcinoma urotelial <sup>107</sup> e uma lista mais ampla de 193 genes conhecidos pelo papel nas 6 diferentes vias de reparo do DNA <sup>107</sup>. Uma lista de 167 genes modificadores da cromatina foram obtidos do site *dbEM* (<http://crdd.osdd.net/raghava/dbem/index.php>), um banco de dados de modificadores epigenéticos de genomas normais e neoplásicos <sup>108</sup>. Mutações deletérias *missense* em genes modificadores da cromatina e genes DDR foram identificadas utilizando *PolyPhen* (v.2) <sup>109</sup> e *SIFT* (v.6.2.1) <sup>110</sup>. As mutações missense foram consideradas deletérias somente se classificadas como “deletérias” pelo *SIFT* e “provavelmente deletérias” pelo *PolyPhen HVAR*.

### 3.4.2 Tipagem HLA e Predição de Neoantígenos

Os genes HLA-A, B e C do tumor foram genotipados utilizando as sequências no formato *fastq* como dado de entrada para o *Optitype* (V.1.3.1) <sup>110</sup>. As sequências de peptídeos flanqueando as mutações somáticas foram anotadas utilizando a ferramenta

<i>Variant</i>	<i>Effect</i>	<i>Predictor</i>
----------------	---------------	------------------

(<https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>).

Para a predição de neoantígenos, alelos HLA e sequências de peptídeos de todas mutações de cada amostra de tumor foram utilizadas como dados de entrada para o *pVAC* (V.4.0.10) <sup>110</sup>. Este algoritmo utiliza o *NetMHCpan* (v.3.0) <sup>110</sup> e *NetChop* (v.3.1) <sup>110</sup> para prever a afinidade da ligação de cada par de peptídeo-HLA e sítios de clivagem pelo proteossomo. Considerando as SNVs *missense*, *frameshift* e *indels*, todas as potenciais sequências de neoantígenos com tamanhos de 8, 9 e 10-

mers foram avaliadas. Epítomos com forte afinidade de ligação com o HLA (constante de afinidade  $[KM] \leq 500$  nM) foram selecionados e, para mutações com múltiplos epítomos de forte ligação, aquele com maior KM foi escolhido. Portanto, o número de neoantígenos por paciente foi estimado a partir do total de mutações capazes de gerar pelo menos um neoantígeno. Carga de neoantígeno (NAL) alta ou baixa foi baseada no número mediano de neoantígenos por amostra incluída no estudo (mediana de 78). O teste de correlação de Pearson foi utilizado para determinar a correlação entre o número de mutações somáticas e o número de neoantígenos.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Como se trata de um estudo exploratório, não foi realizado cálculo formal do tamanho amostral. Utilizamos como base para a definição do tamanho da amostra estudos semelhantes que avaliaram a correlação de TMB com benefício a agentes imunoterápicos<sup>71,72</sup>. Desta forma, foram incluídos 35 pacientes que apresentavam os critérios de inclusão definidos para este estudo. Conforme apresentado na seção 3.0 (Material e Métodos), os pacientes incluídos no estudo foram classificados como responsivos ao BCG (BCG-R) ou não responsivos ao BCG (BCG-NR). Para o cálculo do poder estatístico do estudo, a associação entre TMB (como variável contínua) e resposta ao BCG foi considerada, sendo a diferença do TMB entre os pacientes BCG-R e BCG-UR de 2,1 mutações/Mb, com desvio padrão de 1,4 mutações/Mb. Considerando a amostra de 35 pacientes neste estudo, o poder estatístico calculado foi de 0,992. Para este cálculo, foi considerada distribuição normal na comparação das amostras independentes, com risco  $\alpha \geq 0,05$  para erro tipo I e risco  $\beta \leq 0,2$  para erro tipo II.

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a distribuição dos dados e definir o uso apropriado de testes paramétricos e não paramétricos. O teste qui-quadrado de Pearson ou o teste exato de Fischer foram utilizados para analisar associações categóricas e o método de Wald foi utilizado para calcular a razão de probabilidade (OR, do inglês *odds ratio*) e o intervalo de confiança de 95% (95% CI). O teste de Mann-Whitney foi utilizado para variáveis contínuas. A regressão logística binária foi utilizada para determinar a associação entre alterações genômicas e resposta ao tratamento com BCG. O teste Hosmer-

Lemeshow foi utilizado para validar o modelo binário de regressão logística. O método de Kaplan-Meier e o teste de Log-rank foram utilizados para estimativas da sobrevida livre de recorrência. Como somente 5 pacientes no estudo apresentaram progressão, não foram realizados testes de correlação entre alterações genômicas e sobrevida livre de progressão. O modelo de regressão de Cox foi utilizado para determinar a associação entre alterações genômicas e recorrência após o tratamento com BCG e o teste de Wald foi utilizado para calcular a razão de chance (HR, do inglês *hazard ratio*) ajustada e o 95% CI. Validação dos resultados do teste de Cox foram realizadas com o teste de Schoenfeld. O *status* TMB (alto versus baixo) e DDR (presente versus ausente) não foram incluídos simultaneamente no modelo multivariado devido a colinearidade entre TMB e DDR. Não foi possível realizar análise estratificada usando TMB e DDR devido ao tamanho amostral da coorte desse estudo. As variáveis que atingiram nível de significância  $\leq 0,1$  foram incluídas na análise multivariada. Todos os testes foram bicaudais e um valor  $P \leq 0,05$  (probabilidade de erro  $\alpha$  tipo I  $\leq 5\%$ ) foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa "R" (v 3.5.0), com o suporte dos seguintes pacotes: *gmodels* (v.2.18.1), *epitools* (v.0.5.10), *ResourceSelection* (v.0.3.4), *forestmodel* (v.0.5.0), *survminer* (v.0.4.3), *survival* (v.2.43.3), *survcomp* (v.1.32.0).



## ***RESULTADOS***

---

## 4 RESULTADOS

Neste estudo foram incluídos de forma retrospectiva 35 pacientes com diagnóstico de carcinoma não músculo invasivo de bexiga tratados com BCG intravesical no ICESP entre 2009 e 2016. A maior parte da população do estudo é do sexo masculino (91%), ex-tabagista (60%), diagnóstico de CNMIB de alto risco (91%), carcinoma de alto grau (86%) e/ou estágio T1 (71%). As características dos pacientes incluídos no estudo estão descritas na Tabela 1.

Os pacientes foram classificados como responsivos ao BCG (BCG-R; 48,6%) ou não responsivos ao BCG (BCG-NR; 51,4%) de acordo com os critérios do *International Bladder Cancer Group*<sup>96</sup>. No grupo BCG-NR, 5 pacientes (27,8%) foram classificados como BCG refratário e 13 pacientes (72,2%) como BCG recidivados. O número mediano de instilações de BCG intravesical foi 15 (8-34) na coorte inteira, 14 (8-24) no grupo BCG-R e 15,5 (8-34) no grupo BCG-NR. O tempo mediano de seguimento foi de 46 meses no grupo BCG-R e 52 meses no grupo BCG-NR. O tempo mediano de recidiva e progressão no grupo BCG-NR foi de 10,5 e 19 meses, respectivamente. Nenhuma das características clínico-patológicas dos 35 pacientes do estudo, com exceção da idade ao diagnóstico, foi diferente entre os grupos BCG-R e BCG-NR (Tabela 1).

**Tabela 1 -** Características clínico-patológicas dos pacientes incluídos no estudo.

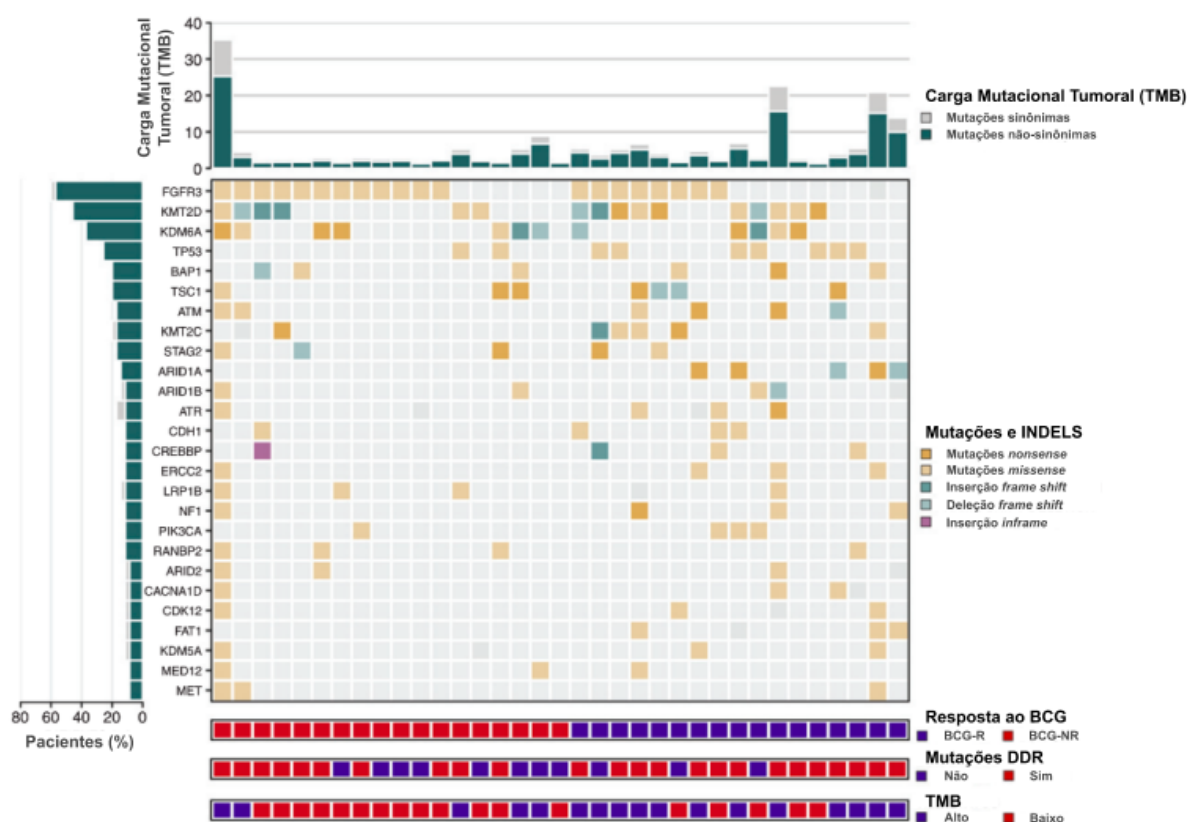
	BCG-R	BCG-NR	Total	P-valor
	N=17	N=18	N=35	
<b>Idade mediana (variação)</b>	75 (54-80)	63 (42-84)	64 (42-84)	0,014
Masculino	15 (88%)	17 (97%)	32 (91%)	0,603
Feminino	2 (12%)	1(6%)	3 (9%)	
<b>Tabagismo</b>				
Nunca	5 (29%)	0 (0%)	5 (14%)	0,050
Ex-tabagista	10 (59%)	11 (61%)	21 (60%)	
Tabagista atual	1 (6%)	3 (17%)	4 (12%)	
Desconhecido	1 (6%)	4 (22%)	5 (14%)	
<b>Sintoma inicial</b>				
Incidental	4 (24%)	3 (16%)	7 (20%)	0,562
Hematúria	13 (76%)	14 (78%)	27 (77%)	
Disúria	0 (0%)	1 (6%)	1 (3%)	
<b>Estádio</b>				
Ta	5 (29%)	5 (28%)	10 (29%)	1,0
T1	12 (71%)	13 (72%)	25 (71%)	
<b>Grau histológico</b>				
Baixo	1 (6%)	4 (22%)	5 (14%)	0,338
Alto	16 (94%)	14 (78%)	30 (86%)	
<b>Carcinoma <i>in situ</i></b>				
Presente	1 (6%)	2 (11%)	3 (9%)	1,0
Ausente	16 (94%)	16 (89%)	32 (91%)	
<b>Histologia</b>				
Carcinoma urotelial (UC) puro	15 (88%)	16 (88%)	31 (88%)	0,512
UC com diferenciação escamosa	2 (12%)	1 (6%)	3 (9%)	
Variante micropapilífera	0 (0%)	1 (6%)	1 (3%)	
<b>Número de tumores</b>				
1	7 (41%)	3 (17%)	10 (29%)	0,156
2	4 (24%)	3 (17%)	7 (20%)	
≥ 3	6 (35%)	12 (66%)	18 (51%)	
<b>Tamanho do tumor (cm)</b>				
<3 cm	7 (41%)	5 (28%)	12 (34%)	0,404
≥ 3 cm	10 (59%)	13 (72%)	23 (66%)	
<b>Tratamento (BCG)</b>				
Indução apenas	3 (18%)	1 (6%)	4 (11%)	1,0
Indução + manutenção	14 (82%)	17 (94%)	31 (89%)	

#### 4.1 ANÁLISE MUTACIONAL

Com o objetivo de caracterizar o espectro de mutações do DNA tumoral dos pacientes incluídos no estudo, foi realizado sequenciamento do exoma total do tumor índice antes do tratamento com BCG de 35 pacientes portadores de carcinoma urotelial não músculo invasivo (mediana de cobertura 158x com 97,4% de

bases alvo sequenciadas com pelo menos 30x profundidade). O sequenciamento do exoma total (WES, do inglês *whole exome sequencing*) identificou 11.482 mutações somáticas, sendo 11.025 mutações pontuais e 457 indels, com mediana de 151 (variação interquartil, IQR: 132-285) mutações pontuais e 8 (IQR: 6-11) indels por tumor (Figura 2 e Tabela S1 [<https://content.iospress.com/articles/bladder-cancer/blc200289>]).

**Figura 2 -** Espectro mutacional dos pacientes portadores de carcinoma urotelial superficial incluídos no estudo.



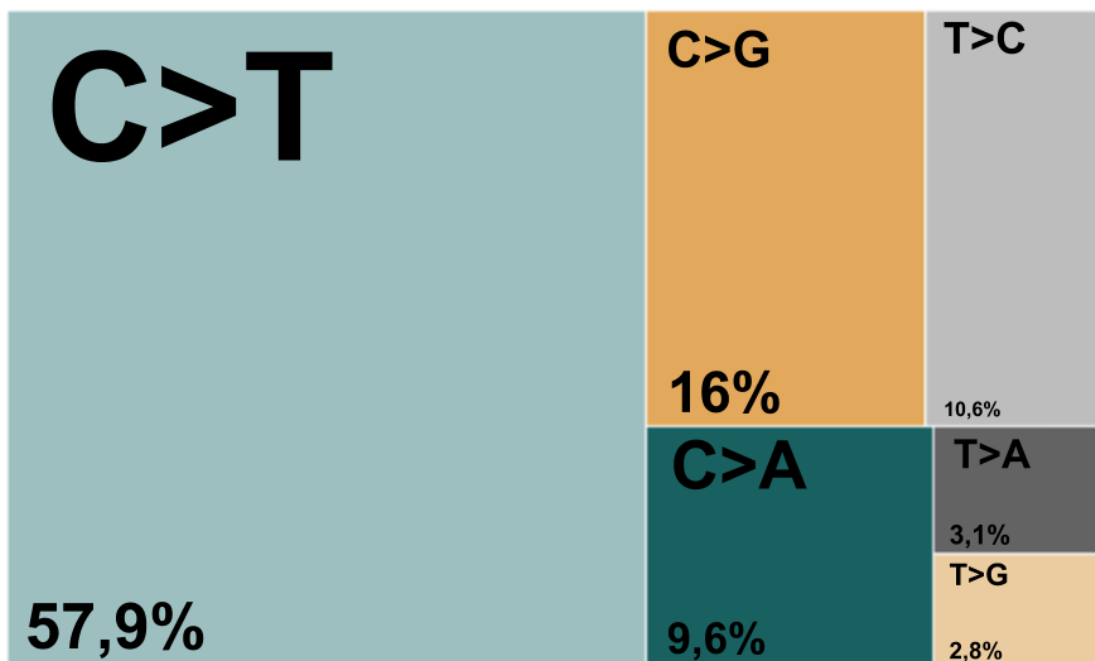
**Legenda:** figura demonstrando a carga mutacional tumoral (TMB) de cada paciente (colunas) incluído no estudo (parte superior). Alterações genéticas mais frequentes (>8%) estão demonstradas por ordem decrescente de prevalência (linhas). Cada paciente foi classificado de acordo com a resposta ao BCG (BCG-R e BCG-NR), presença ou ausência de mutações em genes de reparo do DNA (DDR) e de acordo com a carga mutacional (alta e baixa).

