



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências da Saúde

# **Abordagem Terapêutica de Gliomas Cerebrais de Alto Grau**

**Pedro Miguel Gaspar Alves**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Medicina**

(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Doutor Pedro Simões Rosado

**Covilhã, maio de 2014**

# Dedicatória

Aos meus Pais que o tornaram possível!

Ao meu orientador, pela sua dedicação.

A todos os que de alguma forma me ajudaram nesta jornada acadêmica e pessoal.

*“Medicina é a ciência da incerteza e a arte da probabilidade.”*

William Osler (1849-1919)

## Agradecimentos

As primeiras palavras de agradecimento vão para aquele que me soube guiar desde o primeiro dia, o Doutor Pedro Simões Rosado. Pela orientação que vai muito além desta tese, pela disponibilidade. Se procurei uma janela de conhecimento disponível para uma simples orientação, encontrei um mundo de saber e compreensão inestimáveis, para hoje e para o amanhã.

Aos meus pais e irmão, pelo apoio incondicional, pela paciência, dedicação e confiança que sempre depositaram em mim.

Ao Bruno e à Ana por dispenderem parte do seu valioso tempo para me ajudar a construir este trabalho.

Ao Vasco e à Joana por fazerem parte da minha vida há largos anos, e com isso contribuírem para a estabilidade necessária face às dificuldades associadas à realização de um trabalho desta magnitude.

Aos meus colegas de faculdade pela paciência e apoio necessários nos últimos meses.

Aos meus restantes amigos pelo apoio moral.

## Resumo

Os gliomas são os tumores cerebrais primários mais frequentes, representando mais de 70% de todas as neoplasias do Sistema Nervoso Central. Tanto o diagnóstico como a classificação destes tumores são baseados nas características histopatológicas que, por vezes, são difíceis de definir. Apesar dos avanços na neurocirurgia, quimioterapia e radioterapia, o prognóstico dos doentes com gliomas continua muito reservado.

Nos últimos anos, diversos estudos em gliomas identificaram marcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico, úteis na definição da classificação histológica. A codeleção 1p/19q, a presença de mutações somáticas em genes que codificam isocitrato desidrogenase e a hipermetilação da região promotora do gene MGMT são os três marcadores com maior relevância na atualidade.

Nas últimas duas décadas, o tratamento para os gliomas de alto grau envolveu uma abordagem multidisciplinar, que se baseava em ressecção cirúrgica máxima, quando possível, seguida de radioterapia e quimioterapia. Esta constitui a abordagem terapêutica convencional, com um grande número de ensaios clínicos que revelaram na sua maioria pequenas melhorias que não são satisfatórias. Com a evolução da nanotecnologia em plena expansão, surgiram agora os primeiros estudos sobre a aplicação desta tecnologia inovadora na abordagem terapêutica dos gliomas de alto grau. Novas técnicas de diagnóstico e terapêuticas baseadas em nanomateriais oferecem opções promissoras no tratamento de gliomas malignos. No entanto, a entrega de nanopartículas para tumores cerebrais malignos representa um desafio devido à presença da barreira hemato-encefálica e às células tumorais infiltradas no cérebro normal que não são facilmente detetadas.

As nanopartículas magnéticas representam o nanomaterial mais promissor para direcionar a terapêutica às células tumorais e simultaneamente obter imagens em tempo real, devido às suas propriedades paramagnéticas, permitindo localizar o tumor. A conjugação de péptidos ou anticorpos na superfície destas nanopartículas permite o direcionamento direto à superfície da célula tumoral e potencial rutura das vias de sinalização ativas presentes nas células tumorais. Esta conjugação de péptidos ou anticorpos será fulcral para permitir atingir todas as células tumorais, inclusive as que não são detetadas nos meios convencionais de diagnóstico. Neste momento, encontram-se em curso numerosos estudos para permitir compreender o impacto destas nanopartículas magnéticas no tratamento de tumores cerebrais malignos, com especial interesse nos gliomas cerebrais de alto grau.

## Palavras-Chave

Gliomas de alto grau, marcadores moleculares, abordagem terapêutica, temozolamida, radioterapia, neurocirurgia, nanopartículas.

## Abstract

Gliomas are the most frequent primary brain tumors, accounting for over 70% of all neoplasms of the central nervous system. Diagnosis and classification of these tumors are based on the histopathological characteristics that are sometimes difficult to define. Despite advances in neurosurgery, chemotherapy and radiotherapy, the prognosis of patients with gliomas remains very poor.

In recent years, various studies in gliomas identified molecular markers for diagnostic and prognostic, useful in defining the histological classification. The co-deletion 1p/19q, the presence of somatic mutations in genes encoding isocitrate dehydrogenase and hypermethylation of the promoter region of the MGMT gene are the three markers with greater relevance today.

In the last two decades, treatment for high-grade gliomas involved a multidisciplinary approach, which was based on maximum surgical resection, when possible, followed by radiotherapy and chemotherapy. This is the conventional therapeutic approach, with a large number of clinical trials that showed mostly small improvements that are unsatisfactory. With the development of nanotechnology in full expansion, the first studies on the application of this innovative technology in the management of high-grade gliomas have emerged. Novel diagnostic and therapeutic techniques based on nanomaterials provide promising options in the treatment of malignant gliomas. Delivery of nanoparticles to malignant brain tumors represents a formidable challenge due to the presence of the blood-brain barrier and infiltrating cancer cells in the normal brain.

The magnetic nanoparticles are the most promising nanomaterial to direct therapy to tumor cells and simultaneously obtain images in real time, due to its paramagnetic properties, enabling you to locate the tumor. Conjugation of peptides or antibodies to the surface of MNPs allows direct targeting of the tumor cell surface and potential disruption of active signaling pathways present in tumor cells. This conjugation of peptides or antibodies will be crucial to enable reach all tumor cells, including those that are not detected in conventional diagnostics. At the moment, there are numerous ongoing studies to enable understanding of the impact of magnetic nanoparticles in the treatment of malignant brain tumors, with special interest in cerebral high-grade gliomas.

## Keywords

*High grade gliomas, Molecular markers, therapeutic approach, Temozolomide, radiotherapy, neurosurgery, nanoparticles.*

# Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	iv
Palavras-Chave .....	v
Abstract.....	vi
Keywords.....	vii
Índice .....	viii
Lista de figuras .....	x
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Acrónimos.....	xii
Introdução.....	1
Capítulo 1. Características e o impacto dos gliomas na nossa realidade .....	3
1.1 Neoplasias malignas.....	3
1.1.1 Tumores do Sistema Nervoso Central.....	3
1.2 Gliomas.....	4
1.2.1 Incidência .....	4
1.2.2 Etiologia.....	4
1.2.3 Classificação .....	5
1.2.4 Novos marcadores moleculares de gliomas .....	6
Capítulo 2. Abordagem terapêutica de gliomas cerebrais de alto grau .....	9
2.1 Considerações gerais.....	9
2.2 Radioterapia.....	10
2.3 Cirurgia .....	12
2.4 Quimioterapia .....	14
2.5 Abordagem mista/combinada .....	16
2.6 Tratamento nas recidivas.....	16
2.7 Novas modalidades terapêuticas.....	18
Capítulo 3. Nanomedicina.....	20
3.1 Considerações gerais.....	20
3.2 Nanopartículas .....	21

3.3 Aplicabilidade nos gliomas de alto grau.....	22
Capítulo 4. Conclusões e perspectivas futuras .....	25
Referências Bibliográficas .....	27

## Lista de figuras

Figura 1 - Um exemplo de pseudoprogressão num paciente com GB durante o tratamento com Tmz e RT concomitante ..... 14

Figura 2 - NPM e a sua interação com o tumor ..... 22

# Lista de Tabelas

Tabela 1 - Gliomas malignos: epidemiologia e prognóstico ..... 4

## Lista de Acrónimos

- AA - Astrocitoma Anaplásico
- ADN - ácido desoxirribonucleico
- BHE - Barreira hemato-encefálica
- CED - Convection-enhanced delivery
- FCEV - Fator de crescimento endotelial vascular
- GAG - Gliomas de Alto Grau
- GBM - Glioblastoma Multiforme
- Gy - Grays
- GRTO - Grupo de Radioterapia Oncológica
- IARC - Agência Internacional de Investigação do Cancro
- IDH - Isocitrato Desidrogenase
- INCC - Instituto Nacional de cancro Canadiense
- MGMT - O6-metilguanina ADN-metiltransferase
- nm - nanómetro
- NOA - Grupo neuro-oncológico alemã
- NP - Nanopartícula
- NPM - Nanoparticula Magnética
- OA - Oligodendroglioma Anaplásico
- OEPTC - Organização Europeia de Pesquisa e Tratamento do Cancro
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- QT - Quimioterapia
- RFCDP - Recetor do fator de crescimento derivado das plaquetas
- RFCE - Recetor do fator de crescimento epidérmico
- RMN - Ressonância Magnética Nuclear
- RT - Radioterapia
- TC - Tomografia Computadorizada
- Tmz - Temozolamida
- VAC - Volume alvo clinico
- VBT - Volume bruto do tumor

# Introdução

Glioma é o termo utilizado para designar tumores com origem nas células da glia (astrócitos, oligodendrócitos, microglia e ependimárias). Os principais gliomas cerebrais de alto grau são o astrocitoma anaplásico (AA) e o glioblastoma multiforme (GBM).

O GBM é a forma mais maligna dos gliomas e constitui o tumor cerebral maligno mais comum em adultos[1]. Mesmo tendo em conta que é um tumor relativamente raro, não deixa de ser significativo e de particular interesse, uma vez que a sobrevida média após o diagnóstico não ultrapassa os 20 meses e apenas 5% alcançam os 5 anos[1]. Uma das principais razões para o mau prognóstico que lhe é imputado é o diagnóstico tardio, frequentemente no último estágio do tumor. Outra razão significativa, e possivelmente determinante é a ineficácia das terapêuticas aplicadas no presente, é neste campo da abordagem terapêutica que os esforços se têm multiplicado, sem se assistir a grandes melhorias no que toca ao prognóstico. Os estudos têm recaído em duas vias para o tratamento farmacológico cujo denominador se fixa nas diferenças observadas entre as células cancerígenas e os tecidos saudáveis. A primeira tem como alvo as células cancerígenas propriamente ditas enquanto a segunda tem como objetivo o bloqueio da angiogénese, contrariando a estimulação tumoral. Em ambos os casos não têm sido obtidas melhorias significativas.

Como alternativa recorre-se ao tratamento cirúrgico, não esquecendo os inúmeros casos em que tal não é possível face à complexidade do cérebro e ao alto grau de morbidade associado[2]. Nos casos em que a neurocirurgia é uma opção válida com a respetiva ressecção tumoral, é necessária radioterapia (RT) e/ou quimioterapia (QT) adjuvante. Apesar desta forma combinada observa-se num curto espaço de tempo a recidiva do tumor em quase todos os casos o que limita as opções de tratamento. No presente, as diversas terapêuticas aceites, como a temozolamida (Tmz), apenas atrasam o inevitável, o que reforça a importância de uma investigação aprofundada em busca de novas respostas.

