



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

PEDRO ALEXANDRE RASTEIRO RIBEIRO

***IMUNOTERAPIA NO CANCRO DA BEXIGA LOCALMENTE
AVANÇADO OU METASTIZADO***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE UROLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:
PROFESSOR DOUTOR ARNALDO JOSÉ DE CASTRO FIGUEIREDO
DOUTOR PAULO GUILHERME LOPES AZINHAIS

MARÇO/2018

**IMUNOTERAPIA NO CANCRO DA BEXIGA LOCALMENTE AVANÇADO OU
METASTIZADO**

Pedro Alexandre Rasteiro Ribeiro

Aluno do 6º ano do Mestrado Integrado de Medicina

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal

pedro_alexandre_r@hotmail.com

Orientador: Professor Doutor Arnaldo José de Castro Figueiredo

Professor Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal

Diretor do Serviço de Urologia e Transplantação Renal do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal

Coorientador: Doutor Paulo Guilherme Lopes Azinhais

Assistente Convidado da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Serviço de Urologia e Transplantação Renal do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra,
Portugal

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	4
RESUMO	6
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	10
MÉTODOS	12
RESULTADOS	13
1. CANCRO DA BEXIGA	13
1.1 Epidemiologia	13
1.2 Potenciais Fatores de Risco	14
1.3 Classificação	15
1.4 Manifestações Clínicas	19
1.5 Diagnóstico e Estadiamento	20
1.6 Tratamento	22
2. IMUNOTERAPIA NO CANCRO DA BEXIGA LOCALMENTE AVANÇADO OU METASTIZADO	25
2.1 “Checkpoint” ou Pontos de Controle Imune	26
2.2 Inibidores de Pontos de Controle Imune	27
2.3 Inibidores de PD-1 e de PD-L1	28
2.3.1 Nivolumab	29
2.3.2 Pembrolizumab	29
2.3.3 Atezolizumab	31
2.3.4 Durvalumab	32
2.3.5 Avelumab	33

2.4 Inibidores de CTLA-4	33
2.4.1 Ipilimumab	34
2.4.2 Tremelimumab	34
2.5 Toxicidade dos Agentes em Imunoterapia	35
2.6 Emergência de Novas Terapias Imunes	36
2.7 Imunoterapia em Diferentes Associações Terapêuticas	39
2.8 Biomarcadores de Valor Preditivo em Imunoterapia	40
CONCLUSÃO	44
AGRADECIMENTOS	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

TABELA

Tabela 1: Classificação TNM do Cancro da Bexiga	17
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula Apresentadora de Antígenos
APU	Associação Portuguesa de Urologia
AUA	<i>American Urological Association</i>
BC	Cancro da Bexiga
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
BCSUC	Biblioteca das Ciências da Saúde da Universidade de Coimbra
TCC	Carcinoma de Células de Transição
CEA	Antígeno Carcinoembrionário
CHUC	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
CIS	Carcinoma <i>in Situ</i>
CTLA-4	Antígeno associado a linfócitos T citotóxicos- 4
DGS	Direção Geral de Saúde
EAU	<i>European Association of Urology</i>
EGFR3	Fator de Crescimento Epidérmico- 3
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGFR3	Fator de Crescimento de Fibroblastos- 3
GC	Gencitabina, Cisplatina
IFN- γ	Interferão- γ
IHC	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
ITU	Infeção do trato urinário
MHC	Complexo Major de Histocompatibilidade
MIBC	Cancro da Bexiga músculo-invasivo
MUC-1	Antígeno Mucina-1

MVAC	Metotrexato, Vimblastina, Doxorrubicina, Cisplatina
NBI	<i>Narrow-Band Imaging</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NMIBC	Cancro da Bexiga não músculo-invasivo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PD-1	Proteína de morte celular programada- 1
PDD	<i>Photodynamic Diagnosis</i>
PD-L	Ligandos de morte celular programada
PUNLMP	Proliferação urotelial de baixo potencial maligno
RMN	Ressonância Magnética
RTU	Ressecção Transuretral
TC-CT	Tomografia Computorizada com contraste
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TILs	Linfócitos Inflamatórios Tumoriais
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TNM	T (<i>tumour</i>) N (<i>node</i>) M (<i>metastasis</i>)
Uro-TC	Uro-Tomografia Computorizada
USA	Estados Unidos da América

RESUMO

Introdução: Após vários anos, sem avanços na abordagem de doentes com Cancro da Bexiga (BC) localmente avançado ou metastizado, especialmente assente na quimioterapia à base de platino, a escassez de resultados e o seu impacto reduzido na sobrevivência e no prognóstico destes doentes têm motivado a crescente investigação nesta área.

Objetivo: Reconhecer quais as alternativas farmacológicas existentes atualmente em imunoterapia, para o tratamento do BC localmente avançado ou metastizado, suas particularidades e critérios de inclusão terapêuticos. Determinar o impacto das diferentes opções terapêuticas em imunoterapia, no prognóstico e na sobrevivência global dos doentes com BC localmente avançado ou metastizado. Destacar ensaios clínicos com novos agentes de imunoterapia, que possam ser utilizados nestes doentes, em uso único ou em associação terapêutica.

Métodos: A pesquisa foi realizada com recurso à *PubMed e b-ON*, restringindo-se a artigos de Língua Inglesa, publicados entre 2012 e 2017. Foram também consultadas as publicações mais recentes da APU, AUA e EAU.

Resultados: Comportando o BC uma das taxas mais significativas de mutação tumoral e assumindo a complexidade da interação entre as células tumorais e o sistema imunitário, a imunoterapia surge com elevado potencial terapêutico. O impacto atribuído aos inibidores da PD-1, do PD-L1 e do CTLA-4, tem contribuído para a mudança de paradigma inerente às atuais linhas de orientação terapêuticas no BC. Para além da emergência de novas terapias imunes, como a vacinação anti-tumoral ou as proteínas de fusão, múltiplas abordagens em imunoterapia com agente único ou em associação estão atualmente a ser alvo de atenção no BC. A caracterização do microambiente tumoral e a identificação de biomarcadores com potencial valor preditivo contribuem, não só para uma melhor compreensão da biologia

tumoral, como para a seleção de doentes com maior potencial de resposta. Como fatores com potencial valor preditivo, surgem a expressão de PD-L1 pelo tumor, a taxa de mutação tumoral, a carga de neoantígenos e a expressão de IFN- γ .

Conclusão: Embora as opções terapêuticas em imunoterapia, pareçam cada vez mais corresponder a uma alternativa de tratamento viável no BC, com resultados promissores, ainda há metas consideráveis a atingir, para o estabelecimento de sequencias terapêuticas ótimas, com considerável impacto ao nível da sobrevivência global destes doentes e da sobrevivência livre de progressão da doença.

PALAVRAS-CHAVE: Imunoterapia; Cancro da bexiga; Carcinoma de células de transição; Anticorpos Monoclonais; Biomarcadores.

ABSTRACT

Introduction: After several years, without advances in the approach of patients with locally advanced or metastatic Bladder Cancer (BC), especially based on platinum-based chemotherapy, the scarcity of results and their reduced impact on the survival and prognosis of these patients have motivated the growing investigation in this area.

Objective: To recognize the current pharmacological alternatives in immunotherapy for the treatment of locally advanced or metastatic BC, its particularities and therapeutic inclusion criteria. To determine the impact of different therapeutic options on immunotherapy, prognosis and overall survival of patients with locally advanced or metastatic BC. Highlight clinical trials with new immunotherapy agents that can be used in these patients, in single use or in combination therapy.

Methods: The study was carried out using *PubMed* and *b-ON*, restricted to English language articles published between 2012 and 2017. The most recent publications of the APU, AUA and UAE were also consulted.

Results: With BC being one of the most significant tumor mutation rates and assuming the complexity of the interaction between tumor cells and the immune system, immunotherapy appears to have a high therapeutic potential. The impact attributed to PD-1, PD-L1 and CTLA-4 inhibitors has contributed to the paradigm shift inherent in the current therapeutic guidelines in BC. In addition to the emergence of new immune therapies, such as anti-tumor vaccination or fusion proteins, multiple approaches in single-agent or combination immunotherapy are currently being targeted for BC. The characterization of the tumor microenvironment and the identification of biomarkers with potential predictive value contribute not only to a better understanding of tumor biology, but also to the selection of patients with greater potential for response. As factors with potential predictive value, the

expression of PD-L1 by the tumor, the tumor mutation rate, the neoantigen load and the expression of IFN- γ arise.

Conclusion: Although therapeutic options in immunotherapy seem increasingly to correspond to a viable treatment alternative in BC, with promising results, there are still considerable targets to be reached for the establishment of optimal therapeutic sequences, with considerable impact on overall survival of these patients and disease-free survival.

KEYWORDS: Immunotherapy; Urinary Bladder Neoplasms; Carcinoma, Transitional Cell; Antibodies, Monoclonal; Biomarkers.

INTRODUÇÃO

O BC enquanto doença com elevada incidência e prevalência a nível mundial, encontra-se associado a elevada morbidade e mortalidade,¹⁻⁴ com custos socioeconómicos substanciais.

O tabaco e a exposição ocupacional enquanto fatores de risco estabelecido para o BC, contribuem para a ocorrência de anormalidades nos mecanismos de regulação, diferenciação e proliferação celular, com conseqüente transformação maligna.⁵⁻⁷

Embora a maioria dos casos de BC (75-85%) se apresente como não músculo-invasivo (NMIBC),^{1,4,5} sem invasão da camada muscular do detrusor, cerca de 6% evolui para BC músculo-invasivo (MIBC). Sendo de referir, que aproximadamente 15-25% de todos os casos demonstram um crescimento tumoral invasivo e cerca de 10-15% metástases à altura do diagnóstico.⁶

Deste modo, assumindo o comportamento biológico agressivo, a escassez de resultados e o prognóstico limitado que se encontram associados ao BC localmente avançado ou metastizado, é premente a necessidade de identificar novos agentes terapêuticos, que possam determinar um impacto significativo na sobrevivência destes doentes. Após vários anos sem avanços consideráveis na abordagem do BC em estadios avançados da doença, em que a modalidade terapêutica de eleição assentava na quimioterapia com recurso a fármacos do grupo do platino, como a cisplatina, a imunoterapia emerge de dia para dia com elevado potencial terapêutico.⁵

Nos últimos anos, é notável o surgimento de uma quantidade significativa de novas aplicações para as terapias imunes, particularmente dirigidas para o tratamento das doenças neoplásicas.

