



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

# **Tumores Cerebrais – Histopatologia e Tratamento de Gliomas**

**Susana Filipa Jordão Viegas**

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre  
em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Doutora Raquel Dionísio e da  
Professora Doutora Vera Ribeiro

2018





**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

# **Tumores Cerebrais – Histopatologia e Tratamento de Gliomas**

**Susana Filipa Jordão Viegas**

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre  
em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Doutora Raquel Dionísio e da  
Professora Doutora Vera Ribeiro

2018

## **DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO**

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Universidade do Algarve, 28 de setembro de 2018

---

© 2018 Susana Filipa Jordão Viegas

*A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho, através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.*

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Professora Dr.<sup>a</sup> Vera Marques, que me apoiou na realização desta monografia e que me orientou na preparação da mesma.

À minha orientadora, Dr.<sup>a</sup> Raquel Dionísio, pela confiança que, mais uma vez, depositou em mim ao proporcionar-me a oportunidade de realizar este trabalho sob a sua orientação.

Ao Centro Hospitalar Universitário do Algarve – Hospital de Faro pelo acolhimento e apoio e ao Centro de Formação, Investigação e Conhecimento deste pela cooperação. Um especial agradecimento ao Serviço de Oncologia, e à Dr.<sup>a</sup> Tânia Madureira que tão gentilmente aceitou colaborar comigo neste estudo.

Aos meus colegas de curso, pelo companheirismo e apoio ao longo dos últimos 5 anos, em especial àqueles que por igualdade de circunstâncias se tornaram, mais que parceiros, amigos. A compreensão, incentivo, companheirismo, disponibilidade e resiliência que durante estes anos partilhámos ajudou-nos a atingir os nossos objetivos.

À minha família pelo enorme apoio nesta maratona académica de trabalhadora estudante e que sem eles não teria sido possível.

## Resumo

O tumor cerebral é um tumor raro. A sua relevância incide no facto de pertencer ao tipo de tumores para os quais não existe cura, que provocam défices profundos nos doentes e cujos sintomas são muitas vezes negligenciados.

O tratamento farmacológico para este tipo de tumores, apesar da imensa investigação e interesse que tem despoletado nas últimas décadas, é meramente paliativo, de controlo dos sintomas e de melhoramento da condição física do doente.

Nos últimos anos muito foi descoberto sob a etiologia deste tipo de tumores a nível molecular, contudo nenhuma dessas descobertas conseguiu levar à conceção de um tratamento que se revelasse efetivamente eficaz no tratamento deste tipo de tumores. Foi feito um mapeamento genético dos genes e processos importantes para a etiologia deste tipo de tumores, contudo na prática nenhuma dessas descobertas é atualmente utilizada para o melhoramento do processo de diagnóstico, nem no tratamento dirigido a este tipo de doentes.

Desde o estabelecimento do atual tratamento *standard* recomendado para este tipo de tumores, denominado protocolo Stupp, em 2005 nada mudou.

Este estudo engloba a análise de processos clínicos de doentes do Centro Hospitalar Universitário do Algarve – Hospital de Faro com diagnóstico de glioblastoma no período de junho de 2008 a junho de 2010 e no período de janeiro de 2014 a junho de 2016.

É feita uma análise dos dados de identificação, diagnóstico e terapêutica destes doentes, com o objetivo de verificar a existência de alguma correlação entre a resposta ao tratamento e os marcadores imunológicos utilizados no diagnóstico.

Abreviaturas: glioblastoma, diagnóstico, tratamento, protocolo Stupp, resposta ao tratamento, marcadores imunológicos.

## **Abstract**

The brain tumor is one rare tumor. Its relevance lies in the fact that it belongs to the type of tumors for which there is no cure, causes profound deficits and whose symptoms are often neglected.

The pharmacological treatment for this type of tumors, in spite of the immense research and interest that it has triggered in the last decades, is merely palliative, aiming at symptom control and improvement of the patient physical condition.

In recent years, much has been discovered about the etiology of this type of tumors in a molecular level, but none of these discoveries led to a breakthrough treatment that would prove effectiveness in the treatment of this type of tumors. Mapping of genes and genetic processes important for the etiology of this type of tumor has been done, however in practice none of these findings are currently used on the improvement of the diagnosis nor in targeted treatment for these patients.

Since the establishment of the current standardized treatment recommended for this type of tumors, called Stupp protocol, in 2005 nothing has changed.

This study encompasses the analysis of patients' clinical processes from the Centro Hospitalar Universitário do Algarve – Hospital de Faro with diagnosis of glioblastoma from June 2008 to June 2010 and from January 2014 to June 2016.

An analysis of the identification, diagnosis and treatment data was made aiming to find any correlation between the patient treatment outcome and the immunohistologic markers analyzed.

**Keywords:** glioblastoma, diagnostic, treatment, Stupp protocol, treatment outcome, immunohistologic markers.

# Índice

1. Introdução .....	1
1.1. Epidemiologia .....	1
1.2. Classificação .....	2
1.3. Glioblastomas .....	6
1.4. Etiologia e Epigenética .....	8
1.4.1. Biomarcadores .....	13
1.4.2. Heterogeneidade intertumoral e intratumoral .....	21
1.5. Diagnóstico .....	23
1.5.1. Sintomas.....	24
1.5.2. Técnicas Auxiliares de Diagnóstico.....	26
1.5.3. Testes a marcadores tumorais .....	27
1.6. Tratamento .....	28
1.6.1. Protocolo Stupp.....	29
1.6.1.1. Cirurgia .....	30
1.6.1.2. Radioterapia .....	31
1.6.1.3. Quimioterapia .....	31
1.6.2. Tratamento co-adjuvante .....	32
1.6.3. Tratamento da doença recorrente.....	34
1.6.4. Efeito de mutações na resposta ao tratamento .....	37
1.7. Novas Estratégias de Tratamento.....	41
2. Metodologia e Objetivo .....	47
3. Análise dos Dados.....	48
3.1. Caracterização da População .....	48
3.2. Diagnóstico .....	51
3.3. Tratamento .....	53
4. Conclusão.....	59
5. Glossário .....	61

6. Referências Bibliográficas .....	64
8. Anexos .....	68

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1.1</b> - Tumores mais frequentes, por sexo, no ano de 2010 (Registo Oncológico Nacional 2010, RORENO).....	1
<b>Figura 1.2.1</b> – Classificação da <i>World Health Organization</i> (WHO) para tumores do Sistema Nervoso Central (Louis <i>et al.</i> , 2016).....	4
<b>Figura 1.2.2</b> - Classificação em grau dos Tumores do Sistema Nervoso Central da Organização Mundial de Saúde (Louis <i>et al.</i> , 2016).....	5
<b>Figura 1.2.3</b> - Algoritmo simplificado da classificação de um glioma difuso com base nas características histológicas e genéticas. O diagnóstico nem sempre flui de uma primeira abordagem histológica para uma posterior análise genética, sendo que as “assinaturas” moleculares podem por vezes superar as características histológicas ao chegar a um diagnóstico integrado (Louis <i>et al.</i> , 2016).....	6
<b>Figura 1.3.1</b> – Características dos glioblastomas IDH-wildtype e IDH-mutant (Louis <i>et al.</i> , 2016).....	7
<b>Figura 1.4.1</b> – Esquema representativo dos mecanismos celulares chave que se encontram desregulados em gliomas. Estão assinalados com estrelas, os alvos que estão em estudo como possíveis tratamentos para glioblastoma e que serão descritos mais à frente nesta monografia (Miller <i>et al.</i> , 2016).....	12
<b>Figura 1.5.2.1</b> - Imagens de um glioblastoma obtidas pela técnica de ressonância magnética: uma massa centralmente necrótica com um forte contraste periférico e um marcado edema perifocal (Schneider <i>et al.</i> , 2010).....	27
<b>Figura 3.1.1</b> – Percentagem de doentes do sexo feminino e do sexo masculino com diagnóstico de glioblastoma nos períodos de 06/2008 a 07/2010 e 01/2014 a 06/2016. .	49
<b>Figura 3.1.2</b> – Número de diagnósticos de glioblastoma em função da idade e sexo do doente. ....	50
<b>Figura 3.2.1</b> - Tempo de sobrevivência em meses dos doentes com diagnóstico de glioblastoma após data de diagnóstico. ....	51
<b>Figura 3.2.2</b> – Representação gráfica da expressão do marcador de índice proliferativo ki67 face ao tempo de sobrevivência expresso em meses, dos doentes com diagnóstico de glioblastoma no período de 01/2014 a 06/2016. ....	53

- Figura 3.3.1** - Representação gráfica da expressão do marcador de índice proliferativo ki67 face ao tempo de sobrevivência expresso em meses, dos doentes com diagnóstico de glioblastoma que completaram protocolo Stupp no período de 01/2014 a 06/2016. .... 55
- Figura 3.3.2** – Representação gráfica da percentagem de doentes, com diagnóstico de glioblastoma e protocolo Stupp concluído, que apresentaram expressão do marcador p53 face ao tempo de sobrevivência expresso em meses, no período de 01/2014 a 06/2016.. ..... 56
- Figura 3.3.3** – Representação gráfica da percentagem de doentes, com diagnóstico de glioblastoma e protocolo Stupp concluído, que apresentaram expressão do marcador GFAP face ao tempo de sobrevivência expresso em meses, no período de 01/2014 a 06/2016..... 57
- Figura 3.3.4** – Representação gráfica da percentagem de doentes, com diagnóstico de glioblastoma e protocolo Stupp concluído, que apresentaram expressão do marcador VIMEN face ao tempo de sobrevivência expresso em meses, no período de 01/2014 a 06/2016..... 57

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1.1</b> - Razão mortalidade/incidência por sexo em 2010 (adaptado de Registo Oncológico Nacional 2010, RORENO).....	2
<b>Tabela 1.3.1</b> - Distribuição por tipo histológico em 2010 (adaptado de Registo Oncológico Nacional 2010, RORENO).....	8
<b>Tabela 1.4.1.1-</b> Alterações moleculares e metabólicas em glioblastoma e o seu potencial uso como biomarcador (McNamara <i>et al.</i> , 2013). .....	13
<b>Tabela 1.4.1.2</b> - Algumas das assinaturas genéticas descritas em glioblastomas segundo diferentes autores (McNamara <i>et al.</i> , 2013). .....	14
<b>Tabela 1.4.1.3</b> – A função e o significado dos principais marcadores moleculares em gliomas (Schneider <i>et al.</i> , 2010). .....	15
<b>Tabela 1.6.1.1</b> – Descrição da terapia que compreende o denominado Protocolo Stupp para o tratamento de glioblastoma, adaptado de Physician’s Cancer Chemotherapy Drug Manual 2017 (Chu <i>et al.</i> , 2016). .....	30
<b>Tabela 1.6.3.1</b> - Regimes de quimioterapia recomendados para a doença recorrente de neoplasia cerebral, adaptado de Physician’s Cancer Chemotherapy Drug Manual 2017 (Chu <i>et al.</i> , 2016). *AUC – área debaixo da curva .....	35
<b>Tabela 3.1.1</b> - Número de novos diagnósticos de glioblastoma nos anos de 2008 (desde 1 de Junho), 2009, 2010 (até ao mês de Julho), 2014, 2015 e 2016 (até ao mês de Junho) no Centro Hospitalar Universitário do Algarve. Encontram-se assinalados com * os anos em que a contabilização de todos os meses não foi possível. ....	48
<b>Tabela 3.3.1</b> - Número de doentes com diagnóstico de glioblastoma que realizaram cirurgia e protocolo Stupp, se concluíram este protocolo, o número de óbitos e o número total de diagnósticos analisados nos períodos de 06/2008 a 07/2010 e 01/2014 a 06/2016.. .....	54
<b>Tabela 7.1</b> - Novos casos de tumores malignos registados por grupos etários em 2010 (adaptado de Registo Oncológico Nacional 2010, RORENO). .....	69
<b>Tabela 7.2</b> – Taxas de mortalidade por 100.000 pessoas com diagnóstico de tumor maligno, por grupos etários em 2010 (adaptado de Registo Oncológico Nacional 2010, RORENO). .....	69

## Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIM	Autorização de Introdução no Mercado
AUE	Autorização de Utilização Excepcional de Medicamentos
BBB	<i>Blood-Brain Barrier</i> / Barreira hematoencefálica
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> / Recetor do fator de crescimento da epiderme
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Hibridação com sondas fluorescentes <i>in situ</i>
GBM	Glioblastoma multiforme
IDH	<i>Isocitrate Dehydrogenase</i> / Desidrogenase do isocitrato
IDH-1	<i>Isocitrate dehydrogenase 1</i> / Desidrogenase do isocitrato, isoforma 1
IDH-2	<i>Isocitrate dehydrogenase 2</i> / Desidrogenase do isocitrato, isoforma 2
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.
LOH	<i>Lost of heterozygosity</i> / Perda de heterozigotia
MGMT	O6-metilguanina-DNA metiltransferase
NF1	<i>Neurofibromatosis type 1 gene</i> / Gene da neurofibromatose tipo 1
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> /Reação em cadeia da polimerase
PDGFRA	<i>Platelet derived growth factor receptor A</i> / Recetor A do fator de crescimento derivado de plaquetas
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> / Homólogo da fosfatase e tensina
QT	Quimioterapia
RON	Registo Oncológico Nacional
RORENO	Registo Oncológico Regional do Norte
RT	Radioterapia
SNC	Sistema Nervoso Central
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TMZ	Temozolamida
TP53	<i>Tumor suppressor protein 53 gene</i> / Gene que codifica a proteína supressora tumoral p53
TTFs	<i>Tumor treating fields</i> / Campos de tratamento de tumores

VEGF Fator de crescimento vascular endotelial  
WHO / OMS *World Health Organization* / Organização Mundial de Saúde

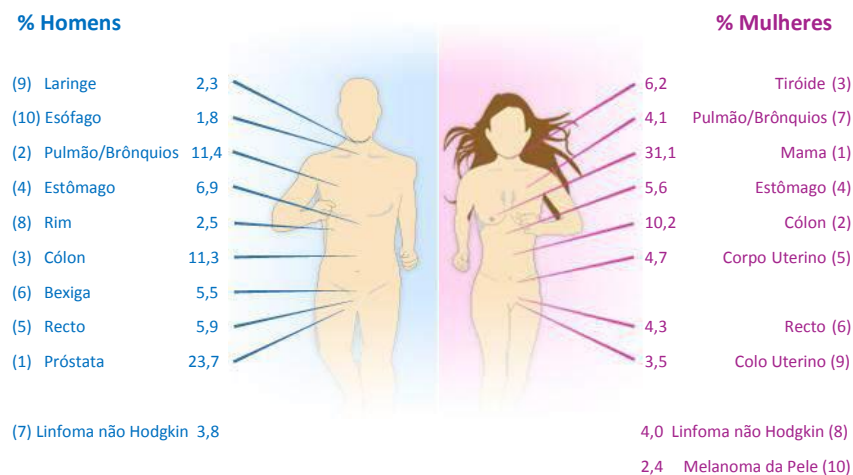
# 1. Introdução

## 1.1. Epidemiologia

No ano de 2010, foram registados 46.724 casos de tumores malignos em Portugal, 25.658 pertencentes ao sexo masculino e 21.066 ao sexo feminino, sendo mais frequentes na faixa etária dos 60 aos 74 anos de idade. Destes, apenas 752 pertencem à topografia de tumores do cérebro e sistema nervoso central (Tabela 7.1 – ver anexos) (RONENO, 2010).

As neoplasias do sistema nervoso central (SNC), em que se incluem as cerebrais, são raras quando comparadas com outro tipo de neoplasias, ex. carcinoma da mama (~31,1% no sexo feminino), cancro da próstata (~23,7%), pulmão/brônquios (~11,4% no sexo masculino), cólon (~10,2% no sexo feminino), entre outros (Fig.1.1.1).

A sua relevância incide no facto de pertencer à classe de tumores mais agressivos, sobretudo na sua forma de progressão, aos défices que provoca, afetando funções essenciais para a vida diária, e para os quais ainda não existe uma cura.



**Figura 1.1.1 - Tumores mais frequentes, por sexo, no ano de 2010 (Registo Oncológico Nacional 2010, RORENO).**

A maioria destes tumores é fatal, segundo o Registo Oncológico Nacional (RON) em 2010 a razão mortalidade/incidência de neoplasias malignas do cérebro e SNC era de 93% no sexo masculino e 112% no sexo feminino (Tabela 1.1.1). E apesar de ter uma taxa de diagnóstico inferior a outros tipos de neoplasias, em faixas etárias inferiores, como por exemplo <1 ano e 1-4 anos, tem uma taxa de mortalidade bastante expressiva (Tabela 7.2 – ver anexos).

**Tabela 1.1.1** - Razão mortalidade/incidência por sexo em 2010 (adaptado de Registro Oncológico Nacional 2010, RORENO).

Topografia	Sexo Masculino			Sexo Feminino		
	Mortalidade	Incidência	Razão (%)	Mortalidade	Incidência	Razão (%)
<b>Cérebro e SNC</b>	403	435	93	354	317	112

Mesmo os tumores cerebrais benignos, uma vez que afetam o tecido cerebral, podem interferir em funções cerebrais essenciais para a vida diária e ao fazê-lo criar receios e défices funcionais tão profundos como perturbadores para os doentes e para as suas famílias, visto que podem alterar a estrutura da personalidade. São tumores difíceis de curar, principalmente quando são infiltrativos ou se encontram em locais de difícil acesso, pois a cirurgia não é possível sem risco para o doente. E ainda, tumores primários de qualquer outro órgão podem secundariamente metastizar para o cérebro (De Monte *et al.*, 2007).

Os sintomas são também muitas vezes ignorados, menorizados por patologias de menor gravidade (ex.: enxaquecas, stress, entre outros) e só quando os sintomas se tornam agudos é que os doentes recorrem à ajuda médica.

## 1.2. Classificação

A classificação utilizada pela maioria das instituições é o sistema de classificação da WHO (*World Health Organization*). Durante o último século, a classificação dos tumores do SNC baseou-se, em grande parte, em conceitos histológicos que classificavam os tumores de acordo com as suas semelhanças microscópicas, pelo tipo de célula de origem, a sua localização e os seus presumíveis níveis de diferenciação. Estudos durante as duas últimas décadas clarificaram a base genética da génese tumoral dos tumores cerebrais, o que contribuiu para uma nova classificação dos mesmos e em 2016 a WHO procedeu a uma atualização aos seus critérios de classificação. A classificação agora é baseada tanto no genótipo como no fenótipo e agrupa tumores que partilham marcadores tumorais semelhantes (Miller *et al.*, 2016). A listagem encontra-se na Fig.1.2.1 abaixo.

## WHO classification of tumours of the central nervous system

<b>Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours</b>		<b>Neuronal and mixed neuronal-glial tumours</b>	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	9400/3	Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	9413/0
Gemistocytic astrocytoma, IDH-mutant	9411/3	Gangliocytoma	9492/0
<i>Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9400/3	Ganglioglioma	9505/1
Diffuse astrocytoma, NOS	9400/3	Anaplastic ganglioglioma	9505/3
		Dysplastic cerebellar gangliocytoma (Lhermitte–Duclos disease)	9493/0
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	9401/3	Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	9412/1
<i>Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9401/3	Papillary glioneuronal tumour	9509/1
Anaplastic astrocytoma, NOS	9401/3	Rosette-forming glioneuronal tumour	9509/1
		<i>Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumour</i>	
Glioblastoma, IDH-wildtype	9440/3	Central neurocytoma	9506/1
Giant cell glioblastoma	9441/3	Extraventricular neurocytoma	9506/1
Gliosarcoma	9442/3	Cerebellar liponeurocytoma	9506/1
<i>Epithelioid glioblastoma</i>	9440/3	Paraganglioma	8693/1
Glioblastoma, IDH-mutant	9445/3*		
Glioblastoma, NOS	9440/3		
		<b>Tumours of the pineal region</b>	
Diffuse midline glioma, H3 K27M–mutant	9385/3*	Pineocytoma	9361/1
		Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	9362/3
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9450/3	Pineoblastoma	9362/3
Oligodendroglioma, NOS	9450/3	Papillary tumour of the pineal region	9395/3
		<b>Embryonal tumours</b>	
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9451/3	Medulloblastomas, genetically defined	
<i>Anaplastic oligodendroglioma, NOS</i>	9451/3	Medulloblastoma, WNT-activated	9475/3*
		Medulloblastoma, SHH-activated and <i>TP53</i> -mutant	9476/3*
<i>Oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3	Medulloblastoma, SHH-activated and <i>TP53</i> -wildtype	9471/3
<i>Anaplastic oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3	Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH <i>Medulloblastoma, group 3</i>	9477/3*
		<i>Medulloblastoma, group 4</i>	
<b>Other astrocytic tumours</b>		Medulloblastomas, histologically defined	
Pilocytic astrocytoma	9421/1	Medulloblastoma, classic	9470/3
Piloxyoid astrocytoma	9425/3	Medulloblastoma, desmoplastic/nodular	9471/3
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1	Medulloblastoma with extensive nodularity	9471/3
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3	Medulloblastoma, large cell / anaplastic	9474/3
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3	Medulloblastoma, NOS	9470/3
		Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered	9478/3*
<b>Ependymal tumours</b>		<i>Embryonal tumour with multilayered         rosettes, NOS</i>	9478/3
Subependymoma	9383/1	Medulloepithelioma	9501/3
Myxopapillary ependymoma	9394/1	CNS neuroblastoma	9500/3
Ependymoma	9391/3	CNS ganglioneuroblastoma	9490/3
Papillary ependymoma	9393/3	CNS embryonal tumour, NOS	9473/3
Clear cell ependymoma	9391/3	Atypical teratoid/rhabdoid tumour	9508/3
Tanycytic ependymoma	9391/3	<i>CNS embryonal tumour with rhabdoid features</i>	9508/3
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion–positive	9396/3*		
Anaplastic ependymoma	9392/3	<b>Tumours of the cranial and paraspinal nerves</b>	
		Schwannoma	9560/0
<b>Other gliomas</b>		Cellular schwannoma	9560/0
Chordoid glioma of the third ventricle	9444/1	Plexiform schwannoma	9560/0
Angiocentric glioma	9431/1		
Astroblastoma	9430/3	Osteochondroma	9210/0
		Osteosarcoma	9180/3
<b>Choroid plexus tumours</b>		<b>Melanocytic tumours</b>	
Choroid plexus papilloma	9390/0	Meningeal melanocytosis	8728/0
Atypical choroid plexus papilloma	9390/1	Meningeal melanocytoma	8728/1
Choroid plexus carcinoma	9390/3	Meningeal melanoma	8720/3
		Meningeal melanomatosis	8728/3
Melanotic schwannoma	9560/1		
Neurofibroma	9540/0		
Atypical neurofibroma	9540/0		
Plexiform neurofibroma	9550/0		
Perineurioma	9571/0		
Hybrid nerve sheath tumours			
Malignant peripheral nerve sheath tumour	9540/3		
Epithelioid MPNST	9540/3		
MPNST with perineurial differentiation	9540/3		

(continuação na página seguinte)