Neste trabalho pretende-se sintetizar os resultados obtidos com as diversas modalidades terapêuticas e introduzir uma nova área, a nanomedicina, na qual se deposita esperança para uma melhoria do prognóstico atual dos gliomas de alto grau (GAG). Esta área encontra-se em grande e visível expansão face ao acentuado desenvolvimento tecnológico, nas quais se inserem as nanopartículas magnéticas (NPM) que poderão constituir a chave para uma nova era no tratamento dos gliomas cerebrais e mais concretamente do glioblastoma.

Os principais desafios que este tipo de tumores representa, são a sua inacessibilidade face à permeabilidade seletiva da barreira hemato-encefálica (BHE) e a incapacidade de atingir todas as células tumorais com os tratamentos convencionais devido à sua grande capacidade infiltrativa. As nanopartículas (NP) podem, num futuro próximo, ser a resposta para ultrapassar estes obstáculos, através de técnicas que possibilitem ultrapassar a BHE. O grande potencial que possuem também se deve à possibilidade de serem associadas a todo o tipo de

materiais de revestimento, inclusive ligandos específicos para as células tumorais que pretendemos atingir.

A metodologia usada para este trabalho, baseou-se numa revisão sistemática da literatura sobre esta temática nas bases de dados de medicina baseada na evidência: *UptoDate*, *Clinical Evidence*, *Evidence Based Medicine* e *PubMed*.

Não se fez restrição da data de publicação dos artigos, mas estes foram selecionados tendo preferência pela sua atualidade. Na pesquisa, não existiu restrição de idioma. A pesquisa foi realizada entre 15 de Novembro de 2013 e 20 de Abril de 2014. Para a elaboração da presente monografia foram também consultados livros, manual e eletronicamente, os quais foram devidamente referenciados na Bibliografia.

# Capítulo 1. Características e o impacto dos gliomas na nossa realidade

## 1.1 Neoplasias malignas

Designa-se neoplasias a um grupo de doenças caracterizadas por crescimento descontrolado e anormal das células. De acordo com as estimativas da Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC), ocorreram em 2008, 12.7 milhões de novos casos de cancro e 7.6 milhões de mortes resultantes. Segundo as estimativas da IARC é esperado que em 2030 se atinjam 21.4 milhões de novos casos de cancro e 13.2 milhões de mortes, devido ao envelhecimento da população, assim como a redução da mortalidade infantil e a diminuição das mortes associadas a doenças infecciosas nos países em desenvolvimento[3].

Como facilmente podemos constatar, os dados apontam para uma quase duplicação no número de novos casos anuais e na mortalidade associada ao cancro.

Em geral, o cancro é um processo lento, que se inicia numa única célula, devido a um evento mutacional em genes determinantes e que, depois, se desenvolve em múltiplos estádios, através da acumulação de alterações genéticas e epigenéticas que resultam na transformação de uma célula normal em célula cancerígena [4]. Estas alterações podem ser adquiridas hereditariamente ou ao longo da vida de um indivíduo.

### 1.1.1 Tumores do Sistema Nervoso Central

Mundialmente, foram diagnosticados aproximadamente 256 mil novos casos de tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) em 2012, com uma estimativa de 189 mil mortes. Em geral, a incidência de tumores cerebrais primários é superior na raça branca comparativamente à raça negra, e a mortalidade é superior no sexo masculino em relação ao sexo feminino[3].

Metástases cerebrais superam a incidência das neoplasias primárias do cérebro numa razão de 10 para 1, e afetam 20% a 40% dos pacientes com cancro[5]. Tumores cerebrais correspondem de 85% a 90% de todos os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC)[3].

Os tumores das células gliais, AA e GBM, são responsáveis por aproximadamente 38% dos tumores cerebrais primários. Os AA representam menos de 10% de todos os gliomas do SNC. Contudo, dado que são agressivos e muitas vezes incluídos em estudos com GBM, são amiúde tratados da mesma forma. Meningiomas e outros tumores mesenquimais são responsáveis por aproximadamente 27% dos tumores cerebrais primários[3].

## 1.2 Gliomas

### 1.2.1 Incidência

O diagnóstico e posterior estadiamento dos tumores cerebrais primários segue a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS)[6]. A incidência anual de gliomas situa-se em 5-6/100.000 pessoas (tabela 1).

**Tabela 1-** Gliomas malignos: epidemiologia e prognóstico[7].

	Incidência anual por 100,000	Sobrevivência a 1 ano (%)	Sobrevivência a 3 anos (%)	Sobrevivência a 5 anos (%)
Astrocitoma anaplásico	0.41	60.3	34.7	27.4
Oligodendroglioma anaplásico	0.12	79.9	59.6	49.4
Glioblastoma	3.19	34.6	7.3	4.8

Gliomas representam mais de 70% de todos os tumores do SNC, sendo o mais frequente e maligno o GB[8]. Houve um aumento recente na incidência de gliomas cerebrais de alto grau no mundo ocidental, particularmente na população idosa. Isto reflete provavelmente fatores como a maior disponibilidade e a evolução dos exames complementares de diagnóstico, nomeadamente os imagiológicos[9]. A idade média para o diagnóstico é de 45 anos no estadiamento III e de 60 anos para o estadiamento IV[10]. Existe uma incidência superior no sexo masculino.

### 1.2.2 Etiologia

Na maioria dos casos, não são associados fatores de risco. Apesar disso é possível identificar a exposição à radiação ionizante como um fator de risco, como nos casos de tratamento anterior por RT[8]. Muitos outros fatores foram estudados nos quais se incluem traumatismos cranianos, campos eletromagnéticos, tabaco e mais recentemente o uso de telemóveis. Nenhum foi comprovado como fator de risco para o desenvolvimento de GAG[11].

Aproximadamente 5% dos doentes com GAG têm uma história familiar de gliomas[12]. A etiologia da maioria dos gliomas malignos permanece desconhecida, exceção feita às síndromes hereditárias como a neurofibromatose, esclerose tuberculosa, síndrome de Li Fraumeni, síndrome de Turcot, e síndrome de Cowden. Tanto as alterações não hereditárias como a irradiação são ocorrências raras, sendo responsáveis por menos de 10% de todos os gliomas, sugerindo com efeito que anormalidades genéticas complexas combinadas com fatores ambientais desconhecidos predispoem indivíduos ao desenvolvimento de gliomas[13].

### 1.2.3 Classificação

Em 1926, Bailey e Cushing estabeleceram o primeiro esquema, amplamente aceite, de classificação de neoplasias astrocíticas[14]. Desde então têm-se reunido esforços no sentido de melhorar esta classificação e, por conseguinte, facilitar a orientação diagnóstica e prognóstica, com destaque para os contributos das recentes modalidades imagiológicas e marcadores imunocitoquímicos e genéticos/moleculares. Apesar dos avanços referidos no que toca à informação disponível sobre estes tumores, o seu tratamento e seguimento não foi alterado significativamente[15].

Existem dois tipos de glioblastomas diferenciados com base na sua origem e fenótipo molecular: primário (de novo) e secundário. O subtipo primário representa a maioria (90%) dos doentes com GB e desenvolve-se rapidamente num espaço de semanas, apresentando-se como um tumor de grau IV. Glioblastomas secundários apresentam-se como gliomas de baixo grau e eventualmente progridem para grau IV. Apesar desta distinção, após o diagnóstico estabelecido, a sobrevivência média para pacientes tratados com cirurgia e RT concomitante associada a Tmz, seguido de Tmz adjuvante, é de aproximadamente 15 meses[16].

O estadiamento é determinado pela parte do tumor com maior grau de malignidade, o que nos projeta para a importância de uma amostra adequada, nomeadamente através de procedimentos de biópsia[11]. Os gliomas são diferenciados em baixo grau e alto grau consoante o seu prognóstico e o tipo histológico de tumor. Os tumores de grau I e II são referidos como gliomas de baixo grau e os tumores de grau III e IV são referidos como GAG[7,17].

Nesta última classificação, alto grau, incluem-se os AA, oligoastrocitomas anaplásicos (OA) e oligodendrogliomas (grau III, OMS), assim como os GBM (grau IV, OMS), que no seu conjunto são referidos como gliomas malignos.

Segundo a OMS o estadiamento tumoral tem 4 categorias. O grau I aplica-se a lesões com baixo potencial proliferativo e com possibilidade de cura após ressecção cirúrgica. Neoplasias de grau II são geralmente infiltrativas e apesar da sua baixa atividade proliferativa usualmente recidivam. Algumas destas neoplasias tendem a progredir para estágios superiores de malignidade. A designação de grau III da OMS é geralmente reservada para lesões com evidência histológica de malignidade, como é o caso dos astrocitomas. Apresentam-se com anaplasia focal ou dispersa e um potencial proliferativo acentuado com aumento da celularidade, atipia nuclear e atividade mitótica evidente. A designação de grau IV pela OMS está associada a polimorfismo celular, atipia nuclear, atividade mitótica, trombose vascular, proliferação microvascular e são neoplasias com propensão para necrose tipicamente associadas a uma evolução rápida da doença, tanto no pré como no pós-operatório, com um desfecho quase sempre fatal[6, 11].

O estadiamento tem sido sistematicamente avaliado e aplicado com sucesso, como no caso particular de um espectro de tumores astrocíticos difusamente infiltrativos. Estas neoplasias são diferenciadas em 3 categorias hierarquizadas num sistema similar ao de Ringertz [18] e St Anne-Mayo[19]. A OMS define que tumores astrocíticos difusamente infiltrativos apenas com citologia atípica são de grau II (astrocitoma difuso), aqueles que demonstram adicionalmente anaplasia e atividade mitótica são grau III (AA), e aqueles que ainda apresentam proliferação microvascular e/ou necrose são grau IV[6].

#### 1.2.4 Novos marcadores moleculares de gliomas

O progresso nas técnicas moleculares permitiu a identificação de uma variedade de marcadores e perfis genéticos que caracterizam os gliomas para lá dos critérios histológicos. Até ao momento, a maioria não teve o impacto clínico esperado, dado que a informação ainda não é robusta o suficiente para o processo de decisão clínica.

Alguns marcadores moleculares, contudo, foram apresentados aos clínicos nos últimos anos e têm-se demonstrado úteis na identificação de subtipos de gliomas (diagnóstico), assim como na orientação do seguimento da doença (prognóstico) e na escolha do tratamento. Isto é notório nos pacientes com gliomas astrocíticos e oligodendrogliomas de grau III, que são particularmente difíceis de distinguir apenas com critérios morfológicos.

Em 2013, três marcadores moleculares foram considerados ferramentas úteis para a orientação dos gliomas de alto grau: perda alélica de 1p/19q, hipermetilação da região promotora do gene O-6-metilguanina-ADN metiltransferase (MGMT), e a mutações nos genes isocitrato desidrogenase 1 e 2, IDH1 e IDH2.

