

*“Declare the past, diagnose the present, foretell the future.”*

Hipócrates

## ÍNDICE

Glossário.....	8
Resumo.....	10
Abstract.....	11
Introdução.....	13
Materiais e métodos.....	18
Desenvolvimento.....	20
Via de sinalização EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K.....	21
Receptores tirosina-cinase – EGFR, PDGFRA.....	23
PTEN.....	27
OUTROS – NF1 e PI3K1 .....	30
Via de sinalização p16 <sup>Ink4a</sup> /CDK4/Rb1.....	31
Rb1 .....	32
p 16 <sup>i n k 4a</sup> .....	34
CDK4 .....	35
Via de sinalização TP53/MDM2/MDM4/p14 <sup>ARF</sup> .....	36
p53.....	37
P14 <sup>ARF</sup> .....	39
MDM2/MDM4.....	40
Perda de heterozigotia.....	41
Perda de heterozigotia do cromossoma 10.....	41

Perda de heterozigotia de 13q .....	43
Perda de heterozigotia de 6q .....	44
Perda de heterozigotia de 9p .....	44
Perda de heterozigotia 1p/19q .....	45
Perda de heterozigotia 22q/7q .....	46
IDH1 .....	46
Epigenética.....	49
MGMT .....	50
MicroRNA.....	53
Classificação Molecular de Glioblastoma Multiforme .....	56
Conclusão .....	61
Agradecimentos .....	63
Referências bibliográficas .....	64

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<i>GBM</i>	<i>Glioblastoma Multiforme</i>
<i>OMS</i>	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
<i>EUA</i>	<i>Estados Unidos da América</i>
<i>SNC</i>	<i>Sistema Nervoso Central</i>
<i>NF1</i>	<i>Neurofibromatose 1</i>
<i>QT</i>	<i>Quimioterapia</i>
<i>TMZ</i>	<i>Temozolamida</i>
<i>Rb1</i>	<i>Retinoblastoma 1</i>
<i>pRb</i>	<i>Proteína do retinoblastoma</i>
<i>p53</i>	<i>Proteína 53</i>
<i>IDH1</i>	<i>Isocitrato desidrogenase 1</i>
<i>IDH2</i>	<i>Isocitrato desidrogenase 2</i>
<i>EGFR</i>	<i>Receptor do factor de crescimento epidermóide</i>
<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
<i>PI3K</i>	<i>Fosfatidinositol 3-cinase</i>
<i>PIP2</i>	<i>Fosfatidinositol 4,5-bifosfato</i>
<i>PIP3</i>	<i>Fosfatidinositol (3,4,5) -trifosfato</i>
<i>Akt</i>	<i>Proteína cinase B</i>
<i>mTOR</i>	<i>Proteína alvo da rapamicina nos mamíferos</i>
<i>RTK</i>	<i>Receptores tirosina-cinase</i>

<i>PDGFRA</i>	<i>Receptor alfa do factor de crescimento derivado das plaquetas</i>
<i>MET</i>	<i>Receptor do factor de crescimento do hepatócito</i>
<i>CDKN2A- P16<sup>Ink4a</sup></i>	<i>Inibidor da cinase dependente de ciclina 2A</i>
<i>CDKN2A - p14<sup>arf</sup></i>	<i>Inibidor da cinase dependente de ciclina 2A</i>
<i>CDK4</i>	<i>Cinase dependente de ciclina 4</i>
<i>ADN</i>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<i>KDR</i>	<i>Kinase insert domain receptor</i>
<i>PDGF</i>	<i>Factor de crescimento derivado das plaquetas</i>
<i>FAK</i>	<i>Cinase de adesão local</i>
<i>MDM2</i>	<i>Murine double minute 2</i>
<i>PKC</i>	<i>Proteína cinase C</i>
<i>E2F1</i>	<i>Factor de transcrição E2F1</i>
<i>CDKN2B- p15<sup>INK4b</sup></i>	<i>Inibidor da cinase dependente de ciclina 2B</i>
<i>p18<sup>INK4c</sup></i>	<i>Inibidor da cinase dependente de ciclina 2C</i>
<i>CDK6</i>	<i>Cinase dependente de ciclina 6</i>
<i>MDM4</i>	<i>p53 binding protein homolog</i>
<i>MGMT</i>	<i>O6-metilguanina-metiltransferase</i>
<i>DMBT1</i>	<i>Deleted in malignant brain tumors 1</i>
<i>FGFR</i>	<i>Receptor do factor de crescimento dos fibroblastos</i>
<i>ANXA7</i>	<i>Annexin A7</i>
<i>PARK2</i>	<i>Parkinson protein 2</i>

<i>QKI</i>	<i>Quaking homolog, KH domain RNA binding</i>
<i>PDE10A</i>	<i>Fosfodiesterase 10A</i>
<i>PTPRD</i>	<i>Receptor tirosina-fosfatase tipo D</i>
<i>CHD5</i>	<i>Proteína com domínios cromo-helicase e de ligação ao DNA-5</i>
<i>P19ARF</i>	<i>Inibidor da cinase dependente de ciclina 2A</i>
<i>TIMP- 3</i>	<i>Inibidor de metaloproteinases-3 tecidual</i>
<i>NADPH</i>	<i>Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina</i>
<i>ARN</i>	<i>Ácido ribonucleico</i>
<i>miR</i>	<i>MicroARN</i>
<i>MMR</i>	<i>Mismatch repair</i>
<i>RT</i>	<i>Radioterapia</i>
<i>UTR</i>	<i>3'-untranslated region</i>
<i>TGF-β</i>	<i>Factor de crescimento tumoral beta</i>
<i>RECK</i>	<i>Proteína indutora de reversão rica em cisteína com motivos kazal</i>
<i>MMP</i>	<i>Metaloproteinases de matriz</i>
<i>TGFBR2/3</i>	<i>Receptor do factor de crescimento tumoral beta 2 e 3</i>
<i>DAXX</i>	<i>Death-domain associated protein</i>
<i>APAF1</i>	<i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i>
<i>PPIF</i>	<i>Peptidylprolyl isomerase F</i>
<i>JNK</i>	<i>c-Jun NH(2)-terminal kinase</i>

<i>PUMA</i>	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis)</i>
<i>BMI1</i>	<i>BMI1 polycomb ring finger oncogene</i>
<i>CCN2</i>	<i>Connective tissue growth factor</i>
<i>NKX2-2</i>	<i>NK2 homeobox 2</i>
<i>OLIG2</i>	<i>Oligodendrocyte lineage transcription factor 2</i>
<i>CDKN1A</i>	<i>Inibidor da cinase dependente de ciclina 1A</i>
<i>CHI3L1</i>	<i>Chitinase 3-like 1</i>
<i>NF- <math>\kappa</math>B</i>	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<i>TNFRSF1A</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A</i>
<i>TRADD</i>	<i>TNFRSF1A-associated via death domain</i>
<i>RELB</i>	<i>V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B</i>

## GLOSSÁRIO

*Amplificação*: produção de múltiplas cópias de uma sequência de ADN.

*Delecção*: aberração cromossômica em que há a perda de parte de um cromossoma (braço ou parte intersticial ou terminal de um braço cromossômico).

*Dissomia Uniparental Adquirida*: os dois homólogos de um par cromossômico são herdados de um dos pais, com ausência do homólogo correspondente que deveria ser herdado do outro progenitor.

*Double minutes*: fragmentos cromossômicos muito pequenos, com ou sem centrómero, que são a expressão citogenética de amplificação genética somática.

*Gene ortólogo*: gene homólogo de diferente organismo, que deriva de um mesmo gene inicial, por especiação filogenética.

*Haploinsuficiência*: situação em que os 50% de proteína codificada e produzida por um indivíduo heterozigótico para um determinado *locus* não são suficientes para manter a função em níveis normais.

*Hemizigotia*: presença de um único alelo no genoma, como ocorre para o cromossoma X. Pode ocorrer também em situações anormais (por ex. delecções) em que, em vez de um genótipo diplóide, apenas se encontra uma cópia de um alelo.

*Locais CpG*: regiões do ADN com uma extensão habitualmente inferior a 1kb, com elevada densidade de dinucleótidos CpG (bases citosina hipometiladas e guanina).

*Locus*: determinado local de um cromossoma em que se encontra um gene.

*Metilação (do ADN)*: ligação covalente de um grupo metil ao ADN.

*Perda de heterozigotia (loss of heterozygosity)*: perda de um alelo responsável pela heterozigotia constitucional para um determinado locus no ADN de um clone celular em comparação com o ADN das restantes células do organismo. Quando o alelo perdido corresponde à única cópia do par de alelos de uma *locus*, há perda de função do gene. Se for um *locus* antioncogénico, corresponde ao “segundo acontecimento” que antecede a tumorigénese.

*Splicing Alternativo*: selecção de diferentes sequências de exões a partir do mesmo ARNhn, originando diferentes ARNm que codificam polipeptídeos diferentes a partir de um mesmo gene.

*Tandem repeats*: pequena sequência de ADN que se repete como múltiplas cópias adjacentes, com a mesma orientação, na cadeia de ADN.

## RESUMO

*Contexto:* O glioblastoma multiforme é o mais frequente e letal dos tumores cerebrais malignos primários, tendo-se verificado um aumento da sua incidência nos últimos anos. Trata-se de uma doença de mau prognóstico, sendo que menos de 3% dos pacientes padecendo desta têm uma sobrevida superior a 5 anos após o diagnóstico, permanecendo uma entidade resistente à terapêutica. No sentido de melhorar a resposta à terapêutica e o prognóstico, têm sido feitos inúmeros esforços visando a caracterização genética deste tumor.

*Objectivo:* Revisão das principais alterações genéticas que ocorrem no glioblastoma multiforme, com foco nos mecanismos genéticos e epigenéticos que se manifestam neste tumor, a sua distribuição percentual entre os vários subtipos e a sua influência no prognóstico.

*Métodos:* Foi realizada uma extensa pesquisa bibliográfica em bases de dados da literatura médica, abrangendo o período de 1993 a 2013, tendo sido seleccionadas publicações em língua inglesa e francesa. As pesquisas foram realizadas na base de dados *Pubmed* ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)), *Science Direct* ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)), assim como na Biblioteca do conhecimento *online* - B-On ([www.b-on.pt](http://www.b-on.pt)) com o objectivo de encontrar fontes bibliográficas acerca da caracterização genética de glioblastoma. Seleccionaram-se oitenta e uma fontes bibliográficas. Foram usadas as seguintes palavras-chave em diferentes combinações: “Glioblastoma Multiforme”, “Genética” (*Genetics*), “Epigenética” (*Epigenetics*), “Classificação” (*Classification*) e “Diagnóstico” (*Diagnosis*).

*Resultados e Conclusão:* O glioblastoma multiforme caracteriza-se pela presença de diversas alterações genéticas e epigenéticas, que ocorrem quer isoladamente como em associação, traduzindo-se em diferentes cursos da doença, assim como em diferentes

respostas à terapêutica e prognóstico. A caracterização genética do glioblastoma multiforme permite o conhecimento dos diversos mecanismos que têm influência no decurso desta patologia, assim como poderá conduzir à otimização da sua abordagem terapêutica e eventualmente à melhoria do seu prognóstico.

*Palavras-chave:* Glioblastoma Multiforme; Genética; Epigenética; Classificação; Diagnóstico.

## **A B S T R A C T**

*Background:* Glioblastoma multiforme is the most common and lethal malignant primary brain tumor, and there has been an increase in its incidence in recent years. It is a disease of poor prognosis, with less than 3% of patients still alive at 5 years after diagnosis, remaining resistant to therapy. Aiming to improve its response to therapy, various efforts are being made to perform its genetic characterization.

*Aim:* Review the major genetic alterations that occur in glioblastoma multiforme, focusing on the genetic and epigenetic mechanisms that manifest in this tumor, its percentage distribution among the various subtypes and their influence on prognosis.

*Methods:* An extensive literature search was performed in medical literature databases, covering the period from 1993 to 2013, selecting publications in English and French languages. The surveys were conducted in the Pubmed database ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)), Science Direct ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)), as well as in Biblioteca do conhecimento online - B-On ([www.b-on.pt](http://www.b-on.pt)) aiming to find bibliographic references on the genetic characterization of glioblastoma. Eighty-one bibliographic references were selected. The

following key words were used, in various combinations: "Glioblastoma Multiforme", "Genetics", "Epigenetics", "Classification" and "Diagnosis".

*Results and Conclusion:* Glioblastoma multiforme is characterized by the presence of several genetic and epigenetic changes that occur either singly or in combination, resulting in different courses of the disease, as well as in different responses to therapy and prognosis. Genetic characterization of glioblastoma multiforme allows the knowledge of the various mechanisms that influence the course of the disease, and leads to optimization of its therapeutic approach and eventually to the improvement of its prognosis.

*Keywords:* Glioblastoma Multiforme: Genetic, Epigenetic, Classification, Diagnosis.

## INTRODUÇÃO

O glioblastoma multiforme (GBM) é o mais frequente e letal dos tumores cerebrais malignos primários (1). Mais concretamente, inclui-se no subtipo dos astrocitomas, que são um tipo de gliomas, representando 65% destes (2). Deriva dos astrócitos, integrando o subgrupo dos astrocitomas. Segundo a Classificação de Tumores do Sistema Nervoso Central da OMS, os astrocitomas categorizam-se em quatro graus distintos. Dentro destes, incluem-se o astrocitoma de grau I (tipo pilocítico), o astrocitoma de grau II (astrocitoma difuso), o astrocitoma de grau III (astrocitomas anaplásico) e, por fim, o astrocitoma de grau IV, que corresponde precisamente ao GBM.

Por sua vez, o GBM pode ser classificado em dois subgrupos: GBM primário e GBM secundário. Esta classificação tem por base as características clínicas e alterações genéticas de cada um (3). No diagnóstico inaugural, o GBM primário apresenta-se como uma lesão totalmente formada, sem evidência clínica, radiológica ou histopatológica da existência de uma lesão precursora de menor grau de malignidade, sendo também designado por GBM *de novo*. Este tipo de GBM é o mais comum, representando 95% deste tipo de tumores. Por sua vez, o GBM secundário desenvolve-se lentamente, progredindo a partir de um astrocitoma difuso de baixo grau (OMS II) ou astrocitoma anaplásico (OMS III). O diagnóstico de GBM secundário requer evidência clínica (por neuroimagem) e histológica (por biópsia) da evolução a partir de lesões de menor grau de malignidade. Este constitui uma entidade relativamente rara quando comparada com o GBM primário, representando apenas 5% dos casos (4). Apesar de histologicamente indistinguíveis, estas duas subclasses desenvolvem-se através de diferentes vias genéticas (5), que serão discutidas adiante.