<b>Meningiomas</b>		<b>Lymphomas</b>	
Meningioma	9530/0	Diffuse large B-cell lymphoma of the CNS	9680/3
Meningothelial meningioma	9531/0	Immunodeficiency-associated CNS lymphomas	
Fibrous meningioma	9532/0	AIDS-related diffuse large B-cell lymphoma	
Transitional meningioma	9537/0	EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma, NOS	
Psammomatous meningioma	9533/0	Lymphomatoid granulomatosis	9766/1
Angiomatous meningioma	9534/0	Intravascular large B-cell lymphoma	9712/3
Microcystic meningioma	9530/0	Low-grade B-cell lymphomas of the CNS	
Secretory meningioma	9530/0	T-cell and NK/T-cell lymphomas of the CNS	
Lymphoplasmacyte-rich meningioma	9530/0	Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive	9714/3
Metaplastic meningioma	9530/0	Anaplastic large cell lymphoma, ALK-negative	9702/3
Chordoid meningioma	9538/1	MALT lymphoma of the dura	9699/3
Clear cell meningioma	9538/1		
Atypical meningioma	9539/1	<b>Histiocytic tumours</b>	
Papillary meningioma	9538/3	Langerhans cell histiocytosis	9751/3
Rhabdoid meningioma	9538/3	Erdheim–Chester disease	9750/1
Anaplastic (malignant) meningioma	9530/3	Rosai–Dorfman disease	
		Juvenile xanthogranuloma	
		Histiocytic sarcoma	9755/3
<b>Mesenchymal, non-meningothelial tumours</b>		<b>Germ cell tumours</b>	
Solitary fibrous tumour / haemangiopericytoma**		Germinoma	9064/3
Grade 1	8815/0	Embryonal carcinoma	9070/3
Grade 2	8815/1	Yolk sac tumour	9071/3
Grade 3	8815/3	Choriocarcinoma	9100/3
Haemangioblastoma	9161/1	Teratoma	9080/1
Haemangioma	9120/0	Mature teratoma	9080/0
Epithelioid haemangioendothelioma	9133/3	Immature teratoma	9080/3
Angiosarcoma	9120/3	Teratoma with malignant transformation	9084/3
Kaposi sarcoma	9140/3	Mixed germ cell tumour	9085/3
Ewing sarcoma / PNET	9364/3		
Lipoma	8850/0	<b>Tumours of the sellar region</b>	
Angiolipoma	8861/0	Craniopharyngioma	9350/1
Hibernoma	8880/0	Adamantinomatous craniopharyngioma	9351/1
Liposarcoma	8850/3	Papillary craniopharyngioma	9352/1
Desmoid-type fibromatosis	8821/1	Granular cell tumour of the sellar region	9582/0
Myofibroblastoma	8825/0	Pituicytoma	9432/1
Inflammatory myofibroblastic tumour	8825/1	Spindle cell oncocytoma	8290/0
Benign fibrous histiocytoma	8830/0		
Fibrosarcoma	8810/3	<b>Metastatic tumours</b>	
Undifferentiated pleomorphic sarcoma / malignant fibrous histiocytoma	8802/3		
Leiomyoma	8890/0		
Leiomyosarcoma	8890/3		
Rhabdomyoma	8900/0		
Rhabdomyosarcoma	8900/3		
Chondroma	9220/0		
Chondrosarcoma	9220/3		
Osteoma	9180/0		

The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) (742A). Behaviour is coded /0 for benign tumours; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; and /3 for malignant tumours. The classification is modified from the previous WHO classification, taking into account changes in our understanding of these lesions. \*These new codes were approved by the IARC/WHO Committee for ICD-O. *Italics: Provisional tumour entities. \*\*Grading according to the 2013 WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone.*

**Figura 1.2.1** – Classificação da World Health Organization (WHO) para tumores do Sistema Nervoso Central (Louis et al., 2016).

A classificação de tumores do SNC consiste de um nome histopatológico seguido das características genéticas. Para um tumor sem mutação genética, é utilizado o termo *wildtype* e num tumor sem uma mutação diagnosticada é dada a designação NOS. A designação NOS indica que não existe informação suficiente para atribuir uma designação mais específica. Assim, esta classificação refere-se, na maioria dos casos, a tumores que não foram totalmente testados para o(s) parâmetro(s) genético(s) relevante(s). Em casos raros pode também incluir tumores que foram testados, mas não apresentam as alterações genéticas necessárias para o diagnóstico (Louis et al., 2016).

A WHO classifica também os tumores do SNC em diferentes graus de acordo com a lista apresentada na Fig. 1.2.2.

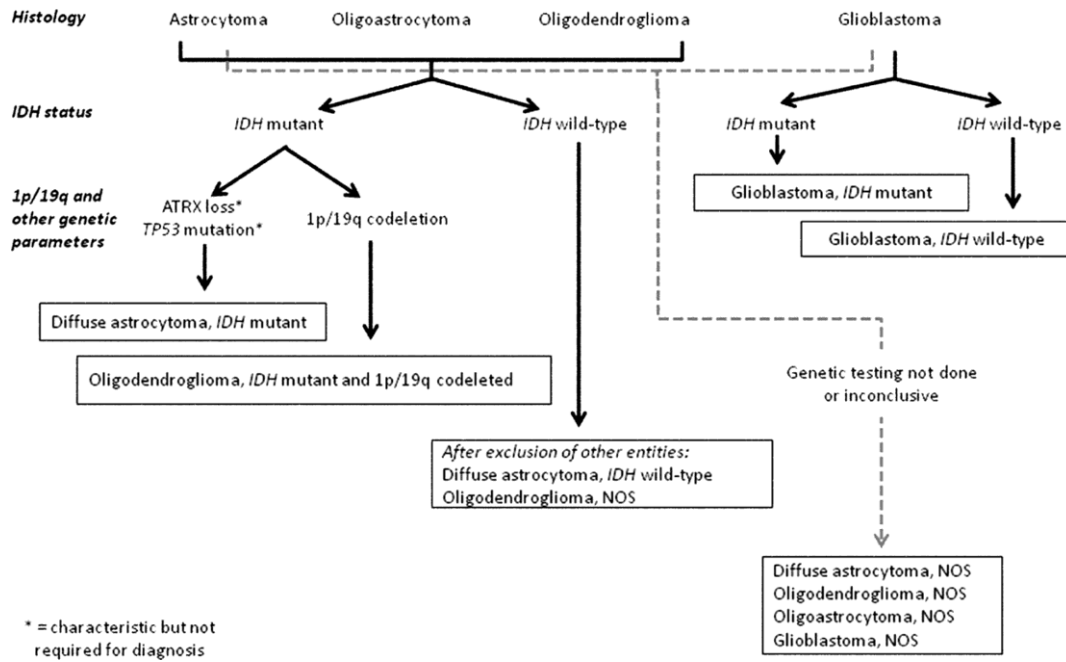
WHO grades of select CNS tumours			
<b>Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours</b>			
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	II	Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	I
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	III	Papillary glioneuronal tumour	I
Glioblastoma, IDH-wildtype	IV	Rosette-forming glioneuronal tumour	I
Glioblastoma, IDH-mutant	IV	Central neurocytoma	II
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	IV	Extraventricular neurocytoma	II
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	II	Cerebellar liponeurocytoma	II
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	III		
<b>Other astrocytic tumours</b>		<b>Tumours of the pineal region</b>	
Pilocytic astrocytoma	I	Pineocytoma	I
Subependymal giant cell astrocytoma	I	Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	II or III
Pleomorphic xanthoastrocytoma	II	Pineoblastoma	IV
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	III	Papillary tumour of the pineal region	II or III
<b>Ependymal tumours</b>		<b>Embryonal tumours</b>	
Subependymoma	I	Medulloblastoma (all subtypes)	IV
Myxopapillary ependymoma	I	Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered	IV
Ependymoma	II	Medulloepithelioma	IV
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion-positive	II or III	CNS embryonal tumour, NOS	IV
Anaplastic ependymoma	III	Atypical teratoid/rhabdoid tumour	IV
<b>Other gliomas</b>		CNS embryonal tumour with rhabdoid features	
Angiocentric glioma	I		IV
Chordoid glioma of third ventricle	II	<b>Tumours of the cranial and paraspinal nerves</b>	
<b>Choroid plexus tumours</b>		Schwannoma	I
Choroid plexus papilloma	I	Neurofibroma	I
Atypical choroid plexus papilloma	II	Perineurioma	I
Choroid plexus carcinoma	III	Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)	II, III or IV
<b>Neuronal and mixed neuronal-gial tumours</b>		<b>Meningiomas</b>	
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	I	Meningioma	I
Gangliocytoma	I	Atypical meningioma	II
Ganglioglioma	I	Anaplastic (malignant) meningioma	III
Anaplastic ganglioglioma	III	<b>Mesenchymal, non-meningothelial tumours</b>	
Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)	I	Solitary fibrous tumour / haemangiopericytoma	I, II or III
		Haemangioblastoma	I
		<b>Tumours of the sellar region</b>	
		Craniopharyngioma	I
		Granular cell tumour	I
		Pituicytoma	I
		Spindle cell oncocyoma	I

**Figura 1.2.2** - Classificação em grau dos Tumores do Sistema Nervoso Central da Organização Mundial de Saúde (Louis et al., 2016).

Esta nova classificação da WHO, utilizando agora tanto o diagnóstico histopatológico como o molecular, cria um diagnóstico unificado que valoriza mais o prognóstico do que a anterior classificação.

Os gliomas grau II a IV são também divididos entre tumores IDH-*wildtype* e IDH-mutado, consoante a avaliação da mutação da desidrogenase do isocitrato (IDH), sendo que os tumores IDH-mutados são ainda divididos conforme a presença ou ausência da co-deleção do cromossoma 1p e 19q. Tumores IDH-mutantes e 1p19q co-deletados apresentam a maior sobrevida global, enquanto tumores IDH-mutantes sem a co-deleção apresentam sobrevida intermédia e os tumores do tipo IDH-*wildtype* assumem o curso mais agressivo (Miller et al., 2016).

Na figura 1.2.3 encontra-se representado um esquema simplificado da forma como é classificado um glioma com base nas suas características histológicas e genéticas.



**Figura 1.2.3** - Algoritmo simplificado da classificação de um glioma difuso com base nas características histológicas e genéticas. O diagnóstico nem sempre flui de uma primeira abordagem histológica para uma posterior análise genética, sendo que as “assinaturas” moleculares podem por vezes superar as características histológicas ao chegar a um diagnóstico integrado (Louis et al., 2016).

### 1.3. Glioblastomas

O glioblastoma (GBM), tumor sobre o qual incide esta monografia, é o tumor maligno do sistema nervoso central mais comum em adultos, representando aproximadamente metade dos gliomas diagnosticados e 15% dos tumores cerebrais primários. Este é considerado, o glioma de mais elevado grau, e é normalmente classificado como “primário” ou “secundário”, consoante a sua génese. A grande maioria dos GBMs surge *de novo* como tumor primário em doentes mais velhos, já os GBMs secundários, surgem de um glioma pré-existente de menor grau, e são menos frequentes. A incidência da doença aumenta com a idade e a média de idade à data de diagnóstico é de 64 anos. As taxas de sobrevivência são fracas; apenas aproximadamente 34% dos doentes sobrevivem 1 ano, 12% 2 anos, e menos de 5% 5 anos, desde a data de diagnóstico. A idade avançada e a ressecção cirúrgica incompleta estão associadas a uma menor sobrevivência. O GBM permanece um dos tumores malignos mais

mortíferos, com opções de tratamento limitadas e uma alta taxa de recorrência (Lee *et al.*, 2017).

São então divididos em:

1. Glioblastoma *IDH-wildtype* – corresponde a 90% dos casos e aos denominados glioblastomas primários ou *de novo*, predominantes em doentes com mais de 55 anos de idade;
2. Glioblastoma *IDH-mutant* – corresponde a aproximadamente 10% dos casos e aos denominados glioblastomas secundários, associados a um historial prévio de glioma difuso de baixo grau, ocorrendo em doentes mais jovens;
3. Glioblastoma NOS - categoria reservada aos tumores a para os quais a avaliação da mutação da IDH não pode ser totalmente realizada (Louis *et al.*, 2016; Ohgaki *et al.*, 2013).

Na Fig. 1.3.1 abaixo, encontram-se descritas algumas das características dos glioblastomas *IDH-wildtype* e *IDH-mutant*.

	IDH-wildtype glioblastoma	IDH-mutant glioblastoma
Synonym	Primary glioblastoma, IDH-wildtype	Secondary glioblastoma, IDH-mutant
Precursor lesion	Not identifiable; develops de novo	Diffuse astrocytoma Anaplastic astrocytoma
Proportion of glioblastomas	~90%	~10%
Median age at diagnosis	~62 years	~44 years
Male-to-female ratio	1.42:1	1.05:1
Mean length of clinical history	4 months	15 months
Median overall survival		
Surgery + radiotherapy	9.9 months	24 months
Surgery + radiotherapy + chemotherapy	15 months	31 months
Location	Supratentorial	Preferentially frontal
Necrosis	Extensive	Limited
<i>TERT</i> promoter mutations	72%	26%
<i>TP53</i> mutations	27%	81%
<i>ATRX</i> mutations	Exceptional	71%
<i>EGFR</i> amplification	35%	Exceptional
<i>PTEN</i> mutations	24%	Exceptional

**Figura 1.3.1** – Características dos glioblastomas *IDH-wildtype* e *IDH-mutant* (Louis *et al.*, 2016).

De entre os tumores do cérebro e sistema nervoso central, os glioblastomas são os tumores com maior número de casos registados em 2010, segundo o Registo Oncológico Nacional, com 395 casos dos 752 registados (ver tabela 1.3.1).

**Tabela 1.3.1** - *Distribuição por tipo histológico em 2010 (adaptado de Registo Oncológico Nacional 2010, ROENO).*

<b>Tipo Histológico</b>	<b>Número de Casos</b>
<b>Cérebro e Sistema Nervoso Central</b>	
Astrocitoma	102
Ependimoma	25
Glioblastoma	395
Glioma	42
Meduloblastoma	20
Oligodendroglioma	90
Outros Tumores	78

#### 1.4. Etiologia e Epigenética

Quanto à etiologia, apenas 1% a 5% dos gliomas pode ser classificado como hereditário. A grande maioria dos gliomas ocorre, portanto, de forma esporádica, e a sua causa é desconhecida na maioria dos casos. Tanto a genética, como a epigenética, as infeções bacterianas, e muitos outros fatores influenciam a oncogénese do GBM, mas o mecanismo molecular subjacente à génese deste é pouco conhecido e os fatores de risco para o desenvolvimento de um glioma não são claros. A exposição ocupacional a solventes orgânicos e pesticidas parece ser um fator de predisposição e o único fator, geralmente conhecido e aceite, que confere um risco elevado é a radiação ionizante (Gladson *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2017; Schneider *et al.*, 2010).

Foram feitos enormes progressos na genética e epigenética do GBM durante a última década. Os esforços desenvolvidos para a compreensão e caracterização genómica do mesmo aumentaram o conhecimento desta doença biologicamente complexa (Weathers *et al.*, 2017). O *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) fez várias análises a amostras de GBM e esta análise, em junção com outros estudos, revelou diversos genes mutados e várias anomalias em vias de

sinalização celulares envolvidas no desenvolvimento e progressão de gliomas, fornecendo a identificação de importantes eventos genéticos no GBM. Entre vários sublinham-se:

- alterações nas vias de sinalização do recetor da tirosina cinase (RTK)/Ras/phosphoinositide 3-kinase (PI3K), ocorrendo em 88% dos GBMs;
- alterações nas vias do p53, ocorrendo em 87% dos GBMs;
- alterações nas vias de sinalização do retinoblastoma (Rb), ocorrendo em 88% dos GBMs;
- alterações na via de regulação do ciclo celular (78% dos GBM);
- alterações nas vias metabólicas das desidrogenase do isocitrato, isoforma 1 e 2 (IDH 1/2) (10% dos GBM);
- desregulação da sinalização do fator de crescimento via amplificação e ativação por mutação dos genes do recetor da tirosina cinase e ativação da via da cinase 3OH-fosfatidilinositol;
- mutações tais como a amplificação do gene do recetor do fator de crescimento da epiderme (EGFR) que podem ser encontradas em 45% dos GBMs;
- ganho de função no PI3K em 15% dos GBMs;
- e perda de PTEN (homólogo da fosfatase e tensina) em 36% dos GBMs (Lee *et al.*, 2017; Polivka *et al.*, 2017; Weathers *et al.*, 2017).

O microambiente do tumor e o seu envolvimento no desenvolvimento e progressão oncológica também foi extensamente estudado, especialmente a angiogénese tumoral e as anomalias na resposta imune antitumoral (Polivka *et al.*, 2017).

O GBM compartilha características histopatológicas em diferentes faixas etárias, mas difere em termos de alterações genéticas e evolução clínica em crianças, adultos jovens e idosos. Em adultos, os GBMs podem desenvolver-se *de novo* ou ao longo dos anos a partir de uma lesão de menor grau e embora ambos sejam tumores grau IV, o curso clínico é significativamente mais favorável quando o tumor apresenta uma mutação na IDH. Em contraste, os gliomas pediátricos de alto grau quase todos surgem *de novo* e apenas em casos excepcionais decorrem de um glioma de grau mais baixo. As localizações também variam de acordo com a faixa etária: nas crianças, surgem principalmente na ponte (*pons*, designados *diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPGs)*) e hemisférios cerebrais; no entanto, uma proporção menor também se apresenta no tálamo (~10%) e no cerebelo (~5%), ambos locais raros para adultos (Filbin *et al.*, 2016).

A mutação da IDH está presente na maioria dos gliomas de elevado grau. As enzimas IDH catalisam a descarboxilação oxidativa do isocitrato, convertendo-o em  $\alpha$ -cetogluturato, e

a mutação dessas enzimas leva à atividade neoenzimática que converte  $\alpha$ -cetoglutarato em 2-hidroxioglutarato. Esta mutação ocorre precocemente na gliomagenese e, conseqüentemente está presente de forma generalizada em todo o tumor. A IDH funciona normalmente como um componente do ciclo dos ácidos tricarbóxicos e a mutação conduz muito provavelmente a um metabolismo celular interrompido em células tumorais mutantes (Miller *et al.*, 2016).

A mutação da IDH resulta num fenótipo de hipermetilação, provocando amplas alterações epigenéticas nas células tumorais induzidas por essa mutação. A hipermetilação pode alterar a topologia cromossômica e alterar a expressão de múltiplos genes, incluindo possíveis oncogenes. Além disso, uma análise dos dados do TCGA em todos os GBMs sugere que 46% dos tumores abrigam mutações nos genes de modificação da cromatina e que essas alterações são mutuamente exclusivas, sugerindo um papel fundamental na alteração epigenética numa elevada proporção desses tumores (Chen *et al.*, 2016).

A amplificação e/ou mutação EGFR, encontrada no cromossoma 7, ocorre em mais de 60% dos tumores primários. A mutação mais comum é a de ganho de função devido a uma deleção *in-frame* dos exões 2-7. Esta mutação resulta na ativação constitutiva do EGFR, o que pode promover a proliferação e invasão das células gliais. A deleção do gene PTEN, devido a perda de heterozigotia ou mutação do cromossoma 10q, é também uma alteração genética comum nos tumores primários de GBM. Esta deleção resulta num aumento da atividade da via AKT/mTOR, o que promove a sobrevivência, proliferação e invasão das células. Tanto a amplificação do gene EGFR e a perda de heterozigotia do gene PTEN podem ser facilmente detetadas pelas técnicas FISH ou *Southern blotting* num laboratório patológico. O gene MDM2 (um inibidor de p53 no cromossoma 12q) é outro gene que se encontra amplificado em aproximadamente 10% a 15% das amostras de tumores GBM (Gladson *et al.*, 2010).

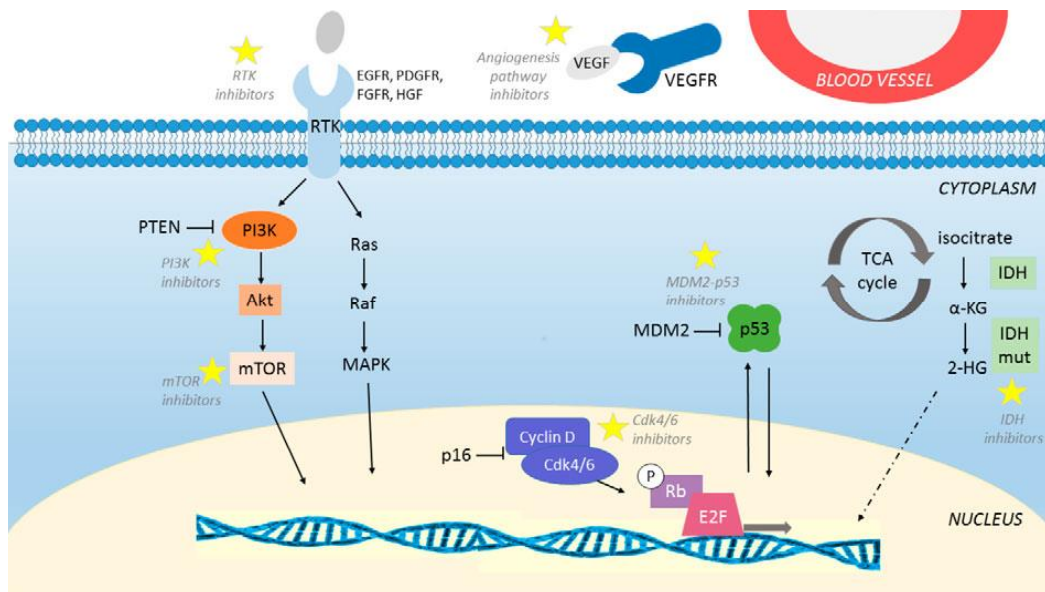
A angiogénese é uma característica patológica do GBM, com a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), entre outras citocinas pro-angiogénicas, como um dos reguladores mais importantes desta, o que o tornou um alvo atraente na terapêutica tumoral. A expressão de VEGF e outras citocinas proangiogénicas no glioblastoma resulta no desenvolvimento de vasculatura tumoral anormal caracterizada por vasos tortuosos, hiperpermeáveis, de diâmetro aumentado, e membranas basais anormalmente espessadas. Acredita-se que esta vasculatura tumoral aberrante aumenta a hipóxia tumoral, sendo um dos fatores que prejudica a administração de quimioterapia citotóxica (Weathers *et al.*, 2014).

Tal como outros tumores malignos, os tumores gliais proliferam rapidamente. Este fenótipo de alta proliferação é devido à perda de múltiplos inibidores do ciclo celular, assim como ao aumento da sinalização de múltiplos recetores de fatores de crescimento que agem

de forma a exercer efeitos positivos na regulação do ciclo celular, tornando-se quase como uma “*signature feature*” deste tipo de tumores (Gladson *et al.*, 2010).

