

Beatriz Marques Gaspar

Biomarcadores em Gliomas: Conhecimento Atual e Perspetivas Futuras

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Sérgio Paulo Magalhães Simões e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Beatriz Marques Gaspar

Biomarcadores em Gliomas: Conhecimento Atual e Perspetivas Futuras

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pelo Professor Doutor Sérgio Paulo Magalhães Simões e apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Beatriz Marques Gaspar, estudante de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o número de estudante 2010130459, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 05 de julho de 2016.

(Beatriz Marques Gaspar)

ÍNDICE

Lista de Acrónimos	2
Abstract	3
1. Introdução	4
2. Cancro	5
3. Gliomas	6
3.1 Classificação	7
3.2 Diagnóstico e Tratamento	7
4. Biomarcadores	9
4.1 Biomarcadores Atuais em Gliomas	11
4.1.1 Mutação IDH	11
4.1.2 Codeleção 1p/19q	14
4.1.3 Hipermetilação MGMT	15
5. Biomarcadores Circulantes	17
5.1 Células Tumorais Circulantes	18
5.2 Vesículas Extracelulares	21
5.3 Ácidos Nucleicos Associados ao Tumor	23
5.3.1 DNA Circulante	24
5.3.2 RNA Circulante	25
5.3.3 MicroRNA Circulante	25
6. Conclusões e Perspetivas Futuras	27
7. Bibliografia	28
8. Anexos	34

LISTA DE ACRÓNIMOS

aCGH – array Comparative Genomic Hybridization
a-KG – α - cetogluturato
ANc – Ácidos Nucleicos circulantes
CTc – Células Tumorais circulantes
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DNAc – DNA circulante
FISH – Fluorescence In Situ Hybridization
IDH – Isocitrato Desidrogenase
LCR – Líquido Cefalorraquidiano
MGMT – O6 – metilguanina DNA – metiltransferase
MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
miRNA – microRNA
mRNA – RNA mensageiro
NCCN – National Comprehensive Cancer Network
O6-MG – O6-metilguanina
OMS – Organização Mundial de Saúde
PCR – Reacção em Cadeia de Polimerase
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RNA – Ácido Ribonucleico
RNAc – RNA circulante
SNC – Sistema Nervoso Central
TC – Tomografia Computorizada
TEM – Transição Epitélio-Mesenquima
VE – Vesículas Extracelulares

ABSTRACT

Gliomas are subdivided into astrocytoma, oligodendroglioma and oligoastrocytoma based on immunophenotypical similarity to a cell of putative origin. Various molecular aberrations of gliomas such as, the combined loss of chromosome arms 1p and 19q, the presence of isocitrate dehydrogenase (IDH) mutation and MGMT promoter hypermethylation, harbor diagnostic, prognostic, or predictive information. (Kros *et al.*, 2015) The clinical importance of genetic or immunohistochemical biomarkers derived from the resected tumour or biopsy is well established, but repeated sampling of tumour tissue is not always appropriate, and circulating biomarkers are necessary to avoid repeated biopsies. Great efforts have been made to validate biomarkers reflecting the genetic profile of a tumour. In the circulation, such biomarkers include circulating tumour cells, and cell-free nucleic acids that can either circulate freely in the plasma or be packaged into extracellular vesicles. (Westphal e Lamszus, 2015) Inclusion of circulating biomarkers in clinical daily practice is warranted in an effort for more effective prognosis, personalized therapy and therapy monitoring in the future of patients.

RESUMO

Os gliomas são subdivididos em astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas com base na semelhança imunofenotípica da célula que lhe deu origem. Várias alterações moleculares têm sido detetadas em gliomas, tais como a perda combinada dos braços dos cromossomas 1p e 19q, a presença de mutação nos genes que codificam a enzima isocitrato desidrogenase (IDH) e a hipermetilação do promotor do gene MGMT, com valor de diagnóstico, prognóstico e preditivo. (Kros *et al.*, 2015) É conhecida a importância clínica de marcadores genéticos ou imunohistoquímicos derivados da ressecção ou biópsia do tumor mas a recolha frequente de amostras de tecido tumoral não é fácil e os biomarcadores circulantes são necessárias para evitar biópsias repetidas. Têm sido feitos esforços na tentativa de validar biomarcadores que reflitam o perfil genético de um tumor. Na circulação, esses biomarcadores incluem células tumorais e ácidos nucleicos, que podem tanto circular livremente no plasma ou estar inseridos em vesículas extracelulares. (Westphal e Lamszus, 2015) A inclusão de biomarcadores circulantes na prática clínica vem permitir um prognóstico mais efetivo, uma terapia personalizada e a monitorização da terapia dos futuros doentes.

I. INTRODUÇÃO

O cancro é, nos dias de hoje, uma das principais causas de morte no Mundo, constituindo um dos principais problemas de Saúde Pública. (Siegel, Miller e Jemal, 2016)

Os gliomas, por sua vez, são os tumores cerebrais primários mais, frequentes, com uma incidência anual de ~3,5/100 000. (Stupp *et al.*, 2014)

Atualmente, o diagnóstico destes tumores é baseado em estudos de imagem e, para um diagnóstico mais preciso, é requerido tecido tumoral para uma análise histológica. Este tecido é obtido através da biópsia ou ressecção o que representa um risco quando os gliomas estão localizados em zonas de difícil acesso. Para além da dificuldade na recolha de tecido, estas zonas podem apresentar resistência à radio e quimioterapia e pode não ser possível realizar uma cirurgia de remoção. Por estas razões, é de extrema importância encontrar novas estratégias que permitam um diagnóstico precoce, um tratamento infalível e uma monitorização mais efectiva. (Liang e Shen, 2011)

Os estudos feitos em gliomas, nos últimos anos, têm identificado marcadores de diagnóstico, de prognóstico e preditivos, suscetíveis de ajudarem a definir a classificação histológica.

A presença de mutações em genes que codificam a proteína isocitrato desidrogenase 1 e 2 (IDH1 e IDH2) em astrocitomas, oligodendrogliomas e glioblastomas, a codeleção 1p/19q em oligodendrogliomas e a hipermetilação da região promotora do gene MGMT em glioblastomas e astrocitomas são considerados dos marcadores mais interessantes em gliomas. (Guedes, 2010)

Sujeitar os doentes a uma série de biópsias invasivas é, na maioria das vezes, impraticável, pode ser doloroso e, em alguns casos, é anatomicamente desafiante e com riscos associados. Também é de salientar que biópsias num único local provavelmente não conseguem capturar a complexidade genómica do tumor do doente no seu todo, devido à heterogeneidade intratumoral profunda. (Krebs *et al.*, 2014)

Os biomarcadores circulantes surgem assim como um meio complementar às tradicionais amostras de biópsia. Captados através de um teste de sangue minimamente invasivo, e prontamente passíveis para amostragem sérica, têm a capacidade de informar acerca da heterogeneidade do tumor e da sua evolução, embora ainda permaneça por determinar o quão útil podem ser na clínica.

2. CANCRO

O cancro é a primeira causa de morte em países economicamente desenvolvidos e a segunda causa de morte em países em desenvolvimento. O número de novos casos está a aumentar em países desenvolvidos como resultado do envelhecimento e crescimento da população, assim como, devido ao aumento crescente da adoção de estilos de vida associados ao cancro, como fumar, inatividade física e dietas “ocidentais”. (Torre *et al.*, 2015)

Apresenta-se assim como o maior problema a nível de saúde pública com, aproximadamente, 14 milhões de novos casos diagnosticados e mais de 8 milhões de mortes em 2012, em todo o mundo. Espera-se, contudo, que o número de novos casos cresça mais 70% nas próximas 2 décadas. (WHO | Cancer, 2016) No que diz respeito ao panorama português, em 2012, houve mais de 49 mil novos casos de cancro e esperam-se, em 2035, mais de 14 mil novos casos do que os verificados em 2012. [Figura 1]

A transformação de células normais em células cancerígenas e a conservação do estado maligno estão associadas a desregulações genéticas e ambientais, a respostas de sinalização celular alteradas e a interações com o microambiente. Estas alterações estão em constante evolução pois as células tumorais estão sujeitas a pressões induzidas pelas células em si, pelo microambiente em que estão inseridas e pelas terapias que lhes são aplicadas. Os tumores são também ecossistemas complexos onde diferentes subpopulações tumorais, por vezes heterogéneas, e uma variedade de células não-tumorais coexistem e evoluem de forma constante. As interações entre as células e as moléculas, que surgem como resultado dessas alterações, e os ecossistemas são ainda mais complexas. As investigações na área do cancro estão, cada vez mais, a integrar essa complexidade e a adotar uma combinação de métodos que lhes permita compreender e entrever a actividade das células cancerosas. (Du e Elemento, 2014)

Os maiores desafios desta doença são a sua deteção precoce, a melhoria na estratificação dos doentes e a previsão da resposta terapêutica e desenvolvimentos nestas áreas prometem resultados mais favoráveis na progressão da doença para os doentes. (Lowe e Allan, 2014)

3. GLIOMAS

Os tumores cerebrais compreendem um espectro heterogéneo de neoplasias que inclui aproximadamente 120 tipos e variantes de tumores cerebrais primários e uma variedade de neoplasias secundárias (metástases). (Louis *et al.*, 2007)

Existem diferentes tipos de tumores do Sistema Nervoso Central (SNC). De forma mais genérica, podem ser classificados em tumores do tecido neuroepitelial (incluem os gliomas), em tumores germinativos (incluem os meduloblastomas e os neuroblastomas), em tumores dos nervos periféricos e em meningiomas, entre outros. (Guedes, 2010)

Os gliomas são o tipo mais comum de tumor cerebral primário, compreendendo cerca de 50% de tumores cerebrais malignos em adultos. São responsáveis por 189,000 novos casos e 142,000 mortes anualmente (1,7% de novos casos de cancro e 2,1% de mortes por cancro), apresentando-se como um dos cancros com maior mortalidade. (Torre *et al.*, 2015)

São assim denominados porque têm origem em células da glia e são subdivididos em astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas com base na similaridade no perfil imunofenotípico das células quem lhes dão origem. Tumores que exibam uma mistura de diferentes células são denominados oligoastrocitomas. (Kros *et al.*, 2015)