Neste estudo foram confirmadas as principais alterações genômicas previamente descritas em pacientes portadores de CNMIB<sup>111-116</sup>. A maioria das mutações pontuais foram transições C > T (57,9%) (Figura 3A) e a assinatura mutacional APOBEC foi detectada em 80% das amostras (Figura 3B). Mutações em genes modificadores da cromatina foram identificadas em 71,4% dos casos e os

mais frequentes foram KMT2D e KDM6A (> 30%) (Figura 4 e Tabela S2 [<https://content.iospress.com/articles/bladder-cancer/blc200289>]). Mutações somáticas recorrentes foram detectadas em 2 genes (TP53 e KDM6A) utilizando o MutSig e mutações em outros genes, incluindo FGFR3, KMT2D, BAP1, TSC1, ATM, KMT2C, STAG2 e ARID1A, foram identificadas em pelo menos 5 pacientes (14,3%) entretanto não atingiram significância estatística de acordo com o MutSig (Figura 1). Nenhuma das 10 mutações genéticas mais frequentemente identificadas foi significativamente associada a resposta ao tratamento com BCG.

**Figura 3 -** Padrões de mutações somáticas pontuais.

A





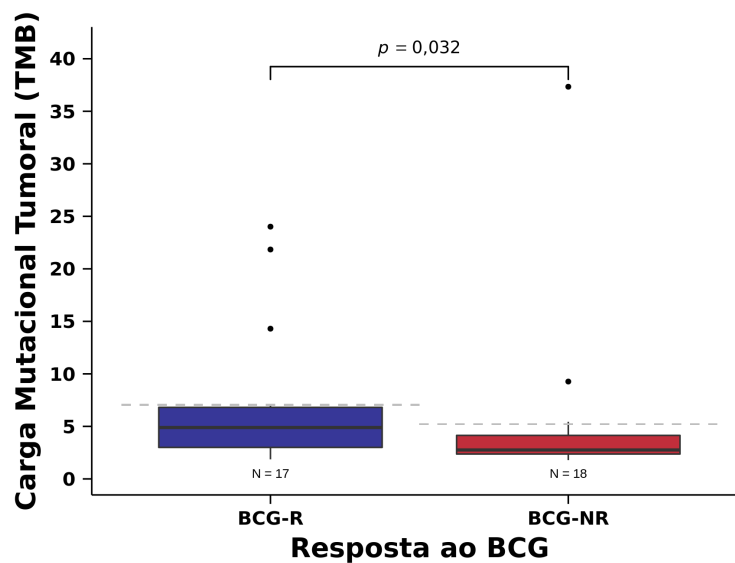
## 4.2 CARGA MUTACIONAL TUMORAL (TMB) E BENEFÍCIO AO TRATAMENTO COM BCG

A carga mutacional tumoral tem sido associada à benefício com tratamento imunoterápicos com os inibidores de checkpoint imune em várias neoplasias <sup>117</sup>. Desta forma, o objetivo primário deste estudo foi avaliar a associação entre TMB e resposta ao BCG. Na coorte de 35 pacientes incluídos neste estudo, o TMB mediano foi de 3 mutações/Mb (IQR: 2,6 – 5,5) (Tabela S1 [<https://content.iospress.com/articles/bladder-cancer/blc200289>]). O TMB mediano foi mais alto no grupo BCG-R quando comparado ao grupo de pacientes BCG-NR (TMB 4,9 [IQR 3,0 – 6,8] versus TMB 2,8 [IQR 2,4 – 4,1], Mann-Whitney  $P= 0,032$ ; Figura 5A). A resposta ao tratamento com BCG intravesical foi superior nos pacientes com TMB alto (definido pelo TMB acima da mediana de 3 mutações/Mb) e o TMB alto foi significativamente associado à resposta ao BCG em comparação ao TMB baixo (resposta ao BCG 71% versus 28%, Odds ratio [OR] 6,24, 95% CI: 1,44 – 27,06, Pearson qui-quadrado  $P= 0,011$ ; Figura 5B e Tabela 2). Na análise multivariada, TMB alto permaneceu como fator independentemente associado à resposta ao BCG (OR 5,20, 95% CI 1,11 – 24,34,  $P= 0,036$ ; Tabela 2).

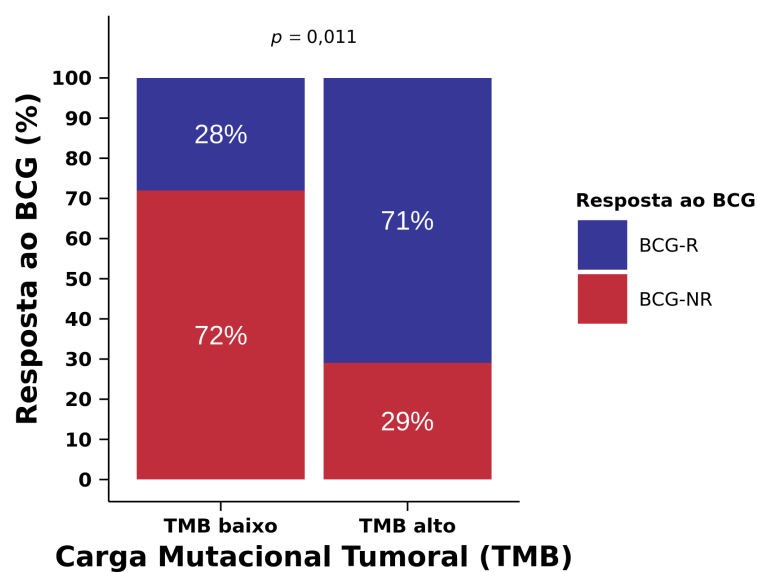
Neste estudo também foi analisada a relação entre TMB e sobrevida livre de recorrência (SLR). Pacientes com TMB alto tiveram maior SLR comparado àqueles com TMB baixo e o TMB alto foi significativamente associado à um menor risco de recorrência (SLR mediana 38 meses versus 15 meses; SLR em 24 meses: 82% versus 28%, Hazard Ratio [HR] 0,27, 95% CI 0,09 – 0,77, Log-rank  $P= 0,009$ ; Figura 5C e Tabela 3). Na análise multivariada, TMB alto permaneceu como fator independentemente associado à menor recorrência aos tratamento com BCG (HR 0,28, 95% CI 0,10 – 0,82, Teste de Wald  $P= 0,021$ ; Tabela 3).

Figura 5 - Carga mutacional tumoral e benefício ao tratamento com BCG.

A

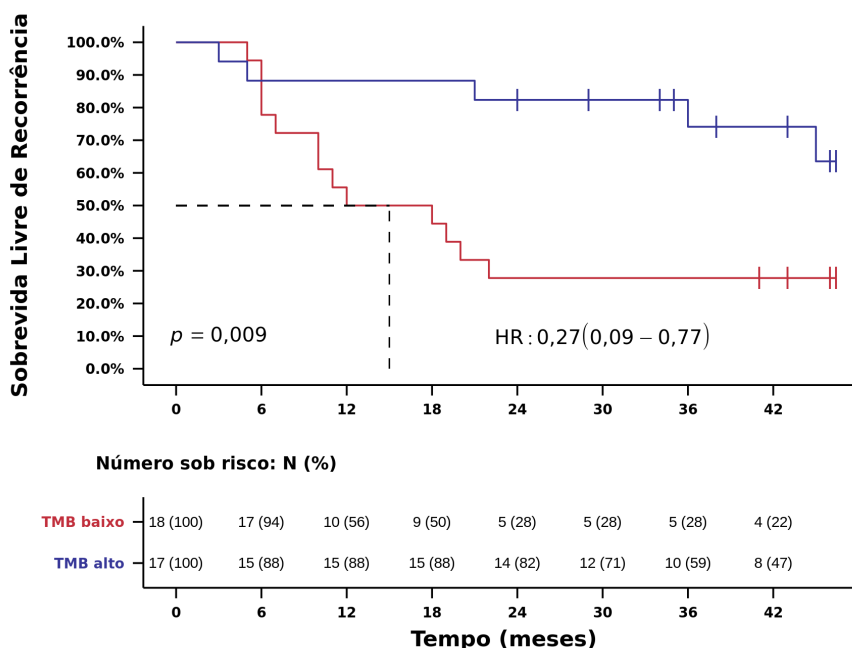


B





C



**Legenda:** (A) Carga mutacional tumoral (TMB) em tumores de pacientes BCG responsivos (BCG-R) e não responsivos (BCG-NR): TMB BCG-R 4,9 versus BCG-NR 2,8 mutações/Mb, Mann-Whitney  $P=0,032$  (B) Taxa de resposta ao BCG em pacientes com tumores com TMB alto comparado com TMB baixo (TMB alto 71% versus TMB baixo 28%, Odds Ratio (OR)= 6,24, 95% CI: 1,44-27,06, Pearson Chi-Square  $P=0,011$ ) (C) Curva de Kaplan-Meier da sobrevida livre de recorrência (SLR) após tratamento com BCG em pacientes com tumores com TMB alto comparado com TMB baixo (TMB alto: 38 meses versus TMB baixo: 15 meses, Hazard Ratio (HR) 0,27, 95% CI: 0,10- 0,77, Log-rank  $P=0,009$ ).

**Tabela 2 -** Análise Univariada e Multivariada da taxa de resposta ao BCG de acordo com características clínicas e genômicas.

Variáveis	Análise Univariada			Análise Multivariada TMB*			Análise Multivariada NAL*		
	OR	95% CI	p-valor	OR	95% CI	p-valor	OR	95% CI	p-valor
Idade ( <b>&lt; 75</b> vs. <b>&gt;=75</b> )	5.62	1.18 – 26.85	0.024	4.50	0.84 – 24.01	0.078	5.97	1.05 – 33.89	0.044
Gênero ( <b>feminino</b> vs. masc)	0.44	0.04 – 5.37	0.603	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Grau ( <b>baixo</b> vs. alto)	4.57	0.46 – 45.86	0.338	NA	NA	NA	NA	NA	NA
No. tumores ( <b>único</b> vs. múltiplo)	0.29	0.06 – 1.38	0.146	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Tamanho tumor ( <b>&lt;3</b> vs. <b>&gt;=3</b> cm)	0.55	0.13 – 2.26	0.404	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Estádio tumor ( <b>Ta</b> vs. T1)	0.92	0.21 – 4.00	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
CIS Concomitante ( <b>não</b> vs. sim)	0.50	0.04 – 6.08	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Tipo histológico ( <b>puro</b> vs. outros)	1.07	0.13 – 8.56	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TMB ( <b>baixo</b> vs. alto)	6.24	1.44 – 27.06	0.011	5.20	1.11 – 24.34	0.036	NA	NA	NA
NAL ( <b>baixo</b> vs. alto)	6.24	1.44 – 27.06	0.011	NA	NA	NA	6.57	1.32 – 32.67	0.021
DDR ( <b>selvagem</b> vs. mut)	3.73	0.79 – 17.68	0.088	NA	NA	NA	NA	NA	NA

\* Dados de TMB, NAL e DDR não foram incluídos simultaneamente nos modelos multivariados devido à colinearidade entre estas variáveis. As variáveis que atingiram nível de significância  $\leq 0,1$  no modelo univariado foram incluídas na análise multivariada.

Abreviaturas: masc: masculino, OR: odds ratio, CI: intervalo de confiança, CIS: *carcinoma in situ*, TMB: carga mutacional tumoral, NAL: carga de neoantígenos, DDR: reparo de dano do DNA, wt: selvagem (não mutado), mut: mutado, NA: não analisado.

**Tabela 3 -** Análise Univariada e Multivariada da sobrevida livre de recorrência após tratamento com BCG de acordo com características clínicas e genômicas.

Variável	Análise Univariada			Análise Multivariada TMB*			Análise Multivariada NAL*			Análise Multivariada DDR*		
	HR	95% CI	p-valor	HR	95% CI	p-valor	HR	95% CI	p-valor	HR	95% CI	p-valor
Idade ( <b>&lt; 75</b> vs. <b>&gt;=75</b> )	0.23	0.07 - 0.84	0.016	0.24	0.07 - 0.91	0.036	0.21	0.06 - 0.80	0.022	0.20	0.05 - 0.72	0.014
Gênero ( <b>feminino</b> vs masc)	1.79	0.24 - 13.44	0.563	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Grau ( <b>baixo</b> vs. alto)	0.44	0.14 - 1.35	0.141	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
No. tumores ( <b>único</b> vs. múltiplo)	2.24	0.65 - 7.74	0.188	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Tamanho tumor ( <b>&lt;3</b> vs. <b>&gt;=3</b> cm)	1.65	0.58 - 4.64	0.349	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Estádio tumor ( <b>Ta</b> vs. T1)	1.13	0.40 - 3.16	0.811	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
CIS Concomitante ( <b>não</b> vs. sim)	2.67	0.61 - 11.82	0.187	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Tipo histológico ( <b>puro</b> vs. outros)	1.52	0.34 - 6.72	0.597	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TMB ( <b>baixo</b> vs. alto)	0.27	0.10 - 0.77	0.009	0.29	0.10 - 0.83	0.021	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NAL ( <b>baixo</b> vs. alto)	0.30	0.11 - 0.85	0.017	NA	NA	NA	0.28	0.10 - 0.81	0.019	NA	NA	NA
DDR ( <b>selvagem</b> vs. mut)	0.33	0.13 - 0.86	0.017	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.28	0.10 - 0.73	0.009

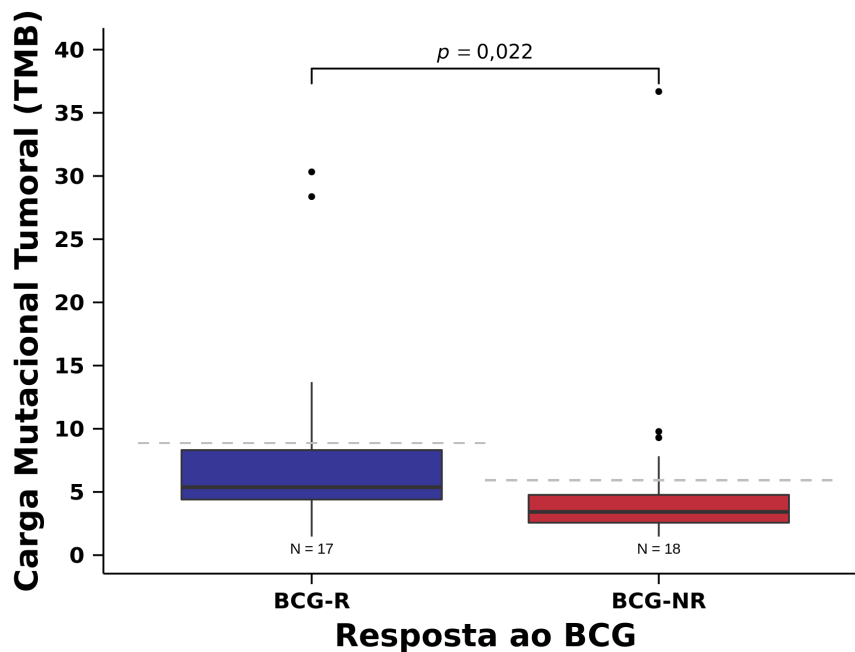
\* Dados de TMB, NAL e DDR não foram incluídos simultaneamente nos modelos multivariados devido à colinearidade entre estas variáveis. As variáveis que atingiram nível de significância  $\leq 0,1$  no modelo univariado foram incluídas na análise multivariada.