Foi demonstrado que malignidades hematopoiéticas, bem como vários tumores sólidos, contêm subpopulações de células que possuem capacidade de iniciação tumoral e propriedades de células estaminais, incluindo expressão de genes de células ou de tecidos estaminais embrionários e potencial de autorenovação. Estas células, denominadas células estaminais cancerígenas (*cancer stem cells* - CSCs), são geralmente destacadas como causadoras da capacidade de regeneração do tumor, preservando a quantidade de células tumorais através da autorenovação, originando uma descendência mais diferenciada. Além de fornecer uma força motriz para o crescimento e a manutenção do tumor, acredita-se que as CSCs sejam mais resistentes às terapias antineoplásicas existentes, facto que é consistente com seu papel na recidiva após tratamento. Assim, estima-se que as “assinaturas” de transcrição das CSC sejam altamente preditivas da sobrevida global do paciente, apoiando a sua relevância clínica. As tentativas de aumentar a eficácia terapêutica em tumores com uma hierarquia celular documentada devem, assim, incluir estratégias que visem todo o espectro de tipos de células presentes nos tumores dos doentes. Como as CSCs compartilham as mesmas alterações genéticas com as células cancerígenas mais diferenciadas por elas originadas, acredita-se que suas propriedades estejam ligadas ao seu estado epigenético (Bao *et al.*, 2006; Filbin *et al.*, 2016).

Alterações na sinalização da cinase dependente da ciclina (Cdk) através do ciclo celular parece ser uma outra maneira pela qual a gliomagénese ocorre. Aproximadamente 50% dos glioblastomas testados têm uma deleção homozigótica de CdkN2A, o gene que codifica o p16INK4, sendo que o p16 inibe a atividade da Cdk4-ciclina D. A perda de p16 promove o aumento de atividade da Cdk4-ciclina D, a fosforilação de Rb e a subsequente desregulação do fator de transcrição E2F, permitindo às células tumorais progredir até a fase S do ciclo celular, bem como evadir a senescência e a apoptose. Este nodo do ciclo celular serve como um alvo terapêutico atrativo, porque é um dos mais frequentemente desregulados (Miller *et al.*, 2016).



**Figura 1.4.1** – Esquema representativo dos mecanismos celulares chave que se encontram desregulados em gliomas. Estão assinalados com estrelas, os alvos que estão em estudo como possíveis tratamentos para glioblastoma e que serão descritos mais à frente nesta monografia (Miller *et al.*, 2016).

Semelhantemente, mutações que inativam o TP53 são comuns, encontradas em 25-30% dos glioblastomas. A via TP53 também é quebrada por mutações na MDM2 (ligase de ubiquitina E3 que tem como alvo a degradação da proteína p53), e pela deleção do supressor de tumor p14ARF, que inibe a degradação da p53 mediada pela ubiquitina. O p53 é ativado por *stress* celular, como danos no ácido desoxirribonucleico (ADN), hipoxia e perda de contato celular, atuando como um fator de transcrição para múltiplos e variados genes, dependendo do sinal de *stress*, incluindo os envolvidos na apoptose, interrupção do ciclo celular, autofagia e senescência. Alguns estudos sugerem que a mutação TP53 no GBM provoca a perda de inibidores de crescimento, levando à proliferação celular e à evasão da apoptose (Miller *et al.*, 2016).

Estas descobertas levaram a uma melhor compreensão da “assinatura molecular” do GBM e revelaram inúmeras alterações consistentes em genes e vias moleculares, algumas das mais importantes encontram-se esquematizadas na figura 1.4.1, acima. Contudo, existe uma necessidade, que não foi ainda satisfeita, de traduzir estas descobertas em práticas clínicas, identificar biomarcadores preditivos, e melhorar os resultados dos doentes com GBM (Lee *et al.*, 2017).

1.4.1. Biomarcadores

Foram recentemente descritas assinaturas moleculares associadas à agressividade do tumor, bem como à progressão da doença e a sua relação com as diferenças nas vias de sinalização implicadas na gliomagenese. Vários biomarcadores com potencial para diagnóstico, prognóstico e previsão de resposta à terapia foram identificados e, juntamente com as modalidades de imagiologia, podem contribuir para uma melhor gestão clínica do tumor (McNamara *et al.*, 2013).

O conhecimento de alterações genómicas que aumentam o risco de GBM, obtidas pelo TCGA, além de outros estudos, de potenciais marcadores preditivos e biomarcadores de prognóstico em GBM, e o seu papel na tomada de decisão clínica são muito discutidos. Esses potenciais marcadores incluem: o promotor de O(6)-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT) e a metilação do ADN, a perda de heterozigotia (LOH) dos cromossomas 1p, 19q e 10q, mutações na IDH, EGFR, VEGF, proteína supressora de tumor p53, PTEN, oxidase do citocromo C (CcO), metabolitos fosfolipídicos, expressão do mRNA da subunidade catalítica da telomerase (hTERT mRNA), miRNAs e marcadores de células estaminais cancerígenas, entre outros (Tabela 1.4.1.1) (McNamara *et al.*, 2013).

**Tabela 1.4.1.1** - *Alterações moleculares e metabólicas em glioblastoma e o seu potencial uso como biomarcador (McNamara et al., 2013).*

<b>Molecular/metabolic alteration</b>	<b>Possible biomarker status</b>
O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) promoter methylation	Prognostic, predictive [1]
Loss of heterozygosity chromosome 1p 19q	No prognostic significance [8]
Loss of heterozygosity 10q	Prognostic [9]
Isocitrate dehydrogenase (IDH) mutational status	Prognostic [10]
Epidermal growth factor receptor (EGFR)	Prognostic [11]
Epidermal growth factor, latrophilin, and 7 transmembrane domain-containing protein 1 on chromosome 1 (ELTD1)	Diagnostic, potentially prognostic [12]
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Potentially prognostic [13]
Tumor suppressor protein p53	Diagnostic [14]
Phosphatase and tensin homolog (PTEN)	Prognostic, possibly predictive [13]
p16INK4a gene	Inconsistent findings [13]
Cytochrome c oxidase (CcO)	Potentially prognostic [15]
Phospholipid metabolites	Potentially predictive [16]
Telomerase messenger expression (hTERT messenger ribonucleic acid [mRNA])	Potentially diagnostic [17], prognostic [18]
microRNAs (miRNAs)	Diagnostic, prognostic [19]
Cancer stem cell markers	Potentially prognostic [20,21]

Novas informações sobre *loci* de suscetibilidade e assinaturas genéticas dos gliomas estão constantemente a ser descobertas (McNamara *et al.*, 2013).

Phillips *et al.* descreveu três subclasses moleculares de glioma de alto grau, que se encontram descritas na Tab. 1.4.1.2 - proneural, proliferativa e mesenquimal. De acordo com esta classificação, a subclasse proneural tem intacta a PTEN, EGFR normal, a via de sinalização pela proteína *Notch* encontra-se funcional e apresenta uma maior sobrevida, enquanto nas classes proliferativa e mesenquimal, observa-se perda de PTEN, a via de regulação mediada por EGFR amplificada ou normal e ativação da via de sinalização celular Akt (também conhecida como proteína cinase B), apresentando uma menor sobrevida (McNamara *et al.*, 2013).

**Tabela 1.4.1.2 - Algumas das assinaturas genéticas descritas em glioblastomas segundo diferentes autores (McNamara *et al.*, 2013).**

Verhaak classification [4]	Phillips classification [5]
<b>Classical</b> —High <i>EGFR</i> , <i>TP53</i> , longest survival of subgroups in response to aggressive treatment.	<b>Proliferative</b> —Enriched for neural stem cell markers, <i>PTEN</i> loss, <i>EGFR</i> amplified or normal, Akt (protein kinase B) cell signaling pathway activation, shorter survival than proneural subgroup.
<b>Proneural</b> — <i>TP53</i> mutated, <i>IDH1</i> gene mutated, <i>PDGFRA</i> mutated, patients significantly younger.	<b>Proneural</b> — <i>PTEN</i> intact, <i>EGFR</i> normal, Notch activation, longer survival than proliferative and mesenchymal subgroup.
<b>Mesenchymal</b> — <i>NF1</i> mutated, <i>TP53</i> mutated, <i>PTEN</i> mutated.	<b>Mesenchymal</b> —Enriched for neural stem cell markers, <i>PTEN</i> loss, <i>EGFR</i> amplified or normal, Akt cell signaling pathway activation, shorter survival than proneural subgroup.
<b>Neural</b> —mutations in many of same genes as the other 3 subgroups. Oldest patients on average.	

Mais recentemente, a TCGA definiu ainda mais a classificação molecular do GBM e descreveu quatro subtipos: clássico, proneural, mesenquimal e neural (McNamara *et al.*, 2013).

Os tumores de GBM do subgrupo clássico são caracterizados por altos níveis de EGFR, mas o TP53 não foi encontrado mutado neste subgrupo (TP53 é o gene mais frequentemente mutado em GBM e é normalmente responsável por suprimir o crescimento do tumor). É também o subgrupo que apresenta maior sobrevida em resposta ao tratamento agressivo (McNamara *et al.*, 2013).

Em tumores proneurais o TP53 encontra-se altamente mutado, e também foram encontradas mutações no gene IDH-1. O recetor A do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRA), que desempenha um papel importante na proliferação celular, migração celular e angiogénese, encontra-se também mutado e expresso em níveis anormalmente altos exclusivamente em tumores proneurais. Apurou-se que os doentes deste subgrupo são significativamente mais jovens, mas aqueles que recebem tratamento agressivo não sobrevivem significativamente mais que os pacientes que não recebem tratamento agressivo (McNamara *et al.*, 2013).

O subgrupo mesenquimal apresenta o maior número de mutações no gene supressor da neurofibromatose tipo 1 (NF1) e mutações frequentes nos genes supressores de tumor PTEN e TP53. Este subgrupo apresenta uma melhoria na sobrevida após tratamento agressivo ao contrário dos subgrupos proneural e neural (McNamara *et al.*, 2013).

No subgrupo neural observam-se mutações em muitos dos mesmos genes que os outros grupos, sendo a idade média dos doentes mais elevada. As melhorias na sobrevida após tratamento agressivo não são tão significativas quanto nos grupos clássico e mesenquimal (McNamara *et al.*, 2013).

Na tabela 1.4.1.3 encontram-se descritos alguns dos principais marcadores moleculares em gliomas. O MGMT é descrito como um excelente marcador em GBM para o tempo de sobrevivência global dos doentes e para a resposta aos tratamentos de quimioterapia (QT) e radioterapia (RT) e a mutação em IDH-2 está associada a um melhor prognóstico por parte dos doentes que possuem esta mutação, apresentando períodos de sobrevivência sem recidiva superiores aos doentes que não apresentam a mutação.

**Tabela 1.4.1.3 – A função e o significado dos principais marcadores moleculares em gliomas (Schneider *et al.*, 2010).**

Molecular marker	Function and significance
MGMT (methylguanyl methyltransferase) promoter methylation <sup>*1,*2</sup>	MGMT is a repair enzyme that protects cells from damage by ionizing radiation or alkylating agents. Glioblastoma patients with a methylated (and therefore functionally impaired) MGMT promoter have better overall survival and better responses to radio- and chemotherapy than glioblastoma patients with an unmethylated MGMT promoter (17). 40% to 50% of glioblastomas have a methylated MGMT promoter. The MGMT status of a recurrent tumor may differ from that of the primary tumor (e35). MGMT status is currently the most important molecular parameter in the treatment of glioblastoma (23, 24).
Isocitrate dehydrogenase (IDH)-1 and -2 <sup>*1,*2</sup>	Heterozygous mutations (mainly of the IDH-1 enzyme) are seen in over 80% of all low-grade gliomas and secondary glioblastomas (i.e., those that arise from low-grade precursor tumors). 12% of glioblastomas have IDH-1 mutations (e36). IDH-1 and -2 mutations are associated with a better prognosis; in patients with glioblastoma, they are associated with longer progression-free survival and longer overall survival (23).

<sup>\*1</sup> Current therapeutic trials must be stratified according to these markers in view of their major clinical importance  
<sup>\*2</sup> These markers are suitable for routine clinical use

Uma subanálise dos resultados de Stupp em 2005 produziram a primeira e impressionante evidência da utilidade da metilação do promotor do gene MGMT como um marcador molecular preditivo para a resposta ao tratamento com temozolomida. A mediana do tempo de sobrevida dos pacientes com um promotor MGMT metilado foi de 21,7 meses, em comparação com os 12,7 meses sem metilação de MGMT, e a taxa de sobrevida a dois anos foi de 46%, em comparação com os 13,8% sem metilação de MGMT (Stupp *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2018; Schneider *et al.*, 2010).

O gene MGMT está localizado no cromossoma 10q26 e codifica uma proteína de reparação do ADN que remove os grupos alquilo da posição O6 da guanina, que são normalmente produzidos por agentes alquilantes quimioterapêuticos. O silenciamento epigenético deste gene de reparação do ADN pela metilação do promotor compromete a reparação do ADN. Independentemente do tratamento, a metilação do promotor do MGMT foi um fator de prognóstico favorável. A sobrevida global média foi reportada como sendo melhor em doentes com um promotor metilado tratados com temozolomida e radioterapia e, portanto, foi declaradamente o primeiro biomarcador preditivo em tumores cerebrais, potencialmente permitindo a seleção de doentes que beneficiam do tratamento com temozolomida e radioterapia e pode ainda fornecer informações valiosas para o prognóstico (McNamara *et al.*, 2013).

Apesar da introdução do *status* de metilação do promotor MGMT como um biomarcador tanto preditivo como de prognóstico, parece haver uma falta de concordância em relação à técnica mais indicada para a determinação do *status* da metilação. Infelizmente, nenhum método único de caracterização do promotor da MGMT emergiu ainda como uma escolha clara para testes clínicos de rotina desta metilação em doentes com glioma. As análises de metilação são apoiadas pelos estudos científicos, mas os custos resultantes e a inacessibilidade aos mesmos são barreiras para o uso regular na prática clínica geral. Existe a necessidade de desenvolvimento de testes de alto rendimento, sensíveis, baratos e confiáveis, que possam ser utilizados nos hospitais e centros de diagnóstico de forma a minimizar os custos associados à utilização deste marcador e tornar a sua utilização um ponto chave no diagnóstico (Lee *et al.*, 2018; McNamara *et al.*, 2013).

Outra explicação plausível para a baixa taxa de utilização deste marcador é que o teste para o *status* de metilação do promotor MGMT não foi incorporado às diretrizes NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) até 2013 e este também não faz parte do painel de diagnósticos moleculares da WHO de 2016 para gliomas (Lee *et al.*, 2018).

Com uma crescente ênfase na medicina personalizada, os marcadores moleculares estão a ser incorporados no diagnóstico para definir uma melhor gestão do tratamento. Apesar das evidências convincentes dos estudos descritos anteriormente, este parece ser um teste altamente subutilizado nos hospitais. Talvez, porque até ao momento, independentemente do status de metilação, a quimioterapia com temozolomida é dada a todos os doentes, pois esta é a terapia de primeira linha aprovada para este tipo de tumores. A utilidade do teste de rotina com MGMT em doentes com GBM pode ser de maior relevância no diagnóstico, assim que estratégias de tratamento personalizadas e distintas para pacientes metilados e não-metilados estejam disponíveis (Lee *et al.*, 2018; McNamara *et al.*, 2013).

Um dos mais importantes biomarcadores em gliomas é a mutação nos genes da IDH, uma enzima metabólica do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, que catalisa a conversão do isocitrato em  $\alpha$ -cetogluturato. A IDH-1 e IDH-2 estão envolvidas em vários processos metabólicos, como transdução de sinal, síntese lipídica, stress oxidativo e respiração oxidativa. Mutações na IDH-1 e IDH-2 resultam numa alteração de função que gera D-2-hidroxi-glutarato (2HG) mais do que os normais produtos de NADH e  $\alpha$ -cetogluturato. Apesar dos tumores primários de GBM, na maioria das vezes não apresentarem mutações na IDH, a maioria dos GBM secundários têm esta mutação, acreditando-se, assim, que a mutação IDH 1/2 precede a aquisição de posteriores alterações oncogénicas que se admitem levar à transformação maligna. Porque a mutação do gene da IDH altera a função catalítica da enzima, estas mutações são potenciais alvos de fármacos inibidores (Wakimoto *et al.*, 2014; McNamara *et al.*, 2013).

As mutações nas IDH1/2 também são usadas como importantes fatores de prognóstico. A sua monitorização regular é agora recomendada na gestão dos doentes com GBM de acordo com a recente revisão da classificação WHO de 2016 para tumores do CNS. Estas mutações em gliomas são conhecidas por serem fatores de prognóstico positivos, com um aumento da sobrevivência global verificada em doentes que possuem uma IDH mutada face aos que têm IDH-*wildtype*. Contudo, até à data, não foram desenvolvidos tratamentos baseados nesta descoberta (Weathers *et al.*, 2014; Polivka *et al.*, 2017).

A amplificação do EGFR, tipicamente através do aumento do número de cópias do gene, é frequente, com uma incidência estimada de até 40% em GBM primário e encontra-se frequentemente associada a uma mutação ativadora específica do EGFRvIII. Esta mutação conhecida como EGFRvIII (variante três) foi identificada em cerca de 30% dos GBM primários recém diagnosticados. É caracterizada por uma deleção *in-frame* dos exões 2-7, que codificam a superfície extracelular da proteína, tornando o recetor constitutivamente ativo.

Esta deleção aumenta a tumorigenicidade, através da promoção da migração de células tumorais e secreção de oncosomas ligados ao EGFRvIII nas membranas plasmáticas das células vizinhas (Chen *et al.*, 2016).

As alterações que levam à ativação constitutiva da atividade do EGFR e RTK, conduzem conseqüentemente, à proliferação celular, transformação, adesão, migração e escape da apoptose. A frequência de amplificação no glioblastoma torna o EGFR um alvo teoricamente atraente e, conseqüentemente, os compostos que inibem o EGFR estão entre os mais estudados em ensaios clínicos até o momento. Infelizmente, a maioria dessas investigações não teve sucesso (Miller *et al.*, 2016).

Foi também verificado que a combinação de testes a IDH-1 e EGFR para classificação imunohistoquímica de glioblastomas era o melhor método para a identificação do tipo de GBM. A combinação de IDH-1 negativo ou EGFR positivo foi o melhor método para identificar GBM primários, enquanto a combinação de IDH-1 positivo e EGFR negativo foi o melhor método para identificar GBM secundários (Lee *et al.*, 2013).

As deleções alélicas abrangendo todo ou parte do cromossoma 10q foram descritas como uma alteração genética frequente nas vias de GBM primário e secundário, indicando que a perda de um ou mais genes supressores de tumor no 10q desempenha um papel na formação de GBM. Um desses genes é o PTEN, um gene localizado em 10q23 que codifica uma proteína fosfatase de especificidade dupla. Não é encontrado um elevado número de mutações no cromossoma 10 em astrocitomas anaplásicos (glioma de grau mais baixo), indicando que a perda de heterozigotia no cromossoma 10 é um evento genético terminal associado ao GBM. A perda do perfil de heterozigotia pode, portanto, ter implicações prognósticas, mas até o momento essa informação não orientou as opções de tratamento (McNamara *et al.*, 2013).

O PTEN é um gene supressor de tumor que regula negativamente a via da fosfatidilinositol 3'-cinase (PI3K) /serina/treonina cinase (Akt) e desempenha um papel importante na regulação da proliferação celular, apoptose e invasão tumoral. No GBM, o PTEN é excluído devido à LOH do cromossoma 10q em 50%-70% dos casos primários e 54%-63% do GBM secundário. Também se encontra mutado em 14% a 47% de GBM primário. Atualmente, acredita-se que o PTEN seja um marcador molecular de prognóstico, já que os doentes com perda de PTEN têm uma diminuição da sobrevida e também pode ser um possível biomarcador preditivo da resposta do glioma a terapias específicas (McNamara *et al.*, 2013).

TP53 é o gene que codifica a proteína supressora de tumor, p53. Um estudo de 715 doentes com diagnóstico de GBM relatou que o tipo e a distribuição das mutações de TP53 diferem entre os subtipos de GBM. Em GBMs secundários, 57% das mutações foram localizadas nos dois codões *hotspot*, 248 e 273, enquanto nos GBMs primários, as mutações foram distribuídas mais equitativamente através dos exões com apenas 17% ocorrendo nos codões 248 e 273, possivelmente refletindo instabilidade genómica aumentada durante a progressão do tumor. Atualmente, o p53 não é conhecido por ser preditivo ou prognóstico, mas tem um papel no diagnóstico, pois pode ajudar a distinguir o grau do tumor (McNamara *et al.*, 2013).

A telomerase humana é uma ribonucleoproteína estruturalmente complexa que é responsável pela manutenção do ADN telomérico nas extremidades dos cromossomas e é apontada como tendo um papel importante na imortalização e oncogénese celular. Um estudo que examinou a atividade da telomerase, descobriu que a idade avançada, bem como a alta atividade da telomerase e os níveis de hTERT mRNA foram preditores significativos de mau prognóstico em relação à sobrevida global e à sobrevivência livre de doença. Outro estudo confirmou que o hTERT encontrava-se expresso em linhagens celulares de glioma e tecidos testados, mas estava ausente em células e tecidos de controlo e poderia, portanto, potencialmente ser útil como uma ferramenta de diagnóstico biológico (McNamara *et al.*, 2013).

Outro estudo com 38 doentes de GBM primário descreveu que miRNA-195 e miRNA-196b correlacionam-se positivamente com a sobrevida global e que a combinação de miRNA-181c e miRNA-21 permite prever o tempo de progressão dentro de seis meses após diagnóstico com 92% de sensibilidade e 81% de especificidade e, portanto, pode ajudar a identificar doentes com alto risco de progressão precoce após a cirurgia. Níveis plasmáticos de miRNAs, e especificamente miRNA-21, miRNA-128 e miRNA-342-3p também foram encontrados alterados em 50 doentes com GBM em comparação com controlos normais, tendo os dois últimos sido apontados como positivamente correlacionados com os graus histopatológicos dos gliomas e sugerem que miRNAs específicos do plasma poderiam ter potencial no uso como biomarcadores de glioma (McNamara *et al.*, 2013).

Outro estudo explorou o papel potencial do CD90 como um marcador de células estaminais cancerígenas em gliomas e a coloração por imunofluorescência de CD90 e CD133 em 15 tecidos de GBM revelou que células estaminais cancerígenas CD133(+) são uma subpopulação de células CD90(+) em GBM *in vivo*. Concluiu-se que CD90 não é apenas um potencial marcador de prognóstico para gliomas de alto grau, mas também um marcador de

células estaminais cancerígenas em gliomas e que pode desempenhar um papel na geração da vasculatura tumoral via diferenciação em células endoteliais (He J *et al.*, 2012).

Marcadores moleculares clássicos com implicações clínicas como metilação do promotor MGMT, co-deleção de 1p e 19q e mutações na IDH-1 são conhecidos como marcadores prognósticos favoráveis em gliomas, sendo a metilação do promotor MGMT o único potencial marcador preditivo para quimioterapia alquilante em GBM (McNamara *et al.*, 2013).

A vimentina (VIMEN), é uma proteína da família dos filamentos intermediários. Ajuda a manter a integridade celular e participa em várias vias de sinalização celular para modular a motilidade e invasão de células cancerígenas (Lin *et al.*, 2016).