Os glioblastomas, os tumores cerebrais primários mais comuns, são responsáveis por aproximadamente 60 a 70% dos gliomas malignos, o astrocitoma anaplásico por 10 a 15%, e os oligodendrogliomas anaplásicos oligoastrocitomas anaplásicos por 10%. A incidência destes tumores aumentou ligeiramente ao longo das últimas duas décadas, especialmente em idosos, como resultado, principalmente, do aperfeiçoamento das técnicas de neuroimagem. Os gliomas malignos são 40% mais comuns em homens do que em mulheres e duas vezes mais comuns entre a população caucasiana do que na africana ou asiática. Nenhuma causa subjacente foi identificada para a maioria dos gliomas malignos. O único factor de risco estabelecido é a exposição à radiação ionizante. Estima-se que aproximadamente 5% dos doentes com gliomas malignos tenha uma história de família de glioma e alguns destes casos familiares estão associados a síndromes genéticas raras. (Wen e Kesari, 2008) Os tumores malignos podem desenvolver-se em todas as idades, estando o pico de incidência situado entre a quinta e a sexta década de vida. (Stupp *et al.*, 2014)

3.1 CLASSIFICAÇÃO

Os tumores cerebrais são classificados segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) de acordo com similaridade morfológica a células diferenciadas do cérebro, citoarquitetura e perfil imunohistológico. Para além da divisão morfológica, a OMS também subdivide os tumores de acordo com o seu grau – I, II, III e IV, em ordem ascendente de malignidade. Tumores de alto grau (grau III e IV) têm um pior prognóstico e são caracterizados histologicamente pela presença de atipia nuclear, aumento proliferativo, proliferação microvascular e necrose. Tumores de baixo grau (grau I e II) têm um potencial proliferativo reduzido e apresentam possibilidade de cura após ressecção cirúrgica. (Louis *et al.*, 2007)

Graus dos Gliomas

Astrocitomas difusos e Oligodendrogliomas	
Astrocitoma difuso, IDH mutante	II
Astrocitoma anaplásico, IDH mutante	III
Glioblastoma, IDH <i>wildtype</i>	IV
Glioblastoma, IDH mutante	IV
Oligodendroglioma, IDH mutante e com a codeleção 1p/19q	II
Oligodendroglioma anaplásico, IDH mutante e com a codeleção 1p/19q	III
Outros Astrocitomas	
Astrocitoma pilocítico	I
Astrocitoma subependimário de células gigantes	I
Xantastrocitoma pleomórfico	II
Xantastrocitoma pleomórfico anaplásico	III
Ependimomas	
Subependimoma	I
Ependimoma mixopapilar	I
Ependimoma	II
Ependimoma anaplásico	III

Tabela I – Graus dos gliomas segundo classificação de tumores do SNC da OMS, 2016 [adaptado de (Louis *et al.*, 2016)]

3.2 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Atualmente, o exame histológico de tecido tumoral é o procedimento-padrão para o diagnóstico definitivo de glioma, enquanto a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética nuclear (RMN) são os procedimentos suplementares para definir o estadio da doença. (Westphal e Lamszus, 2015)

No entanto, tanto os testes histopatológicos como a neuroimagem são insensíveis e dispendiosos e podem causar hemorragias e danos cerebrais. Desta maneira, é urgente e altamente necessário desenvolver procedimentos menos invasivos para detetar e monitorizar gliomas. (Qu, Guan e Liu, 2015)

A deteção precoce de gliomas será um processo difícil até se começarem a usar na prática clínica biomarcadores específicos associados ao desenvolvimento de este tipo de tumores.

No que respeita à terapia, os gliomas são tumores difíceis de curar. Normalmente, o prognóstico para pacientes com gliomas de alto grau (especialmente para glioblastomas) é pior, o que se traduz numa média de sobrevida de apenas 15 meses. (Stupp *et al.*, 2014)

Grau e tipo de célula	Sobrevida média
Grau II	
Astrocitoma	7-10 anos
Oligodendroglioma ^a	>10-15 anos
Grau III	
Astrocitoma anaplásico	3.5 anos
Oligodendroglioma anaplásico	>10 anos
Grau IV	
Glioblastoma	15 meses

^a com LOH 1p/19q

Tabela 2 – Sobrevida esperada para doentes com gliomas. [adaptado de (Stupp *et al.*, 2014)]

A abordagem tradicional para tratar gliomas engloba cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A cirurgia é a abordagem terapêutica inicial comum para a resseção do tumor e para a obtenção de amostras para diagnóstico. Os doentes submetidos a resseção do tumor têm um prognóstico mais favorável; idealmente são sujeitos à resseção total desde que a função neurológica não seja comprometida pela extensão da resseção. É durante a cirurgia que se obtém o tecido (amostra) e este deve ser em quantidade suficiente para realizar a análise molecular. (Stupp *et al.*, 2014)

Um problema notório na medição dos efeitos do tratamento é a pseudoprogressão, uma resposta do tecido cerebral relacionada com a quimio e radioterapia. A pseudoprogressão do glioma provoca um aumento do edema cerebral, que se assemelha a uma progressão real do tumor. Esta condição é provavelmente induzida por uma inflamação local devida ao

tratamento, resultando em edema e aumento da permeabilidade anormal dos vasos. Existe portanto, a necessidade de discriminar o diagnóstico já que a combinação de quimio e radioterapia induz pseudoprogredão em, aproximadamente, 30% dos casos. Infelizmente, ainda não há técnicas radiológicas que distingam entre pseudoprogredão e recorrência tumoral ou progredão. A identificação da proliferação de células tumorais em biópsias de tecido retirado em situações de pseudoprogredão pode ser problemática, e a importância da presença de células disseminadas com as características morfológicas ou moleculares da lesão original é discutível. Atualmente, não há biomarcadores ou exames radiológicos ou clínicos para distinguir de forma segura entre a recorrência do glioma de necrose ou para monitorizar a resposta do tumor à terapia. A existência de parâmetros mensuráveis objetivos que avaliassem a presença de tumor, a sua atividade e resposta ao tratamento seria um acréscimo desejado ao conjunto de técnicas de diagnóstico atualmente disponíveis. (Kros *et al.*, 2015)

4. BIOMARCADORES

Os biomarcadores podem ser definidos como qualquer indicador de diagnóstico mensurável que é usado para avaliar o risco ou a presença de determinada doença. (Gutman e Kessler, 2006) Por outras palavras, podem ser descritos como características que são objetivamente medidas e avaliadas como indicadores de processos biológicos normais, processos patogénicos e respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica. (Atkinson A.J. *et al.*, 2001)

Existem três categorias reconhecidas de biomarcadores. Os biomarcadores de diagnóstico, que identificam a presença de uma doença específica. Ou seja, testes moleculares que ajudam no diagnóstico ou na subclassificação do estadio de uma doença em particular. A subclassificação pode resultar numa abordagem diferente da doença mas o biomarcador é usado primariamente para identificar a doença tendo por base a amostra obtida do doente. Os biomarcadores de prognóstico, usados para deduzirem a evolução da doença independentemente da terapia. Estes têm uma relação com alguns parâmetros clínicos tais como a sobrevida ou sobrevida livre de progredão, independentemente do tratamento prestado. Finalmente, os biomarcadores preditivos, que informam sobre a resposta a um tratamento particular. Estes prevêm a actividade de uma determinada classe ou tipo de

terapia e são usados para ajudar a tomar decisões de tratamento mais específicas. São utilizados como indicadores do provável benefício de um tratamento em específico para um doente em particular. (Berghoff *et al.*, ; Redzic, Ung e Graner, 2014)

Os biomarcadores desempenham um papel importante, por vezes, indispensável na deteção e monitorização de doentes com malignidades. Assim, em doentes assintomáticos, os biomarcadores podem ser usados na deteção precoce de cancro ou condições pré-malignas, enquanto que em pacientes sintomáticos, os biomarcadores podem ajudar na diferenciação entre doença benigna e maligna. Após um diagnóstico de malignidade, os biomarcadores podem ajudar no prognóstico e na identificação da terapia mais apropriada. Em doentes que tenham sido submetidos a cirurgia de resseção, estes podem ser usados na monitorização e na deteção precoce de possíveis recorrências da doença. E no caso de doentes que estejam a receber tratamento sistémico, os biomarcadores podem proporcionar uma abordagem menos invasiva para monitorizar a resposta do tumor. (Duffy *et al.*, 2015; Karsy *et al.*, 2015)

Os biomarcadores estão a desempenhar, cada vez mais, papéis importantes na deteção e tratamento de doentes com cancro. Apesar do grande número de publicações sobre biomarcadores tumorais, apenas alguns estão a ser usados actualmente na clínica. (Duffy *et al.*, 2015)

Estratégias de deteção precoce e um tratamento eficaz para doentes com glioma são peças fundamentais para a melhoria dos resultados clínicos e, o desenvolvimento de biomarcadores para este fim tem sido objeto de investigação. Sendo produzidos pelos processos patológicos da progressão do tumor ou pelo sistema hospedeiro em resposta a este, os biomarcadores podem ajudar a compreender as características da neoplasia. (Manne, Srivastava e Srivastava, 2005)

Os biomarcadores de gliomas podem ser identificados a partir de sangue, de líquido cefalorraquidiano (LCR) ou diretamente de tecido do glioma. Como os tumores intracraniais não são facilmente acessíveis para amostragem, o sangue e o LCR apresentam-se como fontes preferenciais para pesquisa de biomarcadores. (Kros *et al.*, 2015)

4.1 BIOMARCADORES ACTUAIS

A convergência de esforços, a abordagem “ômica”, que inclui genómica, transcriptómica, proteómica e metabólica, e a junção de ambos tem permitido compreender a biologia complexa dos gliomas ao longo das últimas décadas; como resultado, têm sido propostos vários alvos terapêuticos. No entanto, poucas foram as alterações moleculares e os marcadores que mostraram serem úteis no seguimento terapêutico de gliomas e, por isso, que possam ser chamados de biomarcadores de acordo com a definição aceite. (Westphal e Lamszus, 2015)

Para que um teste seja considerado útil na sua generalidade, este deve demonstrar validade analítica e utilidade clínica. A validade analítica inclui a sua reprodutibilidade e qualidade como teste. A validade clínica implica que o biomarcador consiga identificar 2 grupos que possam ser distinguidos biologicamente e que apresentem diferentes resultados mas, porém, não é suficiente para considerar que deva ser usado como teste de rotina. A utilidade clínica implica que seja demonstrado um alto nível de evidência, ou seja, que o uso desse marcador como teste de rotina melhora os resultados no doente suficientemente para poder ser integrado como teste de rotina. (Berghoff *et al.*)

Os biomarcadores genéticos e epigenéticos actualmente analisados são-no a partir de tecido tumoral proveniente da ressecção cirúrgica ou de biópsias, caso o tumor não seja ressecável. Devido ao facto da recorrência de gliomas ser quase inevitável, o acompanhamento ao longo do processo dos biomarcadores é imprescindível para detetar adaptações fenotípicas; contudo, o acesso repetido a biomarcadores requer, actualmente, procedimentos invasivos tais como re-ressecção ou re-biopsia. (Westphal e Lamszus, 2015)

Alguns dos biomarcadores usados actualmente em gliomas com evidência clínica comprovada são a codeleção 1p/19q, as mutações somáticas em genes que codificam isocitrato desidrogenase 1 e 2 (IDH1 e IDH2) e a hipermetilação da região promotora do gene MGMT. Estes biomarcadores podem ser identificados a partir de tecido do glioma e apresentam valor diagnóstico, prognóstico ou preditivo.