Cada um destes subtipos apresenta também outras características que os distinguem, nomeadamente a nível do perfil do doente que afectam e respectivo prognóstico.

Ao passo que o GBM primário atinge pacientes com idade média de 62 anos, o secundário desenvolve-se em doentes mais jovens, com idade média de 45 anos (4). No que respeita ao género, o GBM primário é mais frequente em homens (ratio homem para mulher de 1,33), ao passo que o GBM secundário é mais comum em pacientes do género feminino (ratio homem para mulher de 0,65) (6); este valor vem corroborar estudos anteriores que demonstraram uma maior frequência de mutações da proteína p53 em mulheres, alteração característica do GBM secundário (7).

O tempo de evolução de cada subtipo é também distinto. Enquanto o GBM primário se caracteriza por um período médio de 6,3 meses entre o aparecimento dos primeiros sintomas e o diagnóstico histológico, o GBM secundário apresenta um tempo médio de progressão de aproximadamente 2 anos a partir do astrocitoma anaplásico (grau III) e de cerca de 5 anos a partir do astrocitoma difuso de baixo-grau (grau II).

Finalmente, segundo *Ohgaki e Kleihues*, a sobrevida dos pacientes afectados por GBM de cada uma das classes apresentou uma diferença significativa (4,7 meses para o GBM primário e 7,8 meses para o secundário). No entanto, os autores consideram que esta disparidade é atribuível à idade mais avançada dos doentes atingidos pelo GBM primário, dado que a idade mais jovem (mais usualmente associada ao GBM secundário) é um factor preditivo consistente de maior sobrevida em pacientes com GBM. Após o ajustamento etário, não são encontradas diferenças significativas em termos de sobrevida entre os dois subtipos (4).

Adicionalmente, de acordo com um estudo realizado por *Stupp et al*, em 573 pacientes recentemente diagnosticados com GBM, com idades compreendidas entre 18 e 70 anos, submetidos a um protocolo terapêutico que incluía um esquema de cirurgia de remoção total, quando possível, concomitantemente com radioterapia (RT) e quimioterapia (QT) com o agente citostático alquilante temozolamida (TMZ), sem distinção entre os subtipos de GBM, a sobrevida média observada foi de 14,6 meses (8).

Quanto à epidemiologia do GBM, tem-se verificado um aumento da sua incidência nos últimos anos, o que provavelmente se deve à sofisticação das técnicas de diagnóstico, às alterações feitas na classificação histológica e ainda no refinamento a nível das técnicas neurocirúrgicas. Além disso, o envelhecimento da população e o aumento da incidência deste tumor acima dos 60 anos de idade terá também contribuído (9). A incidência observada nos EUA é de 2.96 novos casos por ano em cada 100,000 habitantes (4), sendo a idade média de diagnóstico de 62 anos. No que respeita a dados europeus, segundo um estudo efectuado por *Ohgaki et al*, em Zurique, Suíça (1.16 milhões de habitantes), a incidência de GBM entre 1980 e 1994, por cada 100,000 habitantes/ano, ajustada à população mundial, foi de 3.32 no género masculino e 2.24 no género feminino (6).

Verificou-se também que os tumores cerebrais, e portanto o GBM, são mais frequentes nos países mais desenvolvidos e industrializados, assim como em caucasianos, comparativamente com africanos e asiáticos. Estes achados dever-se-ão mais provavelmente a diferenças nas condições socio-económicas e acesso a cuidados de saúde, mais do que a diferenças na susceptibilidade genética (2).

No que respeita a factores de risco para o desenvolvimento de GBM, podem ser aplicados os estudados para o desenvolvimento de tumores cerebrais primários ou de gliomas. A nível de factores ambientais e ocupacionais, não foi encontrada nenhuma

relação inequívoca com o desenvolvimento de tumores cerebrais. Apesar disso, verificou-se uma maior incidência de gliomas em determinadas profissões, como por exemplo, em bombeiros, médicos e agricultores, assim como em alguns tipos de exposição ocupacional ao formaldeído. A exposição a arsénio, mercúrio, chumbo, petróleo, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e alguns tipos de insecticidas estava também associada a uma maior frequência de gliomas. Foi também estudada a relação da dieta com o aparecimento destes tumores, tendo-se concluído que a ingestão de alimentos com maior quantidade de nitritos (carnes curadas e fiambre cozido) aumentava o risco de desenvolvimento de glioma, ao passo que, um maior consumo de fruta e vegetais funcionava como factor protector. Não foi encontrada qualquer relação com o tabagismo. Já a exposição a radiação X terapêutica está inequivocamente associada ao aumento do risco de desenvolvimento de tumores cerebrais. Adicionalmente, existem estudos que mostram que indivíduos com antecedentes familiares de glioma têm maior risco de vir a desenvolver este tipo de tumor, relativamente à população em geral. Foi ainda verificado que determinados polimorfismos em genes codificantes de enzimas envolvidas no metabolismo de carcinogénios químicos podem aumentar a susceptibilidade de desenvolver gliomas. Finalmente, há que referir a existência de síndromes familiares de cancro associados ao aparecimento de tumores do SNC, nomeadamente o síndrome de Li-Fraumeni (mutações da proteína p53) e a Neurofibromatose tipo 1 (NF1). No que concerne o uso de telemóveis, não foi encontrada uma associação consistente entre o uso destes dispositivos e a ocorrência de tumores cerebrais (2).

Nos últimos anos, pouco ou nenhum progresso foi feito no tratamento deste tumor, embora a utilização de novos esquemas terapêuticos se associe um melhor prognóstico (8,10), esta doença permanece resistente à maioria das terapêuticas e o seu prognóstico continua a ser sombrio, sendo que actualmente, menos de 3% dos pacientes com GBM têm

uma sobrevida superior a 5 anos (dados dos EUA e Europa) (11). Neste sentido, foram depositadas esperanças no estudo genético deste cancro visando que esse conhecimento permitisse um tratamento mais dirigido e eficaz, possibilitando uma melhoria do prognóstico. Com os múltiplos esforços realizados recentemente, o mais promissor deles, *The Cancer Genome Atlas*, este objectivo tornou-se mais tangível (11).

Em suma, a caracterização genética do GBM é uma peça fundamental no caminho para a melhoria da sobrevida e prognóstico dos pacientes com GBM, actualmente tão desanimador, motivo pelo qual optei por este tema.

## M A T E R I A I S E M É T O D O S

Para a elaboração deste artigo de revisão foi realizada uma extensa pesquisa bibliográfica em diversas bases de dados, abrangendo as publicações de 1997 a 2013.

A bibliografia seleccionada continha fontes em língua inglesa e francesa. As pesquisas foram realizadas na base de dados *Pubmed* ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)), *Science Direct* ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)), assim como na Biblioteca do conhecimento *online* - B-On ([www.b-on.pt](http://www.b-on.pt)).

Foram efectuadas múltiplas pesquisas em cada base de dados. As primeiras pesquisas usaram as seguintes palavras-chave em diferentes combinações: “Glioblastoma Multiforme”, “Genetics”, “Epigenetics”, “Classification” e “Diagnosis”.

À medida que a revisão do tema ia ganhando forma, foram feitas pesquisas mais específicas em determinadas áreas cuja informação recolhida noutras fontes não era suficiente ou não era suficientemente esclarecedora. Foram seleccionadas 76 referências bibliográficas.

Neste artigo são revistas as principais alterações genéticas que se manifestam no Glioblastoma Multiforme, assim como a sua influência no prognóstico, sobrevida e resposta à terapêutica. É feito um esforço no sentido de, sempre que possível, apoiar as informações citadas com dados retirados de outras fontes e estudos, de preferência, aqueles com amostras de maior tamanho, métodos fiáveis e de publicação mais recente.

Os critérios de inclusão usados foram a detecção das palavras-chave enunciadas acima e a data de publicação do artigo, dentro das opções disponíveis, dando preferência aos mais recentes, combinado com a escolha de um autor que tenha várias publicações na área e, finalmente, com a língua do artigos.

Após a pesquisa nas referidas bases de dados recorrendo às palavras-passe e aplicando os critérios de inclusão acima expressos, procedeu-se a uma leitura dos títulos e

resumos dos resultados da pesquisa, optando por aqueles que pareciam ter informação relevante acerca das alterações genéticas e epigenéticas que caracterizam o Glioblastoma Multiforme.

## **D E S E N V O L V I M E N T O**

No estudo da caracterização genética do GBM múltiplas alterações genéticas, de vias de sinalização e epigenéticas foram encontradas (Tabela 1).

Na maioria dos casos de GBM observavam-se, fundamentalmente, a alteração de três vias de sinalização, resultante de alterações genéticas: a via dos receptores tirosina-cinase, a via do ciclo celular (Rb1) e a via da proteína p53. Serão abordadas separadamente duas alterações genéticas de grande importância e frequência no GBM, que podem ou não interferir com as vias de sinalização anteriormente referidas, a perda de heterozigotia e a mutação a nível do gene IDH1.

Finalmente, não é negligenciável o papel da epigenética no desenvolvimento do GBM, motivo pelo qual também será abordado este ponto.

A caracterização genética do GBM permitiu ainda a criação de um novo sistema de classificação deste tumor: Classificação Molecular do GBM.

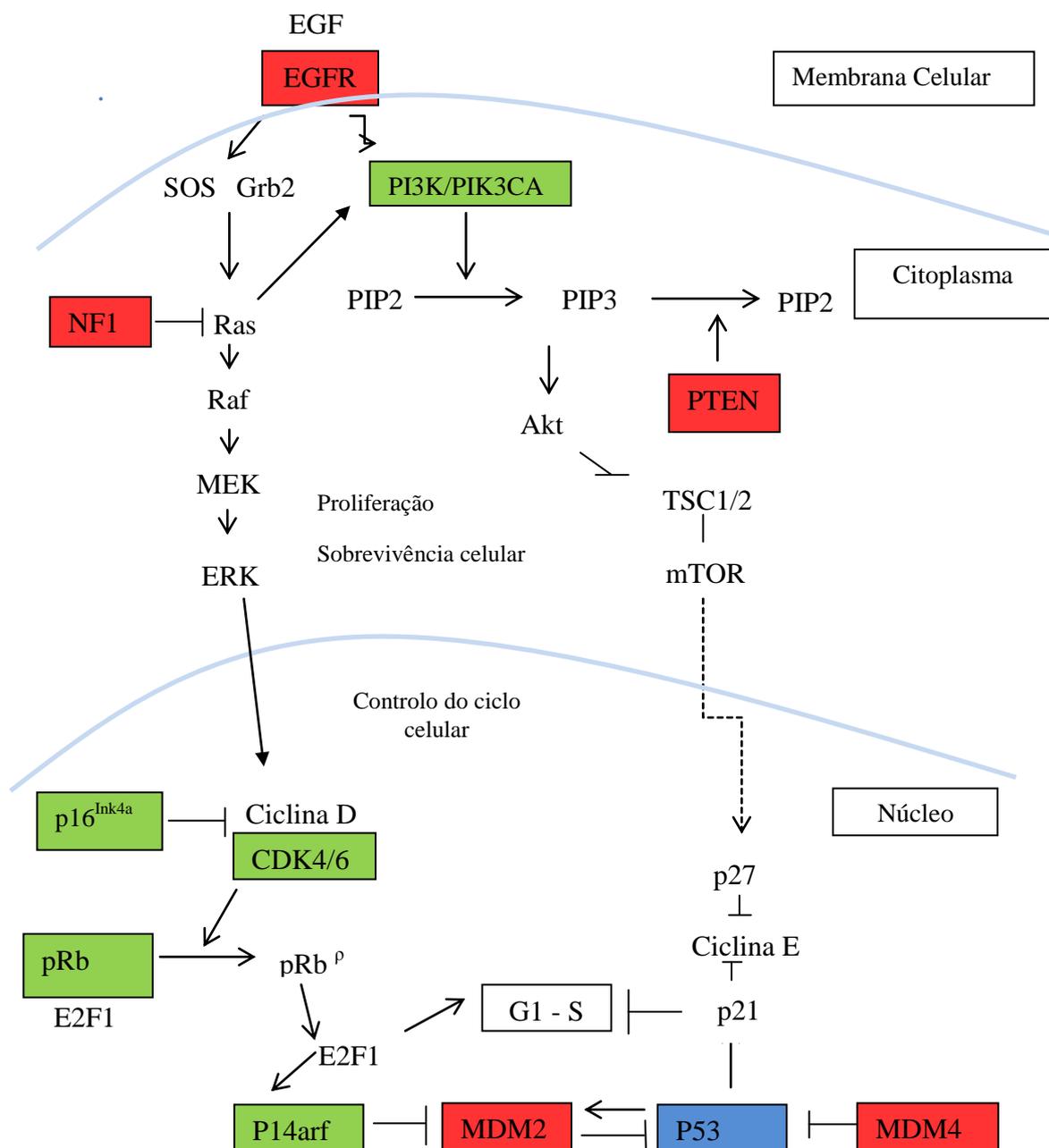
Tabela 1. Principais diferenças entre GBM Primário e Secundário				
Gene	Fenómeno	Frequência total	Frequência GBM Primário	Frequência GBM Secundário
EGFR	Amplificação	34% (6)	40-50% (12)	8% (6)
PDGFRA	Amplificação	15% (12)	--	--
PTEN	Perda de heterozigotia 10q	69%	70%	63% (10)
	Metilação	32%	9%	82% (10)
	Mutação	24-37%	25-40%	4% (10)
NF1	Mutação/Delecção	18% (13)	--	--
PIK3R1	Mutação	10% (13)	--	--
Rb1	Perda de heterozigotia 13q	25-45% (14)	12% (10)	38% (10)
	Metilação	25%	15%	40% (15)
P16 <sup>ink4a</sup>	Delecção	41% (16)	--	--
	Metilação	60% (17)	--	--
CDK4	Amplificação	14% (13)		
P53	Mutação	35%	28%	65% (4)
MDM2	Amplificação	15% (5)	--	--
MDM4	Amplificação	4% (18)	--	--
P14 <sup>ARF</sup>	Delecção	44% (10)	--	--
	Metilação	--	50%	30% (19)
IDH1	Mutação	12%	5% (20)	95% (21)
MGMT	Metilação	40-57% (5)	36%	75% (22)

### ***Via de sinalização EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K***

A via EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K (Figura 1), envolvida no ciclo celular, é uma via fundamental no desenvolvimento do GBM primário (4), presente em 88% destes tumores (13).