##### 1.2.4.1 Perda alélica 1p/19q

Esta codeleção é consequência de uma translocação não equilibrada entre os braços dos cromossomas 1 e 19. Tumores que contêm células com esta translocação, com a perda completa de 1p e 19q, foram associados a um fenótipo oligodendroglial, prognóstico melhor, e uma melhor resposta ao tratamento pós-operatório, apesar do papel biológico deste marcador ser pouco claro. Em 2012, os resultados de estudos acompanhados durante 11-12 anos do Grupo de Radioterapia Oncológica e da Organização Europeia para pesquisa e tratamento do Cancro (GRTO-OEPTC) demonstraram que o benefício da sobrevivência média, resultante da adição de QT à RT, é limitado aos pacientes com tumores oligodendrogliais anaplásicos com a codeleção 1p/19q [20, 21]. A codeleção completa 1p/19q deve ser distinguida da perda parcial, que por sua vez não tem importância prognóstica. Evidências sugerem que é homogénea dentro do tumor e não se modifica durante a evolução da doença [22]. Verificou-se que a hipermetilação da região promotora do gene MGMT foi

significativamente mais elevada em tumores com esta codeleção, quando comparados com tumores sem alteração em 1p e 19q[23].

Entende-se então que a codeleção 1p/19q é bastante indicativa da morfologia de tumores oligodendrogliais, tornando-se um marcador interessante em termos de diagnóstico[24], nomeadamente na confirmação histológica[25].

#### 1.2.4.2 Metilação da região promotora do gene MGMT

A metilação da região promotora do gene MGMT resulta no silenciamento epigenético da metiltransferase, a qual perde a atividade de reparação genética. Esta metilação aparenta ser um fator de prognóstico prevalente nos gliomas de estadio II-IV, apesar de se verificar uma frequência menor à medida que a malignidade dos tumores aumenta[26]. A reparação das lesões de ADN é essencial para a integridade celular e a ausência de expressão do gene MGMT é, por isso, um fator de mau prognóstico, uma vez que conduz à acumulação de mutações e instabilidade cromossómica [27].

Há mais de 15 anos atrás, relatórios indicavam que a alta atividade da proteína MGMT nos gliomas estava relacionada com a resistência aos agentes alquilantes que estão entre os fármacos mais amplamente usados no tratamento do cancro humano. Os agentes alquilantes, como as nitrosureias, são moléculas muito reativas responsáveis por induzir a morte celular, pela formação de ligações cruzadas entre cadeias de ADN adjacentes, sendo a posição mais frequente a O6-guanina. Em 2000, a metilação da região promotora do gene da MGMT estava ligada a evolução favorável. Em 2005, a metilação da região promotora da MGMT comprovada por uma reação em cadeia da polimerase-metilação específica era capaz de prever o benefício da adição de QT com Tmz à RT no tratamento de GBM[28]. No entanto, a padronização de um ensaio de MGMT para uso clínico difundido foi um desafio, e as decisões terapêuticas continuaram a ser feitas sem o conhecimento do status de MGMT. Em 2012, dois ensaios randomizados realizados numa população em crescimento de doentes idosos com GBM demonstrou consistentemente que a hipermetilação da região promotora do gene MGMT é um biomarcador preditivo poderoso para o benefício do uso de Tmz. Com base nestes dados, pelo menos na população idosa, um teste ao gene MGMT deverá ser um procedimento padrão para a tomada de decisões (QT vs RT), apesar de este teste não estar amplamente divulgado[13].

#### 1.2.4.3 Mutações IDH1 e IDH2

Mutações pontuais nos genes que codificam as enzimas IDH1 e IDH2, originalmente descobertas em 2008, ocorrem na maioria dos gliomas de baixo grau (>80%) e GAG secundários. A frequência destas mutações não se altera durante a progressão do grau II para os graus III ou IV (conhecidos por gliomas secundários) tal como no caso da codeleção 1p/19q. Existem evidências de que os GBM primários e secundários se desenvolvem através de vias

genéticas diferentes, apesar de permanecerem histomorfologicamente indistinguíveis ao diagnóstico.

Mutações IDH1/2, que ocorrem no início da formação dos gliomas, alteram a função das enzimas, passando estas a produzir 2-hidroxioglutarato, um possível oncometabolito, ao invés do  $\alpha$ -cetoglutarato. Foi demonstrado que os níveis de 2-hidroxioglutarato estão elevados em amostras de gliomas, tornando as células mais vulneráveis à QT e à RT[29]. As mutações são capazes de aumentar a metilação nos gliomas. Gliomas com a mutação IDH1 ou, menos frequentemente, IDH2, estão associados a um melhor prognóstico quando comparados com os outros [28]. A mutação IDH pode ser facilmente detetada através da imunohistoquímica e de uma forma potencialmente não invasiva através da espectroscopia de RMN. Células gliais não tumorais nunca expressam a mutação IDH, uma referência que pode ser usada para diferenciar a gliose reativa de gliomas. Astrocitoma pilocítico (estadio I, OMS), ependimoma, e GBM primário (mas não GBM secundário) não possuem mutações IDH[30]. De notar que as mutações da IDH não são alterações específicas dos gliomas.

# Capítulo 2. Abordagem terapêutica de gliomas cerebrais de alto grau

## 2.1 Considerações gerais

Entre mais de 100 subgrupos histológicos diferentes de tumores cerebrais, os GAG são as entidades mais frequentes, sendo responsáveis por mais de 50% dos tumores cerebrais primários, dependendo da idade e do país. A incidência do GAG tem aumentado nas últimas décadas e tornou-se significativa na população idosa. Apesar de avanços importantes e recentes no entendimento dos mecanismos de base molecular dos GAG, melhorias notáveis na imagiologia, cirurgia, e RT, assim como a descoberta de uma série de novos fármacos promissores, o prognóstico global permanece reservado, com poucas exceções[31].

Na atualidade as opções terapêuticas disponíveis no tratamento de gliomas, (que incluem, em linhas gerais, cirurgia, RT e QT), ainda não são suficientemente eficazes no controlo da progressão da doença. A sobrevida máxima é alcançada nos doentes que são submetidos a uma ressecção total, seguida de RT e Tmz, mas a sobrevida média nesta população continua a ser de apenas 20 meses[32].

No passado, um erro comum foi a inclusão de todos os GAG na mesma categoria, ou seja, tumores de grau III e IV (OMS) eram incluídos nos mesmos protocolos de tratamento e de estudo, apesar das suas características e prognósticos serem bastante diferentes. Em termos histopatológicos, gliomas de grau IV ou GBM apresentam características de necrose e proliferação microvascular intensa, que não são encontradas nos astrocitomas anaplásicos de grau III ou oligodendrogliomas anaplásicos[31].

O ensaio preponderante da Organização Europeia de Pesquisa e Tratamento do Cancro juntamente com o Instituto Nacional de Cancro do Canadá (OEPTC-INCC), publicado em 2005 e atualizado em 2009, estabeleceu o tratamento standardizado para GBM [33, 34]. Apesar de uma minoria significativa de pacientes sobreviver vários anos,[28, 35] a maioria sucumbe à doença. Progresso também foi feito no que toca a AA e OA[20, 21], para os quais o prognóstico é menos sombrio. A qualidade de vida relacionada com a saúde é uma ferramenta de importância crescente nos GAG[36, 37], devendo ser um aspeto a incluir em qualquer ensaio prospetivo, de forma a facilitar a decisão terapêutica final.

A abordagem com melhores resultados em relação aos GAG envolve uma equipa multidisciplinar. As opções para essa abordagem vão desde o tratamento conservador à cirurgia e terapia adjuvante. O principal objetivo é o diagnóstico e o prolongamento da sobrevida sem intercorrências. A dexametasona tem uma importância vital no controlo rápido do edema cerebral associado aos tumores. Uma eventual ineficácia dos esteróides sugere um

maior déficit neurológico no caso de uma resseção cirúrgica radical[38]. Uma abordagem conservadora é uma opção válida em pacientes com um prognóstico reservado devido à sua idade e às suas comorbidades. Nesta situação é importante um tratamento paliativo/de suporte com boa qualidade[11].

Preditores fortes de resultados benéficos não estão relacionados com o tratamento em si, mas sim com o paciente e não podem ser alterados; incluem-se nestas condições a idade, a pontuação de desempenho, o estado mental e mutações (epi)genéticas. Um exemplo da influência desses preditores é visível no caso do silenciamento da MGMT através da metilação da respetiva região promotora, neste caso existe um compromisso da reparação do ADN e os pacientes tiram um benefício superior dos tratamentos atuais[39].

Existem diversas terapêuticas experimentais com resultados promissores que serão referidas posteriormente, no entanto a sua aplicabilidade ainda tem pouca expressão e as terapêuticas convencionais permanecem como os principais meios disponíveis para fazer face aos GAG.

## 2.2 Radioterapia

Para os radioterapeutas, os GAG são objeto de muito interesse, mas também de muitas frustrações. Em termos de medicina baseada na evidência, nenhum progresso significativo foi feito desde a adição concomitante e adjuvante de Tmz à RT[40].

Os GAG estão entre os tumores sólidos mais heterogêneos em oncologia. A invasão tumoral nos gliomas é um processo de múltiplos passos [41]. Provavelmente coexistem nos mesmos GAG populações celulares de glioma de grau 2, grau 3, e/ou de grau 4, algumas com alta atividade mitótica e um perfil pró-angiogénico, enquanto outras são sobretudo necróticas ou quiescentes; estas últimas células exibem características predominantemente infiltrativas com a atividade metabólica muito baixa[42]. Consequentemente, o conceito académico de usar homogeneamente a “dose certa para o volume certo” aparenta ser inadequado. Além disso, tem sido demonstrada a capacidade dos GAG aumentarem a sua agressividade em períodos muito precoces de QT-RT[40].

O exato mecanismo da RT permanece incerto, contudo a maioria apoia a noção que o efeito celular mais importante da radiação é a quebra da cadeia dupla de ADN. Esta clivagem provoca uma perda irreversível da integridade reprodutiva da célula e uma eventual morte celular. A RT também usa radiação ionizante que por sua vez vai interagir com moléculas de água dentro da célula, o que liberta radicais livres, causando dano adicional ao ADN[43].

Pouco depois da descoberta dos raios-x por Roentgen em 1895[44], houve relatos de pacientes com cancro que foram tratados com sucesso com RT[45].

Frankel e German[46] publicaram um dos primeiros relatórios de RT para o GB em 1958, onde concluíram que a radiação pós-operatória de rotina prolongava efetivamente os efeitos paliativos da cirurgia e propuseram um uso mais geral de RT. Em termos de cirurgia, concluíram que uma remoção mais radical do tumor oferece melhor prognóstico no que diz respeito a mortalidade operatória e subsequente tempo de sobrevivência.