Ao ter em consideração a capacidade adaptativa das células T e a sua memória, a imunoterapia assume um papel único na indução de respostas duradouras no hospedeiro, que através de mecanismos de autorregulação permitem que os linfócitos T se mantenham ativos e funcionais. Assim sendo, o recurso a anticorpos monoclonais para o bloqueio de pontos de controle imune, em particular o Antígeno associado a linfócitos T citotóxicos-4 (CTLA-4) e a Proteína de morte celular programada-1 (PD-1) têm constituído uma revolução no tratamento das doenças neoplásicas, sendo alvo de investigação no BC.

Com este artigo de revisão, pretende-se, num primeiro momento, reconhecer quais as alternativas farmacológicas existentes atualmente em imunoterapia, para o tratamento do BC localmente avançado ou metastizado, suas particularidades e critérios de inclusão terapêuticos.

Num segundo momento, determinar o impacto das diferentes opções terapêuticas em imunoterapia, no prognóstico e na sobrevivência global dos doentes com BC localmente avançado ou metastizado.

Por último, procurar-se-á destacar ensaios clínicos com novos agentes de imunoterapia, que possam ser utilizados nestes doentes, em uso único ou em associação terapêutica.

MÉTODOS

Com o recurso a motores de busca de bases de dados digitais de referência, em particular “PubMed” e “b-ON”, foram utilizados como termos de pesquisa: *Immunotherapy, Bladder Cancer, Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma*. O acesso às bases de dados supracitadas foi conseguido através da Biblioteca Central dos serviços de documentação do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), assim como da Biblioteca das Ciências da Saúde da Universidade de Coimbra (BCSUC), no Pólo das Ciências da Saúde.

A pesquisa restringiu-se a artigos de Língua Inglesa publicados de 1 de janeiro de 2012 a 31 de dezembro de 2017. Foram ainda incluídos artigos citados noutros, cuja leitura integral foi imposta pela relevância que os mesmos demonstraram apresentar sobre o tema.

Por último, foram também alvo de atenção para a execução deste artigo de revisão, as publicações mais recentes da Associação Portuguesa de Urologia (APU), da *American Urological Association* (AUA) e da *European Association of Urology* (EAU).

RESULTADOS

1. CANCRO DA BEXIGA

1.1 Epidemiologia

O BC enquanto doença heterogénea, surge como uma das neoplasias com maior incidência e prevalência em todo o mundo,¹⁻⁴ encontrando-se associado a uma elevada morbidade e mortalidade.¹

O BC constitui atualmente a quarta doença neoplásica mais frequente no sexo masculino e a décima primeira na população global.⁶ Segundo estimativas da GLOBOCAN,^{7,8} ocorreram em 2012 cerca de 430 000 novos casos e 165 000 mortes por BC a nível mundial, dos quais 322 500 no sexo masculino.⁷

Em 2016 nos Estados Unidos da América (USA) registaram-se 76 960 novos casos de BC, dos quais 58 950 no sexo masculino e 18 010 no sexo feminino⁹ e em 2017 estima-se a ocorrência de cerca de 79 030 novos casos, mantendo uma maior incidência no sexo masculino (60 490) comparativamente ao sexo feminino (18 540).^{10,11}

Na Europa presume-se que a taxa de incidência (por 100 000 habitantes/ ano) seja de 19,1 no sexo masculino e de 2,2 no sexo feminino, variando nos diferentes países, tendo em conta o seu nível de desenvolvimento e os recursos existentes. Sendo de realçar, para além das desigualdades no acesso a exames complementares de diagnóstico e protocolos terapêuticos, a exposição a diferentes fatores de risco.^{6,7}

Em Portugal, os dados mais recentes da Direção Geral de Saúde (DGS) relativamente ao BC maligno em 2010, reportam para uma taxa de incidência (por 100 000 habitantes) de 11,3 e, em particular, de 20,4 no sexo masculino.¹²

Relativamente à mortalidade associada ao BC maligno em Portugal, os dados da DGS revelam um aumento significativo entre 2010 e 2014, sendo mencionada, uma taxa de mortalidade global (por 100 000 habitantes) de 7,7 em 2010 e 9,0 em 2014. Um aumento

observável, segundo os dados da DGS, em ambos os sexos, em particular de 11,9 para 14,0 no sexo masculino e de 3,8 para 4,6 no sexo feminino.¹²

Apesar dos fatores de risco associados ao BC ainda não estarem bem definidos, várias substâncias eliminadas pelo trato urinário parecem ser responsáveis por alterações genéticas, tendo em conta a sua ação sobre o DNA das células uroteliais. Considerando-se o tabaco como principal fator de risco estabelecido^{1,6,7} e posteriormente a exposição ocupacional.^{1,13}

1.2 Potenciais Fatores de Risco

O tabaco enquanto fator de risco exógeno,^{1,13} surge associado ao aparecimento de 30-50% de todos os casos de BC.⁷ Apesar de não estarem identificados todos os agentes associados ao tabaco e os mecanismos biopatológicos responsáveis pela doença, o 4-aminobifenil (4-ABP) e a sua acetilação hepática lenta por ação da N-acetiltransferase são apontados como eventuais fatores envolvidos.¹³

Atualmente, considera-se que a incidência do BC se encontra diretamente relacionada com a duração do tabagismo e a carga tabágica,⁶ sendo referido um risco 2 a 5 vezes superior, um diagnóstico mais precoce (6,1 anos antes no sexo masculino e 5,9 anos antes no sexo feminino) e uma maior agressividade tumoral em fumadores comparativamente a não fumadores.^{7,13}

Para além do tabaco, a exposição ocupacional é também apontada como fator de risco estabelecido,^{6,13,14} sendo, contudo ainda difícil de avaliar o seu impacto global.⁷ O BC surge frequentemente associado à exposição a aminas aromáticas, em indivíduos que contactam com borracha, corantes, tintas, solventes, papel e à exposição a benidina, naftilamina, dianisidina e a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos associados ao alumínio ou à gasificação do carvão.^{13,14}

Na medida em que a maior incidência do BC está associada ao homem,^{1,4,5,6} o género masculino surge como eventual fator de risco. Embora os homens demonstrem ser mais

propensos a desenvolver esta doença devido a uma maior exposição tóxica e à consequente presença de mais resíduos na urina, as mulheres tendem a apresentar estádios mais avançados da doença e menores taxas de sobrevivência.⁵

Tendo em conta, que a maioria dos doentes com BC tem mais de 65 anos,^{1,5,13,14} também a idade, surge como potencial fator de risco. É descrito que a incidência de BC aumenta diretamente com a idade, sendo rara antes dos 40 anos e muito frequente depois dos 60, com uma idade média ao diagnóstico de 69 anos em homens e de 73 em mulheres.^{13,14}

Também a raça surge como eventual fator de risco, verificando-se uma maior incidência de BC em indivíduos de raça branca comparativamente aos de raça negra. Contudo, um estudo realizado nos USA considera que os principais determinantes do BC parecem estar associados a desigualdades sociais e não a variações populacionais relacionadas com a raça.⁷

Do ponto de vista genético, evidências crescentes apontam para que fatores de suscetibilidade genética e associações familiares possam intervir na incidência do BC,^{6,7,13,15} encontrando-se a história familiar associada a um risco duas vezes superior de desenvolver esta doença.¹⁶

1.3 Classificação

A maioria dos BC são uroteliais,^{1,13} apresentando-se como BC não músculo-invasivo (NMIBC) em cerca de 75% a 85% dos casos à altura do diagnóstico^{1,4,5} e como BC músculo-invasivo (MIBC) ou disseminado em 15% a 25%.⁶

Na Europa Ocidental e nos USA aproximadamente 90% dos BC são uroteliais, correspondendo a carcinoma de células de transição (TCC).^{4,5} Por sua vez, noutras áreas como o Médio Oriente ou África Oriental são mais comuns outros tipos histológicos, em particular, o carcinoma de células escamosas.^{5,7,13} Facto que está associado nestas áreas, em grande

parte, à infecção do trato urinário por *Schistosoma haematobium*.^{5,7,13} Outros tipos histológicos podem também ser identificados, como o adenocarcinoma ou o carcinoma de pequenas células.²

A atual classificação do BC segue de forma consensual as orientações propostas pela *American Joint Committee on Cancer*, assentes na classificação T (*tumour*) N (*node*) M (*metastasis*) (Tabela 1).^{4,17-19}

Tabela 1: Classificação TNM do Câncer da Bexiga. (adaptado de Brierley J, Gospodarowicz M, Wittekind C. 2017) ¹⁷

T- Tumor Primário	N- Gânglios Linfáticos	M- Metástases à distância
<p>Tx Tumor primário não pode ser avaliado</p> <p>T0 Sem evidência de tumor primário</p> <p>Ta Carcinoma papilar não músculo-invasivo</p> <p>Tis Carcinoma <i>in situ</i></p> <p>T1 Tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial</p> <p>T2 Tumor invade o músculo</p> <p>T2a Tumor invade o músculo superficial (metade interna)</p> <p>T2b Tumor invade o músculo profundo (metade externa)</p> <p>T3 Tumor invade tecido perivesical</p> <p>T3a Microscopicamente</p> <p>T3b Macroscopicamente</p> <p>T4 Tumor invade algum de: próstata, útero, vagina, parede pélvica, parede abdominal</p> <p>T4a Tumor invade a próstata, útero ou vagina</p> <p>T4b-Tumor invade a parede abdominal ou pélvica</p>	<p>Nx Gânglios regionais não podem ser avaliados</p> <p>N0 Sem metástases nos gânglios linfáticos regionais</p> <p>N1 Metástases num gânglio linfático na pélvis (hipogástrico, obturador, ilíaco externo, ou pré-sacral)</p> <p>N2 Metástases em múltiplos gânglios linfáticos (hipogástrico, obturador, ilíaco externo, ou pré-sacral)</p> <p>N3 Metástases no(s) gânglio(s) ilíaco comum</p>	<p>Mx Metástases à distância não podem ser avaliadas</p> <p>M0 Sem metástases à distância</p> <p>M1 Presença de metástases à distância</p>

Em 1973, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs para os tumores do trato urotelial, a sua classificação segundo o grau, destacando a sua divisão em baixo (G1), intermédio (G2) e alto (G3),^{18,19} tendo esta, sido posteriormente submetida a revisão em 2004 com o objetivo de incluir a sua caracterização histológica e propondo a divisão em alto grau e baixo grau.