Resumidamente, o receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR) é activado através da ligação de factores de crescimento ao seu domínio extracelular, com recrutamento de fosfatidinositol 3-cinase (PI3K) para a membrana celular. A PI3K fosforila o fosfatidinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3),

levando à activação a jusante da proteína cinase B (Akt) e da proteína alvo da rapamicina nos mamíferos (mTOR), aumentando a proliferação e a sobrevivência celulares através do bloqueio da apoptose. Por sua vez, a PTEN (*phosphatase and tensin homology*) inibe a sinalização por PIP3, inibindo assim a proliferação celular (4).



**Figura 1.** Principais vias de sinalização envolvidas na patogénese do GBM. A vermelho, encontram-se as alterações típicas de GBM primário, a azul as alterações típicas para o GBM secundário e a verde as alterações presentes em igual proporção nos dois subtipos. Retirado de *Ohgaki et al* (5).

### **Receptores tirosina-cinase – EGFR, PDGFRA**

A maioria dos GBM primários apresenta amplificação e/ou mutação de um gene codificante de um RTK (receptor tirosina-cinase). Em 40 a 50% dos casos é o gene do receptor EGFR (12) (localizado no cromossoma 7p12 (23) que está alterado, em cerca de 15% dos casos é do receptor PDGFRA (receptor alfa do factor de crescimento derivado das plaquetas) e, finalmente, em 5% dos casos a mutação localiza-se no gene codificante do MET (receptor do factor de crescimento do hepatócito) (12).

O fenómeno de amplificação génica corresponde geralmente à formação de *double minutes* (24), também denominados de microcromossomas (25), que se caracterizam por ADN organizado em elementos extra-cromossómicos, podendo ainda apresentar-se como *tandem repeats*, caracterizados pela repetição de pequenas sequências de ADN adjacentes, localizadas num único *locus*, e com a mesma orientação na cadeia (25), que formam usualmente regiões de coloração homogénea, ou ainda como alterações difusamente presentes por todo o genoma (24).

A amplificação do gene codificante do EGFR é um achado frequente no GBM primário, pensando-se que seja um evento tardio na carcinogénese deste tumor (12,26). Esta mutação encontra-se associada à sobreexpressão do gene EGFR em 40 a 60% destes tumores (5), com subsequente activação da via de sinalização correspondente (10). Usualmente a amplificação deste gene, de acordo com o que foi referido anteriormente, apresenta-se sob a forma de *double minutes* (24,27).

Esta mutação segue uma distribuição etária curiosa, reflectindo intimamente a distribuição etária do GBM primário, não sendo detectada em pacientes com idade inferior a 35 anos (6). É, no entanto, um achado muito raro nos GBM secundários (5).

A sobreexpressão do gene EGFR não está necessariamente associada à sua amplificação, pois somente 70 a 90% das sobreexpressões estão associadas a amplificações do gene (5).

Dos GBM que apresentam um EGFR em sobreexpressão, 63 a 75% manifestam também rearranjos do gene correspondente, o que resulta em tumores que expressam simultaneamente genes selvagens e genes mutados (28). Destas, a mutação mais frequente, presente em 20% a 30% dos casos não seleccionados de GBM (28), corresponde à variante EGFRvIII, também denominada 2–7EGFR ou pEGFR. Está presente em associação com a amplificação do gene EGFR em 20% a 50% dos casos (29), ou em 50% a 60% dos casos, segundo outros autores (28).

A variante EGFRvIII resulta de uma deleção não-aleatória de 801 pares de bases dos exões 2-7. O receptor mutado resultante não contém uma porção do domínio extracelular (29). Por esse motivo, este receptor mostra-se incapaz de se conectar aos seus ligandos conhecidos. Não obstante, apresenta actividade constitutiva de tirosina-cinase, sendo globalmente aceite que este fenómeno é importante para o seu efeito pró-oncogénico (28). É ainda provável que este efeito seja potenciado pela capacidade deste receptor de permanecer activo por mais tempo, como resultado da sua degradação tardia (28).

Esta variante confere ao tumor uma vantagem no crescimento, proliferação, migração celular e neovascularização tumoral, além de resistência à QT (28,29).

Foi ainda encontrada uma associação significativa entre a amplificação do gene de EGFR e a deleção do gene p16<sup>Ink4a</sup> (via de sinalização p16<sup>Ink4a</sup>/CDK4Rb1), com uma frequência de 17% (6).

É importante referir que, uma vez que as células com amplificação do gene EGFR vão perdendo algumas das sequências de ADN (ácido desoxirribonucleico) repetidas, ao

longo da divisão celular (12,27), a perpetuação da espécie celular com esta alteração poderá exigir um ambiente celular propício, sugerindo que o ambiente intratumoral poderá afectar a variabilidade regional do número de cópias do gene EGFR dentro do mesmo tumor. Foi ainda demonstrado que a ocorrência de mutações concomitantes da p53 poderia propiciar a indução de instabilidade genómica e amplificação génica (27), embora não facilite a selecção de células com este gene amplificado (12).

No que respeita ao prognóstico associado a esta mutação, a amplificação do gene EGFR foi encontrada mais frequentemente em pacientes diagnosticados com GBM cuja sobrevida foi mais curta. Apesar disso, esta não aparenta ter importância prognóstica no GBM, embora a activação da via de sinalização da qual faz parte esteja associada a um pior prognóstico (10). Segundo um estudo realizado por *Ohgaki et al* em 715 pacientes diagnosticados com GBM, a presença da amplificação do gene EGFR não afectou a sobrevida dos pacientes, independentemente da sua idade. Apesar disso, é de ressaltar que as conclusões acerca da relação da presença desta alteração com a sobrevida destes doentes são diversas consoante o estudo considerado (6).

PDGFRA é outro dos RTK alterados no GBM. O gene que o codifica localiza-se a nível do *locus* 4q12, codificando genes para PDGFRA, Kit e KDR (10,30). Estes três genes encontram-se frequentemente co-amplificados (10).

A via de sinalização celular que envolve este RTK pode contribuir para a génese tumoral através de várias formas: pela ligação do PDGF ao receptor ou por alterações do gene que codifica o PDGFRA. Estas últimas são de vários tipos (31), sendo a mais comum a amplificação do gene do PDGFRA, presente em 15% dos GBM. Apesar de esta ser menos comum em gliomas do que a amplificação do gene do EGFR, constitui a segunda

amplificação de genes codificantes de RTK mais frequente neste tipo de tumores (1,31), sendo mais comum em GBM secundários (32).

Quando esta amplificação está presente, foi observada a associação, em 40% dos casos, de uma deleção intragénica, denominada PDGFRA<sup>Δ8,9</sup>. Trata-se de uma deleção *in-frame* de 243 pares de bases nos exões 8 e 9, que leva à formação de um domínio extracelular mutado (1), numa percentagem aproximadamente igual à encontrada para a mutação EGFRvIII em contexto de GBM com amplificação do gene de EGFR (31). Adicionalmente, poderá também ocorrer a fusão *in-frame* entre o gene codificante do receptor do domínio de inserção de cinase (KDR) e o gene de PDGFRA (1), doravante designada por fusão KP. O produto de ambas as mutações (PDGFRA<sup>Δ8,9</sup> e fusão KP) tem a capacidade de aumentar a actividade de tirosina-cinase e o potencial de transformação. Este efeito é anulado pelo bloqueio de PDGF (31). Mutações pontuais estão também associadas à amplificação do gene PDGFRA, mas, contrariamente às alterações de EGFR, são raras (1,31).

Aproximadamente 30% dos casos de GBM apresentam activação da via de PDGFRA, mesmo na ausência de amplificação do gene que o codifica (12). Este achado é concordante com a observação de que a sobreexpressão de PDGFRA em GBM é de 25% a 30%, uma frequência superior à demonstrada para a amplificação de gene que codifica este receptor (15%). Esta maior frequência pode também dever-se à co-activação de PDGFRA por outros RTK, como, por exemplo, o EGFR (12). De acordo com o *The Cancer Genome Atlas*, a co-amplificação de RTK parece estar presente em 5% dos casos. Pelo menos 14% dos casos de GBM associados a amplificação do gene EGFR, 19% dos casos de amplificação de MET e 43% dos casos de amplificação de PDGFRA evidenciam a presença de co-amplificação de RTK. Esta observação é importante no contexto do

desenvolvimento de terapêuticas de inibição de RTK, nomeadamente na inibição de PDGFRA (12).

A sobreexpressão de PDGFRA foi observada em astrocitomas de todos os graus (5), o que sugere que se trate de um evento inicial na génese de gliomas (33).

Em doentes com GBM não seleccionados (isto é, sem uma mutação conhecida), a inibição de PDGFRA não mostrou benefício no tratamento. Por outro lado, a inibição do PDGFRA em contexto de GBM com amplificação deste gene poderá ser benéfica. Contudo, deve ter-se em conta a fraca resposta de GBM com alterações a nível de EGFR a inibidores de EGFR, assim como a capacidade de outros RTK substituírem o PDGFRA na activação da via que lhes corresponde, caso este seja inactivado (31).

Relativamente à sua influência no prognóstico, não foi encontrada uma relação entre a expressão de PDGFRA e a sobrevida dos doentes. No entanto, a ausência de expressão de PDGFRA está associada à idade e a pior prognóstico, segundo *Martinho et al* (34).

### **PTEN**

O gene codificante de PTEN localiza-se no cromossoma 10q23.3, codificando um domínio central com homologia para a região catalítica de tirosina fosfatase (4), e apresentando um papel importante na regulação da proliferação e apoptose celulares e invasão tumoral, ao desfosforilar directamente a cinase de adesão local (FAK) (4,6).

A PTEN utiliza um mecanismo de supressão tumoral único, através da regulação de via de sinalização mediada por PI3K/Akt. A activação do PI3K gera PIP3, ao fosforilar PIP2. O PIP3 funciona como um segundo mensageiro importante para a activação de Akt. Posteriormente, o Akt activado fosforila uma variedade de substratos, regulando assim importantes processos, tais como a progressão, crescimento, sobrevivência, motilidade e

adesão celulares, expressão proteica, metabolismo da glicose e angiogénese (35,36). A acção de PI3K é antagonizada directamente pela 3-PtdIns (3,4,5) fosfatase codificada pelo gene de PTEN (37). Este mecanismo de supressão tumoral está dependente da actividade de lípido-fosfatase da PTEN enquanto fosfatase de dupla especificidade (tirosina-fosfatase e lípido-fosfatase) (36). Quando o gene codificante de PTEN se encontra alterado, esta proteína mantém a sua capacidade de tirosina-fosfatase, mas perde a capacidade de lípido-fosfatase, responsável pela supressão tumoral, sendo esta alteração observada em vários tumores, incluindo o GBM (35,38).

A desregulação da via de sinalização por PI3K resultante de alterações genéticas a nível do gene PTEN ocorre por perda de heterozigotia, por mutação ou por metilação (35).

Estas alterações genéticas ocorrem raramente em estádios de baixo grau, com uma maior taxa de inactivação em estádios avançados da doença. Deste modo, a inactivação da PTEN não parece ser requisito para a iniciação da carcinogénese, mas constitui um marco na progressão para um cancro mais avançado (35).

O gene PTEN encontra-se alterado em 15-40% dos GBM, com a quase totalidade de alterações correspondendo a GBM primários, sendo raras em GBM secundários (5,13,39).

Apesar de raras em GBM secundários, as alterações do gene codificante de PTEN ocorrem neste subtipo (e também em gliomas de baixo grau) sob a forma de hipermetilação do promotor do gene de PTEN (40), conduzindo à inactivação de PTEN e consequente activação de Akt (41). Este fenómeno epigenético, por sua vez, é raro em GBM primários (40). A hipermetilação do promotor do gene de PTEN é fundamental no desenvolvimento de astrocitomas de baixo grau, assim como na sua progressão para GBM secundário. Por outro lado, o desenvolvimento de GBM primários está intimamente relacionado com

mutações deste gene. Estes dois subtipos de GBM partilham as alterações da via PI3K, mas por diferentes mecanismos (41).

A PTEN faz também parte de uma rede de sinalização cujos mecanismos contribuem para a resistência à QT. Esta resistência deriva do facto de muitos agentes terapêuticos danificarem directa e indirectamente o ADN, promovendo a activação de vias apoptóticas, pela acção da p53. Por sua vez, a sinalização feita por PI3K/Akt promove a fosforilação e translocação para o núcleo da oncoproteína MDM2, onde esta regula negativamente a acção apoptótica da p53. A capacidade de PTEN de inibir a via de sinalização PI3K/Akt permite-lhe bloquear a entrada de MDM2 no núcleo, confinando-a ao citoplasma, o que conduz à sua degradação, o que promove a acção da p53. A PTEN permite, assim, a actuação da p53 pela inibição da via PI3K/Akt e pelo bloqueio da entrada de MDM2 no núcleo celular, evidenciando a interligação que existe entre vários supressores de tumor. (35,38) Uma inactivação do gene de PTEN ou uma inactivação inadequada do circuito PI3K/Akt/MDM2 conduz a uma perda de função de p53 e à incapacidade das células em responder a agentes danificadores do ADN com uma resposta apoptótica (35,38), o que diminui a resposta à QT.

A inactivação da PTEN por mutação ou por perda de heterozigotia está associada a pior sobrevida e pior *outcome* sugerindo que este gene possa funcionar como um potencial marcador de prognóstico (35,42). Segundo *Fenton et al*, também a fosforilação do resíduo de tirosina Y240 de PTEN também está associado a menor sobrevida em doentes com GBM, sendo um achado frequente em amostras destes tumores. Para além disso, esta fosforilação condiciona também resistência à terapêutica com inibidores de EGFR em doentes com alteração neste mesmo gene, sendo uma das explicações para este fenómeno. De referir que a fosforilação de PTEN a nível de Y240 não afecta a sua capacidade de antagonizar a sinalização mediada por PI3K, o que evidencia que, para além de haver

perda e mutação do gene de PTEN, também poderão estar envolvidos fenómenos de fosforilação no desenvolvimento e tratamento de GBM (39).

Em síndromes com maior predisposição para cancro tais como a doença de *Cowden*, a doença de *Lhermitte-Duclose* e a síndrome de *Bannayan-Zonana*, foram verificadas mutações pontuais em PTEN, que não demonstraram efeito a nível da sua actividade enzimática, mas tiveram repercussões importantes na regulação da sua localização. Esta localização, quer nuclear quer citoplasmática, determinada pelas mutações parece comprometer a sua função supressora tumoral (37).

### **OUTROS – NF1 e PI3K1**

O *The Cancer Genome Atlas* identificou alterações genéticas adicionais no GBM para a via EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K, nomeadamente mutações/delecções homozigóticas do gene NF1 (18%) e mutações a nível PIK3R1 (10%) (5).