Foi detetada distorção da vimentina positiva em 84% dos gliomas de alto grau em comparação com 47% em doentes com glioma de baixo grau. Adicionalmente, a expressão de mRNA da vimentina foi correlacionada com o grau do glioma em dois ensaios clínicos. Doentes com baixa expressão de vimentina têm maior sobrevida do que os com alta expressão. Na análise multivariada, a vimentina foi um fator independente de prognóstico significativo para doentes com glioma de alto grau (Lin *et al.*, 2016).

Várias evidências sugerem que a expressão de vimentina tem uma estreita associação com a progressão maligna de tumores do sistema nervoso central. Além disso, a vimentina foi postulada como um marcador molecular de maior motilidade e invasão de astrocitomas. O aumento da expressão de vimentina foi observado em vários tipos de cancro, e essa sobreexpressão pode estar associada à migração e invasão tumoral. A vimentina foi identificada como um biomarcador não apenas para o grau histológico, mas também para o *outcome* de doentes com glioma de alto grau. A expressão de vimentina é maior em glioma de alto grau em comparação com amostras de baixo grau, sugerindo que a vimentina desempenha um papel importante na classificação molecular do glioma (Lin *et al.*, 2016).

Em resumo, foi demonstrado que a sobreexpressão da vimentina é um fator de mau prognóstico em doentes com glioma de alto grau e que a expressão de vimentina tem uma relação significativa com o grau de glioma. Isto sugere que podemos empregar a vimentina como um biomarcador na classificação molecular do glioma. Também foi identificado que doentes com GBM primário com baixa expressão de vimentina tiveram um benefício na sobrevida quando tratados com temozolomida. Portanto, a compreensão dos mecanismos moleculares da expressão da vimentina no glioma pode levar à identificação de alguns novos alvos terapêuticos para o tratamento do glioma e orientar mais as decisões de tratamento para doentes e neurocirurgias (Lin *et al.*, 2016).

Embora outras numerosas alterações genéticas tenham sido descritas em GBM como documentado acima, os biomarcadores moleculares provaram ser de utilidade um tanto secundária na previsão do resultado ou na orientação de decisões na gestão da doença. Atualmente, não há diferenças significativas no tratamento do GBM com base em qualquer biomarcador molecular de prognóstico. Todas estas descobertas moleculares não tiveram impacto nas decisões relativas aos tratamentos, até à data. Contudo, todos estes resultados servem como pistas de que o diagnóstico molecular será futuramente bastante necessário na gestão clínica dos tratamentos dos doentes (Weathers *et al.*, 2014).

Existem outro tipo de neoplasias que já utilizam a análise genómica com sucesso, como por exemplo no caso do cancro da mama, onde a estratificação deste em subgrupos moleculares e a deteção de assinaturas preditivas de prognóstico/tratamento têm implicações nos resultados clínicos. As informações obtidas pelos ensaios disponíveis permitem que os médicos estimem o risco de recorrência e prevejam quais os doentes que provavelmente beneficiarão de terapia adjuvante. No entanto, até o momento, a incorporação dessas tecnologias de perfil molecular na tomada de decisão clínica é um processo lento devido à falta de acessibilidade e custo de alguns testes que ainda exigem validação, mas ilustra que essas ferramentas podem levar a um melhor diagnóstico, prognóstico e gestão terapêutica numa doença clinicamente heterogénea e complexa (McNamara *et al.*, 2013).

#### 1.4.2. Heterogeneidade intertumoral e intratumoral

O GBM é um tumor muito heterogéneo, do ponto de vista molecular. Foi originalmente denominado glioblastoma multiforme numa tentativa de descrever a aparência surpreendentemente diversificada de células incorporadas no mesmo tumor, o que provavelmente reflete a heterogeneidade molecular. Esta heterogeneidade é tanto intertumoral como intratumoral, isto é, ocorre dentro do mesmo tumor e entre diferentes tumores, sendo complicada ainda mais pelas contínuas alterações moleculares que este sofre ao longo do tempo. Várias fontes diferentes de heterogeneidade intratumoral foram postuladas, incluindo hierarquias de diferenciação, heterogeneidade genética e não genética, e os efeitos do microambiente do tumor. Não existe uma única “*driver mutation*” que explique a tumorigénese deste tipo de tumores, e é a sua diversidade molecular que parcialmente explica a sua observada resistência à terapêutica. Testes genómicos promoveram a descoberta de alterações moleculares, algumas das quais são “*drivers*” e outras “*passengers*” (Cloughesy *et al.*, 2014; Weathers *et al.*, 2017).

Análises célula a célula aumentaram ainda mais a descoberta da heterogeneidade intratumoral, revelando a coexistência de diferentes populações de células no mesmo glioblastoma. Esta heterogeneidade intratumoral está a tornar-se cada vez mais reconhecida como determinante no insucesso dos tratamentos e na recorrência da doença. Investigadores examinaram a sequência genómica de amostras de glioblastoma primário e encontraram variabilidade na expressão de diversos fatores de transcrição associados à sinalização oncogénica, proliferação, resposta imune/complemento e hipóxia. Demonstraram também que os subtipos de glioblastoma descritos encontram-se expressos em diferentes células individuais no mesmo tumor, sublinhando o desafio que é o tratamento face à heterogeneidade intratumoral. A progressão desta heterogeneidade ao longo do tempo é outro ponto que impõe uma tremenda dificuldade ao desenvolvimento de terapêuticas eficazes. A exposição de um tumor ao tratamento resulta na “evolução” genética do tumor, através da seleção ou aquisição de alterações genéticas, o que também sugere que estas células possam divergir de um tumor primário. Comparando o perfil molecular do tumor no momento do diagnóstico com o perfil do mesmo em situação de recorrência, estes podem apresentar semelhanças ou podem ser completamente diferentes, como resultado da aquisição de mutações como resposta à pressão seletiva exercida pela terapia a que o doente esteve exposto. Uma alta taxa de complexidade molecular pode fornecer ao tumor mais vias para escapar ao tratamento, complicando ainda mais o desafio que é a eficácia do tratamento (Weathers *et al.*, 2017).

A heterogeneidade intratumoral, particularmente como mediador de resistência a fármacos, também é importante. A integração de tecnologias unicelulares e/ou o desenvolvimento de protocolos de ensaios clínicos que exigem que o tecido tumoral seja amostrado antes e em vários momentos após o tratamento, pode fornecer informações críticas sobre a evolução molecular do GBM em resposta ao tratamento e identificar combinações inesperadas para suprimi-lo (Cloughesy *et al.*, 2014).

Existe, assim, uma crescente evidência de que a falta de terapêuticas eficazes está relacionada com a conclusão de que o glioblastoma é uma doença molecularmente heterogénea. Este é claramente um grande desafio no desenvolvimento de tratamentos eficazes (Weathers *et al.*, 2014).

### 1.5. Diagnóstico

Pela primeira vez, a classificação WHO dos tumores do SNC utiliza parâmetros moleculares em conjunto com a classificação histológica. É esperado que esta objetividade adicional leve a uma maior exatidão no diagnóstico assim como uma melhoria na gestão da doença através da determinação exata do prognóstico e da resposta ao tratamento (Louis *et al.*, 2016).

Contudo, existem desafios a esta objetividade que incluem: a disponibilidade e escolha da técnica ou testes de genotipagem e os formatos atualmente usados para reportar e analisar esses diagnósticos integrados (Louis *et al.*, 2016).

A relevância para o diagnóstico e prognóstico dos biomarcadores sugere fortemente a sua importância biológica, e a observação de associações significativas com a ativação de vias de sinalização específicas sublinha o potencial de terapias direcionadas em subgrupos específicos, mas os estudos em curso para identificar agentes clinicamente eficazes para causar a disrupção destas vias de sinalização e afetar positivamente a sobrevivência global em doentes com GBM têm sido decepcionantes (Chen *et al.*, 2016).

Não existem, até ao momento, meios disponíveis para a deteção precoce, prevenção ou triagem de gliomas, nem estão disponíveis testes para marcadores tumorais específicos (Schneider *et al.*, 2010).

A confirmação histológica do diagnóstico é essencial. O tecido para exame histopatológico deve ser obtido cirurgicamente, isto é, por biópsia estereotáxica ou por ressecção microcirúrgica aberta, sendo este necessário para determinar e diagnosticar o tipo e o grau do tumor (Gladson *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2010).

De momento está bem estabelecido que o prognóstico de um paciente com glioma depende, em geral, da classificação histológica do tumor, do grau do tumor, do comportamento clínico do doente e dos défices neurológicos, bem como da idade do mesmo. Novos marcadores moleculares, como a perda de heterozigotia (LOH) do cromossoma 1p/19q, a metilação de MGMT e as mutações da IDH-1, permitem agora um prognóstico mais preciso, contudo não são prática corrente na maioria dos hospitais portugueses (Schneider *et al.*, 2010).

No Centro Hospitalar Universitário do Algarve – Hospital de Faro, o diagnóstico é feito no Serviço de Neurocirurgia, através de biópsia. Os doentes são posteriormente encaminhados para o Serviço de Oncologia, onde fazem a recuperação da intervenção cirúrgica e são depois

seguidos pelo médico oncologista que faz o seguimento do estado do doente e decide o curso do tratamento a seguir.

A realidade de o diagnóstico ser feito com recurso a biópsia e/ou intervenção cirúrgica, faz com que o mesmo leve bastante tempo a ser estabelecido, o que por vezes agrava ainda mais os resultados, pois só após a confirmação deste se pode decidir o melhor percurso de tratamento a seguir pelo doente.

### 1.5.1. Sintomas

Nos tumores cerebrais, como o GBM, o início dos sintomas é rápido e pode causar praticamente qualquer tipo de distúrbio neurológico. O tipo de distúrbio que está presente e os sintomas apresentados dependem não só da histologia do tumor, mas da sua localização no cérebro (Chamberlain *et al.*, 1998; Gladson *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2010).

As manifestações clínicas podem ser locais, como fraqueza, perda somatossensorial, perda visual, auditiva ou afasia, alterações do humor e da personalidade, ou gerais, como cefaleia, náusea, vômito, edema da papila, consciência debilitada, défices de memória, lentidão na função cognitiva, ataques epiléticos ou convulsões. Essas manifestações generalizadas são devidas ao aumento da pressão intracraniana. As crises epiléticas, que podem ser focais ou generalizadas, são comuns (Chamberlain *et al.*, 1998; Gladson *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2010).

Porque o parênquima do cérebro não tem estruturas sensíveis à dor, as cefaleias têm sido atribuídas à tumefação local e à distorção das terminações nervosas sensíveis à dor associadas aos vasos sanguíneos. Muitos tumores crescem sem cefaleias como sintoma proeminente, outros levam rapidamente a cefaleias. Estas podem variar em gravidade e qualidade e frequentemente ocorrem nas primeiras horas da manhã, após o acordar. Alguns doentes queixam-se apenas de uma sensação desconfortável na cabeça (Chamberlain *et al.*, 1998).

O agravamento rápido das manifestações clínicas pode indicar um crescimento maligno ou alterações no fluxo do líquido cefalorraquidiano. Apenas 7% dos doentes com glioblastoma apresentaram sintomas durante mais de 1 ano antes do diagnóstico, e a apresentação inicial é por vezes repentina (Schneider *et al.*, 2010).

A ocorrência de manifestações clínicas agudas com risco de vida é um sinal de herniação cerebral, devido à hipertensão intracraniana, e incluem cefaleia, vômitos e deterioração da consciência levando ao coma. Tanto tumores que crescem lentamente como

tumores que crescem rapidamente podem, em última instância, causar herniação cerebral fatal (Schneider *et al.*, 2010).

Sintomas gastrointestinais como perda de apetite, náuseas, e vômitos ocasionais ocorrem em todos os doentes, mas são mais comuns em crianças e no geral, refletem o aumento da pressão intracraniana (Chamberlain *et al.*, 1998).

Alterações na personalidade, humor, capacidades mentais, e concentração podem ser indicadores precoces ou podem ser as únicas anomalias observadas. Em geral, os doentes com tumores cerebrais tendem a dormir mais. Estes sintomas, visto não serem exclusivos de tumores cerebrais, podem ser confundidos com depressão e outros problemas psicológicos (Chamberlain *et al.*, 1998).

Sintomas focais podem ser progressivos ou episódicos. Sintomas episódicos incluem convulsões que são o maior prenúncio de tumor cerebral. Apesar de só apenas a 1% dos doentes que apresentam convulsões lhes seja diagnosticado tumor cerebral, a associação aumenta com o aumento da idade do doente (Chamberlain *et al.*, 1998).

Os tumores mais frequentes por localização são, em ordem decrescente de frequência: lobos frontal, parietal, temporal e occipital (Chamberlain *et al.*, 1998).

Tumores no lobo frontal podem ser assintomáticos ou produzir uma desaceleração dos movimentos contralaterais da mão, hemiparesia espástica contralateral, alterações no humor, perda de iniciativa e disfasia. Os tumores bifrontais são comuns e podem causar a hemiparesia bilateral, paraparésia espástica, demência, e grave comprometimento do intelecto, personalidade e humor. Tumores no lobo temporal podem ser clinicamente silenciosos ou podem produzir perturbações na memória recente, quadrantanopsia homónoma, alucinações auditivas, e comportamento agressivo. O envolvimento do lobo temporal pode levar a problemas perceptuais menores e desorientação espacial. O envolvimento do lobo temporal dominante pode levar a disnomia, danos na memória e afasia. Tumores no lobo parietal afetam as funções sensoriais e perceptuais mais que a função motora, no entanto pode coexistir uma hemiparesia menor. Além disso, hemianopsia homónima e falta de atenção visual podem ocorrer em tumores do lobo parietal. Tumores do lobo occipital produzem hemianopsia homónima contralateral ou distorções visuais que tomam a forma de alucinações visuais. Tumores talâmicos ou no gânglio basal podem resultar em cefaleias não específicas devidas a hidrocefalia ou aumento da pressão intracraniana, normalmente desequilíbrios sensoriais e motores, e ocasionalmente afasias subcorticais (Chamberlain *et al.*, 1998).

Os gliomas geralmente crescem através de infiltração difusa da substância branca e, por isso, muitas vezes não são diretamente visíveis na superfície do cérebro (Schneider *et al.*, 2010).

Na periferia da lesão, os vasos estão frequentemente massivamente dilatados, enquanto vasos trombosados são encontrados no centro da lesão, especialmente em tumores agressivos. O tumor encontra-se normalmente rodeado de um edema extenso da substância branca (Schneider *et al.*, 2010).

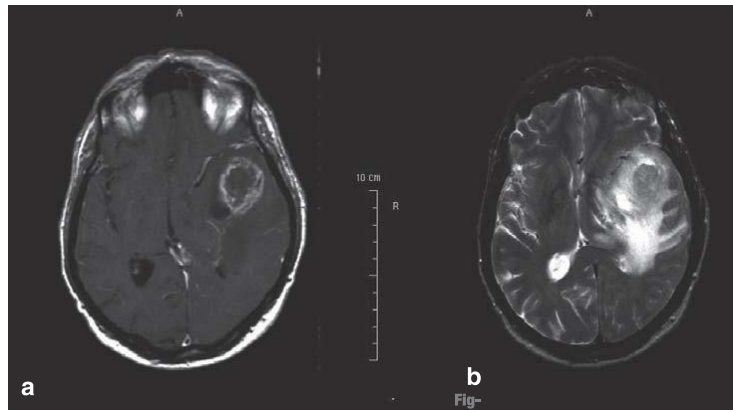
### 1.5.2. Técnicas Auxiliares de Diagnóstico

A neuropatologia oncológica hoje em dia utiliza uma ampla gama de técnicas morfológicas, imunohistoquímicas e de biologia molecular para identificar o tipo de tumor e o seu grau (Flowers *et al.* 2000). O conhecimento da morfologia normal, morfologia da doença e a informação clínica do doente (incluindo idade, historial clínico relevante, localização da lesão, recursos de neuroimagem e tipo de sintomas apresentados) são pré-requisitos para o correto diagnóstico histopatológico de tumores cerebrais (De Monte *et al.* 2007).

As técnicas auxiliares de diagnóstico mais utilizadas são a ressonância magnética nuclear (RMN) e a tomografia axial computadorizada (TAC). Estas são, usualmente, as técnicas utilizadas para o diagnóstico inicial de um tumor cerebral.h

A RMN é realizada com o auxílio de um aparelho que utiliza campos magnéticos e técnicas computacionais para capturar imagens do cérebro, criando uma imagem tridimensional do tumor. A TAC, combinando técnicas de raios-x e computacionais, proporciona a observação de uma combinação tanto de tecidos moles, como de osso e vasos sanguíneos. Nesta técnica é utilizado um agente de contraste contendo, normalmente, iodo (Flowers *et al.* 2000, Bruce *et al.* 2009).

A RMN é uma técnica auxiliar de diagnóstico muito superior à TAC para a finalidade, pois tem maior sensibilidade, consegue obter um maior contraste em tecidos moles, uma melhor representação da extensão dos tumores e possui ainda a capacidade de exibir dados em três dimensões (Schneider *et al.*, 2010).



**Figura 1.5.2.1** - *Imagens de um glioblastoma obtidas pela técnica de ressonância magnética: uma massa centralmente necrótica com um forte contraste periférico e um marcado edema perifocal (Schneider et al., 2010).*

Assim como as características histopatológicas do glioblastoma são altamente variáveis, também são suas características neurorradiológicas. Frequentemente, a ressonância magnética revela uma massa centralmente necrótica com realce periférico ao contraste acentuado e edema acentuado no tecido cerebral adjacente (Figura 1.5.2.1) (Schneider *et al.*, 2010).

### 1.5.3. Testes a marcadores tumorais

Várias técnicas laboratoriais podem, também, ser utilizadas para distinguir entre glioblastomas primários e secundários, através de imunohistoquímica, hibridação com sondas fluorescentes *in situ* (FISH), piro-sequenciação, e sequenciação direta por métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*), entre os principais métodos. As técnicas de FISH, pirosequenciação e sequenciação direta são técnicas mais sofisticadas, sendo, no entanto, mais dispendiosas e demoradas. Em contraste, a imunohistoquímica é muito rápida e económica, e é adequada para testes de triagem para a determinação de estratégias de tratamento. De facto, a imunohistoquímica é amplamente utilizada em laboratórios patológicos, e a avaliação imunohistoquímica é habitualmente utilizada na prática diária para diagnósticos patológicos (Lee *et al.*, 2013).

No Centro Hospitalar Universitário do Algarve – Hospital de Faro, estudos específicos a marcadores ou deleções cromossómicas são feitos só a pedido do médico oncologista, caso se verifique importante para o diagnóstico, e são feitos em laboratórios externos.

## 1.6. Tratamento

O GBM é um tumor cerebral agressivo, altamente invasivo e difícil de tratar, caracterizado por uma vascularização intensa e aberrante e uma elevada resistência à radioterapia (RT) e à quimioterapia (QT). O atual tratamento *standard* para doentes recém-diagnosticados com GBM compreende neurocirurgia com máxima ressecção, RT fracionada de feixe externo e QT com temozolomida sistémica, seguida de temozolomida sistémica como tratamento adjuvante, tratamento denominado Protocolo Stupp, que será descrito em mais detalhe abaixo. Este tratamento serve para estabilizar os tumores, sendo que atualmente não existe um método eficaz para os erradicar ou curar, dada a sua natureza infiltrativa. Para o tratamento de tumores GBM recorrentes, existem poucas opções, sendo que estas geralmente têm uma eficácia clínica mínima (Lee *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2016).

O desafio no desenvolvimento de tratamentos eficazes para doentes com glioblastoma é atribuído à relativa raridade do tumor e da sua heterogeneidade molecular. Contudo, e apesar da melhoria no conhecimento dos subtipos moleculares dos gliomas e das alterações subjacentes em vias de sinalização específicas, essas observações até agora não resultaram na aplicação bem-sucedida de terapias direcionadas, como ocorreu em outros tumores (Chen *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017; Weathers *et al.*, 2014).

Além da medicação utilizada para tratamento dos tumores, a maioria dos doentes também requer fármacos para controlo dos efeitos colaterais relacionados à quimioterapia e radiação, particularmente antieméticos, bem como medicamentos para tratar complicações associadas ao tumor, como antiepilépticos para controlo de crises, corticosteróides para edema peritumoral, anticoagulantes para profilaxia de trombose venosa profunda e embolia pulmonar, assim como outros analgésicos. Todos esses medicamentos adicionais aumentam ainda mais o custo do tratamento de doentes com glioma. Além dos custos indiretos significativos relacionados com o viver com um glioma, incluindo a perda do sustento dos doentes e cuidadores, ao todo, o tratamento do glioma coloca uma pressão económica significativa sobre o nosso sistema de saúde e economia (Miller *et al.*, 2016).

Devido à falta de resposta duradoura e aos efeitos colaterais do tratamento atual, a descoberta de novas drogas e novas estratégias de direcionamento da terapia é de extrema importância (Miller *et al.*, 2016).

Não há deteção precoce, a infiltração generalizada de células tumorais impossibilita a excisão cirúrgica completa e as próprias células tumorais estão entre as mais resistentes à radiação e à quimioterapia de todas as células cancerígenas. No entanto, análises genómicas

começaram a definir a arquitetura molecular do GBM e este é agora um dos tipos de cancro humano mais bem caracterizados a nível molecular. Tornou-se conhecido um grande número de potenciais alvos terapêuticos, mas para a grande maioria dos doentes, as respostas clínicas aos inibidores direcionados não são aparentes ou duráveis (Cloughesy *et al.*, 2014).

Existem outros regimes descritos, além do protocolo Stupp, com a utilização de outros agentes como procarbazona, lomustina, vincristina, carmustina, irinotecano, bevacizumab e carboplatina, tanto em regimes de monoterapia como de combinação. Contudo muitos destes fármacos ainda não possuem autorização de introdução no mercado português (AIM), ou então, já existem, mas para utilização nouro tipo de patologias ou neoplasias, e para que possam ser utilizadas para o tratamento destes doentes é necessário que seja apresentada uma autorização de utilização especial (AUE), devidamente fundamentada, pelo corpo médico ao INFARMED.

#### 1.6.1. Protocolo Stupp

Um ensaio realizado por Stupp e os seus colegas, publicado em 2005, resultou no estabelecimento de um novo tratamento *standard*, que se mantém até aos dias de hoje (Stupp *et al.*, 2005).

Consiste em radioterapia pós-operatória acompanhada de quimioterapia com temozolomida por seis semanas e quimioterapia adjuvante com temozolomida (seis ciclos de 28 dias). Este protocolo resultou num aumento da sobrevida mediana de 12,1 para 14,6 meses e os efeitos colaterais que surgiram não eram mais do que moderadamente severos; por exemplo, apenas 1% dos doentes sofriam de vômitos de grau clínico elevado e mielossupressão grave ocorreu até 16 % dos doentes tratados (Stupp *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2010).

Na tabela 1.6.1.1 encontra-se descrita a terapia que compreende o Protocolo Stupp e a sua forma de implementação.