RT é a modalidade de tratamento que tem maior impacto na sobrevivência média dos doentes com GAG e no caso concreto de GBM, a adição de RT à cirurgia aumentou a sobrevivência média de 3 ou 4 meses para 12 meses[33, 47]. Esta modalidade é agora usada rotineiramente como parte do regime de tratamento para GAG. A sua eficácia e precisão continuam a ser estudadas. Problemas como a precisão e complicações relacionadas com o tratamento permanecem como as principais questões a avaliar. Infelizmente, a janela terapêutica para a RT ao cérebro é estreita e existe uma incidência crescente de necrose derivada da radiação com doses mais altas[11].

O novo paradigma de uso da forma não homogênea em que a dose é adaptada para determinado volume é claramente mais adequado que o princípio da homogeneidade, mas implica o uso de ferramentas mais sofisticadas, nomeadamente meios imagiológicos avançados com novos algoritmos, acelerador linear de partículas (LINACs) tecnologicamente avançados, e novos modelos matemáticos de progressão tumoral para uma previsão dinâmica do crescimento do tumor[48, 49]. Como o passo inicial na RT é a delimitação do tumor, existe a necessidade urgente de uma melhor visualização dinâmica destes novos "alvos biológicos", que vá mais além do aparelho de tomografia computadorizada convencional e da ressonância magnética anatômica, que apenas revelam imagens estáticas dos GAGs num momento particular[40].

Devido à sua resolução espacial superior, a ressonância magnética nuclear (RMN) é favorecida no estudo de GAG, mas a sua superioridade sobre a tomografia computadorizada (TC) não foi clinicamente comprovada. O ambiente peritumoral dos GAG é conhecido por incluir proporções altamente variáveis de edema vasogénico e importantes populações de células gliais. Consequentemente, o grupo de radioterapia oncológica (GRTO) e o OEETC recomendam considerar estas regiões hiperintensas em T2 como volume patológico macroscópico [definido como o volume bruto do tumor (VBT)] ou como volume patológico microscópico [definido como o volume alvo clínico (VAC)], de acordo com o grau do glioma e os grupos de pesquisa ou organizações (GRTO ou OEETC) [40].

Em termos gerais o VAC corresponde ao VBT com uma margem adicional de 2.5cm; a este volume adiciona-se ainda uma margem de 0.5cm para prevenir eventuais erros de configuração e movimentos do paciente. Este volume total é referido como o Volume Alvo Planeado (VAP), isto é, uma margem de 3cm com tecido cerebral normal é aplicada à volta do tumor. Para reduzir os riscos de necrose por radiação a dose é limitada[11]. De realçar que as

orientações da OEETC recomendam fortemente que a dose para o cérebro normal, exterior ao VAP, seja idealmente inferior a 60% da dose prescrita (36 Gy)[40].

Vários regimes de RT foram propostos, mas tradicionalmente são usados apenas dois nos GAG. Referimo-nos portanto à RT radical, com doses de 60 grays (Gy) distribuídas em 30 frações diárias e à RT paliativa, na qual se usa doses de 30 Gy durante 2 semanas em 6 frações[11].

Ainda que tenha sido demonstrada uma melhoria no controlo local e sobrevida quando a dose de radiação foi aumentada de 40 a 60 Gy, a recidiva continua a ser superior a 85%[50]. Usar mais de 60 Gy parece lógico, mas o único estudo prospetivo randomizado (GRT0 93-05) não conseguiu demonstrar qualquer vantagem a favor de um conceito de escalada da dose por estereotaxia guiada por RMN[51].

Muitas variações do padrão de RT foram investigadas numa tentativa de aumentar a eficácia, incluindo doses superiores a 60Gy, esquemas de fracionamento alterados, braquiterapia, radiocirurgia estereotáxica, e o uso de agentes radiosensíveis. Nenhum destes demonstrou um benefício adicional em comparação com o padrão de RT fracionada usual[52, 53].

## 2.3 Cirurgia

Uma das formas mais antigas e, quiçá, ainda a mais importante no tratamento disponível para pacientes com glioma, é a cirurgia. Mesmo no meio contemporâneo de regimes multimodais, incluindo RT e QT, a resseção do glioma continua a ser um esteio[54].

Os GAG, nomeadamente o GB, comporta-se de forma extremamente agressiva. Independentemente do grau, eles têm uma alta taxa de recorrência e de progressão para graus superiores, e são finalmente fatais na maioria dos pacientes[55]. Estes tumores difundem-se geralmente no tecido cerebral normal, o que significa que a resseção cirúrgica envolve usualmente a remoção de tecido funcional. Deste modo, estes tumores são difíceis de remover na sua totalidade, especialmente quando células neoplásicas estão difundidas numa grande área do cérebro[56]. Devido a estes desafios, muitos neurocirurgiões ainda evitam os riscos associados à resseção cirúrgica procedendo no seu lugar a uma biópsia e posterior uso de RT[57].

Biópsias são pouco invasivas, bem toleradas e adequadas para lesões em qualquer local e de qualquer tamanho, são usualmente consideradas quando os riscos da resseção superam os benefícios. Tem maior importância nos casos em que o diagnóstico inicial pode influenciar o tratamento subsequente. Contudo, podem ocorrer erros na recolha das mesmas, especialmente em amostras pequenas e heterogéneas. Para reduzir o risco de biópsias não diagnósticas, a orientação imagiológica é rotineiramente usada para guiá-las[11].

Uma das razões para a referida renitência em executar uma resseção total é a crença comum de que, independentemente da aparência radiológica, os gliomas se disseminam por uma grande área e usualmente apresentam infiltrado microscópico no hemisfério contralateral no momento da sua apresentação inicial. Assim sendo, muitos autores defendem que os gliomas são incuráveis. Uma das bases destas crenças cinge-se a estudos realizados há 60-80 anos com um número reduzido de pacientes (5 ou menos), que foram tratados e seguidos com técnicas cirúrgicas e de diagnóstico ultrapassadas nos dias de hoje. De referir que os critérios usados, assim como o *follow-up* não se encontram de acordo com os padrões atuais de evidência em estudos cirúrgicos[57].

Apesar desta opção, evidências sugerem que uma resseção grosseira aproximadamente total confere um benefício moderado na sobrevivência quando comparado à biópsia ou à resseção subtotal[2, 58, 59]. Os benefícios da resseção incluem melhoria dos sintomas relacionados com o efeito de massa, redução do volume do tumor[60] e remoção do núcleo necrótico do mesmo, que pode ser resistente à RT e de difícil acesso à QT circulante. A resseção cirúrgica no caso de recorrência pode melhorar a qualidade de vida e permitir que haja tempo para terapias adicionais, mas o impacto na sobrevivência média é irrisório.

Apesar da singularidade dos gliomas, estes continuam a ser um tumor sólido sobre o qual são aplicáveis os dogmas básicos da oncologia. Dado que uma neoplasia é uma coleção heterogênea de diferentes populações celulares, uma percentagem das células tumorais é naturalmente resistente ou menos sensível a qualquer terapia adjuvante, incluindo RT e QT convencional[57]. No entanto, a remoção cirúrgica é imune ao fato de existir uma população heterogênea de células, removendo tudo o que estiver nas margens definidas previamente. Assim a resseção cirúrgica é a pedra angular das terapias com maior sucesso em qualquer cancro, reduz drasticamente o número de células que necessitam de ser destruídas pela terapia adjuvante, e reduz dessa forma a possibilidade de encontrar populações celulares resistentes[57]. Resseções totais grosseiras dos gliomas podem ser alcançadas através de melhores técnicas de localização tumoral em simultâneo com melhores técnicas de visualização e identificação. A RMN intraoperatória ganhou evidência com base em relatórios que comprovam o aumento das taxas de resseção completa e melhora da sobrevida[61]. Infelizmente, o custo associado à RMN intraoperatória é muito elevado e constitui um entrave à sua disseminação.

Wolber[32] descreve a cirurgia de GAG com os mais recentes desenvolvimentos no planeamento pré-operatório, neuronavegação multimodal, e diferentes meios que permitam uma citorredução máxima e segura, associando estes desenvolvimentos a um melhor prognóstico. Craniotomias com os pacientes acordados não é uma abordagem nova mas ainda não é amplamente usada na cirurgia de rotina em gliomas. A implementação deste tipo de cirurgia pode diminuir os défices neurológicos pós-operatórios e permitir uma resseção extensa do tumor, mesmo em áreas eloquentes do cérebro. A constatação durante a cirurgia de que as funções neurológicas do paciente permanecem intactas pode aumentar a confiança

do cirurgião, resultando numa excisão mais extensa[32]. O padrão de ouro para a cirurgia segura em áreas funcionais críticas é o mapeamento intraoperatório com o paciente acordado[32].

O papel da resseção foi confirmado com a demonstração de que o aumento na taxa de resseções completas, auxiliadas pelo marcador fluorescente ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) para delinear a área tumoral sob o microscópio cirúrgico, se traduz numa melhoria da sobrevida livre de recorrências em 6 meses[62]. Imagens de fluorescência intraoperatória, especialmente imagiologia de fluorescência na gama do infravermelho próximo, tem o potencial de revolucionar a neurocirurgia proporcionando imagens de orientação em tempo real com alta sensibilidade, o que permite aos cirurgiões definir com maior exatidão as margens do glioma[63, 64].

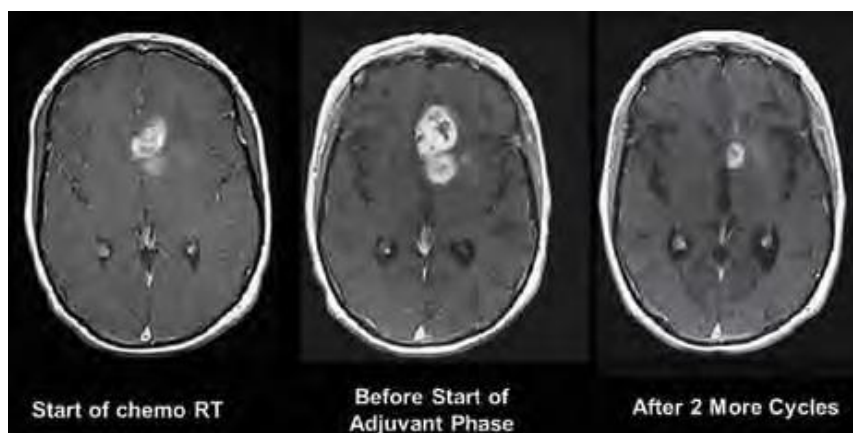
## 2.4 Quimioterapia

As nitrosureias (ex:vincristina) foram substituídas pela Tmz como tratamento padrão para os GBM recém-diagnosticados, com base nos resultados de um estudo de fase III conduzido pela OEPTC e o INCC. O estudo comparou a aplicação de RT isolada (60 Gy durante 6 semanas) com a aplicação de RT e Tmz diária concomitante (75mg/m<sup>2</sup>/dia) seguido de uma terapia adjuvante de Tmz (150-200mg/m<sup>2</sup>/dia durante 5 dias consecutivos após cada ciclo de 28 dias, durante 6 ciclos)[33]. A adição de Tmz à RT melhorou a sobrevida média em comparação com a RT isolada (14.6 versus 12.1 meses). Recentemente os resultados deste estudo foram atualizados, revelando que o aumento da sobrevida devido à Tmz foi mantido, até aos 5 anos[34]. O benefício da Tmz aumenta de forma significativa em pacientes com a metilação da região promotora do gene da MGMT. Entre os pacientes com GBM e a metilação de MGMT que foram tratados com Tmz, a sobrevida média é de 21.7 meses e a sobrevida aos 2 anos é de 46%. No caso dos pacientes sem a metilação de MGMT a sobrevida média foi de 12.7 meses e a sobrevida aos 2 anos foi de 13.8%[28].