NF1, localizado a nível de 17q11.2 (23), é um gene supressor tumoral que codifica a neurofibromina 1. Esta actua como um regulador negativo de Ras (5), cuja acção tem influência na sobrevivência e migração celular (29). Tem ainda um papel em vias mediadas por adenilato ciclase e Akt/mTOR (2,5,43). A perda da função de NF1 pode ocorrer por mutação e delecção (2).

A neurofibromatose 1 é uma doença autossómica dominante que ocorre por mutações a nível do gene NF1, sendo caracterizada por múltiplos neurofibromas, tumores malignos da bainha dos nervos periféricos e outros astrocitomas, múltiplas manchas café com leite, efélides inguinais e axilares, hamartomas da iris (nódulos de *Lisch*) e várias lesões ósseas. Tem uma prevalência de 1 por cada 4000 recém-nascidos. A maior parte dos tumores que resultam desta síndrome são astrocitomas pilocíticos do nervo óptico. Também os GBM e restantes astrocitomas ocorrem frequentemente nesta síndrome (2).

Nos casos de GBM em contexto de neurofibromatose 1, a inactivação do gene codificante de NF1 resulta na desregulação da sinalização por Ras, promovendo a carcinogénese.

Por outro lado, em casos de perda de função de NF1 em gliomas esporádicos, esta pode ocorrer por dois mecanismos: degradação proteossómica excessiva e perda genética (44). A primeira é originada pela desestabilização de NF1, que é despoletada pela hiperactivação de proteína cinase C (PKC), conduzindo a uma degradação por parte do sistema ubiquitina-proteossoma e conferindo sensibilidade a inibidores de PKC. Já a segunda, está presente num outro conjunto de GBM que não apresenta sensibilidade a inibidores de PKC, mas sim a inibidores de mTOR. Nestes, observa-se a ocorrência da perda total de NF1, o que só pode suceder quando a p53 se encontra concomitantemente inactivada (44), sendo que esta última ocorre em primeiro lugar nos GBM que apresentam estas alterações genéticas (26).

O complexo PI3K é constituído por duas subunidades: uma subunidade catalítica, p110a que é codificada por PIK3CA, e uma subunidade reguladora, p85a, codificada por PIK3R1. Mutações e amplificações a nível de PIK3CA são raras (5% e 13%) em ambos os tipos de GBM. Por outro lado, mutações a nível de PIK3R1 foram detectadas em 10% dos casos (5).

### ***Via de sinalização p16<sup>Ink4a</sup> /CDK4/Rb1***

A pRb, codificada pelo gene Rb1, actua através do controlo da transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular, impedindo a esta progressão em células com danos no ADN, pela inibição do factor de transcrição E2F1. No final da fase G1, o complexo cinase dependente de ciclina 4 (CDK4) /ciclina D1 fosforila a pRb, inactivando-a, aumentando, desta forma, a libertação de E2F1 e contribuindo para a libertação de proteínas nucleares, com activação de genes envolvidos na transição G1-S. Por sua vez, a p16<sup>Ink4a</sup> liga-se a

CDK4, inibindo o complexo CDK4/ciclina D1, com consequente inibição da transição G1-S (4,5,29). Esta via é importante na patogénese de GBM primários e secundários (4).

Os GBM têm a capacidade de contornar processos de inibição do ciclo celular através de alterações genéticas relativas à via  $p16^{\text{Ink4a}}/CDK4Rb1$ , (45), sendo estas virtualmente exclusivas entre si (5). Segundo o *The Cancer Genome Atlas*, a frequência total das alterações na via de sinalização  $p16^{\text{Ink4a}}/CDK4Rb1$  é de 78%, com 52% de deleções homozigóticas ou mutações para  $p16^{\text{Ink4a}}$ , 47% de deleções homozigóticas para  $p15^{\text{INK4b}}$ , 2% de deleções homozigóticas para  $p18^{\text{INK4c}}$ , 18% de amplificação de CDK4, 2% de amplificação da ciclina D2, 1% de amplificação de CDK6 e 11% de mutações ou deleções homozigóticas de Rb1 (5).

### **Rb1**

O gene Rb1 que codifica a proteína pRb localiza-se no cromossoma 13 (13q14) (14), sendo considerado um gene supressor tumoral, uma vez que actua como inibidor da progressão do ciclo celular, como foi referido anteriormente.

A perda de função do gene Rb1 resulta na ausência da pRb ou numa pRb inadequadamente desfosforilada, o que, por sua vez, impede o bloqueio de E2F1, estando este, então, livre para dar a continuidade ao ciclo celular (46). Esta anomalia é encontrada em vários tipos de cancro, nomeadamente em cancros da mama, pulmão e bexiga, assim como em sarcomas e gliomas (14). No GBM, está presente em até 25% dos casos (15). Adicionalmente, a perda de função de Rb1 conduz à expressão de genes anti-apoptose como o Bcl-2, implicando um descontrolo na proliferação celular (29).

No que respeita à perda de função do gene Rb1, a inactivação de ambos os alelos em células tumorais foi inicialmente detectada concomitantemente com perda de heterozigotia no locus deste gene, associação observada em 25% a 45% dos GBM. A

inativação completa do gene, uma vez que não poderia ser explicada isoladamente pela LOH, foi atribuída a alterações como microdelecções ou mutações inativadoras no alelo remanescente (14).

Todavia, observou-se uma baixa taxa de mutações inativadoras (5%-12%), o que juntamente com a perda de expressão de pRb na ausência de perda de heterozigotia noutros cancros (mama, próstata e hipófise) sugeria a existência de outro mecanismo que pudesse explicar as alterações da expressão do gene Rb1. Pensou-se na possibilidade da ocorrência de mutações (microdelecções e mutações inativadoras) na região promotora do gene para explicar esta perda de função, como acontece no cancro da próstata e retinoblastoma. No entanto, não foram observadas mutações desta região em casos de GBM (14).

Outra proposta foi o envolvimento de fenómenos epigenéticos na origem desta anomalia, mais concretamente, a metilação de determinadas regiões do promotor do gene Rb1, que causariam uma replicação atrasada e/ou inibição da iniciação da sua transcrição. De facto, *Gonzalez-Gomez et al* verificaram que 21% dos GBM com perda de função de Rb1 apresentavam hipermetilação do promotor deste gene (14), com uma frequência ligeiramente superior (25%) num estudo realizado por *Nakamura et al*. Este estudo concluiu ainda que 85% dos GBM com perda de expressão de Rb1 apresentavam hipermetilação da região promotora do gene, o que comprova a existência de uma relação clara entre estes dois fenómenos, sendo considerada pelos autores como um mecanismo major da perda de expressão de Rb1. A hipermetilação da região promotora é mais frequente em GBM secundários (40%) do que em primários (15%) e é tida como um evento tardio da progressão de astrocitoma (15).

A perda de função do gene Rb1 está associada a um maior grau de malignidade e parece tratar-se de um factor de prognóstico no GBM (14).

Finalmente, a fosforilação inadequada de pRb pode estar presente nos GBM que apresentam genes Rb1 selvagens, ou seja, sem alterações, através da perda de expressão de p16<sup>Ink4a</sup> ou amplificação do gene de CDK4 e consequente sobreexpressão (46), fenómeno que será abordado adiante.

### p 16<sup>ink4a</sup>

O gene p16<sup>ink4a</sup> localiza-se a nível do cromossoma 9 (9p21), actuando como supressor tumoral através do seu produto, p16<sup>ink4a</sup> (inibidor da cinase dependente de ciclina 2<sup>a</sup>). Este liga-se a CDK4, no sentido de inibir a função do complexo CDK4/ciclina D1, mantendo a pRb desfosforilada, com bloqueio da função desta e impedindo a progressão do ciclo celular. O locus onde se situa o gene codificante de p16<sup>ink4a</sup>, denominado também por locus Ink4a/ARF ou CDKN2A (inibidor da cinase dependente de ciclina 2A) (32), é responsável não só pela produção de p16<sup>ink4a</sup>, mas também pela produção de p14<sup>ARF</sup> (Inibidor da cinase dependente de ciclina 2b), por um processo de *splicing* alternativo. Esta actua a nível da via de sinalização p53MDM2MDM4p14<sup>ARF</sup>. Assim, a inactivação dos genes a nível deste locus tem efeito nas vias de Rb1 e de p53, ou seja, poderá ter implicações na génese de gliomas (11,29). Até 50% dos gliomas apresentam deleções homozigóticas que afectam estes dois genes, sendo uma das alterações genéticas frequentemente adquiridas durante a progressão tumoral em casos de GBM (29)

Diferentes mecanismos foram descritos para a ocorrência de inactivação do gene codificante de p16<sup>ink4a</sup>, à semelhança do que acontece para o gene Rb1, nomeadamente a deleção homozigótica e a hipermetilação da região promotora deste gene (29).

A deleção homozigótica ocorre, segundo *Solomon et al*, precocemente na patogénese do GBM (47), estando presente, segundo *Schmidt et al*, em 41% destes

tumores, mais frequente em GBM primários do que em secundários (16). Foi observada a associação entre a amplificação de EGFR e esta deleção (48).

Relativamente às diferenças entre o GBM primário e secundário no que concerne a mutações do gene  $p16^{\text{ink4a}}$ , de forma global, não existe nenhuma tendência em particular (29).

Os dados relativos à influência da deleção do *locus* de  $p16^{\text{ink4a}}$  no prognóstico do GBM mostraram-se inconclusivos. *Kamiryo et al* observaram que esta alteração constituía um critério desfavorável para a sobrevida em casos de GBM. *Labuhn et al*, por outro lado, apenas demonstraram menor sobrevida em pacientes com mais de 50 anos. Por fim, um estudo por *Ohgaki et al*, não encontrou uma relação entre o *status* do gene de  $p16^{\text{ink4a}}$  e a sobrevida dos pacientes (6).

No que toca às alterações epigenéticas que afectam este gene, destaca-se o silenciamento do gene  $p16^{\text{ink4a}}$  pela hipermetilação do seu promotor (49), tendo sido detectado em 60% dos casos de GBM (17).

### **CDK4**

O gene que codifica a CDK4 localiza-se a nível de 12q14.1 (23), codificando a cinase dependente de ciclina (CDK4), que forma um complexo com a ciclina D1, capaz de, entre outros, fosforilar a pRb e, deste modo, promover a progressão do ciclo celular (16).

A amplificação dos genes a nível da região 12q13.3-14.1 é uma das amplificações mais comuns no GBM, tendo sido também observada em casos de cancro do pulmão, mama e em melanomas. O gene codificante de CDK4 é afectado por essa amplificação (50), que ocorre em 14% dos casos (13). Esta associa-se frequentemente à amplificação de MDM2, parte integrante da via de sinalização da p53, uma vez que o gene que o codifica se encontra também a este nível (10), afectando a regulação do ciclo celular.

### ***Via de sinalização TP53/MDM2/MDM4/p14<sup>ARF</sup>***

Após a inflicção de dano ao ADN, a p53 é activada e induz a transcrição de genes como p21<sup>Waf1/Cip1</sup> (5), que actua por inibição de CDK, afectando a progressão do ciclo celular (51). Alternativamente, a p53 liga-se também à proteína MDM2, o que inibe a capacidade da primeira de activar a transcrição (5). A transcrição de MDM2 é induzida pela p53 (4). A MDM2 é também mediada pela proteína p14<sup>ARF</sup>, que bloqueia a função da primeira, estabilizando a p53. Contrariamente à MDM2, a p14<sup>ARF</sup> é regulada negativamente por p53 (5). A MDM4, uma proteína relacionada com a MDM2, inibe a transcrição da p53 e aumenta a actividade da MDM2 (37).

A p53, enquanto supressora tumoral, impede a propagação das células geneticamente instáveis, através da suspensão do ciclo celular em G1 ou pela estimulação da apoptose ou paragem da proliferação celular (37).

Quase todos os GBM contêm alterações a nível desta via, mas cada tumor apresenta mecanismos distintos para a alteração da mesma – mutação ou deleção homozigótica de p53, mutação ou deleção homozigótica de p14<sup>ARF</sup> ou amplificação de MDM2 e/ou MDM4 (45). De facto, segundo o *The Cancer Genome Atlas*, a frequência total de alterações a nível desta via é de 87%, compreendendo mutações e deleções homozigóticas de p53 (35%), amplificação de MDM2 (14%), amplificações de MDM4 (7%) e mutações e deleções homozigóticas de p14<sup>ARF</sup> (49%) (13).

Pelo menos uma alteração a nível desta via de sinalização foi observada em aproximadamente 50% dos GBM primários e mais de 70% dos GBM secundários (5).

Verificou-se uma relação inversa significativa entre a amplificação de MDM2 e a mutação de p53 e entre alterações a nível p14<sup>ARF</sup> e mutações p53 (5).

### **p53**

O gene que codifica a p53 localiza-se a nível de 17p13.1 (23). Como foi referido anteriormente, esta proteína actua em vários processos celulares, incluindo o ciclo celular, resposta celular ao dano do ADN, morte celular e diferenciação celular (19).

A importância da p53 no GBM é demonstrada pelo aumento da incidência de gliomas no contexto de síndrome de *Li-Fraumeni*, uma síndrome familiar com predisposição para cancro associado a mutações de p53 (37).

Segundo o *The Cancer Genome Atlas*, a influência da p53 em GBM ocorre por mutações e deleções do gene que a codifica, que se observam em 35% dos casos (13).

As mutações do gene que codifica p53 são as primeiras alterações detectáveis em dois terços de astrocitomas de baixo grau (Figura 2), sendo esta frequência semelhante à de astrocitomas anaplásicos e GBM secundários, pensando-se que seja um evento precoce no desenvolvimento de GBM (4).

No que respeita às mutações que afectam este gene, estas ocorrem mais frequentemente em GBM secundários (65%) do que em GBM primários (28%) (4).