Abreviaturas: masc: masculino, OR: odds ratio, CI: intervalo de confiança, CIS: *carcinoma in situ*, TMB: carga mutacional tumoral, NAL: carga de neoantígenos, DDR: reparo de dano do DNA, wt: selvagem (não mutado), mut: mutado, NA: não analisado.

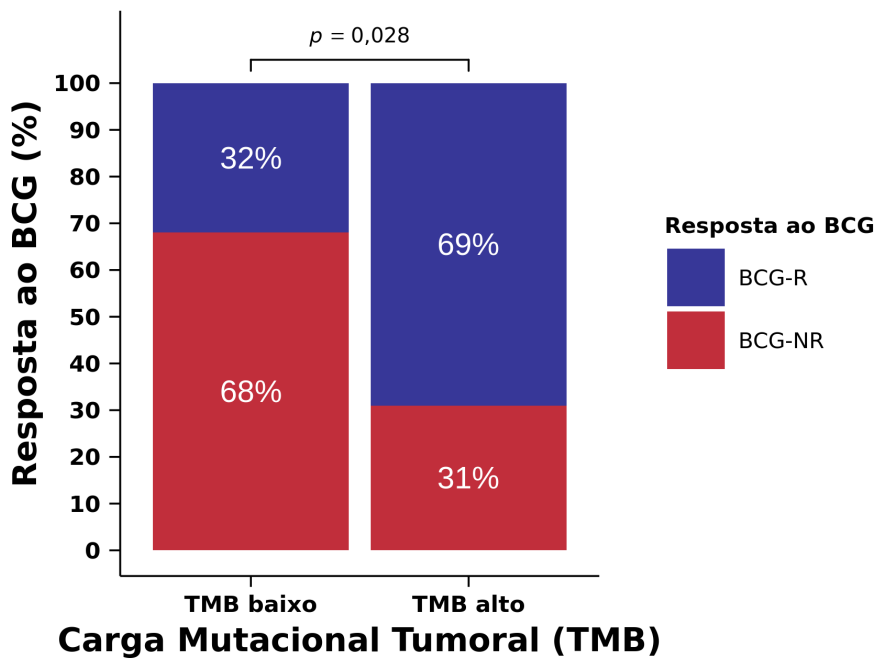
Conforme descrito na seção 3.0 (Materiais e Métodos), foi realizado o sequenciamento do exoma total dos tumores de pacientes incluídos neste estudo, e todas as análises genômicas foram obtidas a partir do sequenciamento do exoma. Entretanto, sabemos que existem muitas plataformas de sequenciamento genético que são utilizadas na prática clínica e incorporadas no processo de decisão terapêutica de muitas neoplasias. Desta forma, os painéis compreensivos de genes relacionados ao câncer (CCGP, do inglês *comprehensive cancer gene panels*) podem ser utilizados para estimar a carga mutacional e prever benefício à imunoterapia<sup>80,81</sup>. Com o objetivo de avaliar se o TMB estimado a partir de CCGP poderia estar associado à benefício com tratamento com BCG, foi realizado o cálculo do TMB usando mutações somáticas presentes no *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets panel* (MSKCC-IMPACT), com 468 genes avaliados<sup>118,119</sup>. O TMB (MSK-IMPACT) foi maior no grupo BCG-R comparado ao grupo BCG-NR (TMB 5,4 [IQR 4,4 – 8,3] versus 3,4 [IQR 2,6 – 4,8] mutações/Mb, Mann-Whitney  $P= 0,022$ , Figura 6A). A resposta ao BCG foi maior nos pacientes com TMB (MSK-IMPACT) alto (acima da mediana) comparado com o TMB baixo (resposta ao BCG: 69% versus 32%, OR 4,77, 95% CI 1,14 – 19,98, Pearson qui-quadrado  $P= 0,028$ , Figura 6B). Além disso, pacientes com TMB (MSK-IMPACT) alto tiveram maior SLR comparado com pacientes com TMB baixo (SLR mediana de 36,5 meses versus 19 meses, SLR em 24 meses: 75% versus 37%, HR 0,36, 95% CI 0,13 – 1,02, Log-rank  $P= 0,045$ ; Figura 6C).

**Figura 6 -** Carga mutacional estimada através de painel compreensivos de genes relacionados ao câncer (MSK-IMPACT) e benefício ao tratamento com BCG.

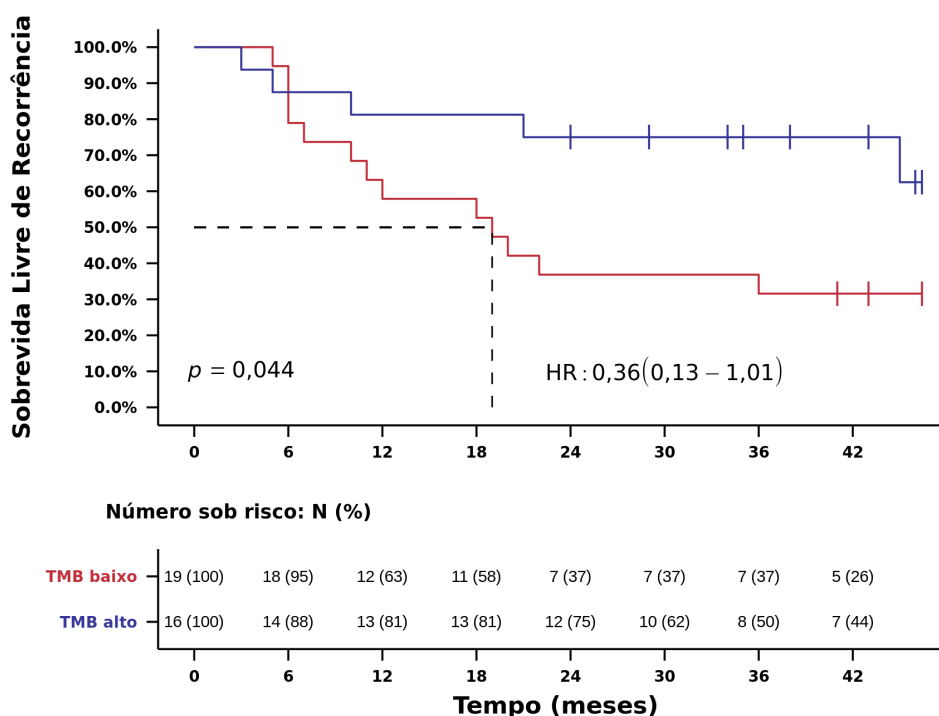
**A**



**B**



C

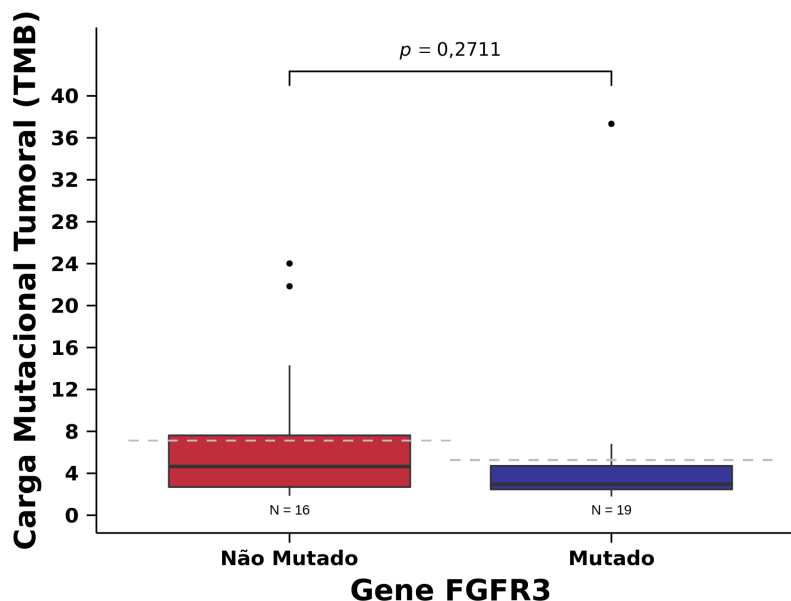


**Legenda:** (A) Carga mutacional tumoral (TMB) estimada utilizando o painel MSK-IMPACT em tumores de pacientes com doença responsiva ao BCG (BCG-R) e não responsiva ao BCG (BCG-NR): TMB BCG-R 5,4 vs. BCG-NR 3,4 mutações/Mb, Mann-Whitney  $P=0,022$ ) (B) Taxa de resposta ao BCG em pacientes com tumores com TMB-alto comparado com TMB-baixo utilizando o painel MSK-IMPACT: taxa de resposta TMB-alto: 69% vs. TMB-baixo 32%, OR = 4,77, 95% CI: 1,14-19,98, Chi-Square  $P=0,028$ ). (C) Curva de Kaplan-Meier da sobrevida livre de recorrência (SLR) em pacientes com tumores com TMB-alto e TMB-baixo utilizando o painel MSK-IMPACT: RFS TMB-alto: 36,5 meses vs. TMB-baixo: 19 meses, HR= 0,36, 95% CI: 0,13-1,02, Log-rank  $P=0,045$ ).

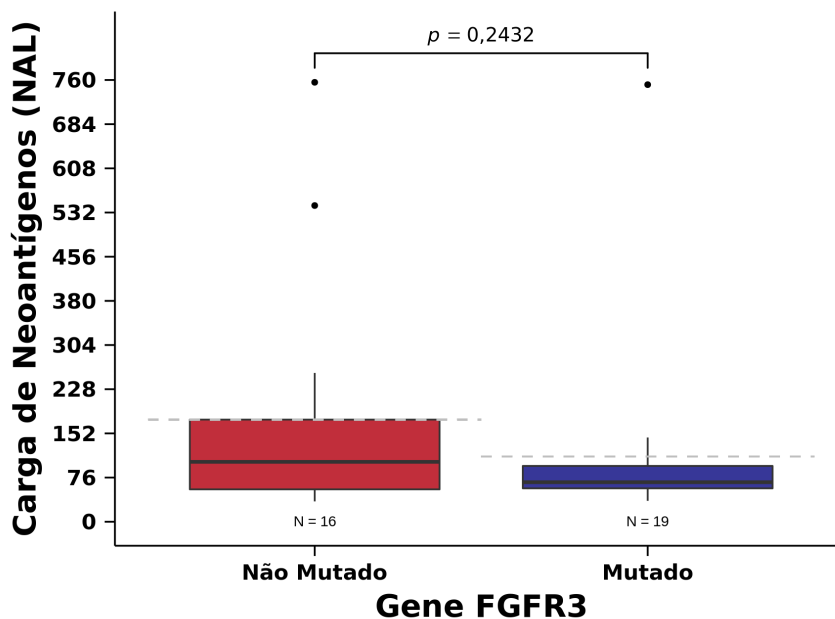
Na coorte deste estudo não foi demonstrada associação entre TMB alto com nenhuma alteração genética específica. Um dado interessante evidenciado em análise exploratória foi que pacientes com alterações no gene FGFR3 demonstraram um TMB menor que pacientes sem alterações neste gene, mas que não atingiu significância estatística (TMB 2,9 [IQR 2,5 – 4,7] versus 4,7 [IQR 2,7 – 7,6] mutações/Mb, Mann-Whitney  $P= 0,271$ ; Figura 7A). A mesma tendência foi observada na carga de neoantígenos (NAL) em pacientes com mutações em FGFR3 (NAL 68 [IQR 57,5 – 96,0] vs. 103 [IQR 55,8 – 175,8] neoantígenos estimados, Mann-Whitney  $P= 0,243$ ; Figura 7B).

**Figura 7 -** Carga mutacional tumoral e carga de neoantígenos em tumores com alterações no gene FGFR3.

**A**



**B**

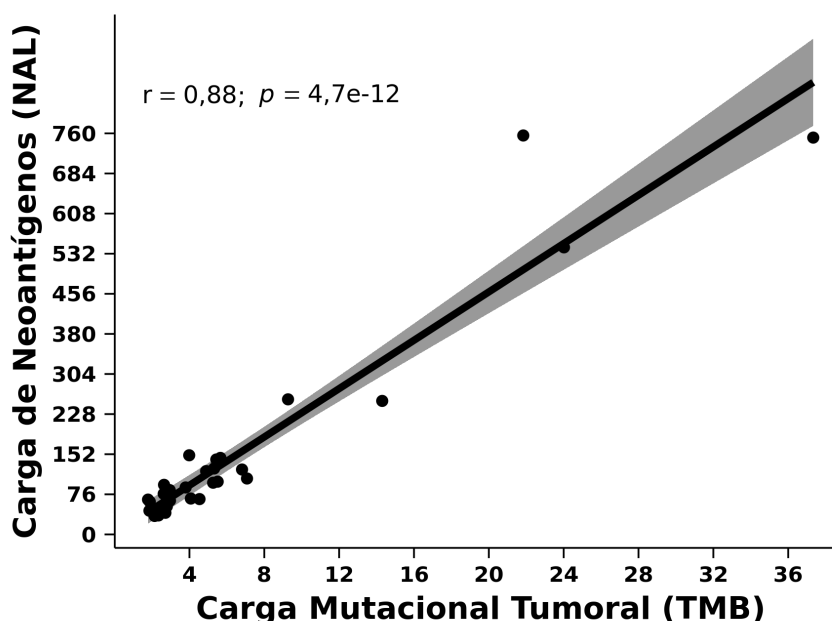


**Legenda:** (A) Carga mutacional tumoral (TMB) em tumores FGFR3 selvagem (WT, do inglês, *wild type*) e mutado (MUT): TMB FGFR3-WT 4,7 vs. FGFR3-MUT 2,8, mutações/Mb, Mann-Whitney  $P=0,2711$ ) (B) Carga de neoantígenos (NAL em tumores FGFR3-WT e FGFR3-MUT: TMB 103 vs. 68 antígenos estimados, respectivamente, Mann-Whitney  $P=0.2432$ ).

