

Estudo de marcadores de diagnóstico e prognóstico em gliomas

Dissertação para obtenção de grau de Mestre

Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde

ANA FILIPA BARATA DUARTE GUEDES



UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO
VILA REAL, 2010

*“A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais volta ao seu tamanho inicial”*

ALBERT EINSTEIN

AGRADECIMENTOS

O espaço limitado desta secção de agradecimentos, seguramente, não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que, ao longo do meu Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde me ajudaram, directa ou indirectamente, a cumprir os meus objectivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica. Desta forma, deixo apenas algumas palavras, poucas, mas um sentido e profundo sentimento de reconhecido agracedimento.

Ao Coordenador do Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde, Professor Doutor Valdemar Carnide, agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar este Mestrado que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica e científica.

Ao Centro de Neurociências e Biologia Celular, em especial à Professora Doutora Catarina Oliveira, por me ter proporcionado as condições necessárias para a elaboração da minha Tese e por permitir a minha integração num centro de investigação de tão elevada qualidade e exigência. Agradeço também a sua simpatia e disponibilidade.

À Professora Doutora Rosário Almeida, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e apoio incondicionais que muito elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer, sempre, saber mais e a vontade constante de querer fazer melhor. Agradeço também a oportunidade que me deu de me integrar no seu Grupo de Investigação e reconheço, com gratidão, não só a confiança que em mim depositou, desde o início, mas também, o sentido de responsabilidade que me incutiu em todas as fases do Projecto.

Ao Professor Doutor Gilberto Igrejas, o meu sincero agradecimento pela co-orientação neste Projecto. Muito obrigada pelo profissionalismo, pela sincera amizade e pela total disponibilidade que sempre revelou para comigo. O seu apoio foi determinante na elaboração desta Tese.

À *Doutora Olinda*, Neuropatologista dos HUC, com quem tive o orgulho e privilégio de colaborar, agradeço todos os estímulos e desafios para a realização deste Projecto. Agradeço também pela amabilidade, amizade e boa disposição em todos os momentos. A sua sabedoria foi essencial para que chegasse ao fim deste trabalho com um enorme sentimento de satisfação.

Aos *Neurocirurgiões* dos HUC, em especial ao *Doutor Hermínio Tão*, por possibilitar a realização deste Projecto, pela sua disponibilidade e colaboração e também pelo seu incentivo neste trabalho de investigação.

Expresso também a minha gratidão e solidariedade a *Todos os Pacientes* que, embora no anonimato, prestaram uma contribuição fundamental para que este estudo fosse possível e para o avanço da investigação científica nesta área do conhecimento.

À *Professora Doutora Celeste Lopes* e ao seu Grupo de Investigação, *Vera*, *Susana*, *Bruno* e *Ana* agradeço todo o auxílio e apoio, manifestados ao longo deste ano.

À *Inês Crespo*, um Muito Obrigada por todo o carinho e amizade que me manifestou. Agradeço, de forma especial, a ajuda, o apoio e a preocupação, nos momentos de maior aflição.

À *Professora Doutora Isabel Carreira* pela amabilidade em dispor do seu laboratório e ao seu Grupo de Investigação, em especial ao *Zé* e à *Susana*, pela ajuda que prestaram.

Às *Técnicas do Serviço de Neuropatologia*, em especial, à *Sandra* e à *Graça* agradeço a ajuda prestada.

Às *Minhas Colegas de Laboratório*, *Ana*, *Maria Helena* e *Sofia*, um Muito Obrigada pela vossa amizade, companheirismo e ajuda, factores muito importantes na realização desta Tese e que me permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação. Também uma referência especial à *Joana*, pela enorme amizade que criámos. Agradeço-lhe a partilha de bons momentos, a ajuda e os estímulos nas alturas de desânimo.

Aos *Meus Amigos*, em especial à *Maria João* e ao *Filipe Pinto* pelos intermináveis desabafos ao telemóvel☺ e pela partilha dos bons (e menos bons) momentos.

Às *Minhas Colegas de Casa*, *Catarina Jesus* e *Catarina Longras* pela forma como me acolheram e integraram em Coimbra. Pela amizade, companhia e afecto, Muito Obrigada.

Ao *Tiago*, um agradecimento especial pelo apoio e carinho diários, pelas palavras doces e pela transmissão de confiança e de força, em todos os momentos. Por tudo, a minha enorme gratidão!

À *Minha Família*, em especial aos *Meus Pais*, ao *Meu Irmão* e aos *Meus Avós*, um enorme obrigada por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem. A eles, dedico todo este trabalho.

ABSTRACT

Gliomas are the most common primary brain tumors, accounting for more than 80% of all neoplasms arising in the Central Nervous System (CNS) and are currently classified by the World Health Organization (WHO) into astrocytomas, oligodendrogliomas, mixed gliomas and ependymomas. The diagnosis and classification are based on their histopathological appearance, which sometimes may be difficult. Despite advances in neurosurgery, chemotherapy and radiotherapy, the prognosis of most glioma patients remains dismal.

In recent years, extensive molecular studies have identified diagnostic, prognostic and predictive markers in gliomas that reinforce the WHO histological classification. The 1p19q deletion in oligodendroglial tumors, the presence of somatic mutations in the genes encoding isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (*IDH1* and *IDH2*) in astrocytomas, oligodendrogliomas and oligoastrocytomas and the hypermethylation of the promoter of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (*MGMT*) gene in glioblastomas are currently the three most pertinent markers in diffuse gliomas.

Previous studies suggest that deletion of chromosome arms 1p and 19q has proven to be a powerful diagnostic and prognostic marker. Combined loss of 1p and 19q has been associated with morphology of oligodendrogliomas and with enhanced survival in these tumors. However, in other glial tumors, an oligodendroglial component can mean a better prognosis. Therefore, one of the aims of this Project is the 1p/19q evaluation concerning the patients' diagnostic and prognostic.

Recent published studies considered that mutations in *IDH1* and *IDH2*, are an important diagnostic and prognostic marker but that is still unclear. Also, patients with tumors harboring mutation of *IDH1* or *IDH2* genes seem to have a better outcome than patients with non mutated tumors. Thus, another goal of this study focus on the identification and characterization of mutations, difference in survival at a population level and to assess whether they allow reliable discrimination between primary (*de novo*) glioblastomas and secondary glioblastomas (that progressed from low-grade or anaplastic gliomas).

DNA repair protein, *MGMT*, is one implicated factor in glioma chemoresistance. The prognostic and predictive value of *MGMT* promoter hypermethylation however remains controversial. An additional aim of this study regards the evaluation of the prognostic significance of *MGMT* in patients with glioblastomas.

In total, we analysed 141 patient samples for a series of patients followed in the University Hospital of Coimbra with astrocytomas (n = 111), oligodendrogliomas (n = 18), mixed gliomas (n = 8) and ependymomas (n = 4). In our study, the 1p/19q status was assessed by interphase Fluorescence *In Situ* Hybridization (iFISH) (n = 130), somatic mutations analysis of *IDH1* and *IDH2* genes was directed sequenced (n = 128) and *MGMT* hypermethylation analysis was performed by using Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA) on the glioma samples (n = 38).

Our data suggested that deletions of chromosome arms 1p and 19q are associated with oligodendrogliomas morphology ($p < 0,0001$), independently of tumor grade. However, this alteration is not associated with chemosensitivity and enhanced survival.

IDH1 mutations were detected in 17 of 128 gliomas, in which 3 different mutations were identified. This study indicated that *IDH1* mutations are frequent in secondary glioblastomas but rare in primary glioblastomas (100% vs 1,1%, $p < 0,0001$). Therefore, *IDH1* mutations also seem to be a more favorable prognostic factor. None of the 128 gliomas analyzed contained an *IDH2* mutation.

The *MGMT* gene promoter was methylated in 67% and unmethylated in 33% of glioblastoma patients. This marker can be a predictor factor of response to chemotherapy because the patients who had the promoter hypermethylation and underwent chemotherapy had increased their survival in relation to the patients who did not undergo the therapy ($p < 0,001$).

Therefore, according to these Project results, we emphasized the importance of the implementation of these three markers, in routine bases, due to their value concerning the diagnosis leading to a better understanding of the prognosis as well as the clinical course and management and also due to their predictive value of the response to chemotherapy treatments.

Key Words: glioma, 1p/19q deletion, chromosome, isocitrate dehydrogenase 1 and 2, mutation, O-6-methylguanine-DNA methyltransferase, hypermethylation, biomarkers.

RESUMO

Os gliomas são os tumores cerebrais primários mais frequentes, representando mais de 80% de todas as neoplasias do Sistema Nervoso Central e são, actualmente, classificados, pela Organização Mundial de Saúde, em astrocitomas, oligodendrogliomas, tumores mistos e ependimomas. O diagnóstico e a classificação destes tumores são baseados nas características histopatológicas que, por vezes, são difíceis de definir. Apesar dos avanços na neurocirurgia, quimioterapia e radioterapia, o prognóstico dos doentes com gliomas é ainda muito reservado.

Nos últimos anos, estudos em gliomas têm identificado marcadores de diagnóstico, de prognóstico e preditivos, susceptíveis de ajudarem a definir a classificação histológica. A codelecção 1p/19q em tumores oligodendrogliais, a presença de mutações somáticas em genes que codificam isocitrato desidrogenase 1 e 2 (*IDH1* e *IDH2*) em astrocitomas, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas e a hipermetilação da região promotora do gene *MGMT* em glioblastomas são, actualmente, considerados os três marcadores mais interessantes em gliomas.

Estudos prévios sugerem que a codelecção dos braços dos cromossomas 1p e 19q tem provado ser um bom marcador de diagnóstico e prognóstico. A perda combinada de 1p e 19q tem sido associada com a morfologia de oligodendrogliomas e com o aumento da sobrevida nestes tumores. Contudo, em outros tumores, a componente oligodendroglioma pode também conferir um melhor prognóstico. Assim, um dos objectivos deste Projecto, foi a avaliação de 1p/19q em relação ao diagnóstico e prognóstico dos doentes.

Estudos recentemente publicados sugerem que mutações nos genes *IDH1* e *IDH2*, podem ser marcadores úteis de diagnóstico e prognóstico, no entanto, esta relação nem sempre é consensual. Os doentes com mutação nos genes *IDH1* ou *IDH2* parecem ter um melhor prognóstico do que os doentes sem mutação. Deste modo, pretendeu-se identificar e caracterizar as mutações encontradas para a população em estudo, e correlacionar a sua presença com a sobrevida dos respectivos doentes. Também, foi objectivo de estudo avaliar se a presença de mutações permite distinguir glioblastomas primários (*de novo*) de glioblastomas secundários (que progridem de gliomas de baixo grau ou anaplásicos).

A proteína de reparação de DNA, MGMT, é um factor implicado na quimioresistência em gliomas. O valor preditivo e de prognóstico da hipermetilação da região promotora do gene MGMT permanece, contudo, controverso. Assim, foi também objectivo deste estudo, avaliar a importância da hipermetilação no prognóstico de doentes com glioblastomas.

No total, analisaram-se 141 amostras de doentes seguidos nos Hospitais da Universidade de Coimbra, com astrocitomas (n = 111), oligoastrocitomas (n = 18), oligoastrocitomas (n = 8) e ependimomas (n = 4). No estudo realizado a perda alélica 1p/19q foi avaliada por *Fluorescence In Situ Hybridization* (iFISH) (n = 130), as mutações somáticas nos genes *IDH1* e *IDH2* foram analisadas por Sequenciação directa (n = 128) e a análise de hipermetilação foi efectuada por *Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MS-MLPA) (n = 38).

Os dados obtidos sugeriram que a codelecção 1p e 19q está associada com a morfologia de oligodendrogliomas ($p < 0,0001$), independentemente do grau do tumor. Contudo, esta alteração não foi associada com a quimiosensibilidade e aumento da sobrevida destes doentes.

Mutações *IDH1* foram detectadas em 17 dos 128 gliomas estudados, e encontraram-se 3 mutações diferentes no gene *IDH1*. Este estudo sugeriu que as mutações *IDH1* são frequentes em glioblastomas secundários, mas raros em glioblastomas primários (100% vs 1,1%, $p < 0,0001$). Além disso, mutações *IDH1* parecem ser também um factor de prognóstico mais favorável. Nenhum dos 128 gliomas analisados era, todavia, portador de mutações *IDH2*.

A região promotora do gene *MGMT* apresentou-se metilada em 67% dos doentes e não metilada em 33% dos doentes com glioblastomas. Verificou-se que os doentes com a região promotora hipermetilada, quando submetidos a radioterapia ou quimioterapia, apresentaram um aumento de sobrevida relativamente àqueles que também apresentavam metilação, mas que não foram submetidos a qualquer tratamento ($p < 0,001$).

Assim, através da realização deste Projecto, a implementação dos três marcadores em estudo reveste-se da maior importância, devido ao seu valor no diagnóstico e à sua utilidade para prever e controlar melhor o prognóstico de alguns destes doentes. Tem ainda, um poder preditivo da resposta ao tipo de tratamento, o qual poderá ser optimizado e ajustado para alguns doentes previamente seleccionados.

ÍNDICE GERAL

Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvi
Lista de abreviaturas utilizadas ao longo do texto	xviii
1. Introdução	2
1.1 Neoplasias Malignas – Conceitos gerais	2
1.2 Tumores do Sistema Nervoso Central	3
1.2.1 Incidência	4
1.2.2 Gliomas	4
1.2.2.1 Classificação	4
1.2.2.2 Glioblastoma primário e secundário	5
1.2.2.3 Desenvolvimento e progressão de gliomas	7
1.2.2.4 Complexidade no diagnóstico de gliomas	8
1.2.2.5 Importância de novos marcadores em gliomas	9
1.2.2.5.1 Alterações cromossómicas - Análise da codelecção 1p/19q	9
1.2.2.5.2 Alterações genéticas - Análise de mutações nos genes IDH1 e IDH2.....	12
1.2.2.5.3 Alterações epigenéticas - Análise da hipermetilação da região promotora do gene MGMT.....	17
1.2.2.6 Factores de prognóstico e tratamento em gliomas.....	21
2. Objectivos	25
2.1 Objectivo principal	25
2.2 Objectivos específicos	25
3. Material e Métodos	27
3.1 População em estudo	27
3.2 Colheita das amostras	29
3.3 Processamento das amostras.....	30
3.3.1 Tratamento de amostras frescas de tumor sólido para a técnica de iFISH.....	30

3.3.2 <i>Extracção de DNA a partir de sangue periférico, de tecido fresco e de tecido em parafina para as técnicas de sequenciação e MS-MLPA</i>	31
3.3.2.1 A partir de sangue	31
3.3.2.2 A partir de tecido fresco e de parafina	32
3.3.3 <i>Quantificação do DNA</i>	33
3.4 <i>Realização das técnicas de iFISH, Sequenciação e MS-MLPA</i>	33
3.4.1 <i>Técnica de iFISH para detecção de alterações cromossómicas</i>	33
3.4.1.1 iFISH	34
3.4.2 <i>Técnica de Sequenciação para detecção de mutações</i>	36
3.4.2.1 Amplificação do DNA	36
3.4.2.2 Desenho de <i>primers</i>	36
3.4.2.3 Preparação da reacção de PCR	37
3.4.2.4 Condições de amplificação para os genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i>	38
3.4.2.5 Visualização e identificação dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose.....	39
3.4.2.6 Purificação dos produtos de PCR através do kit <i>High Pure PCR Product Purification</i> , Roche Applied Science	40
3.4.2.7 Reacção de Sequenciação directa através do kit <i>Genomelabtm Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start</i>	40
3.4.2.8 Purificação dos produtos de Sequenciação	41
3.4.3 <i>Técnica de MS-MLPA Methylation Specific-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification para avaliar a hipermetilação</i>	42
3.4.3.1 MS-MLPA	45
3.5 <i>Análise estatística</i>	48
4. Resultados e discussão	50
4.1 <i>Avaliação da alteração alélica de 1p/19q</i>	50
4.1.1 <i>Amostras estudadas</i>	50
4.1.2 <i>Análise das alterações 1p/19q ao microscópio de fluorescência</i>	51
4.1.3 <i>Alterações citogenéticas detectadas para 1p e 19q</i>	53
4.1.4 <i>Análise da sobrevida</i>	56
4.2 <i>Detecção de mutações nos genes IDH1 e IDH2</i>	59
4.2.1 <i>Amostras estudadas</i>	59

4.2.2 Análise de mutações nos genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> por Sequenciação directa.....	60
4.2.3 Alterações genéticas identificadas nos genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i>	62
4.2.4 Análise da sobrevida	66
4.2.5 Avaliações adicionais	68
4.2.5.1 Análise genética a nível somático e germinal.....	68
4.2.5.2 Reprodutibilidade da técnica: amostras parafina vs tecido fresco.....	69
4.3 Avaliação da hipermetilação da região promotora do gene <i>MGMT</i>	70
4.3.1 Amostras estudadas.....	70
4.3.2 Análise da hipermetilação da região promotora do gene <i>MGMT</i> por <i>MS-MLPA</i>	71
4.3.3 Alterações epigenéticas observadas no gene <i>MGMT</i>	73
4.3.4 Análise da sobrevida	79
5. Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras	83
6. Referências Bibliográficas	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das alterações adquiridas pelas células malignas (adaptado de [1, 2]).	3
Figura 2 – Desenvolvimento de glioblastomas primários e secundários (adaptada de [3]).	6
Figura 3 – Esquema das principais vias de sinalização intracelulares frequentemente alteradas em gliomas. Receptores tirosina cinase tais como o receptor do factor de crescimento endotelial (EGFR) ou o receptor do factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) activam as vias de sinalização PI3K-AKT-mTOR e Ras-MAPK. Alterações na p53, RB e NF1 são também comuns (adaptada de [4])	8
Figura 4 - Via de sinalização envolvida na patogénese de gliomas, envolvendo <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> (adaptada de [5])	13
Figura 5 – Ganho e perda da função de <i>IDH1</i> mutante. <i>IDH1</i> mutante forma um dímero activo imperfeito com <i>IDH1</i> wild-type, que resulta na diminuição dos níveis de α -KG e no aumento dos níveis de HIF-1 α . Contudo, esta mutação confere uma nova função à enzima para converter α -KG em R(-)-2HG, sensibilizando as células para quimioterapia e radiação (adaptada de [6])	14
Figura 6 – Mutações no gene <i>IDH1</i> são alterações genéticas frequentes em astrocitomas e oligodendrogliomas, no entanto, muito raras em outros tumores do SNC, e virtualmente ausentes em tumores fora do sistema nervoso (SNC) (adaptada de [7-10]).	15
Figura 7 – Alterações genéticas que ocorrem no desenvolvimento dos vários tipos de gliomas (adaptada de [5, 11])	16
Figura 8 – A metilação de DNA inibe a expressão de genes e tem sido associada a muitas doenças, incluindo o cancro (adaptada de [12])	17
Figura 9 – Esquema representativo da frequência da hipermetilação de diferentes genes em diferentes tipos tumorais (adaptada de [13])	18
Figura 10 – Processo de reparação do DNA mediado pela MGMT. Esta enzima transfere o grupo metil (adicionado por agentes quimioterapêuticos) a partir do aducto de O6-metilguanina para o resíduo de cisteína, tornando-se inactiva (adaptada de [14]).	19
Figura 11 – Mecanismo de quimiosensibilidade aumentada, resultante da inactivação epigenética do gene <i>MGMT</i> . Gliomas com a região promotora do gene <i>MGMT</i> ou com a região do exão 1 não hipermetilada, expressam a proteína MGMT, que remove os aductos de guanina do DNA, produzidos pela administração de carmustina, resultando na resistência do tumor a este agente quimioterapêutico. Em contrapartida, gliomas com esta região hipermetilada, apresentam silenciamento transcripcional, levando à perda da expressão da proteína MGMT. Os aductos de DNA produzidos pelo agente aquilante,	

carmustina, nestes tumores, não são eficientemente removidos, levando à morte celular (adaptada de [15]).....	20
Figura 12 – Esquema ilustrativo do procedimento da amostra com indicação da metodologia adoptada.....	30
Figura 13 – Esquema ilustrativo do procedimento de MS-MLPA [16]. As sondas específicas para cada gene, que continham um local de reconhecimento para enzima de restrição <i>HhaI</i> foram hibridadas com o DNA alvo. Posteriormente, ocorreu ligação e hidrólise com esta enzima, sensível à metilação. As sequências não digeridas, que eram as sequências que estavam metiladas, foram amplificadas. Nas regiões CpG que não se encontravam metiladas, o complexo DNA/sonda foi digerido e, conseqüentemente, não ocorreu amplificação. Para cada amostra de DNA, o MS-MLPA foi realizado com e sem a hidrólise pela enzima <i>HhaI</i> (adaptada de [16]).....	45
Figura 14 – Imagens visualizadas por microscopia de fluorescência das hibridações obtidas para o cromossoma 1 (A, B, C) e para o cromossoma 19 (D, E, F). As sondas utilizadas hibridaram às regiões cromossômicas 1p36 e 19q13 no espectro laranja, e às regiões 1p25 e 19p13 no espectro verde. As células apresentam sobreposição dos filtros específicos para o espectro verde, laranja e contrastação com DAPI (ampliação de 1000x).....	51
Figura 15 – Imagens obtidas por microscopia de fluorescência das células tumorais gliais. Os sinais fluorescentes resultaram da hibridação das sondas específicas para 1p (LSI 1p36) e 19q (LSI 19q13) às regiões cromossômicas em estudo. É possível verificar células com diferentes sinais fluorescentes no espectro laranja, nomeadamente, 1, 2, 3 ou 4 sinais (indicados pelas setas).....	52
Figura 16 – Curva de <i>Kaplan-Meier</i> comparando a sobrevida dos doentes com oligodendrogliomas que apresentavam codelecção nas regiões cromossômicas analisadas (1p36 e 19q13) e os que não apresentavam a codelecção, independentemente do tratamento.....	57
Figura 17 – Curva de <i>Kaplan-Meier</i> comparando a sobrevida dos doentes com oligodendrogliomas que apresentavam codelecção e não fizeram qualquer tipo de tratamento e os doentes com oligodendrogliomas que apresentavam codelecção e fizeram quimioterapia e/ou radioterapia.....	58
Figura 18 - Separação por electroforese dos produtos resultantes da amplificação do exão 4 do gene <i>IDH1</i> (A) e do gene <i>IDH2</i> (B)	60
Figura 19 – A) Electroferograma representativo da sequenciação do codão 132, do exão 4, do gene <i>IDH1</i> . A amostra representada em A, apresentava o codão normal (CGT). B) A amostra representada em B apresentava mutação (R132H) no codão 132, do gene <i>IDH1</i> . C) Electroferograma representativo da sequenciação do codão 172, do exão 4, do gene <i>IDH2</i> . A amostra representada em C apresentava o codão normal (AGG).....	61
Figura 20 – Frequência das diferentes mutações encontradas no codão 132, do gene <i>IDH1</i> , na população em estudo.....	63
Figura 21 – Distribuição de mutações <i>IDH1</i> em glioblastomas primários e secundários.....	64