É agora reconhecido que os achados na RMN imediatamente após a QT podem demonstrar uma aparente progressão da doença, imagens subsequentes mostram que estas alterações ou estabilizam ou progridem. Esta pseudoprogressão é mais frequentemente observada nos pacientes com a metilação do MGMT e pensa-se que representa um sinal de prognóstico positivo de resposta à terapia (figura 1)[11].

Uma alternativa para a QT sistémica envolve a implantação cirúrgica de polímeros biodegradáveis contendo carmustina (Gliadel® Wafer) na cavidade de resseção tumoral. Um estudo randomizado, duplo cego de fase III demonstrou um benefício modesto em pacientes com GBM recém-diagnosticados. Os pacientes que receberam radiação e placebo obtiveram

uma sobrevida de apenas 11.6 meses, em comparação com os 13.9 meses de sobrevida para os pacientes que receberam radiação e carmustina[65].



**Figura1** - Um exemplo de pseudoprogessão num paciente com GB durante o tratamento com Tmz e RT concomitante. Antes do início da fase adjuvante este tumor aparenta um aumento das suas dimensões. Isto não é uma progressão real mas sim pseudoprogessão, uma vez que, à medida que se continua a Tmz concomitante obtemos uma excelente resposta depois de mais 2 ciclos[11].

No entanto, foi recentemente publicado um estudo (RESCUE) que demonstrou que a administração contínua de Tmz numa dose diária de  $50 \text{ mg/m}^2$ , ao invés dos ciclos convencionais 5/28, tem uma eficácia favorável e é bem tolerada como um agente de segunda linha[66]. Outros agentes, tais como carmustina, carboplatina, etoposido, irinotecano e procarbazina, lomustina e vincristina, produzem baixas taxas de resposta e nenhum benefício significativo de sobrevida[67].

Tanto a OEETC como a GRTO nos USA e Canadá exploraram o papel da vincristina antes e depois da RT em OA. Ambos os estudos revelaram que a adição de vincristina à RT em AO recém-diagnosticados aumentava a sobrevida sem recidivas mas não a sobrevida global[68, 69]. Como a toxicidade hematológica da vincristina é substancial, foi concluído que a vincristina como adjuvante não deveria ser considerada parte do tratamento standardizado destes tumores[7].

O NOA (grupo neuro-oncológico alemão) explorou a possibilidade da QT apenas com vincristina ou Tmz substituir o tratamento único de RT no caso de gliomas anaplásicos recém-diagnosticados. O ensaio 04 do NOA demonstrou não haver diferença para a sobrevida global ou livre de recidivas entre estes tratamentos de 1ª linha para os AA, OA e oligodendroglioma. A Tmz foi tão efetiva como a vincristina, mas melhor tolerada[70].

Muitos neuro-oncologistas estendem a duração do tratamento, dada a excelente tolerabilidade da Tmz, geralmente por 12 meses ou mais. A vantagem dessa abordagem é

desconhecida e deve ser estudada, até porque a exposição prolongada a alquilantes aumenta o risco de mielodisplasia[71].

## 2.5 Abordagem mista/combinada

O tratamento clássico do glioma anaplásico recém-diagnosticado inclui uma ressecção cirúrgica total se possível, seguida de RT (54-60 Gy em frações de 1.8-2 Gy) diretamente sobre a região do tumor com uma margem de segurança de 2-3 cm, dependendo da localização. A cirurgia em pacientes com gliomas malignos tem como objetivo a remoção da maior quantidade possível do tumor, sem causar défices neurológicos. A biópsia é possivelmente a única opção para tumores multifocais ou que envolvam o corpo caloso. O papel da QT em adição à RT tem sido examinado em inúmeros estudos, mas os resultados são inconclusivos. Foi realizado um estudo britânico de grandes dimensões para avaliar a combinação de procarbazina, lomustina e vincristina, ainda que em dosagens incomuns, tendo sido obtida uma sobrevida média de 15 meses com a RT + vincristina versus 13 meses apenas com RT[72].

A análise de três estudos randomizados [68-70] estabeleceu o papel prognóstico proeminente de marcadores moleculares em pacientes com gliomas anaplásicos e revelou os seguintes resultados: a perda alélica de 1p/19q está fortemente associada com a morfologia oligodendroglioma e um melhor resultado com a RT isolada, QT isolada ou a modalidade de tratamento combinado[68-70]; a metilação do promotor MGMT prevê uma maior sobrevida global e sem recidiva independente do tipo de tratamento[70, 73]; mutações de IDH são comuns em todos os tipos de glioma anaplásico e de prognóstico favorável independentemente do tratamento[7]. Por conseguinte, nenhum destes marcadores é atualmente útil para escolher entre a RT, QT ou tratamento de modalidade combinada[74].

## 2.6 Tratamento nas recidivas

Os GAG recidivam de forma quase universal, sendo que o padrão de recidiva demonstra que esta ocorre predominantemente num raio de 2 cm em relação à localização primária do tumor. As opções terapêuticas são repetir cirurgia, a administração de QT com o mesmo esquema anterior ou com alteração do mesmo, e RT adicional. A repetição do procedimento cirúrgico tem demonstrado aumento da sobrevida em pacientes cuidadosamente selecionados, contudo, a cirurgia sem a terapia adjuvante adicional pode não ser efetiva[75, 76].

A administração de doses repetidas de RT tem sido limitada devido ao receio de complicações, derivadas da exposição a doses progressivamente maiores de radiação. A reavaliação da toxicidade por radiação após os avanços recentes nas técnicas e respetiva tecnologia usada na RT revelaram que, são raros os casos de necrose com doses de radiação superiores a 100Gy nos tecidos normais[77]. São necessários mais estudos para determinar um método ótimo para a aplicação de RT nos GAG recidivantes.

As opções terapêuticas nos pacientes com GB recorrente estão a aumentar de maneira substancial mas o tratamento padrão não foi ainda bem definido. Uma minoria dos pacientes beneficia de uma segunda cirurgia ou de uma segunda aplicação de RT. Bevacizumab foi aprovado para o tratamento de GB recorrentes em vários países como a Suíça e os EUA, mas tal ainda não aconteceu na União Europeia. O valor do bevacizumab no tratamento de gliomas é universalmente aceite, mas existem ainda muitas dúvidas no esquema terapêutico a usar[7]. Este fármaco é um anticorpo monoclonal que bloqueia a ação do fator de crescimento endotelial vascular (FCEV), impedindo o crescimento de células vasculares tumorais[78].

Em pacientes selecionados com GBM recorrente que podem ser submetidos à resseção, os implantes de carmustina produzem uma vantagem modesta na sobrevida de cerca de oito semanas[79]. Tendo em conta a informação limitada, a decisão terapêutica no caso de um GBM que recidiva é realizada numa base individual. Os fatores a considerar incluem a histologia do tumor, terapia anterior, intervalo de tempo até à recidiva, e estado geral. Em geral, os pacientes com doença recorrente devem ser incluídos em estudos sempre que possível[80].

Irinotecano, cisplatina, e nitrosureias têm um longo historial de uso em tumores cerebrais, com eficácia demonstrada no tratamento adjuvante de gliomas. Na atualidade o padrão de tratamento dos gliomas baseia-se na Tmz com RT concomitante e o papel destes quimioterápicos mudou para o tratamento de casos de recorrências e progressão dos tumores. Apesar dos avanços em agentes biológicos, a atividade comprovada destes agentes quimioterápicos nos tumores cerebrais irá assegurar-lhes um lugar no arsenal dos neuro-oncologistas nos próximos anos[81].

Existem variados esquemas de tratamento para os pacientes com glioma anaplásico recorrente, e a escolha é realizada tendo em atenção o tratamento primário, ou seja, se não tiver sido sujeito a RT deve ser esta a primeira opção. Aqueles que já foram alvo de RT devem receber QT, e considerando o seu perfil comprovado de segurança e tolerância, a escolha deverá recair na Tmz. Em pacientes que já foram alvo de ambos os tipos de tratamento referidos e que não obtiveram progressos, deve optar-se por outra estratégia terapêutica experimental como a monoterapia com bevacizumab[7].

## 2.7 Novas modalidades terapêuticas

Existem diversos estudos sobre novas modalidades terapêuticas, um deles faz uma análise crítica dos padrões atuais de tratamento e novas abordagens na gestão do GBM, a partir de uma perspectiva de oncologia médica e neuro-oncologia. A partir dos estudos publicados em pacientes adultos (OEETC-INCC) e em pacientes idosos, foram avaliadas cuidadosamente novas terapias.

Terapias moleculares específicas são uma perspectiva interessante, atualmente em vários estágios de pesquisa e desenvolvimento. Estes são fármacos que têm como objetivo atingir as vias oncogénicas em gliomas, através da interação com os recetores ou afetando um alvo a jusante. Os ensaios clínicos de fármacos que bloqueiam o recetor do fator de crescimento epidérmico (RFCE), o recetor do fator de crescimento derivado de plaquetas (RFCDP) e o fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e respetivas vias, até agora têm sido dececionantes[11].

A angiogénese é importante para o crescimento e proliferação dos GAG e é mediada por diversas vias, principalmente através do FCEV, níveis elevados deste fator são observados nos tumores malignos como o GBM. Visar o FCEV parecia ser uma abordagem muito atraente, dada a expressão aumentada de FCEV em GBM, no entanto, foram realizados recentemente dois estudos controlados randomizados sobre GBM primário que obtiveram resultados dececionantes, levantando uma série de questões relativas à adição de FCEV para quimiorradioterapia. Um outro estudo de larga escala não randomizado de fase 2 do bevacizumab em casos de recidiva revelou uma taxa de resposta alta (sobrevida sem recorrência aos 6 meses de 46%; sobrevivida global aos 6 meses de 77%)[78], o que revela ser um fármaco particularmente útil nos casos de recorrências[11, 80]. O bevacizumab é geralmente bem tolerado, sendo os efeitos secundários mais comuns a fadiga, hipertensão, e proteinúria. Outros efeitos secundários menos comuns mas com maior gravidade incluem o tromboembolismo, hemorragia, e perfuração intestinal[80]. Infelizmente, os benefícios da terapia antiangiogénica são transitórios, e foi sugerido que as respostas radiográficas substanciais observadas em pacientes sob o efeito de bevacizumab fossem o resultado de uma permeabilidade diminuída da vasculatura ao invés de um efeito anti-tumoral real[80].