### 4.3 CARGA TOTAL DE NEOANTÍGENOS (NAL) E BENEFÍCIO AO TRATAMENTO COM BCG

Na coorte deste estudo, foi identificada uma mediana de 78 neoantígenos estimados por amostra de tumor (IQR 55,5 – 124,0) (Tabela S1 e Tabela S3 [<https://content.iospress.com/articles/bladder-cancer/blc200289>]) e a carga total de neoantígenos (NAL) estimada se correlacionou fortemente com o TMB (Correlação de Spearman 0,88,  $P < 0,001$ ; Figura 8).

**Figura 8** - Correlação entre a carga mutacional tumoral e a carga de neoantígenos.



**Legenda:** Teste de correlação de Spearman entre a carga mutacional tumoral (TMB) e a carga de neoantígenos (NAL) nos pacientes portadores de CNMIB do estudo ( $r=0,88$ , Teste de Pearson  $P < 0,001$ ).

A carga de neoantígenos foi superior no grupo BCG-R em comparação com o BCG-NR (NAL 100,0 [IQR 75,0 – 145,0] versus 65,0 [IQR 48,3 – 82,5] neoantígenos tumorais estimados, Mann-Whitney  $P = 0,032$ ; Figura 9A). Em relação à taxa de resposta ao BCG, foi observada uma maior resposta ao BCG em pacientes com tumores que apresentavam NAL alto (definido como NAL acima da mediana de neoantígenos estimados) e tumores com NAL alto se associaram de forma estatisticamente significativa à resposta ao BCG comparado com NAL baixo (resposta ao BCG: 71% versus 28%, OR 6,24, 95% CI 1,44 – 27,06, Pearson qui-

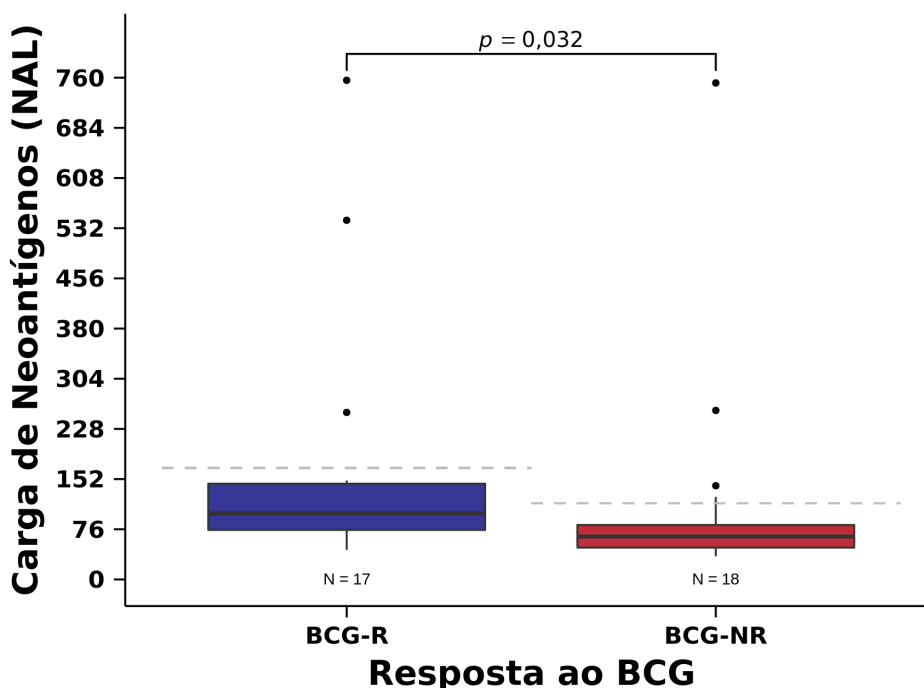


quadrado  $P= 0,011$ ; Figura 9B e Tabela 2). Na análise multivariada, NAL alto permaneceu como fator independente relacionado à resposta ao BCG (OR 6,57, 95% CI 1,32 – 32,67,  $P= 0,021$ ; Tabela 2).

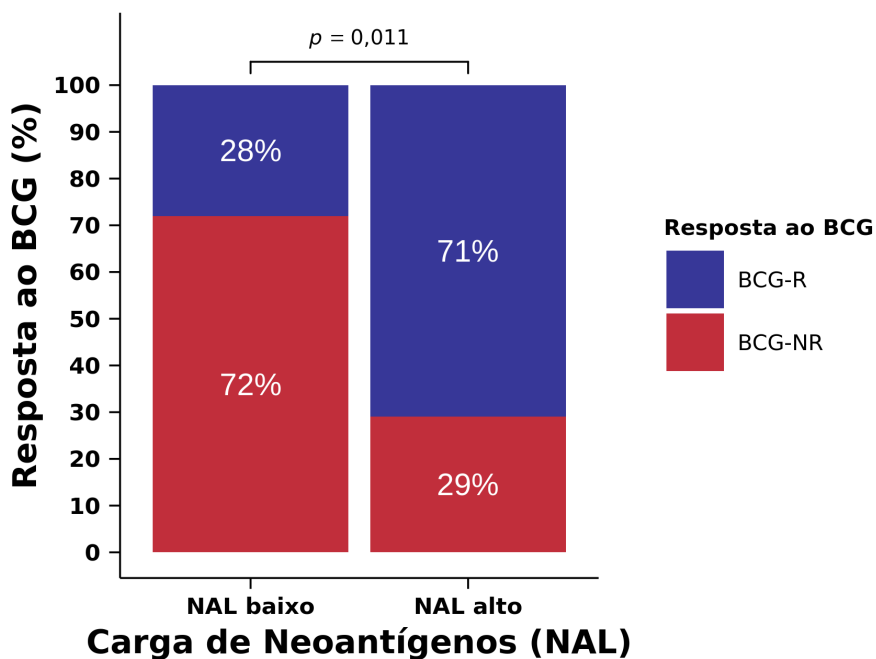
A análise de SLR também demonstrou que pacientes que apresentavam tumores com NAL alto tiveram uma maior SLR quando comparados a NAL baixo (SLR mediana 36,0 meses versus 18,5 meses, SLR em 24 meses: 76% versus 33%, HR 0,30, 95% CI 0,11 – 0,85, Log-rank  $P= 0,016$ ; Figura 9C e Tabela 3). Na análise multivariada, a carga de neoantígenos foi um fator independentemente associado à SLR após tratamento com BCG (HR 0,28, 95% CI 0,10 – 0,81, Teste de Wald  $P= 0,019$ ; Tabela 3). Importante enfatizar que devido a colinearidade entre NAL e TMB (Figura 8), estas duas variáveis não foram incluídas simultaneamente no modelo de análise multivariada e não foi possível realizar análises estratificadas pelo NAL e TMB devido ao tamanho amostral do estudo.

**Figura 9 -** Carga total de neoantígenos e benefício ao tratamento com BCG.

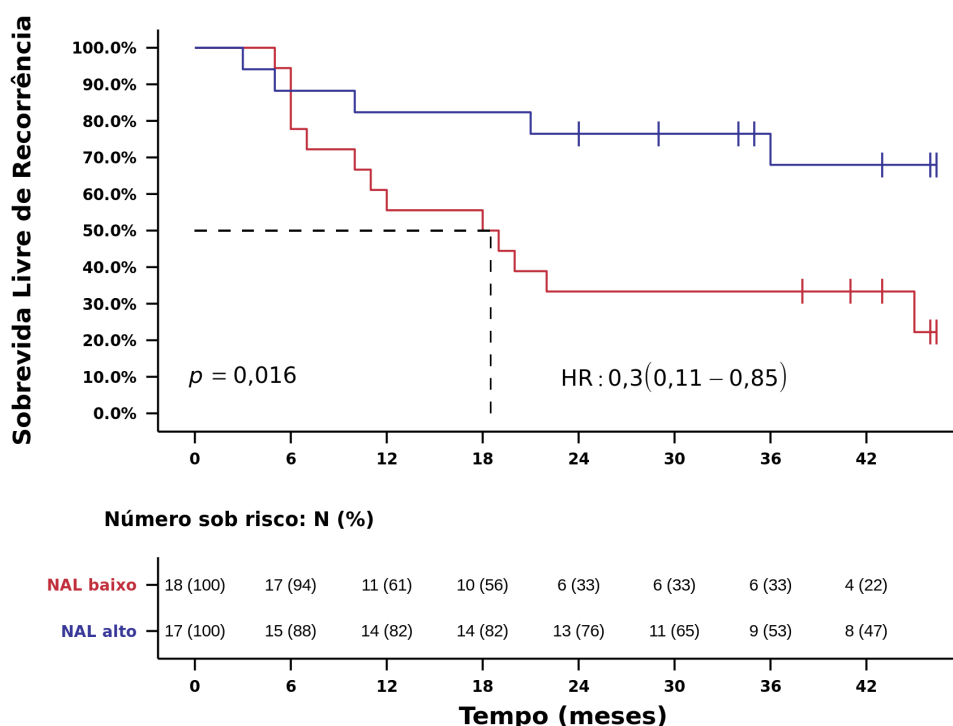
A



B



C



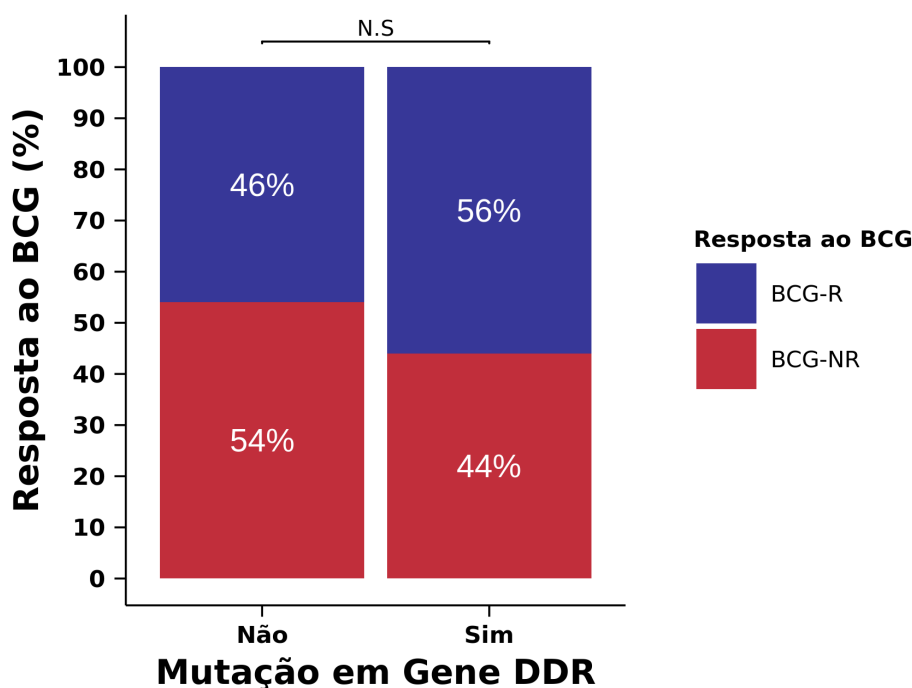
**Legenda:** (A) Carga de neoantígenos em pacientes com doença responsiva ao BCG (BCG-R) e não responsiva ao BCG (BCG-NR): NAL BCG-R 100,0 vs. BCG-NR 65,0 neoantígenos estimados, Mann-Whitney  $P=0,032$  (B) Taxa de resposta ao BCG em pacientes com tumores com NAL-alto comparado com NAL-baixo: taxa de resposta NAL-alto: 71% vs. NAL-baixo 28%, OR = 6,24, 95% CI: 1,44-27,06, Chi-Square  $P=0,011$ . (C) Curva de Kaplan-Meier da sobrevida livre de recorrência (SLR) em pacientes com tumores com NAL-alto e NAL-baixo: RFS NAL-alto: 36 meses vs. NAL-baixo: 18,5 meses, HR= 0,30, 95% CI: 0,11-0,85, Log-rank  $P=0,017$ ).

#### 4.4 MUTAÇÕES EM GENES DE REPARO DE DNA (DDR) E BENEFÍCIO AO TRATAMENTO COM BCG

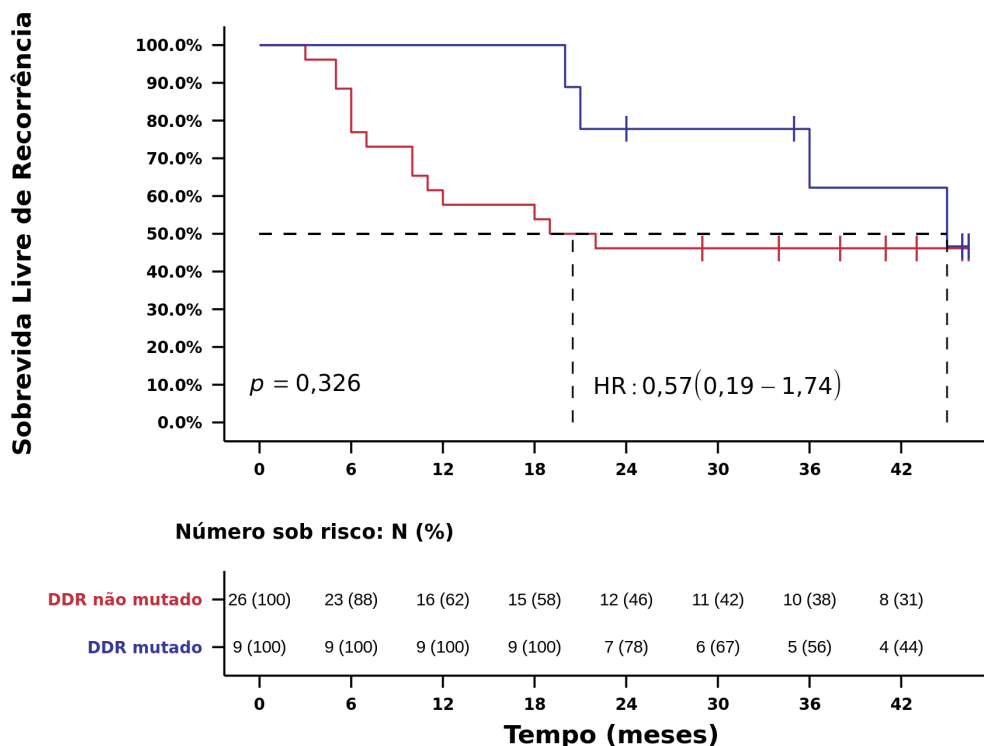
Conforme discutido em seções anteriores, estudos recentes têm demonstrado que a presença de alterações em genes de reparo do DNA (DDR) estão associadas a alta carga mutacional tumoral e maior benefício com imunoterapia em carcinoma urotelial avançado <sup>92,93</sup>. Com base neste racional, foi investigada a associação entre presença de alterações em genes DDR e benefício à imunoterapia com BCG intravesical nos pacientes com carcinoma urotelial superficial incluídos neste estudo. Utilizando uma lista de 34 genes DDR previamente associada à benefício com imunoterapia em carcinoma urotelial avançado <sup>92</sup>, foi observado uma tendência de associação entre alterações em genes DDR com resposta ao BCG e SLR após o tratamento com BCG, mas sem significância estatística (Figuras 10A e 10B), Importante ressaltar que somente 9 pacientes apresentavam pelo menos 1 alteração em genes DDR desta lista de 34 genes.