Relativamente ao BC urotelial, presume-se que a maioria dos doentes manifeste um crescimento não invasivo à altura do diagnóstico, particularmente confinado à mucosa (estadio Ta e Carcinoma *in situ* (CIS)) ou à submucosa (estadio T1),^{4,5,6,20} em oposição a um crescimento tumoral invasivo (T2-T4, N0).²¹

Para além da invasão da camada muscular do detrusor, a distinção entre NMIBC e MIBC^{1,7,13} assenta, também, na arquitetura e na atipia citológica da lesão.^{1,13,22} O NMIBC pode apresentar-se como lesão plana, em particular, hiperplasia urotelial, atipia urotelial reativa, atipia de significado desconhecido, displasia ou CIS, ou por sua vez, como lesão papilar, podendo traduzir-se em papiloma urotelial (lesão benigna), proliferação urotelial de baixo potencial maligno (PUNLMP) ou carcinoma de alto grau ou baixo grau.^{4,11,19,23}

Apesar do MIBC corresponder a carcinoma urotelial na maioria dos casos, este pode também manifestar-se como carcinoma de células escamosas, carcinoma de células glandulares, tumor epitelial do trato urinário superior ou tumor com origem num divertículo da bexiga.^{2,22}

Em relação aos subtipos menos comuns do MIBC, atribui-se especial interesse ao carcinoma de células escamosas e ao carcinoma de células glandulares. O primeiro, caracteriza-se geralmente pela existência de queratinização ou pontes intercelulares e é frequentemente associado a um mau prognóstico. Enquanto, que o segundo, se caracteriza geralmente pelo adenocarcinoma ou adenoma viloso, correspondendo o adenocarcinoma a menos de 2% dos BC.²²

Do ponto de vista molecular, os BC uroteliais correspondem geralmente a tumores altamente heterogêneos, podendo ser classificados em subtipo basal ou subtipo luminal^{1,21,24,25} com base nos seus padrões de expressão de RNA. Sendo que, a cada subtipo se encontra associada uma determinada taxa de sobrevivência e de resposta ao tratamento.^{21,24,25}

Enquanto que os BC do subtipo basal se encontram geralmente associados a características histológicas escamosas ou sarcomatóides, com sobre-expressão do Fator de Crescimento Epidérmico 3 (EGFR3) e metástases à altura do diagnóstico,^{1,25} os do subtipo luminal, associam-se frequentemente a características papilares, com sobre-expressão do Fator de Crescimento de Fibroblastos 3 (FGFR3).^{1,25}

Para além desta classificação, o *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) procede à divisão do BC urotelial em 4 categorias (“clusters”), denominadas de I, II, III e IV, em que os “clusters” I e II correspondem ao subtipo luminal e os “clusters” III e IV ao subtipo basal.^{21,24-26}

Segundo o TCGA, os tumores do “cluster” I (“papilar-like”)²⁶ caracterizam-se por uma sobre-expressão do FGFR3 devido a mutações e parecem apresentar uma sobrevivência global mais significativa, enquanto que os do “cluster” II (“p53-like”)²⁶ expressam genes ativos de p53 e demonstram ser resistentes à quimioterapia.

1.4 Manifestações Clínicas

Na maioria dos doentes com BC (≈85%), a hematúria surge como principal queixa e,^{1,6,19} manifesta-se geralmente de forma indolor podendo, contudo, também ser caracterizada como micro ou macroscópica, contínua ou intermitente.^{6,19}

Enquanto que, a hematúria macroscópica pode ser facilmente identificada pelo doente através da alteração da coloração da urina, a hematúria microscópica não, sendo geralmente diagnosticada com recurso a análises urinárias específicas, entre as quais, a tira teste,⁵ sendo feito o seu diagnóstico na presença de >3 eritrócitos por campo da amostra.^{1,5}

Como outra sintomatologia, pode haver referência a sintomas do trato urinário inferior (LUTS), em particular urgência, aumento da frequência urinária ou disúria, sendo estes, contudo, mais frequentes em doentes com CIS ou MIBC.²³

Em estadios mais avançados da doença pode haver alusão a sintomas constitucionais, como cansaço, perda de peso, anorexia ou hipersudorese noturna. Apesar de não ser comum, pode haver, também, referência a edemas dos membros inferiores decorrentes da obstrução linfática ou venosa provocada pelo processo tumoral, queixas álgicas pélvicas ou anúria.⁶

1.5 Diagnóstico e Estadiamento

Perante a suspeita de BC, a cistoscopia está preconizada enquanto exame de referência^{4,5,6,19} na medida, em que possibilita uma avaliação pormenorizada da localização, tamanho e aparência da lesão. Contudo, esta técnica, pode não permitir a identificação de pequenos tumores ou determinados CIS.^{4,20}

Para além da cistoscopia, o diagnóstico de BC depende da avaliação histológica do tecido ressecado,¹⁹ na qual é descrito o tipo, grau, estágio, ausência ou presença de CIS.²⁷

Na medida em que as células uroteliais malignas podem ser observadas no exame microscópico do sedimento urinário, a citologia parece constituir um exame com interesse para o diagnóstico e monitorização do doente com BC.⁴ Apesar da citologia apresentar uma sensibilidade de aproximadamente 50% e uma especificidade superior a 95% na deteção de BC de alto grau,^{4,5} tem demonstrado uma baixa sensibilidade para tumores de baixo grau, com 40-70% de falsos-negativos.

Apesar da Ecografia vesical poder demonstrar interesse no estudo inicial de um doente com hematuria, o facto de não permitir uma avaliação completa do trato urinário leva a que a Uro-Tomografia Computorizada (Uro-TC) surja também como opção no diagnóstico.

Com o passar do tempo e, assumindo por objetivo melhorar a detecção de lesões intravesicais, têm sido identificadas novas técnicas de diagnóstico, entre as quais, a Cistoscopia *Narrow-band imaging* (NBI) e o *Photodynamic diagnosis* (PDD).¹

A Cistoscopia NBI enquanto exame endoscópico, constitui uma técnica de melhoramento de imagem ótica, que permite uma melhor visualização dos vasos sanguíneos na submucosa,^{1,4,5,20} sem recurso a instilações intravesicais. Esta técnica, demonstrou numa meta-análise²⁰ quanto à sua acuidade diagnóstica, permitir uma maior identificação de doentes e processos tumorais comparativamente à cistoscopia convencional.²⁰ Para além do diagnóstico, a Cistoscopia NBI parece vir a contribuir para uma ressecção mais completa da lesão tumoral e para uma menor recorrência da doença.¹⁹ Contudo, os custos mais elevados e o tempo necessário para a execução da técnica fazem com que não seja utilizada de forma generalizada na prática clínica.¹

O PDD parece constituir uma técnica de diagnóstico útil para tumores de alto grau,⁴ ao permitir a fotossensibilização do tecido displásico através da instilação intravesical de um corante. Com esta técnica, o tecido anormal emite uma cor vermelha sob luz de referência azul e o tecido normal uma cor azul.⁴ Apesar do PDD poder ser recomendado no seguimento de alguns doentes, os estudos não são ainda consensuais quanto à dose ideal, ao tempo de instilação do corante intravesical, nem quanto aos resultados desta técnica.^{4,18,20}

Os marcadores urinários moleculares surgem também com potencial no diagnóstico e monitorização do BC.^{1,19} Apesar de alguns autores considerarem que os marcadores urinários podem melhorar a sensibilidade de outros exames de diagnóstico,^{1,4,5,19} eles encontram-se ainda associados a maiores custos e a incerteza quanto aos resultados.^{5,19} Apesar destes marcadores urinários não demonstrarem ultrapassar a combinação da cistoscopia e da citologia no diagnóstico do BC,¹⁹ parecem constituir uma mais-valia quando os resultados da citologia urinária são equívocos.⁴

Para a identificação da extensão local e regional do MIBC,²² para além dos exames laboratoriais, como a contagem de células sanguíneas ou a bioquímica, preconiza-se o recurso a exames de imagem,²² que permitam determinar a invasão de gânglios linfáticos ou órgãos à distância. A este nível, destaca-se a realização da Tomografia Computorizada com contraste (TC-CT) ou da Ressonância Magnética (RMN).^{22,28}

1.6 Tratamento

O tratamento do BC assenta fundamentalmente no estadio da doença à altura do diagnóstico, pelo que se torna imprescindível uma adequada avaliação clínica e acompanhamento destes doentes.

Na medida em que a Ressecção Transuretral (RTU), enquanto cirurgia endoscópica permite a excisão completa da lesão tumoral, ou de parte dela, esta constitui o primeiro passo a adotar no BC.¹

A RTU ao permitir a excisão e consequente análise patológica da lesão tumoral,¹ assume especial impacto ao nível do diagnóstico e consequente orientação terapêutica, podendo estar indicada em determinados casos, a associação de outras estratégias terapêuticas, como a cistectomia parcial/radical, a quimioterapia ou a radioterapia.²² A este nível, considera-se que uma técnica de RTU inadequada ou erros na avaliação das lesões pelo patologista, podem contribuir para taxas significativamente elevadas, no risco de progressão e recidiva da doença aos 5 anos.¹

Em doentes com BC em estadio igual ou superior a T2, a cistectomia radical com linfadenectomia pélvica e ressecção de estruturas anexas, parece constituir a principal opção terapêutica.^{1,6} Contudo, considera-se que após cistectomia cerca de 50% de todos os doentes recidivam, correspondendo aproximadamente 10-30% das recidivas, a recidivas locais e as restantes a metástases à distância.^{6,22}

Em relação à abordagem dos doentes com BC, em contexto de doença metastizada, surge como indicação terapêutica de primeira linha, o recurso à quimioterapia sistémica,^{5,22,28,29} podendo associar-se a radioterapia paliativa em casos de doença disseminada persistente.^{5,22} Nestes doentes, o regime de quimioterapia deve procurar refletir não só a idade do doente e a extensão da doença, mas também a existência de comorbilidades médicas, como patologia cardíaca ou disfunção renal.^{22,28-30}

Neste contexto, os esquemas combinados de quimioterapia, contendo Cisplatina encontram-se estabelecidos como o padrão.^{6,31} Enquanto que, o tratamento isolado com Gencitabina tem revelado taxas de resposta baixas e de curta duração, com uma sobrevivência média de apenas 6 a 9 meses,^{6,22} esquemas combinados, como a associação de Gencitabina com Cisplatina (GC) ou de Metotrexato com Vimblastina, Doxorubicina e Cisplatina (MVAC) têm demonstrado melhores resultados, com uma sobrevivência de 12 a 16 meses.^{5,6,29,31}

Com base na análise de vários estudos publicados nos últimos 5 anos, não são evidentes diferenças significativas entre esquemas de GC ou MVAC, no que concerne às taxas de sobrevivência, resposta global e tempo de progressão da doença.^{22,29} Segundo a EAU, a toxicidade surge como a principal diferença existente entre os dois esquemas, sendo esta maior com MVAC.^{6,10}

O mau prognóstico associado à progressão do BC localmente avançado após quimioterapia, com recurso a esquemas contendo cisplatina, com uma sobrevivência média de 5 a 7 meses,¹⁴ e o considerável número de doentes com BC localmente avançado ou metastizado ($\approx 50\%$), não elegível a cisplatina,³⁴ em que esquemas com carboplatina ou outros esquemas sem platino surgem como alternativas^{29,34} pouco efetivas, demonstram que as opções terapêuticas para o BC são ainda limitadas.^{32,33}

Deste modo, assumindo os resultados pouco significativos das terapêuticas “clássicas” até agora instituídas para o BC localmente avançado ou metastizado e o seu reduzido impacto ao nível da sobrevivência e prognóstico destes doentes, torna-se fundamental a reflexão sobre o investimento atualmente em curso nesta área, com destaque, para a imunoterapia.