4.1.1 MUTAÇÃO IDH1/2

Os genes isocitrato desidrogenase 1 e 2, IDH1 e IDH2, parecem estar envolvidos em processos metabólicos importantes, assumindo papéis relevantes na biologia do cancro.

As enzimas isocitrato desidrogenase catalisam a descarboxilação oxidativa de isocitrato a acetoglutarato (a-KG) no ciclo de Krebs. Durante este processo, o NAD⁺ ou o NADP⁺ são reduzidos a NADH ou NAPH, respetivamente, dependendo da isoforma que catalisa a reação. Há 3 isoformas diferentes, NADP(+) citosólico – IDH específico (IDH1), NADP(+) mitocondrial – IDH específico (IDH2), NAD(+) mitocondrial – IDH específico (IDH3). A enzima IDH1 é ativa no citosol e nos peroxissomas enquanto que a IDH2 está localizada na mitocôndria. (Mellai *et al.*, 2013) As proteínas IDH3 estão, exclusivamente, localizados na mitocôndria e a sua atividade enzimática depende de NAD⁺, desempenhando funções no ciclo de Krebs, como a produção de energia. Estas proteínas, porém, não têm sido associadas com o desenvolvimento de gliomas. (Ying, 2006)

Em células normais, a atividade da IDH1 e da IDH2 é regulada pela disponibilidade de substrato e cofatores. A característica chave deste mecanismo cinético de regulação é a direção da atividade enzimática. As reações catalisadas pelas enzimas IDH1 e IDH2 são reversíveis mas o mesmo não acontece com a reação catalisada pela IDH3. [Figura 2] (Mellai *et al.*, 2013)

As proteínas IDH desempenham papéis importantes mas distintos numa variedade de funções metabólicas celulares tais como transduções de sinais, síntese lipídica, stress oxidativo e respiração oxidativa. Em suma, as proteínas IDH desempenham um papel preponderante na protecção celular. (McNamara, Sahebjam e Mason, 2013)

Identificadas em 2008 num estudo genómico, feito por Parsons *et al.*, as proteínas IDH1/2 mostraram estar mutadas em, aproximadamente, 5% dos gliomas primários e em 60-80% dos gliomas secundários. Quando observada em gliomas de grau alto, significa que o tumor se desenvolveu a partir de uma lesão de baixo grau (glioblastoma secundário). De facto, a mutação IDH1/2 apresenta-se como uma mutação no desenvolvimento precoce de glioblastomas (> 90% amostra com a mutação IDH1/2) e resulta no aumento da produção do oncometabolito D-2-hidroxiglutarato, o qual pode alterar os padrões de metilação do DNA nos glioblastomas e alterar a transcrição de genes num grande número de alvos. As enzimas IDH1/2 usam NADP⁺ como cofator na produção de NADPH. Deste modo, as mutações levam à diminuição da produção de NADPH o que, por sua vez, leva ao aumento do stress oxidativo, oxidação do DNA, supressão dos mecanismos de reparação do DNA e eventual indução de danos no DNA. (Krell *et al.*, 2013)

As mutações IDH1/2 são actualmente consideradas como o primeiro evento na gliomagénesese e uma das alterações genéticas mais importantes na biologia do glioma. (Arita *et al.*, 2015)

Anomalias em ambos os genes, IDH1 e IDH2, têm sido associadas com uma melhoria no prognóstico de doentes com gliomas de vários graus. (Stancheva *et al.*, 2014)

Num estudo com 395 amostras de glioblastoma mostrou que, nas 30 amostras que continham a mutação, a sobrevida dos doentes aumentou (26.6 vs 14.5 meses). (Labussière *et al.*, 2014) Noutro estudo, feito por Jansen *et al.*, foi reportado que esta mutação estava presente em 18 de 149 (12%) dos glioblastomas e a sobrevida média de doentes com a mutação na IDH foi de 31 meses em comparação aos 15 meses dos doentes sem a mutação. (Jansen *et al.*, 2010)

A frequência de cada mutação varia de acordo com os ensaios. A mutação mais comum, que afecta aproximadamente 90% dos mutados IDH, é uma substituição do aminoácido arginina por histidina (R132H). Outros tipos de mutação incluem R132C (4%), R132L (1%) e R132S (2%) e R132G (2%). (Preusser, 2012) A mutação IDH2 no resíduo Arg172 é análoga à Arg132 encontrada no gene IDH1. As mutações no gene IDH2 têm sido detectadas em ~3% dos gliomas de grau II e III. (Yan *et al.*, 2009)

A mutação p.R132H no gene que codifica a IDH1 é fortemente associada com astrocitomas enquanto que a mutação no gene que codifica a IDH2 afecta maioritariamente doentes com oligodendrogliomas. (Mellai *et al.*, 2013) A mutação mais comum, p.R132H, pode ser detectada usando técnicas de imunohistoquímica com um anticorpo monoclonal que é capaz de detectar a mutação enquanto as outras mutações podem ser detectadas por sequenciamento. (Stupp *et al.*, 2014)

Um estudo do passado mês de maio revelou uma diferença intrínseca entre os gliomas com a mutação IDH1 e com a mutação IDH2. Este estudo vem demonstrar que estas mutações devem, então, ser consideradas separadamente pois as suas diferenças podem ter implicações no diagnóstico e tratamento desses gliomas. (H.-Y. Wang *et al.*, 2016)

As mutações IDH1/2 estão intimamente ligadas com outros fatores de prognóstico/preditivos, tais como a idade do doente, a metilação do promotor do gene MGMT ou da codeleção 1p19q. Apesar do tamanho limitado de coorte, das diferentes terapêuticas aplicadas e da heterogeneidade dos diferentes tipos de tumores entre cada estudo poder levar a resultados conflituosos, sabe-se que a presença/ausência da mutação

IDH1/2 adiciona informações valiosas para a previsão do curso clínico da doença, e deve ser considerado como um factor de estratificação em ensaios clínicos de gliomas. (Arita *et al.*, 2015)

Apesar de a proteína IDH ser uma ferramenta útil no prognóstico e diagnóstico, atualmente não parece ser capaz de prever a resposta a um tipo particular de terapia. (Mellai *et al.*, 2013)

4.1.2 CODELEÇÃO 1p/19q

Os gliomas raramente têm cura e os factores que influenciam o prognóstico dos doentes com esta doença ainda não é totalmente compreendido. A perda da heterozigotia do 1p/19q tem vindo a ser conhecida como uma característica molecular típica de oligodendrogliomas. No entanto, a associação entre perda de heterozigotia do 1p/19q e a sobrevida permanece controversa. (Zhao, Ma e Zhao, 2014)

A perda combinada de material genético nos braços dos cromossomas 1p e 19q é consequência de uma translocação não equilibrada entre os braços dos cromossomas 1 e 19, $t(1;19)(q10;p10)$, que leva à formação de dois cromossomas derivativos, um composto por 1q e 19p e outro composto por 1p e 19q. Subsequentemente, ocorre perda do cromossoma derivativo $der(1;19)(p10;q10)$, resultando na perda simultânea de 1p e 19q, com retenção do $der(1;19)(q10;p10)$. [Figura 3] (Jenkins *et al.*, 2006)

Deste modo, a perda de 1p/19q tem-se demonstrado ser uma característica comum entre os oligodendrogliomas. Estudos sugerem que a perda de heterozigotia está presente em 80% dos oligodendrogliomas de baixo grau, 60% dos oligodendrogliomas anaplásicos, 30% dos oligoastrocitomas anaplásicos e 10% dos astrocitomas difusos (incluindo glioblastomas). (Zhao, Ma e Zhao, 2014)

É agora reconhecido que doentes com oligodendrogliomas com a codeleção 1p/19q têm um prognóstico mais favorável do que aqueles doentes com tumores com um grau equivalente e com uma aparência histológica similar mas sem a codeleção. (Ahmed *et al.*, 2014)

A codeleção 1p/19q tem também um poderoso valor preditivo na resposta da quimioterapia, com os doentes a apresentar uma progressão da doença mais lenta e um aumento de sobrevida quando tratados com agentes alquilantes. (Ahmed *et al.*, 2014)

Há várias técnicas diferentes para testar a codeleção 1p/19q: PCR- baseado na análise da perda de heterozigotia, MLPA (multiplex ligation-dependent pobre amplification), aCGH (array comparative genomic hybridization) e FISH (fluorescence in situ hybridization). As técnicas de PCR e FISH são as mais usadas nos meios clínicos. (Preusser, 2012)

De acordo com o relatório da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), o teste de 1p/19q em oligodendrogliomas preenche o critério de alto nível de evidência (IA), suportado por validação e utilidade clínica baseadas em ensaios clínicos randomizados, existindo uma guideline disponível para a realização da análise da 1p/19q pelo método FISH. (Berghoff et al.,)

4.1.3 HIPERMETILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE MGMT

O gene MGMT está localizado no cromossoma 10q26 e contém uma ilha CpG. As ilhas CpG são regiões no genoma, com cerca de 300-3000 pb, que contêm uma elevada percentagem de citosinas e guaninas (regiões CpG), e estão geralmente localizadas nas regiões promotoras dos genes, onde em células normais estão tipicamente não metiladas, permitindo a transcrição dos genes. As regiões CpG que se encontram fora das regiões promotoras são, comumente, metiladas e são responsáveis pelo silenciamento transcripcional, por exemplo, das sequências repetitivas. (Weller et al., 2010; Hadnagy, Beaulieu e Balicki, 2008)

Em células cancerígenas, a metilação nas ilhas CpG, localizadas próximo ou na região promotora de genes envolvidos no ciclo celular, na invasão e apoptose, na supressão tumoral ou na reparação do DNA e integridade genómica, tem sido frequentemente associada com o silenciamento transcripcional em vários modelos tumorais. Um estudo realizado por Yu et al., mostrou que genes como o MGMT, encontravam-se metilados em doentes com gliomas, nomeadamente, com astrocitomas, ao contrário do que acontecia em indivíduos controlo, em que estes genes não estavam metilados. (Guedes, 2010)