**Figura 10 -** Mutações em genes de reparo de DNA (lista de 34 genes) e benefício ao tratamento com BCG

**A**



B



**Legenda:** (A) Taxa de resposta ao BCG em pacientes com tumores com mutações deletérias em genes de reparo do DNA (DDR-MUT) comparado com tumores sem mutações em genes DDR (DDR-WT): DDR-MUT 71% versus DDR-WT 28%, Odds Ratio (OR)= 1,58, 95% CI: 0,32-6,70, Chi-Square  $P=0,711$  (B) Curva de Kaplan-Meier da sobrevida livre de recorrência (SLR) após tratamento com BCG em pacientes com tumores DDR-MUT comparado com DDR-WT: 36 meses versus 20 meses, respectivamente, Hazard Ratio (HR) 0,57, 95% CI: 0,19- 1,74, Log-rank  $P=0,322$ .

Posteriormente foi realizada análise com uma lista maior de 193 genes que tem papel direto no reparo ao dano do DNA <sup>120</sup>. Nesta análise, 68,6% tumores (24 pacientes) apresentavam ao menos 1 alteração deletéria em gene DDR (Tabela S1 [<https://content.iospress.com/articles/bladder-cancer/blc200289>]). Foi observada associação estatisticamente significativa entre a presença de alterações em genes DDR (lista de 193 genes) e alta carga mutacional (TMB 4,3 [IQR 2,8 – 5,9] versus 2,7 [IQR 2,2 – 3,4] mutações/Mb, Mann-Whitney  $P= 0,049$ ; Figura 11A). Um dado interessante demonstrado foi que todos os 3 pacientes que apresentavam TMB acima de 20 mutações/Mb tinham mutações deletérias no gene ERCC2 (Figura 2). Um total de 48 das 139 mutações somáticas identificadas em genes DDR foram classificadas como mutações deletérias (*missense*, *nonsense*, *splice-site*, *frameshift indels*) (Tabela S4 [<https://content.iospress.com/articles/bladder-cancer/blc200289>]).

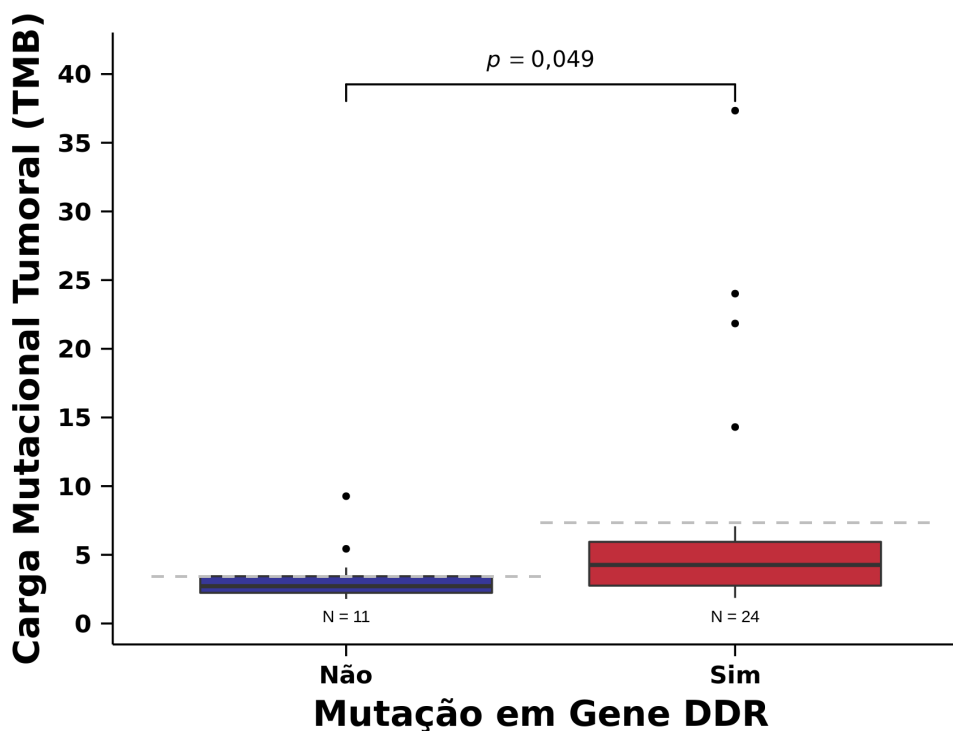
A resposta ao tratamento com BCG intravesical foi numericamente maior em pacientes que apresentavam pelo menos 1 mutação em genes DDR, mas não foi

demonstrada correlação estatisticamente significativa entre alteração em genes DDR e resposta ao BCG (resposta ao BCG: 58% versus 27%, OR 3,73, 95% CI 0,79 – 17,68, Pearson qui-quadrado  $P= 0,088$ ; Figura 11B e Tabela 2). Apesar de não ter sido demonstrado associação definida com resposta ao BCG, a presença de alterações deletérias em genes DDR se correlacionou com maior SLR comparado a tumores com ausência de alterações deletérias em genes DDR (SLR mediana 35,5 versus 11 meses, SLR em 24 meses: 78% versus 46%, HR 0,33, 95% CI 0,13 – 0,86, Log-rank  $P= 0,017$ ; Figura 11C, Tabela 3). Devido a colinearidade entre DDR e TMB (Figura 11A), estas duas variáveis não foram incluídas simultaneamente no modelo de análise multivariada e não foi possível realizar análises estratificadas pelo DDR e TMB devido ao tamanho amostral do estudo.

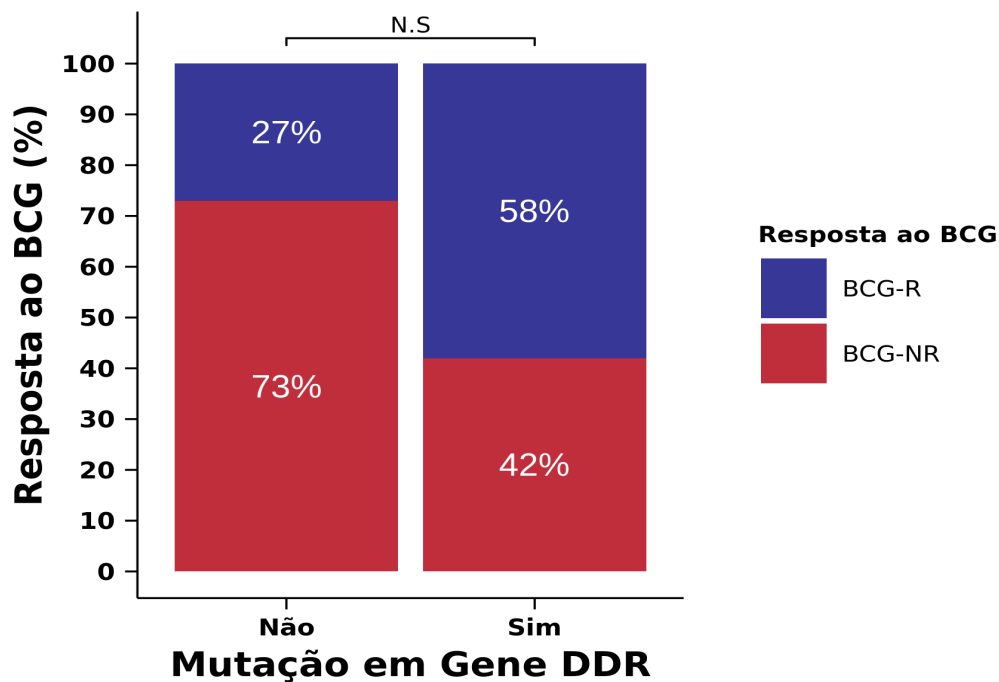
Uma descrição gráfica detalhada da evolução após o tratamento com BCG de cada um dos 35 pacientes (BCG-R e BCG-NR) incluídos neste estudo, de acordo com o seu perfil genômico (TMB, NAL, DDR) encontra-se na Figura 12.

**Figura 11 -** Mutações em genes de reparo de DNA (lista de 193 genes) e benefício ao tratamento com BCG.

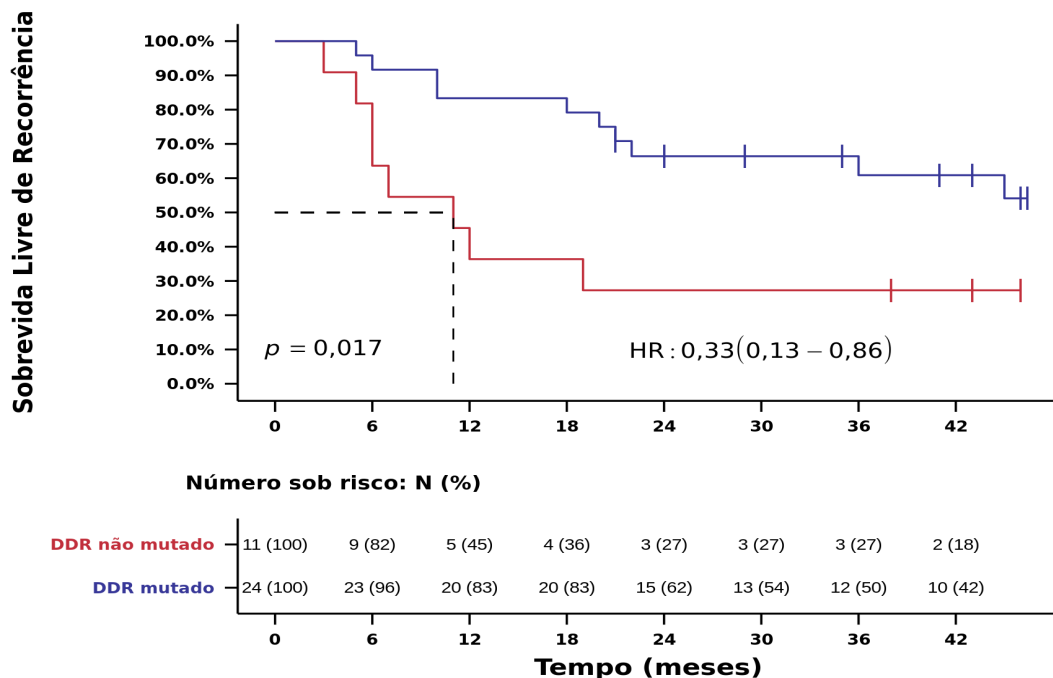
A



B

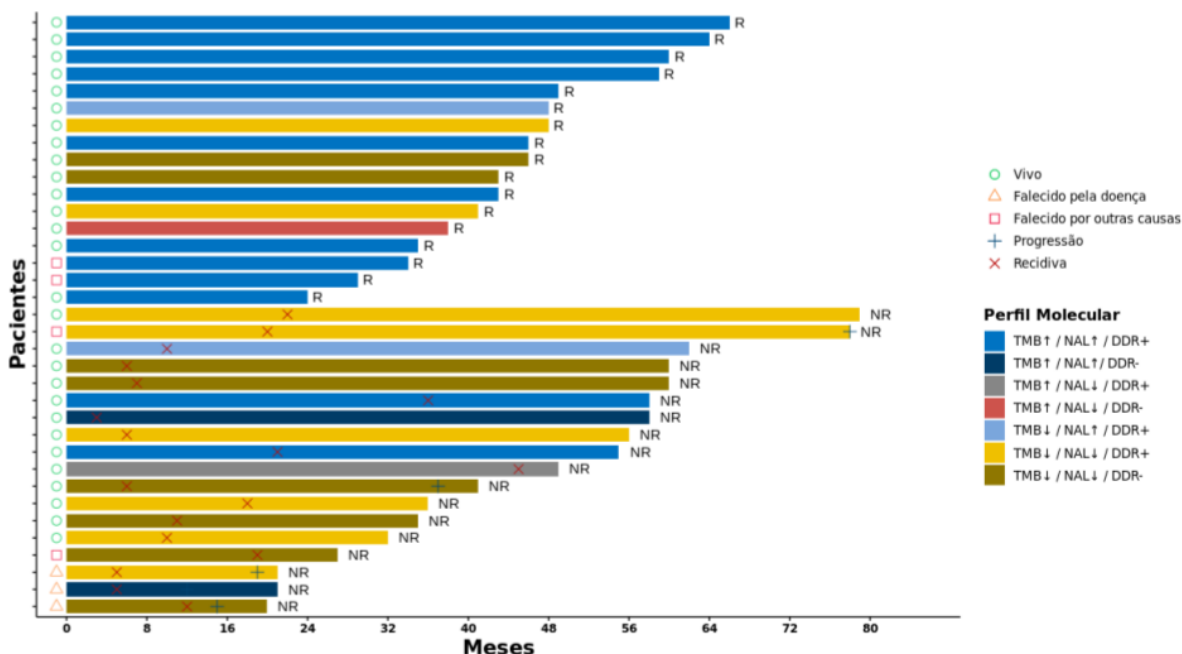


C



**Legenda:** (A) Carga mutacional tumoral (TMB) em tumores de pacientes com mutações deletérias em genes de reparo do DNA (DDR-MUT) comparado com tumores sem mutações em genes DDR (DDR-WT): TMB DDR-MUT 4,3 versus DDR-WT 2,7 mutações/Mb, Mann-Whitney  $P=0,049$ ) (B) Taxa de resposta ao BCG em pacientes com tumores DDR-MUT comparado com DDR-WT: DDR-MUT 58% versus DDR-WT 27%, Odds Ratio (OR)= 3,73, 95% CI: 0,79-17,68, Chi-Square  $P=0,088$ ) (C) Curva de Kaplan-Meier da sobrevida livre de recorrência (SLR) após tratamento com BCG em pacientes com tumores DDR-MUT comparado com DDR-WT : 35,5 meses versus 11 meses, respectivamente, Hazard Ratio (HR) 0,33, 95% CI: 0,13- 0,86, Log-rank  $P=0,017$ ).

**Figura 12 -** Descrição gráfica da evolução após o tratamento com BCG dos 35 pacientes incluídos neste estudo, de acordo com a resposta ao BCG (BCG-R e BCG-NR) e o seu perfil genômico (TMB, NAL, DDR).



**Legenda:** Descrição gráfica dos pacientes portadores de carcinoma urotelial não músculo invasivo tratados com BCG incluídos neste estudo. Cada coluna representa um paciente incluído no estudo e a evolução no tempo (em meses) após o tratamento com BCG. Desfecho clínico (recidiva [x] ou progressão [+]) e sobrevida (vivo [o], falecido pela doença [Δ] ou falecido por outras causas [□]) dos pacientes BCG-R e BCG-NR estão descritos no gráfico. As diferentes cores de cada paciente representam o *status* genômico em relação ao TMB (alto [↑] e baixo [↓]), NAL (alto [↑] e baixo [↓]) e mutações DDR (selvagem [DDR-] e mutado [DDR+]).