2. IMUNOTERAPIA NO CANCRO DA BEXIGA LOCALMENTE AVANÇADO OU METASTIZADO

A compreensão da atividade do sistema imunitário sobre os processos tumorais, tem surgido como alvo de interesse crescente por parte da investigação médica, em que o BC não é exceção, destacando-se neste processo a ação das células T enquanto mediadoras da imunidade tumoral.²¹

Em relação às células T, considera-se que a sua ativação depende da expressão de recetores específicos capazes de reconhecer e se ligar a antigénios apresentados por um complexo proteico, em particular, o complexo major de histocompatibilidade (MHC), existente à superfície das células apresentadoras de antigénios (APCs).²¹

Após a ativação das células T no tecido linfático, estas células vão iniciar um processo de proliferação e diferenciação celular, com conseqüente libertação de citocinas, das quais se destaca, o interferão- γ (IFN- γ), responsáveis pelo reconhecimento e destruição de antigénios estranhos ao organismo.²¹

Embora as células T sejam capazes de reconhecer e destruir células estranhas ao sistema imunitário, reconhece-se ao longo do tempo, que estas nem sempre reconhecem as células neoplásicas. Facto, que pode ser explicado pela existência de moléculas expressas pelas células tumorais com capacidade para se ligarem a proteínas específicas existentes à superfície das células T e impedir a resposta imune.^{21,29,35-38} A estas proteínas, atribui-se especificamente a designação de “checkpoint” ou ponto de controle imune,^{35,36} uma vez que funcionam como um “switch off”, ao limitarem a atividade do sistema imunitário.

A imunoterapia intravesical, tem assumido desde 1976 um especial relevo no tratamento do BC, não se encontrando, contudo, ainda bem esclarecido o seu mecanismo de ação.^{35,37} Destacam-se os resultados favoráveis obtidos com a instilação intravesical do

BCG,^{26,37,38} a qual foi aprovada no tratamento do NMIBC, em 1990, pela *Food and Drug Administration* (FDA).³⁵

Atualmente, reconhece-se que o processo de oncogénese para além de conduzir a instabilidade genética é, responsável pela ocorrência de mutações somáticas que codificam antígenos anormais, denominados de neoantígenos, que são reconhecidos como estranhos pelo sistema imunitário, potenciando uma resposta imune contra as células tumorais.^{21,24,30,34} Deste modo, considerando que o BC urotelial apresenta segundo o TCGA,^{26,33} a terceira maior taxa de mutação tumoral, este pode desencadear uma maior resposta imunitária por parte do hospedeiro, assim como, responder de forma mais efetiva e durável às terapias imunes, comparativamente a tumores com menores taxas de mutação.^{24,26,33,39,40}

A possibilidade de haver contacto direto entre os agentes terapêuticos e o tumor através da instilação intravesical, a capacidade de exposição a altas concentrações de agentes com exposição sistémica limitada e a possibilidade de monitorizar a resposta ao tratamento através da cistoscopia ou da biopsia, fazem, com que a imunoterapia pareça cada vez mais constituir uma estratégia de tratamento viável em doentes com BC.⁴¹

2.1 “Checkpoint” ou Pontos de Controle Imune

No reconhecimento das células tumorais por parte do sistema imunitário, presume-se, que para além da ativação do MHC e dos recetores das células T estejam envolvidas proteínas expressas à superfície das células T, denominadas de “Checkpoint” ou pontos de controle imune.^{30,35,36}

Na medida em que as proteínas de ponto de controle imune quando ligadas aos seus ligandos específicos modulam a atividade das células T, a produção de citocinas Th1 e a citotoxicidade celular,²⁹ estas constituem importantes alvos da imunoterapia, com destaque para o Antígeno associado a linfócitos T citotóxicos-4 (CTLA-4) e para a Proteína de morte celular programada-1 (PD-1), cujo bloqueio aumenta a imunidade anti-tumoral.^{21,26,30,35,38,42,44}

Em relação a estas proteínas, admite-se que atuem em diferentes estádios da resposta imune, considerando-se que a CTLA-4 impeça a ativação inicial das células T nos gânglios linfáticos e que a PD-1 iniba a atividade das células T ativas, no microambiente tumoral.³⁰

A CTLA-4, ao apresentar uma estrutura similar a CD28, um recetor co-estimulador existente à superfície das células T, vai ter capacidade para se ligar à proteína B7 (B7-1 ou B7-2) da APC, impedindo, deste modo, a ligação da proteína CD28 e conseqüentemente a ativação inicial da célula T.^{30,36,41} Por sua vez, a PD-1 vai limitar a resposta do sistema imunitário ao ligar-se a ligandos específicos, em particular, os ligandos de morte celular programada 1 e 2 (PD-L1 e PDL-2).^{16,21,33,42,43}

Ao contrário da ligação PD-1/PD-L2 que não se encontra bem estudada, a ligação PD-1/PD-L1 constitui a via mais abordada em imunoterapia, na medida em que a expressão de PD-L1 tem sido associada a uma grande variedade de células tumorais,^{30,35} contribuindo para a evolução do processo neoplásico.^{21,33}

2.2 Inibidores de Pontos de Controle Imune

Os resultados insuficientes atribuídos às terapêuticas “clássicas” e o potencial crescente atribuído à imunoterapia no tratamento do BC localmente avançado ou metastizado, têm contribuído para que as terapêuticas imunes venham progressivamente a assumir especial interesse nestes doentes. A este nível, destacam-se numa primeira fase as várias pesquisas assentes na atividade dos anticorpos monoclonais como inibidores de pontos de controle imune.^{30,44} Como exemplo, surge o papel atribuído ao anticorpo IgG 1 no tratamento do BC, na medida em que parece exercer especial ação sobre um co-inibidor de resposta periférica do sistema imunitário com elevada expressão no carcinoma urotelial.^{37,45}

Como os inibidores de pontos de controle imune atuam com o objetivo de restaurar a resposta anti-tumoral por parte do sistema imunitário, considera-se que a resposta dos doentes

a estes agentes terapêuticos vai estar particularmente dependente da cinética e da eficiência do seu sistema imunitário, assim como da sua interação com o processo tumoral.³⁰

Atualmente, são vários os agentes identificados como inibidores de pontos de controle imune com interesse para o BC localmente avançado ou metastizado, encontrando-se alguns já reconhecidos pela FDA, como Atezolizumab, Durvalumab, Nivolumab e Pembrolizumab.^{6,21,22,34}

Em relação aos inibidores de pontos de controle imune, vários são os estudos que procuram compreender quais os doentes com maior probabilidade de resposta a esta terapêutica, salientando-se o recurso à imunohistoquímica (IHC), como forma de identificar nos tumores a presença de moléculas envolvidas no controle imune.²¹ A este respeito, salienta-se a revisão recente das indicações de Atezolizumab, na medida em que parece apresentar também especial ação em doentes não elegíveis à quimioterapia contendo cisplatina.^{6,21,22,46}

2.3 Inibidores de PD-1 e de PD-L1

Partindo do pressuposto que a expressão de PD-L1 por IHC no BC se associa ao seu estadio patológico, esta poderá representar algum significado prognóstico, considerando que níveis mais elevados de PD-L1 parecem corresponder a estadios mais avançados da doença.^{35,39,41}

Atualmente, estima-se que aproximadamente 95% dos linfócitos que invadem o BC expressam PD-1 e que cerca de 12% das células tumorais e 27% das células imunes infiltrantes de tumores expressam PD-L1.⁴⁷

A este nível, destacam-se o Nivolumab e o Pembrolizumab como principais agentes inibidores de PD-1 e o Atezolizumab, o Durvalumab e o Avelumab como agentes anti-PD-L1.^{35,37}

2.3.1 Nivolumab

O Nivolumab, enquanto inibidor PD-1, corresponde a um anticorpo monoclonal humano IgG4, responsável pelo bloqueio da interação entre PD-1 e os seus ligandos expressos pelas células tumorais.^{35,38}

O Nivolumab encontra-se testado como terapêutica de segunda linha no BC localmente avançado ou metastizado através de um estudo de fase I/II (CheckMate 032) e de um estudo não-randomizado de fase II (CheckMate 275). Em CheckMate 275 foi também determinada a expressão de PD-L1 em cada amostra tumoral. Como resultados, foi possível verificar nos doentes (n=265) tratados com Nivolumab (3mg/Kg) a cada duas semanas, uma percentagem de resposta global de aproximadamente 19,6%.^{26,35,36,38}

Por sua vez, tendo em conta a relação existente entre a expressão de PD-L1 e a resposta ao Nivolumab, o estudo CheckMate 275 permitiu identificar uma percentagem de resposta global de aproximadamente 23,8% para amostras tumorais com expressão de PD-L1 $\geq 1\%$ e uma percentagem de 16,1% para amostras tumorais com expressão $< 1\%$.^{26,35,36,38,44}

Em relação ao Nivolumab, este encontra-se aprovado pela FDA desde 2 de fevereiro de 2017 no tratamento do BC localmente avançado ou metastizado com progressão após quimioterapia contendo cisplatina.⁴⁴