A O6-metilguanina DNA-metiltransferase (MGMT) é uma enzima de reparação do DNA que remove grupos alquilo da posição O6 da guanina, transferindo-os para uma cisteína. (D'Alessandris, 2014)

A remoção de grupos alquilo da O6-metilguanina (O6-MG) mediada pela enzima MGMT torna-se relevante na quimioterapia por agentes alquilantes em doentes com glioma, tais como a temozolomida. A alquilação do DNA em grande escala produzida pela temozolomida causa desemparelhamento de bases pois, a guanina metilada, em vez de emparelhar com a

citossina, emparelha com a timina. Se a O6-MG não é reparada devido à baixa/nula expressão do gene MGMT, esta forma um par de base com a timina. Este desemparelhamento é reconhecido pelas proteínas de reparação que conduzem à paragem do ciclo e à morte celular. Pelo contrário, a enzima MGMT pode reverter os danos causados pela metilação da temozolomida visto que a sua actividade de reparação do DNA proporciona resistência contra os efeitos citotóxicos da metilação da guanina. Como demonstrado em ensaios clínicos com doentes afectados por gliomas que foram tratados com o agente alquilante temozolomida, a terapia é significativamente mais eficaz quando a expressão do gene MGMT está reduzida devido à metilação do promotor. [Figura 4] (Cabrini *et al.*, 2015)

Assim sendo, a hipermetilação do promotor do gene MGMT emergiu como um importante marcador molecular em doentes com gliomas. Dados indicam que a metilação do promotor do gene MGMT tem um forte valor prognóstico quando doentes com glioma anaplásico são tratados com radioterapia e quimioterapia com agentes alquilantes.

Stupp *et al.*, num estudo publicado, avaliaram o impacto da temozolomida quando associado a radioterapia. Dos 206 casos, 45% mostraram ter o promotor do gene MGMT metilado, o que resultou num prognóstico mais favorável. A média de sobrevida foi de 21.7 meses após radio e quimioterapia comparado com os 15.3 meses dos doentes sem a metilação e a receber o mesmo tratamento. (Hegi *et al.*, 2005; Stupp *et al.*, 2009)

Ensaio randomizados vieram reforçar o valor prognóstico e preditivo da metilação do promotor do gene MGMT. No ensaio clínico NOA-04 com doentes com astrocitomas anaplásico (grau III), a metilação foi eficaz ao prever uma sobrevida (11.9 vs 8.2 meses) e sobrevida livre de progressão (8.4 vs 4.6 meses), assim como uma melhoria na resposta à quimioterapia em comparação com os controlos não metilados. (Wick *et al.*, 2009) No ensaio NOA-08, 584 doentes com glioblastoma ou astrocitoma anaplásico foram recrutados para tratamento com temozolomida associada ou não a radioterapia. A metilação no promotor do gene MGMT estava presente em 73 dos 209 doentes testados (35% das amostras) e foi associada com um aumento de sobrevida significativo (11.9 vs 8.2 meses). Além disso, a sobrevida livre de progressão, definida como o tempo desde a cirurgia até aos primeiros sinais de progressão ou morte, melhorou em doentes com a metilação sujeitos a quimioterapia em relação a doentes sem a metilação (8.4 vs 4.6 meses). (Wick *et al.*, 2012) Estes resultados mostram que doentes com a metilação respondem melhor à quimioterapia; contudo, a diferença entre doentes com glioblastoma e doentes com astrocitomas anaplásico não foi estudada, limitando a interpretação do estudo.

Além disso, estudos sugerem que não é apenas um biomarcador de prognóstico mas também um biomarcador preditivo na resposta à temozolomida em doentes com glioblastoma. (Hegi *et al.*, 2005)

5. BIOMARCADORES CIRCULANTES

Pretende-se que, cada vez mais, os doentes sejam tratados com base na genética do tumor. Contudo, os genomas dos tumores são instáveis e suscetíveis a mudanças quando sujeitos a pressões tal como a aplicação de um determinado tratamento. Deste modo, terapias com alvos moleculares requerem uma monitorização contínua do tumor de modo a assegurar que esse tal tratamento ainda é eficaz ou até mesmo para detectar o surgimento de novos biomarcadores preditivos. No entanto, como dito anteriormente, biópsias regulares não podem ser realizadas devido à sua natureza invasiva. Além disso, frequentemente, são recolhidas pequenas quantidades de material citológico e, portanto, a informação sobre o conteúdo genético das células é limitado. A incapacidade de obter amostras para a monitorização dos tumores apresenta-se como uma barreira para a terapia. (Heitzer, Auer, Ulz, Geigl, & Speicher, 2013a)

São necessários métodos rápidos, de baixo custo e não invasivos para a identificação de potenciais biomarcadores em vários pontos temporais durante o curso da doença. Deste modo, células tumorais circulantes, vesículas extracelulares e ácidos nucleicos oferecem uma oportunidade única para a monitorização dos tumores de uma forma não invasiva. São referidos frequentemente como “biópsia líquida” por serem potenciais substitutos do tecido tumoral propriamente dito. (Heitzer *et al.*, 2013)

Os biomarcadores circulantes surgem com a vantagem de serem encontrados no sangue ou no LCR. Ao contrário das técnicas usadas até ao momento para detectar os biomarcadores descritos anteriormente, os biomarcadores circulantes são facilmente acessíveis, o que simplifica amostragens repetidas com, conseqüentemente, um melhor acompanhamento da doença. No entanto, estes biomarcadores estão a ser objecto de estudo e ainda não estão a ser usados na prática clínica. (Kros *et al.*, 2015)

As três principais classes de biomarcadores circulantes em gliomas são as células tumorais circulantes, as vesículas extracelulares (microvesículas) e os ácidos nucleicos circulantes.

Cada classe de biomarcadores tem as suas vantagens e desafios que estão intrinsecamente relacionadas com a biologia subjacente. (Holdhoff *et al.*, 2013)

A questão chave relativa a todos os tipos de biomarcadores circulantes é a sua representatividade de todo o tumor ou, pelo menos, dos aspectos mais relevantes do tumor. Nesse sentido, muito pode ser aprendido de outras doenças oncológicas nas quais a confiança em diferentes classes de biomarcadores circulantes tem sido extensivamente avaliada. A avaliação do biomarcador deve considerar todas as características tumorais e a meia-vida deste, de maneira a que a dinâmica da evolução fenotípica do tumor e o reflexo das respostas ao tratamento possa ser seguido com segurança. As células tumorais circulantes, por exemplo, contêm toda a informação celular, mas se o tumor não é homogéneo, estas representam apenas uma pequena parte do tumor e, desse modo, apresentam menor relevância nas decisões terapêuticas. Pelo contrário, as vesículas extracelulares representam mais do secretoma total do tumor: pensa-se que estas derivam de todas as células do tumor reflectindo assim a composição heterogénea. E as moléculas individuais – DNA, RNA e microRNA – apenas podem fornecer informação acerca dos genes nelas contidas. O valor clínico dos biomarcadores circulantes em gliomas baseia-se na precisão com que estes reflectem a biologia do tumor, na adequação das meias-vidas e dinâmicas ao longo do tempo e da disponibilidade de tecnologia padronizada para a sua deteção. (Westphal e Lamszus, 2015)

5.1 CÉLULAS TUMORAIS

As células tumorais circulantes (CTc) têm sido identificadas no sangue periférico de doentes com cancro com ou sem metástases detectadas clinicamente. (Joosse, Gorges e Pantel, 2015; Kros *et al.*, 2015)

Acredita-se que a aquisição deste fenótipo invasivo por parte das células tumorais ocorre, talvez, pelo aumento da hipoxia tecidular que deriva do crescimento do tumor e consequente competição pelos recursos, que por sua vez conduz à neovascularização e linfogénese. Um conceito fundamental que surgiu e se mostrou relevante foi a transição epitélio-mesenquima (TEM), um processo que se observou pela primeira vez no desenvolvimento embrionário. A TEM permite que as células epiteliais percam a polaridade apical-basal, se separem das células vizinhas, adquiram uma morfologia parecida à do fibroblasto, invadam o estroma circundante e se tornem mais resistentes à apoptose. Durante este processo, as células tumorais perdem a expressão de alguns marcadores

específicos do epitélio e começam a exprimir proteínas do citoesqueleto mesenquimal, proteínas de adesão, factores de crescimento e cinases. (Friedlander, Premasekharan e Paris, 2014)

As CTc podem representar tão bem ou melhor a heterogeneidade do tumor que uma biópsia. Foram publicados mais de 1500 ensaios na última década, abrangendo tópicos desde o desenvolvimento tecnológico (métodos de recolha, caracterização e isolamento de CTc), utilidade prognóstica e farmacodinâmica do biomarcador, e identificação de biomarcadores preditivos baseada em CTc (por exemplo, mutações candidatas ou estado dos recetores) para seleção da terapêutica. (Krebs *et al.*, 2014)

Com os recentes avanços tecnológicos, o perfil de DNA e RNA das CTc pode ser examinado para determinar o grau de heterogeneidade entre células e o grau de semelhança entre amostras de biópsias aparentemente iguais. (Krebs *et al.*, 2014)

O principal desafio técnico para a investigação das CTc deve-se à raridade de células tumorais no sangue, que se estima que seja de apenas 1 em 10^9 no sangue de pacientes com metástases. (Kros *et al.*, 2015) Uma vasta gama de tecnologias surgiu na tentativa de isolar as CTc. Na sua maioria, estas baseiam-se nos princípios de “enriquecimento” e “detecção”. Enriquecimento em CTc, o processo de separar as CTc da vasta gama de células sanguíneas, é conseguido em virtude das propriedades físicas das células, tais como o tamanho, densidade e carga ou das características biológicas específicas, tais como a expressão de marcadores à superfície das células. A deteção é normalmente feita por imunocoloração e microscopia ou por métodos baseados na técnica de PCR. (Krebs *et al.*, 2014)

Tal como acontece com outros ensaios para biomarcadores, os requisitos regulamentares para usar uma tecnologia que tenha como base as CTc e que seja útil na prática clínica são necessariamente estritos. Estes ensaios têm que ser fiáveis, reprodutíveis e robustos com validação e qualificação clínica de estudos prospectivos, para poderem ser usados clinicamente. Este processo rigoroso requer colaboração entre centros de investigação e a indústria de modo a que estes biomarcadores circulantes se tornem uma realidade. (Krebs *et al.*, 2014)