***DISCUSSÃO***

---



## 5 DISCUSSÃO

O tratamento padrão do carcinoma urotelial não músculo invasivo envolve a realização de RTU do tumor de bexiga seguida do tratamento com BCG intravesical, com o objetivo de reduzir o risco de recorrência e progressão da doença. A indicação do tratamento com BCG é realizada mediante evidência de fatores associados à maior risco de recorrência, como o estágio T (Ta versus T1) definido na análise anatomopatológica da amostra de RTU, grau do tumor (alto versus baixo grau), presença de carcinoma *in situ*, número e tamanho da lesão vesical<sup>107,121</sup>. Entretanto, sabe-se que estes fatores são prognósticos em termos de risco de recidiva e progressão da doença e uma parcela significativa de pacientes com fatores de risco pode evoluir com recidiva da doença mesmo após tratamento com o BCG. Desta forma, há a necessidade da identificação de fatores preditivos de benefício ao BCG com objetivo de selecionar pacientes com maior chance de benefício à esta terapia e evitar o uso de BCG em pacientes com fatores associados à doença refratária. Desta forma, seria maximizado o benefício do BCG para pacientes selecionados e poderia ser oferecido tratamentos alternativos para pacientes com pequena chance de benefício ao BCG, poupando risco de toxicidade com o tratamento.

Um outro ponto importante na seleção de pacientes com maior chance de resposta ao BCG é o cenário de desabastecimento mundial do BCG, inclusive no Brasil, com períodos recentes de falta do BCG no mercado brasileiro nos últimos anos<sup>122,123</sup>. Apesar de existirem opções terapêuticas no caso de indisponibilidade ao BCG, como por exemplo o uso de quimioterapia intravesical com gemcitabina, o tratamento com BCG ainda é considerado o tratamento padrão com maior chance de resposta. Estratégias atuais durante o período de falta do BCG nos mercados mundiais tem sido o uso de doses mais baixas do BCG, priorização do tratamento de indução (sem manutenção), uso de diferentes cepas do BCG e mesmo seleção de pacientes de maior risco de recidiva e progressão<sup>122-125</sup>. Apesar de potencialmente úteis, estas estratégias podem levar a uma menor eficácia do tratamento e maior risco de recidiva do carcinoma urotelial de bexiga. Neste contexto, um estudo avaliou o tratamento com BCG intravesical em um total 402 pacientes, divididos em período de abastecimento normal e falta do BCG<sup>126</sup>. Nesta análise retrospectiva foi

identificado um aumento no risco de recidiva do carcinoma urotelial de 16,2% no período em que o tratamento com BCG estava disponível para 46,9% no período de desabastecimento do BCG. Além disto, neste estudo foi identificado um aumento de custos relacionados ao tratamento no período de falta do BCG <sup>126</sup>. Para minimizar o impacto do desabastecimento do BCG para os pacientes, a incorporação de biomarcadores genômicos / moleculares na seleção de pacientes poderia amplificar o uso mais seletivo e eficaz do BCG.

Recentemente foi proposto um imunograma de carcinoma urotelial incluindo potenciais biomarcadores de benefício à imunoterapia, com fatores relacionados ao tumor e hospedeiro em 7 eixos: capacidade de reconhecimento do tumor pelo sistema imune (*"tumor foreignness"*), capacidade de infiltração imune, pontos de verificação imune (*"immune checkpoints"*), inibidores solúveis, metabolismo tumoral inibitório, estado imune geral e sensibilidade tumoral à mecanismos de resposta imune efetora <sup>127,128</sup>. Um dos eixos mais estudados para identificação de biomarcadores são os fatores relacionados ao tumor com potencial de gerar reconhecimento do sistema imune, que inclui a carga mutacional tumoral (TMB), presença de mutações genéticas específicas (por exemplo, mutações em genes de reparo de DNA) e a carga de neoantígenos (NAL). Desta forma, este estudo teve como objetivo identificar biomarcadores genômicos de benefício ao tratamento com BCG através da análise do sequenciamento do exoma total de tumores de pacientes portadores de carcinoma urotelial superficial submetidos a RTU de bexiga e tratados com BCG. O resultado mais relevante encontrado no estudo foi a associação independente entre TMB alto com a chance de resposta ao BCG e maior sobrevida livre de recorrência, sendo observado uma mediana do TMB maior nos pacientes com doença responsiva ao BCG (BCG-R) quando comparado com o grupo não responsivo do BCG (BCG-NR). Esta associação entre TMB alto e resposta ao BCG se manteve após análise multivariada e foi observada com TMB calculado a partir dos dados do sequenciamento do exoma total e também restringindo o cálculo baseado nos genes do painel MSKCC-IMPACT. Caso esta associação seja confirmada em coortes maiores e independentes, o TMB pode ser integrado a outros potenciais biomarcadores para selecionar pacientes para tratamento com BCG com maior chance de benefício.

Recentemente a carga mutacional tumoral tem sido identificada como biomarcador preditivo de resposta à imunoterapia em diferentes neoplasias sólidas

<sup>117,129</sup>, incluindo em pacientes com carcinoma urotelial avançado. Mesmo em estádios menos avançados, o TMB alto parece ter correlação com resposta à imunoterapia neoadjuvante antes da cistectomia em pacientes portadores de carcinoma urotelial músculo invasivo da bexiga <sup>64</sup>. Desta forma, a determinação do TMB tem se tornado cada vez mais acessível com a introdução e maior disponibilidade das plataformas de sequenciamento de última geração (NGS, do inglês, *next-generation sequencing*) e estudos de validação do TMB como biomarcador preditivo de resposta à imunoterapia estão em andamento <sup>129</sup>.

Entretanto, existem inúmeros desafios para validação e implementação do TMB e outros potenciais biomarcadores genômicos como biomarcadores preditivos de resposta à imunoterapia. O cálculo do TMB envolve uma série de etapas complexas que podem impactar nos resultados finais e que necessitam ser adequadamente padronizadas: coleta da amostra biológica, extração e processamento do DNA, etapa de sequenciamento, análises de bioinformática, formulação de relatório de resultados e o escore final do TMB <sup>83</sup>. Desta forma, estes desafios incluem a variabilidade do tipo e metodologia de avaliação (por exemplo painéis de sequenciamento genético com número variável de genes sequenciados) e a dificuldade de acesso ao sequenciamento do exoma total, tanto pelo custo quanto pela limitação de recursos tecnológicos e de bioinformática para implementação em larga escala. Um ponto importante a ser discutido em termos de validação do TMB como biomarcador é a dificuldade de harmonização na forma de reportar os resultados de TMB, valores de referência e pontos de corte para definição do TMB baixo versus TMB alto, já que os valores medianos do TMB variam significativamente nas diferentes neoplasias sólidas <sup>84</sup>. Estudo recente comparou resultados de TMB de 11 laboratórios de referência com o objetivo de caracterizar a variabilidade das estimativas de TMB de painéis de sequenciamento diferentes e propor estratégias de harmonização das análises para guiar as fases de validação analítica, relatório de resultados do TMB para futura incorporação como biomarcador de resposta à imunoterapia <sup>82</sup>. Neste estudo, os laboratórios utilizaram dados de sequenciamento de exoma total (WES) de amostras de múltiplos tumores do TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) e calcularam o TMB baseado nos genes contidos nas respectivas plataformas de sequenciamento genético de cada instituição participante. O TMB referência foi calculado a partir dos dados de WES e comparado com TMB calculado a partir dos painéis de genes em amostras de 32 tipos diferentes

de neoplasias. Os resultados deste estudo demonstraram que a variabilidade entre os painéis aumenta conforme valor do TMB, especialmente em alguns tipos de neoplasias como o câncer de bexiga, cólon e útero <sup>82</sup>. Para minimizar estas diferenças e padronizar as análises, iniciativas recentes identificaram estratégias importantes que incluem a padronização das etapas de coleta e processamento das amostras de tecido tumoral, seleção de painéis com ampla cobertura genômica, alinhamento dos valores de TMB dos painéis genéticos com análises de WES como referência, padronização das análises de bioinformática e adequar os relatórios de resultados de TMB para permitir resultados comparáveis <sup>83</sup>.

O tratamento intravesical com BCG é utilizado há muitos anos e inúmeros estudos buscaram avaliar os mecanismos de ação desta modalidade de imunoterapia. Mas a despeito desta intensa investigação, o mecanismo de ação do BCG para redução do risco de recidiva do carcinoma urotelial superficial não é completamente conhecido até os dias de hoje. Sabe-se que tanto fatores das células neoplásicas quanto do sistema imune local têm papel no efeito terapêutico anti-tumoral do BCG. Entretanto, não está claro se o efeito anti-tumoral é mediado pelo reconhecimento de antígenos tumorais, com subsequente indução de resposta imune tumor-específica ou se ocorre a indução pelo BCG de uma resposta imune inflamatória global, não tumor-específica, que por consequência leva à efeito anti-tumoral <sup>130,131</sup>. Estudos anteriores sugeriam que o principal efeito do BCG se relacionava com ativação de linfócitos T induzido pela presença da bactéria atenuada do BCG <sup>132</sup>. Entretanto, à luz do conhecimento atual de mecanismos de escape imune de inúmeras neoplasias como mecanismo de progressão à imunoterapia modernas, existe a hipótese de um mecanismo mais complexo de ação do BCG, que pode incluir ativação imune tumor-específica. Um estudo recente em modelo murino demonstrou que o tratamento com BCG induz um aumento da função de células T CD4+ específicas contra o tumor, especialmente através do aumento da produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) <sup>133</sup>. Estes resultados sugerem que o BCG é capaz de induzir imunidade tumor-específica através do aumento de função de linfócitos T CD4+ mediante expressão do receptor de IFN- $\gamma$  nas células neoplásicas. No presente estudo foi observada associação significativa entre a alta carga de neoantígenos (NAL) com maior chance de resposta ao BCG e maior SLR. Apesar do NAL não ser validado como biomarcador preditivo de resposta ao BCG, esta associação é uma evidência indireta que o BCG atua ativando o sistema imune ao

aumentar o reconhecimento de neoantígenos. Outro ponto importante do melhor entendimento dos mecanismos de ação do BCG é a possibilidade do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas eficazes no manejo de pacientes portadores de carcinoma urotelial superficial. Por exemplo, a identificação da carga de neoantígenos como fator associado a maior benefício ao BCG sugere que a estratégia de combinação de BCG com inibidores dos pontos de verificação imune (ICI, do inglês, *immune checkpoint inhibitors*) pode aumentar a eficácia do BCG. A atividade dos ICI inibidores de PD(L)1 no tratamento de pacientes com falha ao BCG está sendo intensamente investigada em estudos clínicos <sup>134</sup>. Recentemente, Kates e colaboradores demonstraram que a expressão de PDL1 por imunohistoquímica está associado à piores resultados de tratamento com BCG, indicando que pacientes neste subgrupo podem se beneficiar do uso combinado de BCG com ICI <sup>135</sup>. Estudo prospectivo avaliando o uso de pembrolizumabe, um inibidor de PDL1, em pacientes portadores de carcinoma urotelial não responsivo ao BCG (estudo Keynote 057) demonstrou taxa de resposta completa de 41%, com metade dos pacientes respondedores mantendo-se livres de doença com seguimento de pelo menos 1 ano <sup>66</sup>. Outro estudo de fase II (estudo SWOG S1605) avaliando o uso do inibidor de PDL1 atezolizumab em pacientes com carcinoma urotelial não músculo invasivo (carcinoma *in situ*) não responsivo ao BCG incluiu 75 pacientes e demonstrou taxa de resposta completa em 3 meses de 41% e 26% em 6 meses após o tratamento <sup>136</sup>. Pelo menos outros três estudos estão em andamento avaliando a eficácia da combinação de BCG com ICI (NCT02324582, NCT03528694, NCT02808143).

Atualmente há grande interesse na avaliação de mutações em genes de reparo de DNA (DDR) em pacientes portadores de carcinoma urotelial, já que um número crescente de estudos têm demonstrado maior chance de resposta em pacientes com estas alterações genômicas com tratamento de quimioterapia baseado em cisplatina e imunoterapia com inibidores de PD(L)1 <sup>92,137,138</sup>. Outro ponto importante é a associação entre a presença de mutações em genes de reparo de DNA e alta carga mutacional tumoral, que tem sido demonstrada em estudos recentes <sup>111,139</sup>. O presente estudo confirmou a presença de mutações deletérias em genes de reparo de DNA em 68,6% dos pacientes incluídos na análise e também uma associação significativa entre a presença destas mutações com alta carga mutacional. Utilizando uma lista ampla de 193 genes DDR, foi observada tendência de maior resposta ao BCG (apesar de não estatisticamente significativa) e maior

TMB mediano em pacientes com mutações DDR em comparação com pacientes sem mutações em um destes genes. Além disto, foi observado maior sobrevida livre de recorrência na análise univariada e multivariada, demonstrando que os pacientes com alterações em genes DDR nesta coorte apresentaram menor risco de recorrência após tratamento com BCG. Utilizando a lista menor com 34 genes DDR, previamente associada à benefício com imunoterapia no carcinoma urotelial metastático<sup>92</sup>, foi observada a mesma tendência de associação com maior resposta ao BCG neste estudo, entretanto, não houve significância estatística nesta análise provavelmente pelo pequeno número de pacientes com pelo menos alteração em 1 gene da lista de 34 genes DDR (9 pacientes). Recentemente, estudos têm sugerido que mutações no gene ATM se correlacionam com pior prognóstico no carcinoma urotelial, diferentemente de outros genes de reparo do DNA<sup>140,141</sup>. Na coorte deste estudo não foi observada esta associação, embora o pequeno tamanho da amostra não permita uma conclusão definitiva.

Uma implicação interessante dos resultados deste estudo é que pacientes com doença não responsiva ao BCG podem recidivar ou progredir com tumores que têm menor carga mutacional tumoral e menor potencial de apresentarem alterações em genes DDR, que são alterações genômicas que tem sido associadas à maior chance de resposta com tratamento com quimioterapia neoadjuvante e imunoterapia em estágios mais avançados da doença. De fato, um estudo que comparou pacientes com diagnóstico de câncer de bexiga músculo invasivo (CBMI) ao diagnóstico (*de novo*) versus CBMI secundário (que progrediram após diagnóstico de carcinoma superficial não músculo invasivo) demonstrou que os tumores secundários tiveram menor chance de benefício com quimioterapia neoadjuvante antes da cistectomia radical<sup>142</sup>. Além disso, foi demonstrado que CBMI *de novo* apresentaram um maior TMB mediano em comparação com CBMI secundário.

O tratamento do carcinoma urotelial não músculo invasivo após a falha ao BCG é complexo e desafiador, muitas vezes sendo indicado cistectomia radical precoce com o objetivo de minimizar risco de progressão com doença músculo invasiva e/ou metastática. Inúmeros estudos estão sendo realizados explorando novas estratégias neste cenário, inclusive estudos com combinação de drogas e medicina de precisão com terapia alvo. Sabe-se que uma parcela significativa dos pacientes com CBNMI apresentam alterações no gene FGFR (57,1% na coorte deste estudo) e portanto, há o interesse em realizar estudos clínicos com inibidores

do FGFR no tratamento da doença, como o erdafitinib (já aprovado pelo F.D.A. no tratamento do carcinoma urotelial avançado), rogaratinib, pemigatinib, entre outros. Em termos de estratégias de combinação de drogas para doença superficial não responsiva ao BCG, potenciais combinações sinérgicas poderiam incluir BCG em combinação com inibidores de PD(L)1, radioterapia, vacinas e agentes citotóxicos.