Figura 22 – Curva de <i>Kaplan-Meier</i> comparando a sobrevida dos doentes que apresentavam mutação <i>IDH1</i> e dos que não apresentavam mutação.....	66
Figura 23 – Electroferogramas representativos da sequenciação do codão 132 do gene <i>IDH1</i> a partir de DNA extraído de tecido tumoral e sangue periférico.....	68
Figura 24 – Resultados das electroforeses capilares por MS-MLPA, utilizando os kits: ME011A1 (Exemplo 1), ME002B1 (Exemplo 2) e ME011B1 (Exemplo 3). Exemplos representativos dos padrões dos picos de amostras não sujeitas a hidrólise e de amostras submetidas a hidrólise pela enzima <i>HhaI</i> , consoante o kit utilizado. Os picos correspondentes às sondas que hibridam em regiões CpG da região promotora do gene <i>MGMT</i> estão identificados por setas.....	72
Figura 25 – Distribuição do estado de hipermetilação da região promotora do gene <i>MGMT</i> em glioblastomas.....	78
Figura 26 – Curva de <i>Kaplan-Meier</i> para doentes com glioblastomas comparando a sobrevida dos doentes com hipermetilação da região promotora do gene <i>MGMT</i> e dos doentes sem esta região hipermetilada.....	80
Figura 27 – Curva de <i>Kaplan-Meier</i> para doentes com glioblastomas e com a região promotora do gene <i>MGMT</i> hipermetilada, comparando a sobrevida dos doentes que não foram submetidos a quimioterapia com a sobrevida dos doentes que o foram.....	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação de gliomas de acordo com a Organização Mundial de Saúde. A incidência e a faixa etária mais prevalente são descritas consoante o subtipo glial (adaptada de [17])	5
Tabela 2 – Alterações cromossómicas comuns em gliomas (adaptada de [18])	10
Tabela 3 – Distribuição da população em estudo, de acordo com os subtipos histológicos, idade no diagnóstico e razão homens: mulheres	28
Tabela 4 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados para os genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> e o tamanho dos produtos amplificados	37
Tabela 5 – Sequências dos <i>primers</i> alternativos para os genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> e tamanho dos produtos amplificados	37
Tabela 6 – Reagentes utilizados na reacção de PCR para amplificação das regiões de interesse dos genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> , utilizando os <i>primers</i> previamente descritos	38
Tabela 7 – Reagentes utilizados na reacção de sequenciação	41
Tabela 8 – Características dos kits de MS-MLPA utilizados relativamente às sondas específicas para o gene <i>MGMT</i>	44
Tabela 9 – Distribuição das amostras tumorais em estudo para análise de iFISH, de acordo com o tipo de glioma.....	51
Tabela 10 – Representação esquemática das alterações cromossómicas observadas em 1p/19q em diversos subtipos histológicos gliais. Os números representam a totalidade de indivíduos nos quais foram observadas as alterações cromossómicas indicadas.....	53
Tabela 11 – Delecções observadas nos diferentes tipos histológicos em estudo	54
Tabela 12 – Média de idade no diagnóstico nos doentes com oligodendrogliomas com a codelecção e sem a codelecção.....	56
Tabela 13 – Distribuição das amostras tumorais em estudo, para análise por sequenciação directa, de acordo com o tipo de glioma.....	59
Tabela 14 – Resultados obtidos por Sequenciação directa para os genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> de acordo com os diferentes subtipos histológicos de gliomas. Os números representam a totalidade de indivíduos nos quais foram observadas mutações.....	62
Tabela 15 – Média de idade no diagnóstico nos doentes com mutação e sem mutação.....	66
Tabela 16 – Distribuição das amostras tumorais em estudo para a análise por MS-MLPA, de acordo com o tipo de glioma.....	70
Tabela 17 – Resultado do estado de hipermetilação para as várias sondas específicas do gene <i>MGMT</i> , utilizando os kits ME011A1 e ME002B1	73

Tabela 18 – Resultado do estado de hipermetilação das diversas sondas específicas do gene <i>MGMT</i> , utilizando o kit ME011B1.....	75
Tabela 19 – Resultados obtidos por MS-MLPA para avaliar o estado de hipermetilação da região promotora do gene <i>MGMT</i> , de acordo com os diferentes subtipos de gliomas. Os números representam a totalidade de indivíduos nos quais foram observadas alterações epigenéticas.....	77
Tabela 20 – Média de idade no diagnóstico dos doentes com glioblastomas consoante o estado de hipermetilação da região promotora do gene <i>MGMT</i>	79

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS AO LONGO DO TEXTO

% - Percentagem

> - Maior

< - Menor

°C – Graus Celsius

µl - microlito

ml - mililitro

ng - nanograma

nm – nanometro

nt- nucleótido

pb – pares de bases

α-KG - α-cetoglutarato

χ² – Qui-quadrado

A

A - Adenina

AGT - O6-alquilguanina-

DNA-alquiltransferase

AKT- Proteína cinase B

B

BCNU – Carmustina

BLU – Gene supressor

tumoral

BrEt – Brometo de Etídeo

C

C - Citosina

C – Aminoácido cisteína

C-5 - Carbono 5

CAMTA1 – Proteína

ativadora de transcrição

CCNU - Lomustina

CDH1 – Gene *caderina 1*

CDK4 - Cinase dependente de ciclina 4

CDKN1C - Inibidor cinase dependente de ciclina

CpG – Regiões citocinas-fosfo-guaninas

Cyclin a1 – *Ciclina 1*

D

DAPK - Proteína cinase

ligada à morte celular

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

der – Cromossoma

derivativo

DFFB- Factor de fragmentação do DNA, subunidade beta

DIRAS3 – Proteína de ligação

dNTPs - Desoxinucleotidos trifosfatos

ddNTPs -

Didesoxinucleotidos trifosfatos

DNA - Ácido

desoxirribonucleico

E

EGF- Factor de crescimento epitelial

EGFR- Receptor do factor de crescimento epitelial

EMP3 – Proteína de membrana epitelial

F

F - *Primer forward*

G

G – Guanina

g – Unidade de medida da força centrífuga

G – aminoácido glicina

Gy - Gray

GBM – Glioblastoma multiforme

GLTSCR – Gene supressor tumoral

Glut1 – Gene transportador de glucose 1

H

H - Aminoácido histidina

H₂O - Água

HCl – Ácido clorídrico

HhaI – Enzima de retrição sensível à metilação

HIF – Factor indutor de hipóxia

HUC - Hospitais da Universidade de Coimbra

I

ICT- Isocitrato

IDH - Isocitrato

desidrogenase

iFISH – *Fluorescence In Situ Hybridization*

INI1 – Gene supressor de tumor

IRF7 – Factor de interferão regulatório

K

K- Aminoácido lisina

KPS – Índice performance de Karnofsky

L

L- Aminoácido leucina

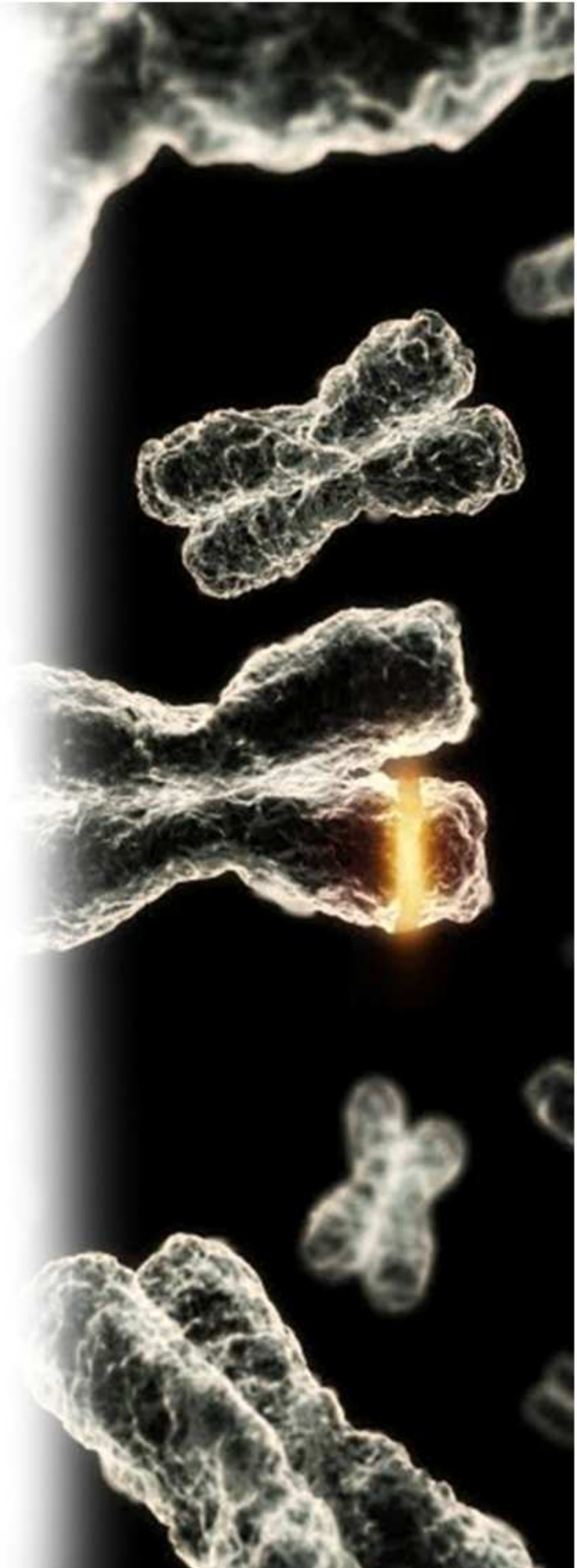
LOH - Perda de heterozigotia

LSI - Sondas específicas de locus

M	P	S
mM - Milimolar	p – Braço curto do cromossoma	S – Aminoácido serina
M – Aminoácido metionina	p – Significância estatística	SLS – <i>Loading Solution</i>
m-TOR – Via de sinalização que envolve a regulação de várias cinases	p14ARF – Regulador de proteínas	SNC - Sistema Nervoso Central
MAPK – Proteínas cinases activadas por mitogéneos	p53 – Gene supressor tumoral	SNP – Polimorfismo de nucleótido único
MDM2 - <i>Murine double minute 2</i>	PBS – <i>Phosphate Buffered Saline</i>	SPSS - <i>Statistical Package for Social Science</i>
MgCl₂ – Cloreto de magnésio	PCR - Reação de polimerização em cadeia	T
MGMT - O-6-metilguanina-DNA metiltransferase	PCDH-gamma-A11 - Proteína envolvida na invasão e apoptose	T - Timina
MLH1 - Proteína de reparação do DNA	PDGFR-α - Factor de crescimento derivado de plaquetas, subunidade alfa	t - Translocação
MITC - <i>methyltriazeno-imidazole carboxamide</i>	PHD – Fosforilação	TBE – Tris Borato EDTA
MS-MLPA - <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>	PTEN – Gene supressor tumoral	TIMP3 – Inibidor de metaloproteínas
N	Q	TMZ - Temozolomida
N - Número	q – Braço longo do cromossoma	TP16 – Proteína 16, pertencente à família das ciclinas
NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleótido	R	TP73 – Proteína relacionada com a TP53
NADH – Nicotinamida adenina dinucleótido reduzida	R – <i>Primer reverse</i>	X
NADP⁺ - Nicotinamida adenine dinucleótido fosfato	R - Aminoácido arginina	X – Cromossoma X
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida	R(-)-2HG –2–hidroxiglutarico desidrogenase	Y
NF1 - Proteína envolvida na Neurofibromatose	Raf - Oncogene	Y – Cromossoma Y
O	Ras – Oncogene	V
OMS - Organização Mundial de Saúde	RASSF1A – Isoforma do gene <i>Ras</i>	V - aminoácido valina
O6-BG - O6- benzilguanina	Rb – Proteína de Retinoblastoma	Vs – Versus
	RNase - Ribonuclease	v/v – volume por volume
	ROS – Espécies reactivas de oxigénio	VHL – gene supressor tumoral
		VEGF - Factor de crescimento vascular endotelial
		W
		WT - <i>Wild-Type</i>

aaagtcattgttggaataaatgtgatt
tggtttttttttcatggcccagaaat
ccaacttgatatgtgttttattcctt
ggatatctacacccattaagcaaggta
aattgagaaatgcatatatgtataac
atttacacacatttagctaaaggcaa
caaataaacttacaaataggcgtcca
acacattttttttcaaacatgctgtt
tttcctttatccttttattcagttat
atgatattgccatttttatgttggtat
tcatatgggttcaaccagatctgtggt
acactggctgcacaataggatcccct
aagtttttttggtgggtttgttttgc
ttgatttggttctttgttttagtttc
gcttgagtaccaccctacacaaattat
tgaattccatgggggttcaggcatttt
gctccccagggtgaatctaattgtgcaa
agaaccaccaagattgtattaaaca
ccatcatgcataaaagaaaaaactgg
tactatgggttcacacctgtaatccta
ttggaggccaatttggaagcactgct
ccaggagtttgagactagcctggacg
agtgggtgcaaactcgctaattctgtat
aacatagcagaacctgtctctacaa
aaaagtatttcaataattatgtcaat
tcatggaagagccagttttgtttatt
acaaagtgagtaggcgaagctgagtgt
tggcatgtgcctatagtcccagctac
aggctgaggcctgaggatcccttaag
aggagttcaaggttacagctatgagc
tcacaccactgcctacgcaacagagc
acctgtctcgaaaaagaaaaagaaa
aactgactcggtagttgaaagcagcc
ctaaagcattccttcctgcctggaaa
tattgcttctttacttctgtaccagta
cttggttgccaaattaagcaaaaaaac
agtaaacaaaatcaaagttcagtggt
actgaggtttcagactttcacagaaa
ttatgtcttaaaaggaccttaaaaac
aatctctcatgctgaaatccagaggt
ttagccatcattgaaaacagtgtgt
gggtaaacagttttagtccttgagggg
taactttgttccactctgtggctaaa
atcctttcatcctggccaaagccttc
tagtcccaggggcccaagcaaggga
tagatggcagtggtgcaaactcgcta
gtgccatcattgaaaacagtgtgttg
gggtaaacagttttagtccttgagggg
taactttgttccactctgtggctaaa
atcctttcatcctggccaaagccttc
tagtcccaggggcccaagcaaggga
tagatggcagtggtgcaaactcgcta
gtaagatggcagtggtgcaaactcg
ttatcagctgagctgagctgagctg

የጥንቃቄ



1. Introdução

1.1 *Neoplasias Malignas* – Conceitos gerais

O cancro é, actualmente, uma das principais causas de morte em todo o Mundo, representando um dos principais problemas de Saúde Pública [19]. Estima-se que, anualmente, sejam diagnosticados cerca de 11 milhões de novos casos e que, aproximadamente, 7 milhões de pessoas morram devido a esta doença. A Organização Mundial de Saúde considera que o cancro será a primeira causa de morte no Mundo, em 2020 [20, 21].

Apesar de, a nível Mundial, se ter verificado, nos últimos anos, uma diminuição da sua incidência, na população Europeia, o número total de casos de cancro tem aumentado desde 2004 [22]. Relativamente à população Portuguesa, registou-se, em 2008, aproximadamente 266 novos casos de cancro em indivíduos do género masculino e 190 novos casos em indivíduos do género feminino (por 100 000 habitantes) [23].

Em geral, o cancro é um processo lento, que se inicia numa única célula, devido a um evento mutacional em genes determinantes e que, depois, se desenvolve em múltiplos estadios, através da acumulação de alterações genéticas e epigenéticas que resultam na transformação de uma célula normal em célula cancerígena [1]. Estas alterações podem ser adquiridas hereditariamente, ou ao longo da vida de um indivíduo [24].

Os genes mais frequentemente envolvidos na origem das neoplasias malignas são: os proto-oncogenes, que codificam proteínas reguladores do crescimento celular normal e da diferenciação e cujo ganho de função promove a proliferação celular; os genes supressores tumorais, que codificam proteínas que, normalmente, suprimem o crescimento e a divisão celular e que, por perda de função, promovem a proliferação celular; os genes envolvidos na reparação do DNA e os genes envolvidos no controlo do ciclo celular [25].

Embora diferentes tumores possuam diferentes características, há características comuns transversais aos diferentes tipos de células tumorais que caracterizam o processo de carcinogénese, tais como, o facto de as células serem independentes de sinais de factores de crescimento, escaparem a sinais de apoptose e senescência, manterem o comprimento dos telómeros e, por isso, terem um potencial replicativo

ilimitado, induzirem a angiogénese e poderem possuir a capacidade de invadir e metastizar (Figura 1). Estas alterações genéticas promovem a transformação progressiva de células humanas normais para células malignas [1, 2].

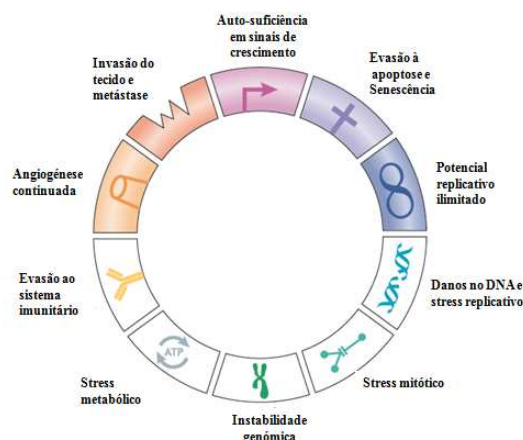


Figura 1 - Representação das alterações adquiridas pelas células malignas (adaptada de [1, 2]).

A susceptibilidade para cancro, no entanto, resulta de uma combinação de factores endógenos (genéticos e epigenéticos) e de factores exógenos (exposição a carcinogénicos ambientais), pelo que o cancro é considerada uma doença multifactorial muito complexa [25].

Deste modo, torna-se imperativo avanços do conhecimento científico nesta área. O estudo dos mecanismos moleculares inerentes e a identificação de novos marcadores revestem-se da maior importância para o aparecimento de novas formas de prevenção e tratamento do cancro, diminuindo a sua mortalidade e morbilidade e aumentando a qualidade de vida dos doentes [26].

1.2 Tumores do Sistema Nervoso Central

As neoplasias primárias do Sistema Nervoso Central (SNC) representam 2% de todas as neoplasias malignas e 20% dos tumores em crianças com idade inferior a 15 anos. Estes tumores constituem a segunda maior causa de morte por neoplasia, em doentes com idades inferiores a 39 anos [27, 28].

Os tumores do SNC são, de forma mais genérica, classificados em tumores do tecido neuroepitelial (incluem os gliomas), em tumores germinativos (incluem os

meduloblastomas e os neuroblastomas), em tumores dos nervos periféricos e em meningiomas, entre outros [17].

1.2.1 Incidência

Dados mundiais da incidência de tumores do SNC revelaram que, a incidência é mais elevada em homens do que em mulheres (aproximadamente, 3,7 e 2,6 em cada 100 000 pessoas por ano, respectivamente) [29]. Na Europa Ocidental, a incidência de tumores do SNC em homens e mulheres é mais elevada, aproximadamente, 6,7 e 4,5 em cada 100 000 pessoas por ano, respectivamente. Incidências similares são observadas em Portugal (aproximadamente, 6,7 homens e 5,0 mulheres em 100 000 pessoas por ano).

Curiosamente, a incidência é mais elevada nos países mais desenvolvidos do que nos países menos desenvolvidos, mas estas diferenças podem ser consequência das diferentes práticas de diagnóstico e acesso a adequados cuidados de saúde [30]. Alguns estudos indicam também que a população caucasiana tem uma maior incidência do que a africana ou a asiática [5, 31].

1.2.2 Gliomas

Os gliomas representam mais de 70% de todas as neoplasias do SNC e constituem o grupo mais frequente em adultos [32].

1.2.2.1 Classificação

Os gliomas são divididos em subgrupos baseados na morfologia histológica e similaridade das suas células com células da glia diferenciadas. Desta forma, são classificados, segundo a OMS, em: astrocitomas (derivados de astrócitos ou dos seus precursores), oligodendrogliomas (derivados de oligodendrócitos ou dos seus precursores) e oligoastrocitomas (linha mista), sendo estes, os três maiores subgrupos. No entanto, existe um outro subgrupo, os ependimomas, (derivados de ependimócitos ou dos seus precursores) que, ocorrem com uma menor frequência [17, 33, 34] (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação de gliomas de acordo com a Organização Mundial de Saúde. A incidência e a faixa etária mais prevalente são descritas consoante o subtipo glial (adaptada de [17]).

Tipo de Glioma	Grau	Nomenclatura	Incidência (% de todos os tumores cerebrais)	Idade
Astrocitoma	I	Astrocitoma pilocítico	5-6%	<20
	II	Astocitoma difuso	10-15%	30-40
	III	Astrocitoma anaplásico	10-15%	45-50
	IV	Glioblastoma multiforme	12-15%	45-75
Oligodendroglioma	II	Oligodendroglioma	2.5%	40-45
	III	Oligodendroglioma anaplásico	1.2%	45-50
Oligoastrocitoma	II	Oligoastrocitoma	1.8%	35-45
	III	Oligoastrocitoma anaplásico	1%	40-45
Ependimoma	I	Subependimoma	0.7%	50-60
	II	Ependimoma	4.7%	<16,30-40
	III	Ependimoma anaplásico	1%	>16

Estes tumores são também classificados de acordo com o seu comportamento biológico, variando o grau de malignidade entre I (os menos agressivos biologicamente) e IV (os mais agressivos) [35] (Tabela 1). Embora haja uma grande heterogeneidade entre os doentes na progressão da doença, a média de sobrevida em gliomas de grau II pode variar entre 7 e 10 anos e em gliomas de grau III e IV pode variar de 1 a 3 anos [36]. Os tumores de grau I e II são referidos como gliomas de baixo grau e os tumores de grau III e IV são referidos como gliomas de alto grau [36]. Esta classificação é baseada nas características das células tumorais, tais como, índice mitótico, atipia nuclear, proliferação microvascular, características invasivas, capacidade de necrose e no comportamento clínico destes tumores [17, 37, 38]. Geralmente, os de grau I apresentam células bem diferenciadas e são considerados benignos e curáveis com a completa ressecção cirúrgica [39]. Em contraste, gliomas de grau II são considerados malignos e, geralmente, invadem e progridem para lesões de alto grau. Os gliomas de grau III exibem aumento de anaplasia e proliferação, no entanto, os gliomas de grau IV são a forma mais invasiva e com pior prognóstico [40]. Estes últimos são, também, designados por glioblastomas multiformes (GBM) e representam 30% dos tumores gliais primários em adultos [41].

1.2.2.2 Glioblastoma primário e secundário

O glioblastoma representa o tipo de tumor cerebral mais frequente e agressivo que, pode desenvolver-se a partir da progressão de um glioma de baixo grau, sendo nestes

casos chamado de glioblastoma secundário, ou desenvolver-se desde o início como glioblastoma primário [42] (Figura 2). Esta distinção foi feita pela primeira vez, em 1940, pelo Neuropatologista Hans-Joachim Scherer mas, nas últimas décadas, há evidências que estes dois tipos de tumor constituem entidades de doença diferentes, estão envolvidos em vias de sinalização distintas, apresentam diferentes expressões proteicas, afectam doentes em faixas etárias distintas e estão associados com respostas variadas ao tratamento [5, 43, 44]. A nível populacional, apenas 5% de todos os casos são glioblastomas secundários [3].

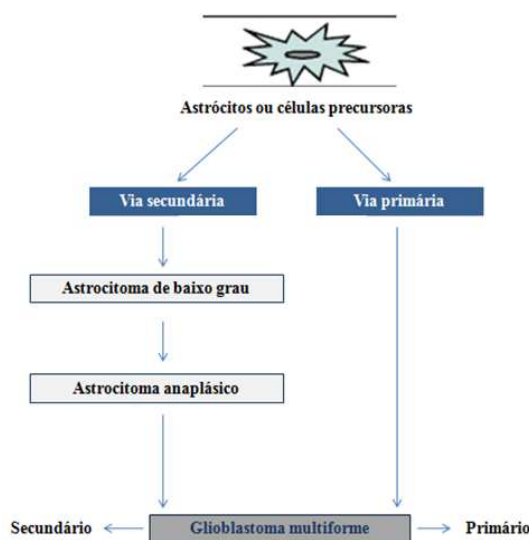


Figura 2 – Desenvolvimento de glioblastomas primários e secundários (adaptada de [3]).

Assim, um doente com glioblastoma primário, geralmente, é mais velho, na faixa etária dos 55 anos, tem uma história clínica mais curta (menos de 3 meses), não apresenta evidências clínicas ou histopatológicas de lesão precursora pré-existente, apresenta crescimento tumoral mais rápido e agressivo, e tem, em geral, pior prognóstico. Por sua vez, um glioblastoma secundário afecta doentes mais jovens e tem crescimento mais lento [35]. Para serem caracterizados desta forma, são necessárias evidências radiológicas, clínicas e moleculares de que existiu, anteriormente, uma lesão precursora [45, 46]

No entanto, do ponto de vista histológico, um glioblastoma primário e um secundário são indistinguíveis, possuindo taxas de proliferação e invasão equivalentes [35, 46]. Do ponto de vista genético, as mutações genéticas específicas, podem variar entre estes dois subtipos de tumor [35] (Figura 5).