Além disso, o fármaco cilengitide, inibidor seletivo de integrinas, produziu resultados animadores em estudos de fase 2, em particular para os pacientes cujos tumores exibem a metilação do MGMT, mas a eficácia desta abordagem não foi confirmada num estudo randomizado controlado de grande dimensão. Vários agentes dirigidos contra o recetor do fator de crescimento epidérmico (RFCE) foram testados, mas os resultados foram novamente decepcionantes[82].

A monoterapia tem pouco efeito como verificamos após os estudos mencionados anteriormente, uma possível explicação para esta fraca resposta poderá dever-se ao facto de múltiplos receptores de tirosina quinases estarem activados durante o desenvolvimento do

glioma, o que faz com que o bloqueio de apenas um receptor tenha um efeito reduzido. A combinação de várias terapias específicas poderá ser um aspecto importante a considerar futuramente[11, 80].

## Capítulo 3. Nanomedicina

### 3.1 Considerações gerais

A Nanotecnologia, juntamente com alguns conceitos relacionados, tais como os nanomateriais, nanoestruturas e NP, tornou-se um foco prioritário para a investigação científica e desenvolvimento tecnológico. A nanotecnologia corresponde à criação de materiais e dispositivos à nanoescala. A emergente nanomedicina associa a nanotecnologia à medicina de forma a desenvolver novas terapias e melhorar os tratamentos atualmente utilizados. Na nanomedicina manipulam-se átomos e moléculas para produzir nanoestruturas da mesma dimensão de biomoléculas para interação com as células humanas.

Nos últimos anos, surgiu uma inovação na área da terapia do cancro, denominada terapia dirigida ou direcionada, que envolve o desenvolvimento de fármacos confinados a NPs (nanofármacos). Este direccionamento do agente terapêutico pode ser passivo ou ativo. O direccionamento passivo é baseado na reduzida dimensão das NPs, que as leva a entregar o fármaco, preferencialmente, no local do tumor. Os materiais distribuídos sistemicamente acumulam-se nos locais afetados, com base numa aumentada permeabilidade e retenção. Por outro lado, o direccionamento ativo envolve a conjugação das NPs com ligandos. Estes ligandos ligam-se especificamente a certos tipos de células tumorais, o que permite que as NPs distribuam o fármaco apenas nessas células tumorais e não nas restantes células do organismo[83]. As NPs direcionadas para as células tumorais irão permitir aplicar terapias seletivas, com menos efeitos secundários. Adicionalmente, devido a uma capacidade aumentada para visualização de células tumorais irá permitir um diagnóstico precoce, conferir uma monitorização em tempo real da eficácia de um tratamento e controlar o aparecimento de metástases ou de tumor recidivante. Esta capacidade aumentada deve-se à utilização de NPs superparamagnéticas de óxido de ferro que funcionam como contraste na RMN.

Existe ainda a possibilidade de reaproveitamento de agentes quimioterápicos, cujo interesse diminuiu por serem extremamente tóxicos mas que, tendo em conta os sistemas de distribuição possíveis através da Nanotecnologia, podem agora tornar-se opções viáveis no tratamento de cancro. O uso de nanomateriais biocompatíveis permitiu a fabricação de NPs com capacidades que superam as dos agentes convencionais[84].

### 3.2 Nanopartículas

Com os avanços atuais nas engenharias, estão a ser sintetizadas e testadas NPs com vários tamanhos, formas, composição e compostos de revestimento. Alguns dos tipos de NPs mais usados incluem partículas poliméricas, micélios[85], *nanoshells*[86], pontos quânticos[87], e NPs magnéticas de óxido de ferro [88].

As NPM representam um nanomaterial promissor devido às suas propriedades eletromagnéticas únicas que permitem a sua detecção pela RMN[89, 90]. Estas NPM mostraram grande potencial como agentes de contraste em T1 ou T2 na RMN, sendo que as NPs superparamagnéticas de óxido de ferro são as mais investigadas como agentes de contraste[91]. NPs de óxido de ferro num campo magnético podem gerar níveis de contraste significativamente maiores que o gadolínio, fornecendo assim a oportunidade de detetar tumores precocemente.

Tanto o perfil de toxicidade favorável, como a sua capacidade para atravessar a BHE hematoencefálica, fazem destas NPs uma nanoplataforma atrativa para as terapias destinadas aos tumores cerebrais malignos. As propriedades únicas das NPM também podem ser exploradas para gerar hipertermia local com a aplicação segura de campos eletromagnéticos[92]. A hipertermia corresponde à elevação da temperatura numa região específica do corpo usualmente afetada por um tumor. O princípio físico baseia-se na morte direta das células tumorais com temperaturas de 41° a 42° Celsius.

As NPM são comumente compostas por um núcleo e um revestimento, o núcleo é composto por óxido de ferro (usualmente magnetite ou magmite), revestido com um material biocompatível[93]. As NPs de magnetite tornam-se superparamagnéticas à temperatura ambiente se o diâmetro do cerne da partícula for de 20 nm ou menos. Estas NPs têm inúmeras aplicações, de entre as quais se destacam a reparação de tecidos, marcação celular, diagnóstico e tratamento de cancro. Além disso alguns estudos têm demonstrado que o ferro libertado a partir da NPM em degradação é metabolizado pelo corpo, reduzindo assim o potencial de citotoxicidade a longo prazo[94].

NPs carregadas com quimioterápicos obtiveram resultados positivos nas formulações de libertação sustentada, que podem baixar a toxicidade sistémica e produzir um maior efeito antitumoral[84]. NPs desenvolvidas recentemente podem atravessar a BHE após a administração sistémica ou são distribuídas no cérebro através de *Convection-Enhanced Delivery* (CED) para atingir as células dos GBM. A importância dada a estas NPs deve-se ao seu potencial terapêutico e de diagnóstico, que é reforçado pela ideia de que serão capazes de fornecer uma visualização em tempo real do tumor e de o tratar diretamente.

CED é um método de entrega direta que usa um gradiente de pressão hidrostático para distribuir macromoléculas através do tecido cerebral via cateteres implantados cirurgicamente[95]. No entanto, vários estudos, incluindo um ensaio clínico recente,

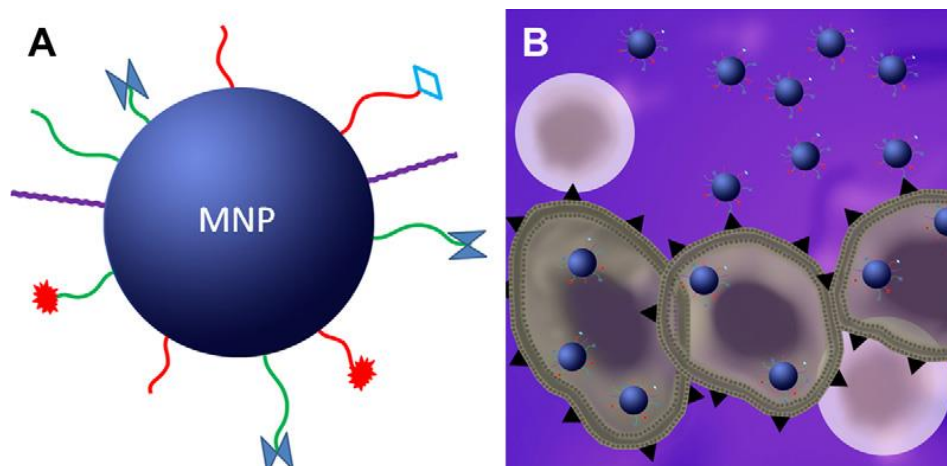
destacam a natureza imprevisível de distribuição de agentes por CED. A perda de infusão para os ventrículos e espaço subaracnoide e a anisotropia do tecido circundante do tumor podem contribuir para a natureza aleatória da dispersão do agente. Numa tentativa para ultrapassar a limitação de distribuição aleatória, pode ser utilizada monitorização em tempo real aproveitando as propriedades das NPM na RMN. Este procedimento permite ajustes durante o procedimento, ou tratamentos adicionais nos casos em que a área tumoral não seja totalmente incluída pelo procedimento inicial[95].

### 3.3 Aplicabilidade nos gliomas de alto grau

O tumor cerebral que representa um maior desafio para o seu tratamento é o GBM, existem múltiplas razões para a inabilidade atual de tratar este tumor. São extremamente agressivos com invasão local[96], as células tumorais infiltram-se para lá da área massa tumoral visível e não são facilmente detetadas pela RMN ou cirurgia. O objetivo da ressecção cirúrgica cinge-se a remover a parte do tumor que respondeu ao contraste de gadolínio, dada a potencial morbilidade de remover tecidos saudáveis adjacentes que não responderam ao contraste[97]. Contudo algumas células infiltrativas permanecem nesses tecidos saudáveis adjacentes, e posteriormente serão responsáveis pela recorrência. A QT adjuvante é usada numa tentativa de eliminar as células tumorais residuais, mas na maioria dos pacientes não se obtém sucesso, o que é confirmado pela recorrência do tumor.

Diversos agentes experimentais tentam atingir a superfície das células tumorais e as vias de sinalização intracelular que estão ativas nessas células. A entrega dos fármacos aos tumores cerebrais representa um desafio diferente para o tratamento efetivo das células tumorais. A existência da BHE dificulta a passagem da maioria dos fármacos para o cérebro, especificamente para o tumor. Adicionalmente, a confirmação do acesso dos fármacos ao tumor através da imagiologia é pobre, o que dificulta a deteção da eficácia dos mesmos.

As NPMs multifuncionais permitem simultaneamente obter imagens e direcionar os fármacos, daí o seu grande potencial para o tratamento do GBM. A inclusão das NPMs nas células tumorais e nas células fagocitárias permite observar os tumores cerebrais através da RMN, após uma introdução sistémica destas NPs. Ligandos específicos do tumor conjugados às NPMs podem aumentar a sua absorção por parte do tecido tumoral. Um melhor acesso aos parâmetros de perfusão cerebral poderá determinar a resposta do tumor à terapia, à necrose por radiação e recorrência do tumor[98].



**Figura 2** - NPM e a sua interação com o tumor. (A) Ilustração de uma NPM com diferentes grupos funcionais na sua superfície, que permitem a ligação molecular às células tumorais, visualização (RMN), aumentar o tempo de circulação no plasma, e/ou terapia. (B) Ilustração de NPMs revestidas com ligantes ligadas a células tumorais (células grandes e irregulares) ao invés das células normais (rosa). Inclusão de NPM nas células tumorais também é visível.