Um outro resultado interessante observado neste estudo foi a associação da idade avançada com benefício ao BCG, tanto analisando a idade como variável contínua ou categórica. Pacientes acima de 75 anos tiveram uma maior taxa de resposta ao BCG na análise univariada, mas não na análise multivariada. Em relação à sobrevida livre de recidiva, idade acima de 75 anos foi associada a melhor SLR tanto na análise univariada quanto na multivariada nesta coorte de pacientes. Estes achados contrastam com estudos prévios que demonstraram resultados inferiores de tratamento com BCG em pacientes mais idosos, especialmente acima de 80 anos <sup>121,143-145</sup>. Esta discrepância pode estar relacionada ao tamanho amostral do estudo e ao fato de haver um número maior de pacientes idosos no grupo BCG-R, além de ter sido observado um TMB alto em maior frequência em pacientes idosos neste estudo. Um achado interessante observado foi que uma assinatura mutacional relacionada ao envelhecimento foi detectada somente em 5,7% dos pacientes deste estudo (Figura 13).





apresentarem amostras com qualidade de DNA para o sequenciamento genômico. Desta forma, as análises são consideradas exploratórias e os resultados geram hipóteses a serem confirmadas em estudos com maior número de pacientes. Entretanto, com a amostra de 35 pacientes, o poder estatístico calculado do estudo foi de 0,992 considerando um erro tipo I de 0,05 e erro tipo II de 0,2. Em segundo lugar, neste estudo não foram avaliados aspectos relacionados ao microambiente tumoral, como por exemplo o perfil do infiltrado linfocitário e aspectos relacionados ao hospedeiro, que não foram o escopo dos objetivos deste estudo. Um outro ponto que merece destaque é que não havia disponibilidade de DNA germinativo dos pacientes para análise pareada para seleção exclusivamente das alterações genômicas somáticas (tumoriais). Com o objetivo de minimizar este fator de confusão, foi utilizado filtro de variantes germinativas conhecidas utilizando bancos de dados públicos e as variantes germinativas foram removidas em conjunto com variantes recorrentes provenientes de artefatos de alinhamento e sequenciamento genômico. Desta forma, os resultados são confiáveis em termos de inclusão das alterações genéticas somáticas. Por outro lado, o estudo tem inúmeros pontos fortes. Em primeiro lugar, incluiu populações bem selecionadas a partir de banco de dados de pacientes tratados consecutivamente e de forma homogênea com BCG intravesical no ICESP, com o objetivo de minimizar viés de seleção. Em segundo lugar, as análises anatomopatológicas foram revisadas por patologista experiente especializado em tumores genitourinários. Outro fator relevante foi que a hipótese previamente estabelecida foi testada como objetivo primário e demonstrada a despeito do tamanho amostral e foi possível realizar análise genômica complexa e correlacionar os dados com as características clínicas e de resposta dos pacientes com tempo apropriado de seguimento após tratamento com BCG.

**CONCLUSÃO**

---

## 6 CONCLUSÃO

Concluindo, os achados mais relevantes deste estudo foram a associação de alterações genômicas, como a alta carga mutacional tumoral e a carga de neoantígenos, como fatores relacionados à maior chance de resposta ao tratamento com BCG intravesical em pacientes portadores de carcinoma urotelial de bexiga não músculo invasivo. Caso estes resultados sejam confirmados em estudos com número maior de pacientes, o TMB pode ser o primeiro fator preditivo de resposta ao BCG e possivelmente poderá ser integrado à outros biomarcadores para melhor seleção de pacientes com maior benefício com a imunoterapia com BCG. Este estudo também demonstrou de forma indireta que o BCG pode atuar através do aumento do reconhecimento de neoantígenos tumorais. Desta forma, estes dados adicionam conhecimento dos mecanismos da ação imune do BCG e aumentam o racional da investigação clínica de inibidores de *checkpoint* imune no tratamento do CBNMI. Estes resultados necessitam de confirmação através de estudos com maior número de pacientes, preferencialmente com colaborações multi-institucionais, para melhor definição de alterações genômicas e biomarcadores de resposta ao tratamento intravesical com BCG.

## ***REFERÊNCIAS***

---

## REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro : INCA, 2019.
2. 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;68:394-424.
3. 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;63:234-41.
4. Murta-Nascimento C, Silverman DT, Kogevinas M, Garcia-Closas M, Rothman N, Tardon A, et al. Risk of bladder cancer associated with family history of cancer: do low-penetrance polymorphisms account for the increase in risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16:1595-600.
5. Mucci LA, Hjelmborg JB, Harris JR, Czene K, Havelick DJ, Scheike T, et al. Familial risk and heritability of cancer among twins in nordic countries. *JAMA* 2016;315:68-76.
6. Vlachostergios PJ, Faltas BM, Carlo MI, Nassar AH, Alaiwi SA, Sonpavde G. The emerging landscape of germline variants in urothelial carcinoma: Implications for genetic testing. *Cancer Treat Res Commun.* 2020;23:100165.
7. Carlo MI, Ravichandran V, Srinivasan P, Bandlamudi C, Kemel Y, Ceyhan-Birsoy O, et al. Cancer susceptibility mutations in patients with urothelial malignancies. *J Clin Oncol.* 2020;38:406-14.
8. Nassar AH, Abou Alaiwi S, AlDubayan SH, Moore N, Mouw KW, Kwiatkowski DJ, et al. Prevalence of pathogenic germline cancer risk variants in high-risk urothelial carcinoma. *Genet Med.* 2020;22:709-18.
9. Herr HW. The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumors. *J Urol.* 1999;162:74-6.
10. Dalbagni G, Herr HW, Reuter VE. Impact of a second transurethral resection on the staging of T1 bladder cancer. *Urology* 2002;60:822-4; discussion 4-5.
11. Hall MC, Chang SS, Dalbagni G, Pruthi RS, Seigne JD, Skinner EC, et al. Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. *J Urol.* 2007;178:2314-30.
12. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Bohle A, Palou-Redorta J, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol.* 2008;54:303-14.
13. Amin B., Edge SB, Greene FL. *AJCC cancer staging manual.* 8<sup>th</sup> ed. New York: Springer; 2017.
14. Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn BW, Comperat E, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol.* 2013;64:639-53.
15. Holmang S, Andius P, Hedelin H, Wester K, Busch C, Johansson SL. Stage progression in Ta papillary urothelial tumors: relationship to grade, immunohistochemical expression of tumor markers, mitotic frequency and DNA ploidy. *J Urol.* 2001;165:1124-8; discussion 8-30.
16. Chade DC, Shariat SF, Godoy G, Savage CJ, Cronin AM, Bochner BH, et al. Clinical outcomes of primary bladder carcinoma in situ in a contemporary series. *J Urol.* 2010;184:74-80.
17. Herr HW, Jakse G, Sheinfeld J. The T1 bladder tumor. *Semin Urol.* 1990;8:254-61.
18. Peyromaure M, Zerbib M. T1G3 transitional cell carcinoma of the bladder: recurrence, progression and survival. *BJU Int.* 2004;93:60-3.

19. Torti FM, Lum BL, Aston D, MacKenzie N, Faysel M, Shortliffe LD, et al. Superficial bladder cancer: the primacy of grade in the development of invasive disease. *J Clin Oncol.* 1987;5:125-30.
20. Mariappan P, Smith G, Lamb AD, Grigor KM, Tolley DA. Pattern of recurrence changes in noninvasive bladder tumors observed during 2 decades. *J Urol.* 2007;177:867-75; discussion 75.
21. Burger M, van der Aa MN, van Oers JM, Brinkmann A, van der Kwast TH, Steyerberg EC, et al. Prediction of progression of non-muscle-invasive bladder cancer by WHO 1973 and 2004 grading and by FGFR3 mutation status: a prospective study. *Eur Urol.* 2008;54:835-43.
22. van Rhijn BW, Vis AN, van der Kwast TH, Kirkels WJ, Radvanyi F, Ooms EC, et al. Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 is superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome. *J Clin Oncol.* 2003;21:1912-21.
23. Hernandez S, Lopez-Knowles E, Lloreta J, Kogevinas M, Amoros A, Tardon A, et al. Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas. *J Clin Oncol.* 2006;24:3664-71.
24. Hartmann A, Schlake G, Zaak D, Hungerhuber E, Hofstetter A, Hofstaedter F, et al. Occurrence of chromosome 9 and p53 alterations in multifocal dysplasia and carcinoma in situ of human urinary bladder. *Cancer Res.* 2002;62:809-18.
25. Moonen PM, van Balken-Ory B, Kiemeny LA, Schalken JA, Witjes JA. Prognostic value of p53 for high risk superficial bladder cancer with long-term followup. *J Urol.* 2007;177:80-3.
26. Shariat SF, Lotan Y, Karakiewicz PI, Ashfaq R, Isbarn H, Fradet Y, et al. p53 predictive value for pT1-2 N0 disease at radical cystectomy. *J Urol.* 2009;182:907-13.
27. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol.* 1976;116:180-3.
28. Ho PL, Williams SB, Kamat AM. Immune therapies in non-muscle invasive bladder cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2015;16:5.
29. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Witjes JA, Kurth K. Bacillus calmette-guerin versus chemotherapy for the intravesical treatment of patients with carcinoma in situ of the bladder: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol.* 2005;174:86-91; discussion -2.
30. 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.
31. Bohle A, Bock PR. Intravesical bacille Calmette-Guerin versus mitomycin C in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology.* 2004;63:682-6; discussion 6-7.
32. de Reijke TM, Kurth KH, Sylvester RJ, Hall RR, Brausi M, van de Beek K, et al. Bacillus Calmette-Guerin versus epirubicin for primary, secondary or concurrent carcinoma in situ of the bladder: results of a European Organization for the Research and Treatment of Cancer--Genito-Urinary Group Phase III Trial (30906). *J Urol.* 2005;173:405-9.
33. Bohle A, Jocham D, Bock PR. Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J Urol.* 2003;169:90-5.
34. Herr HW. Tumour progression and survival in patients with T1G3 bladder tumours: 15-year outcome. *Br J Urol.* 1997;80:762-5.

35. Herr HW, Schwalb DM, Zhang ZF, Sogani PC, Fair WR, Whitmore WF Jr., et al. Intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy prevents tumor progression and death from superficial bladder cancer: ten-year follow-up of a prospective randomized trial. *J Clin Oncol.* 1995;13:1404-8.
36. Brake M, Loertzer H, Horsch R, Keller H. Long-term results of intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy for stage T1 superficial bladder cancer. *Urology.* 2000;55:673-8.
37. Davis JW, Sheth SI, Doviak MJ, Schellhammer PF. Superficial bladder carcinoma treated with bacillus Calmette-Guerin: progression-free and disease specific survival with minimum 10-year followup. *J Urol.* 2002;167:494-500; discussion 1.
38. Herr HW, Dalbagni G. Defining bacillus Calmette-Guerin refractory superficial bladder tumors. *J Urol.* 2003;169:1706-8.
39. Prescott S, Jackson AM, Hawkyard SJ, Alexandroff AB, James K. Mechanisms of action of intravesical bacille Calmette-Guerin: local immune mechanisms. *Clin Infect Dis.* 2000;31 Suppl 3:S91-3.
40. Bohle A, Brandau S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol.* 2003;170:964-9.
41. Mungan NA, Witjes JA. Bacille Calmette-Guerin in superficial transitional cell carcinoma. *Br J Urol.* 1998;82:213-23.
42. Nunez-Nateras R, Castle EP, Protheroe CA, Stanton ML, Ocal TI, Ferrigni EN, et al. Predicting response to bacillus Calmette-Guerin (BCG) in patients with carcinoma in situ of the bladder. *Urol Oncol.* 2014;32:45 e23-30.
43. 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.
44. Watanabe E, Matsuyama H, Matsuda K, Ohmi C, Tei Y, Yoshihiro S, et al. Urinary interleukin-2 may predict clinical outcome of intravesical bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for carcinoma in situ of the bladder. *Cancer Immunol Immunother.* 2003;52:481-6.
45. de Reijke TM, de Boer EC, Kurth KH, Schamhart DH. Urinary cytokines during intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer: processing, stability and prognostic value. *J Urol.* 1996;155:477-82.
46. Saint F, Kurth N, Maille P, Vordos D, Hoznek A, Soyeux P, et al. Urinary IL-2 assay for monitoring intravesical bacillus Calmette-Guerin response of superficial bladder cancer during induction course and maintenance therapy. *Int J Cancer.* 2003;107:434-40.
47. Zuiverloon TC, Nieuweboer AJ, Vekony H, Kirkels WJ, Bangma CH, Zwarthoff EC. Markers predicting response to bacillus Calmette-Guerin immunotherapy in high-risk bladder cancer patients: a systematic review. *Eur Urol.* 2012;61:128-45.
48. Kim YJ, Ha YS, Kim SK, Yoon HY, Lym MS, Kim MJ, et al. Gene signatures for the prediction of response to Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy in primary pT1 bladder cancers. *Clin Cancer Res.* 2010;16:2131-7.
49. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol.* 1999;17:2105-16.
50. McDermott DF, Regan MM, Clark JI, Flaherty LE, Weiss GR, Logan TF, et al. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2005;23:133-41.

51. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012;366:2443-54.
52. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* 2012;366:2455-65.
53. Wolchok JD. PD-1 Blockers. *Cell* 2015;162:937.
54. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363:711-23.
55. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2011;364:2517-26.
56. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* 2015;372:320-30.
57. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med.* 2015;373:23-34.
58. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crino L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015;373:123-35.
59. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee JL, Fong L, et al. Pembrolizumab as second-line therapy for advanced urothelial carcinoma. *N Engl J Med.* 2017;376:1015-26.
60. Powles T, Duran I, van der Heijden MS, Loriot Y, Vogelzang NJ, De Giorgi U, et al. Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* 2018;391:748-57.
61. Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, Baron A, Necchi A, Bedke J, et al. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18:312-22.
62. Patel MR, Ellerton J, Infante JR, Agrawal M, Gordon M, Aljumaily R, et al. Avelumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum failure (JAVELIN Solid Tumor): pooled results from two expansion cohorts of an open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol.* 2018;19:51-64.
63. Powles T, O'Donnell PH, Massard C, Arkenau HT, Friedlander TW, Hoimes CJ, et al. Efficacy and safety of durvalumab in locally advanced or metastatic urothelial carcinoma: updated results from a phase 1/2 open-label study. *JAMA Oncol.* 2017;3:e172411.
64. Necchi A, Anichini A, Raggi D, Briganti A, Massa S, Luciano R, et al. Pembrolizumab as neoadjuvant therapy before radical cystectomy in patients with muscle-invasive urothelial bladder carcinoma (PURE-01): An Open-Label, Single-Arm, Phase II study. *J Clin Oncol.* 2018;JCO1801148.
65. Powles T, Kockx M, Rodriguez-Vida A, Duran I, Crabb SJ, Van Der Heijden MS, et al. Clinical efficacy and biomarker analysis of neoadjuvant atezolizumab in operable urothelial carcinoma in the ABACUS trial. *Nat Med.* 2019;25:1706-14.
66. Balar AV, Kulkarni GS, Uchio EM, Boormans J, Mourey L, Krieger LEM, et al. Phase II trial of Pembrolizumab (pembro) for patients (pts) with high-risk (HR) nonmuscle invasive bladder cancer (NMIBC) unresponsive to bacillus calmette-guérin (BCG) [abstract]. *J Clin Oncol.* 2019;37(7\_suppl):350.