**Tabela 1.6.1.1** – Descrição da terapia que compreende o denominado Protocolo Stupp para o tratamento de glioblastoma, adaptado de *Physician's Cancer Chemotherapy Drug Manual 2017* (Chu et al., 2016).

<b>Terapia Adjuvante</b>	
<b>Regime de Combinação</b>	
<b>Radioterapia e Temozolamida</b>	
Radioterapia:	200 cGy/dia durante 5 dias por semana num total de 6 semanas
Temozolamida:	75 mg/m <sup>2</sup> <i>per os</i> (PO) diariamente durante 6 semanas com radioterapia. Após uma pausa de 4 semanas, 150 mg/m <sup>2</sup> PO nos dias 1 a 5
Repetir a temozolamida em monoterapia a cada 28 dias até um máximo de 6 ciclos. Se for bem tolerada, pode ser aumentada a dose para 200 mg/m <sup>2</sup> nos ciclos seguintes. Os doentes devem ser colocados sob inalação de pentamidina ou trimetoprim/sulfametoxazole para profilaxia de <i>Pneumocystis pneumonia</i> (PCP) durante o regime de terapia de combinação.	

#### 1.6.1.1. Cirurgia

Somente na última década é que os estudos clínicos finalmente conseguiram documentar o benefício da extensa ressecção do tumor. Revelaram que doentes que não tinham tumor residual viviam significativamente mais do que os doentes que permaneciam com tumor residual. A técnica padrão de ressecção microcirúrgica está associada a menos de 2% de mortalidade operatória e menos de 5% de morbilidade neurológica permanente. A ressecção total do glioblastoma é uma impossibilidade prática, devido à migração de células de glioma para o tecido cerebral circundante; portanto, o tratamento adicional ainda é necessário mesmo após a ressecção de todos os tecidos tumorais (Schneider *et al.*, 2010).

A cirurgia de tumores cerebrais é sempre limitada devido a potenciais danos aos tecidos circundantes e o seu comportamento infiltrativo torna-os difíceis de completa ressecção. Tipicamente, na oncologia cirúrgica, o objetivo é extirpar o tumor e garantir que nenhuma célula infiltrativa é deixada para trás, minimizando os danos ao tecido normal. Em neoplasias cerebrais como o GBM, não é possível retirar margens amplas além da borda aparente do tumor, devido ao potencial dano a estruturas neurais críticas que poderiam causar déficits neurológicos. No entanto, visto a máxima segura ressecção cirúrgica melhorar o prognóstico é, como tal, recomendada como o passo inicial na gestão do tratamento de glioblastomas. E só

não é efetuada em casos em que o tumor se encontre numa zona em que a cirurgia traria mais riscos para o doente, que benefícios, como por exemplo um tumor localizado numa zona de difícil acesso sem danos graves para o tecido e estruturas cerebrais. Nestes casos os tumores são considerados inoperáveis (Weathers *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2015).

#### 1.6.1.2. Radioterapia

A cirurgia pode ser considerada um tratamento local para o cancro, já a radioterapia é considerada um tratamento mais amplo ou regional. Como as células de GBM se infiltram muito além das margens visíveis do tumor, o uso de terapia adjuvante é o padrão de tratamento. Pode ser utilizada após cirurgia para destruir células tumorais residuais e prevenir ou atrasar a recidiva. Esta também pode ser utilizada para travar ou reduzir o crescimento de tumores inoperáveis. A radioterapia geralmente tem como alvo células em rápida divisão e é tratamento adjuvante em muitos tumores sólidos (De Monte *et al.* 2007; Wong *et al.*, 2015).

A radioterapia utiliza raios-x de energia elevada ou outros tipos de radiação ionizante para travar a divisão das células tumorais. Esta radiação destrói o ADN das células, mas enquanto que as células normais podem conseguir reparar os danos ao longo do tempo, as células tumorais irradiadas morrem. A radioterapia convencional utiliza um feixe de radiação externa focado na região que contem o tumor, é fracionada em várias pequenas doses que são administradas durante, normalmente, 5 a 7 semanas. A dose diária encontra-se entre 1,8 e 2,0 Gy (Gray), sendo que a dose total varia, dependendo do tipo de tumor, entre 50 e 60 Gy. A radioterapia de cérebro inteiro para tratamento de gliomas é agora considerada obsoleta, visto os riscos para o doente serem bastante elevados, devendo-se assim, manter a irradiação restrita à área do tumor no cérebro (De Monte *et al.* 2007; Flowers *et al.* 2000; Schneider *et al.*, 2010).

Os efeitos secundários mais comuns a curto prazo são cansaço, perda de apetite, náusea, perda de memória a curto prazo, reações cutâneas e queda de cabelo no local onde a radiação é administrada (Flowers *et al.* 2000).

#### 1.6.1.3. Quimioterapia

A adição da quimioterapia à radioterapia emergiu como tratamento *standard* para glioblastomas após o estudo feito por Stupp e os seus colegas (Weathers *et al.*, 2014).

A temozolamida (TMZ), um agente alquilante, é espontaneamente hidrolisada ao pH fisiológico, sendo convertida principalmente na sua espécie ativa, 3-metil-(triazeno-1-il)

imidazol-4-carboxamida (MTIC). A MTIC é espontaneamente hidrolisada em 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC), um conhecido intermediário na biossíntese de purina e ácido nucleico, e em metil-hidrazina, que se pensa ser a espécie ativa alquilante, que, impedindo a divisão celular, retarda a progressão dos tumores. Pensa-se que a citotoxicidade se deve principalmente à alquilação do ADN maioritariamente nas posições O<sup>6</sup> e N<sup>7</sup> da guanina (EMA).

Administrado concomitantemente uma dose de 75mg/m<sup>2</sup> ao tratamento de radioterapia localizada, seguido de temozolamida de manutenção administrada a uma dose de 150-200 mg/m<sup>2</sup>, nos dias 1 a 5 de um ciclo de 28 dias, resultou numa melhoria da sobrevivência média global de 12,1 meses para 14,6 meses, quando comparada com doentes tratados apenas com radioterapia. A adição da temozolamida à radioterapia demonstrou claramente um benefício estatisticamente significativo (Weathers *et al.*, 2014).

Como a radiação, a quimioterapia tem como alvo células em rápida divisão e pode estar associada a uma significativa toxicidade. Existem muitas células que se dividem rapidamente no corpo, particularmente no trato intestinal e na medula óssea. No trato intestinal, o epitélio intestinal é constantemente eliminado e renovado pelas células precursoras. Essas células que se dividem rapidamente podem ser facilmente danificadas pela quimioterapia, o que pode levar a má absorção, náusea e diarreia. Da mesma forma, a hematopoiese na medula óssea pode ser inibida por radioterapia e quimioterapia. A leucopenia é um evento adverso comum, levando a respostas imunes debilitadas e potenciais infeções com risco de vida e os agentes alquilantes, como a temozolomida, são mais frequentemente associados à anemia, que pode causar fadiga e trombocitopenia, levando a hematomas ou distúrbios hemorrágicos mais graves (Wong *et al.*, 2015).

A quimioterapia convencional tem eficácia limitada em GBM devido à baixa penetração da barreira hematoencefálica (BBB), à heterogeneidade intratumoral, à resistência intrínseca do GBM, e à toxicidade inespecífica dos tratamentos (Lee *et al.*, 2017).

#### 1.6.2. Tratamento co-adjuvante

Como referido anteriormente, além dos fármacos antineoplásicos citotóxicos utilizados para o tratamento dos tumores, quase todos os doentes requerem a adição de outros fármacos ao seu tratamento, seja para controlo dos efeitos colaterais da QT e RT, como para tratamento ou controlo de complicações ou sintomas associados ao tumor. Abaixo são descritas algumas das classes de fármacos mais utilizados:

- Corticosteróides

O edema perifocal dos vasos geralmente acompanha tumores cerebrais e pode causar um efeito de massa marcadamente aumentado. A farmacoterapia específica, do edema cerebral associado ao tumor, com dexametasona pode melhorar rapidamente os défices neurológicos e o estado geral do paciente. Esta forma muito eficaz de tratamento foi descrita pela primeira vez em 1961 por Galicich *et al.*, e desde então tem sido usada em todo o mundo. Até onde se sabe, nunca houve um ensaio clínico randomizado e controlado sobre este tratamento. Assim, todas as recomendações sobre a utilização de dexametasona para o edema cerebral associado ao tumor são de natureza empírica. Contudo o tratamento com esteroides a longo prazo pode causar múltiplas complicações, algumas delas graves. Assim, a dose de dexametasona deve ser sempre diminuída tão rapidamente quanto possível para a menor dose clinicamente necessária. Em vista de tais problemas, parece razoável procurar uma alternativa à dexametasona (Cairncross *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 2010).

- Fármacos Antitrombóticos

Doentes com glioma maligno apresentam um maior risco de desenvolver trombozes venosas nos membros inferiores e embolia pulmonar. Fármacos anticoagulantes, como a heparina ou, de preferência, heparinas de baixo peso molecular, são administradas em muitos hospitais, mesmo na fase inicial do pós-operatório, apesar de não terem sido aprovadas para uso após a cirurgia cerebral. A experiência prática demonstrou que o risco de hemorragia intracraniana nesta situação é relativamente baixo, contudo os dados publicados sobre este assunto são apenas de um pequeno número de estudos de pequena escala, nos quais não ocorreu hemorragia intracraniana em coortes de até 50 doentes tratados. Anticoagulantes orais, não são recomendados frequentemente e, se possível, não devem ser administrados até pelo menos quatro semanas após a cirurgia (Schneider *et al.*, 2010).

- Anticonvulsivos

Cerca de metade dos doentes com glioma apresentam convulsões epiléticas em algum momento do seu percurso. Crises focais são mais comuns que as generalizadas. Os principais tipos de anticonvulsivos são igualmente eficazes na prevenção de convulsões em doentes com glioma. Alguns interagem quando administrados simultaneamente, em diferentes graus, com agentes citostáticos como a temozolomida, pois podem inibir ou induzir enzimas metabólicas. Tais interações são menos marcantes com anticonvulsivos mais recentes, como o levetiracetam, do que com os mais antigos, como fenitoína, carbamazepina e ácido valpróico.

Os agentes mais recentes são melhor tolerados em geral, mas possuem certas desvantagens individuais, como a necessidade de uma introdução gradual do fármaco (Batchelor *et al.*, 2006).

Os anticonvulsivos devem ser administrados como um tratamento prático e protetor sempre que um paciente, em quem há suspeita de glioma por motivos radiológicos, tiver uma primeira crise epilética, embora não haja evidência direta de ensaios clínicos a apoiar essa prática. A administração profilática de anticonvulsivos a todos os doentes com glioma, ou a todos os doentes com glioma submetidos à cirurgia, não é recomendada (Schneider *et al.*, 2010).

### 1.6.3. Tratamento da doença recorrente

Atualmente, não há uma abordagem padrão para o tratamento do glioma recorrente. Os dados disponíveis sobre o glioma recorrente não têm tanta informação e baseiam-se principalmente em ensaios de pequena escala. A reoperação é geralmente recomendada quando se prevê que esta traga benefícios para o doente, isto é, quando a operação resulta numa remoção significativa do tumor residual e melhora a condição neurológica do doente, e o estado geral do mesmo é satisfatório (Schneider *et al.*, 2010).

Para uma minoria de doentes com lesões bem circunscritas, a repetição da radioterapia pode ser considerada, contudo a decisão de realizar um novo ciclo de quimioterapia deve ser tomada individualmente, consoante o estado do doente (Schneider *et al.*, 2010). A repetição da quimioterapia, pode ser feita, utilizando o mesmo regime de tratamento ou um agente antineoplásico diferente, ou uma combinação destes, se a resposta ao regime inicial tiver sido satisfatória. Num estudo, foi verificado que o aumento da dose de temozolomida para 150 mg/m<sup>2</sup> em semanas alternadas prolonga a mediana do tempo de sobrevida livre de progressão de 13 semanas para 21 semanas. Contudo a qualidade de vida desses doentes é altamente variável e imprevisível, pois são normalmente doentes que têm um prognóstico clínico bastante reservado (Schneider *et al.*, 2010).

Um dos tratamentos mais promissores da doença recorrente que surgiu na última década foi o bevacizumab. Este é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga ao VEGF-A em circulação e altera a ligação às células endoteliais, diminuindo assim a angiogénese (Chen *et al.*, 2016).

Foi aprovado em maio de 2009 pela FDA (Food and Drug Administration) nos EUA para uso como agente único em doentes com glioblastoma com doença progressiva, após

terapia de primeira linha com ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia com temozolomida. Nos primeiros estudos clínicos não controlados, foram observadas respostas radiológicas impressionantes e um prolongamento da sobrevida livre de progressão. Este foi subsequentemente avaliado em estudos clínicos de fase III para glioblastomas recém-diagnosticados, onde infelizmente não demonstrou efeito na sobrevida global dos doentes. A rápida e robusta resposta radiológica dos inibidores angiogénicos sugere que estes têm pouca atividade antitumoral intrínseca, e que o principal benefício poderá vir de efeitos indiretos secundários à redução do edema cerebral e ao potencial para aumentar a eficácia de outras terapias. A falta de uma resposta duradoura observada com o uso de agentes angiogénicos foi desapontante e na Europa, devido aos reduzidos resultados dos ensaios clínicos, não foi aprovado para utilização em doentes de glioblastoma (Miller *et al.*, 2016; Weathers *et al.*, 2014).

Resultados iniciais positivos já foram observados, no entanto, a partir da inibição da angiogénese com o bevacizumab em combinação com o irinotecano. Estudos de fase I e II mostraram que o tratamento com essa combinação melhora acentuadamente a taxa de sobrevida livre de progressão em seis meses para 43% no glioblastoma. Nenhuma mudança estatisticamente significativa na sobrevida global foi, no entanto, encontrada (Schneider *et al.*, 2010).

Com base nestes estudos e nos resultados dos ensaios clínicos, foram descritos alguns regimes de tratamento para utilização em doença avançada ou recorrente, podendo ser estes regimes de combinação de agentes ou de monoterapia, tal como se apresentam na Tab. 1.6.3.1.

**Tabela 1.6.3.1 - Regimes de quimioterapia recomendados para a doença recorrente de neoplasia cerebral, adaptado de Physician's Cancer Chemotherapy Drug Manual 2017 (Chu *et al.*, 2016). \*AUC – área debaixo da curva**

<b>Doença Recorrente</b>	
<b>Regime de Combinação</b>	
<b>PCV</b>	
Procarbazona:	75 mg/m <sup>2</sup> <i>per os</i> (PO) nos dias 8 a 21
Lomustina:	130 mg/m <sup>2</sup> PO no dia 1
Vincristina:	1,4 mg/m <sup>2</sup> endovenoso (EV) nos dias 8 e 29
Repetir o ciclo a cada 8 semanas.	

<b>Irinotecano + Bevacizumab</b>	
Irinotecano:	125 mg/m <sup>2</sup> EV no dia 1
Bevacizumab:	10 mg/kg EV no dia 1
Repetir o ciclo a cada 2 semanas até 6 ciclos.	
<b>Temozolamida + Bevacizumab</b>	
Temozolamida:	150 mg/m <sup>2</sup> PO nos dias 1 a 5
Bevacizumab:	10 mg/kg EV no dia 1 e 14
Repetir o ciclo a cada 28 dias.	
<b>Carboplatina + Irinotecano + Bevacizumab</b>	
Carboplatina:	AUC* de 4, EV no dia 1
Irinotecano:	340 mg/m <sup>2</sup> EV nos dias 1 e 14
Bevacizumab:	10 mg/kg EV nos dias 1 e 14
Repetir o ciclo a cada 28 dias.	
<b>Temozolamida + Lomustina</b>	
Temozolamida:	100 mg/m <sup>2</sup> PO nos dias 2 a 6
Lomustina:	100 mg/m <sup>2</sup> PO no dia 1
Repetir o ciclo a cada 28 dias até 6 ciclos.	
<b>Regime Monoterapia</b>	
<b>Carmustina</b>	
Carmustina:	200 mg/m <sup>2</sup> EV no dia 1
Repetir o ciclo a cada 6-8 semanas.	
<b>Procarbazina</b>	
Procarbazina:	150 mg/m <sup>2</sup> PO dividido em 3 doses diárias
Repetir diariamente.	
<b>Temozolamida</b>	
Temozolamida:	150 mg/m <sup>2</sup> PO nos dias 1 a 5
Repetir o ciclo a cada 28 dias. Se tolerado, a dose pode ser aumentada para 200 mg/m <sup>2</sup> .	
<b>Irinotecano</b>	
Irinotecano:	350 mg/m <sup>2</sup> EV durante 90 minutos no dia 1
Repetir o ciclo a cada 3 semanas.	
<b>Irinotecano</b>	
Irinotecano:	125 mg/m <sup>2</sup> EV semanalmente durante 4 semanas
Repetir o ciclo a cada 3 semanas.	

**Bevacizumab**

Bevacizumab: 15 mg/kg EV no dia 1

Repetir o ciclo a cada 3 semanas.

Infelizmente, apesar do tratamento multimodal, todos os doentes irão sofrer recorrência da doença necessitando de uma alteração na terapia. O aumento do conhecimento sobre as alterações moleculares do glioblastoma com o passar do tempo apresenta-se como um desafio cada vez maior no desenvolvimento de tratamentos eficazes na doença recorrente. O perfil molecular do tecido do tumor obtido no momento do diagnóstico torna-se cada vez menos representativo com o passar do tempo, visto que o tumor continua a acumular mutações e desenvolve resistência aos tratamentos. Existe atualmente uma enorme falta de terapia de salvamento eficazes para o glioblastoma recorrente (Weathers *et al.*, 2014).

No Centro Hospitalar Universitário do Algarve – Hospital de Faro, a terapêutica após progressão de doença mais utilizada e que tem apresentado melhores resultados é o tratamento com bevacizumab. Como dito anteriormente, é um fármaco que ainda não possui AIM em Portugal para utilização no tratamento deste tipo de tumor, contudo quando feito um pedido à comissão de farmácia e terapêutica hospitalar devidamente documentado e justificado pelo clínico, este é geralmente autorizado e disponibilizado, para o tratamento, pelo hospital.

#### 1.6.4. Efeito de mutações na resposta ao tratamento

Acredita-se que as alterações no RTK, PI3K, TP53 e ciclo celular, descritas acima, sejam as principais mutações que favorecem a tumorigênese. Contudo, anomalias genómicas adicionais podem acumular-se sequencialmente ao longo do tempo, espontaneamente ou em resposta ao stress provocado pelo tratamento do tumor, levando à transformação maligna e à resistência ao tratamento. A análise detalhada de células individuais de tumores de GBM revelou um elevado grau de heterogeneidade entre as mutações que deram origem às primeiras células mutadas e as observadas ao longo da evolução do tumor. Dados de vários estudos ilustram a variabilidade das populações de células tumorais que adquirem alterações oncogénicas adicionais ao longo do tempo, e diferentes alterações em diferentes populações de células no mesmo tumor. Assim, dado o grau de heterogeneidade espacial e temporal observada no glioblastoma, não é surpresa que os testes com fármacos envolvendo agentes

únicos direcionados a vias específicas tenham sido amplamente malsucedidos (Miller *et al.*, 2016).

Contudo, da mesma forma que foram encontradas diversas mutações que caracterizavam as diferentes populações de células, e os diferentes tumores, também foram encontradas diferentes respostas aos tratamentos consoante a presença ou ausência de determinadas mutações nos GBM. Abaixo serão descritos alguns dos biomarcadores encontrados em GBM e a forma como estes se relacionam com a resposta dos doentes aos tratamentos instituídos.

A MGMT é uma enzima de reparação do ADN que pode afetar negativamente a resposta do tumor a agentes alquilantes. A metilação do gene promotor da MGMT resulta no silenciamento do gene, comprometendo assim a reparação do ADN. A hipermetilação do gene, presente em aproximadamente 30-40% dos tumores, ocorre em ambos GBM primários (36%) e secundários GBM (75%) e indica uma melhor resposta ao tratamento com temozolomida (Gladson *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2016; SCAN, 2015).

O MGMT também mostrou ter forte valor preditivo no *outcome* do prognóstico, particularmente entre os doentes mais idosos. Foi verificado que os doentes com tumores com o promotor MGMT metilado tinham uma sobrevida livre de progressão significativamente mais longa quando recebiam RT concomitante com QT de agentes alquilantes, ou somente QT, em comparação àqueles que recebiam só RT. Aqueles com tumores não-metilados não obtiveram benefícios da QT, independentemente de ter sido administrada no momento do diagnóstico juntamente com RT ou como tratamento de recidiva. A sobrevida média para aqueles que receberam QT e RT entre os doentes com o promotor MGMT metilado foi quase o dobro, em comparação com o grupo não-metilado (Lee *et al.*, 2018).

Esses estudos apoiam o teste do *status* do MGMT como padrão de tratamento, particularmente entre doentes mais idosos, onde isso pode afetar a decisão de tratamento. No entanto, parece ser um teste altamente subutilizado, pois apenas uma pequena percentagem dos doentes em meio hospitalar são testados para esta metilação (Lee *et al.*, 2018).

O EGFR é uma característica molecular comum do GBM e promove um sinal pró-proliferativo. O EGFR em 7p12 é o gene mais amplificado e mais expresso em GBM primário (30% -70%) com EGFRvIII sendo o recetor de tirosina cinase mais mutado em GBM, ocorrendo em aproximadamente 50% dos casos de GBM que sobreexpressam EGFR (McNamara *et al.*, 2013).

O EGFRvIII ativa constitutivamente a via do EGFR-PI3K e foi verificado que os GBMs que possuem recetores EGFRvIII constitutivamente ativos apresentam um fenótipo mais

invasivo do que aqueles com EGFR-*wildtype*. Contudo a eficácia dos inibidores de EGFR permanece controversa em GBM recém-diagnosticado. Embora a utilização preditiva e prognóstica do EGFR continue a ser estudada, foi relatado que doentes de GBM tratados com temozolomida e que tinham amplificação de EGFR, manutenção de PTEN e p53 e p16 *wildtype* eram fortes indicadores de prognóstico na sobrevida global (McNamara *et al.*, 2013).

Para todos os gliomas, os doentes portadores de mutações IDH parecem ter uma vantagem prognóstica em comparação com doentes sem mutações IDH. Especificamente, um estudo de Jansen *et al.*, relatou que mutações somáticas estavam presentes em 12% dos GBMs e pareciam correlacionar-se com o aumento da sobrevida. A sobrevida global em doentes com mutações IDH foi de 31 meses em comparação com 15 meses naqueles sem mutações IDH. Apesar da IDH ser uma ferramenta útil de prognóstico, atualmente não parece ser capaz de prever a capacidade de resposta a um tipo específico de terapia (McNamara *et al.*, 2013).

Os resultados de outra análise demonstraram, também, uma vantagem feminina na sobrevivência entre os doentes com glioblastoma que receberam tratamento *standard*. Dentro de um subconjunto IDH-*wildtype*, a vantagem de sobrevivência feminina permaneceu. Os resultados desta análise sugerem que a vantagem de sobrevivência feminina no glioblastoma é independente do status de tratamento, idade ou IDH1/2. Contudo, estes são resultados preliminares e será necessária uma investigação mais profunda das características e potenciais fatores específicos do sexo para determinar a causa da vantagem de sobrevivência feminina observada (Ostrom *et al.*, 2018).