1.2.2.3 Desenvolvimento e progressão de gliomas

O processo de carcinogénese dos gliomas é complexo e ainda muito desconhecido [47]. De notar que, apenas cerca de 5% dos doentes com gliomas malignos têm história familiar de glioma. Alguns destes casos são associados com raros Síndromes genéticas como Neurofibromatose dos tipos 1 e 2, Síndrome de Li-Fraumeni e Síndrome de Turcot [48]. Também, os factores ambientais não se têm revelado directamente associados com a carcinogénese destes tumores. O único factor externo de risco na gliomagéne que tem sido descrito é o uso de quimioterapia de elevada dose no tratamento de outros tumores, após diversos anos de exposição [49].

À semelhança do processo de tumorigénese que ocorre noutros tecidos humanos, a gliomagéne resulta de uma acumulação sequencial de alterações genéticas e epigenéticas, incluindo, deleções e amplificações de regiões cromossómicas, mutações génicas, metilações ou desmetilações de DNA e de histonas [32]. Contudo, as células de origem dos gliomas permanecem desconhecidas, uma vez que, não está ainda claro se os gliomas resultam da transformação de células precursoras indiferenciadas ou de células gliais diferenciadas [50]. A maioria das classificações, considera que os gliomas se originam a partir de células da glia diferenciadas, no entanto, não há evidências que, células cerebrais, já diferenciadas, entrem em divisão durante a vida adulta. Por isso, tem sido sugerida uma outra possibilidade mais provável, segundo a qual, os gliomas se deverão desenvolver a partir de células progenitoras neuronais (possuem uma grande capacidade de auto-renovação e divisão celular) [51].

Existem diferentes vias de sinalização, nomeadamente, as vias intervenientes na regulação do ciclo celular (proliferação celular e senescência), sobrevivência celular (apoptose e necrose), invasão (adesão e migração) e angiogénese, que estão, frequentemente, alteradas em gliomas [52]. Entre as diversas vias de sinalização que poderão estar envolvidas na gliomagéne, estudos têm dado ênfase a vias específicas (Figura 3) [4].

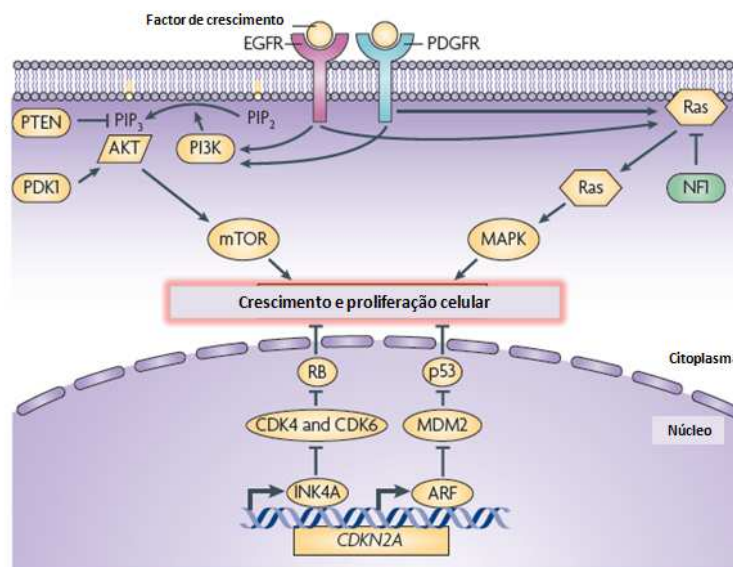


Figura 3 – Esquema das principais vias de sinalização intracelulares, frequentemente, alteradas em gliomas. Receptores tirosina cinase, tais como, o receptor do factor de crescimento endotelial (EGFR) ou o receptor do factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) activam as vias de sinalização PI3K-AKT-mTOR e Ras-MAPK. Alterações na TP53, RB e NF1 são também comuns (adaptada de [4]).

As vias de sinalização que foram encontradas alteradas na maioria dos glioblastomas foram: a via CDK/ciclina, envolvida na regulação da divisão celular; a via p53, envolvida na resposta a danos no DNA e na indução de apoptose e a via RTK/RAS/PI3K, envolvida na transmissão de factores de crescimento [53].

1.2.2.4 Complexidade no diagnóstico de gliomas

Os tumores cerebrais representam um grande desafio tanto para aqueles que recebem como para aqueles que fornecem o diagnóstico. Localizados, geralmente, em regiões de difícil acesso, resistentes à radiação, à quimioterapia e à cirurgia de remoção e oferecendo um grande risco às funções desempenhadas pelo cérebro, estes tumores são um apelo constante a novas estratégias de diagnóstico e de tratamento mais eficazes.

Actualmente, o diagnóstico é feito por estudos de imagem (ressonância magnética e tomografia axial computadorizada), seguido de biópsia e análise histológica [54, 55]. Considera-se a histologia do tumor determinante no diagnóstico e nas decisões terapêuticas em gliomas, no entanto, por vezes, é um método subjectivo e variável [56]. Entre as principais características histológicas observáveis, destaca-se o polimorfismo celular, imagens de mitose, hiper celularidade, traduzida pela proliferação de células imaturas, citoplasma de limites imprecisos, atipias nucleares, trombose vascular e

proliferação microvascular [46]. Estes tumores podem também variar desde neoplasias com células pequenas e uniformes até células gigantes e multiformes, justificando assim o termo multiforme para designar os glioblastomas. Devido ao rápido crescimento, provocam extensas áreas de destruição do tecido nervoso, causando edema e necrose. A microscopia electrónica mostra lesões infiltrativas no tecido cerebral que rodeia o tumor, característica que está sempre presente nos glioblastomas [57].

Porém, apesar do desenvolvimento das técnicas de neuro-imagem, do aperfeiçoamento das técnicas cirúrgicas, da melhoria nas metodologias histológicas e do aumento progressivo do conhecimento na biologia molecular dos tumores, o diagnóstico dos gliomas cerebrais malignos ainda permanece difícil e subjectivo [58]. Por isso, nos últimos anos, têm-se estudado intensivamente formas mais eficazes de diagnóstico e, para isso, esforços têm sido feitos de forma a clarificar as alterações genéticas/moleculares associadas com o desenvolvimento e progressão de gliomas humanos.

1.2.2.5 Importância de novos marcadores em gliomas

Estudos recentes têm sugerido o uso de diferentes marcadores, em doentes com gliomas, de forma a melhorar o diagnóstico, o prognóstico e a terapêutica destes doentes. Deste modo, o presente trabalho pretende, assim, fornecer dados adicionais das alterações genéticas e epigenéticas que têm ganho importância em gliomas, nomeadamente, a perda alélica de 1p/19q, as mutações nos genes isocitrato desidrogenase 1 e 2, *IDH1* e *IDH2* e a hipermetilação da região promotora do gene *MGMT*.

1.2.2.5.1 Alterações cromossómicas - Análise da codelecção 1p/19q

Estudos citogenéticos, em gliomas, têm identificado diversas regiões cromossómicas com alterações no número de cópias (ganhos ou perdas). Geralmente, a presença de deleções em tumores poderá indicar regiões cromossómicas com genes supressores tumorais, cuja função é suprimir a formação e/ou progressão tumoral. Por sua vez, amplificações ou ganhos cromossómicos poderão indicar regiões com

oncogenes, cuja função favorece a tumorigénese. Algumas das alterações cromossómicas mais comuns estão, apresentadas, na Tabela 2 [18].

Tabela 2 – Alterações cromossómicas comuns em gliomas (adaptada de [18]).

Região cromossómica	Tipo de alteração	Genes candidatos
1p34.2-pter	Ganho e Perda	Não conhecido
1p32	Ganho	<i>RIPKS</i> , <i>MDM4</i> , <i>PIK3C2B</i> e outros
4q	Perda	<i>NEK1</i> , <i>NIMA</i>
7q11.2-p12	Ganho/amplificação	<i>EGFR</i>
9p21-p24	Perda	<i>CDKN2</i>
10q23	Perda	<i>PTEN</i>
10q25-q26	Perda	<i>MGMT</i>
11p	Perda	<i>CDKN1C</i> e <i>RRAS2</i>
12q13.3-q15	Ganho	<i>MDM2</i> , <i>CDK4</i> e outros
13q11-p13 e 13q14-q34	Perda	<i>RB1</i>
19q13	Perda	<i>GLTSCR1</i> , <i>GLTSCR2</i> , <i>LIG1</i> , <i>PSCD2</i> e outros
22q11.21-q12.2	Perda	28 genes, incluindo <i>INI1</i>
22q13.1-q13.3	Perda	Não conhecidos

Vários estudos têm mostrado que o número médio de alterações por tumor é mais elevado em gliomas de grau III e IV em comparação com gliomas de grau II [59].

Entre as alterações genéticas mais promissoras, foram identificadas deleções combinadas no braço curto do cromossoma 1 (1p) e no braço longo do cromossoma 19 (19q), em oligodendrogliomas e em gliomas mistos [60, 61]. No entanto, vários estudos mostraram que a perda alélica ocorre, mais frequentemente, em oligodendrogliomas (85%) do que em oligoastrocitomas (50%) e que afecta de igual modo oligodendrogliomas de grau II e de grau III, sugerindo que esta alteração tem um papel inicial na tumorigénese e que pode ser útil como marcador de diagnóstico [62]. Esta codelecção verificou-se também, ocasionalmente, em outros subtipos de gliomas, tanto individualmente como em combinação [63], no entanto, raramente, foi verificada em outros modelos tumorais humanos [64].

A presença desta alteração tem fornecido novos conhecimentos acerca da sobrevida e resposta à terapia deste tipo de tumores. Assim, investigadores mostraram que a codelecção 1p/19q, além de estar fortemente associada com a morfologia clássica de oligodendrogliomas, conduz ao aumento da sobrevida dos doentes e a uma resposta aumentada ao tratamento, nomeadamente, por agentes alquilantes e por radiação, tanto

em combinação, como individualmente [65, 66]. Em contrapartida, em doentes com tumores oligodendrogliais que não são sujeitos a tratamento por quimioterapia ou radioterapia, a codelecção 1p/19q, não parece conferir qualquer vantagem. Isto pode dever-se ao facto de que a perda de material genético resultante da codelecção pode envolver a perda de genes implicados na resistência a terapias [67].

No que diz respeito à sobrevida dos indivíduos, verificou-se que a média é de 7 anos para oligodendrogliomas anaplásicos com a codelecção e de 2 a 3 anos para indivíduos sem a codelecção [68]. Ricard e colaboradores mostraram que a razão de crescimento tumoral é, significativamente, mais lenta na presença de codelecção, do que na sua ausência [69].

Embora o mecanismo biológico seja ainda pouco conhecido, Griffin e colaboradores assim como Jenkins e colaboradores (2006), sugeriram que a codelecção 1p/19q é consequência de uma translocação não equilibrada entre os braços dos cromossomas 1 e 19, $t(1;19)(q10;p10)$, formando dois cromossomas derivativos, um composto por 1q e 19p e outro composto por 1p e 19q. Subsequentemente, ocorre perda do cromossoma derivativo $der(1;19)(p10;q10)$, resultando na perda simultânea de 1p e 19q, com retenção do $der(1;19)(q10;p10)$ [70, 71]. Assim, a perda completa de 1p e 19q parece ser uma característica comum dos oligodendrogliomas e um factor de prognóstico mais favorável [72-74]. Estas deleções estão geralmente associadas, o que sugere que os genes situados nestes segmentos cromossómicos podem estar envolvidos em vias biológicas distintas mas que estão ligados de alguma maneira funcional. Para isso, vários estudos têm sido feitos na tentativa de identificar genes envolvidos na translocação [75]. Entre os genes mais estudados, destacam-se: *TP73* (1p36.3) [76], *CAMTA1* (1p36) [77], *DFFB* (1p36) [78], *SHREW1* (1p36.32) [79] *CITED4* (1p34.2) [80] e *DIRAS3* (1p31) [81] no cromossoma 1 p, bem como os genes *p190RhoGAP* (19q13.3) [82] e *EMP3* (19p13.3) [83] no cromossoma 19q. No entanto, vários genes têm sido eliminados como candidatos no desenvolvimento de oligodendrogliomas [84]. A identificação dos genes trará, presumivelmente, novas informações no relacionamento entre a perda 1p e 19q, assim como na associação entre a codelecção e a sensibilidade terapêutica [51].

A codelecção 1p/19q parece inversamente associada com a presença de mutação *TP53* [85], com a amplificação *EGFR* [86] e com a perda cromossómica de 10q e 9p [87]. Porém, verificou-se que a hipermetilação da região promotora do gene *MGMT* foi,

significativamente, mais elevada em tumores com a codelecção, quando comparados com tumores sem alteração em 1p e 19q [88].

O facto da codelecção 1p/19q em gliomas ser bastante indicativa da morfologia de tumores oligodendrogliais, torna esta alteração, um marcador muito interessante para o diagnóstico clínico [89]. Assim, poderá ajudar a confirmar o diagnóstico histológico deste tipo de gliomas [90].

1.2.2.5.2 Alterações genéticas – Análise de mutações nos genes IDH1 e IDH2

Investigadores descreveram, recentemente, que os genes isocitrato desidrogenase 1 e 2, *IDH1* e *IDH2* parecem estar envolvidos em processos metabólicos importantes, assumindo papéis relevantes na biologia do cancro [91]. Torna-se, por isso, crucial aprofundar o conhecimento acerca da importância das mutações que afectam estes genes, a nível biológico e funcional, em doentes com tumores gliais.

Das cinco proteínas IDH codificadas no genoma humano (*IDH1* (cujo gene é localizado no 2q33.3), *IDH2* (15q26.1), *IDH3A* (15q25.1-q25.2), *IDH3B* (20p13) e *IDH3G* (Xq28), a *IDH1* é dependente de NADP^+ e pode ser encontrada no citoplasma, nos peroxissomas e no retículo endoplasmático [92]. Esta proteína forma um homodímero assimétrico [93] e tem um papel chave no controlo celular de danos oxidativos. Representa, por isso, a maior fonte de produção de NADPH citosólico, o qual é necessário para a regeneração de glutathione reduzida, que funciona como principal antioxidante em células de mamífero [94]. A proteína *IDH2* é também dependente de NADP^+ e está localizada na mitocôndria, tendo uma função análoga a *IDH1* [95]. Os outros três membros da família IDH estão, exclusivamente, localizados na mitocôndria e a sua actividade enzimática depende de NAD^+ , desempenhando funções no ciclo de Krebs, como a produção de energia. Estas proteínas, porém, não têm sido associadas com o desenvolvimento de gliomas [96].

A isocitrato desidrogenase 1 (*IDH1*) cataliza a descarboxilação oxidativa de isocitrato a α -cetoglutarato (α -KG), resultando na produção de NADPH reduzido (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) a partir de NADP^+ (Ciclo de Krebs) [92]. Assim, α -KG, no citoplasma, actua na degradação, dependente de oxigénio, da subunidade α do factor indutor de hipóxia (*HIF-1 α*) (Figura 4) [97].

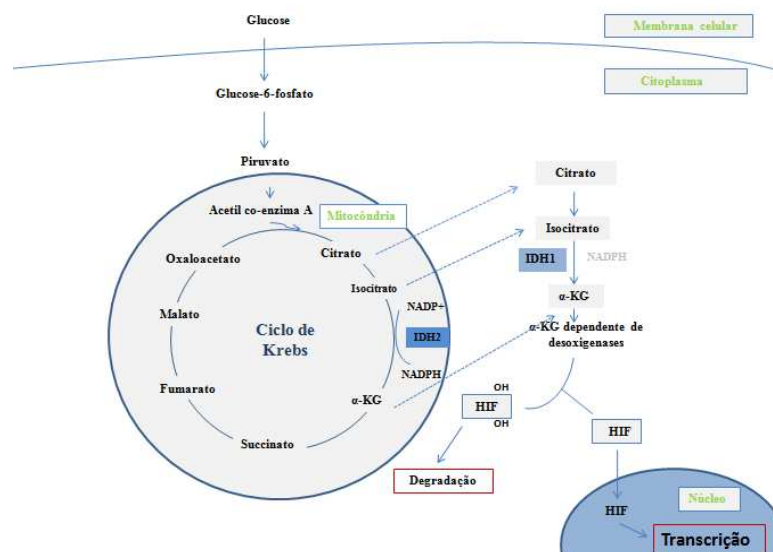


Figura 4 - Via de sinalização envolvida na patogênese de gliomas, envolvendo *IDH1* e *IDH2*. (α -cetoglutarato; HIF-1, factor indutor de hipóxia-1; NADP, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida) (adaptada de [5]).

Verifica-se, no entanto, que a presença de uma mutação no gene *IDH1* inibe a formação do homodímero WT-WT (*Wild-Type*–*Wild-Type*) e conduz à formação do heterodímero WT-R132H (*Wild-Type*-Arg132His, por exemplo) que reduz a actividade enzimática e, como consequência, os níveis citoplasmáticos de α -KG são diminuídos [98]. Esta diminuição conduz ao aumento dos níveis do factor de transcrição HIF-1 existente no citoplasma e o heterodímero, constituído por HIF-1 α e HIF-1 β , é transportado para o núcleo para exercer a sua função [97]. Este é um importante factor para a adaptação celular a baixos níveis de oxigénio e induz a expressão de genes envolvidos no metabolismo da glucose, angiogénese, motilidade celular e invasão, assim como, genes envolvidos em vias de sinalização, que são críticos para o crescimento tumoral, tais como: transportador de glucose 1 (*Glut1*), factor de crescimento vascular endotelial (*VEGF*) e cinase fosfoglicerato (*PGK1*) [98].

Contudo, apenas uma cópia do gene é mutado, deixando a possibilidade de que mutações não resultem numa simples perda de função. Um estudo recente mostrou que, além de *IDH1* mutado ter uma menor capacidade para catalizar a descarboxilação oxidativa, de isocitrato a α -KG, apresenta também, um ganho de função na capacidade de converter α -KG e NADPH em R(-)-2HG (2-hidroxiglutarico desidrogenase) e NADP⁺, respectivamente. Foi também demonstrado que os níveis de R(-)-2HG estão elevados em amostras de gliomas, tornando as células mais vulneráveis à quimioterapia e à radiação (Figura 5) [6, 99].

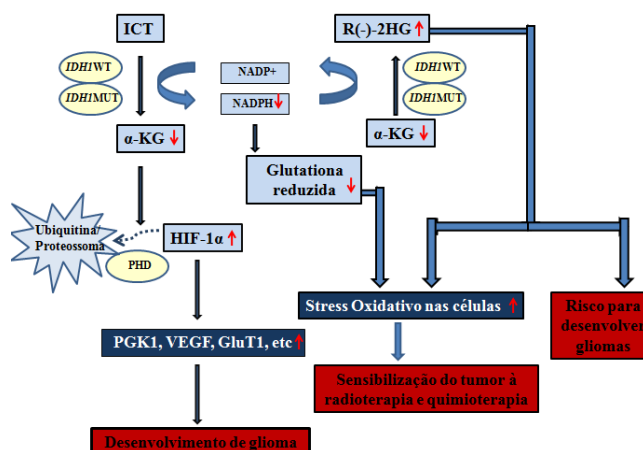


Figura 5 – Ganho e perda da função de *IDH1* mutante. *IDH1* mutante forma um dímero activo imperfeito com *IDH1* wild-type, que resulta na diminuição dos níveis de α -KG e no aumento dos níveis de HIF-1 α . Contudo, esta mutação confere uma nova função à enzima para converter α -KG em R(-)-2HG, sensibilizando as células para quimioterapia e radiação. (ICT, isocitrato; α -KG, α -cetoglutarato; HIF-1 α , factor indutor de hipóxia; R(-)-2HG, 2-hidroxi-glutarato desidrogenase; NADP⁺, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida; PHD, fosforilação) (adaptada de [6]).

Sabe-se que o R(-)-2HG causa alterações no metabolismo, pela deficiência da enzima R(-)-2HG desidrogenase [100]. Os doentes com deficiência nesta enzima acumulam R(-)-2HG no cérebro, desenvolvendo leucoencefalopatas e têm um risco aumentado de desenvolver tumores cerebrais, pelo aumento das espécies reactivas de oxigénio (ROS) [101]. Também a produção de NADPH em gliomas é afectada por mutações *IDH*. Verificou-se que a capacidade de produção de NADPH, pela actividade de *IDH1*, foi estimada em 65%. Contudo, a presença de mutação reduziu essa produção para 38% [10]. Esta redução parece conduzir à diminuição da síntese de glutatona, responsável por proteger as células do stress oxidativo. Desta forma, dados biológicos defendem a hipótese que a produção diminuída de NADPH pode tornar as células mais vulneráveis ao tratamento [9]. Tem sido referido, em vários estudos, que as mutações em *IDH1* são um factor de prognóstico mais favorável em gliomas [11, 102]

As mutações *IDH1* e *IDH2* são específicas do tumor e foram, inicialmente, identificadas por Parsons e colaboradores através da análise de 20 661 genes codificantes de proteínas em glioblastomas [103]. Estudos subsequentes demonstraram que mutações no gene *IDH1* são muito frequentes (>80%) em gliomas de baixo grau e em glioblastomas secundários [8, 9, 104]. Pelo contrário, mutações neste gene parecem ser raras (<5%) em astrocitomas pilocíticos e glioblastomas primários e ausentes em ependimomas e noutros tumores do CNS, bem como noutros tumores fora do SNC

(Figura 6) [7, 8]. Por outro lado, as mutações identificadas para o gene *IDH2* são raras, no entanto, verificaram-se em astrocitomas e em oligodendrogliomas [7-9, 105].

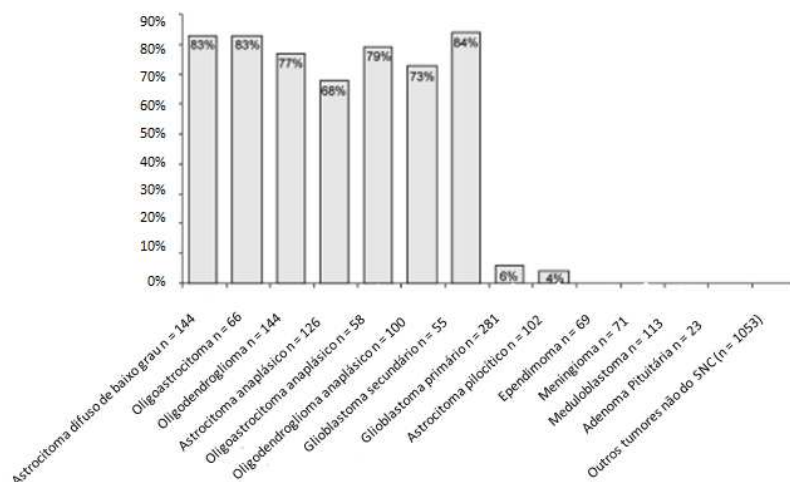


Figura 6 – Mutações no gene *IDH1* são alterações genéticas frequentes em astrocitomas e oligodendrogliomas, no entanto, muito raras em outros tumores do SNC, e virtualmente ausentes em tumores fora do sistema nervoso (adaptada de [7-10]).

Perante estas frequências, mutações *IDH* parecem ser um marcador selectivo de glioblastomas secundários que complementam critérios histológicos para os distinguir dos glioblastomas primários [106]. Os poucos glioblastomas primários identificados com mutação têm, também, sido associados com um melhor prognóstico [107]. A baixa incidência de mutações *IDH* em astrocitomas pilocíticos de grau I pode também ser importante para distinguir estes tumores dos outros subtipos, nomeadamente de astrocitomas de grau II [108]. Estes dois subtipos de tumor, por terem características morfológicas semelhantes são difíceis de distinguir histologicamente [51].