2.3.2 Pembrolizumab

O Pembrolizumab enquanto anticorpo monoclonal IgG4, corresponde a um agente anti-PD-1, com eficácia demonstrada num ensaio clínico de fase II, realizado em doentes com BC localmente avançado ou metastizado.⁴⁴ Através deste ensaio clínico, foi possível identificar uma percentagem de resposta global ao Pembrolizumab de cerca de 26% e uma duração média de resposta de aproximadamente 10 meses.⁴⁴ Na medida, em que apenas foram seleccionados para este ensaio clínico doentes com expressão de PD-L1 $\geq 1\%$ pelas amostras

tumorais, foi sugerido haver uma associação favorável entre a expressão de PD-L1 e a resposta ao Pembrolizumab.⁴⁴ Contudo, o mesmo não foi demonstrado num estudo randomizado de fase III (KEYNOTE-045) em doentes com BC localmente avançado ou não ressecável com progressão após quimioterapia contendo cisplatina.^{26,31,38,44}

No estudo KEYNOTE-045 o tratamento com Pembrolizumab (200mg) a cada 3 semanas, demonstrou ser mais eficaz e apresentar maior duração de resposta, comparativamente à quimioterapia com recurso a taxanos de agente único (Paclitaxel (175mg/m²), Docetaxel (75mg/m²) e Vinflunina (320mg/m²)). O estudo KEYNOTE-045 permitiu reconhecer uma percentagem de resposta global atribuída ao Pembrolizumab de sensivelmente 21,1% e de 11,4% à quimioterapia.^{26,31,38,44}

Apesar de não terem sido identificadas diferenças significativas quanto à sobrevivência livre de progressão da doença entre as formas de tratamento avaliadas em KEYNOTE-045, foi possível associar o Pembrolizumab a um menor número de eventos adversos, comparativamente aos agentes únicos de quimioterapia, com uma percentagem respetiva de cerca de 60,9% (Pembrolizumab) e de 90,2% (quimioterapia).^{31,44}

Na tentativa de testar o Pembrolizumab como tratamento de primeira linha em doentes com BC localmente avançado ou metastizado não elegíveis à cisplatina, surge na literatura a referência a um estudo de fase II, em particular KEYNOTE-052. Este estudo permitiu observar uma percentagem de resposta global de cerca de 29% e um período médio de resposta de aproximadamente 2 meses.^{35,38,44}

Tendo por base, os resultados obtidos com os ensaios clínicos KEYNOTE-045 e KEYNOTE-052, o Pembrolizumab recebeu aprovação pela FDA a 18 de maio de 2017 como tratamento de segunda-linha do BC localmente avançado ou metastizado com progressão após quimioterapia contendo cisplatina, assim como tratamento de primeira linha do BC localmente avançado ou metastizado em doentes não elegíveis à Cisplatina.⁴⁴

2.3.3 Atezolizumab

O Atezolizumab enquanto anticorpo monoclonal IgG1, surge como inibidor de PD-L1 responsável por bloquear a interação de PD-L1 com PD-1.^{26,29,35,44} Este agente foi alvo de um estudo de fase I, realizado em doentes (n=68) com BC localmente avançado ou metastizado, numa dose de 15mg/kg a cada 3 semanas, tendo demonstrado de forma global resultados favoráveis e duradouros.⁴⁴

O Atezolizumab apresenta aprovação pela FDA desde 18 de maio de 2016, com base nos resultados de um estudo de fase II (IMvigor 210). Este estudo, caracteriza-se de forma objetiva pela seleção de 2 coortes de doentes, em particular, doentes com BC localmente avançado ou metastizado não elegíveis à cisplatina (coorte 1) e doentes com BC localmente avançado ou não ressecável (n=310) com progressão após quimioterapia contendo cisplatina durante 12 meses (coorte 2). Através do mesmo, foi possível determinar uma percentagem de resposta global de cerca de 15%, assim como uma estabilização da doença em aproximadamente 19% dos doentes selecionados.^{26,29,38,44,46,48}

Em IMvigor 210 foi também determinada a expressão de PD-L1 pelas células imunes infiltrantes de Tumor com recurso ao teste VENTANA SP142, tendo sido identificada uma percentagem de resposta ao Atezolizumab mais significativa em doentes com maior expressão de PD-L1 nestas células.³⁸

Num ensaio clínico randomizado de fase III (IMvigor 211), o Atezolizumab foi também testado em doentes (n=931) com BC localmente avançado ou metastizado com progressão após quimioterapia contendo cisplatina, numa dose de 1200mg a cada 3 semanas, em comparação com o tratamento assente num agente único de quimioterapia (Docetaxel, Paclitaxel ou Vinflunina), tendo sido identificados resultados semelhantes aos resultados apresentados pelo estudo IMvigor 210. O IMvigor 211 permitiu observar taxas de sobrevivência mais significativas em doentes tratados com o Atezolizumab comparativamente

aos doentes tratados com quimioterapia, em particular Docetaxel ou Paclitaxel. Contudo, o tratamento com o Atezolizumab não demonstrou em IMvigor 211 apresentar uma maior sobrevivência comparativamente ao tratamento com recurso ao agente de quimioterapia Vinflunina, tendo sido identificado com este último, um resultado superior.⁴⁴

Na tentativa de avaliar o Atezolizumab como tratamento de primeira linha em doentes com BC localmente avançado ou metastizado não elegíveis à cisplatina, surge na literatura, a referência aos resultados obtidos através da coorte 1 do estudo IMvigor 210, referido antes. Com esta coorte, foi possível identificar uma percentagem de resposta global ao Atezolizumab de sensivelmente 23% na amostra em estudo.^{34,35,44}

Através dos resultados obtidos com IMvigor 210, a FDA pôde rever a aprovação do Atezolizumab, a qual passou a englobar a partir de 17 de abril de 2017 o tratamento de doentes não elegíveis à cisplatina.

2.3.4 Durvalumab

O Durvalumab apresenta aprovação pela FDA no tratamento de doentes com BC localmente avançado ou metastizado, após ou durante o tratamento com quimioterapia contendo cisplatina, desde 1 de maio de 2017.^{21,34,44}

O Durvalumab enquanto anticorpo monoclonal humano IgG1, seletivo e de alta afinidade, encontra-se associado ao bloqueio da ligação de PD-1 com PD-L1 ou com CD80^{35,49} e foi alvo de um estudo de fase I/II realizado em doentes com doença neoplásica inoperável ou metastizada. Com base neste estudo, foi possível concluir, que na coorte de doentes (n=191) com BC localmente avançado, o tratamento com o Durvalumab (10mg/kg) a cada 2 semanas, foi responsável por uma percentagem de resposta global de cerca de 18% e uma duração de resposta efetiva superior ou igual a 6 meses em aproximadamente 81% da amostra.^{21,34,44}

Neste estudo, foi também determinada a expressão de PD-L1 pelas células tumorais, com recurso ao teste VENTANA P263, de modo a determinar a atividade do Durvalumab com base na expressão de PD-L1. Como resultado deste estudo, foi possível reconhecer uma percentagem de resposta global de cerca de 28% em tumores com expressão elevada de PD-L1 e em oposição, uma percentagem inferior a 25% em tumores sem ou com baixa expressão de PD-L1.^{21,34,35,44,46,49}

2.3.5 Avelumab

O Avelumab enquanto anticorpo monoclonal IgG1 corresponde a um inibidor de PD-L1 que se encontra ainda numa fase inicial de investigação.^{35,38}

Em vários estudos, há referência a um ensaio clínico de fase I (JAVELIN 100), em que o Avelumab foi testado em múltiplos tumores sólidos, salientando-se os resultados obtidos no tratamento de uma coorte de doentes (n=242) com BC localmente avançado ou não ressecável com progressão após quimioterapia contendo cisplatina.^{34,35,38,44} O ensaio clínico JAVELIN 100 permitiu observar que o Avelumab foi responsável por uma percentagem de resposta global de cerca de 18%.^{34,38,44}

Em JAVELIN 100 foi também determinada a expressão de PD-L1 no tecido tumoral de 132 doentes da amostra, tendo sido reconhecida uma expressão positiva (PD-L1 >5%) em 56 desses doentes, assim como uma percentagem de resposta global ao Avelumab mais favorável em doentes com expressão de PD-L1 positiva, particularmente de 25%, contra 14,7% em doentes sem expressão de PD-L1.⁴⁴

2.4 Inibidores da CTLA-4

Em relação aos inibidores da CTLA-4, como referido antes, eles são responsáveis por inibir a interação da CTLA-4 com os seus ligandos B7, sendo deste modo, responsáveis pela

ativação de um maior número de células T e conseqüentemente por uma maior ação anti-tumoral.^{26,30,42,47}

O Ipilimumab e o Tremelimumab encontram-se atualmente reconhecidos como anticorpos anti-CTLA-4.^{21,30,35,37}

2.4.1 Ipilimumab

O Ipilimumab enquanto inibidor da CTLA-4, corresponde a um anticorpo monoclonal IgG1,²⁶ alvo de um estudo de fase II em associação com quimioterapia GC no tratamento de primeira linha de doentes com BC metastizado. Através deste estudo, foi possível observar que a associação de Ipilimumab com a quimioterapia GC apesar de não demonstrar toxicidade sinérgica, também não demonstrou atividade sinérgica. Tendo sido, deste modo, reconhecida com a associação do Ipilimumab à quimioterapia GC uma percentagem de resposta global semelhante à obtida com a quimioterapia GC de forma isolada.²⁶

2.4.2 Tremelimumab

O Tremelimumab enquanto inibidor da CTLA-4, encontra-se ainda numa fase inicial de investigação, salientando-se a sua participação numa coorte de um estudo de Fase II, ainda em vigor, em doentes com BC localmente avançado ou metastizado.²⁶

2.5 Toxicidade dos Agentes em Imunoterapia

A toxicidade atribuída ao bloqueio do ponto de controle imune parece estar particularmente relacionada com o agente utilizado, considerando-se de forma global que os eventos adversos associados a estes agentes se devem maioritariamente ao resultado da sua ativação imunológica.²¹

Os eventos adversos associados aos inibidores do ponto de controle imune são inespecíficos num considerável número de doentes, como fadiga, tosse, náuseas ou anorexia. De forma menos frequente, pode haver referência a alterações inflamatórias em múltiplos sistemas de órgãos,²¹ como os pulmões, fígado, pâncreas, hipófise, tireoide e mais vulgarmente a pele.²¹

Os agentes anti-PD-1 e anti-PD-L1 parecem estar associados à ocorrência de um menor número de eventos adversos comparativamente à quimioterapia, encontrando-se nesta última, mais comumente descritas alterações cutâneas, gastrointestinais, hepáticas ou endócrinas.³⁴

Ainda em relação aos inibidores de pontos de controle imune, os agentes anti-CTLA-4 aparecem mais vulgarmente associados a taxas de eventos adversos mais significativas comparativamente aos anti-PD-1/PD-L1, na medida em que a expressão de CTLA-4 se encontra associada a um maior número de tecidos, como a pele e os intestinos e a expressão de PD-L1 se limita a áreas tumorais ou tecidos inflamados.³⁰

2.6 Emergência de Novas Terapias Imunes

Dada a necessidade de novas abordagens no tratamento do BC localmente avançado ou metastizado tem sido notável na literatura o interesse crescente por novas estratégias terapêuticas, destacando-se para além dos múltiplos estudos assentes em inibidores de pontos de controle, a investigação em curso com vista à identificação de outros agentes em imunoterapia.⁴⁵ A este nível, tem-se atribuído principal destaque ao eventual impacto da vacinação anti-tumoral.^{30,45}

Em relação às vacinas anti-tumorais, presume-se que estas possam constituir uma mais-valia no tratamento de doentes com BC, tendo por base os mecanismos de ação que lhe estão subjacentes.