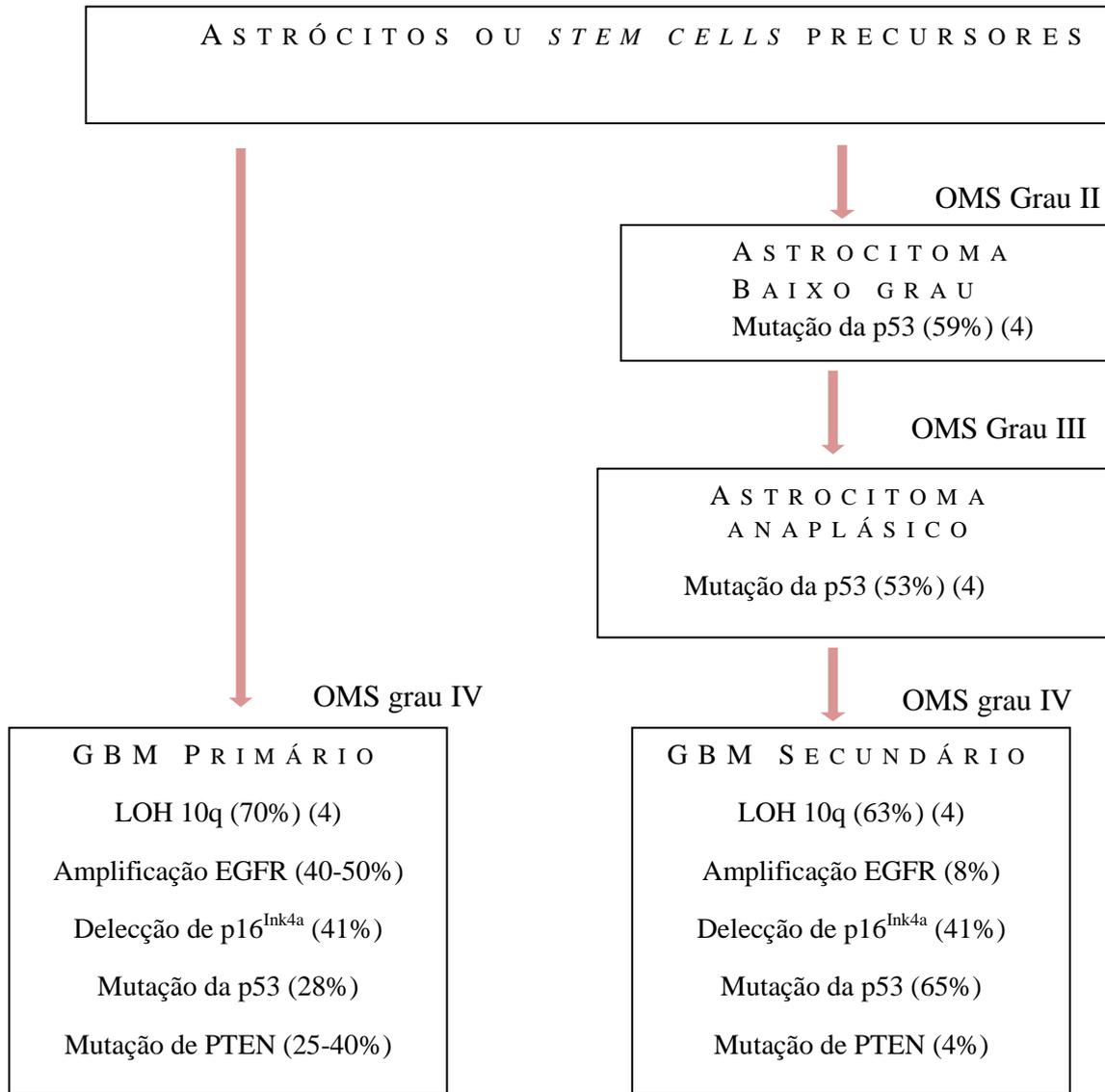
No caso do GBM secundário as mutações ocorrem preferencialmente nos codões 248 e 273 (57% dos casos), o que não se verifica em casos de GBM primário, encontrando-se equitativamente distribuídas por diferentes exões, com apenas 17% a ocorrer nos codões supracitados. Verificou-se ainda que mutações pontuais em locais CpG deste gene eram mais frequentes em GBM secundário do que primário, o que permitiu concluir que, quando estas ocorrem, especificamente nos codões 248 e 273, tratar-se-á de um evento precoce associado à transformação maligna que integra a progressão para GBM secundário. Embora menos frequentes e com um padrão menos específico no GBM primário, as

mutações da p53 poderão desempenhar um papel, ainda que acessório, no aumento da instabilidade genómica (4).

De acordo com *Yin et al*, a dissomia uniparental adquirida (AUPD) do cromossoma 17q é uma alteração frequentemente associada a p53 mutada, em GBM. Esse fenómeno resulta numa região cromossómica duplicada, contendo um gene supressor de tumor inactivado ou um oncogene activado. A ocorrência de AUPD pode resultar em duplicação do alelo mutado ou em perda do alelo normal deste gene. Em casos de GBM, prevalece a primeira (18).

Outra das alterações associada à mutação da p53 é a hipermetilação do promotor do gene de MGMT. O produto deste gene é responsável pela reparação do ADN e está implicada na resistência à terapêutica, sendo abordado mais adiante. Normalmente, esta alteração epigenética ocorre antes da mutação da p53 (52).

Segundo *Ohgaki et al*, a presença de mutações de p53 está associada a maior sobrevida. Contudo, após ajuste etário, esta associação não se verificou (6).



**Figura 2.** Altera es genéticas mais frequentes em GBM primários e secundários (adaptado de *Ohgaki et al* (4)).

### P14<sup>ARF</sup>

O gene que codifica p14<sup>ARF</sup>, também designado por locus Ink4a/ARF ou CDKN2A, localiza-se a nível de 9p21. Como foi referido anteriormente, a proteína p14<sup>ARF</sup> resulta de um processo de *splicing* alternativo, do qual resultam duas proteínas distintas, com interferência em vias de sinaliza o distintas, p16<sup>Ink4</sup> e p14<sup>ARF</sup> (29). Esta última proteína actua por liga o a MDM2, estabilizando a p53 e neutralizando MDM2 (18,53).

O *locus* CDKN2A encontra-se frequentemente sujeito a deleção em neoplasias humanas, incluindo tumores cerebrais (54).

A perda de expressão de p14<sup>ARF</sup> é observada em 76% dos casos de GBM (4), mais frequentemente em primários, associando-se tipicamente a duas alterações: a deleção homozigótica e a hipermetilação do promotor do respectivo gene (5). A perda de expressão de p14<sup>ARF</sup> por inativação mutacional é rara (49,53).

Apesar de a hipermetilação do promotor do gene de p14<sup>ARF</sup> ser frequente em GBM secundários, não se verificaram diferenças significativas na frequência total de alterações para o gene codificante de p14<sup>ARF</sup> em ambos os subtipos de GBM (5,29). A hipermetilação do promotor do gene de p14<sup>ARF</sup> é um evento precoce no que respeita a astrocitomas que sofrem progressão para GBM secundários, o que não se verificou no caso de deleção homozigótica (54). Este fenómeno epigenético foi observado em cerca de 30% dos astrocitomas de baixo grau e GBM secundários e cerca de 50% dos GBM primários (19). A presença da hipermetilação do promotor de p14<sup>ARF</sup> está associada a uma sobrevida mais curta em casos de astrocitoma (55).

### **MDM2/MDM4**

O gene que codifica MDM2 localiza-se a nível de 12q14-15. MDM2 é um modulador da actividade da p53, inibindo a sua actividade transcricional, participando também na ubiquitinação e degradação proteossómica de p53 (53).

A proteína codificada encontra-se amplificada em aproximadamente 15%, ocorrendo quase exclusivamente em GBM primários que não apresentam mutação a nível de p53 (5,29). *Biernat et al* determinaram que a sobreexpressão de MDM2 está presente em 52% dos GBM primários mas apenas 11% dos GBM secundários. Dos 52% de GBM apresentando sobreexpressão de MDM2, apenas 1 apresentava mutação a nível de p53,

sugerindo que a sobreexpressão de MDM2, com ou sem amplificação do gene que lhe corresponde, constitui um mecanismo molecular de escape ao controlo do crescimento regulado por p53, útil na evolução de GBM primários tipicamente sem mutações de p53 (56). Por sua vez, GBM secundários apresentam frequentemente inactivação de p53 mas através de um mecanismo mais directo, pela mutação do próprio gene (32).

A descoberta de um gene relacionado com MDM2, MDM4 (1q32), que inibe a transcrição de p53 e aumenta a actividade de ubiquitina ligase de MDM2, conduziu à descoberta de que a esta via se encontra inactivada em 4% de GBM que não contêm alterações a nível de p53 ou MDM2.

Segundo *Yin et al*, a amplificação do gene da MDM4 é similar à amplificação do gene da MDM2 em amostras de GBM, sendo que estas raramente coexistem (48).

### ***Perda de heterozigotia***

A perda de heterozigotia (LOH – *loss of heterozigoty*) é um achado frequente em células de vários tipos de tumor. Define-se como a perda de um alelo de um *locus* específico, causado por uma deleção ou a perda de um cromossoma de um par de cromossomas, resultando numa hemizigotia anormal. É detectado quando marcadores heterogéneos de um *locus* surgem monomórficos porque um dos alelos foi eliminado por deleção. EM GBM, quer primários ou secundários, a LOH é um achado comum, sendo encontrada em diversos cromossomas.

### **Perda de heterozigotia do cromossoma 10**

A LOH do cromossoma 10 é a alteração genética mais frequente no GBM, ocorrendo em 60% a 80% dos casos (29), por vezes com perda de um braço completo (10p ou 10q (5)).

Muitos casos de GBM aparentam ter perdido a totalidade de uma das cópias do cromossoma 10, sendo que vários estudos com foco em LOH em GBM sugerem que pelo menos três *loci* sofram deleção (10p14-p15, 10q23-24 e distalmente a 10q25), o que sugere a presença de importantes genes supressores tumorais a nível destes.

A maior parte dos GBM primários apresentam perda total do cromossoma, enquanto os GBM secundários apresentam apenas perda parcial de 10q (29), com uma frequência até 70% (5). Por outro lado, a LOH de 10p é muito rara em GBM secundários (57).

A LOH de 10q parece estar associada a menor sobrevida em doentes padecendo de GBM.

*Ohgaki et al* mostraram que a LOH de 10q se apresenta tipicamente associado a outras mutações encontradas no GBM, mencionadas anteriormente, nomeadamente a amplificação do gene de EGFR (25,8%), a mutação de p53 (23,7%), a deleção de p16<sup>ink4a</sup> (23,3%) e mutação de PTEN (16,2%), o que sugere que a LOH de 10q e pelo menos uma outra alteração genética actuarão em conjunto na evolução da maioria dos GBM (6). Apesar disso, verificou-se que a mutação de p53, deleção de p16<sup>ink4a</sup> e mutação de PTEN não são encontradas concomitantemente, exceptuando-se a correlação positiva entre a deleção de p16<sup>INK4A</sup> e a amplificação de EGFR (6).

A LOH da região 10q25-qter, distal ao *locus* de PTEN (10q23.3), parece estar associada à aquisição de um fenótipo de GBM, sugerindo que a inactivação de um gene supressor de tumor nesta região poderá ser crucial para o desenvolvimento deste tumor. Genes candidatos incluem DMBT1 (*Deleted in malignant brain tumors 1*) e FGFR (receptor do factor de crescimento dos fibroblastos) (6). Este locus foi associado a uma

progressão histologicamente reconhecida de astrocitoma de baixo grau para um fenótipo de GBM altamente anaplásico (57).

Outras regiões são frequentemente perdidas a nível de 10q, incluindo regiões contendo os genes codificando PTEN (10q23.3), MGMT (10q26) e ANXA7 (10q21.1 – q21.2), um inibidor do EGFR (10,58).

A LOH para a região contendo o ANXA7 (*annexin 7*) ocorre em aproximadamente 75% dos GBM, de acordo com o *The Cancer Genome Atlas*, conduzindo à perda significativa dos níveis de expressão desta proteína. Este fenómeno leva ao aumento de 72% – 744% da abundância de EGFR e ao aumento do potencial de transformação de EGFR nas células de GBM. Quando considerado o facto de que mutações a este nível são pouco frequentes (cerca de 6% dos tumores), considera-se que o gene ANXA7 actua como um gene haploinsuficiente, uma vez que, embora esteja presente uma cópia funcional do gene, esta não tem a capacidade de codificar proteínas em quantidade suficiente para sustentar uma condição igual à normal. A haploinsuficiência do ANXA7 duplica o potencial tumoral das células de GBM e a associação do *knockdown* de ANXA7 e a sobreexpressão de EGFR promove sinergicamente a carcinogénese. A LOH da região contendo ANXA7 está associada a pior sobrevida (58).

Outro inibidor de EGFR frequentemente sujeito a deleção é NFkB1A, que se localiza no cromossoma 14, sendo que esta deleção está também associada a pior prognóstico (10).

### **Perda de heterozigotia de 13q**

LOH 13q foi detectada em 12% de GBM primários e 38% de GBM secundários, incluindo tipicamente o *locus* do gene Rb1 (5,59).

### **Perda de heterozigotia de 6q**

A LOH 6q ocorre em aproximadamente um terço dos astrocitomas anaplásicos (5). Segundo Yin et al, a perda de 6q ocorre em 29% dos GBM, sendo que 4% destas apresentam deleção a nível de 6q26-27, incluindo os genes PARK2, QKI (*Quaking homolog, KH domain RNA binding*) e PDE10A (fosfodiesterase 10A). Pensa-se que o gene PARK2 (*Parkinson protein 2*), que se encontra mutado em alguns pacientes com doença de Parkinson juvenil autossómica recessiva, possa actuar como um gene supressor tumoral em cancro da mama e do ovário, assim como em leucemias. Segundo o estudo realizado por estes autores, aproximadamente 61% das amostras de GBM apresentavam uma expressão reduzida de PARK2 quando comparada com tecido cerebral normal de controlo. Estes achados sugerem que PARK2 poderá actuar como gene supressor de tumor, que se encontra inactivado em GBM (10,48).

### **Perda de heterozigotia de 9p**

De acordo com o *The Cancer Genome Atlas*, a LOH de 9p é a alteração genética mais comum para a via de sinalização p16<sup>Ink4a</sup>/CDK4/Rb, ocorrendo pela deleção do locus de CDKN2A/B (55%/53%) a nível de 9p21.3 (13), que contém os genes supressores de tumor p14<sup>ARF</sup>, p15<sup>INK4B</sup> (inibidor da cinase dependente de ciclina 2B), e p16<sup>INK4A</sup>. Estes genes codificam proteínas com papel importante a nível do ciclo celular, a via de Rb1, como já foi referido, e também a via da p53 (48). A deleção dos genes CDKN2A e CDKN2B (inibidor da cinase dependente de ciclina 2B) é frequentemente acompanhada pela deleção de CDKN2C (inibidor da cinase dependente de ciclina 2C) no cromossoma 1p32, que codifica outra proteína do ciclo celular p18<sup>INK4C</sup>. A LOH 9p é mais comum em sobreviventes a curto-prazo (10).