Até agora, as mutações identificadas no gene *IDH1* foram todas mutações *missense*, em heterozigotia [9]. A mutação que parece ocorrer mais frequentemente é a R132H (substituição da arginina por histidina), tendo sido observada em 83-91% de todas as mutações encontradas. Porém, outras foram identificadas neste gene, nomeadamente: R132C, (substituição da arginina por cisteína: 3,6-4,6%), R132G (substituição da arginina por glicina: 0,6-3%), R132S (substituição da arginina por serina: 0,8-2,5%) e R132L (substituição da arginina por leucina: 0,5-4,3%) [7-9]. A substituição de arginina para valina também já foi observada (R132V) [91, 98].

Quando não se identificaram mutações no resíduo R132 do exão 4, do gene *IDH1*, verificaram-se, por vezes, mutações no resíduo R172 do exão 4, do gene *IDH2* que possui uma função análoga à do gene *IDH1*. Até ao momento, para o gene *IDH2* foram

identificadas as mutações, R172G (substituição de arginina por glicina), R172M (substituição da arginina por metionina) e R172K (substituição da arginina por lisina) [9].

Verificou-se que a aquisição de mutação *IDH1/IDH2* ocorre anteriormente à aquisição de mutações *TP53* ou à codelecção 1p/19q, sugerindo que estas mutações são alterações genéticas iniciais na evolução dos gliomas, que podem afectar uma população de células precursoras comuns. Tanto os astrocitomas como os oligodendrogliomas contêm, frequentemente, mutações somáticas no *IDH1* ou *IDH2*, mas não partilham de outras alterações genéticas que ocorrem no desenvolvimento destas duas linhas tumorais [8] (Figura 7).

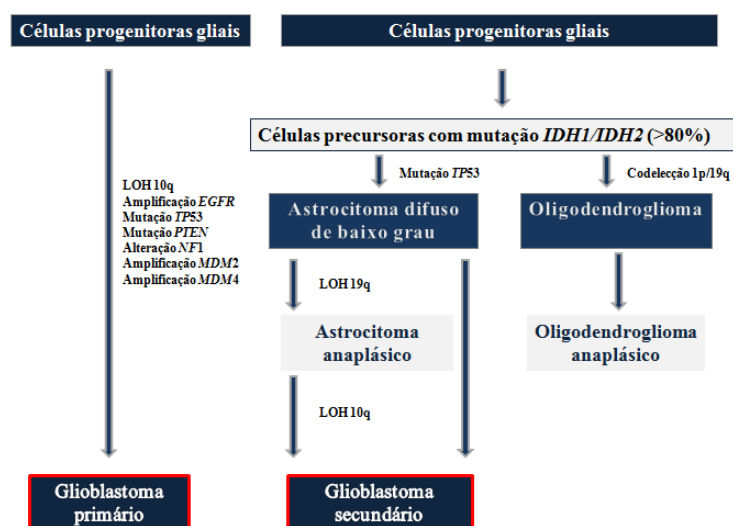


Figura 7 – Alterações genéticas que ocorrem no desenvolvimento dos vários tipos de gliomas (adaptada de [5, 11]).

Segundo o estudo realizado por Nobusawa e colaboradores, componentes oligodendrogliais foram significativamente mais frequentes em glioblastomas com mutação *IDH1*. Por sua vez, a necrose e a isquémia são marcadores histológicos de tumores sem a mutação [11]. Os glioblastomas primários, raramente, apresentam mutações *IDH1*, sugerindo que glioblastomas primários e secundários podem originar-se a partir de células progenitoras diferentes, sendo, todavia, histologicamente indistinguíveis, como referido anteriormente [6]. Verificou-se também que, doentes com mutação *IDH1* são, geralmente, mais novos do que doentes sem a mutação [10].

As mutações no gene *IDH1* parecem também ser muito frequentes em tumores cujo gene *MGMT* se encontra metilado. É bem conhecido que a inactivação de *MGMT* facilita a mutação de transição de G para A, afectando genes críticos, tais como o *TP53*

e *K-ras* [13, 15]. Portanto, a metilação *MGMT* pode explicar a razão elevada da transição R132H, no codão 132, do gene *IDH1*.

Também, pelo facto das mutações já descritas estarem localizadas em codões específicos, torna a avaliação deste marcador exequível num laboratório de rotina, podendo ser útil no diagnóstico e prognóstico de gliomas [11].

1.2.2.5.3 Alterações epigenéticas – Análise da hipermetilação da região promotora do gene *MGMT*

Alterações epigenéticas têm sido descritas em várias doenças neurológicas, cardiovasculares, metabólicas, auto-imunes, e em particular, no cancro, onde a metilação do DNA e a modificação das histonas parecem ter um papel preponderante [109]. (Figura 8).

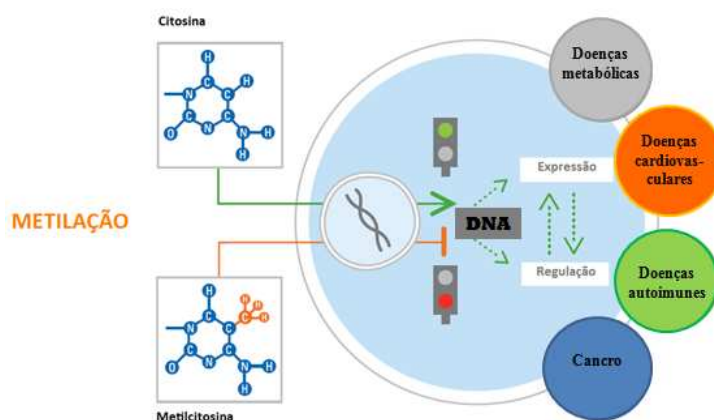


Figura 8 – A metilação de DNA inibe a expressão de genes e tem sido associada a muitas doenças, incluindo o cancro (adaptada de [12]).

As alterações nos padrões de metilação de DNA têm sido reconhecidas como eventos comuns na génese e progressão de neoplasias, a sua detecção torna-se, por isso, essencial para aumentar o conhecimento da biologia do cancro, de forma, a melhorar o prognóstico e/ou terapêutica de tumores [110].

A metilação das regiões CpG (citocinas-fosfo-guaninas) é o evento epigenético melhor caracterizado. Estas regiões são caracterizadas por uma elevada percentagem de citosinas e guaninas e, normalmente, estão localizadas nas regiões promotoras dos genes, onde em células normais estão tipicamente não metiladas, permitindo a transcrição dos genes. As regiões CpG que se encontram fora das regiões promotoras são, comumente, metiladas e são responsáveis pelo silenciamento transcripcional, por exemplo, das sequências repetitivas [12]. A metilação consiste, sinteticamente, na

transferência do grupo metil, sobretudo para a posição C-5 das citocinas, sendo um processo catalizado pelas enzimas DNA metiltransferases I, IIIA e IIIB [111].

Em células cancerígenas, a metilação nas ilhas CpG, localizadas próximo ou na região promotora de genes envolvidos no ciclo celular ($p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$), na invasão e apoptose (*DAPK*, *TIMP3*, *CDH1*, *PCDH-gamma-A11*, *TMS1/ASC*), na supressão tumoral (*RB1*, *VHL*, *EMP3*, *RASSF1A*, *BLU*) ou na reparação do DNA e integridade genómica (*MGMT*, *MLH1*), tem sido frequentemente associada com o silenciamento transcripcional em vários modelos tumorais [13, 112-114] (Figura 9).

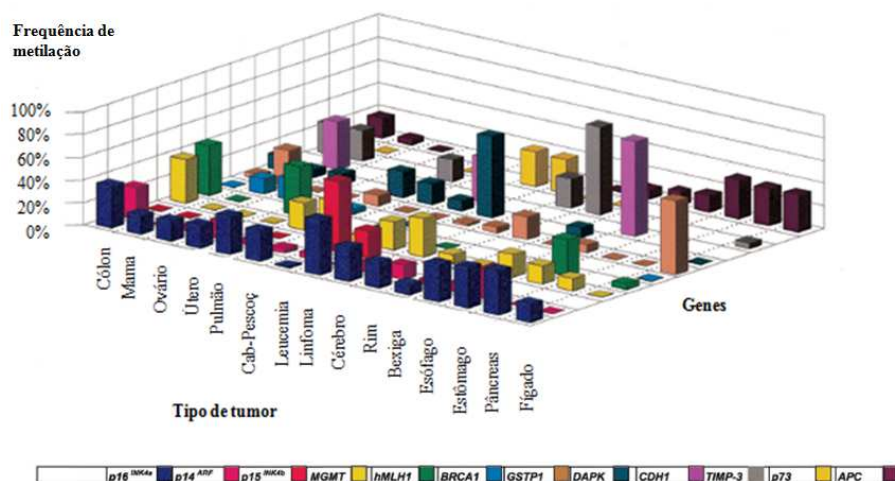


Figura 9 – Esquema representativo da frequência da hipermetilação de diferentes genes em diferentes tipos tumorais (adaptada de [13]).

Um estudo realizado, por Yu e colaboradores (2004), mostrou que genes como *CDH1*, *CSPG2*, *Cyclin a1*, *IRF7*, *MGMT*, $p16^{INK4a}$, *p73* e *RASSF1A*, encontram-se metilados em doentes com gliomas, nomeadamente, com astrocitomas, ao contrário do que acontece em indivíduos controlo, em que estes genes não estão metilados [110].

A O6-alquilguanina-DNA-alquiltransferase (AGT) é uma importante proteína de reparação do DNA codificada pelo gene *O6-metilguanina-DNA-metiltransferase* (*MGMT*) (10q26.3) [115]. Esta proteína, também conhecida como *MGMT*, é responsável por reverter, rapidamente, o estado de alquilação através da remoção dos grupos alquilo da posição O6 da guanina e, em menor grau, da posição O4 da timina, transferindo-os para uma cisteína (Figura 10) [116, 117].

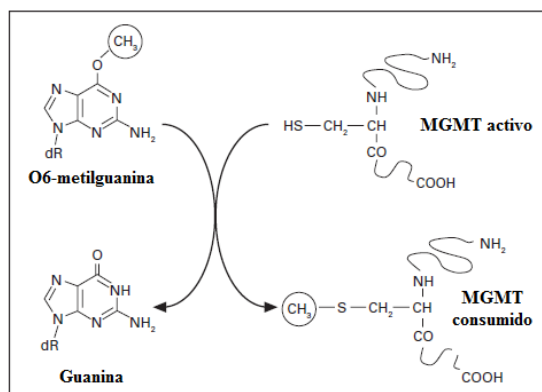


Figura 10 – Processo de reparação do DNA mediado pela MGMT. Esta enzima transfere o grupo metil (adicionado por agentes quimioterapêuticos) a partir do aducto de O6-metilguanina para o resíduo de cisteína, tornando-se inactiva (adaptada de [14]).

Depois de reparar, a proteína MGMT alquilada é libertada e direccionada para a degradação por ubiquitinação [118]. Por cada lesão reparada, uma molécula de MGMT é inactivada, requerendo uma nova síntese proteica para manter a actividade enzimática [119]. A capacidade de reparação das células depende da quantidade de moléculas MGMT no núcleo e da capacidade celular de resintetizar esta proteína. Este processo é saturável, uma vez que o excesso de O⁶- metilguanina no DNA pode esgotar MGMT [120].

A reparação destas lesões de DNA é assim essencial para a integridade celular e a ausência de expressão do gene *MGMT* é, por isso, um factor de baixo prognóstico para diversos tumores, uma vez que conduz à acumulação de mutações e à instabilidade cromossómica [121]. A falha de reparação de aductos de DNA, por esta enzima, aumenta assim o potencial mutagénico durante a replicação, devido à tendência da O6-metilguanina para emparelhar com a timina, resultando na transição G-C para A-T no DNA [122]. Além disso, os aductos mostram potencial citotóxico por causarem quebras na dupla cadeia de DNA [123].

Porém, a expressão de MGMT tem sido relacionada com a resistência aos agentes alquilantes que estão entre os fármacos mais amplamente usados no tratamento do cancro humano. Os agentes alquilantes são moléculas muito reactivas responsáveis por induzir a morte celular, pela formação de ligações cruzadas entre cadeias de DNA adjacentes, sendo a posição mais frequente a O6-guanina. [124].

A investigação realizada por Esteller e colaboradores mostrou que, em gliomas, a hipermetilação da região promotora do gene *MGMT*, cuja proteína está envolvida na resistência aos agentes alquilantes, pode ser usada como forma de prever a resposta à

terapia com estes agentes [15]. Os tumores com esta região hipermetilada são descritos como sendo mais sensíveis a agentes alquilantes, tais como a carmustina (BCNU:1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitroso-uréia), procarbazina (N-isopropil-4(2-metilhidrazino)-benzamida-metil), lomustina (CCNU:1-(2-cloroetil)-3-ciclohexil-1-nitroso-uréia) e temozolomida (TMZ), comparados com os tumores sem o gene silenciado (Figura 11) [125]. Pensa-se que este estado hipermetilado da região promotora torna as células gliais tumorais mais sensíveis aos agentes alquilantes porque as lesões celulares podem não ser reparadas, conduzindo à activação de vias apoptóticas [125]. Consequentemente, uma elevada actividade terapêutica dos agentes alquilantes é esperada em células tumorais com baixos níveis de MGMT [126] (Figura 13).

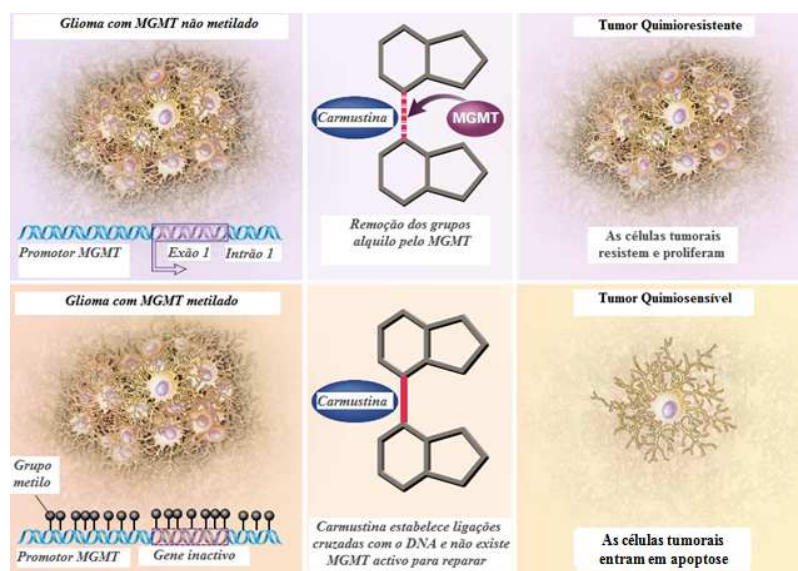


Figura 11 – Mecanismo de quimiosensibilidade aumentada, resultante da inativação epigenética do gene *MGMT*. Gliomas com a região promotora do gene *MGMT* ou com a região do exão 1 não hipermetilada, expressam a proteína MGMT, que remove os aductos de guanina do DNA, produzidos pela administração de carmustina, resultando na resistência do tumor a este agente quimioterapêutico. Em contrapartida, gliomas com esta região hipermetilada, apresentam silenciamento transcripcional, levando à perda da expressão da proteína MGMT. Os aductos de DNA produzidos pelo agente alquilante, carmustina, nestes tumores, não são eficientemente removidos, levando à morte celular (adaptada de [15]).

Assim, esta alteração está associada a uma melhor resposta ao tratamento e, consequentemente, a um aumento da sobrevida, sobretudo em doentes com glioblastomas, no entanto, existem dados que referem que também os doentes com oligodendrogliomas têm um melhor prognóstico [15].

É importante notar, no entanto, que, a metilação do *MGMT*, sem o tratamento com agentes alquilantes é, de facto, um factor de pobre prognóstico [127]. Uma razão possível para isto acontecer é o facto dos doentes com silenciamento génico no *MGMT*,

acumularem mais mutações em oncogenes e em genes supressores tumorais como o *p53* e o *K-Ras* [128].

O silenciamento de certos genes pela hipermetilação tem sido um dos objectivos da farmacogenética. Dada a importância do papel do *MGMT* na resistência tumoral aos agentes alquilantes, vários inibidores de *MGMT* têm sido investigados com o objectivo de modular a quimioresistência [129]. O6-benzilguanina (O6-BG) é um potente agente inactivador de *MGMT* que tem sido estudado em combinação com agentes alquilantes [119]. Contudo, O6-BG também diminui os níveis de *MGMT* nas células normais, aumentando a toxicidade à quimioterapia. Desta forma, têm sido realizados estudos de modo a determinar a dose de O6-BG que poderá, efectivamente, suprimir a actividade de *MGMT* em gliomas [130].

Assim, tem-se considerado que o estado da hipermetilação da região promotora do *MGMT* poderá ser um biomarcador epigenético importante para determinar o prognóstico dos doentes e a sua sensibilidade à quimioterapia, fornecendo informação que conduz a decisões de tratamento [125].

1.2.2.6 Factores de prognóstico e tratamento em gliomas

Actualmente, os factores de prognóstico desfavoráveis mais claramente definidos em doentes com gliomas são: idade avançada, parâmetros clínicos agressivos, características histológicas associadas com o aumento da malignidade (grau do tumor), pobre índice performance de Karnofsky (KPS), índice de proliferação elevado e volume do tumor [131]. Normalmente, os melhores prognósticos estão associados a doentes mais jovens, cujos tumores podem ser amplamente removidos e que têm uma boa resposta a seguir à cirurgia [132].

Apesar do grande avanço no conhecimento destes tumores, as opções terapêuticas disponíveis no tratamento de gliomas, (que incluem, em linhas gerais, cirurgia, radioterapia e quimioterapia), ainda não são suficientemente eficazes no controlo da progressão da doença e o prognóstico dos doentes com gliomas continua a ser muito reservado [35].

O tratamento cirúrgico dos gliomas está comprometido pela natureza invasiva destas células tumorais, sendo a infiltração no tecido cerebral adjacente um factor limitante da ressecção cirúrgica. Apesar disso, os doentes são submetidos à ressecção máxima, sempre que possível [133], no entanto, a recorrência do tumor é quase

inevitável, já que a remoção cirúrgica do tumor invariavelmente deixa uma população residual de células [134]. Contudo, os avanços nos métodos cirúrgicos têm melhorado muito tanto a segurança da cirurgia, como o alcance da ressecção [135].

A radioterapia é a terapia mais importante no tratamento de gliomas malignos porque, embora não seja curativa, melhora os sintomas e, geralmente, aumenta a sobrevida dos doentes [136]. Estudos mostraram que a adição de radioterapia no tratamento aumenta a sobrevida dos doentes, de um intervalo de 3 a 4 meses, a um intervalo de 7 a 12 meses. No entanto, têm-se verificado que, após a ressecção cirúrgica e a radioterapia padrão, 90% dos tumores reaparecem na área original [48, 137]. Como resultado, têm sido feitos esforços adicionais para a produção de novos fármacos quimioterapêuticos que em combinação com a radioterapia possam também aumentar a sua eficácia [138].

Também tem sido realçada a importância da quimioterapia no tratamento de gliomas principalmente, através do uso dos agentes alquilantes. Estudos têm mostrado que a quimioterapia adjuvante resulta num significativo aumento da sobrevida [139]. Segundo Stupp e colaboradores, em 2005, também a combinação de radioterapia com a temozolomida adjuvante ou concomitante originou um aumento na sobrevida (de 12,1 meses para 14,6 meses) comparada com a radioterapia sozinha [40].

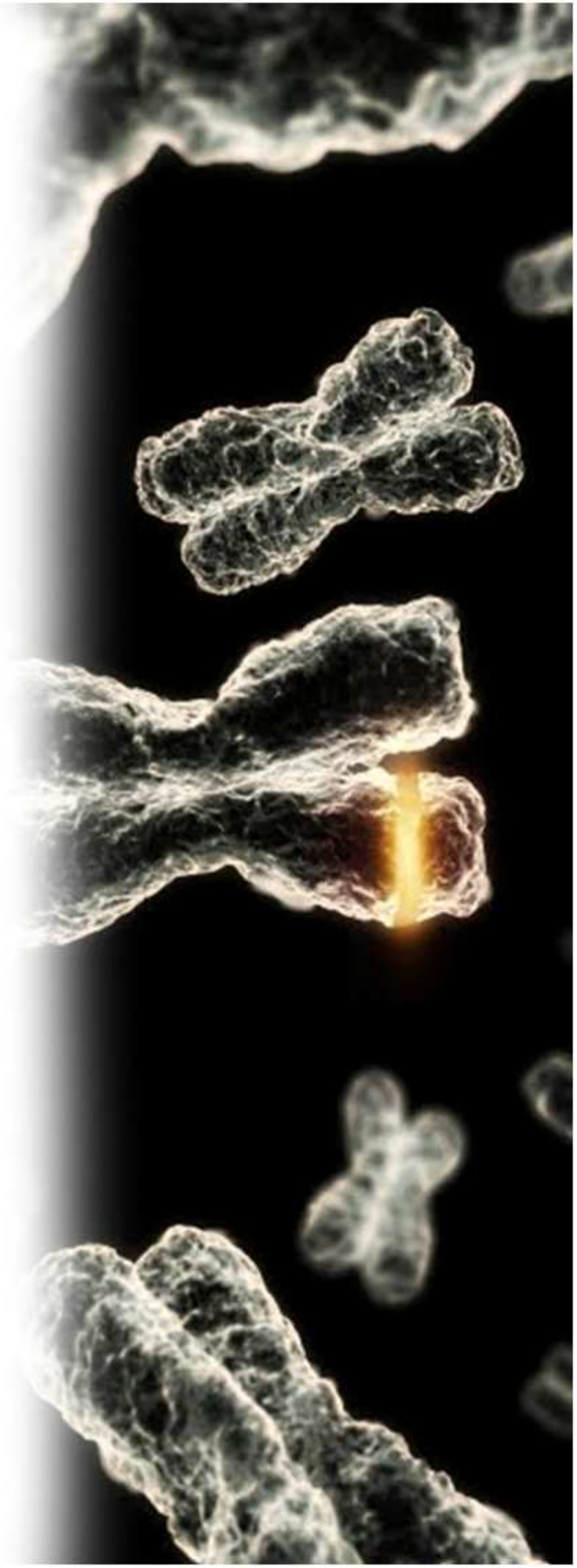
A temozolomida é um agente alquilante citostático, geralmente utilizado no tratamento de gliomas e induz danos no DNA, levando à morte celular [140, 141]. Algumas características da temozolomida que a tornam atractiva para o tratamento de gliomas são: a sua capacidade para atravessar a barreira hematoencefálica, podendo atingir 40% da concentração dos níveis plasmáticos; o facto de estar geralmente associada a uma baixa toxicidade e ser espontaneamente hidrolisada a um metabolito activo *methyltriazeno-imidazole-carboxamide* (MITC). A nível celular, MITC adiciona um grupo metil ao DNA em diversas posições, nomeadamente, na O6-guanina que parece fatal para a célula. No entanto, este grupo metil pode ser removido pela enzima de reparação do DNA, MGMT [142]. De forma geral, a temozolomida demonstrou eficácia clínica, com um perfil aceitável de segurança e moderada melhora na qualidade de vida dos doentes com glioblastomas [143].

Estão ainda a emergir novas estratégias de tratamento na patogénese molecular de gliomas, como é o caso de anticorpos monoclonais e vários inibidores de vias de sinalização [146, 205, 206].