Em cancro não-metástico, a aplicação clínica mais importante explorada até ao momento foi a contagem de CTc como biomarcador de prognóstico na recorrência do tumor após conclusão da terapia. Um estudo feito em mulheres com cancro da mama mostrou que a contagem de CTc antes e depois da quimioterapia, aliada com factores preditivos clínicos,

pode ajudar na determinação do risco de recorrência. (Friedlander, Premasekharan e Paris, 2014)

Outro desafio na avaliação das CTC como biomarcadores preditivos baseia-se no facto de que nem todas as terapias atuam da mesma maneira. Enquanto umas são direccionadas para a necrose e apoptose, tal como a maior das quimioterapias, outras podem ter pouco efeito sobre as CTC. Por esse motivo, os resultados de um ensaio que estude o valor preditivo de uma terapia com base na contagem das CTC não pode ser generalizado para outros tratamentos ou para outros cancros. Deste modo, para avaliar o valor preditivo das CTC serão necessários dados de ensaios clínicos em grande escala. (Friedlander, Premasekharan e Paris, 2014)

As CTC são o modelo mais compreensivo das propriedades do tumor. Até mesmo uma única célula pode ser usada para uma análise genómica. As CTC parecem refletir os tumores homogéneos, como o gástrico, com muita precisão mas, obviamente, não podem reflectir as características e a composição heterogénea que caracteriza quase todos os tumores, particularmente aquelas que são complexos e dinâmicos como os gliomas. É desconhecido ainda com quanta precisão as CTC podem refletir as propriedades das células de um glioma pois a descoberta das CTC derivadas de gliomas foi feita recentemente por vários grupos de pesquisa independentes e com metodologias diferentes. (Westphal e Lamszus, 2015)

O isolamento de CTC a partir do sangue de doentes com gliomas foi conseguido com sucesso usando diferentes técnicas sendo que em 20-73% dos doentes com gliomas de alto grau foram detetadas CTC. (Best *et al.*, 2015)

Num ensaio baseado em telomerasas, as CTC foram detectadas em 8 de 11 doentes com gliomas. Além disso, em 5 desses doentes, a quantidade de CTC era tão elevada que foi possível relacionar o número de CTC com a eficácia da radioterapia: naquelas que responderam positivamente, o número de CTC diminuiu drasticamente após o tratamento. (Westphal e Lamszus, 2015)

Noutro estudo em que se sequenciou uma única célula, algumas mutações raras foram encontradas nas CTC assim como no tumor que lhes deu origem, o que permite deduzir que as CTC refletem rigorosamente o genoma dos tumores. (Muller *et al.*, 2014)

Apesar dos recentes avanços na área dos gliomas, o potencial das CTC permanece uma questão aberta. Continua por avaliar se as CTC representam totalmente a heterogeneidade da população celular do tumor, e qual é o potencial prognóstico, preditivo e de

monitorização das CTC em doentes com esse tumor. (Best *et al.*, 2015; Westphal e Lamszus, 2015)

5.2 VESÍCULAS EXTRACELULARES

Com um diâmetro que pode variar desde os 30 aos 1000 nm de diâmetro, as vesículas extracelulares (VE), segregadas a partir de células saudáveis, são capazes de transportar vários tipos de RNA (incluindo mRNA, microRNA (miRNA) e outros RNA não codificantes) assim como proteínas e DNA. Dentro das VE podemos destacar os exossomas e as microvesículas, por serem as mais amplamente estudadas. Os exossomas são pequenas vesículas (50-90 nm de diâmetro) de origem endocítica que são libertadas no meio extracelular e permitem a comunicação celular. As microvesículas são moléculas maiores (100-1000 nm de diâmetro) que são libertadas da célula por brotamento da própria membrana celular. Devido às semelhanças funcionais entre ambas tem-se vindo a discutir se há realmente uma diferença significativa entre elas. (Mahmoudi, Ezrin e Hadjipanayis, 2015)

Todas as células libertam vesículas para comunicarem com outras células como resposta ao estado de doenças crónicas ou agudas. No caso de células cancerígenas, a libertação de VE poderá ser a reação mais eficaz das células tumorais para mudar as condições ambientais. (Kros *et al.*, 2015) As VE que contêm DNA, microRNA e proteínas funcionam como um reservatório de adaptação rápida para biomarcadores de gliomas tais como DNA mutacional, microRNA reguladores e oncoproteínas. (Westphal e Lamszus, 2015)

A grande vantagem que as vesículas apresentam é que, ao contrário das moléculas que circulam livremente na corrente sanguínea, as moléculas no interior das VE estão protegidas da rápida degradação. (Westphal e Lamszus, 2015)

As VE contêm um espectro variável de moléculas representativas das células mãe que lhes deram origem. As provenientes de tumores carregam sinais e respostas moleculares tais como proteínas tumorigénicas e RNA/DNA que codifica factores oncogénicos. O seu conteúdo pode ajudar a identificar a célula de origem da vesícula extracelular e oferece a oportunidade de identificar biomarcadores de alvos terapêuticos nos fluidos corporais. (Redzic, Ung e Graner, 2014; Kros *et al.*, 2015)

A informação acerca da farmacodinâmica das VE é escassa, estas parecem ser depuradas através de mecanismos não específicos pelos rins, fígado e outros órgãos com alta

capacidade de depuração, assim como pela captação por células alvo. Um estudo descobriu que o seu tempo de meia-vida parece ser muito curto, refletindo as alterações fenotípicas e adaptativas das células que lhes deram origem. (Westphal e Lamszus, 2015)

Algumas técnicas tais como ultracentrifugação, cromatografia de exclusão molecular, ultrafiltração e purificação por afinidade podem ser usadas para isolar VE desde o plasma sanguíneo. Uma vez isoladas e desnaturadas as técnicas de *Western blotting*, espectroscopia de massa e sequenciação podem ser usadas para analisar o conteúdo genómico e em proteínas das VE. (Mahmoudi, Ezrin e Hadjipanayis, 2015)

Dependendo do tipo de tumor, o conteúdo das VE pode variar significativamente. Por exemplo, em situações de hipoxia, as VE dos glioblastomas enriquecem-se com proteínas induzidas pela hipoxia tais como metaloproteinases da matriz (MMP-9), pentaxina-3, IL-8, PDGF-AB/AA, CD26 (também conhecido como dipeptidil peptidase-4), inibidor do ativador do plasminogénio I (PAI1), fator de crescimento insulina-like (IGFBP)-1 e 3, lisina oxidase e caveolina-I. Em condições de hipercoagulação induzida pelo glioma (por exemplo, no aumento de frequência de trombozes), as células tumorais produzem uma grande quantidade de partículas tipo exossoma contendo fator tecidual, VEGF e outros estimuladores potentes da angiogénese. De facto, dependendo das condições, as células tumorais libertam VE enriquecidas com proteínas cuja atividade é crítica no crescimento, proliferação, expansão, sobrevivência e adaptação às novas condições. (Redzic, Ung e Graner, 2014; Kucharzewska *et al.*, 2013)

As VE podem vir a desempenhar um papel na diferenciação de pseudoprogressão. Através do isolamento da VE de doente submetidos a radio e quimioterapia, poderá detectar-se biomarcadores específicos do tumor que indiquem a sua verdadeira progressão. (Mahmoudi, Ezrin e Hadjipanayis, 2015)

Embora as VE sejam alvos promissores para a investigação de biomarcadores, a sua detecção e quantificação em amostras clínicas permanece um desafio.

As VE derivadas de gliomas apresentam-se como uma grande promessa como fonte de biomarcadores. Contudo, estudos clínicos e pré-clínicos focados na avaliação da importância prognóstica e diagnóstica começaram recentemente e ainda não há dados disponíveis. (Chistiakov e Chekhonin, 2014)

5.3 ÁCIDOS NUCLEICOS ASSOCIADOS AO TUMOR

Em 1948, Mandel e Métais, descreveram a presença de ácidos nucleicos na corrente sanguínea. Em 1996, foram detectadas alterações no DNA circulante de doentes com cancro e, durante as últimas décadas, cada vez mais atenção tem sido dada aos ácidos nucleicos circulantes (ANc), tal como DNA, RNA e microRNA, que estão presentes em altas concentrações na corrente sanguínea de doentes cancerígenos.

A quantidade de ANc é maior em doentes com lesões malignas que em doentes sem tumores mas, quantidades crescentes também tem sido identificadas em doentes com lesões benignas, doenças inflamatórias e traumatismos. Os eventos fisiológicos que levam ao aumento de ANc durante o desenvolvimento e progressão do cancro ainda não são bem compreendidos. No entanto, análises ao DNA circulante (DNAc) permitem a deteção de alterações genéticas e epigenéticas relacionadas com tumores que são relevantes para o seu desenvolvimento e progressão.

Pensa-se que a libertação de ácidos nucleicos para a corrente sanguínea possa estar relacionada com a apoptose e necrose das células cancerosas no microambiente tumoral, assim como com a segregação por macrófagos que fagocitam essas células e fragmentos. Os fragmentos de ácidos nucleicos celulares também podem ser libertados activamente. Estimou-se que, para um paciente com um tumor de 100 g, o que corresponde a 3×10^{10} células tumorais, pode ser libertado, diariamente, na corrente sanguínea, até 3,3% de DNA tumoral.

Os tumores representam, normalmente, uma mistura de diferentes células cancerígenas (que representam a heterogeneidade genómica e epigenómica dos tumores) e de células normais, tais como células hematopoiéticas e estromais. Assim, durante a progressão do tumor e turnover, tanto podem ser libertados ANc derivados de células cancerígenas como de células normais. Como tal, a proporção de ANc que se origina a partir de células tumorais varia consoante o estado e tamanho do tumor. A quantidade de ANc também é influenciada pela eliminação, degradação e outros eventos fisiológicos de filtração da circulação sanguínea e linfática. Os ácidos nucleicos são eliminados do sangue pelo fígado e rim e têm uma meia-vida na circulação que varia de 15 minutos a várias horas.