Adicionalmente, a região 9p23-24.1 encontra-se frequentemente sujeita a deleção em GBM (6%). Em situações normais, codifica o gene do PTPRD (receptor tirosina-fosfatase tipo D), um, com função supressora tumoral. Para além da LOH, também se encontra frequentemente inativado por hipermetilação do respectivo promotor (37%) (5), com um total de inactivação de PTPRD em mais de 50% dos GBM, segundo *Veeriah et al.* A perda de expressão de PTPRD em gliomas está associada a pior prognóstico (60).

### **Perda de heterozigotia 1p/19q**

A LOH de 1p é rara em ambos os tipos de GBM (12% nos GBM primários e 15% nos GBM secundários), estando associada a sobrevida mais longa (5). A perda de alelos de 1p foi também observada em 20 a 30% dos astrocitomas (48).

A região 1p36 encontra-se frequentemente sujeita a deleção em cancros hematopoiéticos, epiteliais e neurais, incluindo neuroblastomas, meningiomas e gliomas. O recém-descoberto gene supressor de tumor CHD5 (proteína com domínios cromosoma-helicase e de ligação ao ADN-5), que se localiza em 1p36, e que, como tal, se encontra deletado em gliomas humanos, mantém os níveis da p53 ao facilitar a expressão do inibidor da cinase dependente de ciclina 2A, p19<sup>ARF</sup> (ortólogo de p14<sup>ARF</sup>, parte importante da via da p53, em ratos), apresentando-se assim como um mecanismo adicional de inactivação desta via (37).

A LOH 19q é mais frequente em GBM secundários (54%) do que em GBM primários (6%), o que sugere que genes supressores de tumor localizados no cromossoma 19q estão frequentemente envolvidos na progressão de astrocitoma de baixo grau para GBM secundário, não tendo um papel significativo na patogénese de GBM primários (59). A região mais comumente afectada é 19q13.3 (5,59). A LOH de 19q poderá actuar como um marcador de maior sobrevida (37,61), por vezes superior a 3 anos (61).

A co-delecção de 1p e 19q foi observada em oligodendriomas e nestes foi associada a sobrevida prolongada. Esta associação verifica-se também para GBM. *Kanu et al* afirmam que a associação de LOH 1p e LOH 19q poderá indicar um melhor prognóstico e resposta à terapêutica em pacientes com GBM (29).

### **Perda de heterozigotia 22q/7q**

A LOH de 22q é frequente em GM primários (41%) e em GBM secundários (82%). A frequência total da LOH de 22q em GBM é de 53% (10). A LOH de 22q ocorre numa frequência de 20-30% em astrocitomas de baixo grau e anaplásicos (5), associando-se nestes a pior sobrevida (62).

A caracterização da LOH de 22q em GBM primários identificou duas regiões que apresentam deleções, 22q12.3-13.2 e 22q13.31. A nível de 22q12.3, uma deleção de 957 pares de bases foi identificada em 22 de 23 GBM, uma região onde se localiza o inibidor de metaloproteinases-3 tecidual (TIMP-3), com relação com a progressão para GBM secundário (5).

Por outro lado, a hipermetilação do promotor de TIMP-3 foi observada mais frequentemente em GBM secundários do que em GBM primários, relacionando-se com uma perda de expressão de TIMP-3 (4).

A LOH de 7q encontra-se presente em 9% a 12% dos GBM (29).

### ***IDH1***

O gene IDH1 localiza-se a nível de 2q33, codificando a isocitrato desidrogenase 1, uma enzima que catalisa a carboxilação oxidativa de isocitrato para  $\alpha$ -cetogluturato, resultando na produção de NADPH (fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina). A enzima IDH1 está localizada no citoplasma e peroxisomas, enquanto as restantes isocitrato

desidrogenases se localizam a nível mitocondrial. IDH1 funciona como uma fonte importante de produção citosólica de NADPH, necessária para a regeneração de glutathione reduzida, que funciona como o principal antioxidante celular em mamíferos, considerando-se, assim, que a IDH1 têm um importante papel no combate ao *stress* oxidativo (63,64).

A mutação a nível do gene da desidrogenase do isocitrato 1 (IDH1) foi pela primeira vez associada a casos de GBM em 2009, num estudo realizado por *Parsons et al*, ocorrendo em cerca de 12% das amostras (21).

Caracteriza-se por uma mutação pontual na posição R132 da sequência codificante desta enzima, incluindo diferentes mutações R132H, R132C, R132S, R132L e R132G, com maior frequência de R132H (21), que consiste numa substituição de uma guanina por uma histidina na posição 132 (64). A nível proteico, o resíduo R132 está conservado em todas as espécies, formando ligações hidrofílicas com o substrato no local de ligação (63).

Estudos demonstram que a idade média de pacientes com GBM e mutação a nível de IDH1 era significativamente inferior do que doentes sem esta mutação, o que se deve ao facto de a maior parte dos tumores com mutação IDH1 serem GBM secundários, que se desenvolvem em pacientes mais jovens (20). A idade média de doentes com esta mutação foi de 47.9 anos, sendo que aproximadamente 50% dos pacientes com GBM com idade inferior a 35 anos a apresentavam, em oposição à média de 53-56 anos em doentes apresentando o gene selvagem de IDH1 (20,21).

A mutação a nível do gene IDH1 foi encontrada em praticamente todos os doentes padecendo de GBM secundário (95%) (21,57), tendo sido praticamente ausente em doentes com GBM primário (aproximadamente 5% dos casos) (20), o que torna esta mutação um marcador genético fiável de GBM secundário (57). Uma vez que se observou que os GBM secundários partilhavam mutações a nível de IDH1 com oligodendrogliomas e esta relação

não foi observada em relação a GBM primários, pondera-se que os dois subtipos de GBM tenham diferentes origens (20).

Pensava-se inicialmente que a mutação de IDH1 funcionaria através da síntese reduzida de  $\alpha$ -cetogluturato, mas novos relatos demonstraram que a enzima resultante da mutação de IDH1 produz um metabolito alternativo, 2-hidroxiogluturato, o que traz uma nova luz acerca de se a redução terapêutica de 2-hidroxiogluturato poderá ser eficaz em gliomas apresentando mutações IDH1, sendo que decorrem no momento estudos neste sentido (32).

Verificou-se que os doentes com mutação para o gene de IDH1 apresentavam prognóstico significativamente melhor, com uma sobrevida média de 3,6 anos, quando comparada com a sobrevida média de 1,1 anos em doentes apresentando gene IDH1 selvagem.

Sendo a mutação a nível da p53 conhecida como factor de prognóstico positivo, verificou-se que a sua associação com a mutação de IDH1 confere sobrevida ainda mais longa (21).

*Yan et al* verificaram que também que a mutação a nível de IDH2 (codificante de enzima com função similar à de IDH1) confere melhor sobrevida aos pacientes com GBM onde esta está presente. Aliás, observou-se que os portadores de mutação a nível de IDH1 ou IDH2 apresentavam uma sobrevida média de 31 meses, o que é significativamente mais longo do que a média de sobrevida de 15 meses para doentes sem alterações a nível de IDH1 ou IDH2 (64). De referir que embora a mutação IDH1 seja rara em GBM primários, quando presente, é indicadora de melhor prognóstico (65).

A mutação a nível de IDH1 mostrou também ocorrer precocemente na evolução tumoral, ao ser identificado em todos os GBM secundários em estágio inicial (63), assim

como em tumores de baixo grau (20,64), não tendo sido demonstrada a sua presença após a aquisição de mutação em p53 ou perda de 1p/19q (20).

A mutação a nível de IDH1 foi frequentemente observada em tumores associados a hipermetilação do promotor de MGMT. A inativação de MGMT pela hipermetilação do seu promotor facilita a transição de Guanina para Adenosina, afectando genes cruciais, como p53 e Ras. Assim, a metilação de MGMT poderia explicar a maior taxa da mutação G395A a nível do codão 132, resultando na maior frequência de R132H (63), já referida anteriormente.

Permanece a dúvida se a mutação de IDH1 constituirá um factor de prognóstico *per se* ou um factor preditivo da resposta à terapêutica. A transição de Arginina na posição 132 para Glutamina resulta numa enzima cataliticamente inactiva, sugerindo um papel importante para este resíduo, não existindo estudos quanto à substituição de Arginina na posição 132 por Histidina (Arg132His), pensando-se que esta poderá exercer um efeito negativo dominante através do deficiente funcionamento de outras subunidades, tornando a célula mais vulnerável ao *stress* oxidativo induzido pela RT e QT. Em suma, a mutação Arg132His parece ser uma forte factor independente de prognóstico em doentes tratados para glioma. Se confirmada esta observação, a presença de Arg132His poderá ser um marcador importante no *work-up* inicial de doentes com glioma (63).

### ***Epigenética***

O silenciamento epigenético de genes supressores tumorais é um fenómeno comum de instabilidade genómica no cancro.

A epigenética consiste na aquisição de características de expressão génica, sem relação com a sequência nucleotídica. São exemplos a metilação do promotor, desacetilação e metilação de histonas, outras modificações de histonas que possam alterar a estrutura da

cromatina directa e indirectamente, e mecanismos de silenciamento de ARN (ácido ribonucleico) como interferência do ARN ou regulação da expressão génica por microRNA (miRNA ou miR).

Contrastando com a hipometilação global do ADN encontrada no GBM e outros tumores, genes supressores tumorais são frequentemente hipermetilados e, por conseguinte, silenciados (4), fenómeno importante e precoce durante o desenvolvimento tumoral (66). Os mecanismos mais bem estudados no GBM são a metilação de ADN, desacetilação de histonas e miR. No geral, GBM secundários apresentaram uma maior frequência de metilação do promotor do que GBM primários (4).

### **MGMT**

O gene da O6-metilguanina-metiltransferase (MGMT) localiza-se no cromossoma 10q26, codificando uma proteína de reparação do ADN, a MGMT, que actua através da remoção de um grupo alquilo da posição O6 da guanina, um local importante da alquilação do ADN (66), com restauração da sequência de nucleotídeos na sua forma nativa, sem causar quebra da cadeia de ADN. Quando actua, esta enzima é irreversivelmente inactivada e requer uma síntese proteica de novo para manter a sua actividade. É uma enzima universalmente expressa nas células humanas (4).

O silenciamento epigenético do gene MGMT pela metilação do seu promotor está associado à perda de expressão de MGMT e uma diminuição da actividade de reparação de ADN (66). Este é considerado o principal mecanismo para o silenciamento de MGMT, uma vez que deleções, mutações e instabilidade de ARN mensageiro são eventos raros (67). A perda da expressão de MGMT causada por hipermetilação do seu promotor foi detectada 40% a 57% dos GBM (5), estando presente em 75% dos GBM secundários, uma frequência significativamente maior do que em GBM primários (36%) (22).

O silenciamento epigenético de MGMT no GBM confere às células que o apresentam um *fenótipo hipermutador* com a criação de mutações pontuais, nomeadamente p53 ou o oncogene *Ras* (19,67), tendo sido já detectada uma correlação entre a mutação p53 e a metilação MGMT no cancro do pulmão assim como a presença de mutações G3A no gene k-ras no carcinoma colorectal (4). Este *fenótipo hipermutador* resulta de uma deficiência do mecanismo de *mismatch repair* (MMR) (19). Adicionalmente, a terapia alquilante do GBM com perda de expressão de MGMT introduz uma pressão selectiva para a perda da função de MMR, o que é consistente com a observação de que os genes que codificam MMR são, eles próprios, mutados com a terapêutica. Esta descoberta levanta a possibilidade de que doentes que respondem inicialmente à terapêutica de primeira linha poderão, não só desenvolver resistência à terapêutica, como um *fenótipo hipermutador*, deficitário em MMR (13).

Elevados níveis de actividade de MGMT em células tumorais criam um fenótipo resistente à QT através do bloqueio do efeito terapêutico da mesma, constituindo um importante factor determinante do insucesso terapêutico (66). Isto é clinicamente relevante porque os pacientes com GBM apresentando hipermetilação do promotor de MGMT apresentam benefício substancialmente maior na terapêutica adjuvante com TMZ (22).

A QT actua por alquilação do ADN, o que origina emparelhamentos erróneos (por exemplo, verifica-se a tendência da 06-metilguanina em se emparelhar erradamente com a timina durante a replicação do ADN, levando à conversão de C:G em A:T, a alteração mais frequentemente causada por agentes alquilantes), que vão despoletar, directa ou indirectamente, citotoxicidade e apoptose celulares (4,19,66). Ora, este emparelhamento incorrecto pode ser reconhecido pelo sistema pós-replicativo de *mismatch repair* (MMR), que corrige este erro, mas somente na cadeia-filha do ADN, deixando intacta a cadeia-mãe. Foi proposto que esta via de reparação, numa tentativa de reparar esta alteração, inicia

ciclos repetitivos de síntese e tentativas de restauro sucessivas, o que leva a quebras na cadeia dupla de ADN, acabando, em última instância, por originar a morte celular (68). Nesta linha, verificou-se que tumores com alterações da via de reparação do ADN mediada por MMR são 100 vezes mais resistentes a agentes alquilantes (68), uma vez esta característica reduz a citotoxicidade dos agentes da QT (4).

Consequentemente, a actividade terapêutica mais elevada de agentes alquilantes é esperada em células tumorais com baixos níveis de MGMT e sistema MMR intacto. Dado o papel central de MGMT na resistência a agentes de alquilação e as suas propriedades únicas, é um alvo ideal para o potencial de modulação bioquímica da resistência à QT (68).

A hipermetilação do promotor de MGMT confere uma vantagem aos pacientes no que concerne a resposta à terapêutica com TMZ (67). O *status* de metilação de MGMT demonstrou ter valor prognóstico uma vez que os indivíduos cujo tumor apresentava hipermetilação de MGMT tinham maior sobrevida total (18,2 meses) do que os doentes nos quais esta característica não estava presente (12,2 meses), independentemente da terapêutica a que foram submetidos.

Quando considerado o tipo de terapêutica efectuada e o *status* de metilação de MGMT, a sobrevida para doentes com hipermetilação do promotor de MGMT que foram submetidos a RT associada a TMZ foi superior à dos doentes apenas submetidos a RT (21,7 meses vs. 15,3 meses). De referir que, em doentes sem alteração do *status* de metilação de MGMT, o tratamento com RT e TMZ implicou uma sobrevida média de 12,7 meses, comparativamente com 11,8 meses para indivíduos apenas submetidos a RT, o que reforça o impacto do *status* de metilação de MGMT (66).

A taxa de sobrevida a 2 anos para o primeiro grupo de doentes foi de 46%, com uma taxa de 22.7% na sobrevida a 2 anos para o segundo grupo (66).