A neovascularização é uma característica neuropatológica em gliomas de alto grau e os fatores angiogênicos podem desempenhar um papel importante na progressão tumoral maligna. O VEGF é considerado o fator determinante da angiogênese e foi identificado em 64,1% dos GBMs, e uma forte correlação entre a expressão do VEGF e a sobrevida tem sido relatada, indicando que o VEGF é um potencial fator prognóstico em doentes com gliomas (McNamara *et al.*, 2013).

A citocromo c oxidase (CcO) é a enzima terminal da cadeia respiratória mitocondrial (cadeia de transporte de elétrons) que catalisa a transferência de elétrons do citocromo c para o oxigênio. Um recente estudo de 84 doentes com GBM relatou que a sobrevida mediana para doentes com tumor com baixos valores de CcO foi de 14,3 meses, em comparação com 6,3 meses para doentes com alta atividade de CcO no tumor. Constatou-se que a alta atividade da CcO é um preditor independente de resultados maus e pode no futuro se tornar um marcador molecular útil no desenvolvimento de terapia direcionada (McNamara *et al.*, 2013).

Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA não-codificadoras, com aproximadamente 21 a 25 nucleótidos de comprimento. A desregulação dos miRNAs tem sido implicada no GBM com relatos da sua associação com a resistência adquirida à temozolomida e que os miRNAs podem desempenhar um papel nas propriedades das células estaminais cancerígenas que contribuem para a resistência ao tratamento (McNamara *et al.*, 2013).

Os miRNAs podem ser marcadores biológicos putativos para o diagnóstico e alvos possivelmente promissores para o tratamento de GBM no futuro através do estabelecimento de terapias direcionadas a miRNA em GBM resistente à temozolomida. Estudos *in vitro* revelaram que a exposição crónica a temozolomida da linhagem celular humana de GBM D54MG resultou em resistência adquirida à temozolomida e expressão elevada de miRNA-21. O tratamento concomitante com um inibidor de miRNA-21 e temozolomida resultou numa taxa de apoptose significativamente mais elevada do que a temozolomida em monoterapia. Foi postulado que o miRNA-21 pode ter potencial para uso como um biomarcador de resistência adquirida à temozolomida e ser um potencial adjuvante no tratamento de GBM resistente à temozolomida. Todos esses relatórios são investigacionais e estudos adicionais em grandes populações de amostras de tumores GBM são necessários antes da aplicação ao cenário clínico geral (McNamara *et al.*, 2013).

A vimentina é uma proteína de 57 kDa da família IF que existe principalmente no citoplasma das células mesenquimais para manter a integridade tecidual e a cito-arquitetura (Franke *et al.*, 1982).

Foi identificada como um biomarcador não apenas para o grau histológico, mas também para o *outcome* de doentes com glioma de alto grau. Foi descrito que a expressão de vimentina é maior em gliomas de grau elevado em comparação com amostras de baixo grau. Doentes com glioma com altos níveis de expressão de vimentina apresentaram pior sobrevida global do que com baixa expressão de vimentina. Análises indicaram que a vimentina era um fator de prognóstico independente em doentes com glioma de alto grau. Isto sugere que a vimentina desempenha um papel importante na classificação molecular do glioma e pode servir como um preditor para o tratamento do glioma (Lin *et al.*, 2016).

Também foi identificado que os doentes com glioblastoma com baixa expressão de vimentina tiveram uma melhor resposta à terapia com temozolomida (Sun *et al.*, 2012).

A temozolomida (TMZ) é o principal fármaco antineoplásico padrão para doentes de glioblastoma. Embora os benefícios clínicos tenham sido observados com o tratamento com TMZ, os resultados dos doentes ainda são escassos visto a alta frequência de resistência aos

medicamentos. Pesquisas identificaram que a vimentina estava envolvida no estabelecimento da resistência à TMZ. A regulação positiva da expressão da vimentina, foi observada na exposição a longo prazo à TMZ. Dados indicam que a expressão de vimentina tem associação com a eficácia da quimioterapia com TMZ. A baixa expressão de vimentina está relacionada com uma resposta melhor à TMZ em comparação com o grupo de alta expressão. No entanto, os mecanismos de como a vimentina responde ao tratamento com TMZ em doentes com GBM primário ainda não são claros (Lin *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2012).

### 1.7. Novas Estratégias de Tratamento

Nos últimos anos, o conhecimento da biologia do glioblastoma cresceu significativamente como resultado dos esforços em larga escala para a descoberta do seu perfil molecular. O glioblastoma foi selecionado como um dos primeiros 3 cânceros a ser sequenciado pelo *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e é agora um dos cânceros cujo genoma é mais estudado e sequenciado. Estes esforços resultaram na identificação de fatores moleculares importantes no prognóstico e vulnerabilidades moleculares que poderão ser potenciais alvos no desenvolvimento de novos tratamentos. Contudo até à data o conhecimento dos fundamentos moleculares do glioblastoma ultrapassa em larga escala o desenvolvimento de novas terapias. Muitos alvos foram identificados, mas poucas terapias demonstraram eficácia e nenhuma foi aprovada, salientando a necessidade de um melhor conhecimento dos mecanismos de resistência deste tipo de tumor e a razão pela qual os ensaios clínicos falham (Weathers *et al.*, 2017).

Muito se aprendeu sobre as vias de sinalização que estão interrompidas em GBM e este conhecimento está atualmente a ser aplicado no desenvolvimento de terapias medicamentosas direcionadas na esperança de encontrar um tratamento eficaz. Apesar do esclarecimento de muitos detalhes definindo subgrupos moleculares de GBM e da identificação de múltiplos alvos terapêuticos promissores, a eficácia clínica dos esforços direcionados de terapia em GBM permanece decepcionante. Os motivos para essas falhas são muitos, incluindo entre outros: falta de dependência do tumor em relação ao alvo proposto, falha na adequação da penetração no SNC dos fármacos através da BBB, falha da inibição adequada do alvo dos fármacos que penetram no SNC, heterogeneidade intratumoral, evolução clonal e escape do antigénio nos casos em que a inibição do alvo é eficaz (Chen *et al.*, 2016; Miller *et al.*, 2016).

Os fármacos candidatos precisam penetrar no SNC e é difícil encontrar compostos que atravessem adequadamente a BBB de forma a alcançar concentrações terapêuticas. Por essa

mesma razão, em muitos dos ensaios clínicos falhados não ficou claro se a falha do fármaco estava relacionada com a penetração da BBB ou com o mecanismo de ação. Para evitar isso, é necessário adotar uma abordagem diferente nos ensaios clínicos de forma a que sejam extensamente avaliados, como por exemplo o grau de permeabilidade do fármaco a testar na BBB (Miller *et al.*, 2016).

Análises de mutação sequenciais, incluindo os gliomas inicialmente apresentados e cada sucessiva recorrência, sugerem que a cirurgia e a quimioterapia exercem fortes pressões evolutivas sobre os tumores para selecionar vias alternativas de progressão maligna. Foi descoberto que mutações presentes num tumor na apresentação inicial, eram frequentemente substituídas por outras na recorrência que não faziam parte do tumor original. Embora a heterogeneidade do tumor também possa estar relacionada com a natureza variável das células estaminais de glioma, ou aos diferentes estádios de evolução celular, vários estudos sugerem que existem múltiplos subclones num único tumor. Sendo que cada um evolui de maneira diferente, dependendo do stress extracelular e de eventos genéticos aleatórios. Apesar da heterogeneidade tumoral não ser um problema exclusivo ao glioblastoma, enquanto outros tipos de cancro foram tratados de forma eficaz com agentes direcionados, isso ainda não foi realizado no GBM. Poderá ser também necessário recorrer a estratégias politerapêuticas, onde a combinação de terapias poderá ser superior à monoterapia (Chen *et al.*, 2016; Miller *et al.*, 2016; Weathers *et al.*, 2017).

Contudo também ainda não foi possível esclarecer se a falha está relacionada à falta de um alvo claro ou a alguma outra propriedade inerente dos GBM. O facto de estudos clínicos de terapias direcionadas poderem incluírem tumores com alterações moleculares, prognósticos e biologia subjacente, significativamente diferentes, poderá estar a diluir a capacidade de verificar os efeitos dos tratamentos recorrente (Chen *et al.*, 2016).

Aceite a dificuldade que é a heterogeneidade deste tipo de tumores, outra questão que se torna cada vez mais visível, é a necessidade de uma abordagem individualizada e personalizada para o uso direcionado dos fármacos, já que os tumores variam muito entre doentes, assim como no mesmo doente ao longo do tempo, face às pressões a que está exposto. Torna-se cada vez mais necessária uma avaliação e caracterização genómica individual dos gliomas para criar essa abordagem personalizada. Meios de amostragem mais precisos, mais rápidos e económicos, ou métodos de deteção de marcadores ou assinaturas moleculares, poderiam permitir uma deteção precoce da doença e um melhor controlo da evolução da mesma ao longo do tratamento (Miller *et al.*, 2016).

Além disso, existem algumas evidências de que a terapia *standard* com TMZ pode induzir um fenótipo hipermutado em alguns tumores. Essas dificuldades somam-se à ideia de que é necessária uma abordagem diferente em ensaios clínicos de fase inicial para uma melhor avaliação da farmacodinâmica e da atividade de inibição dos fármacos, nos definidos subtipos moleculares tumorais, antes de prosseguir para estudos mais avançados. (Chen *et al.*, 2016)

A falha de testes com um único agente, apesar dos alvos aparentemente promissores, argumenta que uma abordagem de combinação de fármacos pode ser necessária para que agentes direcionados afetem significativamente a sobrevida na doença. As vias de sinalização que estão a ser direcionadas poderão estar sobrepostas e ser interdependentes, e, certamente, a inibição de uma via poderá levar à regulação positiva de outras. Assim, uma abordagem cuidadosa para selecionar tanto os alvos corretos quanto a consideração dos regimes de combinação sinérgica é crucial para evitar o desenvolvimento de mecanismos de resistência (Miller *et al.*, 2016).

Desenvolver compostos direcionados que consigam penetrar no cérebro e combiná-los com outros agentes (mais ou menos direcionados) provavelmente produzirão melhores resultados, particularmente se forem apoiados em dados pré-clínicos sólidos, com esquemas de dosagem cientificamente suportados e estabelecidos para maximizar a inibição alvo e que podem ser estudados em doentes em ensaios clínicos que permitem a análise de biomarcadores farmacocinéticos e farmacodinâmicos, de modo a que as medidas tradicionais de resultados possam ser compreendidas num contexto molecular (Cloughesy *et al.*, 2014).

Fatores de crescimento e os respetivos recetores associados a tirosina cinases são frequentemente candidatos fortes a alvos terapêuticos porque muitos são considerados “*driver mutations*” críticas para a oncogénese. Estes recetores são, assim, frequentemente “drogáveis” através do design de inibidores que bloqueiam a ativação da cinase, tendo já esta abordagem produzido resultados bastante satisfatórios em outros tipos de neoplasias (Chen *et al.*, 2016).

A lista de outras terapias direcionadas em estudo é extensa: inibidores farmacológicos da enzima poliadenosina difosfato ribose polimerase (PARP), que interferem com a montagem do fuso mitótico e a regulação do ADN em tumores PTEN-deficientes e inibidores NF-kB e STAT3, que visam os marcadores de sinalização intimamente envolvidos no GBM cujos papéis exatos ainda estão sendo estudados, e novos alvos do mecanismo dos inibidores da rapamicina (MTOR) estão todos em estudo. Além disso, também surgiram estratégias imunoterapêuticas avançadas, mas sem sucesso significativo (Cihoric *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, um melhor conhecimento científico levou ao desenvolvimento de vários fármacos em gliomas, entre eles, os inibidores do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), como o gefitinib e o erlotinib, inibidores de integrina, tais como cilengitide, e inibidores da tirosina cinase, tais como o imatinib. Esses agentes ainda não demonstraram fornecer um benefício terapêutico (Schneider *et al.*, 2010).

A falha das terapias em atingir resultados adequados com toxicidade mínima levou à investigação de outras modalidades, como campos de tratamento de tumores (TTFs, *tumor treating fields*) (Optune®, Novocure®). Esta é uma nova abordagem, consistindo de um dispositivo que emite campos elétricos alternados que podem interferir com os estágios finais da mitose de células tumorais. Num estudo de fase III, a adição do dispositivo ao protocolo de quimioterapia padrão melhorou a sobrevida geral em doentes com GBM recém-diagnosticado em aproximadamente 3 meses (Miller *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2015).

Este sistema elétrico de superfície que interrompe a formação do fuso mitótico e citocinese, foi aprovado pela FDA para tratamento de GBM recorrente após demonstrar uma vantagem na sobrevivência quando adicionado à quimioterapia padrão e já é utilizada em alguns países da Europa (Chen *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2015).

Aproximadamente há 10 anos atrás, cientistas israelitas postularam que campos elétricos alternados, de baixa intensidade e frequência intermediária (100-300 kHz), distribuídos por meio de matrizes de transdutores isolados, poderiam ser desenhados para interferir na divisão celular e oferecer uma maneira de tratar o cancro. Dois conjuntos de campos elétricos alternados são aplicados ao cérebro através de 4 matrizes de transdutor colocadas no couro cabeludo rapado. À frequência usada no glioblastoma, aproximadamente 200 kHz, os TTFs não estimulam os nervos nem os músculos, nem afetam as células que proliferam no resto do corpo e parecem ter impacto nas células em divisão em vários estágios da mitose. Após o ADN se ter duplicado para duplicar o número de cromossomas, proteínas carregadas, como a tubulina, ajudam a fixar os cromossomas ao fuso mitótico, auxiliando na separação ordenada dos pares de cromossomas nas células-filhas. Os TTFs interferem com as cargas eletrostáticas envolvidas na ligação dessas proteínas ao cromossoma, impedindo a igual divisão do material genético e a carga que é canalizada ao redor da célula em direção aos sulcos de clivagem, prejudica a divisão dos organelos subcelulares, obstruindo a progressão adequada das membranas celulares em duas células-filhas. Este processo parece levar à morte celular via apoptose (Wong *et al.*, 2015).

Esta abordagem foi associada a uma melhoria acentuada na sobrevivência sem declínio na qualidade de vida. Houve melhoria na sobrevida global entre os doentes tratados com

terapia TTFields com temozolomida de manutenção *versus* temozolomida de manutenção isolada. Reduziu o risco de morte em 25%, a taxa de sobrevida em 2 anos foi maior em doentes que receberam terapia temozolomida de manutenção e TTFields, em comparação com a temozolomida de manutenção isoladamente (Wong *et al.*, 2015).

Os efeitos adversos mais frequentemente associados ao tratamento com TTFields foram reações cutâneas, como dermatite, e feridas no local do tratamento (45%), exigindo que as matrizes dos transdutores fossem reposicionadas. Todos os outros efeitos adversos relacionados ao tratamento foram leves e principalmente relacionados à temozolomida. Não houve aumento nos efeitos colaterais neurológicos com a adição da terapia com TTFields (Wong *et al.*, 2015).

Foram testadas também placas de polímero impregnadas de carmustina, Gliadel®, utilizadas para tratamento localizado, aplicadas no local do tumor após ressecção, em meio cirúrgico. A eficácia da utilização destas foi testada em ensaios clínicos onde não se conseguiu verificar um aumento significativo da sobrevida. A percentagem de penetração da carmustina através do polímero foi pequena (0,5 cm), pois esta tem uma elevada permeabilidade transvascular e, por isso, é facilmente absorvida pela circulação sistémica. As moléculas de carmustina, sendo lipossolúveis e bastante permeáveis, entram na corrente sanguínea antes de conseguirem migrar até mais longe. Aliado ao pequeno tempo de meia-vida da carmustina (1,5 horas), a pequena distância de penetração limita a eficácia da terapia (Nishikawa *et al.*, 2010).

Com o aumento do conhecimento e, como tal, da classificação molecular do GBM em um número de subgrupos e sua aplicação à prática clínica, um maior entendimento das razões para diferentes desfechos e o potencial de terapia individualizada dirigida pelo paciente continuará a evoluir. A análise genotípica provavelmente tornar-se-á parte do tratamento clínico padrão e é importante que todos os estudos futuros incorporem análises de assinaturas tanto genéticas quanto histopatológicas para permitir uma maior avaliação da patogénese do GBM e permitir um desenvolvimento de terapias direcionadas mais informadas. Contudo, transformar o tratamento de doentes com GBM exigirá uma cooperação extraordinária entre investigadores e clínicos (Cloughesy *et al.*, 2014; McNamara *et al.*, 2013).

Em vez de iniciar mais tentativas sem seleção, os pacientes com glioblastoma (primário e recorrente) devem ser incluídos em estudos de fase inicial onde a seleção do doente é baseada no perfil genómico do tumor e não na classificação histológica clássica ou anatómica. A pesquisa contínua provavelmente não levará ao desenvolvimento de um único tipo de tratamento que seja ideal para todos os pacientes. Em vez disso, as melhorias futuras

provavelmente envolverão uma terapia individualizada baseada nas propriedades moleculares dos tumores que serão tratados (Cihoric *et al.*, 2017; Schneider *et al.*, 2010).

Os quatro subgrupos moleculares que foram caracterizados no glioblastoma deveriam ser utilizados numa personalização do tratamento para cada subgrupo. As características de cada subtipo, a influência que estas têm na forma como as células reagem ao tratamento, e o impacto que isto tem no prognóstico de cada doente é de extrema importância para a melhoria e desenvolvimento de ensaios clínicos mais exatos. Esta classificação poderá aumentar a eficácia na descoberta de quais os tratamentos, ou as vias de tratamento, que serão mais ou menos eficazes consoante as características moleculares de cada tumor (Weathers *et al.*, 2017). O desafio prende-se com a identificação de quais terapias irão funcionar em cada um dos grupos. Apesar do sistema de classificação dos glioblastomas em subgrupos fornecer conhecimento sobre a heterogeneidade associada à doença, esta classificação não tem ainda papel na decisão clínica, assim como também não há atualmente distinção de subtipo nos tratamentos existentes (Weathers *et al.*, 2017).

## 2. Metodologia e Objetivo

Para a análise de dados nesta monografia foram analisados dados de processos clínicos de doentes adultos do Centro Hospitalar Universitário do Algarve – Hospital de Faro com diagnóstico de glioblastoma no período de Junho de 2008 a Junho de 2010 e no período de Janeiro de 2014 e Junho de 2016. Os dados utilizados referentes aos anos de 2014 a 2016 foram cedidos pela Dr.<sup>a</sup> Tânia Madureira, médica interna do Serviço de Oncologia do Centro Hospitalar do Algarve.

Foram analisados dados de identificação, diagnóstico e terapêutica de doentes com diagnóstico de glioblastoma dos processos clínicos dos doentes Centro Hospitalar Universitário do Algarve:

- Sexo
- Idade à data de diagnóstico
- Data de diagnóstico
- Biopsia
- Marcadores imunológicos analisados (ki67, p53, GFAP, VIMEN)
- Topografia da neoplasia
- Tipo de tratamento instituído
- Estado após tratamento
- Data de óbito
- Situação do Caso

O objetivo deste estudo é a análise comparativa dos dados de diagnóstico e tratamento nos dois períodos de tempo.

### 3. Análise dos Dados

#### 3.1. Caracterização da População

Os tumores cerebrais são raros em comparação com outro tipo de doenças, no entanto essa raridade é relativa. Durante o período de 1 de Junho de 2008 a 30 de Julho de 2010 foram internados ou diagnosticados, no Centro Hospitalar Universitário do Algarve, 25 novos doentes com glioblastoma e durante o período de 1 de Janeiro de 2014 a 30 de Junho de 2016, 33 novos doentes, somando assim um total de 58 doentes de glioblastoma nos períodos analisados. O número de novos diagnósticos por ano de glioblastomas encontra-se indicado abaixo na Tab. 3.1.1.

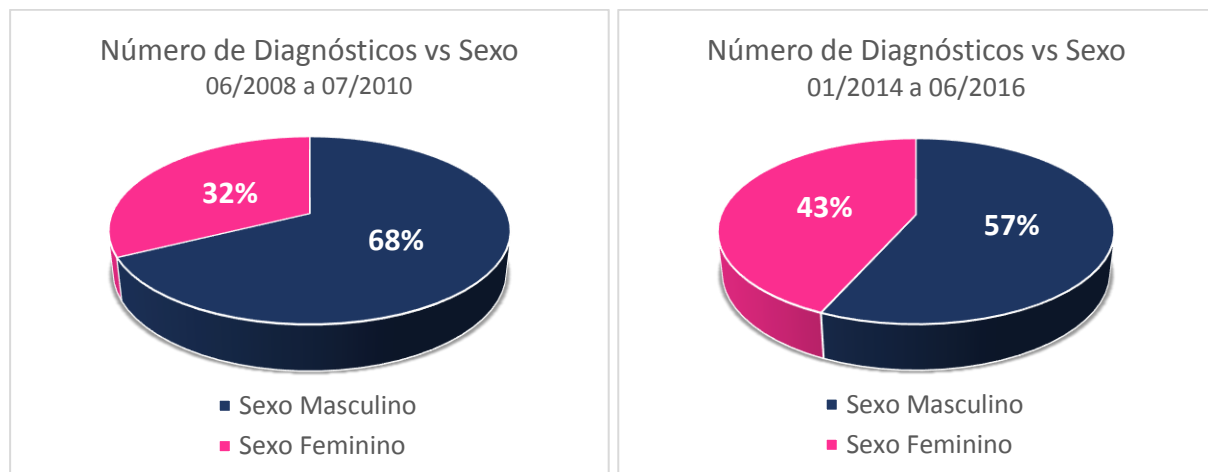
**Tabela 3.1.1** - *Número de novos diagnósticos de glioblastoma nos anos de 2008 (desde 1 de Junho), 2009, 2010 (até ao mês de Julho), 2014, 2015 e 2016 (até ao mês de Junho) no Centro Hospitalar Universitário do Algarve. Encontram-se assinalados com \* os anos em que a contabilização de todos os meses não foi possível.*

Número de diagnósticos	
2008*	11
2009	11
2010*	3
<b>Total</b>	<b>25</b>
2014	16
2015	15
2016*	2
<b>Total</b>	<b>33</b>
<b>Total Global</b>	<b>58</b>

A distribuição de novos diagnósticos, ao longo dos anos em ambos os períodos analisados, pode considerar-se uniforme visto que a variação no número de casos apesar de ligeiramente superior no período mais recente, não obteve um aumento significativo, o que confirma a ideia de que o tumor cerebral é uma doença que não tem por base razões epidemiológicas.