67. Davis AA, Patel VG. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: an analysis of all US Food and Drug Administration (FDA) approvals of immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer*. 2019;7:278.
68. Noguchi Y, Chen YT, Old LJ. A mouse mutant p53 product recognized by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:3171-5.
69. Monach PA, Meredith SC, Siegel CT, Schreiber H. A unique tumor antigen produced by a single amino acid substitution. *Immunity*. 1995;2:45-59.
70. Dubey P, Hendrickson RC, Meredith SC, Siegel CT, Shabanowitz J, et al. The immunodominant antigen of an ultraviolet-induced regressor tumor is generated by a somatic point mutation in the DEAD box helicase p68. *Exp Med*. 1997;185:695-705.
71. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*. 2014;371:2189-99.
72. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015;348:124-8.
73. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, et al. Genomic correlates of response to CTLA4 blockade in metastatic melanoma. *Science* 2016;352(6283):aaf8264.
74. Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor mutational burden and response rate to PD-1 inhibition. *N Engl J Med*. 2017;377:2500-1.
75. Klemptner SJ, Fabrizio D, Bane S, Reinhart M, Peoples T, Ali SM, et al. Tumor mutational burden as a predictive biomarker for response to immune checkpoint inhibitors: a review of current evidence. *Oncologist*. 2020;25:e147-e59.
76. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372:2509-20.
77. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, Di Giacomo AM, De Jesus-Acosta A, Delord JP, et al. Efficacy of Pembrolizumab in patients with noncolorectal high microsatellite instability/mismatch repair-deficient cancer: results from the phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol*. 2020;38:1-10.
78. U.S. Food & Drug A. FDA grants accelerated approval to pembrolizumab for first tissue/site agnostic indication. Content current as of: 05/30/2017. Available from: <https://bit.ly/338IRuH>.
79. U.S. Food & Drug A. FDA approves pembrolizumab for adults and children with TMB-H solid tumors. Content current as of: 06/17/2020. Available from: <https://bit.ly/323vfl5>.
80. Campesato LF, Barroso-Sousa R, Jimenez L, Correa BR, Sabbaga J, Hoff PM, et al. Comprehensive cancer-gene panels can be used to estimate mutational load and predict clinical benefit to PD-1 blockade in clinical practice. *Oncotarget*. 2015;6:34221-7.
81. Bevins N, Sun S, Gaieb Z, Thorson JA, Murray SS. Comparison of commonly used solid tumor targeted gene sequencing panels for estimating tumor mutation burden shows analytical and prognostic concordance within the cancer genome atlas cohort. *J Immunother Cancer*. 2020;8:e000613.
82. Merino DM, McShane LM, Fabrizio D, Funari V, Chen SJ, White JR, et al. Establishing guidelines to harmonize tumor mutational burden (TMB): in silico assessment of variation in TMB quantification across diagnostic platforms: phase I of the Friends of Cancer Research TMB Harmonization Project. *J Immunother Cancer*. 2020;8:e000147.
83. Stenzinger A, Allen JD, Maas J, Stewart MD, Merino DM, Wempe MM, et al. Tumor mutational burden standardization initiatives: Recommendations for consistent tumor mutational burden assessment in clinical samples to guide immunotherapy treatment decisions. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2019;58:578-88.

84. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499:214-8.
85. Iyer G, Al-Ahmadie H, Schultz N, Hanrahan AJ, Ostrovnaya I, Balar AV, et al. Prevalence and co-occurrence of actionable genomic alterations in high-grade bladder cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31:3133-40.
86. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer*. 2015;15:25-41.
87. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 2014;507:315-22.
88. Gui Y, Guo G, Huang Y, Hu X, Tang A, Gao S, et al. Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nat Genet*. 2011;43:875-8.
89. Guo G, Sun X, Chen C, Wu S, Huang P, Li Z, et al. Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. *Nat Genet*. 2013;45:1459-63.
90. Ross JS, Wang K, Al-Rohil RN, Nazeer T, Sheehan CE, Otto GA, et al. Advanced urothelial carcinoma: next-generation sequencing reveals diverse genomic alterations and targets of therapy. *Mod Pathol*. 2014;27:271-80.
91. 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;387:1909-20.
92. Teo MY, Seier K, Ostrovnaya I, Regazzi AM, Kania BE, Moran MM, et al. Alterations in DNA damage response and repair genes as potential marker of clinical benefit from PD-1/PD-L1 blockade in advanced urothelial cancers. *J Clin Oncol*. 2018;36:1685-94.
93. Mouw KW, Goldberg MS, Konstantinopoulos PA, D'Andrea AD. DNA damage and repair biomarkers of immunotherapy response. *Cancer Discov*. 2017;7:675-93.
94. D'Andrea D, Soria F, Abufaraj M, Pones M, Gontero P, Machado AT, et al. Comparative effectiveness of intravesical BCG-Tice and BCG-moreau in patients with non-muscle-invasive bladder cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2020;18:20-5 e2.
95. Lamm D, Persad R, Brausi M, Buckley R, Witjes JA, Palou J, et al. Defining progression in nonmuscle invasive bladder cancer: it is time for a new, standard definition. *J Urol*. 2014;191:20-7.
96. Kamat AM, Sylvester RJ, Bohle A, Palou J, Lamm DL, Brausi M, et al. Definitions, end points, and clinical trial designs for non-muscle-invasive bladder cancer: Recommendations From the International Bladder Cancer Group. *J Clin Oncol*. 2016.
97. Kamat AM, Flaig TW, Grossman HB, Konety B, Lamm D, O'Donnell MA, et al. Expert consensus document: Consensus statement on best practice management regarding the use of intravesical immunotherapy with BCG for bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2015;12:225-35.
98. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25:1754-60.
99. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25:2078-9.
100. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20:1297-303.
101. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:e164.

102. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:D941-D7.
103. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536:285-91.
104. Genomes Project C, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526:68-74.
105. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature.* 2013;499:214-8.
106. Lee J, Lee AJ, Lee JK, Park J, Kwon Y, Park S, et al. Mutalisk: a web-based somatic MUTation AnaLyIS toolKit for genomic, transcriptional and epigenomic signatures. *Nucleic Acids Res.* 2018;46:W102-W8.
107. Cambier S, Sylvester RJ, Collette L, Gontero P, Brausi MA, van Andel G, et al. EORTC nomograms and risk groups for predicting recurrence, progression, and disease-specific and overall survival in non-muscle-invasive stage Ta-T1 urothelial bladder cancer patients treated with 1-3 years of maintenance bacillus calmette-guerin. *Eur Urol.* 2016;69:60-9.
108. Singh Nanda J, Kumar R, Raghava GP. dbEM: A database of epigenetic modifiers curated from cancerous and normal genomes. *Sci Rep.* 2016;6:19340.
109. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7:248-9.
110. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3812-4.
111. Pietzak EJ, Bagrodia A, Cha EK, Drill EN, Iyer G, Isharwal S, et al. Next-generation sequencing of nonmuscle invasive bladder cancer reveals potential biomarkers and rational therapeutic targets. *Eur Urol.* 2017;72:952-9.
112. Meeks JJ, Carneiro BA, Pai SG, Oberlin DT, Rademaker A, Fedorchak K, et al. Genomic characterization of high-risk non-muscle invasive bladder cancer. *Oncotarget.* 2016;7:75176-84.
113. Balbas-Martinez C, Sagrera A, Carrillo-de-Santa-Pau E, Earl J, Marquez M, Vazquez M, et al. Recurrent inactivation of STAG2 in bladder cancer is not associated with aneuploidy. *Nat Genet.* 2013;45:1464-9.
114. Hurst CD, Alder O, Platt FM, Droop A, Stead LF, Burns JE, et al. Genomic subtypes of non-invasive bladder cancer with distinct metabolic profile and female gender bias in KDM6A mutation frequency. *Cancer Cell.* 2017;32:701-15 e7.
115. Nassar AH, Umeton R, Kim J, Lundgren K, Harshman L, Van Allen EM, et al. Mutational analysis of 472 urothelial carcinoma across grades and anatomic sites. *Clin Cancer Res.* 2018.
116. Nordentoft I, Lamy P, Birkenkamp-Demtroder K, Shumansky K, Vang S, Hornshoj H, et al. Mutational context and diverse clonal development in early and late bladder cancer. *Cell Rep.* 2014;7:1649-63.
117. Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, Hellmann MD, Shen R, Janjigian YY, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet.* 2019;51:202-6.
118. Cheng DT, Mitchell TN, Zehir A, Shah RH, Benayed R, Syed A, et al. Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT): a hybridization capture-based next-generation sequencing clinical assay for solid tumor molecular oncology. *J Mol Diagn.* 2015;17:251-64.

- 119.Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, et al. F. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med.* 2017;23:703-13.
- 120.Chae YK, Anker JF, Carneiro BA, Chandra S, Kaplan J, Kalyan A, et al. Genomic landscape of DNA repair genes in cancer. *Oncotarget.* 2016;7:23312-21.
- 121.Kamat AM, Li R, O'Donnell MA, Black PC, Roupret M, Catto JW, et al. Predicting response to intravesical bacillus calmette-guerin immunotherapy: are we there yet? a systematic review. *Eur Urol.* 2018;73:738-48.
- 122.Wroclawski ML, Schutz FA, Cha JD, Soares A. Alternative therapies to bacillus calmette-guerin shortage for nonmuscle invasive bladder cancer in Brazil and other underdeveloped countries: management considerations. *J Global Oncol.* 2019;5:1-9.
- 123.Guallar-Garrido S, Julian E. Bacillus Calmette-Guerin (BCG) therapy for bladder cancer: an update. *Immuno Targets Ther.* 2020;9:1-11.
- 124.Golla V, Lenis AT, Faiena I, Chamie K. Intravesical therapy for non-muscle invasive bladder cancer-current and future options in the age of bacillus calmette-guerin shortage. *Rev Urol.* 2019;21:145-53.
- 125.Hofbauer SL, Shariat SF, Chade DC, Sarkis AS, Ribeiro-Filho LA, Nahas WC, et al. The Moreau Strain of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) for high-risk non-muscle invasive bladder cancer: an alternative during Worldwide BCG Shortage? *Urol Int.* 2016;96:46-50.
- 126.Ourfali S, Ohannessian R, Fassi-Fehri H, Pages A, Badet L, Colombel M. Recurrence rate and cost consequence of the shortage of bacillus calmette-guerin connaught strain for bladder cancer patients. *Eur Urol Focus.* 2019;S2405-4569(19)30109-9.
- 127.van Dijk N, Funt SA, Blank CU, Powles T, Rosenberg JE, van der Heijden MS. The cancer immunogram as a framework for personalized immunotherapy in urothelial cancer. *Eur Urol.* 2019;75:435-44.
- 128.Zahoor H, Grivas P. The cancer immunogram: a pledge for a comprehensive biomarker approach for personalized immunotherapy in urothelial cancer. *Eur Urol.* 2019;75:445-7.
- 129.Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, Swanton C, Quezada SA, Stenzinger A, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann Oncol.* 2019;30:44-56.
- 130.Pettenati C, Ingersoll MA. Mechanisms of BCG immunotherapy and its outlook for bladder cancer. *Nat Rev Urol.* 2018;15:615-25.
- 131.Redelman-Sidi G, Glickman MS, Bochner BH. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer--a current perspective. *Nat Rev Urol.* 2014;11:153-62.
- 132.Biot C, Rentsch CA, Gsponer JR, Birkhauser FD, Jusforgues-Saklani H, Lemaitre F, et al. Preexisting BCG-specific T cells improve intravesical immunotherapy for bladder cancer. *Sci Translat Med.* 2012;4:137ra72.
- 133.Antonelli AC, Binyamin A, Hohl TM, Glickman MS, Redelman-Sidi G. Bacterial immunotherapy for cancer induces CD4-dependent tumor-specific immunity through tumor-intrinsic interferon-gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117:18627-37.
- 134.Lattanzi M, Balar AV. Current status and future direction of immunotherapy in urothelial carcinoma. *Curr Oncol Rep.* 2019;21:24.
- 135.Kates M, Matoso A, Choi W, Baras AS, Daniels MJ, Lombardo K, et al. Adaptive immune resistance to intravesical BCG in non-muscle invasive bladder cancer: implications for prospective BCG-unresponsive trials. *Clin Cancer Res.* 2020;26:882-91.
- 136.Black PC, Tangen C, Singh P, McConkey DJ, Lucia S, Lowrance TW, et al. Phase II trial of atezolizumab in BCG-unresponsive non-muscle invasive bladder cancer: SWOG S1605 [abstract]. *J Clin Oncol.* 2020;38(15\_suppl):5022.

137. Van Allen EM, Mouw KW, Kim P, Iyer G, Wagle N, Al-Ahmadie H, et al. Somatic ERCC2 mutations correlate with cisplatin sensitivity in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Cancer Discov.* 2014;4:1140-53.
138. Plimack ER, Dunbrack RL, Brennan TA, Andrake MD, Zhou Y, Serebriiskii IG, et al. Defects in DNA repair genes predict response to neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 2015;68:959-67.
139. Chae YK, Davis AA, Raparia K, Agte S, Pan A, Mohindra N, et al. Association of tumor mutational burden with DNA repair mutations and response to anti-PD-1/PD-L1 therapy in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2019;20:88-96 e6.
140. Yin M, Grivas P, Emamekhoo H, Mendiratta P, Ali S, Hsu J, et al. ATM/RB1 mutations predict shorter overall survival in urothelial cancer. *Oncotarget.* 2018;9:16891-8.
141. Yin M, Grivas P, Wang QE, Mortazavi A, Emamekhoo H, Holder SL, et al. Prognostic value of dna damage response genomic alterations in relapsed/advanced urothelial cancer. *Oncologist.* 2020;25(8):680-8.
142. Pietzak EJ, Zabor EC, Bagrodia A, Armenia J, Hu W, Zehir A, et al. Genomic differences between "primary" and "secondary" muscle-invasive bladder cancer as a basis for disparate outcomes to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy. *Eur Urol.* 2019;75:231-9.
143. Joudi FN, Smith BJ, O'Donnell MA, Konety BR. The impact of age on the response of patients with superficial bladder cancer to intravesical immunotherapy. *J Urol.* 2006;175:1634-9; discussion 9-40.
144. Herr HW. Age and outcome of superficial bladder cancer treated with bacille Calmette-Guerin therapy. *Urology.* 2007;70:65-8.
145. Fernandez-Gomez J, Solsona E, Unda M, Martinez-Pineiro L, Gonzalez M, Hernandez R, et al. Prognostic factors in patients with non-muscle-invasive bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guerin: multivariate analysis of data from four randomized CUETO trials. *Eur Urol.* 2008;53:992-1001.

***ANEXOS***

---

## **ANEXOS**

Tabelas suplementares S1 a S4. Devido ao tamanho das tabelas não foi possível incluí-las de forma descritiva neste documento.

As tabelas originais com todos os dados estão disponíveis no sítio de internet: <https://content.iospress.com/articles/bladder-cancer/blc200289>.

**Tabela S1.** Informações de cobertura do sequenciamento, mutações identificadas e de neoantígenos dos pacientes com carcinoma urotelial não músculo invasivo de bexiga.

**Tabela S2.** Lista dos genes modificadores de cromatina identificados.

**Tabela S3.** Lista dos neoantígenos identificados.

**Tabela S4.** Lista das mutações somáticas deletérias identificadas em genes de reparo de DNA