Verificou-se ainda que o grupo de pacientes com hipermetilação do promotor de MGMT apresentava uma sobrevida livre de progressão mais longa e uma melhor resposta à terapêutica de segunda linha, comparativamente aos doentes sem esta alteração. O conjunto de doentes com esta alteração submetidos a RT isolada demonstrou maior sobrevida livre de progressão do que o conjunto de pacientes sem esta anomalia e sujeitos ao protocolo terapêutico com TMZ e RT, o que enfatiza o papel positivo deste fenómeno epigenético no prognóstico destes doentes.

### **MicroRNA**

Os micro-RNAs (miRNAs) são pequenas sequências de 20-22 nucleótidos de ARN não codificantes que mostraram ser codificados pelo genoma da maior parte dos eucariotas observados até agora.

Rapidamente se tornaram foco de atenção no que concerne a regulação da expressão génica, sendo-lhes atribuído um papel importante no desenvolvimento tumoral (22). Estas sequências inibem normalmente a expressão de genes alvo, através do emparelhamento de sequências de bases específicas à 3'-*untranslated region* (UTR) (69), quer pela inibição da transcrição dos genes alvo quer pelo despoletar da clivagem do mRNA alvo (10).

Os miRs frequentemente suprarregulados são denominados oncomiR (10).

Destes, destaca-se o miR-21, que apresenta grande discrepância de expressão no GBM (podendo ocorrer entre 44% a 100% dos casos), quando comparado com tecido cerebral normal. Os alvos identificados deste miR são a p53, o TGF- $\beta$  (factor de crescimento tumoral beta), a via apoptótica mitocondrial e provavelmente PTEN (22).

A nível da p53, miR-21 tem a capacidade de afectar negativamente a resposta da p53 a estímulos, através da repressão da apoptose mediada por esta em resposta ao dano no ADN, nomeadamente o induzido pela QT, contribuindo assim para a resistência à terapêutica em GBM. Desta forma, a suprarregulação deste miR poderá contribuir significativamente para o desenvolvimento de tumores em que não se verificam alterações a nível da p53 (70).

Foi também observada uma associação entre a suprarregulação de miR-21 e a regulação negativa de genes relativos à proteína indutora de reversão rica em cisteína com motivos *kazal* (RECK) e aTIMP3, ambos supressores de tumor e inibidores de metaloproteinases de matriz (MMP), promovendo a capacidade de invasão das células tumorais (22,71). Mais, a infrarregulação de miR-21 conduz a uma redução dessa capacidade de invasão e migração (22).

A influência de miR-21 a nível de TGF- $\beta$  dá-se pela regulação indirecta de TGF- $\beta$  1/2 e pela selecção directa dos receptores TGFBR2/3 (receptor do factor de crescimento tumoral beta 2 e 3) e o mediador apoptótico DAXX (*Death-domain associated protein*). Este último tem a capacidade de estabilizar a p53 assim como é passível de mediar a apoptose por TGF- $\beta$ , sendo por isso crucial em ambas as vias, tornando-se um alvo chave na disrupção da ligação entre as duas vias (22).

Foi demonstrado que, quando ocorre infrarregulação deste microRNA, se verifica suprarregulação de genes envolvidos na via apoptótica mitocondrial, tais como os codificando APAF1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*), PPIF (*peptidylprolyl isomerase F*) e caspase-3. Os produtos da transcrição destes genes são importantes na mediação da apoptose mitocondrial através da libertação do *citocromo C* em resposta a estímulos apoptóticos (70).

Em suma, a sobreexpressão de miR-21 pode funcionar como um micro-oncogene em GBM através do bloqueio da expressão de genes-chave potenciadores de apoptose (72).

Outros oncomiRs importantes em GBM são o miR-26a, o miR-221 e o miR-222. O miR-26a tem como alvo o gene de PTEN em GBM, cooperando com CDK4 e CENTG1, formando *clusters* de oncomiR/oncogenes, que estimulam as vias Rb1, PIK3K/AKT e JNK (*c-Jun NH (2) -terminal kinase*), aumentando a agressividade de GBM. Por sua vez, miR-221 e miR-222 têm um papel importante na regulação da apoptose celular, tendo como alvo a molécula pró-apoptótica PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) (10). A suprarregulação destes dois miR leva à infrarregulação de PUMA, com aumento da sobrevivência celular (73).

Por outro lado, os miRs frequentemente infrarregulados em GBM são denominados de miRs supressores de tumor (10).

Um destes miRs supressores de tumor é o miR-124. Juntamente com miR-137, foram ambos observados em níveis significativamente inferiores em astrocitomas anaplásticos e GBM, quando comparados com tecido cerebral não-neoplásico. Particularmente, a perda de função de miR-124a foi associada à activação de CDK6, assim como à fosforilação de pRb, actuando como supressor tumoral (22). miR-124 e miR-137 inibem a proliferação em GBM e induzem a diferenciação de tecido neural normal e de *stem cells* cerebrais tumorais (40). Assim, estes dois miR são potentes factores antiproliferativos e pró-diferenciadores, com actividades supressora de tumor em gliomas (74,75).

Também miR-7 se encontra infrarregulado nas células de GBM. Este miR tem como função a supressão da expressão de EGF, assim como a inibição da via Akt (76).

Outros miRs pouco expressos em GBM são miR-128, miR-34 e miR-181 (10).

O miR-128 funciona como um supressor tumoral através da repressão directa do oncogene BMI1 (*BMI1 polycomb ring finger oncogene*) (77). Tem também acção a nível de E2F3a, com acção antiproliferativa (74) e a nível de EGFR (10).

A importância de miR-34 advém da sua acção a nível da supressão do crescimento tumoral uma vez que tem acção a nível de c-met e Notch 1/2. A sua infrarregulação em GBM poderá estar associada à frequente deleção do cromossoma 1p6, mutações da p53 e à hipermetilação do promotor deste miR (78).

O miR-181 é formado por três isoformas, (a, b, e c), encontrando-se infrarregulado em doentes que apresentam resposta à terapêutica com RT/TMZ. Em particular, pensa-se que miR-181b e miR-181c possam ser utilizados como marcador preditivo de resposta à terapêutica com RT/TMZ em doentes com GBM (79).

### ***Classificação Molecular de Glioblastoma Multiforme***

O perfil e sequenciamento de alterações genéticas têm sido usados na tentativa de dividir GBM em subclasses moleculares, visando um melhor entendimento dos seus mecanismos e susceptibilidades a certas terapêuticas. Em 2006, *Philips et al*, por meio de perfis de expressão génica, dividiram os GBM em três tipos: Proneural, Mesenquimatoso e Proliferativo. Contudo, com o advento do *The Cancer Genome Atlas*, surge uma nova classificação por *Verhaak et al*. Esta divide GBM em quatro classes: Proneural, Neural, Mesenquimatosa e Clássica (Tabela 2). De referir que a frequência das mutações mais comuns foi associada com os vários subtipos, potencialmente trazendo uma nova luz às suas origens genéticas (32).

O uso de terapêuticas agressivas, usando RT e TMZ, resultaram numa redução da mortalidade em GBM Clássicos e Mesenquimatosos, sendo que a eficácia das mesmas foi apenas sugerida para GBM Neurais, mas não resultaram em alterações na sobrevida para doentes com GBM Proneural (80).

- I. GBM Clássico: está associado a amplificação e/ou mutação do gene de EGFR, perda de PTEN (cromossoma 10) e deleção de CDKN2A.

A amplificação do cromossoma 7, onde se encontra o gene EGFR associada à perda de cromossoma 10 é um fenómeno muito frequente em GBM, tendo sido observada na totalidade de GBM pertencendo ao subtipo Clássico. Apesar de a amplificação do cromossoma 7 ser observado em tumores de outras classes, a amplificação de EGFR foi observada em 97% dos casos desta subclasse e infrequentemente nas outras classes. Doze de 22 amostras de GBM Clássico continham uma mutação pontual ou a variante EGFRvIII. Enquanto as alterações de EGFR são importantes em vários GBM, a subclasse Clássica demonstra uma predileção para este gene. Em sintonia com as altas taxas de alteração de EGFR, denotou-se uma ausência importante de mutações da p53 neste subgrupo, mesmo sendo esta uma das mais frequentes em GBM (13).

A deleção de 9p21.3, com alvo no gene CDKN2A (que codifica tanto p16<sup>INK4A</sup> e p14<sup>ARF</sup>), foi um evento frequente nesta subclasse, ocorrendo concomitantemente com a amplificação de EGFR em 94% dos casos de GBM Clássico. A deleção de 9p21.3 foi quase na totalidade mutualmente exclusiva de outras alterações na via de Rb1, como Rb1, CDK4 e CCN2 (*connective tissue growth factor*). Isto sugere que, em amostras com amplificação de EGFR, a via RB está quase exclusivamente afectada através da deleção de CDKN2A (80).

II. GBM Proneural: apresenta mutações do gene de IDH1 e alterações no gene de PDGFRA.

As ampliações no *locus* 4q12 comportando PDGFR foram observadas em todos os subtipos de GBM, mas a uma taxa mais elevada nas amostras de GBM Proneural. Neste subgrupo, as alterações de PDGFRA apresentam-se, de forma característica, por amplificação focal em concomitância com níveis elevados de expressão génica de PDGFRA, sendo que este padrão é observado quase exclusivamente neste subgrupo.

Quanto a IDH1, onze de 12 mutações a nível deste gene foram encontradas neste subgrupo, a maioria das quais não apresentando alterações a nível de PDGFRA.

A nível da p53, mutações e perda de heterozigotia foram fenómenos frequentes neste subgrupo.

A amplificação do cromossoma 7 acompanhado da perda de heterozigotia para o cromossoma 10 foi caracteristicamente menos prevalente, ocorrendo em apenas 54% das amostras Proneurais.

Este subgrupo manifestou ainda uma grande expressão de genes envolvidos no desenvolvimento oligodendrocítico, tais como PDGFRA, NKX2-2 (*NK2 homeobox 2*) e OLIG2 (*oligodendrocyte lineage transcription factor 2*), enfatizando o seu papel como uma subclasse atípica. A grande expressão de OLIG2 mostrou ser capaz de regular negativamente o gene supressor de tumor de p21 (CDKN1A - inibidor da cinase dependente de ciclina 1A), aumentando assim a proliferação celular, sendo que a expressão de CDKN1A se encontrava diminuída nesta subclasse. Dez de 16 mutações a nível de PIK3CA/PIK3R1 foram identificadas neste subgrupo, a maioria observada em amostras sem alterações de PDGFRA (80).

Também as características epigenéticas de GBM foram consideradas na classificação destes tumores. De acordo com *The Cancer Genome Atlas*, um fenótipo metilador foi identificado, quase exclusivamente em tumores na subclasse Proneural, assim como em GBM secundários com mutações para o gene de IDH1. Doentes pertencentes a esta subclasse que apresentam este fenótipo metilador manifestam sobrevida significativamente melhor do que doentes sem esta associação (81).

Apesar de não ser estatisticamente significativo, denotou-se uma tendência para uma sobrevida mais longa em doentes apresentando o subgrupo Proneural. Esta sobrevida foi melhorada quando incluídos gliomas de grau II e III. Ressalva-se que os doentes incluídos neste tipo são normalmente mais jovens (80).

III. GBM Neural: expressão de genes neuronais, não apresentando um perfil genético característico (80). Este subtipo é o que mais se assemelha a tecido cerebral normal (10).

IV. GBM Mesenquimatoso: ocorrência frequente de deleções NF1.

As deleções de 17q11.2, contendo o gene NF1, ocorreram predominantemente no subtipo Mesenquimatoso, sendo que a maioria das amostras apresentava valores de expressão de NF1 reduzidos. No estudo realizado por *Verhaak et al*, cerca de 53% das amostras apresentava alterações a nível de NF1. Cerca de seis de 7 co-mutações de NF1 e PTEN, ambas com interferência a nível da via Akt, foram observadas nesta subclasse.

Os GBM desta classe apresentam expressão de marcadores mesenquimatosos, tais como CHI3L1 (*Chitinase 3-like 1*), também conhecido como YKL40 e MET.

Também os genes da família de factores de necrose tumoral e da via NF-  $\kappa$ B (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), como TNFRSF1A (*Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A*), TRADD (*TNFRSF1A-associated via death domain*) e RELB (*V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B*), encontram-se altamente expressos nesta subclasse, potencialmente como consequência da maior necrose e infiltrados inflamatórios associados neste subgrupo (80).

Tabela 2. Classificação Molecular de GBM Multiforme, com as principais alterações manifestadas em cada classe.			
CLÁSSICO	PRONEURAL	MESENQUIMATOSO	NEURAL
<p>Amplificação de 7q11.2 (EGFR) e perda de heterozigotia para o cromossoma 10</p> <p>Delecção 9p21.3 (p16<sup>Ink4a</sup>/p14<sup>ARF</sup>)</p> <p>Ausência de mutações p53, NF1, IDH1, PDGFRA</p>	<p>Amplificação de 4q12 (PDGFRA)</p> <p>Mutação IDH1</p> <p>Mutações /perda de heterozigotia da p53</p> <p>Genes desenvolvimento oligodendrocítico (PDGFRA, NKX2-2 e OLIG2)</p>	<p>Delecção/mutação 17q11.2 (NF1)</p> <p>Marcadores mesenquimatosos (CHI3L1, MET)</p>	<p>Genes Neurais</p>

## **C O N C L U S ã O**

O glioblastoma multiforme é o tumor cerebral maligno primário mais frequente, acarretando um prognóstico bastante sombrio, uma vez que tem sido feito pouco ou nenhum progresso no tratamento do mesmo. Actualmente, menos de 3% dos pacientes com GBM têm uma sobrevida superior a 5 anos, sendo que este permanece resistente à maioria das terapêuticas. Desta forma, a caracterização genética do GBM assume um papel importante na abordagem a aplicar neste tumor.

A caracterização genética do GBM revelou uma vasta gama de alterações, tanto puramente genéticas como mediadas por mecanismos epigenéticos, podendo ocorrer isoladamente ou em associação. Verificou-se que estas alterações se distribuem de forma distinta quer seja um GBM primário, quer seja um GBM secundário, abrindo portas a uma melhor compreensão da patogénese deste tumor. O estudo genético deste tumor permitiu ainda a criação da Classificação Molecular do GBM, cujas classes apresentam diferentes perfis genéticos, o que lhes confere diferentes prognósticos e diferentes respostas à terapêutica.

No que respeita a alterações puramente genéticas, é de notar que, na sua maioria, ocorrem em vias de sinalização: a via dos receptores tirosina-cinase, em cerca de 88% dos casos, a via do ciclo celular (Rb1), alterada em aproximadamente de 78% dos casos, e a via da proteína p53, em 87% dos casos. Destaca-se a amplificação do gene que codifica o EGFR, que ocorre em cerca de 40% a 60% dos casos, maioritariamente em GBM primários, e a mutação a nível da p53, considerada uma característica distintiva do GBM secundário, presente em cerca de 65% destes.