Um dos marcadores mais promissores para gliomas é a amplificação da expressão do RFCE com uma frequência de cerca de 50% nos GBM[99], sendo um alvo preferencial na detecção de células tumorais associadas ao GBM.

As estratégias para o controlo local do GBM incluem as NPMs conjugadas com anticorpo de RFCE para atingir as células tumorais e as suas vias de sinalização sobreativas, e a hipertermia em combinação com a RT em ensaios humanos e pré-clínicos.

As NPMs também são muito promissoras na perspetiva de permitirem uma delineação do tumor intraoperatória. Apesar do sucesso limitado com a entrega sistemática de NPMs, a capacidade de concentração em tumores cerebrais continua a ser um desafio que ainda não foi superado.

As aplicações terapêuticas e imagiológicas das NPM requerem um revestimento especial da superfície, não tóxico e biocompatível, que possa fornecer uma entrega direcionada a uma localização particular numa área específica. O revestimento da superfície com carga neutra ou negativa pode ser ótimo para direcionar especificamente para os tumores cerebrais malignos[98]. O tamanho hidrodinâmico das NPMs desempenha um papel importante na sua entrega, uma vez que as NPs maiores (>100nm) podem ter dificuldades em chegar aos tumores cerebrais[98].

Nos ensaios *in vivo* as NPMs devem ser recobertas com um polímero biocompatível durante ou depois do processo de síntese para prevenir a formação de grandes agregados, mudanças na estrutura original e biodegradação quando expostas a um sistema biológico. O polímero vai também permitir a ligação de fármacos por afinidade covalente, adsorção ou aprisionamento nas partículas.

Um estudo recente revelou que NPMs direcionadas para células e vasculatura do GBM por uma conjugação de péptidos específicos pode ter um efeito anti-tumoral significativo. NPMs à base de óxido de ferro conjugados com um peptídeo ligante de células tumorais e um peptídeo pró-apoptótico demonstraram retardar o desenvolvimento do tumor em tumores resistentes ao tratamento implantados nos roedores após múltiplas administrações sistêmicas[100].

Apesar da eficácia obtida com o uso de NPM para entregar Tmz *in vivo*, a eficiência do fármaco que realmente atinge o alvo é bastante baixa. Este achado pode diminuir o potencial clínico das NPM. Neste sentido, e para melhorar esta eficiência foram usados anticorpos e outros ligandos na superfície das NPM[101]. Adicionalmente, o aumento da concentração do fármaco nas NPM pode aumentar a quantidade que efetivamente atinge o alvo.

## Capítulo 4. Conclusões e perspectivas futuras

A heterogeneidade fenotípica tumoral e a resistência adaptativa aos fármacos anti-tumorais são desafios complexos e necessitam de uma abordagem ao nível do diagnóstico e tratamento que se exige diversificada e abrangente. O desenvolvimento de ferramentas para uma melhor decisão clínica, deve assim ser acelerado com enfoque na biocompatibilidade, capacidade de contraste em imagiologia, libertação controlada de fármacos, facilidade de preparação, capacidade de absorção pelas células tumorais, distribuição pelo tumor, toxicidade reduzida e eliminação controlada.

Neste momento as probabilidades de cura de um GAG não são favoráveis e, dado o grande número de pessoas visadas pela patologia, torna-se indispensável a procura por soluções. Desde cedo se começou essa procura, com os meios disponíveis incentivou-se a cirurgia e posteriormente a RT e a QT, verificando-se melhorias constatadas por variadíssimos estudos mas que foram pouco significativas. A sobrevida, de facto, aumentou com a utilização destes meios convencionais de tratamento, no entanto, o prognóstico pouco melhorou. Atualmente situa-se nuns curtos 15 meses, e é por isso que a procura de outras abordagens terapêuticas se intensificou. Nos próximos anos a incorporação de várias plataformas tecnológicas irá provavelmente permitir avanços na abordagem dos tumores cerebrais malignos.

A natureza clínica multifuncional da nanotecnologia permitirá especificar as terapias e a visualização das células tumorais infiltrativas associadas ao GBM. As NPMs serão usadas para romper as vias de sinalização sobreativas das células tumorais, que contribuem para a resistência a diversas terapias. NPMs conjugadas com um revestimento superficial de péptidos ligantes tumorais ou anticorpos específicos para o tumor, serão introduzidas de forma sistémica ou local no cérebro por CED para tratamento específico do tumor. As características das NPMs permite usá-las como contraste na RMN, configurando-se como fundamental para fornecer informação precisa em relação à entrega dos agentes terapêuticos e sua eficácia, assim como para a monitorização posterior. A resseção cirúrgica será igualmente necessária para remover a massa tumoral principal, aliviando assim o efeito de massa no cérebro. A visualização intraoperatória das NPMs e o uso do marcador fluorescente 5-ALA irão permitir uma resseção mais completa.

Hipertermia local também será uma opção viável com o uso de NPMs, que possibilita a destruição das células que incluíram estas NPs usando um campo magnético alternado. Com os inúmeros estudos e ensaios realizados até à data, é unanimemente reconhecido que será necessária uma abordagem combinada para a obtenção de um prognóstico mais favorável com

o respetivo aumento da sobrevida dos pacientes, essa abordagem poderá passar pelo uso de NPMs para marcar as células tumorais seguido da RT e QT convencionais.

Múltiplos estudos sobre marcadores moleculares dos GAG permitiram identificar marcadores específicos destes tumores, mas nenhum é representativo da totalidade das células afetadas pelo que as dificuldades permanecem na erradicação deste tipo de tumores.

Existem hoje diversos modelos de NPs desenvolvidas na forma de plataformas versáteis que poderão ser usados para ultrapassar os muitos obstáculos associados ao tratamento de gliomas. De referir, que o sucesso da entrega intracraniana de fármacos levanta a possibilidade de usar este sistema, não só para tratar tumores mas também um grande espectro de outras doenças do sistema nervoso central.

## Referências Bibliográficas

1. Dolecek, T.A., et al., *CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005–2009*. Neuro-oncology, 2012. **14**(suppl 5): p. v1-v49.
2. Stummer, W., et al., *Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias*. Neurosurgery, 2008. **62**(3): p. 564-76; discussion 564-76.
3. World Health Organization. *GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. 2013 [cited 2014 24/January/2014]; Available from: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
5. Behin, A., et al., *Primary brain tumours in adults*. Lancet, 2003. **361**(9354): p. 323-31.
6. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
7. Weller, M., *Novel diagnostic and therapeutic approaches to malignant glioma*. Swiss Med Wkly, 2011. **141**: p. w13210.
8. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Epidemiology and etiology of gliomas*. Acta neuropathologica, 2005. **109**(1): p. 93-108.
9. Wen, P.Y. and S. Kesari, *Malignant gliomas in adults*. New England Journal of Medicine, 2008. **359**(5): p. 492-507.
10. Laws, E.R., et al., *Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project*. Journal of neurosurgery, 2003. **99**(3): p. 467-473.
11. Narayanan V, P., K., Price, S, *High Grade Gliomas: Pathogenesis, Management and Prognosis*. Advances in Clinical Neuroscience and Rehabilitation, 2012. **12**: p. 24-29.
12. Bondy, M., et al., *Genetics of primary brain tumors: a review*. J Neurooncol, 1994. **18**(1): p. 69-81.
13. Hofer, S., et al., *Molecular biology of high-grade gliomas: what should the clinician know?* Chin J Cancer, 2014. **33**(1): p. 4-7.
14. Burger, P.C., et al., *Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications*. Cancer, 1985. **56**(5): p. 1106-11.
15. Camara-Quintana, J.Q., R.T. Nitta, and G. Li, *Pathology: commonly monitored glioblastoma markers: EFGR, EGFRvIII, PTEN, and MGMT*. Neurosurg Clin N Am, 2012. **23**(2): p. 237-46, viii.
16. Wen, P.Y. and S. Kesari, *Malignant gliomas in adults*. N Engl J Med, 2008. **359**(5): p. 492-507.
17. Dunbar, E. and A.T. Yachnis, *Glioma diagnosis: immunohistochemistry and beyond*. Adv Anat Pathol, 2010. **17**(3): p. 187-201.
18. Dumas-Duport, C. and P. Varlet, *[Dysembryoplastic neuroepithelial tumors]*. Rev Neurol (Paris), 2003. **159**(6-7 Pt 1): p. 622-36.

19. Ringertz, N., *Grading of gliomas*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1950. **27**(1): p. 51-64.
20. Cairncross, G., et al., *Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402*. J Clin Oncol, 2013. **31**(3): p. 337-43.
21. van den Bent, M.J., et al., *Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951*. J Clin Oncol, 2013. **31**(3): p. 344-50.
22. Weller, M., et al., *Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice*. Neuro Oncol, 2012. **14 Suppl 4**: p. iv100-8.
23. Brandes, A.A., et al., *Correlations between O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation status, 1p and 19q deletions, and response to temozolomide in anaplastic and recurrent oligodendroglioma: a prospective GICNO study*. J Clin Oncol, 2006. **24**(29): p. 4746-53.
24. Aldape, K., P.C. Burger, and A. Perry, *Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(2): p. 242-51.
25. Gadji, M., et al., *Is the 1p/19q deletion a diagnostic marker of oligodendrogliomas?* Cancer Genet Cytogenet, 2009. **194**(1): p. 12-22.
26. Hofer, S. and A.B. Lassman, *Molecular markers in gliomas: impact for the clinician*. Target Oncol, 2010. **5**(3): p. 201-10.
27. Delaney, J.C. and J.M. Essigmann, *Effect of sequence context on O(6)-methylguanine repair and replication in vivo*. Biochemistry, 2001. **40**(49): p. 14968-75.
28. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
29. Fu, Y., et al., *Glioma-derived mutations in IDH: from mechanism to potential therapy*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **397**(2): p. 127-30.
30. Capper, D., et al., *Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors*. Brain Pathol, 2010. **20**(1): p. 245-54.
31. Mirimanoff, R.O., *High-grade gliomas: reality and hopes*. Chin J Cancer, 2014. **33**(1): p. 1-3.
32. Wolbers, J.G., *Novel strategies in glioblastoma surgery aim at safe, supra-maximum resection in conjunction with local therapies*. Chin J Cancer, 2014. **33**(1): p. 8-15.
33. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
34. Stupp, R., et al., *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial*. Lancet Oncol, 2009. **10**(5): p. 459-66.
35. Mirimanoff, R.O., et al., *Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial*. J Clin Oncol, 2006. **24**(16): p. 2563-9.
36. Taphoorn, M.J., et al., *Health-related quality of life in patients with glioblastoma: a randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2005. **6**(12): p. 937-44.