De referir o esforço multidisciplinar contínuo, desenvolvido nas últimas décadas, no sentido de identificar biomarcadores de diagnóstico, de prognóstico e com vista à criação de novas estratégias terapêuticas que sejam mais eficazes na redução da mortalidade e morbilidade observadas nestes doentes. Para que tais avanços ocorram é, fundamental, um acompanhamento do conhecimento, cada vez mais profundo, da biologia e da fisiopatologia dos gliomas.

ttttttttttcatggcccagaaattt
aacttgatatgtgttttattccttatct
tatctacacccattaagcaaggatatc
ttgagaaatgcatatatgtataactc
ttacacacatttagctaaaggcaaat
aataaacttacaaataggcgtccatc
acattttttttcaaacatgctgtttt
tccttttatccttttattcagttatac
gatattgccattttttatgttggtaat
atatggttcaaccagatctgtggttt
actggctgcacaataggatcccctt
gttttttttggtggttttggtttgctt
gatttggttctttgttttagtttcae
ttgagtaccaccctacacaaattaa
aattccatgggggttcaggcattttta
tccccagggtgaatctaattgtgcaaac
aaccaccaaagattgtattaaacatc
atcatgcataaaaagaaaaaactggct
ctatgggttcacacctgtaatcctagc
ggaggccaatttggaagcactgcttc
aggagtttgagactagcctggacgat
tggtgcaaactcgctaattcttgtaa
catagcagaaccctgtctctacaaa
aagtatttcaataattatgtcaattc
atggaagagccagttttgtttattca
aaagtgagttaggcgaagctgagtggc
gcatgtgcctatagtcccagctactt
gctgaggcctgaggatcccttaagcc
gagttcaaggttacagctatgagcte
acaccactgcctacgcaacagagcae
cctgtctcgaaaaagaaaaagaaaa
ctgactcggtagttgaaagcagcctt
aaagcattccttcctgcctggaaaa
ttgcttctttacttctgtaccagtac
tgttgccaaattaagcaaaaaaactc
taaacaaaatcaaagttcagtgttg
tgaggtttcagactttcacagaaagt
atgtcttaaaggaccttaaaaacag
tctctcatgctgaaatccagaggttt
tagccatcattgaaaacagtgtgttc
gtaaacagtttagtccttgaggggtc
actttgttccactctgtggctaaaac
cctttcatcctggccaaagccttcag
gctcccagggggcccaagcaagggaac
gatggcagtggtgcaaactcgctaata
gccatcattgaaaacagtgtgttgaa
gtaaacagtttagtccttgaggggtc
actttgttccactctgtggctaaaac
cctttcatcctggccaaagccttcag
gctcccagggggcccaagcaagggaac
gatggcagtggtgcaaactcgctaata
aagatggcagtggtgcaaactcgcta
gtaagatggcagtggtgcaaactcgct

Objectivos



2. Objectivos

2.1 Objectivo principal

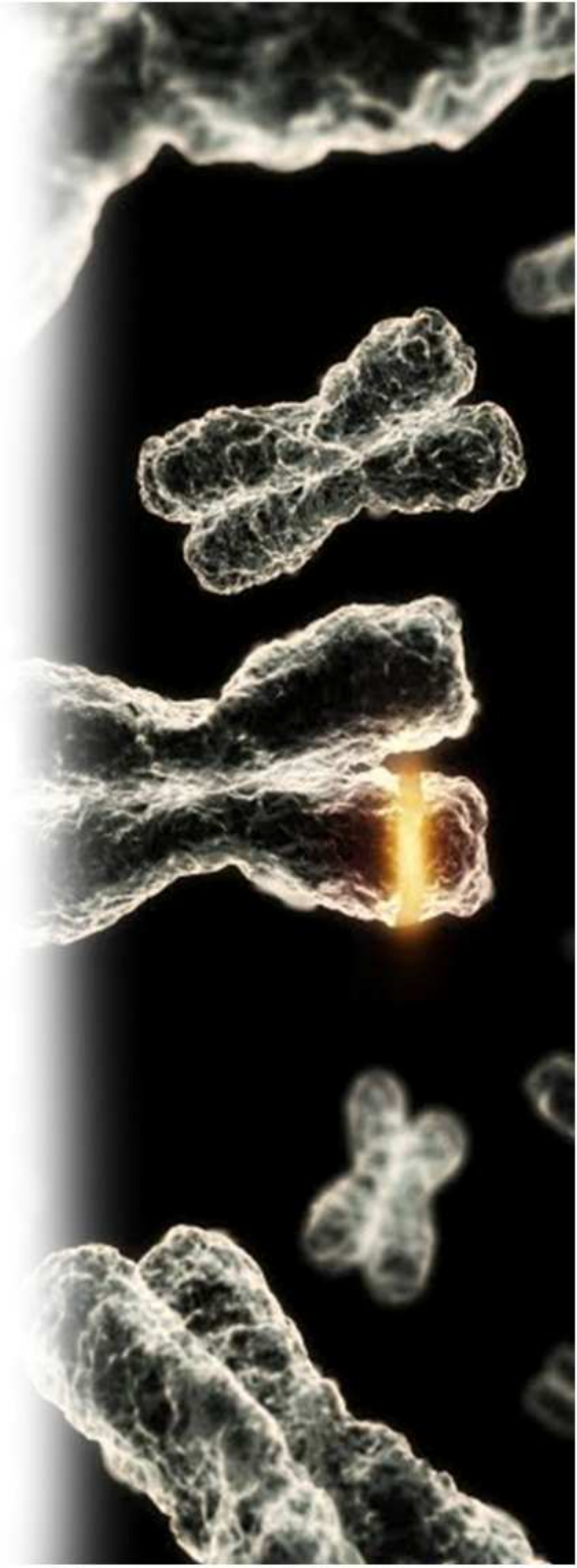
O principal objectivo deste Projecto foi avaliar três marcadores a nível citogenético, genético e epigenético com potencial valor de diagnóstico, de prognóstico e preditivo em doentes com gliomas, seguidos nos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC). A procura e a identificação de marcadores capazes de ajudar os clínicos na sua prática diária, contribuindo para um melhor controlo e seguimento dos doentes, foi a base fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Desta forma, pretendeu-se avaliar os três marcadores mais promissores no diagnóstico, na estratificação terapêutica e no prognóstico, que são: a perda alélica 1p/19q, a presença de mutações nos genes *IDH1* e *IDH2* e o estado de hipermetilação da região promotora do gene *MGMT*.

2.2 Objectivos específicos

- Aplicação da técnica de iFISH, *interfase Fluorescence In Situ Hybridization*, para a análise de duas diferentes regiões cromossómicas em 1p e 19q. Identificação de perfis citogenéticos distintos, na tentativa de os relacionar com subtipos de gliomas específicos, bem como, com o prognóstico e sobrevida dos doentes.
- Detecção e análise de mutações somáticas nos genes, *IDH1* e *IDH2*, por Sequenciação directa, identificando as mutações presentes na população em estudo, a sua prevalência nos diferentes subtipos gliais e as suas consequências no prognóstico e sobrevida dos doentes.
- Análise da hipermetilação da região promotora do gene *MGMT*, que codifica uma enzima de reparação do DNA, pela técnica de MS-MLPA, *Methylation Specific-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, determinando o seu factor de prognóstico e o seu valor preditivo na resposta ao tratamento.

aaagtcattgttggaataatgtgattt
tgttttttttttcatggcccagaaatf
ccaacttgatatgtgttttattcctatc
ggatatctacacccattaagcaaggtaf
aattgagaaatgcatatatgtataaci
atftacacacatttagctaaaggcaa
caaataaacttacaaataggcgtccaf
acacattttttttcaaacatgctgttf
tttccttttatccttttattcagttata
atgatattgccatttttatgttggtat
tcatatgggttcaaccagatctgtggtf
acactggctgcacaataggatcccctf
aagtttttttgggtgggtttgttttgcf
ttgatttggttctttgttttagtttca
gcttgagtaccacccctacacaaattat
tgaattccatgggggttcaggcattttat
gctccccagggtgaatctaattgtgcaa
agaaccaccaagattgtattaaacaf
ccatcatgcataaaagaaaaaactggc
tactatgggttcacacctgtaatccta
ttggaggccaatttggaagcactgctf
ccaggagtttgagactagcctggacga
agtgggtgcaaactcgctaattctgtat
aacatagcagaaccctgtctctacaaf
aaaagtatttcaataattatgtcaatf
tcatggaagagccagttttgtttattc
acaaagtgagttaggcgaagctgagtgc
ggcatgtgcctatatgtcccagctacf
aggctgaggcctgaggatcccttaagc
aggagttcaagggttacagctatgagcf
tcacaccactgcctacgcaacagagca
accctgtctcgaaaaagaaaaagaaa
aactgactcggtagttgaaagcagccf
ctaaagcattccttcctgcctggaaa
tattgcttctttacttctgtaccagta
cttggttgccaaattaagcaaaaaacf
agtaaacaaaatcaaagttcagtggtf
actgaggtttcagactttcacagaaa
ttatgtcttaaaaggaccttaaaaac
aatctctcatgctgaaatccagaggtf
ttagccatcattgaaaacagtgtgtf
gggtaaacagttttagtccttgagggg
taactttgttccactctgtggctaaf
atcctttcatcctggccaaagccttca
tagctcccagggggcccaagcaaggga
tagatggcagtggtgcaaactcgctaf
gtgccatcattgaaaacagtgtgttg
gggtaaacagttttagtccttgagggg
taactttgttccactctgtggctaaf
atcctttcatcctggccaaagccttca
tagctcccagggggcccaagcaaggga
tagatggcagtggtgcaaactcgctaf
gtaagatggcagtggtgcaaactcgcf

Material e métodos



3. Material e Métodos

3.1 POPULAÇÃO EM ESTUDO

No presente estudo, foram analisadas amostras de tecido tumoral glial, provenientes de um total de 141 doentes sujeitos a cirurgia, no Serviço de Neurocirurgia, dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC), no período entre Junho de 2005 e Junho de 2010. Os doentes operados desde Junho de 2005 a Setembro de 2009 foram estudados com recurso a amostras incluídas em parafina e amostras em suspensão celular, no entanto, os indivíduos sujeitos a cirurgia no período correspondente à duração desta tese de Mestrado (Outubro de 2009 a Junho de 2010), foram estudados com recurso a amostras de tecido tumoral fresco, amostras em suspensão celular e, simultaneamente, foram utilizadas também amostras incluídas em blocos de parafina desses doentes, para determinados objectivos do estudo.

O diagnóstico histológico e a classificação dos tumores, incluídos neste estudo, foram efectuados de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde [17] e a sua distribuição encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição da população em estudo, de acordo com os subtipos histológicos, idade no diagnóstico e razão homens: mulheres.

Classificação (OMS)	Número de amostras	Idade no diagnóstico (anos) Média± desvio padrão	Razão homens/mulheres
Tumores Primários	120	59±15	65:55
Astrocitoma (I-IV)			
• Astrocitoma pilocítico (I)	3	35±15	0:3
• Astrocitoma difuso (II)	6	45±14	2:4
• Astrocitoma Anaplásico (III)	2	29±2	2:0
• Glioblastoma (IV)	78	64±11	43:35
• GBM c/componente oligodendroglial (IV)	3	56±12	2:1
• Gliosarcoma (IV)	4	66±8	2:2
Oligodendroglioma (II-III)			
• Oligodendroglioma (II)	4	34±8	4:0
• Oligodendroglioma anaplásico (III)	11	59±11	8:3
Mistos – Oligoastrocitoma (II-III)			
• Oligoastrocitoma (II)	4	33±14	1:3
• Oligoastrocitoma anaplásico (III)	3	72±8	1:2
Ependimoma (II-III)			
• Ependimoma anaplásico (III)	2	40±35	0:2
Recidivas	21	46±13	11:10
Astrocitoma (I-IV)			
• Astrocitoma difuso (II)	2	38±14	0:2
• Glioblastoma (IV)	11	45±13	5:6
• Gliosarcoma (IV)	1	39	1:0
• GBM c/componente oligodendroglial (IV)	1	49	1:0
Oligodendroglioma (II-III)			
• Oligodendroglioma (II)	1	56±8	0:1
• Oligodendroglioma anaplásico (III)	2	46±10	2:0
Mistos – Oligoastrocitoma (II-III)			
• Oligoastrocitoma anaplásico (III)	1	66	1:0
Ependimoma (II-III)			
• Ependimoma (II)	1	67	1:0
• Ependimoma anaplásico (III)	1	22	0:1
Total Gliomas	141	57±16	76:65

No total, o número de indivíduos estudados do género masculino foi 76 e o número de indivíduos do género feminino foi 65, sendo que a média de idade no diagnóstico foi de 57 ± 16 anos (desde os 15 aos 84 anos) (Tabela 3).

As informações clínico-patológicas, incluindo, idade no momento do diagnóstico, tipo de tratamento e sobrevida foram obtidas a partir da análise dos processos clínicos.

Todas as amostras foram utilizadas com autorização dos diferentes indivíduos mediante o seu consentimento informado.

3.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS

Em cada caso, a colheita efectuou-se no momento da cirurgia. As amostras foram obtidas por procedimentos cirúrgicos convencionais, tendo-se realizado em alguns casos biópsia, noutros, ressecção subtotal ou ressecção total.

Cada amostra recebida do bloco operatório foi analisada no laboratório de Neuropatologia dos HUC através de métodos histológicos convencionais (coloração hematoxilina-eosina), elaborando-se de imediato um diagnóstico preliminar. Todas as características histológicas, nomeadamente o tipo de células, presença ou ausência de proliferação vascular, de necrose ou de atipia nuclear foram recolhidas para cada doente. Posteriormente, foram realizadas técnicas complementares, como a de imunohistoquímica, no hospital, de forma a chegar ao diagnóstico do doente com a elaboração do respectivo relatório.

Todo o tecido tumoral excedente e não utilizado para fins de diagnóstico foi processado e devidamente armazenado para investigação, de acordo com a Figura 12. Todas as amostras utilizadas para investigação foram, previamente, sujeitas a coloração hematoxilina-eosina e apenas as amostras que apresentavam áreas tumorais superiores a 75% foram utilizadas. Tentou-se excluir, o máximo possível, áreas com a presença de células necróticas ou células de tecido cerebral normal.

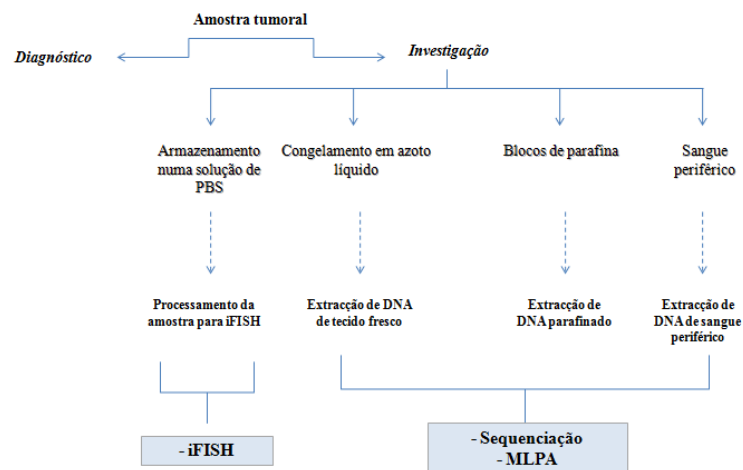


Figura 12 – Esquema ilustrativo do procedimento da amostra com indicação da metodologia adoptada (interfase *Fluorescence in situ hybridization* (iFISH), Sequenciação e *Methylation Specific-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MS-MLPA)).

3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

3.3.1 Tratamento de amostras frescas de tumor sólido para a técnica de iFISH

Após a recolha da amostra para um frasco com PBS 1x, transferiu-se o pedaço de tecido para um copo de vidro autoclavado com 3 ml de tampão citrato, pH7.6, previamente preparado. Desagregou-se o tecido, de forma a libertar o maior número de células. Centrifugou-se a 2300 g, durante 7 minutos, à temperatura ambiente. Desprezou-se o sobrenadante e, ao *pellet*, adicionou-se metanol:ácido acético (3:1), previamente preparado. Por fim, agitou-se manualmente e no vortéx, de forma a desagregar o *pellet* que se formou. Colocou-se a suspensão celular durante 10 minutos, a 4°C e armazenou-se a -20 °C, até à realização da técnica de iFISH.

3.3.2 Extracção de DNA a partir de sangue periférico, de tecido fresco e de tecido em parafina para as técnicas de Sequenciação e MS-MLPA

O DNA extraído de sangue periférico, de tecido fresco, assim como o DNA extraído de parafina dos indivíduos participantes no estudo foram obtidos utilizando o *kit* de extracção, comercialmente disponível, *QIAamp DNA Mini Kit* - #51304 (Qiagen, Hilden, Alemanha). O DNA foi extraído de acordo com as especificações do fornecedor.

O princípio do método envolveu três etapas fundamentais: a lise das membranas celular e nuclear, a degradação das proteínas e a precipitação do DNA.

3.3.2.1 A partir de sangue

1. Transferiu-se a amostra de sangue periférico para um tubo de 13 ml, devidamente identificado e centrifugou-se a 2500 g, durante 10 minutos, à temperatura ambiente.
2. Retirou-se a camada intermédia – *buffy coat* (fracção enriquecida com leucócitos) para um novo *ependorf*, ao qual se adicionou 40 µl de proteinase K. Vortexou-se e centrifugou-se, a 600 g, durante 1 minuto.
3. Adicionaram-se 4 µl de RNase A, seguido de 400 µl de tampão de lise AL. Vortexou-se e repetiu-se a centrifugação anterior. Incubou-se durante 10 minutos, a 56 °C e, em seguida, centrifugou-se nas mesmas condições.
4. Adicionaram-se 400 µl de etanol absoluto e vortexou-se. Transferiu-se esta solução para uma coluna do kit, por centrifugações sucessivas.
5. Adicionaram-se 500 µl do tampão de lavagem AW1. Centrifugou-se a 9300 g, durante 1 minuto. Trocou-se o tubo colector.
6. Adicionaram-se 500 µl do tampão de lavagem AW2. Centrifugou-se a 17000 g, durante 3 minutos e, em seguida, trocou-se o tubo colector.
7. Centrifugou-se a 17000 g, 1 minuto e colocou-se a coluna num novo *ependorf* para a eluição do DNA. Adicionaram-se 50 µl de buffer AE e incubou-se a 5 minutos, à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 9300 g, 2 minutos. Guardou-se o *ependorf* com o DNA, a -20 °C.

3.3.2.2 A partir de tecido fresco e de parafina

A extracção de DNA a partir de tecido fresco e de parafina envolveu um passo inicial de tratamento, específico para cada amostra, como descrito em baixo.

Tratamento inicial da amostra

Tecido fresco

1. Colocou-se a amostra à temperatura ambiente.
2. Com uma lâmina estéril de bisturi e com auxílio de uma pinça esterilizada, cortou-se o tecido em fragmentos pequenos de forma, a que a digestão deste, fosse o mais eficiente possível e transferiu-se para um *ependorff*. O procedimento continuou no ponto 4.

Parafina

1. Adicionou-se 1 ml de xilol a 3 cortes de parafina de 10 μ m, e homogeneizou-se no vórtex. Em seguida, incubou-se 10 minutos, à temperatura ambiente e centrifugou-se, a 14700 g, durante 5 minutos, eliminando-se o sobrenadante sem perturbar o *pellet*. Repetiu-se a lavagem com xilol, de forma a remover o máximo de parafina.
2. Efectuaram-se lavagens sucessivas, ao sedimento de tecido, com 1 ml de etanol a 95% (v/v), a 70% (v/v) e a 50% (v/v). Em cada lavagem incubou-se, 5 minutos, à temperatura ambiente e centrifugou-se a 14700 g, durante 5 minutos, desprezando o sobrenadante.
3. Adicionou-se ao sedimento de tecido 1 ml de água estéril. Incubou-se, 5 minutos, à temperatura ambiente e centrifugou-se a 14700 g, durante 5 minutos. Desprezou-se o sobrenadante. O procedimento continuou no ponto 4.

Passo Comum - Extracção de DNA

4. Adicionaram-se 180 μ l de tampão ATL e 20 μ l de proteinase K. Em seguida, incubou-se, durante a noite, a 56 °C, no banho seco, com agitação.

5. Quando a hidrólise estava completa, adicionaram-se 200 µl de tampão AL, vortexou-se 15 segundos por impulsos e incubou-se a 10 minutos, a 70 °C, no banho seco, com agitação. Centrifugou-se brevemente e adicionaram-se 200 µl de etanol absoluto. Repetiu-se a centrifugação.
6. Transferiu-se o conteúdo do *ependorf* para uma coluna *QIAmp Spin*, e centrifugou-se a 5900 g, 1 minuto, à temperatura ambiente. Posteriormente, transferiu-se a coluna para um novo tubo colector e adicionaram-se 500 µl de tampão AW1 à coluna, efectuando-se, de seguida, uma centrifugação a 9300 g, 1 minuto, à temperatura ambiente.
7. Trocou-se o tubo colector e adicionaram-se 500 µl de tampão AW2 à coluna. Centrifugou-se a 17000 g, 3 minutos, à temperatura ambiente. Trocou-se novamente o tubo colector e repetiu-se a centrifugação, 1 minuto.
8. Transferiu-se a coluna para um tubo de *ependorf* devidamente identificado e colocaram-se 50 µl de tampão AE. Deixou-se 5 minutos, à temperatura ambiente e centrifugou-se a 9300g, 2 minutos. Guardou-se o DNA, a -20 °C.

3.3.3 Quantificação do DNA

Após a extracção de DNA dos vários tipos de amostras, procedeu-se à respectiva quantificação, sendo que a razão das absorvâncias aos 260 nm e 280 nm, assim como a razão das absorvâncias aos 260 nm e 230 nm foram sempre analisadas para permitir avaliar a qualidade do DNA extraído. A quantificação do DNA foi efectuada no aparelho *Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer*, versão 3.5.3, a 260 nm, utilizando o software associado.

3.4 REALIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE iFISH, SEQUENCIAÇÃO E MS-MLPA

3.4.1 Técnica de iFISH para detecção de alterações cromossómicas

A hibridação *in situ* fluorescente em interfase (iFISH) é uma técnica que utiliza sondas fluorescentes para detectar, entre outras modificações, alterações numéricas de sequências específicas de DNA no genoma, permitindo identificar distintos perfis citogenéticos. Assim, esta técnica foi usada neste projecto, para detectar alterações

numéricas em regiões específicas dos braços dos cromossomas 1p e 19q, para isso, usaram-se duas sondas de marcação dupla *locus*-específicas (LSI): LSI 1p36 (espectro laranja)/LSI 1q25 (espectro verde) e LSI 19q13 (espectro laranja)/LSI 19p13 (espectro verde). Este procedimento foi dividido em várias etapas, nomeadamente: tratamento enzimático, fixação celular, desidratação, desnaturação, hibridação do DNA em estudo com as sondas marcadas com fluorescência e revelação. As lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência e as alterações cromossômicas foram identificadas.

3.4.1.1 iFISH

Como descrito em 3.3.1, as células encontravam-se numa suspensão de metanol:ácido acético (3:1), a -20°C.

1. Retirou-se a suspensão do congelador, agitou-se e deixou-se repousar um pouco. Identificaram-se, devidamente, as lâminas revestidas, previamente, com polilisina. Com uma caneta fluorescente apropriada (*Dakocytomation*, Dinamarca), delimitaram-se dois campos em cada lâmina, sendo cada um para aplicação de uma sonda específica.
2. Com a pipeta, colocaram-se $\pm 40 \mu\text{l}$ da suspensão, em cada campo e deixaram-se secar as lâminas, à temperatura ambiente. Em seguida, coraram-se as células com *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI) (Vysis, Inc), durante 2 minutos, à temperatura ambiente.
3. Observaram-se as lâminas ao microscópio de fluorescência com a objectiva de 4x, 10x, 20x e 40x para assegurar a existência de um número suficiente de células.

Tratamento enzimático, fixação celular e desidratação

4. Prepararam-se 99 ml de H₂O com 1 ml HCl, a 37% para um coplin apropriado, adicionando-se, de seguida, 75 μl de pepsina, a 10%. Colocaram-se as lâminas, durante 10 minutos, nesta solução, num banho a 37°C.
5. Em seguida, transferiram-se as lâminas para uma solução de PBS 1x, durante 5 minutos, à temperatura ambiente (repetiu-se este passo). Posteriormente, incubaram-se as lâminas com formaldeído 1% em PBS (92,4 ml PBS a 1x, com 5 ml MgCl₂, 1M, e 2,6 ml Formaldeído, a 37%), durante 10 minutos, à temperatura ambiente.

6. Colocaram-se, novamente, as lâminas numa solução de PBS 1x, durante 5 minutos, à temperatura ambiente (repetiu-se este passo).
7. Em seguida, desidrataram-se as lâminas numa sequência de álcoois: a 70%, 5 minutos, a 90%, 5 minutos e a 100%, também durante 5 minutos. Deixaram-se secar as lâminas no suporte.