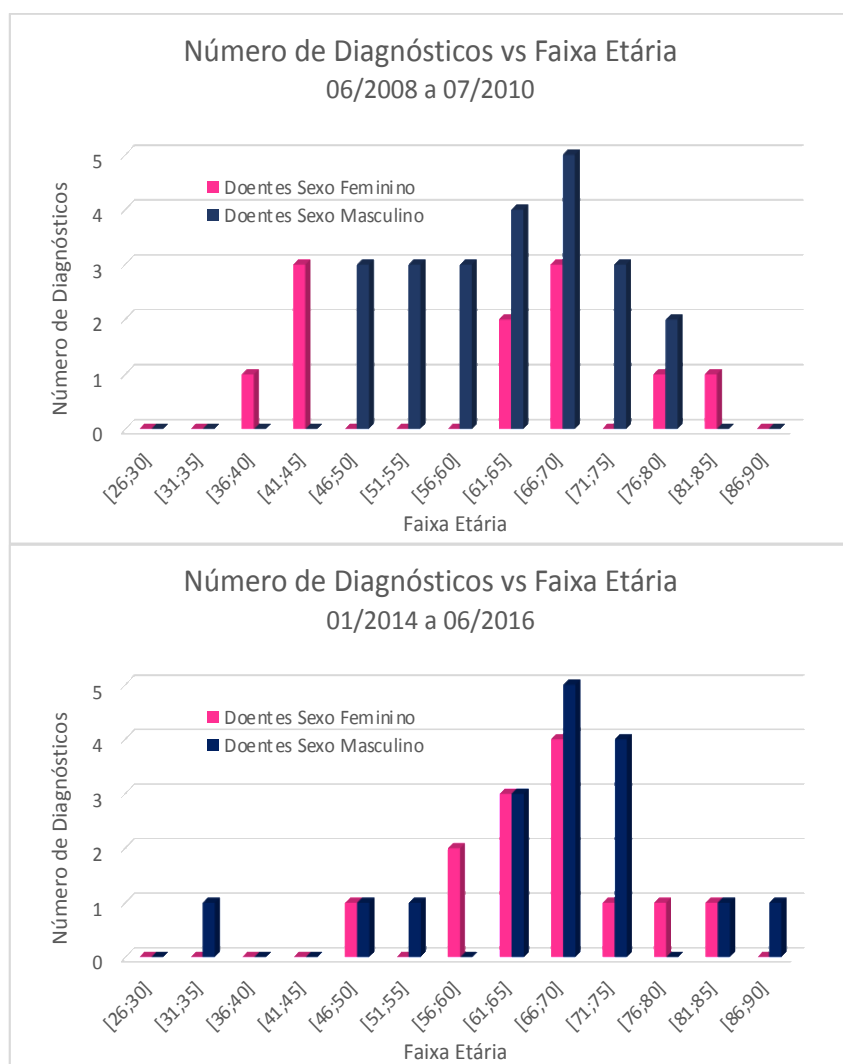
A análise dos dados referentes ao período de 06/2008 a 07/2010 será então referida como primeira análise e a análise dos dados referentes ao período de 01/2014 a 06/2016 será referida como segunda análise, para efeitos de simplificação.

A taxa de incidência encontra-se descrita na literatura como sendo maior no sexo masculino (DeMonte *et al.* 2007), facto que é corroborado pelos dados obtidos descritos na Fig. 3.1.1, i.e. 68% do total de glioblastomas diagnosticados eram de doentes do sexo masculino e 32% do sexo feminino, na primeira análise, e 57% eram de doentes do sexo masculino e 43% do sexo feminino, na segunda análise. Esta incidência foi, contudo, mais expressiva na primeira análise.



**Figura 3.1.1** – Percentagem de doentes do sexo feminino e do sexo masculino com diagnóstico de glioblastoma nos períodos de 06/2008 a 07/2010 e 01/2014 a 06/2016.

Na análise do número de diagnósticos face à faixa etária e sexo do doente, que se encontra descrita na Fig. 3.1.2, contrariamente ao descrito na literatura que descreve um predomínio do sexo masculino (DeMonte *et al.* 2007), existe uma predominância do sexo feminino face ao sexo masculino em três faixas etárias na primeira análise ([36; 40], [41; 45] e [81;85]) e na segunda análise em duas faixas etárias ([56; 60] e [76;80]). Em duas faixas etárias da segunda análise o número de doentes, de ambos os sexos, é igual ([46; 50], [81;85]).



**Figura 3.1.2** – Número de diagnósticos de glioblastoma em função da idade e sexo do doente.

Na primeira análise, em 7 das faixas etárias descritas o sexo masculino é predominante, sendo mesmo os únicos casos descritos em 4 delas. A faixa etária em que o número de casos foi mais significativo foi dos 66 aos 70 anos de idade, e também aí o predomínio do sexo masculino mantém-se com 5 casos face a 3 do sexo feminino.

Na segunda análise, existe predomínio do sexo masculino em apenas 5 das faixas etárias, sendo exclusivo nas faixas etárias [31; 35], [51; 55] e [86; 90] e a faixa etária em que o número de casos foi mais significativo é a mesma que na primeira análise, [66; 70], com uma menor expressão na predominância do sexo masculino, 5 casos face a 4 casos do sexo feminino.

Na primeira análise o número de casos do sexo masculino foi 23 face a 11 do sexo feminino, na segunda análise o número de casos do sexo masculino foi de 17 para 13 do sexo

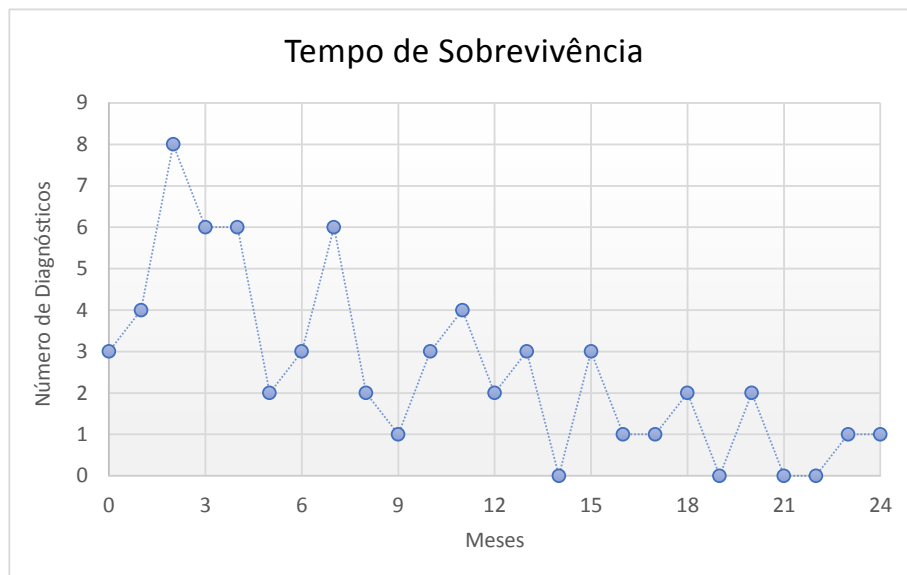
feminino, o que demonstra uma ligeira mudança na anterior tendência de superioridade de casos do sexo masculino.

A média de idades no período de 06/2008 a 07/2010 foi de 67 anos e no período de 01/2014 a 06/2016 de 62 anos, o que demonstra um ligeiro decréscimo na idade média de aparecimento ou diagnóstico da doença.

### 3.2. Diagnóstico

É muito comum em tratamentos oncológicos utilizar-se a expressão de que “cada caso é um caso”, visto a heterogeneidade tumoral e a resposta de cada doente ao tratamento ser tão única como difícil de prever. Contudo, um ponto essencial e extremamente importante ao estabelecer o diagnóstico de um doente com glioblastoma é a confirmação da histologia do tumor. A realização de uma biópsia, é por isso, decisiva para conhecer a morfologia deste. Contudo, nem sempre é possível que esta seja realizada. Na maior parte dos casos, devido ao estado clínico do doente ser tão reservado que a realização da biópsia o colocaria em risco, ou então devido ao falecimento do doente antes que esta pudesse ser realizada.

Uma característica dos glioblastomas é possuírem uma taxa de sobrevivência bastante baixa. Foi feita uma análise do tempo de sobrevivência dos doentes de ambos os períodos de análise cuja representação se encontra descrita na Fig. 3.2.1.



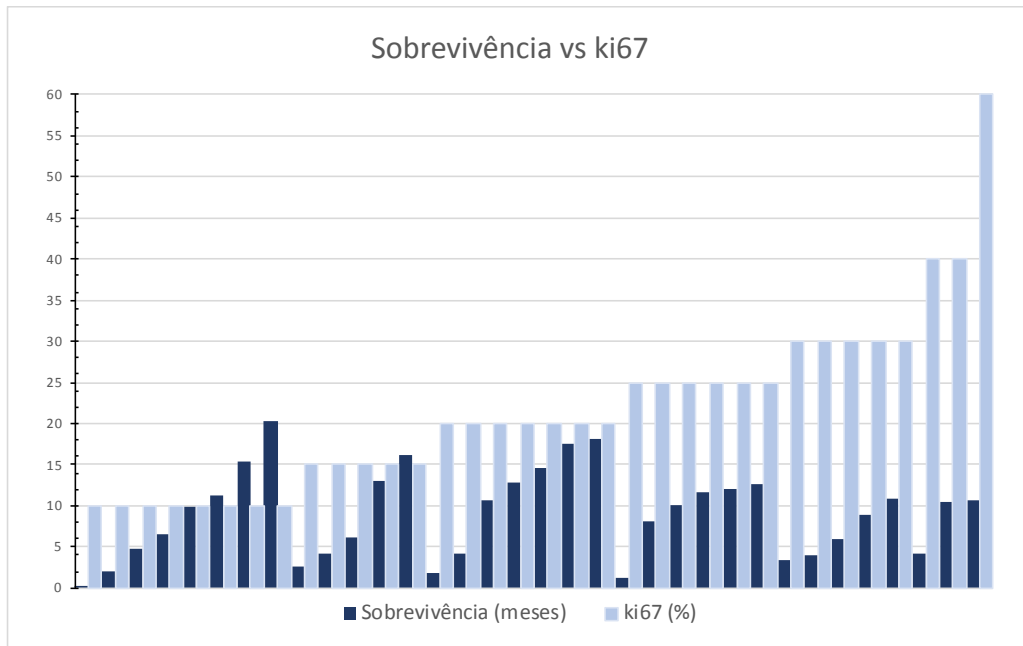
**Figura 3.2.1** - Tempo de sobrevivência em meses dos doentes com diagnóstico de glioblastoma após data de diagnóstico.

Dos 58 processos analisados, apenas 14 doentes sobreviveram mais de 12 meses, 4 doentes mais de 18 meses e apenas 1 chegou aos 24 meses. A maioria dos diagnósticos apresenta uma sobrevivência de apenas 2 meses e 3 doentes tiveram um tempo de sobrevida inferior a 1 mês. Estes dados vão ao encontro dos dados conhecidos sobre este tipo de tumores que os descrevem como tumores de elevada mortalidade e tempo de sobrevivência muito reduzido. Visto ser um tumor de rápida progressão, é de esperar que o tempo de sobrevivência médio dos doentes seja baixo e que a percentagem de sobrevida decresça com o passar do tempo.

Na primeira análise, o teste a marcadores tumorais não era prática comum no estabelecimento de diagnóstico, só foi encontrada referência ao marcador p53 em alguns relatórios de biópsia. Isto é, após resseção cirúrgica a amostra do tumor era enviada para análise em laboratório patológico e aí entre várias análises realizadas para determinação do tipo histológico do tumor também, por vezes, era possível realizar a expressão do marcador p53. Do total de 30 processos analisados apenas 10 apresentavam teste a p53, sendo que 2 eram p53 positivo e 8 negativo.

Na segunda análise o teste a marcadores já é mais utilizado, sendo feitos testes imunohistoquímicos a ki67, p53, GFAP e VIMEN. O marcador de índice proliferativo ki67 foi analisado nas peças operatórias, isto é, no tecido extraído em biópsia e os resultados da sua expressão face ao tempo de sobrevivência dos doentes encontra-se representado no gráfico abaixo.

As baixas taxas de sobrevivência são também reflexo da alta agressividade e taxa de proliferação deste tipo de tumores. O marcador ki67 reflete isso mesmo, o índice de proliferação destas células, e como tal foi feita uma comparação dos seus valores com a sobrevivência dos doentes no gráfico da Fig. 3.2.2.



**Figura 3.2.2** – Representação gráfica da expressão do marcador de índice proliferativo ki67 face ao tempo de sobrevivência expresso em meses, dos doentes com diagnóstico de glioblastoma no período de 01/2014 a 06/2016.

Foi encontrado um pico de expressão a 60%, contudo este não correspondeu a um diagnóstico de um doente que tenha tido uma sobrevivência menor. Todos os diagnósticos apresentaram expressão de ki67  $\geq 10\%$ , 21 diagnósticos apresentaram ki67  $\geq 20\%$ , 8 diagnósticos ki67  $\geq 30\%$  e 3 diagnósticos ki67  $\geq 40\%$ , o que está de acordo com a indicação que estes são todos tumores bastante agressivos e de proliferação rápida. Foi encontrada uma tendência na expressão de ki67 face ao tempo de sobrevivência dos doentes, onde verificamos que com o aumento da expressão de ki67 ocorre uma diminuição do número de doentes com um maior tempo de sobrevivência. Onde a expressão de ki67 é maior o tempo máximo de sobrevivência encontrado foi de 11 meses.

### 3.3. Tratamento

As baixas taxas de sobrevivência também refletem a incapacidade curativa dos tratamentos instituídos. Verifica-se que apenas uma pequena percentagem dos doentes tem uma resposta suficientemente positiva ao tratamento para que este se reflita num tempo de sobrevivência maior que 12 meses.

Outra razão que contribui para a reduzida taxa e tempo de sobrevivência é o facto de os doentes muitas vezes ignorarem sintomas indicativos de tumor cerebral por os associarem a

outras causas benignas. Normalmente, a maioria dos doentes só procura ajuda médica quando estes sintomas se tornam agudos e aí a condição clínica já se encontra deteriorada, diminuindo a taxa de eficácia dos tratamentos.

Foi analisado o tipo de tratamento instituído aos doentes, se realizaram cirurgia, protocolo Stupp, se completaram ou não o mesmo, nos dois períodos de análise, tendo-se obtido os resultados apresentados na Tab. 3.3.1 abaixo:

**Tabela 3.3.1** - *Número de doentes com diagnóstico de glioblastoma que realizaram cirurgia e protocolo Stupp, se concluíram este protocolo, o número de óbitos e o número total de diagnósticos analisados nos períodos de 06/2008 a 07/2010 e 01/2014 a 06/2016..*

	Cirurgia	Protocolo Stupp	Completo Protocolo Stupp	Não Completo Protocolo Stupp	Óbitos	Total Diagnósticos
06/2008 – 07/2010	18	11	4	7	26	30
01/2014 – 06/2016	27	25	7	18	10	34

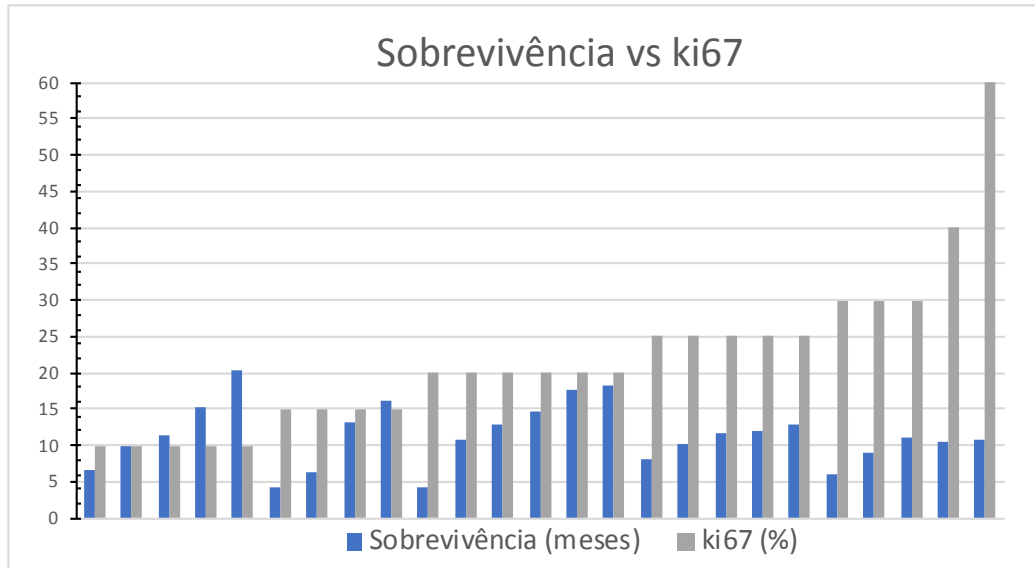
Alguns dos doentes que não realizaram nenhum tipo de tratamento, nem cirurgia nem protocolo Stupp, deve-se em muitos dos casos ao falecimento do doente antes do início do tratamento. Contudo ainda existem alguns casos de recusa dos doentes ou das suas famílias aos tratamentos.

Este é outro ponto de importante quando se fala glioblastomas, uma vez que os tratamentos existentes não dão garantia de cura e os seus efeitos secundários são bastante danosos, a escolha que normalmente se coloca ao doente é ou fazer o tratamento que oferece um possível prolongamento do tempo de vida, com a esperança de uma estabilização da condição médica, e suportar os efeitos secundários que esta acarreta, ou não realizar o tratamento e fazer apenas em casa uma gestão dos sintomas através de fármacos. Apesar das vantagens oferecidas pelos tratamentos disponíveis, muitos são os que os recusam. Isto associado ao facto de grande parte dos doentes de glioblastoma ter uma idade avançada, ainda faz com que a aderência à terapêutica e aos tratamentos disponíveis seja menor.

O protocolo utilizado no tratamento de doentes de glioblastoma no Centro Hospitalar Universitário do Algarve – Hospital de Faro é o protocolo Stupp, como indicado nas recomendações da OMS para este tipo de tumores. Este consiste numa primeira fase concomitante de radioterapia e quimioterapia com a duração de 42 dias, seguida de um 1º

ciclo de quimioterapia com a duração de 5 dias, quatro semanas após o término da radioterapia, e de um 2º a 6º ciclos de quimioterapia, de quatro em quatro semanas, com a duração de 5 dias. O agente de quimioterapia utilizado durante este protocolo é a temozolamida, sendo que a dosagem para a fase concomitante é de 75 mg/m<sup>2</sup>/dia, para o 1º ciclo 150 mg/m<sup>2</sup>/dia e para os 2º a 6º ciclos 200 mg/m<sup>2</sup>/dia, embora estas quantidades possam ser alteradas se assim se justificar. Podem também ser prescritos outros fármacos durante este protocolo para ajudar o doente a suportar alguns dos efeitos secundários da radio e quimioterapia, sendo os mais comuns o ondansetron, para controlo das náuseas e vômitos, dexametasona, como anti-inflamatório e imunossupressor, e o pantoprazol, por ser um inibidor da bomba de prótons para controlo da acidez gástrica. A radioterapia é administrada em clínicas especializadas neste tipo de tratamento e a dose de radiação é adaptada ao local e tipo de tumor.

Foram então analisados apenas os diagnósticos dos doentes que completaram o protocolo Stupp no segundo período de análise de forma a aferir se existia alguma correlação entre os marcadores utilizados para o diagnóstico e a resposta dos doentes ao tratamento. No total foram analisados 25 processos clínicos.



**Figura 3.3.1** - Representação gráfica da expressão do marcador de índice proliferativo ki67 face ao tempo de sobrevivência expresso em meses, dos doentes com diagnóstico de glioblastoma que completaram protocolo Stupp no período de 01/2014 a 06/2016.

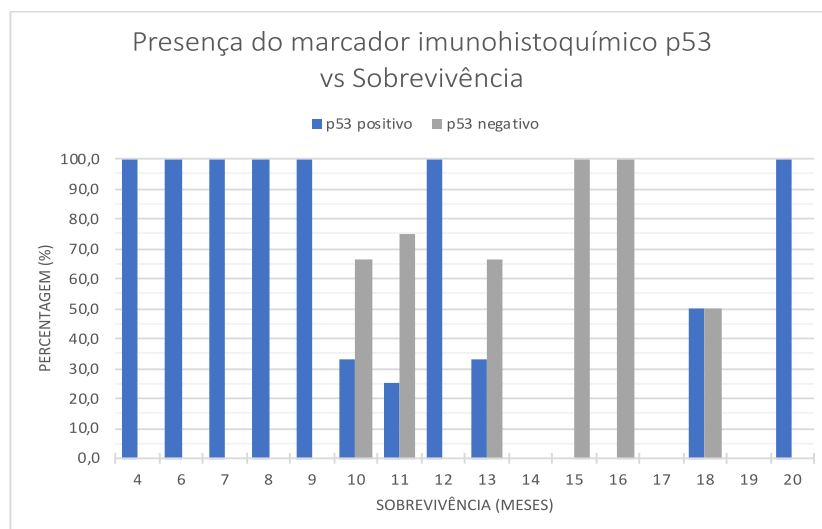
Verificou-se que a percentagem da expressão do marcador ki67, representada na Fig. 3.3.1, era mais baixa nos doentes que sobreviveram maiores períodos de tempo, p.ex.

ki67=10% para uma sobrevivência de 20 meses. Já nos doentes em que a expressão de ki67 era mais elevada a sobrevivência máxima verificada foi de 11 meses.

Estes dados estão de acordo com a literatura, visto o ki67 ser um marcador do índice proliferativo das células. Assim doentes com células com uma maior capacidade de proliferação têm uma resposta mais baixa ao tratamento, e como tal, um menor período de sobrevida.

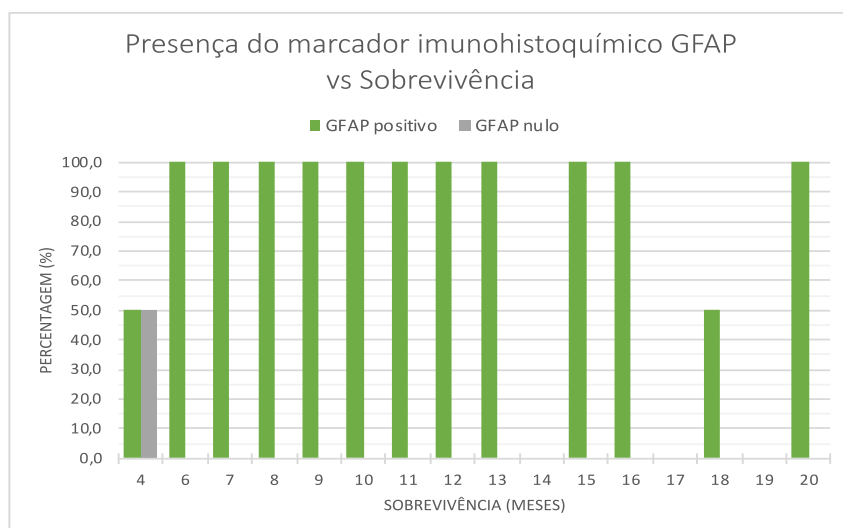
Dos 25 processos clínicos analisados 56% eram positivos para a presença do marcador p53 e 44% negativos. Ao ser feita a análise da percentagem de diagnósticos positivos e negativos para o marcador face ao tempo de sobrevivência do doente não se verificou nenhuma tendência significativa. Esta análise encontra-se descrita na Fig. 3.3.2.