A vacina ao promover a proliferação de células T a partir da ativação de APCs vai potenciar uma resposta imune por parte do hospedeiro, salientando-se a ação das células T contra os antígenos tumorais.^{24,30,43} A este nível, são atualmente identificadas duas categorias de vacinas, por um lado as que visam oncoproteínas e por outro, as vacinas direcionadas contra antígenos tumorais.^{30,45}

Das vacinas que visam oncoproteínas, encontra-se atualmente testada a vacina DN24-02 (Lapuleucel- T), uma imunoterapia celular autóloga constituída por APCs cultivadas com um antígeno recombinante derivado da oncoproteína HER 2, em particular BA7072.^{30,45}

Na medida em que a oncoproteína HER 2 representa o recetor de um fator de crescimento com elevada expressão em múltiplos processos neoplásicos, como o carcinoma urotelial,³⁰ esta constitui o alvo da vacina DN24-02.

DN24-02 foi alvo de um ensaio clínico randomizado de fase II (NeuACT) em doentes com BC urotelial, HER 2 positivo e com risco elevado de recaída após cirurgia. Apesar de não terem sido identificadas em NeuACT diferenças significativas nos resultados obtidos ou na sobrevivência livre de doença por parte da amostra, foi possível concluir que DN24-02

potenciou a ativação de APCs e conseqüentemente, uma resposta imune por parte do hospedeiro.³⁰

Em relação às vacinas direcionadas contra antígenos, estas demonstram potencial terapêutico enquanto terapias imunes, na medida em que os tumores expressam antígenos, podendo essa expressão ser devidamente explorada, por forma a capacitar o sistema imunitário na identificação e ação sobre as células tumorais.⁵⁰

Ainda a este nível, há referência na literatura à existência de uma vacina primária de vetor recombinante (PANVAC). Na medida em que a vacina PANVAC tem sido associada a resultados favoráveis no tratamento de processos tumorais com expressão de antígenos específicos, como o antígeno mucina-1 (MUC-1) ou o antígeno carcinoembrionário (CEA), esta tem merecido especial atenção no tratamento do BC urotelial.³⁰

Atualmente, atribui-se especial interesse em imunoterapia à família de antígenos cancro/testículo (CT). Apesar destes antígenos não serem expressos por células adultas normais, com exceção das células germinativas masculinas, tem-se verificado a sua expressão em múltiplos processos tumorais malignos, como o BC urotelial.³⁰

A este nível, há referência na literatura a um estudo que testou a expressão de antígenos CT em amostras de doentes (n=95) com BC urotelial de alto grau, através do qual foi possível observar a expressão de pelo menos um antígeno CT em cerca de 77% das amostras e de mais do que um desses antígenos em aproximadamente 66%. O mesmo estudo permitiu identificar MAGE-A3 e MAGE-A4 como os principais antígenos expressos nas amostras em estudo.³⁰

Apesar das funções biológicas de MAGE-A3 não serem ainda conhecidas, a sua presença em células tumorais tem sido associada a um pior prognóstico, constituindo também alvo de investigação em imunoterapia.^{37,50} MAGE-A3 encontra-se atualmente a ser alvo de vários ensaios clínicos, com destaque para um estudo de Fase II (MAGNOLIA). No estudo

MAGNOLIA, o antígeno MAGE-A3 encontra-se a ser estudado em associação com um imunostimulante (AS15) como tratamento adjuvante de doentes com MIBC.^{30,37,43}

Em imunoterapia, surge ainda como potencial estratégia terapêutica no BC localmente avançado ou metastizado, o recurso a proteínas de fusão, como a proteína ALT-801 e a proteína ALT-803.^{41,51}

A proteína ALT-801 resulta da fusão de uma interleucina, em particular, da interleucina-2 (IL-2) com um recetor das células T.^{37,51} Na medida em que a IL-2 corresponde a uma citocina segregada por linfócitos B, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, com ação no processo de diferenciação das células T em células Th1, na produção de IFN- γ , assim como na produção de TNF- α e células *Natural Killer* (NK), a proteína ALT-801 tem demonstrado especial interesse em imunoterapia.^{37,41,51}

Segundo alguns autores, a ALT-801 parece apresentar uma ação imunostimulante e anti-tumoral mais efetiva que a IL-2.^{37,51} ALT-801 foi alvo de um estudo de fase I/II em associação com a quimioterapia GC no tratamento de doentes com BC localmente avançado ou metastizado. Como resultados deste estudo, apesar de ter sido identificada uma percentagem de resposta global na amostra de aproximadamente 35%, a associação da proteína ALT-801 com a quimioterapia GC foi relacionada a elevada toxicidade.^{37,41,42,51}

Por sua vez, a proteína ALT-803 corresponde à Interleucina-15 (IL-15) com atividade biológica avançada.^{41,51} A IL-15 apresenta uma estrutura semelhante à IL-2, contudo, é segregada por fagócitos mononucleares e intervém no processo de desenvolvimento, proliferação e ativação de células NK e células T de memória (CD8+).^{41,51} Na medida em que ALT-803 tem demonstrado uma atividade anti-tumoral durável em vários tumores, surge também, com eventual potencial terapêutico no BC.

2.7 Imunoterapia em Diferentes Associações Terapêuticas

Na medida em que se pondera poder existir uma correlação favorável entre a resposta aos inibidores de pontos de controle e a sua associação com outros agentes terapêuticos, como a quimioterapia, a radioterapia, a cirurgia ou outras terapêuticas imunes,^{34,44} tem-se assistido neste âmbito a um investimento crescente. A este nível, atribui-se especial enfoque à associação de inibidores da PD-1/PD-L1 com inibidores da CTLA-4 ou, por sua vez, à associação de inibidores da PD-1/PD-L1 ou da CTLA-4 com a quimioterapia.

Vários autores consideram que, a combinação de inibidores de pontos de controle com ação sobre diferentes moléculas alvo pode ser mais eficaz do que a sua utilização de forma isolada, podendo trazer vantagens do ponto de vista anti-tumoral.³⁴

A associação de inibidores da PD-1/PD-L1 com inibidores da CTLA-4 surge como alvo de interesse num ensaio clínico de fase I/II (CheckMate 032) em que é testada a ação do Nivolumab (anti-PD-1) com o Ipilimumab (anti-CTLA-4) em doentes com BC avançado.^{21,34,35,44,51} Em CheckMate 032 foram avaliados dois esquemas de dose, em particular, o Ipilimumab (3mg/kg) com o Nivolumab (1mg/kg) e o Ipilimumab (1mg/kg) com o Nivolumab (3mg/Kg), assim como, o Nivolumab de forma isolada (3mg/kg). Com este estudo, foi possível associar resultados mais favoráveis aos esquemas de associação comparativamente ao Nivolumab de forma isolada, com uma percentagem de resposta global, respetivamente de 38,5%, 26% e 25,6%.^{21,34,51} O mesmo estudo, concluiu haver uma maior ocorrência de efeitos adversos (Grau 3/4) na associação de Ipilimumab (1mg/kg) com o Nivolumab (3mg/Kg) (31,7%), comparativamente a Ipilimumab (3mg/kg) com o Nivolumab (1mg/kg) (30,8%), ou Nivolumab de forma isolada (23,1%).⁴⁴

A associação de inibidores de pontos de controle com terapêuticas convencionais, como a quimioterapia, também tem sido alvo de vários trabalhos, destacando-se um estudo de fase I em que foi avaliada a associação de Pembrolizumab (anti-PD-1) com um agente de

quimioterapia, em particular o Docetaxel ou a Gencitabina.^{34,35} Com os resultados deste estudo, foi possível verificar que a associação do Pembrolizumab com a quimioterapia demonstrou uma atividade anti-tumoral favorável em ambos os esquemas, tendo sido reconhecida uma percentagem de resposta global de cerca de 50% para a associação do Pembrolizumab com o Docetaxel e de 17% para a associação do Pembrolizumab com a Gencitabina.^{34,35}

Apesar de um estudo inicial de fase II considerar que o Ipilimumab (anti-CTLA-4) apresenta uma percentagem de resposta global baixa, de apenas 5%, em doentes com BC urotelial avançado, este fármaco tem demonstrado um maior potencial de ação quando associado a outras terapêuticas.^{29,52}

Apesar da toxicidade verificada com a associação à quimioterapia GC, de ALT-801, não foi ainda descartado um eventual potencial terapêutico desta proteína em associação com outras terapêuticas imunes, apresentando-se sob investigação o seu papel, em associação com agentes anti-PD-1 e anti-PD-L1.⁵¹

2.8 Biomarcadores de Valor Preditivo em Imunoterapia

Os inibidores de pontos de controle imune, apesar de virem a demonstrar uma eficácia clínica crescente no tratamento do BC localmente avançado ou metastizado, é necessário ter em atenção que uma percentagem considerável de doentes, não apresenta benefícios com esta modalidade terapêutica, permanecendo desconhecidos os mecanismos de resistência.⁵³

A caracterização tumoral e a determinação de biomarcadores de valor preditivo surgem no BC, como fatores de destaque à medida que novas terapêuticas imunes vão sendo desenvolvidas, não só para uma melhor compreensão da biologia tumoral, como também para a seleção dos doentes com maior potencial de resposta.^{24,26,33}