Desnaturação e Hibridação

8. Em seguida, aplicaram-se 5 µl de cada sonda em cada campo da lâmina (1p36: diluição 1:15; 19q13 diluição: 1:20) e cobriram-se as lâminas com uma lamela 22x22 mm, em cada campo, selando-se a parte lateral com cola.
9. A hibridação foi efectuada numa câmara de atmosfera húmida e escura (Dako, Glostrup, Dinamarca), a 75°C, durante 6 minutos, seguido de 38°C, durante 16 horas.

Revelação

10. Após se retirar a cola e a lamela, colocaram-se as lâminas, durante 10 minutos, em Formamida 50%/SSC 2x pH 7.0, a 46°C. Em seguida, colocaram-se as mesmas numa solução de SSC 2x pH 7.0, a 46°C, durante 5 minutos.
11. Aplicou-se a solução de DAPI para coloração dos núcleos, durante 2 minutos, à temperatura ambiente. Deixaram-se secar as lâminas no suporte, ao abrigo da luz.
12. Colocaram-se 10 µl de meio de montagem *Vectashield* (Vector Laboratories Inc, Burlingame, Califórnia) e cobriu-se com lamela 24x50 mm. Guardaram-se as lâminas, a 4°C, até à realização das contagens no microscópio de fluorescência.

Observação dos resultados no microscópio de fluorescência

As células foram visualizadas no microscópio de fluorescência equipado com a objectiva de 100x (Zeiss, GÖTTINGEN, Alemanha), tendo sido contadas 200 células em cada campo, correspondente às sondas em estudo, para cada indivíduo. Apenas os pontos de fluorescência com tamanho similar, bem definidos e sem sobreposição de núcleos, foram contabilizados, desprezando-se sempre situações de marcação inespecífica.

Os *cut-offs* usados para definir a presença de alterações cromossômicas foram baseados em amostras de tecido humano normal, como já anteriormente descrito por Sayagues e colaboradores, em 2004 [144]. Assim, ocorreram ganhos sempre que 5% ou mais das células contadas apresentavam um número de sinais fluorescentes superior em relação às células normais diplóides (2n) e perdas foram consideradas quando 10% ou mais das células contadas apresentavam um número de sinais fluorescentes inferior em relação às células normais diplóides (2n) [145].

Sempre que surgiram dúvidas de interpretação, foi repetida a análise por iFISH, aumentando a concentração das sondas.

3.4.2 Técnica de Sequenciação para detecção de mutações

3.4.2.1 Amplificação do DNA

A pesquisa de mutações no exão 4, dos genes *IDH1* e *IDH2*, localizados nos cromossomas 2 e 15, respectivamente, foi realizada pela técnica *Polymerase Chain Reaction* (PCR), seguida da técnica de sequenciação. Para isso, procedeu-se, numa fase inicial, ao desenho de *primers* e à optimização das reacções de amplificação por PCR.

3.4.2.2 Desenho de *primers*

Para amplificação das regiões de interesse, desenharam-se os *primers Forward* e *Reverse* para os dois genes em estudo, recorrendo a dois *softwares*, nomeadamente, o *Primer 3 Plus* (disponível em <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) e o *OligoCalc* (disponível em <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Na Tabela 4, encontram-se as sequências dos *primers* utilizados, bem como o tamanho dos produtos de PCR obtidos.

Tabela 4 – Sequências dos *primers* utilizados para os genes *IDH1* e *IDH2* e o tamanho dos produtos amplificados.

Nome	Forward (5'- 3')	Nome	Reverse (5'- 3')	Tamanho produto (pb)
IDH1-F	ACCAAATGGCACCATACGA	IDH1-R	CATACCTTGCTTAATGGGTGT	252
IDH2-F	CCACTATTATCTCTGTCCTCAC	IDH2-R	TGTGGCCTTGTACTGCAGAG	281

Para alguns casos, em particular para amostras extraídas de parafina, em que o DNA se encontrava muito degradado verificou-se, após várias tentativas, a ausência de qualquer amplificação por PCR, e, por isso, optou-se por desenhar novos *primers*, de forma a tornar o produto amplificado mais curto. Desta forma, obteve-se maior eficiência na amplificação e, conseqüentemente, melhores resultados na sequenciação. As sequências dos *primers*, assim como o tamanho dos produtos de PCR, encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Sequências dos *primers* alternativos para os genes *IDH1* e *IDH2* e tamanho dos produtos amplificados.

Nome	Forward (5'- 3')	Nome	Reverse (5'- 3')	Tamanho produto (pb)
IDH1/2F	ACGGTCTTCAGAGAAGCCA	IDH1/2R	CATGCAAAATCACATTATTGCC	133
IDH2/2F	GTTGAAAGATGGCGGCTGC	IDH2/2R	CCGGTCTGCCACAAAGTCTG	198

3.4.2.3 Preparação da reação de PCR

A mistura de reação de PCR para amplificação dos fragmentos de DNA pretendidos foi preparada para um volume final de 25 µl, de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6 – Reagentes utilizados na reacção de PCR para amplificação das regiões de interesse dos genes *IDH1* e *IDH2*, utilizando os *primers* previamente descritos.

Reagentes	Concentração final	Quantidade utilizada por caso (µl)
H ₂ O estéril	-	13,9
<i>Taq Buffer</i> 5x (Promega)	1x	5
MgCl ₂ 25mM (Promega)	1,5 mM	1,5
dNTPs 5mM (Bioline)	0,2 mM	1
<i>Primers</i> 10µM		
• Forward	0,5 µM	1,25
• Reverse		1,25
<i>Taq DNA polimerase</i> 5U/µl (Promega)	0,5U	0,1

Após a preparação da reacção de PCR de acordo com a Tabela 6, distribuíram-se 24 µl da mistura em cada *ependorf* e adicionou-se 1 µl de DNA genómico (100ng/µl), a fim de perfazer os 25 µl de produto de PCR.

Em todas as reacções de PCR realizadas foi incluído um controlo negativo.

De notar que, para amostras de DNA extraído de blocos de parafina, depois de se verificar uma melhor eficiência na amplificação, procedeu-se, a uma desnaturação prévia do DNA, durante 10 minutos, a 95°C, antes de adicionar o DNA à mistura de reacção.

Imediatamente após a adição do DNA, colocaram-se os tubos de PCR no termociclador *Biometra* para dar início à amplificação.

3.4.2.4 Condições de amplificação para os genes *IDH1* e *IDH2*

As condições de amplificação, utilizando os *primers* descritos na Tabela 4 para os genes *IDH1* e *IDH2*, foram as seguintes:

- Desnaturação inicial, a 95°C, durante 5 minutos, seguida de:
 - 14 ciclos (desnaturação a 95°C, 30 segundos, *annealing* a 60°C, 30 segundos e extensão a 72 °C, 30 segundos);
 - 10 ciclos (desnaturação a 95°C, 30 segundos, *annealing* a 55°C, 30 segundos e extensão a 72 °C, 30 segundos);
 - 10 ciclos (desnaturação a 95 °C, 30 segundos, *annealing* a 50°C, 30 segundos e extensão a 72°C, 30 segundos).
- Extensão final, a 72°C, durante 10 minutos.

As condições de amplificação com os *primers* descritos na Tabela 5 para o gene *IDH1* foram:

- Desnaturação a 96°C, durante 5 minutos, seguida de:
 - 35 ciclos (desnaturação a 96°C, 45 segundos, *annealing* a 60 °C, 45 segundos e extensão a 72°C, 45 segundos).
- Extensão a 72°C, durante 5 minutos.

As condições de amplificação com os *primers* descritos na Tabela 5 para o gene *IDH2* foram:

- Desnaturação a 96°C, durante 5 minutos, seguida de:
 - 35 ciclos (desnaturação a 96°C, durante 45 segundos, *annealing* a 64 °C, durante 45 segundos e extensão a 72°C, durante 45 segundos).
- Extensão a 72°C, durante 5 minutos.

3.4.2.5 Visualização e identificação dos produtos de PCR por electroforese em gel de agarose

Os fragmentos de DNA resultantes da reacção de PCR foram separados num gel de agarose de acordo com o seu tamanho molecular, da voltagem e da concentração de agarose. Pretendeu-se com a electroforese analisar os produtos amplificados, garantindo a inexistência de amplificações inespecíficas e a ausência de contaminações.

A electroforese foi realizada de acordo com o seguinte procedimento:

- 1) Preparou-se o suporte de gel, colocando vários pentes numa superfície plana para, posteriormente, se depositar a solução de agarose. Seguidamente, preparou-se um gel de agarose a 2%. Para tal, colocou-se num balão de *erlenmyer* a agarose em tampão TBE 1x. Esta solução foi aquecida no microondas, até dissolver completamente a agarose e a solução ficar translúcida. Após arrefecer um pouco, adicionou-se BrEt (0,5µg/ml), homogenizando bem a solução.
- 2) Depois do gel polimerizado, colocou-se o suporte com o gel na tina de electroforese, utilizando tampão TBE 1x. Adicionou-se 5µl do produto amplificado por PCR nos vários poços e iniciou-se a electroforese a uma

voltagem de 80 volts, durante 40 minutos. Após electroforese visualizaram-se os produtos de PCR utilizando um transiluminador, *Gel doc_XR da BIORAD*, com o *software* específico acoplado ao sistema.

3.4.2.6 Purificação dos produtos de PCR através do kit *High pure PCR product purification, Roche Applied Science*

Este procedimento foi baseado nas propriedades selectivas de aderência do produto amplificado de DNA a fibras especiais de vidro que as colunas contêm. Com este procedimento pretendeu-se remover sais, dNTPs, *primers* e polimerases não incorporadas durante a reacção de PCR.

1. Adicionaram-se 250 µl da solução de ligação ao produto de PCR amplificado. Colocou-se uma coluna *High Pure Filter* num tubo de 2ml, fornecido pelo kit e transferiu-se todo o volume da mistura anterior para a coluna. Centrifugou-se, à velocidade máxima (18000 g, aproximadamente), durante 60 segundos.
2. Colocou-se novamente a coluna no tubo e adicionaram-se 400 µl da solução de lavagem. Centrifugou-se nas mesmas condições. Colocou-se novamente a coluna no tubo e adicionaram-se 200 µl da mesma solução. Centrifugou-se a 13000 g, durante 1 minuto.
3. Colocou-se a coluna num tubo estéril de 1,5 ml e eluiu-se o DNA adicionando 50 µl com tampão de eluição. Centrifugou-se a 13000 g, durante 1 minuto. Guardaram-se os produtos purificados à temperatura de 4°C.

3.4.2.7 Reacção de Sequenciação directa utilizando o Kit *GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start*

A reacção de sequenciação directa foi realizada segundo o método de Sanger, descrito em 1977 [146].

Durante a reacção de sequenciação, os dNTPs foram incorporados, sequencialmente, na extremidade 3' de uma cadeia de DNA. O alongamento desta foi terminado selectivamente em A, T, C ou G, à medida que os análogos de nucleótidos terminadores de cadeia, sem extremidade 3'-OH, (ddNTPs – marcados com fluoróforos de cor diferente) foram adicionados pela polimerase. Desta foram, produziu-se uma série de moléculas de DNA de tamanho variável, cada uma terminando numa base

diferente, com fluorescência diferente. Cada reacção de sequenciação foi feita num só tubo, utilizando apenas um *primer*, tendo-se realizado a sequenciação bidireccional sempre que se justificou.

1. Após a identificação dos tubos, efectuou-se a mistura de sequenciação para um volume total de 20 µl, de acordo com a Tabela 8.

Tabela 7 – Reagentes utilizados na reacção de sequenciação.

Reagentes	Quantidade utilizada por caso (µl)
H ₂ O ultrapura	0 – 9,5 µl*
Produto de PCR purificado	0,5 – 10 µl*
“Primer” Fwd ou Rev 10mM	1 µl
“DTCS Quick Start Master Mix”	3 µl

***Nota 1:** Consoante a intensidade da banda observada no gel de agarose, assim se definiu o volume a colocar da amostra purificada na reacção de sequenciação.

2. Após a preparação da reacção de sequenciação, colocaram-se os tubos no termociclador, de acordo com o seguinte programa:

$$30 \text{ ciclos} \left\{ \begin{array}{l} 96^{\circ}\text{C, durante 20 segundos,} \\ 50^{\circ}\text{C, durante 20 segundos,} \\ 60^{\circ}\text{C, durante 4 minutos.} \end{array} \right.$$

3. Os produtos resultantes da reacção de sequenciação foram, imediatamente, purificados.

3.4.2.8 Purificação dos produtos de Sequenciação

Este procedimento foi baseado na precipitação das reacções de sequenciação, a fim de remover sais residuais, ddNTPs marcados com fluoróforos que não foram incorporados. Esta eliminação de excedentes foi fundamental pois poderiam interferir com a análise das sequências.

1. Para cada amostra, preparou-se uma solução “Stop” (3 µl de ácido acético, 14,5 µl de água estéril e 62,5 µl de etanol a 95% (a -20°C)) e adicionaram-se 80 µl desta solução a cada reacção.
2. Em seguida, selou-se a placa com parafilme e colocou-se a -20°C, durante 10 minutos. Centrifugou-se à velocidade de 6100 g, durante 30 minutos, a 4°C. Seguidamente, inverteu-se a placa e desprezou-se o sobrenadante em papel absorvente.
3. Adicionaram-se 200 µl de etanol a 70% (a -20°C) e centrifugou-se a 6100 g, durante 10 minutos, a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante. Repetiu-se a lavagem com o etanol a 70% e centrifugou-se a 6100 g, durante 5 minutos.
4. Colocou-se a placa invertida em papel absorvente na centrífuga e centrifugou-se a 100 g, durante 10 segundos. Em seguida, adicionaram-se, em cada poço, 30 µl de *Loading Solution* (SLS) e vortexou-se, suavemente, a placa.
5. Colocou-se uma gota de óleo mineral em cada poço que tinha amostra, para evitar a evaporação durante a corrida no sequenciador e, numa outra placa, apropriada para o efeito, colocou-se um tampão fornecido pelo kit até $\frac{3}{4}$ de cada poço da placa.
6. Colocaram-se ambas as placas no sequenciador de 8 capilares, da *Beckman Coulter* (*CEQ 8000 Genetic Analysis System*, Beckman Coulter, USA). Terminando a corrida, foi realizada uma pré-análise usando o software *CEQ 8000 Genetic Analysis System* fornecido pela *Beckman Coulter*, versão 9.0.

3.4.3 Técnica de MS-MLPA Methylation Specific-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification para avaliar a hipermetilação

Este método permite avaliar o estado de metilação de múltiplos genes, simultaneamente com a detecção combinada do número de cópias [147]. Foi baseado na reacção por PCR e permitiu a detecção semiquantitativa de alterações no DNA, na região promotora de vários genes, numa única reacção [16]. A discriminação entre as sequências metiladas e não metiladas foi efectuada através da hibridação de sondas contendo o local de reconhecimento para a enzima sensível à metilação, *HhaI*

(Promega, Leiden, Holanda) ao DNA. Todas as sondas de MS-MLPA são sequências de cópia única e foram desenhadas e preparadas como descrito por Schouten e colaboradores [148].

Para a técnica de MS-MLPA utilizaram-se três diferentes kits desenvolvidos pela *MRC Holland*, nomeadamente, ME011A1-lote 0609, ME002B1-lote 0809 e ME011B1-lote 1009 (*MRC Holland*, Amesterdão, Holanda) como descrito por Jeuken e colaboradores, em 2007 [147]. No início deste Projecto, foram utilizados os dois primeiros kits, mencionados anteriormente, no entanto, estes dois kits foram descontinuados pela *MRC Holland*. Por isso, o Projecto prosseguiu com a utilização do kit ME011B1-lote 1009, para a maioria das amostras.

Os três kits tinham características particulares que os distinguiam. O primeiro, ME011A1, era constituído por 21 sondas, 3 das quais eram capazes de reconhecer dinucleótidos CpG na região promotora do gene *MGMT* (sonda *MGMT* 1: 2239-L1261, sonda *MGMT* 2: 5670-L5146 e sonda *MGMT* 3: 7188-L7715). As restantes eram específicas para outros genes. Este kit continha ainda 8 sondas de referência que não tinham local de corte da enzima de restrição *HhaI* [149]. Além destas sondas, o kit era constituído também por 7 fragmentos controlo, sendo que os primeiros 4 serviram como controlo da quantidade de DNA na reacção (64-70-76-82 nt) e os outros 3 serviram como fragmentos controlo da desnaturação e da ligação (88-92-96nt).

O segundo kit, ME002B1, era constituído por 27 sondas com local de reconhecimento da enzima *HhaI*, sendo que 2 delas reconheceram dinucleótidos CpG na região promotora do gene *MGMT* (sonda *MGMT* 1: 5670-L5146 e *MGMT* 2: 13716-L15582). Este kit continha ainda 14 sondas de referência e os mesmos fragmentos controlo que o kit anteriormente referido, no entanto, possuía 2 fragmentos adicionais (100 e 105 nt) que forneceram informação relativamente ao género dos indivíduos.

O terceiro kit utilizado, ME011B1, continha 22 sondas com local de reconhecimento da enzima de restrição *HhaI*, sendo que 6 sondas eram específicas para a região promotora do gene *MGMT* (sonda *MGMT* 1: 13716-L15582, *MGMT* 2: 14136-L12791, *MGMT* 3: 5670-L14276, *MGMT* 4: 12250-L14205, *MGMT* 5: 14133-L15736 e *MGMT* 6: 14135-L16573) e 16 sondas de referência. Este kit era constituído também por 9 fragmentos controlo diferentes, tal como o kit anteriormente descrito.

Um resumo das sondas presentes nos três kits utilizados neste trabalho, encontra-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Características dos kits de MS-MLPA utilizados relativamente às sondas específicas para o gene *MGMT*.

Sondas		Produto amplificado (nt)	Kits/lote			Sequência parcial com local de reconhecimento <i>HhaI</i>
			<i>MEO11-A1 0609</i>	<i>MEO02-B1 0809</i>	<i>MEO11-B1 1009</i>	
Fragmentos de controlo	Quantidade de DNA	64;70;76; 82	Presente	Presente	Presente	
	Desnaturalização e ligação	88; 92; 96	Presente	Presente	Presente	
	Cromossomas sexuais	100(X); 105(Y)	Ausente	Presente	Presente	
Sondas específicas para a região promotora do gene <i>MGMT</i>	2239-L1261	373	Presente	Ausente	Ausente	CAGGACCGGGATTCTCACTAAGCGGGCGGCGTC
	5670-L5146	191/193	Presente	Presente	Ausente	GGCGGAAGCTGGGAAGCGGCGCCCCGGCTGTAC
	7188-L5144	319	Presente	Ausente	Ausente	GTCCTCGCGGTGCGGACCGTTTGC GACTTG GTGAGT
	13716-L15582	346	Ausente	Presente	Presente	AGGACCTGAGAAAA GCAAGAGAGCGCGCGGGGGCG
	14136-L12791	391	Ausente	Ausente	Presente	GCCACGTGCCCGAGTGGTCCTGAAA GCGCGCGGGGTCGTAG GACGGCGGCCCGCTT AGTGA
	5670-L14276	202	Ausente	Ausente	Presente	GGCAGAGAGCCTCA GGCGGAAGCTGGGA AGGCGGCGCCCCGG
	12250-L14205	214	Ausente	Ausente	Presente	AGCCTCGAGTGGTC CTGCAGGCGGCCCTC ACTTCGCCGTCGG
	14133-L15736	172	Ausente	Ausente	Presente	CTGGGAGGCACTTG GGCGGACCTGGAG CTCGCCCGGGAT
	14135-L16573	409	Ausente	Ausente	Presente	CTAAGTATGCTAAA GGGTTGCTGCAAGC CAAGGCCCGCGCAG
Sondas de referência para a metilação	Total 8	-	Sim	-	-	
	Total 14	-	-	Sim	-	
	Total 16	-	-	-	Sim	

3.4.3.1 MS-MLPA

O protocolo de MS-MLPA consistiu em 5 passos: 1) Desnaturação do DNA e hibridação das sondas 2) Reacção de ligação e hidrólise 3) Reacção de PCR 4) Separação dos produtos de amplificação por electroforese capilar 5) Análise dos resultados obtidos (Figura 13).

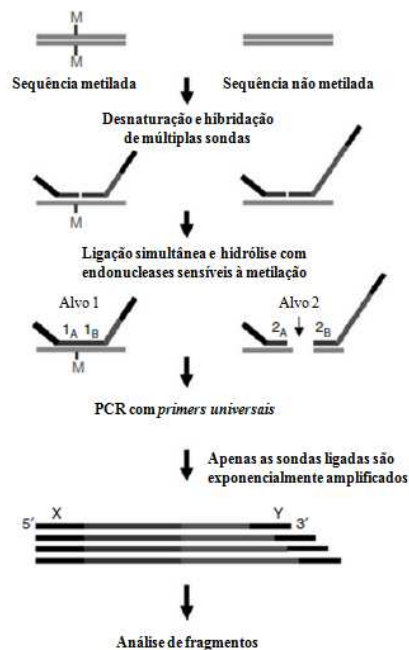


Figura 13 –Esquema ilustrativo do procedimento de MS-MLPA [16]. As sondas específicas para cada gene, que continham um local de reconhecimento para enzima de restrição *HhaI* foram hibridadas com o DNA alvo. Posteriormente, ocorreu ligação e hidrólise com esta enzima, sensível à metilação. As seqüências não digeridas, que eram as seqüências que estavam metiladas, foram amplificadas. Nas regiões CpG que não se encontravam metiladas, o complexo DNA/sonda foi digerido e, consequentemente, não ocorreu amplificação. Para cada amostra de DNA, o MS-MLPA foi realizado com e sem a hidrólise pela enzima *HhaI* (adaptada de [16]).

Desnaturação do DNA e hibridação das sondas

1. Diluiu-se a amostra de DNA com tampão de eluição até uma concentração aproximada de 300 ng/μl. Perfez-se o volume com água até 5 μl. Colocaram-se as amostras no termociclador, durante 10 minutos, a 98°C, para desnaturar o DNA, diminuindo depois a temperatura até 25°C.
2. Preparou-se a mistura de 1,5 μl *SALSA probe mix ME011A1*, *ME011B1* ou *ME002B1* com 1,5 μl de *MLPA buffer* e adicionaram-se 3μl desta mistura a cada tubo.

3. Incubou-se durante 1 minuto, a 95°C, seguido de 16 horas a 60°C, de forma a permitir a hibridação das sondas ao DNA.

Reacção de ligação e hidrólise

1. À temperatura ambiente, adicionou-se a mistura de 3 µl de *Ligase-buffer A* com 10 µl de água a cada amostra e misturou-se. Transferiram-se 10 µl de cada tubo para um segundo tubo e incubaram-se ambos os tubos para cada caso em estudo, a 49°C, pelo menos 1 minuto, no termociclador.
2. Preparou-se a mistura *Ligase-65*, adicionando 1,5 µl de *Ligase-65 buffer B* com 8,25 µl de água e 0,25 µl de *Ligase-65 enzyme* para cada amostra. Em seguida, preparou-se a mistura *Ligase-Digestion*, adicionando 1,5 µl de *Ligase-65 buffer B*, com 7,75 µl de água, 0,25 µl de *Ligase-65 enzyme* e 0,5 µl da enzima de restrição *HhaI* para cada amostra e misturou-se.
3. Enquanto o termociclador mantinha a temperatura de 49°C, adicionaram-se 10 µl da mistura *Ligase-65* ao primeiro tubo e, ao segundo tubo, adicionaram-se 10 µl da mistura *Ligase-Digestion*.
4. Incubaram-se ambos os tubos, durante 30 minutos, a 49°C, seguido de 5 minutos a 98°C.