A maioria dos doentes era p53 positivo e a presença negativa deste marcador só se verificou em doentes que sobreviveram mais de 10 meses. Contudo os valores são poucos para se poder considerar uma tendência.



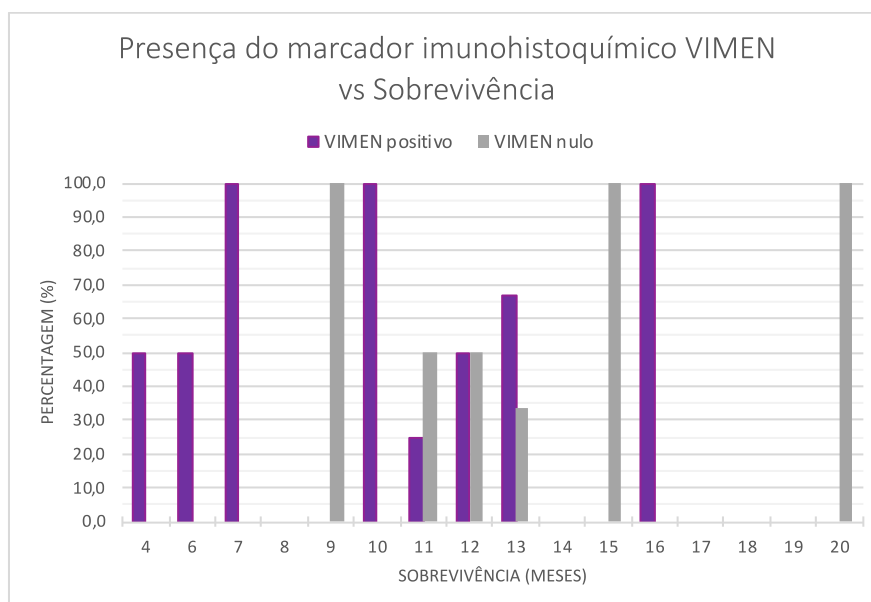
**Figura 3.3.2** – Representação gráfica da percentagem de doentes, com diagnóstico de glioblastoma e protocolo Stupp concluído, que apresentaram expressão do marcador p53 face ao tempo de sobrevivência expresso em meses, no período de 01/2014 a 06/2016.

Dos 25 processos clínicos analisados 92% eram GFAP positivo e 4% GFAP nulo. Todos os doentes apresentaram positividade para a presença do marcador GFAP, exceto num cujo doente teve uma sobrevida de 4 meses e que o teste do marcador foi negativo e num de um doente que teve uma sobrevida de 18 meses e que o resultado do teste foi inconclusivo. Os resultados encontram-se apresentados na Fig. 3.3.3.



**Figura 3.3.3** – Representação gráfica da percentagem de doentes, com diagnóstico de glioblastoma e protocolo Stupp concluído, que apresentaram expressão do marcador GFAP face ao tempo de sobrevivência expresso em meses, no período de 01/2014 a 06/2016.

Dos 25 processos clínicos analisados 44% tiveram um teste de VIMEN positivo e 32% VIMEN nulo. Destes, 6 doentes não tinham no processo resultados ao teste a este marcador.



**Figura 3.3.4** – Representação gráfica da percentagem de doentes, com diagnóstico de glioblastoma e protocolo Stupp concluído, que apresentaram expressão do marcador VIMEN face ao tempo de sobrevivência expresso em meses, no período de 01/2014 a 06/2016.

Apesar de a quantidade de processos com a análise de VIMEN ser pequena podemos concluir, através da análise da representação gráfica da Fig. 3.3.4., que o doente com maior tempo de sobrevivência (20 meses) tinha o teste ao marcador negativo. E que com o aumento do tempo de sobrevivência a quantidade de diagnósticos com o teste a VIMEN negativo aumenta. Esta conclusão está de acordo com o descrito na literatura que indica que quanto menor a expressão de vimentina melhor a resposta ao tratamento com TMZ.

Em resumo, devido ao número de diagnósticos com resultados de testes a marcadores tumorais no processo clínico ser pequeno, não nos é possível retirar conclusões expressivas sobre se estes realmente têm um efeito no prognóstico destes doentes.

O que podemos verificar é que apesar de existirem vários biomarcadores com valor para o diagnóstico, prognóstico e mesmo para auxiliar na gestão do tratamento do doente, estes não são utilizados na prática clínica frequente. Isto pode ser devido ao facto de muitos ainda não estarem cientificamente validados e extensamente descritos na literatura e, como tal, não integrarem as *guidelines* da prática clínica da gestão deste tipo de doentes. Ou o facto de que se este tipo de testes viesse a integrar a prática comum, na análise imunológica de todos os doentes oncológicos, implicaria um elevado aumento do custo financeiro do tratamento oncológico, e como tal não seria possível ser comportado pelos orçamentos de todos os hospitais. A inexistência de técnicos e laboratórios especializados capacitados para a realização deste tipo de análises nos hospitais, poderá ser também outro fator limitativo.

Contudo, existe uma clara melhoria neste âmbito, quando comparados os dois períodos de tempo analisados. Nos diagnósticos de 06/2008 a 07/2010 o único teste efetuado era à presença da mutação de p53 e nos diagnósticos de 01/14 a 06/2016 já foram executados testes outros marcadores como ki67, GFAP e VIMEN. No entanto, verifica-se que estes são insuficientes para uma completa análise do tumor.

## 4. Conclusão

A precisão médica é uma importante e valiosa característica que as terapias para o tratamento de glioblastomas devem procurar atingir de forma a melhorar o prognóstico destes doentes. A caracterização molecular do glioblastoma foi acentuadamente aperfeiçoada ao longo dos últimos anos, mas a tradução destas no desenvolvimento de terapias direcionadas, resultando em melhores resultados para os doentes, continua a ficar muito aquém.

O desafio de uma terapia direcionada e personalizada em glioblastomas é ainda mais complicada pela relativa raridade da doença face a outro tipo de tumores e pelos fracos resultados obtidos nos ensaios clínicos. Apesar dos avanços na terapêutica e no diagnóstico, o prognóstico de GBM continua fraco. Devido à heterogeneidade dos tumores, novas estratégias demonstraram limites clínicos em termos de eficácia e efeitos secundários.

A capacidade de devolver terapias personalizadas em glioblastomas vai requerer esforço, não só no “*profiling*” molecular, mas também dependerá do correto direcionamento da administração dessas terapias a grupos de doentes adequadamente selecionados. Isto é, a integração de fatores como a heterogeneidade da doença, tanto no fator clínico como molecular, no desenvolvimento de novos ensaios clínicos, poderá reforçar o progresso em direção ao desenvolvimento de terapias direcionadas em glioblastoma. Assim sendo, uma classificação dos doentes de GBM baseada na genética, epigenética e dados de perfil transcricional, poderá ser benéfica para a seleção de terapêuticas e na previsão das respostas aos tratamentos. De facto, o progresso na classificação molecular do GBM contribuirá para o desenvolvimento de agentes terapêuticos direcionados mais eficazes, de estratégias multifacetadas e numa melhor previsão dos resultados de cada doente. A tumorigénese do GBM e a sua resistência à quimioterapia é mediada por múltiplos fatores, o que sugere que estratégias multifacetadas/multidirecionais serão possivelmente mais eficientes.

Apesar dos imensos estudos sobre a epigenética do glioblastoma, da extensa análise de amostras tumorais pelo TCGA e dos inúmeros ensaios clínicos para o teste e desenvolvimento de novas terapias farmacológicas para o tratamento de glioblastomas, não foi encontrado nenhum estudo extenso realizado em meio hospitalar deste tipo de doentes. Assim julgo que uma análise concertada num grande centro hospitalar como o Centro Hospitalar Universitário do Algarve, ou até a nível nacional, seria de extrema importância para o conhecimento do comportamento deste tipo de tumores face à terapêutica instituída. Seria de interesse fazer uma análise aos biomarcadores tumorais descritos na literatura, como é o caso do MGMT, IDH, EGFR, entre outros, referidos anteriormente e que são de reconhecida importância no

prognóstico destes doentes, de forma a avaliar a existência ou não de comportamentos ou tendências neste tipo de tumores face à suas características epigenéticas.

## 5. Glossário

**Adjuvante:** um método, fármaco ou tratamento usado em adição a um tratamento primário para aumentar a sua eficácia.

**Afasia:** perda ou alteração da capacidade de falar ou de compreender a linguagem escrita ou falada (PRIBERAM, 2013).

**Anemia:** diminuição da quantidade de glóbulos vermelhos no sangue (PRIBERAM, 2013).

**Angiogénese:** processo de desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes (PRIBERAM, 2013).

**Biomarcador:** substância que pode ser medida e indica a ocorrência de processos biológicos (normais ou patológicos) ou respostas farmacológicas a intervenções terapêuticas; marcador biológico (INFOPÉDIA, 2018).

**Biópsia estereotáxica:** biópsia realizada com sedação do doente e em meio cirúrgico, onde uma agulha é inserida para a recolha da amostra de tecido; procedimento guiado por ressonância magnética ou tomografia computadorizada para ajudar no posicionamento da sonda até atingir o alvo.

**Cefaleia:** dor de cabeça (PRIBERAM, 2013).

**Demência:** enfraquecimento mais ou menos grave das faculdades intelectuais sob a influência de lesões do cérebro; anomalia psíquica ou mental que torna um indivíduo incapaz de governar a sua pessoa e de dirigir os seus bens; alienação mental (INFOPÉDIA, 2018).

**Disfasia:** qualquer dificuldade ou perturbação na fala (INFOPÉDIA, 2018).

**Disnomia:** disfunção da linguagem; incapacidade de nomear pessoas ou objetos.

**Edema:** infiltração de serosidade nos tecidos do organismo, que produz inchaço (INFOPÉDIA, 2018).

**Edema cerebral:** inchaço causado pelo aumento de líquidos intra (dentro das células) e extracelular (fora das células) no cérebro.

**Gliomagénese:** exprime a noção de origem ou produção do glioma.

**Hematopoiéticas:** relativo a hematopoiese; em que há produção de células sanguíneas (PRIBERAM, 2013).

**Hemianopsia:** doença da vista em metade do campo de visão, que geralmente só deixa ver uma parte dos objetos (ex.: hemianopsia completa; hemianopsia parcial) (PRIBERAM, 2013).

**Hemiparesia:** paralisia que atinge um dos lados do corpo (PRIBERAM, 2013).

**Heterozigotia:** indivíduo que possui diferentes alelos para determinado(s) gene(s) (INFOPÉDIA, 2018).

**Hidrocefalia:** aumento excessivo de líquido cefalorraquidiano nos ventrículos cerebrais e que pode ser devida a produção excessiva de líquido cefalorraquidiano, dificuldade de reabsorção de líquido cefalorraquidiano ou bloqueio da circulação do líquido cefalorraquidiano (INFOPÉDIA, 2018).

**Líquido Cefalorraquidiano:** também designado de fluido cefalorraquidiano; ocupa o espaço subaracnoideu (situado entre duas das meninges, a piamáter e a aracnoideia, ao longo de todo o canal raquidiano e no crânio), o canal espinhal e os ventrículos cerebrais (INFOPÉDIA, 2018).

**Metástase:** propagação de uma doença do seu local original para outra localização no corpo.

**Oncogene:** gene mutado que pode transformar uma célula normal numa célula tumoral.

**Paliativo:** tratamento cuja intenção é a de reduzir a dor e aumentar o conforto, em vez de curar (PRIBERAM, 2013).

**Paraparesia:** paralisia leve ou parcial dos membros inferiores ou dos membros superiores, com perda de força muscular (PRIBERAM, 2013).

**Perda Somatossensorial:** perda da comunicação das informações sobre o estado geral do corpo e sobre o meio que o circunda (PRIBERAM, 2013).

**Per os:** via oral.

**Profilaxia:** conjunto das precauções ou medidas que podem ser tomadas para evitar uma doença ou um contágio (PRIBERAM, 2013).

**Prognóstico:** previsão da evolução de uma afeição baseada no tipo de doença e nos sintomas apresentados (INFOPÉDIA, 2018).

**Quadrantanopsia:** cegueira de um dos quadrantes do campo visual (INFOPÉDIA, 2018).

**Recidiva:** reaparecimento de uma doença num indivíduo que já sofreu dela, há mais ou menos tempo, e da qual ficou curado (INFOPÉDIA, 2018).

**Ressecção:** intervenção cirúrgica para extração total ou parcial de um órgão ou de uma neoformação patológica (INFOPÉDIA, 2018).

**Tumefação:** aumento ou inchaço patológico de um órgão, de uma parte do corpo ou de uma estrutura orgânica. Pode ser provocada por edema, por infiltração, por inflamação ou por neoplasia (INFOPÉDIA, 2018).

## 6. Referências Bibliográficas

- Affronti ML, Schneider SM, Herndon JE, Schlundt S, Friedman HS. Adherence to antiemetic guidelines in patients with malignant glioma: a quality improvement project to translate evidence into practice. *Support Care Cancer*. 2014;22(7):1897-905. doi:10.1007/s00520-014-2136-0.
- Batchelor TT, Byrne TN. Supportive care of brain tumor patients. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2006;20(6):1337–61. doi: 10.1016/j.hoc.2006.09.013.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756–60. doi: 10.1038/nature05236.
- Belghali MY, Rais H, M SB, Hazmiri FZ, Khoudri N El, Fakhri A. Glial fibrillary acidic protein, CD34, Ki-67, and p53 immunohistochemistry expression study to estimate the concordance between the morphology and the awarded grades of the brain gliomas. *Clin Cancer Investig J*. 2017;(6):44-50. doi:10.4103/ccij.ccij\_148\_16.
- Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst*; 1998; 90(19): 1473–9.
- Chamberlain MC, Kormanik PA. Practical guidelines for the treatment of malignant gliomas. *West J Med*. 1998;168(2):114-120. Disponível em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1304839&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Chen R, Cohen AL, Colman H. Targeted Therapeutics in Patients With High-Grade Gliomas: Past, Present, and Future. *Curr Treat Options Oncol*. 2016;17(8):42. doi:10.1007/s11864-016-0418-0.
- Chu E, DeVita Jr. VT. *Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual 2017*. Jones & Bartlett Learning. 2016; 409 – 411.
- Cihoric N, Tsikkinis A, Minniti G, Lagerwaard FJ, Herrlinger U, Mathier E, Soldatovic I, Jeremic B, Ghadjar P, Elicin O, Lössl K, Aebersold DM, Belka C, Herrmann E, Niyazi M. Current status and perspectives of interventional clinical trials for glioblastoma -

- analysis of ClinicalTrials.gov. *Radiat Oncol.* 2017;12(1):1. doi:10.1186/s13014-016-0740-5.
- Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:1-25. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130324.
- DeMonte F, Gilbert MR, Mahajan A, McCutcheon IE. *Tumors of the brain and spine.* M.D. Anderson Cancer Care Series, Springer, 2007.
- European Medicines Agency (EMA). Resumo das características do medicamento – Temodal, INN-Temozolamida. [Web Page]. [Consultado em Fevereiro de 2018]. Disponível em: [http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2018/20180528140574/anx\\_140574\\_pt.pdf](http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2018/20180528140574/anx_140574_pt.pdf)
- Filbin MG, Suvà ML. Glioma Genomics and Epigenomics: Arriving at the Start and Knowing it for the First Time. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2016;11(1):497-521. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044208.
- Franke WW, Grund C, Kuhn C, Jackson BW, Illmensee K. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. *Differentiation.* 1982;23(1):43–59.
- Gladson CL, Prayson RA, Liu WM. The pathobiology of glioma tumors. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:33-50. doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102109.
- He J, Liu Y, Zhu T, Zhu J, Dimeco F, Vescovi AL, Heth JA, Muraszko KM, Fan X, Lubman DM. CD90 is identified as a candidate marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays. *Mol. Cell. Proteomics.* 2012; 11(6):M111.010744. doi:10.1074/mcp.M111.010744.
- INFOPÉDIA. Dicionário da Língua Portuguesa. Porto Editora. 2003-2018. Disponível em: <https://www.infopedia.pt/> [consultado a 18-09-2018].
- Lee A, Youssef I, Osborn VW, Safdieh J, Becker DJ, Schreiber D. The utilization of MGMT promoter methylation testing in United States hospitals for glioblastoma and its impact on prognosis. *J Clin Neurosci.* 2018;51:85-90. doi:10.1016/j.jocn.2018.02.009.
- Lee DH, Ryu HW, Won HR, Kwon SH. Advances in epigenetic glioblastoma therapy. *Oncotarget.* 2017;8(11):18577-18589. doi:10.18632/oncotarget.14612.

- Lee KS, Choe G, Nam KH, et al. Immunohistochemical classification of primary and secondary glioblastomas. *Korean J Pathol.* 2013;47(6):541-548. doi:10.4132/KoreanJPathol.2013.47.6.541.
- Lin L, Wang G, Ming J, Meng X, Han B, Sun B, Cai J, Jiang C. Analysis of expression and prognostic significance of vimentin and the response to temozolomide in glioma patients. *Tumor Biol.* 2016;37(11):15333-15339. doi:10.1007/s13277-016-5462-7.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. WHO classification of tumours of the central nervous system, ed 4 Lyon, IARC Press, 2016.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1.
- McNamara M, Sahebjam S, Mason WP. Emerging Biomarkers in Glioblastoma. *Cancers.* 2013; 5(3):103-1119. doi:10.3390/cancers5031103.
- Miller JJ, Wen PY. Emerging targeted therapies for glioma. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2016;21(4):441-452. doi:10.1080/14728214.2016.1257609.
- Nishikawa R. Standard therapy for glioblastoma--a review of where we are. *Neurol Med Chir.* 2010;50(9):713-719. doi:10.2176/nmc.50.713.
- Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(4):764–772. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3002
- Ostrom QT, Rubin JB, Lathia JD, Berens ME, Barnholtz-Sloan JS. Females have the survival advantage in glioblastoma. *Neuro-Oncology.* 2018;20(4):576-577. doi:10.1093/neuonc/noy002.
- Polivka Jr. J, Polivka J, Holubec L, et al. Advances in Experimental Targeted Therapy and Immunotherapy for Patients with Glioblastoma Multiforme. *Anticancer Res.* 2017;37(1):21-33. doi:10.21873/anticancer.11285.
- PRIBERAM. Dicionário de Língua Portuguesa. 2008-2013. Disponível em: <https://dicionario.priberam.org/> [consultado a 18-09-2018].

- RORENO. Registo Oncológico Nacional 2010. Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil - EPE, ed. Porto, 2016. Disponível em [http://www.roreno.com.pt/images/stories/pdfs/ro\\_nacional\\_2010.pdf](http://www.roreno.com.pt/images/stories/pdfs/ro_nacional_2010.pdf)
- Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, Skalej M, Firsching R. Gliomas in adults. *Dtsch Arztebl Int.* 2010;107(45):799-807. doi:10.3238/arztebl.2010.0799.
- Singapore Cancer Network (SCAN) Neuro-Oncology Workgroup. Singapore Cancer Network (SCAN) Guidelines for Systemic Therapy of High-Grade Glioma. *Ann Acad Med Singapore.* 2015;44(10):463-473. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26763064>.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 352(10):987-996. doi: 10.1056/NEJMoa043330
- Sun S, Wong TS, Zhang XQ, Pu JK, Lee NP, Day PJ, Ng GK, Lui WM, Leung GK. Protein alterations associated with temozolomide resistance in subclones of human glioblastoma cell lines. *J Neurooncol.* 2012;107(1):89–100. doi: 10.1007/s11060-011-0729-8.
- Wakimoto H, Tanaka S, Curry WT, et al. Targetable signaling pathway mutations are associated with malignant phenotype in IDH-mutant gliomas. *Clin Cancer Res.* 2014;20(11):2898–909. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3052.
- Weathers SP, Gilbert MR. Advances in treating glioblastoma. *F1000Prime Rep.* 2014;6:46. doi:10.12703/P6-46.
- Weathers SS, Gilbert MR. Toward Personalized Targeted Therapeutics: An Overview. *Neurotherapeutics.* 2017;14(2):256-264. doi:10.1007/s13311-016-0496-5.
- Wong ET, Toms SA, Ahluwalia MS. Technological Advances in the Treatment of Cancer: Combining Modalities to Optimize Outcomes. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2015;13(11):1-18. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26862770>.

## **8. Anexos**

**Tabela 7.1** - Novos casos de tumores malignos registados por grupos etários em 2010 (adaptado de Registo Oncológico Nacional 2010, RORENO).

<b>Idade / Topografia</b>	<b>&lt; 1</b>	<b>1-4</b>	<b>5-9</b>	<b>10-14</b>	<b>15-19</b>	<b>20-24</b>	<b>15-29</b>	<b>30-34</b>	<b>35-39</b>	<b>40-44</b>	<b>45-49</b>	<b>50-54</b>	<b>55-59</b>	<b>60-64</b>	<b>65-69</b>	<b>70-74</b>	<b>75-79</b>	<b>80-84</b>	<b>≥85</b>	<b>Total</b>
<b>Cérebro e SNC</b>	4	10	17	17	13	16	15	21	27	34	40	57	81	86	99	108	72	23	12	752
<b>Total</b>	29	88	80	78	132	219	387	675	1063	1696	2682	3561	4582	5621	6092	6800	6260	4105	2574	46724

**Tabela 7.2** – Taxas de mortalidade por 100.000 pessoas com diagnóstico de tumor maligno, por grupos etários em 2010 (adaptado de Registo Oncológico Nacional 2010, RORENO).

<b>Idade / Topografia</b>	<b>&lt; 1</b>	<b>1-4</b>	<b>5-9</b>	<b>10-14</b>	<b>15-19</b>	<b>20-24</b>	<b>15-29</b>	<b>30-34</b>	<b>35-39</b>	<b>40-44</b>	<b>45-49</b>	<b>50-54</b>	<b>55-59</b>	<b>60-64</b>	<b>65-69</b>	<b>70-74</b>	<b>75-79</b>	<b>80-84</b>	<b>≥85</b>	<b>Total</b>
<b>Cérebro e SNC</b>	2	1,3	0,8	0,4	0,9	1,7	1,2	0,9	2,5	3,6	4,4	8	11,3	11,4	18,3	20,7	26,3	20,8	23,1	7,2
<b>Total</b>	6	2	3	1,6	4,8	7,2	6,6	11,6	26	55,4	103,7	173,9	252,7	360	496	703,8	936,9	1315,4	1782,2	235,7



Centro  
Hospitalar  
Universitário  
do Algarve

*Unidade de Investigação  
Centro de Formação Investigação e Conhecimento*

## DECLARAÇÃO

Para os devidos efeitos, se declara que **Susana Filipa Jordão Viegas**, solicitou autorização para a realização do estudo *“Tumores Cerebrais – Histopatologia e Tratamento de Gliomas”* no Centro Hospitalar do Algarve, EPE, tendo o mesmo sido autorizado pelo Conselho de Administração em 01/02/2018.

Faro, 07 de Março de 2018

Centro de Formação,  
Investigação e Conhecimento

Sérgio Cardoso

Sub-Coordenador do CFIC – Unidade de Faro