Outra das alterações mais frequentes no contexto de GBM é a perda de heterozigotia, sendo a mais frequente a do cromossoma 10, ocorrendo em 60% a 80% dos casos.

Realça-se também a mutação a nível do gene de IDH1, presente em praticamente em todos os GBM secundários, sendo, como tal considerada, um marcador genético fiável de GBM secundário. Esta mutação está associada a melhor prognóstico.

No contexto de alterações epigenéticas, destaca-se a hipermetilação do promotor do gene de MGMT, presente em cerca de 40% a 57% dos GBM. Esta, quando presente, confere aos doentes uma melhor resposta à terapêutica com TMZ. Também a regulação epigenética de miRs tem um papel importante no desenvolvimento tumoral.

Apesar de na última década se terem conseguidos grandes progressos na compreensão da genética e patogénese dos GBM, estes mantêm prognóstico reservado, dado que os resultados clínicos apenas mostraram melhorias moderadas. Assim, os esforços no sentido de aprofundar os conhecimentos acerca deste tumor, nomeadamente a caracterização genética, deverão ser mantidos, pois poderão revelar um novo rumo para a sua abordagem, ao permitir tanto uma melhoria nas técnicas de terapêutica, como a personalização do tratamento, pelo conhecimento das diferenças nas alterações do material genético que podem ocorrer de indivíduo para indivíduo.

## **A G R A D E C I M E N T O S**

Ao Sr. Professor Doutor Marcos Barbosa pela infinita paciência, disponibilidade e sabedoria que dedicou a este trabalho.

Aos meus pais, irmão e restante família por me fazerem sentir que não é preciso mais nada para ser feliz. E pelos telefonemas a horas impróprias.

À Sara e ao Diogo pela paciência, pelo incentivo, pelo carinho e pelos hidratos de carbono.

A todos os meus amigos, de cá e de lá, por me acompanharem e apoiarem nesta caminhada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, Genovese G, Quayle SN, Dunn IF, et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes & development*. 2012 Apr 15;26(8):756–84.
2. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta neuropathologica*. 2005 Jan;109(1):93–108.
3. Taylor TE, Furnari FB, Cavenee WK. Targeting EGFR for Treatment of Glioblastoma: Molecular Basis to Overcome Resistance. *Current Cancer Drug Targets*. 2012;12(3):197–209.
4. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American journal of pathology*. 2007 May;170(5):1445–53.
5. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer science*. 2009 Dec;100(12):2235–41.
6. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre P-L, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer research*. 2004 Oct 1;64(19):6892–9.
7. Louis DN, Von Deimling A, Chung RY, Rubio MP, Whaley JM, Eibl RH, et al. Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytic tumors. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1993 Jan;52(1):31–8.
8. Stupp R, Mason WP, Van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*. 2005 Mar 10;352(10):987–96.
9. Baldi I, Huchet A, Bauchet L, Loiseau H. [Epidemiology of glioblastoma]. *Neuro-Chirurgie*. 2010 Dec;56(6):433–40.
10. Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *Journal of neuro-oncology*. 2012 May;108(1):11–27.
11. Purow B, Schiff D. Glioblastoma genetics: in rapid flux. *Discovery Medicine*. 2010 Feb;9(45):125–31.
12. Szerlip NJ, Pedraza A, Chakravarty D, Azim M, McGuire J, Fang Y, et al. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012 Feb 21;109(8):3041–6.
13. Cancer T, Atlas G. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008 Oct 23;455(7216):1061–8.

14. Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Alonso ME, Arjona D, Lomas J, De Campos JM, et al. CpG island methylation status and mutation analysis of the RB1 gene essential promoter region and protein-binding pocket domain in nervous system tumours. *British journal of cancer*. 2003 Jan 13;88(1):109–14.
15. Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2001 Jan;81(1):77–82.
16. Schmidt E, Ichimura K, Reifenberger G, Collins V. CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer research*. 1994 Dec 15;54(24):6321–4.
17. Park SH, Jung KC, Ro JY, Kang GH, Khang SK. 5' CpG island methylation of p16 is associated with absence of p16 expression in glioblastomas. *Journal of Korean medical science*. 2000 Oct;15(5):555–9.
18. Yin D, Ogawa S, Kawamata N, Tunici P, Finocchiaro G, Eoli M, et al. High-resolution genomic copy number profiling of glioblastoma multiforme by single nucleotide polymorphism DNA microarray. *Molecular cancer research : MCR*. 2009 May;7(5):665–77.
19. Martínez R. Beyond Genetics in Glioma Pathways: The Ever-Increasing Crosstalk between Epigenomic and Genomic Events. *Journal of signal transduction*. 2012 Jan;2012:519807.
20. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *The American journal of pathology*. 2009 Apr;174(4):1149–53.
21. Parsons D, Jones S, Zhang X, Lin J. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008 Sep 26;321(5897):1807–12.
22. Martinez R, Esteller M. The DNA methylome of glioblastoma multiforme. *Neurobiology of disease*. Elsevier Inc.; 2010 Jul;39(1):40–6.
23. Crespo I, Tão H, Nieto AB, Rebelo O, Domingues P, Vital AL, et al. Amplified and homozygously deleted genes in glioblastoma: impact on gene expression levels. *PloS one*. 2012 Jan;7(9):e46088.
24. Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Ferrer-Luna R, Benito R, Serna E, Gonzalez-Darder J, et al. New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2010 Jun;23(6):856–65.
25. Regateiro F. *Manual de Genética Médica*. 1ª edição,. Coimbra, Portugal: Imprensa da Universidade de Coimbra; 2007.

26. Attolini CS-O, Cheng Y-K, Beroukhim R, Getz G, Abdel-Wahab O, Levine RL, et al. A mathematical framework to determine the temporal sequence of somatic genetic events in cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010 Oct 12;107(41):17604–9.
27. Okada Y, Hurwitz E, Esposito J, Brower M. Selection pressures of TP53 mutation and microenvironmental location influence epidermal growth factor receptor gene amplification in human glioblastomas. *Cancer research*. 2003;
28. Gan HK, Kaye AH, Luwor RB. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. Elsevier Ltd; 2009 Jun;16(6):748–54.
29. Kanu OO, Hughes B, Di C, Lin N, Fu J, Bigner DD, et al. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clinical medicine. Oncology*. 2009 Apr 8;3:39–52.
30. Holtkamp N, Ziegenhagen N, Malzer E, Hartmann C, Giese A, Von Deimling A. Characterization of the amplicon on chromosomal segment 4q12 in glioblastoma multiforme. *Neuro-oncology*. 2007 Jul;9(3):291–7.
31. Ozawa T, Brennan CW, Wang L, Squatrito M, Sasayama T, Nakada M, et al. PDGFRA gene rearrangements are frequent genetic events in PDGFRA-amplified glioblastomas. *Genes & development*. 2010 Oct;24(19):2205–18.
32. Purow BW, Schiff D. Glioblastoma genetics: in rapid flux. *Discovery medicine*. 2010 Feb;9(45):125–31.
33. Saxena A, Shriml LM, Dean M, Ali IU. Comparative molecular genetic profiles of anaplastic astrocytomas/glioblastomas multiforme and their subsequent recurrences. *Oncogene*. 1999 Feb 11;18(6):1385–90.
34. Martinho O, Longatto-Filho A, Lambros MBK, Martins A, Pinheiro C, Silva A, et al. Expression, mutation and copy number analysis of platelet-derived growth factor receptor A (PDGFRA) and its ligand PDGFA in gliomas. *British journal of cancer*. 2009 Sep 15;101(6):973–82.
35. Koul D. PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer biology & therapy*. 2008 Sep;7(9):1321–5.
36. Knobbe CB, Merlo A, Reifenberger G. Pten signaling in gliomas. *Neuro-oncology*. 2002 Jul;4(3):196–211.
37. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & development*. 2007 Nov 1;21(21):2683–710.
38. Mayo L, Donner D. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends in biochemical sciences*. 2002 Sep;27(9):462–7.

39. Fenton TR, Nathanson D, Ponte de Albuquerque C, Kuga D, Iwanami A, Dang J, et al. Resistance to EGF receptor inhibitors in glioblastoma mediated by phosphorylation of the PTEN tumor suppressor at tyrosine 240. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012 Aug 28;109(35):14164–9.
40. Nagarajan RP, Costello JF. Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. *Seminars in cancer biology*. 2009 Jun;19(3):188–97.
41. Wiencke JK, Zheng S, Jelluma N, Tihan T, Vandenberg S, Tamgüney T, et al. Methylation of the PTEN promoter defines low-grade gliomas and secondary glioblastoma. *Neuro-oncology*. 2007 Jul;9(3):271–9.
42. Zhou Y, Tan F, Hess K, Yung W. The Expression of PAX6, PTEN, Vascular Endothelial Growth Factor, and Epidermal Growth Factor Receptor in Gliomas Relationship to Tumor Grade and Survival. *Clinical Cancer Research*. 2003;3369–75.
43. Lee M, Stephenson D. Recent developments in neurofibromatosis type 1. *Current opinion in neurology*. 2007 Apr;20(2):135–41.
44. McGillicuddy L, Fromm J, Hollstein P. Proteasomal and genetic inactivation of the NF1 tumor suppressor in gliomagenesis. *Cancer cell*. 2009 Jul 7;16(1):44–54.
45. Cerami E, Demir E, Schultz N, Taylor BS, Sander C. Automated network analysis identifies core pathways in glioblastoma. *PloS one*. 2010 Jan;5(2):e8918.
46. Collins V. Brain tumours: classification and genes. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2004 Jun 1;75(suppl\_2):ii2–ii11.
47. Solomon D, Kim J, Jean W, Waldman T. Conspirators in a capital crime: co-deletion of p18INK4c and p16INK4a/p14ARF/p15INK4b in glioblastoma multiforme. *Cancer research*. 2008 Nov 1;68(21):8657–60.
48. Yin D, Ogawa S, Kawamata N. High-resolution genomic copy number profiling of glioblastoma multiforme by single nucleotide polymorphism DNA microarray. *Molecular Cancer* .... 2009 May;7(5):665–77.
49. Alelú-Paz R, Ashour N, González-Corpas A, Ropero S. DNA methylation, histone modifications, and signal transduction pathways: a close relationship in malignant gliomas pathophysiology. *Journal of signal transduction*. 2012 Jan;2012:956958.
50. Kim H, Huang W, Jiang X, Pennicooke B, Park PJ, Johnson MD. Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010 Feb 2;107(5):2183–8.
51. Adnane J, Jackson R, Nicosia S. Loss of p21WAF1/CIP1 accelerates Ras oncogenesis in a transgenic/knockout mammary cancer model. *Oncogene*. 2000 Nov 9;19(47):5338–47.

52. Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis*. 2001 Oct;22(10):1715–9.
53. Bello MJ, Rey J a. The p53/Mdm2/p14ARF cell cycle control pathway genes may be inactivated by genetic and epigenetic mechanisms in gliomas. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2006 Jan 15;164(2):172–3.
54. Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y, et al. p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2001 Apr;11(2):159–68.
55. Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Yachi K, Ohta T, Ogino A, et al. Aberrant hypermethylation of p14ARF and O6-methylguanine-DNA methyltransferase genes in astrocytoma progression. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2007 Jan;17(1):5–10.
56. Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1997 Feb;56(2):180–5.
57. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009 Oct 1;15(19):6002–7.
58. Yadav AK, Renfrow JJ, Scholtens DM, Xie H, Duran GE, Bredel C, et al. Monosomy of chromosome 10 associated with dysregulation of epidermal growth factor signaling in glioblastomas. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2009 Jul 15;302(3):276–89.
59. Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2000 Jun;59(6):539–43.
60. Veeriah S, Brennan C, Meng S, Singh B, Fagin JA, Solit DB, et al. The tyrosine phosphatase PTPRD is a tumor suppressor that is frequently inactivated and mutated in glioblastoma and other human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Jun 9;106(23):9435–40.
61. Maher E a, Brennan C, Wen PY, Durso L, Ligon KL, Richardson A, et al. Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. *Cancer research*. 2006 Dec 1;66(23):11502–13.
62. Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Kishi M, Nakase H, Sakaki T, et al. Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2005 Feb;85(2):165–75.

63. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009 Sep 1;27(25):4150–4.
64. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England journal of medicine*. 2009 Feb 19;360(8):765–73.
65. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, et al. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009 Dec 1;27(34):5743–50.
66. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, De Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine*. 2005 Mar 10;352(10):997–1003.
67. Fukushima T, Takeshima H, Kataoka H. Anti-glioma therapy with temozolomide and status of the DNA-repair gene MGMT. *Anticancer research*. 2009 Nov;29(11):4845–54.
68. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008 Sep 1;26(25):4189–99.
69. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer research*. 2007 Feb 15;67(4):1424–9.
70. Papagiannakopoulos T, Shapiro A, Kosik K. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Research*. 2008 Oct 1;68(19):8164–72.
71. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, et al. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Molecular and cellular biology*. 2008 Sep;28(17):5369–80.
72. Chan J, Krichevsky A, Kosik K. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer research*. 2005 Jul 15;65(14):6029–33.
73. Zhang C-Z, Zhang J-X, Zhang A-L, Shi Z-D, Han L, Jia Z-F, et al. MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma. *Molecular cancer*. 2010 Jan;9:229.

74. Godlewski J, Newton HB, Chiocca E a, Lawler SE. MicroRNAs and glioblastoma; the stem cell connection. Cell death and differentiation. Nature Publishing Group; 2010 Feb;17(2):221–8.
75. Silber J, Lim D a, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, et al. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. BMC medicine. 2008 Jan;6:14.
76. Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, et al. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. Cancer research. 2008 May 15;68(10):3566–72.
77. Guan Y, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Hata N, Shono T, Suzuki SO, et al. MiRNA-196 is upregulated in glioblastoma but not in anaplastic astrocytoma and has prognostic significance. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 2010 Aug 15;16(16):4289–97.
78. Li Y, Guessous F, Zhang Y, DiPierro C. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. Cancer research. 2009 Oct 1;69(19):7569–76.
79. Slaby O, Lakomy R, Fadrus P, Hrstka R, Kren L, Lzicarova E, et al. MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients. Neoplasma. 2010 Jan;57(3):264–9.
80. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer cell. 2010 Jan 19;17(1):98–110.
81. Cooper L a D, Kong J, Gutman D a, Wang F, Gao J, Appin C, et al. Integrated morphologic analysis for the identification and characterization of disease subtypes. Journal of the American Medical Informatics Association: JAMIA. 2012;19(2):317–23.