Ao nível da imunidade adaptativa, a complexidade do microambiente tumoral tem vindo a assumir um interesse crescente, considerando que parece estar relacionado com a resposta dos doentes às terapêuticas imunes.²⁴

Nos dias de hoje, reconhece-se que a ação das células T ativas contra as células tumorais é determinada em grande parte pela complexidade do microambiente tumoral, que pode ser constituído por diferentes tipos de células, incluindo, para além das células tumorais, células do estroma, citocinas, células T, antígenos e moléculas do MHC.^{26,53}

A este nível, o tumor pode ser caracterizado como tumor imunogénico ou não-imunogénico, tendo em conta a presença ou a ausência, respetivamente, de outro tipo de células, como células infiltrantes tumorais (CD4+ e CD8+), quimiocinas ou proteínas PD-L1.^{26,53}

Relativamente aos biomarcadores, não se encontra ainda bem esclarecida de que forma a sua expressão pode prever os resultados das diferentes terapias imunes. Contudo, são atualmente apresentados como fatores com potencial valor preditivo, a expressão de PD-L1 pelo tumor, a taxa de mutação tumoral, a carga de neoantígenos e a expressão de IFN- γ .^{34,37,50}

Embora a expressão de PD-L1 possa constituir um biomarcador para a resposta imune, os estudos atuais não permitem chegar a um consenso quanto ao seu potencial no BC,⁵⁰ tendo ficado demonstrado que a expressão de PD-L1 ou a falta dela, pelas células tumorais, não possui valor preditivo positivo ou negativo capaz de determinar a terapêutica a instituir.²⁶ Algumas imprecisões identificadas entre os diversos estudos, para além de se deverem a fatores relacionados com a heterogeneidade tumoral, parecem também estar relacionados com a falta de padronização existente, na medida em que os testes de IHC utilizados, os limites considerados para definir a expressão, os clones de anticorpos empregues ou o tipo de células avaliadas, não são ainda consensuais.^{21,26,30}

Relativamente a PD-L1 é de realçar que se encontram atualmente aprovados pela FDA, testes de HIC, como o teste de DAKO ou os testes de VENTANA (VENTANA SP142 e VENTANA SP263), capazes de determinar a expressão de PD-L1 pelas células tumorais ou pelas células imunes infiltrantes de tumor, particularmente, macrófagos, células dendríticas e linfócitos.^{21,34,44}

Da análise de vários estudos, conclui-se de modo geral que uma maior expressão de PD-L1 pelas células imunes infiltrantes de tumor, se encontra associada a uma maior taxa de resposta e a uma maior sobrevivência global, destacando-se os resultados obtidos em dois estudos com Atezolizumab (anti-PD-L1). Por um lado, um estudo de fase I em doentes com cancro da bexiga metastizado, em que foi possível verificar respostas mais duráveis e taxas de resposta mais significativas em doentes com maior expressão de PD-L1 pelas células imunes,^{24,33} por outro, o estudo IMvigor 210, referido anteriormente.

Em relação ao estudo IMvigor 210, na medida em que foi determinada a expressão de PD-L1 pelas células tumorais e pelas células imunes infiltrantes de tumor, foi possível observar uma expressão baixa de PD-L1 pelas células tumorais, em oposição a uma expressão significativa pelas células imunes. Por sua vez, foi possível verificar uma resposta à terapêutica e uma sobrevivência global mais favoráveis em doentes com maior expressão de PD-L1 pelas células imunes, não tendo sido identificada qualquer relação entre a expressão de PD-L1 pelas células tumorais e a resposta ao tratamento.^{25,32}

Na medida, em que as mutações tumorais parecem ser responsáveis pelo aparecimento de novos neoantígenos, que ao serem reconhecidos pelas células T anti-tumorais, potenciam uma resposta imune, determinados fatores, como uma maior prevalência de mutações,^{24,34} maior carga de neoantígenos²¹ e, maior afinidade de ligação ao antígeno, surgem como fatores capazes de prever um benefício clínico durável com recurso aos inibidores de pontos de controle imune, constituindo assim, potenciais biomarcadores.^{21,40}

A este nível, há referência à análise de um subgrupo do estudo IMvigor 210, que ao permitir avaliar genes associados ao BC localmente avançado ou metastizado, permitiu concluir haver uma associação favorável entre a taxa de mutação tumoral e a resposta ao tratamento com Atezolizumab por parte da amostra.^{21,39} Resultados semelhantes foram também observados num estudo com Nivolumab (CheckMate 275).²¹

Para além dos biomarcadores de valor preditivo referidos anteriormente, vários estudos consideram ainda, que a carga de linfócitos infiltrantes de tumor (CD3+ e CD8+) e o seu status de ativação, possam intervir na eficácia da imunoterapia, encontrando-se uma maior densidade de CD3+ e CD8+ associada a um aumento da sobrevivência global e livre de doença e o seu status de ativação associado ao prognóstico.^{25,50,53}

A expressão de IFN- γ que desempenha um papel central na resposta anti-tumoral, encontra-se também a ser alvo de estudo, tendo em conta o seu potencial como biomarcador prognóstico e preditivo em imunoterapia.^{25,50} Tendo em conta que o IFN- γ corresponde a uma citocina produzida por células T ativas capaz de induzir a expressão de PD-L1 pelas células tumorais, considera-se que uma maior expressão de IFN- γ no microambiente tumoral possa estar associada a uma resposta mais efetiva aos inibidores de pontos de controle imune. A este nível, através de uma análise realizada em doentes (n=149) do estudo IMvigor 210, foi possível concluir que uma elevada expressão de genes de IFN- γ se associou a uma melhor resposta ao tratamento com Atezolizumab.

Por sua vez, a partir da análise de amostras tumorais (n=177) no estudo CheckMate 275, foi também possível concluir que uma maior expressão de IFN- γ pelas amostras se associou a uma maior resposta ao inibidor de ponto de controlo imune em estudo, em particular, ao Nivolumab.²¹

CONCLUSÃO

Partindo da análise de vários estudos, é desde logo evidente a complexidade atribuída às interações entre as células tumorais e o sistema imunitário. A instabilidade genética inerente ao processo de oncogénese parece cada vez mais influenciar a resposta imune por parte do hospedeiro e deste modo condicionar o desenvolvimento do processo tumoral.

Comportando o BC uma das taxas de mutação mais significativas, associadas a processos tumorais, cada vez mais a base genómica e a caracterização do microambiente tumoral parecem constituir fatores determinantes para a resposta e significado prognóstico das diferentes terapêuticas até agora instituídas.

Em imunoterapia, o impacto atribuído aos anticorpos monoclonais como inibidores de pontos de controle imune, na sobrevivência global ou livre de progressão da doença tem contribuído para a mudança de paradigma inerente às atuais linhas de orientação terapêuticas no BC.

Embora, os anticorpos monoclonais venham a demonstrar respostas duráveis num considerável número de doentes com BC localmente avançado ou metastizado, ainda não se consegue prever quais os doentes que podem beneficiar do bloqueio de ponto de controle imune. Facto que parece cada vez mais, estar dependente de fatores moleculares e imunológicos subjacentes.

Apesar da tolerabilidade geral atribuída aos inibidores de pontos de controle imune, em particular, aos agentes anti-PD-1 e anti-PD-L1, os desafios inerentes à sua utilização incluem ainda a determinação de mecanismos de resistência e a identificação de pontos de controle alternativos.

Na atualidade, é notável a emergência de novas terapias imunes, com destaque para a vacinação anti-tumoral. Para além do interesse atribuído às vacinas que visam oncoproteínas e às direcionadas contra antígenos tumorais, surge a referência a PANVAC, uma vacina de

vetor primário recombinante, com resultados favoráveis em tumores com expressão de MUC-1 ou CEA, dos quais se destaca o BC urotelial.

A expressão de antígenos CT, em particular de MAGE-A3 e MAGE-A4 no BC urotelial, tem sido associada a um mau prognóstico e, por sua vez, alvo de estudo em imunoterapia, destacando-se o papel da associação de MAGE-A3 com um imunoestimulante no tratamento adjuvante de doentes com MIBC.

Também, o recurso a proteínas de fusão, com destaque para ALT-801 e ALT-803 parece vir a demonstrar especial interesse em imunoterapia no tratamento do BC. Sendo ALT-801, resultante da fusão de uma IL-2 com um recetor das células T, associada a uma ação anti-tumoral mais efetiva que a IL-2, destacando a sua ação no processo de diferenciação das células T, produção de IFN- γ , TNF- α e células NK e, por sua vez, ALT-803, enquanto IL-15 com atividade biológica avançada, associada ao desenvolvimento, proliferação e ativação de células NK e CD8+.

Para além dos estudos discutidos aqui, múltiplas abordagens em imunoterapia com agente único ou em combinação estão a ser alvo de atenção. A este nível, atribui-se especial enfoque à associação de inibidores PD-1/PD-L1 com inibidores CTLA-4 ou, por sua vez, à associação de inibidores PD-1/PD-L1 ou CTLA-4 com a quimioterapia.

A caracterização do microambiente tumoral e a determinação de biomarcadores de valor preditivo surgem no BC, não só para uma melhor compreensão da biologia tumoral, como para a seleção dos doentes com maior potencial de resposta. Como fatores com potencial valor preditivo, surgem a expressão de PD-L1 pelo tumor, a taxa de mutação tumoral, a carga de neoantígenos e a expressão de IFN- γ .

Apesar da expressão de PD-L1 no BC demonstrar uma aparente associação com respostas mais favoráveis aos inibidores de pontos de controle imune, a verificação de

respostas significativas e até mesmo completas em doentes com expressão de PD-L1 negativa, encontra-se ainda por esclarecer.

Embora a imunoterapia e, em particular a variedade de novos agentes terapêuticos, pareça cada vez mais corresponder a uma alternativa de tratamento viável no BC, com resultados cada vez mais promissores, ainda há metas consideráveis a atingir, quanto ao estabelecimento da sequência ideal, da combinação mais efetiva e duração ótima das terapias imunes.

Claramente, há necessidade num futuro próximo de uma mudança de paradigma no tratamento do BC localmente avançado ou metastizado. Assim, o interesse científico e o investimento crescentes na área da imunoterapia permitirão a identificação de novas terapias imunes, assim como o estabelecimento de sequencias terapêuticas ótimas, com considerável impacto ao nível da sobrevivência global e da sobrevivência livre de progressão da doença.