Um dos problemas na avaliação dos ANc é a padronização dos ensaios, tais como as tecnologias de isolamento, normas, condições de ensaio e especificidade e sensibilidade. Permanece controverso se a amostra ideal será o plasma ou soro. A diversidade de

protocolos e reagentes utilizados hoje em dia impede a comparação dos dados a partir de diferentes laboratórios. (Schwarzenbach, Hoon e Pantel, 2011)

5.3.1 DNA CIRCULANTE

O DNA circulante (DNAc) pode conter as alterações genéticas e epigenéticas presentes em tumores e nas suas metástases, incluindo mutações pontuais, rearranjos, amplificações e aneuploidias. As alterações podem ser altamente específicas para um tumor em particular mas podem também ser representativas da sua heterogeneidade molecular. (Diaz e Bardelli, 2014)

O DNAc tem sido detetado em doentes com cancro de mama, bexiga, colon, fígado, pulmão, ovários, pâncreas e próstata assim como em linfomas (exceto o de Hodgkins) e melanomas. Também tem sido detetado em doentes com gliomas e as alterações encontradas incluem a mutação IDH1, perda de heterozigotia em 1p, 10q, 19q, mutação EGFRvIII, assim como a metilação anormal dos promotores MGMT, p16, DAPK, RASSF1A, p73, RARbeta, PTEN, p15INK4B e p14ARF. (Kros *et al.*, 2015)

Em relação às CTCs, o DNAc parece ser muito mais abundante. Foi detectado em 13 de 16 doentes com cancro da bexiga, coloretal ou mama nos quais não havia vestígio de CTCs. (Bettegowda *et al.*, 2014) Estima-se que são necessárias 50×10^6 células malignas para produzir níveis detetáveis de DNAc, um número muito inferior ao número de células necessárias para que o tumor seja visível por técnicas de neuroimagem. Por esse motivo, o DNAc é potencialmente, um parâmetro muito sensível. (Westphal e Lamszus, 2015)

A alta sensibilidade e dinâmica do DNAc faz dele um marcador ideal para acompanhar as mudanças rápidas da homeostasia tumoral, especialmente com tecnologias robustas (PCR digital, BEAMing [PCR de emulsão com esferas magnéticas e citometria de fluxo], electroforese em gradiente desnaturante e sequenciamento em paralelo) que permitem uma análise rápida e reprodutível de amostras de plasma, proporcionando uma "biópsia líquida". (Francis e Stein, 2015)

Neste momento, a utilidade clínica ainda não foi validada para qualquer dos DNAc candidatos a biomarcadores para doentes com gliomas. Para que estes testes sejam clinicamente aplicáveis precisam ainda de correções futuras. (Kros *et al.*, 2015)

5.3.2 RNA CIRCULANTE

A caracterização do RNA circulante (RNAc) tem sido menos explorada que a do DNAc.

Uma das razões para que isto aconteça é que o RNA que circula livremente fora das células tem tendência para ser degradado pelas enzimas que degradam o RNA (RNAase), que estão normalmente elevadas no sangue dos doentes cancerígenos. Por esta mesma razão, o RNA extracelular encontra-se normalmente incorporado nas vesículas extracelulares.

A expressão alterada de RNA tem sido associado com a fase, a progressão, e a propagação do cancro de diversos tipos.

Tal como o DNAc, o RNAc ainda não foi validado como biomarcador a fim de ser introduzido na prática clínica. (Kros *et al.*, 2015)

5.3.3 MicroRNA CIRCULANTE

MicroRNA (miRNA) são pequenas moléculas de RNA não codificantes com 20-22 nucleótidos que estão envolvidas no processamento pós-transcricional do RNA mensageiro (mRNA). São capazes de regular vias fisiológicas e processos metabólicos e, portanto, influenciar toda a fisiologia celular, o desenvolvimento dos órgãos, e a diferenciação dos tecidos. A maioria dos miRNA são conhecidos por serem específicos, dependendo da fisiologia, do tecido e da doença. Devido ao seu pequeno tamanho, são menos sensíveis à exposição de RNases e, portanto, são mais estáveis do que o RNAm. (Carrigan e Krahn, 2016)

O miRNA foi descoberto em 2002 e, atualmente, conhecem-se cerca de 2000. (Floyd e Purow, 2014) A expressão anormal de miRNA tem sido detetada em vários tipos de tumores humanos, incluindo gliomas. Estudos mostraram que os tumores são caracterizados por uma expressão diminuída dos miRNA o que indica que estas moléculas estão envolvidas em processos biológicos de vigília. Porém, tem sido demonstrado que estas moléculas atuam não só como supressores tumorais mas, também, dependendo a função do mRNA alvo, como oncogenes. Por conseguinte, os níveis alterados de expressão de miRNA exercem um grande impacto nos processos oncogénicos. As razões para a expressão diferencial do miRNA maligno, em comparação com células normais não estão totalmente elucidadas. (Kreth *et al.*, 2014)

Em glioblastomas, foram identificados vários miRNA que são expressos diferencialmente quando comparados a tecidos cerebrais não-neoplásicas. (Kreth *et al.*, 2014) Padrões de expressão de miRNA desviantes no sangue de pacientes com glioma incluem miR-10b, miR-130, miR-15b, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-23a, miR-31, miR-106, miR-128, miR-133a, miR-146b, miR-148a, miR-150, miR-193a, miR-197, miR-200b, miR-221, miR-222, miR-342-3p, miR-497, and miR-548b- 5p. (Kros *et al.*, 2015)

O miRNA-21 é o exemplo mais típico de sobreexpressão e é um factor de pobre prognóstico. Investigações revelaram que existe uma maior expressão de miR-21 na maior parte dos gliomas malignos em comparação com o cérebro normal. Isto sugere que o miRNA-21 pode ser um potencial biomarcador de diagnóstico de glioma maligno. O miRNA-221/222 encontrou-se sobreexpresso em astrocitomas de alto grau, com análoga especificidade, com aumento da invasão celular e pior prognóstico em gliomas.

Por outro lado, vários miRNA com expressão supressiva foram identificados em tumores cerebrais. A subexpressão de miRNA-128 foi relacionada com o aumento da proliferação e diferenciação de células de glioma, e vice-versa.

Neste momento, encontram-se a decorrer ensaios clínicos com o objetivo de identificar miRNA com potencial de prognóstico em amostras de sangue/LCR em pacientes com glioma, durante o curso do tratamento. Por exemplo, um estudo feito por Srinivasan *et al.*, revelou que a expressão de vários miRNA consegue distinguir com sucesso graus de malignidade de gliomas com uma notável sensibilidade e especificidade. (Srinivasan, Patric e Somasundaram, 2011) Além deste, outro estudo feito por Lages *et al.*, apresentou sete miRNA desregulados que permitem a discriminação de oligodendrogliomas de glioblastomas. (Lages *et al.*, 2011)

Um dos maiores obstáculos é a identificação do/s miRNA representativos de gliomas malignos através estudos de grande escala. Estes resultados permitirão desenvolver um conjunto de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico para avaliação clínica e terapêutica.

Em conclusão, o miRNA regula a proliferação de células do tumor, a apoptose, a invasão e a angiogénese através da interação recíproca com o RNA mensageiro alvo. No entanto, a informação detalhada deste processo continua a ser incompleta, e é necessário mais investigação para uma melhor compreensão do papel dos miRNA em gliomas. (Wang e Ma, 2015)

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Dado o baixo prognóstico associado aos tumores cerebrais de alto grau, como os gliomas, e as dificuldades em monitorizar a resposta do tumor à terapia ou a sua progressão, existe uma clara necessidade de abordagens inovadoras para melhorar a avaliação do tumor. Os biomarcadores circulantes surgem então como um meio promissor e não-invasivo para avaliar o estado dos gliomas e, potencialmente, ajudar no seguimento e monitorização da terapia no futuro.

Deste modo, um biomarcador ideal de gliomas seria aquele que poderia ser facilmente testado com técnicas não-invasivas ou minimamente invasivas mas que possuísse alta sensibilidade e especificidade. A dificuldade em encontrar um biomarcador específico para estes tumores reside em parte na natureza heterogénea complexa do tumor em si. A heterogeneidade abrange desde as múltiplas mutações que uma célula de tumor sofre durante a transformação às alterações genómicas entre os vários tipos e subtipos de gliomas. Usar um conjunto de biomarcadores para detectar um painel de alterações ou um conjunto de biomarcadores para detectar uma característica específica será, possivelmente, mais benéfico do que utilizar um único biomarcador. (Tumilson *et al.*, 2014)

Um grande número de candidatos a biomarcadores tem sido descoberto mas, nem as células tumorais circulantes, nem as vesículas extracelulares, DNA, RNA ou miRNA preenchem os requisitos da *Tumor Marker Utility Grading System Levels of Evidence/NCCN* para aplicação clínica ou como monitores em ensaios. O caminho a percorrer desde a descoberta de um novo candidato até à sua validação clínica é longo. Muitas questões têm ainda que ser abordadas tais como relevância biológica, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade das medições. As técnicas de padronização são cruciais para que os candidatos a biomarcadores consigam demonstrar utilidade clínica. Esforços colectivos são necessários para a padronização e validação da recolha e armazenamento de amostras e são necessários grandes estudos prospectivos multicêntricos para alcançar o nível de evidência requerido para introduzir novos biomarcadores na prática clínica. (Kros *et al.*, 2015)

Espera-se então que, num futuro próximo, com o acumular do conhecimento acerca dos mecanismos moleculares subjacentes aos vários tipos de tumores e da dinâmica dos biomarcadores na corrente sanguínea, sejam introduzidos biomarcadores circulantes na prática clínica e que o tratamento dos doentes seja focado na arquitetura genética do tumor em particular em vez de na localização e histologia do mesmo.

7. BIBLIOGRAFIA

AHMED, Rafay *et al.* - Malignant gliomas: Current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods. *Cancer Management and Research*. ISSN 11791322. 6:1 (2014) 149–170.

ARITA, Hideyuki *et al.* - IDH1/2 mutation detection in gliomas. *Brain Tumor Pathology*. . ISSN 1861387X. 32:2 (2015) 79–89.

ATKINSON A.J., Jr *et al.* - Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. ISSN 00099236. 69:3 (2001) 89–95.

BERGHOFF, Anna Sophie *et al.* - Clinical Neuropathology Practice News 4-2012: levels of evidence for brain tumor biomarkers. *Clinical neuropathology*. ISSN 0722-5091. 31:4 206–9.

BEST, Myron G. *et al.* - Liquid biopsies in patients with diffuse glioma. *Acta Neuropathologica*. . ISSN 14320533. 129:6 (2015) 849–865.

BETTEGOWDA, Chetan *et al.* - Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science translational medicine*. ISSN 1946-6242. 6:224 (2014).

BRANDNER, Sebastian; DEIMLING, Andreas VON - Diagnostic, prognostic and predictive relevance of molecular markers in gliomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. .ISSN 03051846. 41:6 (2015) 694–720.