Reacção de PCR

1. Entretanto, preparou-se a mistura de *PCR buffer*, adicionando 2 µl de *SALSA PCR buffer* e 13 µl de água por cada amostra. Distribuíram-se 15 µl por cada novo tubo e colocaram-se em gelo.
2. Em seguida, retiraram-se os tubos do termociclador e adicionaram-se 5 µl da mistura *MLPA ligation* ou 5 µl da mistura *MLPA ligation-digestion* a cada novo tubo que contém a mistura de 15 µl, anteriormente referida, colocando os tubos novamente em gelo.
3. Preparou-se a mistura *Polymerase*, adicionando 1 µl de *SALSA PCR-primers*, 1 µl de *SALSA Enzyme dilution buffer*, 2,75 µl de água e 0,25 µl de *SALSA Polymerase* para cada amostra, colocando a mistura em gelo. Ainda em gelo, adicionaram-se 5 µl da mistura *Polymerase* aos tubos contendo a mistura anterior. Em seguida, colocaram-se os tubos no termociclador a 72°C.

4. De imediato, iniciou-se a seguinte reacção de PCR:

- 35 ciclos $\left\{ \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C}, 30 \text{ segundos} \\ 60^{\circ}\text{C}, 30 \text{ segundos} \\ 72^{\circ}\text{C}, 60 \text{ segundos} \end{array} \right.$
- 72°C, durante 20 minutos

Separação dos produtos amplificados por electroforese capilar

1. Preparou-se uma mistura, contendo 9,1 µl de Formamida com 0,3 µl de *Gene Scan-500 ROX Size Standard* (*Applied Biosystems*, Warrington, UK) para cada amostra.
2. Transferiram-se 9,4 µl para cada poço da placa e colocou-se 1 µl de cada produto de PCR nos respectivos poços e desnaturou-se a placa durante 3 minutos, a 95°C.
3. Em seguida, colocou-se a placa no Sequenciador automático. Os fragmentos resultantes foram separados e quantificados por electroforese capilar no Sequenciador *3130 Genetic Analyser*, de 4 capilares (*Applied Biosystems – Hitachi High-Technologies Corporation*, Tóquio, Japão). A recolha de resultados foi efectuada através do *software Genemapper*, versão 4.1.

Análise de dados de MS-MLPA

A análise de dados foi efectuada usando o *software MLPA Coffalyser*, versão 9.4, desenvolvido pela *MRC Holland*.

Para compensar a diferença na eficiência do PCR de amostras individuais, a fracção de cada pico foi normalizada pela divisão do valor do pico de cada sonda amplificada, pelo valor combinado de sondas de referência dentro da amostra. Desta forma, a percentagem de metilação foi calculada pela divisão das áreas dos picos normalizados das amostras metiladas (sujeitas à hidrólise pela enzima), pela área dos picos normalizados das amostras não metiladas (não sujeitas à hidrólise pela enzima de restrição).

Para cada kit, foi realizada a média das diferentes sondas que englobam diferentes regiões CpG da região promotora do gene *MGMT*. Os *cut-offs* adoptados foram de 0,00-0,24 ausência de hipermetilação, 0,25-0,49 hipermetilação média, 0,51-0,74, hipermetilação moderada e >0,75 extensa hipermetilação, de acordo com Jeuken e colaboradores, 2007 [147].

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o software *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 15.0.

O teste χ^2 foi usado para testar a associação das variáveis clínicas com as alterações cromossómicas e genéticas, tendo-se utilizado o teste exacto de *Fisher*, em alguns casos, nomeadamente, em tabelas dois por dois.

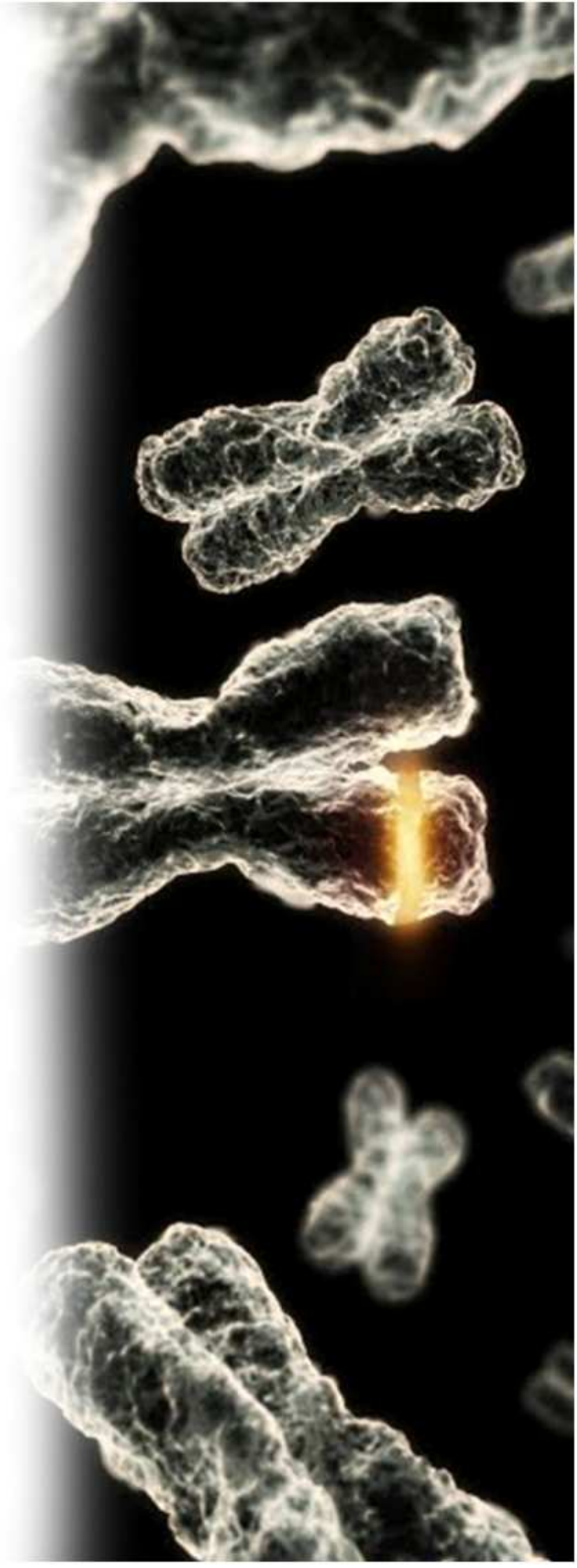
O teste *log-rank* foi usado para testar a sobrevida entre diferentes grupos pelas curvas de *Kaplan-Meier*. A sobrevida foi calculada desde a data de cirurgia até ao último *follow-up* ou morte dos doentes.

O teste *t-Student* foi utilizado para comparar médias em variáveis com distribuição normal e, alternativamente, utilizou-se o teste de *Mann-Whitney*.

Os valores de *p* foram considerados significativos quando inferiores a 0,05.

caagtcacgttggtggaataatgtgattt
gtttttttttttcatggcccagaaatt
ccaacttgatgtgtttttattcttata
ggatctacacccattaagcaaggta
aattgagaaatgcatatatgtataac
atttacacacatttagctaaaggca
caaataaacttacaaataggcgccat
acacatttttttcaaacatgctgttt
tttccttttatccttttattcagttat
atgatattgccattttttatgttggt
ccatatgggttcaaccagatctgtggt
acactggctgcacaataggatcccct
aagtgttttttggtgggtttgttttgc
ttgatttggttctttgttttagtttc
gcttgagtaccaccctacacaaatt
gaattccatgggggttcaggcatttt
gtccccagggtgaatctaattgtgca
agaaccaccaagattgtattaaacat
ccatcatgcataaaagaaaaaactgg
cactatgggtcacacctgtaatccta
ttggaggccaatttggaagcactgct
ccaggagtttgagactagcctggacg
agtgggtgcaaactcgctaattctgt
aacatagcagaaccctgtctctaca
aaaagtatttcaataattatgtcaat
ccatggaagagccagttttgtttatt
ccaaagtgagtaggcgaagctgagt
ggcatgtgcctatagtcccagctact
aggctgaggcctgaggatcccttaag
aggagtccaaggttacagctatgagc
ccacaccactgcctacgcaacagagc
accctgtctcgaaaaagaaaaagaa
aactgactcggtagttgaaagcagcc
ctaaagcattccttcctgacctgga
cattgcttctttacttctgtaccagt
cttggttgccaaattaagcaaaaaac
agtaaacaaaatcaaagttcagtggt
actgagggttcagactttcacagaa
ctatgtcttaaaaggaccttaaaaac
aatctctcatgctgaaatccagaggt
ctagccatcattgaaaacagtgtgt
gggtaaacagtttagtccttgagggt
taactttgttccactctgtggctaaa
atcctttcatcctggccaaagccttc
cagctcccagggggccaagcaaggga
cagatggcagtggtgcaaactcgcta
gtgccatcattgaaaacagtgtgttg
gggtaaacagtttagtccttgagggt
taactttgttccactctgtggctaaa
atcctttcatcctggccaaagccttc
cagctcccagggggccaagcaaggga
cagatggcagtggtgcaaactcgcta
gtaagatggcagtggtgcaaactcgct

Resultados e Discussão



4. Resultados e discussão

Neste estudo, foram analisadas amostras de tecido tumoral glial, provenientes de um total de 141 doentes (Tabela 3). Destas amostras, 130 foram avaliadas quanto à perda alélica de 1p/19q usando a técnica de iFISH (descrita em 3.4.1.1), 128 foram analisadas para a detecção de mutações em dois diferentes genes, *IDH1* e *IDH2*, através da técnica de sequenciação directa (descrita em 3.4.2.7) e 38 foram avaliadas relativamente à hipermetilação da região promotora do gene *MGMT*, pela técnica de MS-MLPA (descrita em 3.4.3.1).

4.1 Avaliação da alteração alélica de 1p/19q

4.1.1 Amostras estudadas

A avaliação da alteração alélica de 1p/19q, realizada neste Projecto, decorreu no âmbito de um outro projecto de investigação intitulado “Caracterização de alterações genéticas em gliomas humanos por *arrays* de polimorfismos de nucleótido único (SNP): correlação com as características clínicas, biológicas e citogenéticas da doença”, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)(Ref. PIC/IC/83108/2007).

Desta forma, através da técnica de iFISH foi possível avaliar um total de 130 amostras, sendo 51 amostras resultantes do presente trabalho e 79 amostras resultantes do trabalho desenvolvido no decurso do Projecto acima referenciado. Assim, foi possível analisar um número significativo de amostras, de forma a tornar o estudo mais completo e informativo.

Relativamente à histologia das amostras tumorais estudadas, de acordo com o sistema de classificação da OMS [17], verificou-se que os astrocitomas foram o tipo de glioma mais frequente (76,9%) e os ependimomas, o menos frequente (3,1%) (Tabela 9). Dos 130 indivíduos estudados, 62 indivíduos eram do género feminino e 68 indivíduos eram do género masculino, sendo a média de idade no diagnóstico de 57±16 anos.

Tabela 9 – Distribuição das amostras tumorais em estudo para análise de iFISH, de acordo com o tipo de glioma.

Tipo histológico	Amostras estudadas				
	Astrocitomas	Oligodendrogliomas	Mistos	Ependimoma	Total
Nº amostras analisadas	100	18	8	4	130

4.1.2 Análise das alterações 1p/19q ao microscópio de fluorescência

Para cada indivíduo, foi avaliada a heterogeneidade citogenética intratumoral, de forma a identificar distintos perfis citogenéticos. Para isso, foi realizada a técnica de iFISH utilizando duas sondas *locus*-específicas (LSI) de marcação fluorescente dupla: LSI 1p36/1q25 para o cromossoma 1 e LSI 19q13/19p13 para o cromossoma 19. Os sinais de hibridação observados com a marcação verde foram utilizados como controlo. Desta forma, foram considerados os cromossomas 1p e 19q sem alteração para a região cromossômica em estudo, quando se observaram dois sinais verdes e dois sinais laranja. A presença de deleção foi registada, sempre que, dois sinais verdes e um sinal laranja se observaram e os ganhos foram considerados na presença de múltiplos sinais laranja, de acordo com Mahajan e colaboradores (2009) [150] (Figura 14).

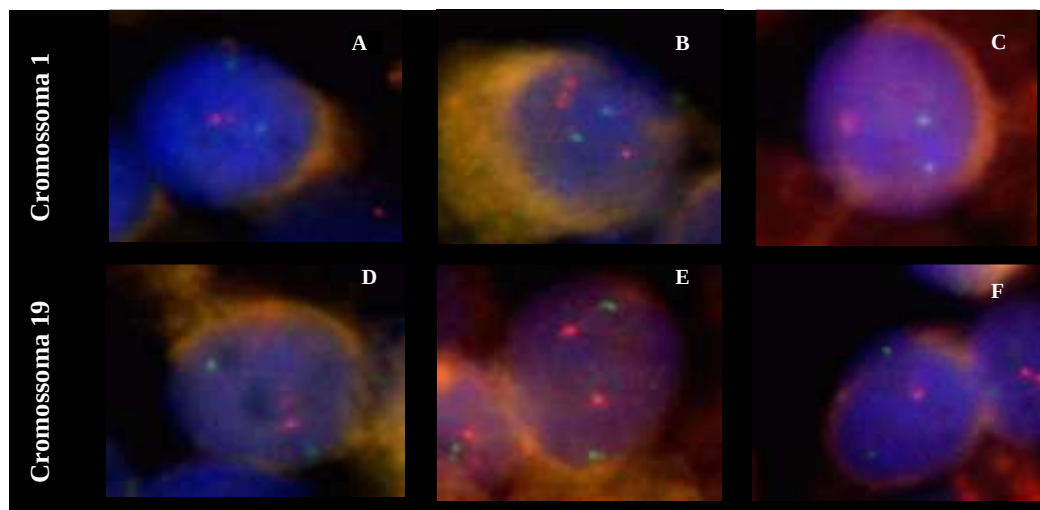


Figura 14 – Imagens visualizadas por microscopia de fluorescência das hibridações obtidas para o cromossoma 1 (A, B, C) e para o cromossoma 19 (D, E, F). As sondas utilizadas hibridaram às regiões cromossômicas 1p36 e 19q13 no espectro laranja, e às regiões 1p25 e 19p13 no espectro verde. As células apresentam sobreposição dos filtros específicos para o espectro verde, laranja e contração com DAPI (ampliação de 1000x).

Como anteriormente referido, os sinais visualizados no espectro verde foram apenas para controlo da hibridação, como tal, para avaliar as alterações detectadas para

as regiões cromossômicas em 1p e 19q contabilizaram-se os sinais observados no espectro laranja, resultantes da hibridação com as sondas fluorescentes 1p36 e 19q13 (Figura 15).

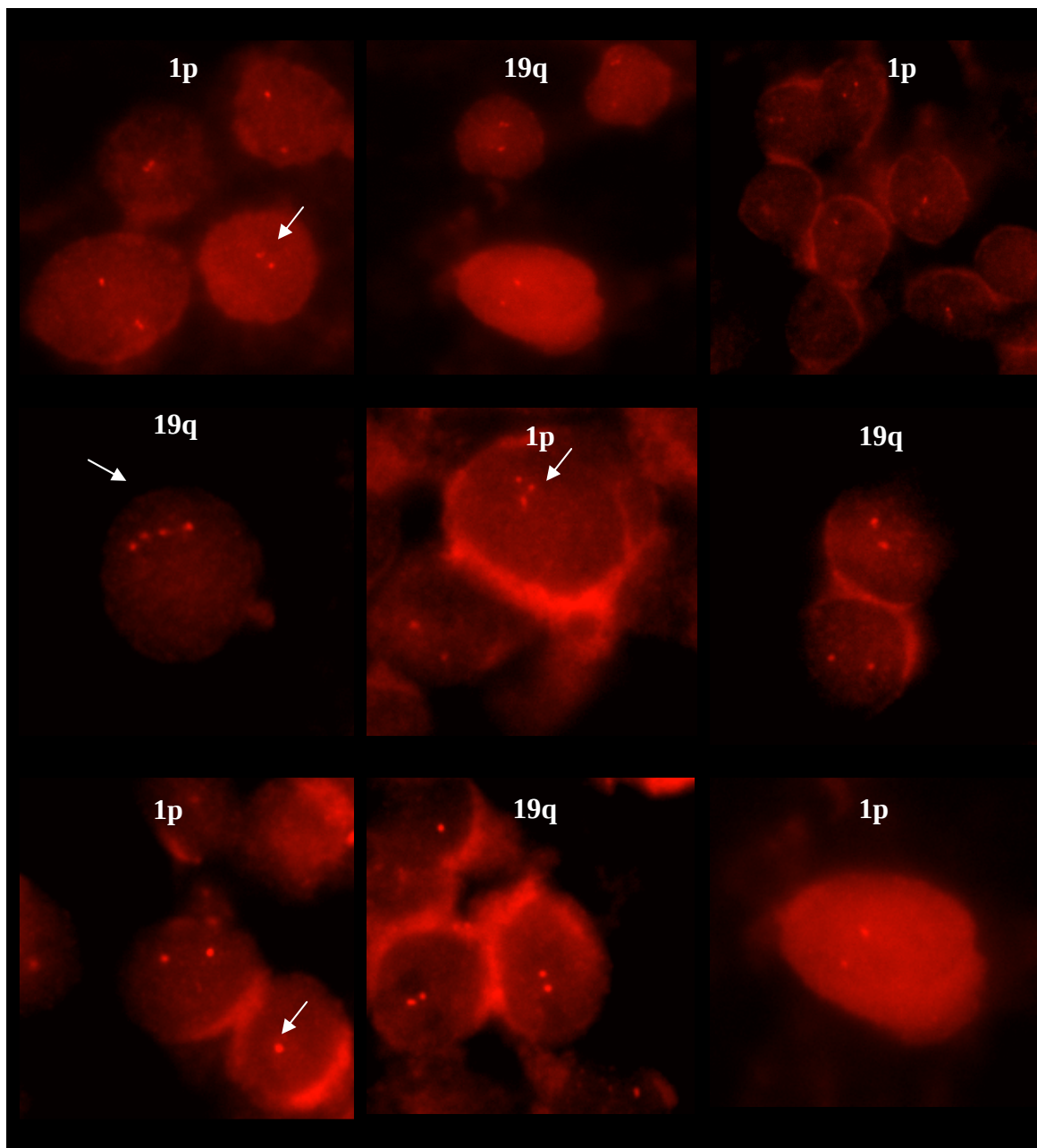


Figura 15 – Imagens obtidas por microscopia de fluorescência das células tumorais gliais. Os sinais fluorescentes resultaram da hibridação das sondas específicas para 1p (LSI 1p36) e 19q (LSI 19q13) às regiões cromossômicas em estudo. É possível verificar células com diferentes sinais fluorescentes no espectro laranja, nomeadamente, 1, 2, 3 ou 4 sinais (indicados pelas setas).

Os *cut-offs* utilizados para diferenciar as alterações numéricas foram considerados de acordo com o descrito por Sayagues e colaboradores (2004) [144], sendo definidos com base na comparação entre o perfil citogenético das células normais e o perfil citogenético das células tumorais. Assim, para as regiões cromossômicas em estudo,

consideraram-se significativas as perdas de material genético quando, uma percentagem igual ou superior a 10% de células apresentava menos de dois sinais fluorescentes. Os ganhos de material genético foram considerados quando uma percentagem igual ou superior a 5% de células apresentava mais de dois sinais fluorescentes.

4.1.3 Alterações citogenéticas detectadas para 1p e 19q

Nesta população de gliomas, várias alterações foram observadas nos braços curto e longo dos cromossomas, 1p e 19q, respectivamente. Na Tabela 10 estão, esquematizados, os padrões citogenéticos observados para os doentes em estudo, de acordo com o subtipo tumoral histológico, diagnosticado clinicamente.

Tabela 10 – Representação esquemática das alterações cromossómicas observadas em 1p/19q em diversos subtipos histológicos gliais. Os números representam a totalidade de indivíduos nos quais foram observadas as alterações cromossómicas indicadas.

Diagnóstico histológico	Astrocitoma pilocítico (I) Astrocitoma difuso (II) Astrocitoma anaplásico (III) GBM (IV) GBM c/ componente oligodendroglial (IV)				Oligodendroglioma (II) Oligodendroglioma anaplásico (III)		Oligoastrocitoma (II) Oligoastrocitoma anaplásico (III)		Ependimoma (II) Ependimoma anaplásico (III)		
Alterações cromossômicas											
1p*/19q*	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-
1p-/19q-	-	-	-	16	2	4	9	-	-	-	1
1p-/19q*	-	-	-	3	1	-	1	-	-	-	-
1p*/19q-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
1p-/19q+	-	-	-	3	1	-	-	-	-	-	1
1p+/19q-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-
1p+/19q+	3	4	2	21	-	-	3	1	2	-	1
1p+/19q*	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-
1p*/19q+	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-
Outras alterações	-	4	-	31	-	1	-	3	1	-	-
Total das amostras 130	3	8	2	83	4	5	13	5	3	1	3

- Delecção cromossómica

+ Ganho cromossómico

*Número de cópias normal

Numa primeira abordagem, foi possível observar que os gliomas, representados nesta população, apresentavam, frequentemente, alterações em pelo menos uma das regiões dos cromossomas em estudo (128/130, 98,5%). Assim, verificou-se que relativamente aos *loci* analisados, nomeadamente, o *locus* 1p36, no cromossoma 1 e o *locus* 19q13, no cromossoma 19, os indivíduos apresentavam um número de cópias alterado, nesta região, por ganho ou por deleção. Apenas duas amostras tumorais (2/130, 1,5%), cujo diagnóstico clínico foi de glioblastoma e ependimoma, mostravam o perfil citogenético sem alteração, apresentando duas cópias para cada região analisada. A elevada frequência de alterações em 1p/19q foi observada também por Smith e colaboradores, que consideraram estas alterações eventos comuns em gliomas humanos [60, 150].

Entre as alterações citogenéticas mais comuns, na população em estudo, destacaram-se ganhos (polissomias) em $1p^+/19q^+$ e deleções combinadas (codelecção) em $1p^-/19q^-$ (28,5% e 23,8%, respectivamente).

Em astrocitomas (grau I, II, III e IV) e em tumores mistos, oligoastrocitomas (grau II e III), as polissomias combinadas do 1p e do 19q ($1p^+/19q^+$) foram observadas com elevada frequência, nomeadamente, 30% e 37,5%, respectivamente. O facto desta alteração se verificar nos dois tipos histológicos referidos, sugere que é característica de uma componente celular astrocitária, uma vez que é observada, maioritariamente, nestes dois tipos de tumores. Também Perry e o seu grupo de investigação, observaram que as polissomias são muito frequentes em astrocitomas [151].

Do mesmo modo neste estudo, as codelecções 1p/19q observadas revelaram-se de grande importância, dado que, tem sido sugerida uma associação desta alteração com a morfologia clássica de oligodendrogliomas [60, 65, 90]. A Tabela 11 resume os resultados obtidos para a codelecção 1p/19q e para a deleção isolada de 1p ou 19q, consoante o tipo de glioma.

Tabela 11 – Deleções observadas nos diferentes tipos histológicos em estudo.

Alteração Cromossómica	Classificação histológica			
	Astrocitoma <i>n</i> = 100	Oligodendroglioma <i>n</i> = 18	Mistos <i>n</i> = 8	Ependimoma <i>n</i> = 4
Codelecção 1p/19q	17	13	0	1
Delecção 1p	9	1	0	1
Delecção 19q	2	0	1	0

Através da análise da Tabela 11, verificou-se que, 72,2% dos oligodendrogliomas (grau II e III) apresentavam a codelecção em 1p/19q. Esta alteração cromossómica foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) quando observada em oligodendrogliomas, comparativamente com os astrocitomas. Assim, os resultados obtidos poderão ter repercussões importantes ao nível do diagnóstico clínico. Esta alteração cromossómica poderá ser um bom marcador de diagnóstico para os oligodendrogliomas, principalmente nos casos em que os métodos histológicos são insuficientes para classificar este tipo de tumor. Vários estudos têm sido publicados sobre esta associação: Perry e colaboradores (2003), por exemplo, identificaram a codelecção em 70% dos doentes com oligodendrogliomas e Gadji e colaboradores (2009) verificaram que 91% dos doentes estudados com oligodendrogliomas também apresentavam a codelecção [90, 151].