37. Taphoorn, M.J., et al., *An international validation study of the EORTC brain cancer module (EORTC QLQ-BN20) for assessing health-related quality of life and symptoms in brain cancer patients*. Eur J Cancer, 2010. **46**(6): p. 1033-40.
38. Stummer, W., et al., *Counterbalancing risks and gains from extended resections in malignant glioma surgery: a supplemental analysis from the randomized 5-aminolevulinic acid glioma resection study. Clinical article*. J Neurosurg, 2011. **114**(3): p. 613-23.
39. Riemenschneider, M.J., M.E. Hegi, and G. Reifenberger, *MGMT promoter methylation in malignant gliomas*. Target Oncol, 2010. **5**(3): p. 161-5.
40. Dhermain, F., *Radiotherapy of high-grade gliomas: current standards and new concepts, innovations in imaging and radiotherapy, and new therapeutic approaches*. Chin J Cancer, 2014. **33**(1): p. 16-24.
41. Price, S.J. and J.H. Gillard, *Imaging biomarkers of brain tumour margin and tumour invasion*. Br J Radiol, 2011. **84 Spec No 2**: p. S159-67.
42. Viel, T., et al., *Analysis of the growth dynamics of angiogenesis-dependent and -independent experimental glioblastomas by multimodal small-animal PET and MRI*. J Nucl Med, 2012. **53**(7): p. 1135-45.
43. E.J., H., ed. *Radiobiology for radiologist*. 4th edition ed. Vol. 1. 1994, JB Lippincott: Philadelphia. 1-13.
44. *On a new kind of rays*. By W.C. Rontgen. Translated by Arthur Stanton from the *Sitzungsberichte der Wurzburger Physic-med. Gesellschaft, 1895*. Nature, January 23, 1896. Radiography, 1970. **36**(428): p. 185-8.
45. Halperin, E.C., et al., *Perez & Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology*. 2013: Lippincott Williams & Wilkins.
46. Frankel, S.A. and W.J. German, *Glioblastoma multiforme; review of 219 cases with regard to natural history, pathology, diagnostic methods, and treatment*. J Neurosurg, 1958. **15**(5): p. 489-503.
47. Walker, M.D., et al., *Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial*. J Neurosurg, 1978. **49**(3): p. 333-43.
48. Holdsworth, C.H., et al., *Adaptive IMRT using a multiobjective evolutionary algorithm integrated with a diffusion-invasion model of glioblastoma*. Phys Med Biol, 2012. **57**(24): p. 8271-83.
49. Neal, M.L., et al., *Response classification based on a minimal model of glioblastoma growth is prognostic for clinical outcomes and distinguishes progression from pseudoprogression*. Cancer Res, 2013. **73**(10): p. 2976-86.
50. Bleeher, N.M. and S.P. Stenning, *A Medical Research Council trial of two radiotherapy doses in the treatment of grades 3 and 4 astrocytoma. The Medical Research Council Brain Tumour Working Party*. Br J Cancer, 1991. **64**(4): p. 769-74.
51. Souhami, L., et al., *Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **60**(3): p. 853-60.
52. Lee, S.W., et al., *Patterns of failure following high-dose 3-D conformal radiotherapy for high-grade astrocytomas: a quantitative dosimetric study*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1999. **43**(1): p. 79-88.

53. Fiveash, J.B. and S.A. Spencer, *Role of radiation therapy and radiosurgery in glioblastoma multiforme*. Cancer J, 2003. **9**(3): p. 222-9.
54. Choi, B.D., et al., *The use of motor mapping to aid resection of eloquent gliomas*. Neurosurg Clin N Am, 2012. **23**(2): p. 215-25, vii.
55. Laperriere, N., L. Zuraw, and G. Cairncross, *Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review*. Radiother Oncol, 2002. **64**(3): p. 259-73.
56. Berger, M.S. and R.C. Rostomily, *Low grade gliomas: functional mapping resection strategies, extent of resection, and outcome*. J Neurooncol, 1997. **34**(1): p. 85-101.
57. Han, S.J. and M.E. Sughrue, *The rise and fall of "biopsy and radiate": a history of surgical nihilism in glioma treatment*. Neurosurg Clin N Am, 2012. **23**(2): p. 207-14, vii.
58. Sanai, N. and M.S. Berger, *Glioma extent of resection and its impact on patient outcome*. Neurosurgery, 2008. **62**(4): p. 753-64; discussion 264-6.
59. Lacroix, M., et al., *A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival*. J Neurosurg, 2001. **95**(2): p. 190-8.
60. Keles, G.E., et al., *Volume of residual disease as a predictor of outcome in adult patients with recurrent supratentorial glioblastomas multiforme who are undergoing chemotherapy*. J Neurosurg, 2004. **100**(1): p. 41-6.
61. Senft, C., et al., *Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial*. Lancet Oncol, 2011. **12**(11): p. 997-1003.
62. Stummer, W., et al., *Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial*. Lancet Oncol, 2006. **7**(5): p. 392-401.
63. Colditz, M.J. and R.L. Jeffree, *Aminolevulinic acid (ALA)-protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 1: Clinical, radiological and pathological studies*. J Clin Neurosci, 2012. **19**(11): p. 1471-4.
64. Colditz, M.J., K. Leyen, and R.L. Jeffree, *Aminolevulinic acid (ALA)-protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 2: theoretical, biochemical and practical aspects*. J Clin Neurosci, 2012. **19**(12): p. 1611-6.
65. Westphal, M., et al., *A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma*. Neuro Oncol, 2003. **5**(2): p. 79-88.
66. Perry, J.R., et al., *Phase II trial of continuous dose-intense temozolomide in recurrent malignant glioma: RESCUE study*. J Clin Oncol, 2010. **28**(12): p. 2051-7.
67. Wong, E.T., et al., *Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials*. J Clin Oncol, 1999. **17**(8): p. 2572-8.
68. van den Bent, M.J., et al., *Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial*. J Clin Oncol, 2006. **24**(18): p. 2715-22.
69. Cairncross, G., et al., *Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402*. J Clin Oncol, 2006. **24**(18): p. 2707-14.

70. Wick, W., et al., *NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide*. J Clin Oncol, 2009. **27**(35): p. 5874-80.
71. Natelson, E.A. and D. Pyatt, *Temozolomide-induced myelodysplasia*. Adv Hematol, 2010. **2010**: p. 760402.
72. Party, M.R.C.B.T.W., *Randomized trial of procarbazine, lomustine, and vincristine in the adjuvant treatment of high-grade astrocytoma: a Medical Research Council trial*. J Clin Oncol, 2001. **19**(2): p. 509-18.
73. van den Bent, M.J., et al., *MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951*. J Clin Oncol, 2009. **27**(35): p. 5881-6.
74. Tabatabai, G., et al., *Molecular diagnostics of gliomas: the clinical perspective*. Acta Neuropathol, 2010. **120**(5): p. 585-92.
75. Park, J.K., et al., *Scale to predict survival after surgery for recurrent glioblastoma multiforme*. J Clin Oncol, 2010. **28**(24): p. 3838-43.
76. Mandl, E.S., et al., *Repeated surgery for glioblastoma multiforme: only in combination with other salvage therapy*. Surg Neurol, 2008. **69**(5): p. 506-9; discussion 509.
77. Wind, J.J., et al., *The role of adjuvant radiation therapy in the management of high-grade gliomas*. Neurosurg Clin N Am, 2012. **23**(2): p. 247-58, viii.
78. Vredenburgh, J.J., et al., *Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme*. J Clin Oncol, 2007. **25**(30): p. 4722-9.
79. Brem, H., et al., *Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group*. Lancet, 1995. **345**(8956): p. 1008-12.
80. Merrell, R.T., E.C. Quant, and P.Y. Wen, *Advances in treatment options for high-grade glioma—current status and future perspectives*. Euro. Neuro. Rev, 2010. **5**(1): p. 49-55.
81. Carrillo, J.A. and C.A. Munoz, *Alternative chemotherapeutic agents: nitrosoureas, cisplatin, irinotecan*. Neurosurg Clin N Am, 2012. **23**(2): p. 297-306, ix.
82. Hottinger, A.F., R. Stupp, and K. Homicsko, *Standards of care and novel approaches in the management of glioblastoma multiforme*. Chin J Cancer, 2014. **33**(1): p. 32-9.
83. Grobmyer, S.R., et al., *The promise of nanotechnology for solving clinical problems in breast cancer*. J Surg Oncol, 2011. **103**(4): p. 317-25.
84. Nduom, E.K., et al., *Nanotechnology applications for glioblastoma*. Neurosurg Clin N Am, 2012. **23**(3): p. 439-49.
85. Liu, L., et al., *Polymeric micelles anchored with TAT for delivery of antibiotics across the blood-brain barrier*. Biopolymers, 2008. **90**(5): p. 617-23.
86. Loo, C., et al., *Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer*. Technol Cancer Res Treat, 2004. **3**(1): p. 33-40.
87. Xing, Y., et al., *Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry*. Nat Protoc, 2007. **2**(5): p. 1152-65.
88. Provenzale, J.M. and G.A. Silva, *Uses of nanoparticles for central nervous system imaging and therapy*. AJNR Am J Neuroradiol, 2009. **30**(7): p. 1293-301.

89. Jain, T.K., et al., *Magnetic nanoparticles with dual functional properties: drug delivery and magnetic resonance imaging*. Biomaterials, 2008. **29**(29): p. 4012-21.
90. Sun, C., J.S. Lee, and M. Zhang, *Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(11): p. 1252-65.
91. Thorek, D.L., et al., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging*. Ann Biomed Eng, 2006. **34**(1): p. 23-38.
92. Jordan, A., et al., *The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma*. J Neurooncol, 2006. **78**(1): p. 7-14.
93. Roca, A., et al., *Progress in the preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2009. **42**(22): p. 224002.
94. Rosen, J.E., et al., *Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics*. Nanomedicine, 2012. **8**(3): p. 275-90.
95. Bernal, G.M., et al., *Convection-enhanced delivery and in vivo imaging of polymeric nanoparticles for the treatment of malignant glioma*. Nanomedicine, 2014. **10**(1): p. 149-57.
96. Hochberg, F.H. and A. Pruitt, *Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma*. Neurology, 1980. **30**(9): p. 907-11.
97. Hentschel, S.J. and F.F. Lang, *Current surgical management of glioblastoma*. Cancer J, 2003. **9**(2): p. 113-25.
98. Wankhede, M., et al., *Magnetic nanoparticles: an emerging technology for malignant brain tumor imaging and therapy*. Expert Rev Clin Pharmacol, 2012. **5**(2): p. 173-86.
99. Furnari, F.B., et al., *Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment*. Genes Dev, 2007. **21**(21): p. 2683-710.
100. Agemy, L., et al., *Targeted nanoparticle enhanced proapoptotic peptide as potential therapy for glioblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(42): p. 17450-5.
101. Hadjipanayis, C.G., et al., *EGFRvIII antibody-conjugated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging-guided convection-enhanced delivery and targeted therapy of glioblastoma*. Cancer Res, 2010. **70**(15): p. 6303-12.