AGRADECIMENTOS

A presente revisão, mais do que o trabalho final do sexto ano em Medicina, determina para mim, o início de uma nova fase de aprendizagem, de grande exigência e responsabilidade. Por esta razão, assumindo o contributo de várias pessoas para a concretização deste trabalho, agradeço:

- À minha família, em particular à minha mãe, ao meu pai e à minha irmã.
- Ao Senhor Professor Doutor Arnaldo Figueiredo por ter aceite desde logo o meu pedido de orientação, pelos comentários e pelo tempo despendido no acompanhamento deste artigo de revisão.
- Ao Senhor Doutor Paulo Azinhais, pelas impressões e pelo tempo despendido no acompanhamento deste artigo de revisão.
- Aos meus amigos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodriguez R, Rueda O, Ibarz O. Bladder cancer: Present and Future. *Med Clin.* 2017;149:449-455.
2. Kluth L, Black P, Bochner B, Catto J, Lerner S, Stenzl A, et al. Prognostic and Prediction Tools in Bladder Cancer: A Comprehensive Review of the Literature. *Eur Urol.* 2015;68:238-253.
3. Truta A, Popon T, Saraci G, Ghervan L, Pop I. Health Related Quality of life in bladder cancer. Current approach and future perspectives. *Clujul Med.* 2017;90:262-267.
4. Cheung G, Sahai A, Billia M, Dasgupta P, Khan M. Recent advances in the diagnosis and treatment of bladder cancer. *BMC Med.* 2013;11:13-20.
5. Griffiths T. Current perspectives in bladder cancer management. *Int J Clin Pract.* 2013;67:435-448.
6. Witjes J, Compérat E, Cowan N, Santis M, Gakis G, Lebrét T, et al. Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2016;72:45-120.
7. Antoni S, Ferlay J, Soerjomatarum I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A global Overview and Recent Trends. *Eur Urol.* 2017;71:96-108.
8. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base. [Online]. International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
9. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics. 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66:7-30.
10. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics. 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67:7-30.

11. Humphrey P, Moch H, Cubilla A, Ulbright T, Reuter V. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol.* 2016;70:106-119.
12. Portugal. Direção-Geral de Saúde. PORTUGAL Doenças Oncológicas em números-2015. Programa Nacional para as Doenças Oncológicas. DGS. 2016. ISSN: 2183-0681.
13. Miyazaki J, Nishiyama H. Epidemiology of urothelial carcinoma. *Int J Urol.* 2017;24:730-734.
14. Letasiová S, Medvedová A, Sovciková A, Dusinská M, Volkovová K, Mosoiu C, et al. Bladder Cancer, a review of the environmental risk factors. *Environ Health.* 2012;11:11-15.
15. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive Molecular Characterization of Urothelial Bladder Carcinoma. *Nature.* 2014;507:315-322.
16. Figueroa J, Ye Y, Siddiq A, Garcia-Closas M, Chatterjee N, Prokunina-Olsson L, et al. Genome-wide association study identifies multiple loci associated with bladder cancer risk. *Hum Mol Genet.* 2014;23:1387-1398.
17. Brierley J, Gospodarowicz M, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. [Online]. Union for International Cancer Control. 8th. 2017. Disponível em: <http://www.hoofdhalskanker.info/wpavl/wp-content/uploads/TNM-Classification-of-Malignant-Tumours-8th-edition.pdf>.
18. Rouprêt M, Babjuk M, Compérat E, Zigeuner R, Sylvester R, Burger M. European Association of Urology Guidelines on Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma: 2017 Update. *Eur Urol.* 2018;73:111-122.
19. Anastasiadis A, Reijke T. Best Practice in the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer. *Ther Adv Urol.* 2012;4:13-32.

20. Kaiwen L, Lin T, Fan X, Duan Y, Huang J. Diagnosis of narrow-band imaging in non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Urol.* 2013;20:602-609.
21. Siefker-Radtke A, Apolo A, Bivalacqua T, Spiess P, Black P. Immunotherapy With Checkpoint Blockade in the Treatment of Urothelial Carcinoma. *J Urol.* 2017;S0022-5347:77816-77850.
22. Spiess P, Agarwal N, Bangs R, Boorjian S, Buyyounouski M, Clark P, et al. Bladder Cancer, Version 5.2017. *Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2017. J Natl Compr Canc Netw.* 2017;15:1240-1267.
23. Babjuk M, Bohle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat E. European Association of Urology Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol.* 2017;71:447-461.
24. Sweis R, Galsky M. Emerging role of immunotherapy in urothelial carcinoma-Immunobiology/biomarkers. *Urol Oncol.* 2016;34:556-565.
25. Ren R, Tyryshkin K, Graham C, Koti M, Siemens D. Comprehensive immune transcriptomic analysis in bladder cancer reveals subtype specific immune gene expression patterns of prognostic relevance. *Oncotarget.* 2017;8:70982-71001.
26. Zibelman M, Ramamurthy C, Plimack E. Emerging role of immunotherapy in urothelial carcinoma-Advanced disease. *Urol Oncol.* 2016;34:538-547.
27. Gaya J, Palou J, Cosentino M, Patiño D, Rodríguez-Faba O, Villavivencio H. A second transurethral resection could be not necessary in all high grade non-muscle-invasive bladder tumors. *Actas Urol Esp.* 2012;36:539-544.
28. Abufaraj M, Dalbagni G, Daneshmand S, Horenblas S, Kamat A, Kanzaki R, et al. The Role of Surgery in Metastatic Bladder Cancer: A Systematic Review. *Eur Urol.* 2017;73:543-557.

29. Pinto I. Systemic therapy in bladder cancer. *Indian J Urol.* 2017;33:118-126.
30. Petrylak DP. Immunotherapy: The Wave of the Future in Bladder Cancer?. *Clin Genitourin Cancer.* 2017;15:S3-S17.
31. Bellmunt J, Wit R, Vaughn D, Fradet Y, Lee J, Fong L, et al. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med.* 2017; 376:1015-1026.
32. Raggi D, Miceli R, Sonpavde G, Giannatempo P, Mariani L, Galsky M, et al. Second-line single-agent versus doublet chemotherapy as salvage therapy for metastatic urothelial cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol.* 2016;27:49-61.
33. Rosenberg J, Hoffman-Censits J, Powles T, Van der Heidjen M, Balar A, 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;387:1909-1920.
34. Powles T, Necchi A, Rosen G, Hariharan S, Apolo A. Anti-Programmed Cell Death 1/Ligand 1 (PD-1/PD-L1) Antibodies for the Treatment of Urothelial Carcinoma: State of the Art and Future Development. *Clin Genitourin Cancer.* 2017;S1558-7673:30362-30375.
35. Bellmunt J, Powles T, Vogelzang N. A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: The future is now. *Cancer Treat Rev.* 2017;54:58-67.
36. Popovic L, Matovina-Brko G, Popovic M. Checkpoint inhibitors in the treatment of urological malignancies. *ESMO Open.* 2017. 2:000165-000174.
37. Zichi C, Tucci M, Leone G, Buttigliero C, Vignani F, Pignataro D, et al. Immunotherapy for Patients with Advanced Urothelial Cancer: Current Evidence and Future Perspectives. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1-13.

38. Giridhar K, Kohli M. Management of Muscle-Invasive Urothelial Cancer and the Emerging Role of Immunotherapy in Advanced Urothelial Cancer. *Mayo Clin Proc.* 2017;92:1564-1582.
39. Aggen D, Drake C. Biomarkers for immunotherapy in bladder cancer: a moving target. *J Immunother Cancer.* 2017;5:94-107.
40. Schumacher T, Schreiber R. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science.* 2015;348:69-74.
41. Donin N, Lenis A, Holden S, Drakaki A, Pantuck A, Beedegrun A, et al. Immunotherapy for the Treatment of Urothelial Carcinoma. *J Urol.* 2017;197:14-22.
42. Seront E, Machiels JP. Molecular biology and targeted therapies for urothelial carcinoma. *Cancer Treat Rev.* 2015;41:341-353.
43. Rouanne M, Loriot Y, Leuret T, Soria J. Novel therapeutic targets in advanced urothelial carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;98:106-115.
44. Gartrell B, Sharma T, Sonpavde G. Update of systemic immunotherapy for advanced urothelial carcinoma. *Urol Oncol.* 2017;35:678-686.
45. Tsiatas M, Grivas P. Immunobiology and immunotherapy in genitourinary malignancies. *Ann Transl Med.* 2016;4:270-282.
46. Drake C, Bivalacqua T, Hahn N. Programmed cell death Ligand-1 blockade in Urothelial bladder cancer: to select or not to select. *J Clin Oncol.* 2016;34:3115-116.
47. Carneiro B, Meeks J, Kuzel T, Scaranti M, Abdulkadir S, Giles F. Emerging therapeutic targets in bladder cancer. *Cancer Treat Rev.* 2015;41:170-178.
48. Ning Y, Suzman D, Maher V, Zhang L, Tang S, Ricks T, et al. FDA Approval Summary: Atezolizumab for the Treatment of Patients with Progressive Advanced Urothelial Carcinoma after Platinum-Containing Chemotherapy. *Oncologist.* 2017; 22:743-748.

49. Massard C, Gordon M, Sharma S, Rafii S, Wainberg Z, Luke J, et al. Safety and efficacy of durvalumab (MEDI4736), an Anti-programmed cell death ligand-1 Immune -Checkpoint Inhibitor, in Patients With Advanced Urothelial Bladder Cancer. *J Clin Oncol.* 2016;34:3119-3125.
50. Lerut E, Poppel H, Joniau S, Gruselle O, Coche T, Therasse P. Rates of MAGE-A3 and PRAME expressing tumors in FFPE tissue specimens from bladder cancer patients: potential targets for antigen-specific cancer immunotherapeutics. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:9522-9532.
51. Gupta S, Gill D, Poole A, Agarwa N. Systemic Immunotherapy for Urothelial Cancer: Current Trends and Future Direction. *Cancers.* 2017;9:1-15.
52. Galsky M, Wang H, Hahn N, Twardowski P, Pal S, Albany C, et al. Phase 2 Trial of Gemcitabine, Cisplatin, plus Ipilimumab in Patients with Metastatic Urothelial Cancer and Impact of DNA Damage Response Gene Mutations on Outcomes. *Eur Urol.* 2017;S0302-2838:31033-31041.
53. Sweis R, Spranger S, Bao R, Paner M, Stadler W, Steinberg G, et al. Molecular drivers of the non-T-cell inflamed tumor microenvironment in Urothelial bladder cancer. *Cancer Immunol Res.* 2016;4:563-568.