CABRINI, Giulio *et al.* - Regulation of expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and the treatment of glioblastoma (Review). *International journal of oncology*. ISSN 1791-2423. 47:2 (2015) 417–28.

CARRIGAN, Patricia; KRAHN, Thomas - Impact of Biomarkers on Personalized Medicine. *Handbook of experimental pharmacology*. ISSN 0171-2004. 232:2016) 285–311.

CHISTIYAKOV, Dimitry A.; CHEKHONIN, Vladimir P. - Extracellular vesicles shed by glioma cells: pathogenic role and clinical value. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. ISSN 1423-0380. 35:9 (2014) 8425–38.

D’ALESSANDRIS, Quintino Giorgio - Prognostic Impact of MGMT Promoter Methylation in Glioblastoma - A Systematic Review. *Journal of Cancer Science & Therapy*. ISSN 19485956.

06:04 (2014) 136–141.

DIAZ, Luis A.; BARDELLI, Alberto - Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. ISSN 1527-7755. 32:6 (2014) 579–86.

DU, W.; ELEMENTO, O. - Cancer systems biology: embracing complexity to develop better anticancer therapeutic strategies. *Oncogene*. ISSN 1476-5594. August 2014 (2014) 3215–3225.

DUFFY, Michael J. *et al.* - Validation of new cancer biomarkers: a position statement from the European group on tumor markers. *Clinical chemistry*. ISSN 1530-8561. 61:6 (2015) 809–20.

FLOYD, Desiree; PUROW, Benjamin - Micro-masters of glioblastoma biology and therapy: Increasingly recognized roles for microRNAs. *Neuro-Oncology*. ISSN 15235866. 16:5 (2014) 622–627.

FRANCIS, Glenn; STEIN, Sandra - Circulating Cell-Free Tumour DNA in the Management of Cancer. *International journal of molecular sciences*. ISSN 1422-0067. 16:6 (2015) 14122–42.

FRIEDLANDER, Terence W.; PREMASEKHARAN, Gayatri; PARIS, Pamela L. - Looking back, to the future of circulating tumor cells. *Pharmacology & Therapeutics*. ISSN 01637258. 142:3 (2014) 271–280.

GUEDES, Ana Filipa - Estudo de marcadores de diagnóstico e prognóstico em gliomas. 2010).

GUTMAN, Steven; KESSLER, Larry G. - The US Food and Drug Administration perspective on cancer biomarker development. *Nature reviews. Cancer*. ISSN 1474-175X. 6:7 (2006) 565–571.

HADNAGY, Annamaria; BEAULIEU, Raymond; BALICKI, Danuta - Histone tail modifications and noncanonical functions of histones: perspectives in cancer epigenetics. *Molecular cancer therapeutics*. ISSN 1535-7163. 7:4 (2008) 740–8.

HEGI, Monika E. *et al.* - MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine*. ISSN 1533-4406. 352:10 (2005) 997–1003.

HEITZER, Ellen *et al.* - Circulating tumor cells and DNA as liquid biopsies. *Genome medicine*. ISSN 1756-994X. 5:8 (2013) 73.

HOLDHOFF, Matthias *et al.* - Blood-based biomarkers for malignant gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*. ISSN 0167-594X. 113:3 (2013) 345–352.

JANSEN, Michael *et al.* - Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. *The Lancet. Neurology*. ISSN 1474-4465. 9:7 (2010) 717–26.

JENKINS, Robert B. *et al.* - A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Research*. ISSN 00085472. 66:20 (2006) 9852–9861.

JOOSSE, Simon A.; GORGES, Tobias M.; PANTEL, Klaus - Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO molecular medicine*. ISSN 1757-4684. 7:1 (2015) 1–11.

KARSY, Michael *et al.* - A practical review of prognostic correlations of molecular biomarkers in glioblastoma. *Neurosurgical focus*. ISSN 1092-0684. 38:3 (2015) E4.

KREBS, Matthew G. *et al.* - Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. *Nature reviews. Clinical oncology*. ISSN 1759-4782. 11:3 (2014) 129–44.

KRELL, Daniel *et al.* - IDH mutations in tumorigenesis and their potential role as novel therapeutic targets. *Future oncology (London, England)*. ISSN 1744-8301. 9:12 (2013) 1923–35.

KRETH, Simone *et al.* - Epigenetics in human gliomas. *Cancer letters*. ISSN 1872-7980. 342:2 (2014) 185–92.

KROS, Johan M. *et al.* - Circulating glioma biomarkers. *Neuro-oncology*. ISSN 1523-5866. 17:3 (2015) 343–60.

KUCHARZEWSKA, Paulina *et al.* - Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. ISSN 1091-6490. 110:18 (2013) 7312–7.

LABUSSIÈRE, Marianne *et al.* - Combined analysis of TERT, EGFR, and IDH status defines distinct prognostic glioblastoma classes. *Neurology*. ISSN 1526632X. 83:13 (2014) 1200–

1206.

LAGES, Elodie *et al.* - MicroRNA and Target Protein Patterns Reveal Physiopathological Features of Glioma Subtypes. PLoS ONE. ISSN 1932-6203. 6:5 (2011).

LIANG, Shufang; SHEN, Guobo - Biomarkers of Glioma. [Acedido a 10 de junho de 2016] Disponível na internet: http://cdn.intechopen.com/pdfs/19940/InTech-Biomarkers_of_glioma.pdf

LOUIS, David N. *et al.* - The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta neuropathologica. ISSN 0001-6322. 114:2 (2007) 97–109.

LOUIS, David N. *et al.* - The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathologica. ISSN 0001-6322. 2016) 1–18.

LOWES, Lori; ALLAN, Alison - Recent Advances in the Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells. Cancers. ISSN 2072-6694. 6:1 (2014) 595–624.

MACARTHUR, Kelly M. *et al.* - Detection of brain tumor cells in the peripheral blood by a telomerase promoter-based assay. Cancer research. ISSN 1538-7445. 74:8 (2014) 2152–9.

MAHMOUDI, Keon; EZRIN, Alan; HADJIPANAYIS, Costas - Small extracellular vesicles as tumor biomarkers for glioblastoma. Molecular Aspects of Medicine. ISSN 18729452. 45:(2015) 97–102.

MANNE, Upender; SRIVASTAVA, Rashmi-Gopal; SRIVASTAVA, Sudhir - Recent advances in biomarkers for cancer diagnosis and treatment. Drug discovery today. ISSN 1359-6446. 10:14 (2005) 965–76.

MCNAMARA, Mairéad G.; SAHEBJAM, Solmaz; MASON, Warren P. - Emerging biomarkers in glioblastoma. Cancers. ISSN 2072-6694. 5:3 (2013) 1103–19.

MELLAI, Marta *et al.* - The Distribution and Significance of IDH Mutations in Gliomas. [Acedido a 16 de junho de 2016] Disponível na internet: <http://www.intechopen.com/books/evolution-of-the-molecular-biology-of-brain-tumors-and-the-therapeutic-implications/the-distribution-and-significance-of-idh-mutations-in-gliomas>

MULLER, C. *et al.* - Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. Science Translational Medicine. ISSN 1946-6234. 6:247 (2014).

PREUSSER, Matthias - Clinically useful biomarkers in neurooncology. *Memo - Magazine of European Medical Oncology*. ISSN 18655041. 5:3 (2012) 201–204.

QU, Shengtao; GUAN, Junhong; LIU, Yunhui - Identification of microRNAs as novel biomarkers for glioma detection: A meta-analysis based on 11 articles. *Journal of the Neurological Sciences*. ISSN 18785883. 348:1-2 (2015) 181–187.

REDZIC, Jasmina S.; UNG, Timothy H.; GRANER, Michael W. - Glioblastoma extracellular vesicles: reservoirs of potential biomarkers. *Pharmacogenomics and personalized medicine*. ISSN 1178-7066. 7: (2014) 65–77.

SCHWARZENBACH, H.; HOON, D. S. B.; PANTEL, K. - Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. ISSN 1474-175X 1474-1768. 11:6 (2011) 426–437.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin - Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. ISSN 00079235. 66:1 (2016) 7–30.

SRINIVASAN, Sujaya; PATRIC, Irene Rosita Pia; SOMASUNDARAM, Kumaravel - A Ten-microRNA Expression Signature Predicts Survival in Glioblastoma. *PLoS ONE*. ISSN 1932-6203. 6:3 (2011) e17438.

STANCHEVA, Gergana *et al.* - IDH1/IDH2 but not TP53 mutations predict prognosis in Bulgarian glioblastoma patients. *BioMed Research International*. ISSN 23146141. 2014:2014).

STUPP, R. *et al.* - High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. ISSN 0923-7534. 25:suppl 3 (2014) iii93–iii101.

STUPP, Roger *et al.* - Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. [Acedido a 16 de junho de 2016] Disponível na internet: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa043330#t=article>

TORRE, Lindsey A. *et al.* - Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. ISSN 1542-4863. 65:2 (2015) 87–108.

TUMILSON, Charlotte A. *et al.* - Circulating microRNA biomarkers for glioma and predicting response to therapy. *Molecular neurobiology*. ISSN 1559-1182. 50:2 (2014) 545–58.

WANG, Bao-Cheng; MA, Jie - Role of MicroRNAs in Malignant Glioma. *Chinese medical*

journal. ISSN 0366-6999 (Print). 128:9 (2015) 1238–1244. d

WELLER, Michael *et al.* - MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nature reviews. Neurology.* ISSN 1759-4766. 6:1 (2010) 39–51.

WEN, Patrick Y.; KESARI, Santosh - Malignant gliomas in . *The New England journal of medicine.* ISSN 1533-4406. 359:5 (2008) 492–507.

WESTPHAL, Manfred; LAMSZUS, Katrin - Circulating biomarkers for gliomas. *Nature reviews. Neurology.* ISSN 1759-4766. 11:10 (2015) 556–66.

WHO | Cancer - WHO. 2016). - [Acedido a 13 de junho de 2016] Disponível na internet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (2016)

WICK, Wolfgang *et al.* - NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* ISSN 1527-7755. 27:35 (2009) 5874–80.

WICK, Wolfgang *et al.* - Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology.* ISSN 1474-5488. 13:7 (2012) 707–15.

WICK, Wolfgang *et al.* - MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment. *Nature reviews. Neurology.* ISSN 1759-4766. 10:7 (2014) 372–85.

YAN, Hai *et al.* - IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. [Acedido a 15 de junho de 2016] Disponível na internet: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0808710#t=article>

YING, Weihai - NAD⁺ and NADH in cellular functions and cell death. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* ISSN 1093-9946. 11: (2006) 3129–48.

ZHAO, Jiaxin; MA, Wenjie; ZHAO, Hong - Loss of heterozygosity 1p/19q and survival in glioma: A meta-analysis. *Neuro-Oncology.* . ISSN 15235866. 16:1 (2014) 103–112.

8. ANEXOS

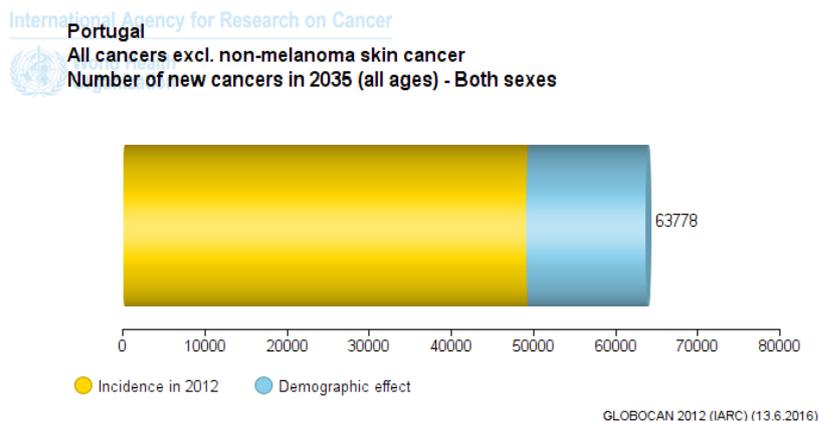


Figura 1 – Número de novos casos de cancro em Portugal em 2035 (excluindo cancro da pele que não seja melanoma). [Adaptado de: http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx, consultado no dia 13.06.2016]

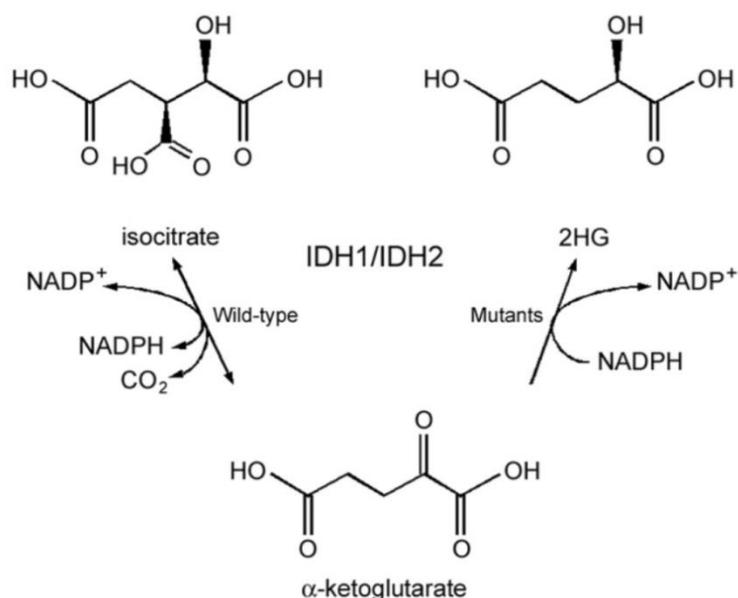


Figura 2 – Actividade enzimática das isoformas IDH, *wild-type* e mutante. [Adaptado de (Mellai et al., 2013)]

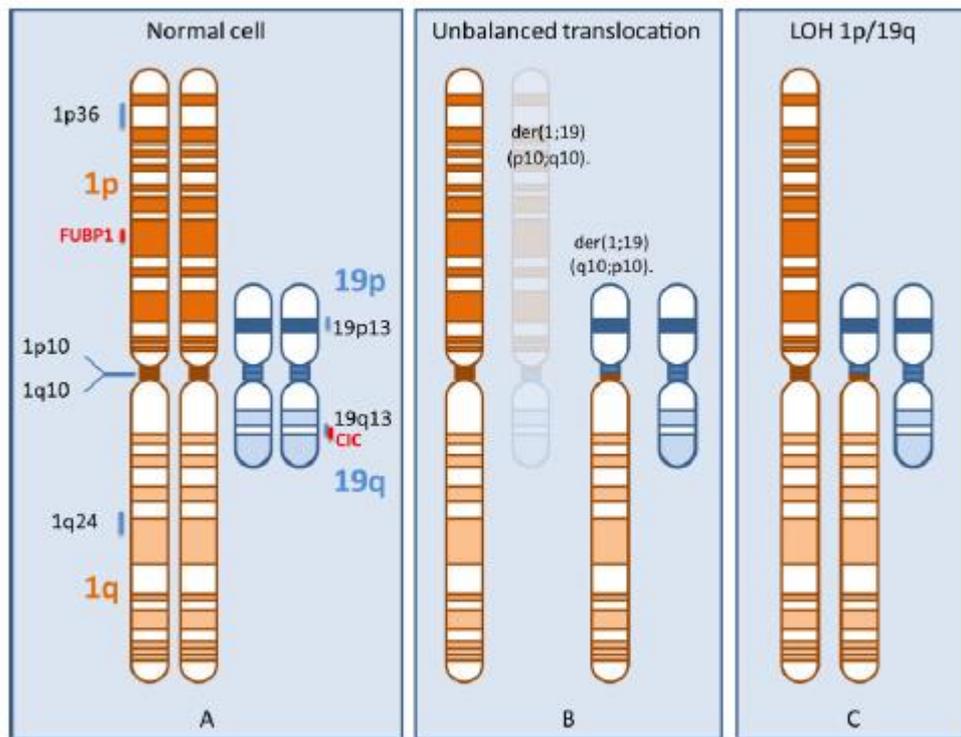


Figura 3 – Translocação cromossômica que conduz à codelação 1p/19q. (A) Uma célula normal contém 2 cópias do cromossoma 1 e 19, cada uma delas contendo um braço curto (p) e outro longo (q). (B) Uma translocação não equilibrada resulta numa transposição ao nível do centrómero do 19q para o 1p (esquerda, sombreado) e a sua perda subsequente, e a formação de um cromossoma derivativo constituído por 1q e 19p, $der(1;19)(p10;q10)$, no qual 'p10' e 'q10' indica a localização centromérica no cromossoma. (C) A perda dos braços cromossômicos 1p e 19q resulta numa cópia do 1p e do 19q e duas cópias do 1q e do 19p. [Adaptado de (Brandner e Deimling, von, 2015)]

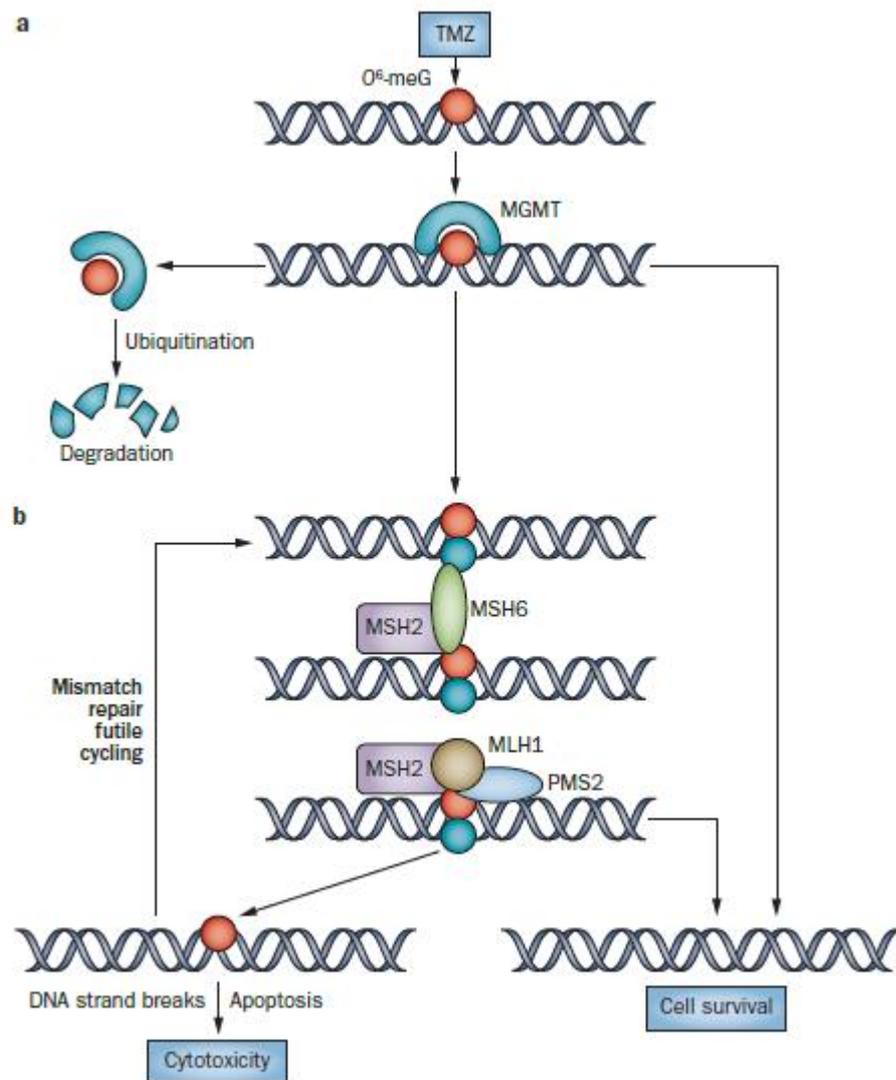


Figura 4 – Reparação do DNA mediada pela enzima MGMT. A quimioterapia alquilante pelo agente temozolomida causa modificações citotóxicas no DNA tal como a conversão de guanina em guanina metilada (círculo vermelho) que podem ser corrigidas pela enzima MGMT. (a) A enzima MGMT sequestra o grupo metil da guanina metilada, restaurando assim o estado normal da guanina. Este processo leva à inativação irreversível da enzima MGMT e à sua degradação mediada pela ubiquitina. (b) Se a guanina metilada não é reparada pela enzima MGMT, devido à sua baixa expressão ou silenciamento epigenético, esta emparelha com a timina (círculo azul) durante a replicação do DNA. O desemparelhamento guanina metilada-timina é reconhecido por mecanismos de reparação que conduzem à paragem do ciclo e à morte celular. Legenda: MGMT, O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase; TMZ, temozolomida; MSH2, MLH1, PMS2, MSH6 são proteínas de reparação. [Adaptado de (Wick *et al.*, 2014)]