Tendo em conta o grau do tumor em oligodendrogliomas (Tabela 12), verificou-se que 80% e 69,2% dos tumores de grau II e grau III, respectivamente, apresentavam codelecção das regiões cromossómicas em estudo. Estatisticamente, verificou-se que, esta alteração está associada aos oligodendrogliomas, independentemente do grau do tumor, dado que entre estes dois grupos não se verificaram diferenças estatisticamente significativas. Estes resultados foram concordantes com o observado por Smith e colaboradores, que afirmaram que a morfologia de oligodendrogliomas puros parece estar relacionada com a codelecção, independentemente do grau do tumor [60].

Como referido anteriormente, esta alteração torna-se muito relevante para o diagnóstico clínico, contudo, é preciso ter em conta que esta associação entre a histologia e a citogenética nem sempre se verifica. Assim, no presente estudo, observou-se que, aproximadamente, 22% dos doentes com oligodendrogliomas (grau II ou III) não apresentavam perda (isolada ou combinada) das regiões cromossómicas analisadas em 1p ou 19q. Estes dados vão ao encontro de um estudo publicado, segundo o qual, 10 a 20% dos oligodendrogliomas puros não apresentam esta alteração [60].

Alguns autores referem ainda que a codelecção 1p/19q não se observa apenas em oligodendrogliomas mas também em outros subtipos tumorais como em astrocitomas [60, 151]. Um estudo realizado por Perry (2003) detectou também a codelecção 1p/19q em tumores de grau IV (astrocitomas) [151]. Também, no presente Projecto, 19,3% dos glioblastomas puros (astrocitomas de grau IV) apresentavam a codelecção 1p/19q e, além disso, 9,6% dos doentes tinham a perda isolada de 1p ou 19q, maioritariamente do

1p. Tendo em conta que 50% dos tumores classificados como glioblastomas com componente oligodendroglioma (astrocitomas de grau IV) apresentavam codelecção 1p/19q e que os restantes 50% apresentavam perda isolada de 1p (50%), isto poderá sugerir que, os doentes diagnosticados com glioblastomas puros e que apresentam codelecção, ou pelo menos uma perda, poderão ter um prognóstico mais favorável devido à componente oligodendroglioma. A associação desta alteração, como um factor de prognóstico mais favorável, tem sido descrita, por vários autores, em tumores oligodendrogliomas com codelecção [60, 65, 90].

No presente estudo, verificou-se que não há uma associação estatisticamente significativa entre a presença de codelecção e a média de idade no diagnóstico nos doentes com oligodendrogliomas. Desta forma, a codelecção e a idade no diagnóstico parecem ser factores independentes no aparecimento da doença (Tabela 12).

Tabela 12 – Média de idade no diagnóstico nos doentes com oligodendrogliomas com a codelecção e sem a codelecção.

<i>Média de idade no diagnóstico ± desvio padrão (anos)</i>	
<i>Com a codelecção</i>	<i>Sem a codelecção</i>
52±13	49±17

Estes resultados estão de acordo com outros estudos publicados em que, também não se observou nenhuma diferença, estatisticamente significativa, entre a codelecção e a idade no diagnóstico em doentes com oligodendrogliomas [152]

4.1.4 Análise da sobrevida

Estudos sugerem que a perda alélica dos cromossomas 1p e 19q está associada com uma sensibilidade aumentada à quimioterapia e radioterapia, com consequente aumento da sobrevida dos doentes com oligodendrogliomas [60, 65, 90]. Para oligodendrogliomas que não apresentam esta alteração, tem sido descrita uma sobrevida mais curta [60, 153].

Através de uma análise segundo a curva de *Kaplan-Meier*, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as curvas de sobrevida dos doentes com oligodendrogliomas (grau II e III) com codelecção 1p/19q e sem codelecção,

independentemente do tratamento (Figura 16). A sobrevida média observada foi de 15 ± 4 meses e 24 ± 9 meses, para os doentes com e sem a codelecção, respectivamente

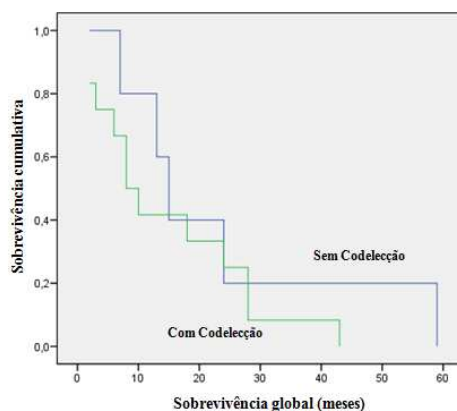


Figura 16 – Curva de *Kaplan-Meier* comparando a sobrevida dos doentes com oligodendrogliomas que apresentavam codelecção nas regiões cromossômicas analisadas (1p36 e 19q13) e os que não apresentavam a codelecção, independentemente do tratamento.

Porém, a maioria dos estudos publicados mostrou que a codelecção 1p/19q conduziu a uma resposta aumentada ao tratamento, nomeadamente por quimioterapia e por radiação, tanto em combinação, como individualmente [65, 66]. No entanto, em doentes com tumores oligodendrogliais que não foram sujeitos a estes tratamentos, a codelecção 1p/19q, não pareceu conferir qualquer vantagem [67]. Assim, tendo em os estudos publicados verificou-se que, nesta população, os doentes com oligodendrogliomas, portadores da codelecção e que não fizeram qualquer tipo de tratamento, apresentaram uma média de sobrevida de 11 ± 8 meses e que os doentes com oligodendrogliomas, que apresentavam codelecção e que fizeram quimioterapia e/ou radioterapia apresentaram uma média de sobrevida de 16 ± 4 meses. Contudo, não se observou uma relação estatisticamente significativa (Figura 17).

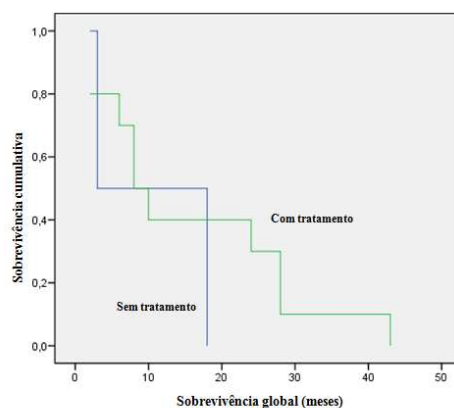


Figura 17 – Curva de *Kaplan-Meier* comparando a sobrevida dos doentes com oligodendrogliomas que apresentavam codelecção e não fizeram qualquer tipo de tratamento e os doentes com oligodendrogliomas que apresentavam codelecção e fizeram quimioterapia e/ou radioterapia.

É necessário ter em conta o reduzido número de doentes com oligodendrogliomas e portadores da codelecção que entraram neste estudo ($n = 13$). A ligeira diferença observada, embora não seja estatisticamente significativa, poderá ser sugestiva de que a perda de material genético das regiões em estudo envolverá genes ligados à resistência às várias estratégias terapêuticas, no entanto, será necessário estudar um maior número de casos para confirmar esta hipótese.

Também nos GBM estudados, não se observaram diferenças estatisticamente significativas relativamente à sobrevida dos indivíduos com e sem a codelecção. Relativamente a este grupo histológico, têm surgido, na literatura, alguns resultados contraditórios. Assim, um estudo realizado por Homma (2006) avaliou apenas a perda de 1p em glioblastomas, mas verificou uma associação desta alteração com o aumento da sobrevida [154]. Smith (2000), pelo contrário, não observou qualquer vantagem na sobrevida em doentes com glioblastomas e portadores da codelecção 1p/19q [60].

Para a população estudada neste Projecto, a codelecção mostrou ser um bom marcador de diagnóstico que poderá ser implementado como rotina hospitalar, complementando a caracterização histológica. No entanto, para esclarecer o papel que a codelecção poderá ter no prognóstico dos doentes com oligodendrogliomas será necessário aumentar o número de doentes estudados.

4.2 Detecção de mutações nos genes *IDH1* e *IDH2*

4.2.1 Amostras estudadas

Um dos objectivos iniciais deste trabalho consistiu na identificação de mutações no gene *IDH1* que, de acordo com estudos recentemente publicados, parecem ser um bom marcador de diagnóstico e, ainda parecem conferir um prognóstico mais favorável [9, 11]. A avaliação de mutações no presente trabalho foi também alargada ao gene *IDH2* porque, recentemente, vários trabalhos têm, descrito mutações neste gene, capazes de conferir o mesmo efeito. Além disso, estudos em gliomas mostraram que podem existir mutações neste gene quando não ocorrem mutações no seu análogo [9].

A análise genética nestes dois genes foi efectuada em 128 amostras tumorais de doentes com diferentes subtipos de gliomas, sendo que, destas, 92 eram glioblastomas: 87 glioblastomas primários e 5 glioblastomas secundários.

Relativamente à histologia das amostras tumorais estudadas para este marcador, pode-se observar que os astrocitomas foram o tipo de glioma mais frequente (80,5%) e os ependimomas, o menos frequente (5,6%) (Tabela 13). Do total dos indivíduos em estudo, 61 eram do género feminino e 67 eram do género masculino, cuja idade média no diagnóstico foi de 58 ± 15 anos.

Tabela 13 – Distribuição das amostras tumorais em estudo, para análise por Sequenciação directa, de acordo com o tipo de glioma.

<i>Amostras estudadas</i>					
<i>Tipo histológico</i>	<i>Astrocitomas</i>	<i>Oligodendrogliomas</i>	<i>Mistos</i>	<i>Ependimoma</i>	<i>Total</i>
<i>Nº amostras analisadas</i>	103	16	2	7	128

4.2.2 Análise de mutações nos genes *IDH1* e *IDH2* por Sequenciação directa

A pesquisa de mutações efectuou-se por amplificação por PCR do exão 4, dos genes *IDH1* e *IDH2*, onde se localizam todas as mutações descritas até ao momento, em gliomas. Desta forma, foram obtidos fragmentos de DNA com 252 pb para *IDH1* (Figura 18-A) e fragmentos de DNA com 281 pb para *IDH2* (Figura 18-B), cujos produtos resultantes foram visualizados num gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) (descrito em 3.4.2.5).

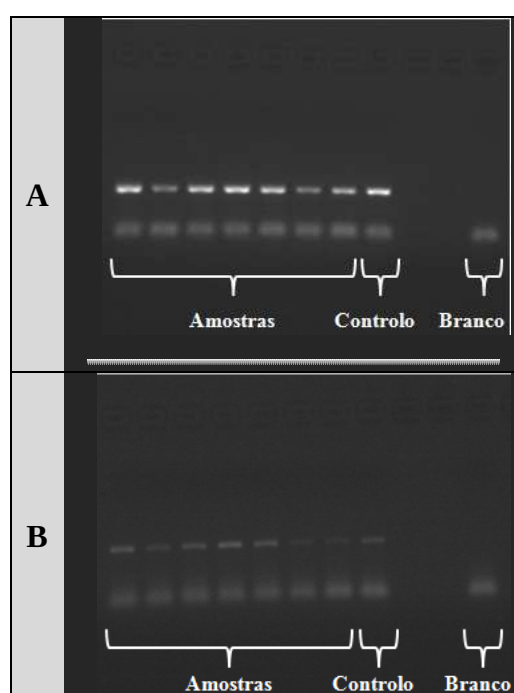


Figura 18 – Separação por electroforese dos produtos resultantes da amplificação do exão 4 do gene *IDH1* (A) e do gene *IDH2* (B).

Tal como descrito em 3.4.2.2, quando a amplificação não foi possível, devido ao DNA estar degradado, como aconteceu com algumas amostras incluídas em parafina, utilizaram-se outros *primers* (descritos na Tabela 5), diminuindo assim o tamanho dos produtos amplificados para 133 pb e 198 pb, para o gene *IDH1* e para o gene *IDH2*, respectivamente.

Os produtos amplificados por PCR foram sequenciados, tal como descrito em 3.4.2.7. Os resultados da sequenciação foram devidamente analisados, utilizando o *software Sequencher*, versão 9.4, com o objectivo de identificar possíveis mutações nas regiões estudadas destes genes. Exemplos de resultados obtidos para os dois genes estão representados nos electroferogramas (Figura 19).

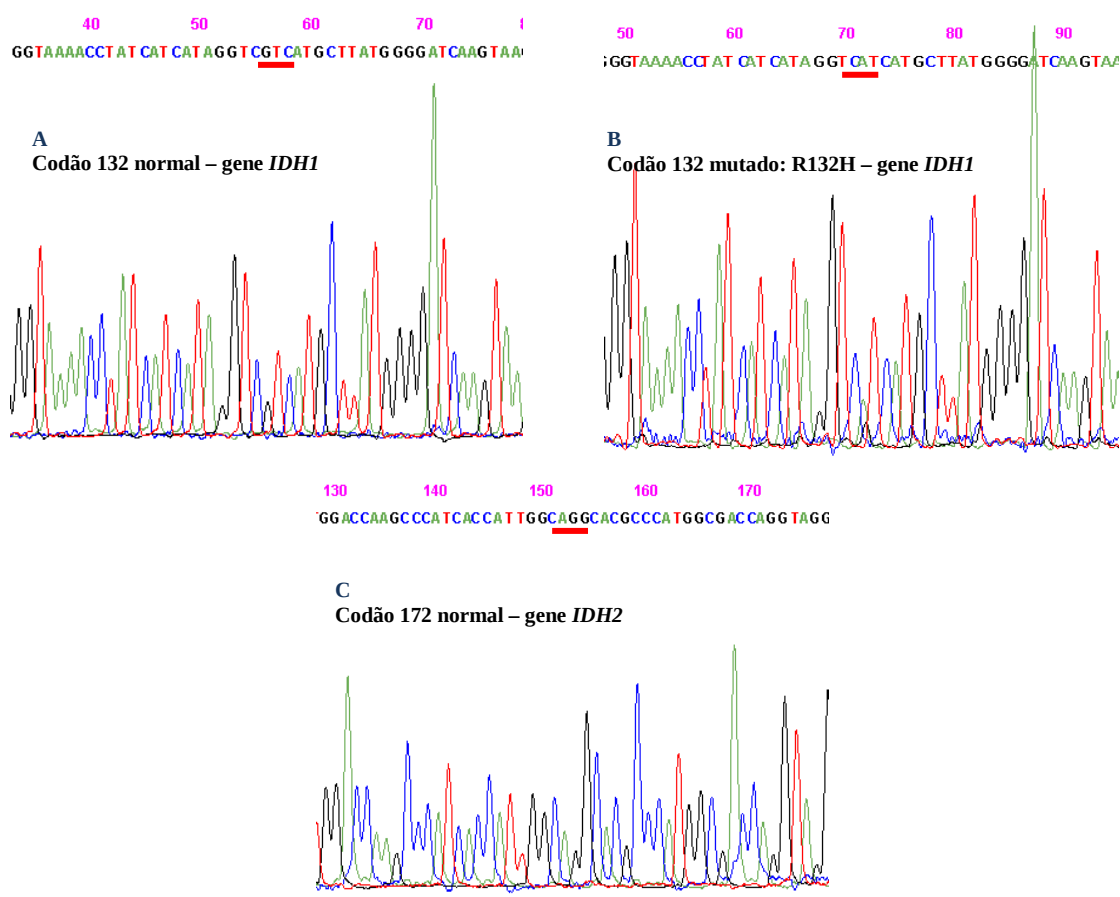


Figura 19 – A) Electroferograma representativo da sequenciação do codão 132, do exão 4, do gene *IDH1*. A amostra representada em A, apresentava o codão normal (CGT). B) A amostra representada em B apresentava mutação (R132H) no codão 132, do gene *IDH1*. C) Electroferograma representativo da sequenciação do codão 172, do exão 4, do gene *IDH2*. A amostra representada em C apresentava o codão normal (AGG).

4.2.3 Alterações genéticas identificadas nos genes *IDH1* e *IDH2*

Os resultados, obtidos por Sequenciação directa nas 128 amostras em estudo para os genes *IDH1* e *IDH2*, estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados obtidos por Sequenciação directa para os genes *IDH1* e *IDH2*, de acordo com os diferentes subtipos histológicos de gliomas. Os números representam a totalidade de indivíduos nos quais foram observadas mutações.

Diagnóstico histológico	Astrocitoma pilocítico (I) Astrocitoma difuso (II) Astrocitoma anaplásico (III) GBM (IV)				Oligodendroglioma (II) Oligodendroglioma anaplásico (III)		Oligoastrocitoma (II) Oligoastrocitoma anaplásico (III)	Ependimoma (II) Ependimoma anaplásico (III)		
Presença de mutação <i>IDH1</i>										
<i>Arg132His</i>	-	2	1	5	1	3	1	2	-	-
<i>Arg132Ser</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arg132Leu</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Presença de mutação <i>IDH2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total das amostras 128	3	6	2	92	3	12	3	3	1	3

Através da Tabela 14 foi possível observar que, na população em estudo, foram identificados 17 doentes com mutação no codão 132, do exão 4, do gene *IDH1*. De notar que, as mutações foram observadas em astrocitomas (grau II, III e IV), em oligodendrogliomas (grau II e III) e em gliomas mistos (grau II e III). Porém, não se identificou qualquer mutação em ependimoma (grau II e III) ou astrocitoma pilocítico (grau I).

Considerando que, tumores com ausência de mutação no codão 132 do exão 4, do gene *IDH1*, poderiam conter mutações no codão 172, do exão 4, do gene *IDH2* [9], sequenciaram-se as 128 amostras, mas nenhuma mutação foi identificada em *IDH2*.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Nobusawa e colaboradores, pois também não identificaram qualquer mutação neste codão nas 367 amostras de glioblastomas analisadas [11]. Já em 2010, também Van den Bent, identificou apenas um doente com mutação *IDH2*, numa população constituída por 157 doentes com oligodendrogliomas anaplásicos ou com oligoastrocitomas anaplásicos [155]. Assim, os resultados obtidos neste Projecto, associados com os estudos acima mencionados permitem comprovar que mutações no codão 172, do gene *IDH2* são, de facto, muito raras em relação às que ocorrem no codão 132, do gene *IDH1*.

Das cinco mutações diferentes descritas para este gene [7, 9, 102, 156], foram encontradas, no presente trabalho, três mutações distintas, nesta população. Todas as mutações identificadas foram em heterozigotia, dado que, apenas um alelo estava alterado. Também as mutações identificadas nesta população foram *missense*, uma vez que a alteração de um único nucleótido (395G>A, 394C>A e 395G>T) conduziu à alteração do aminoácido codificado (R132H, R132S e R132L, respectivamente). Estas observações estão de acordo com o publicado por vários autores, em 2009 e 2010 [102, 155, 156]. Pela Figura 19, verificou-se que a mutação mais frequente foi a R132H (88%) comparativamente às mutações R132S e R132L, que ocorreram apenas em 6% dos casos (Figura 20).

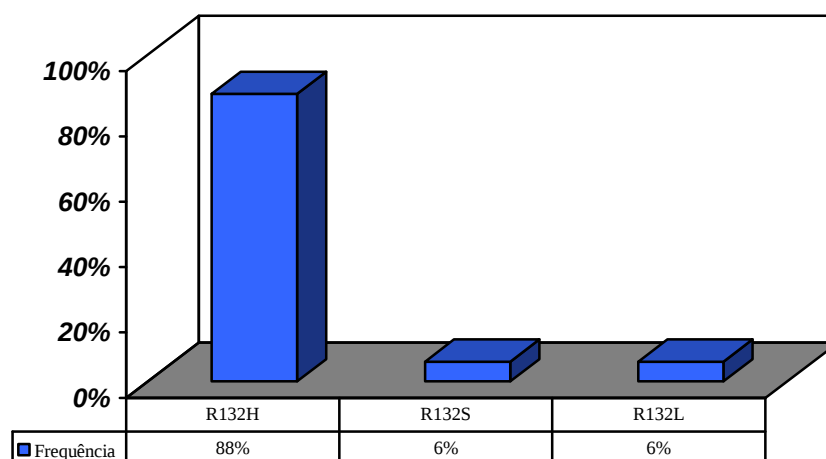


Figura 20 – Frequência das diferentes mutações encontradas no codão 132, do exão 4, do gene *IDH1*, na população em estudo.

Um estudo avaliado por Sanson (2009) envolvendo 404 doentes com gliomas descreveu, para as mutações aqui identificadas, frequências semelhantes: 89% R132H, 2% R132S e 1,3% R132L [102].

É de notar que, não foi possível confirmar a presença das mutações R132S e R132L por um segundo PCR, de acordo com o procedimento habitual do laboratório, devido à pouca quantidade de DNA existente.

A presença de mutação no gene *IDH1* tem sido descrita como um bom marcador molecular a ser usado na distinção entre glioblastomas primários e glioblastomas secundários [43, 106]. No presente Projecto, para os doentes estudados, verificou-se que 100% dos glioblastomas secundários (tumores que progrediram de gliomas de baixo grau para gliomas de alto grau) apresentaram mutação no codão 132, do exão 4, do gene *IDH1* ao contrário dos glioblastomas primários (tumores que se apresentaram desde início como glioblastomas de alto grau) em que a mutação foi identificada em apenas 1% dos casos (Figura 21).

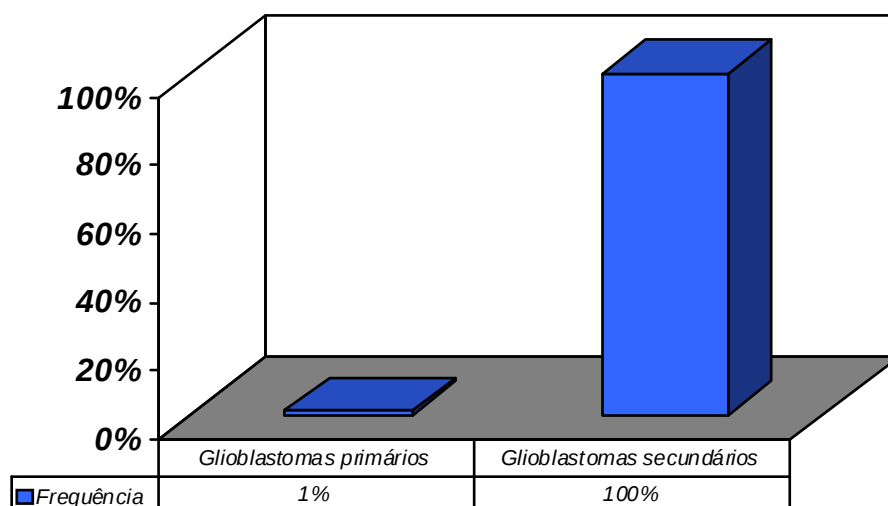


Figura 21 – Distribuição de mutações *IDH1* em glioblastomas primários e secundários.

A distinção entre estes dois tipos de glioblastomas através da identificação de mutação no gene *IDH1* foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Assim, a implementação deste novo marcador molecular poderá ajudar a distinguir estes dois tipos de tumor, quando a análise histológica não é suficiente. Os resultados obtidos estão de acordo com estudos já publicados envolvendo outras populações em que a presença de mutações em glioblastomas secundários, foi de 77% e de 82% [8, 102]. A presença frequente de mutações em glioblastomas secundários e a sua quase ausência em glioblastomas primários reforçam a ideia de que, apesar das semelhanças histológicas que são observadas, estes dois subtipos tumorais são geneticamente e clinicamente entidades distintas.

Importa também dizer, que o glioblastoma com mutação no gene *IDH1* diagnosticado como primário, poderia, rapidamente, ter progredido de uma lesão de baixo grau que, clinicamente, não tivesse sido diagnosticada. A presença de mutações *IDH1* em todos os glioblastomas secundários analisados sugere que foi realizado um diagnóstico atempadamente, permitindo identificar lesões de mais baixo grau antes de terem progredido para lesões de alto grau. A identificação destas mutações no desenvolvimento precoce destes tumores permitirá aos clínicos realizarem um acompanhamento mais vigiado e controlado do doente, orientando-o, logo que possível, para terapias que possam impedir o desenvolvimento destes tumores tentando proporcionar um aumento da sobrevida destes doentes.

Também nesta população, verificou-se que 25% dos gliomas de grau II (astrocitomas difusos, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas) e 26% dos gliomas de grau III (astrocitomas anaplásicos, oligodendrogliomas anaplásicos e oligoastrocitomas anaplásicos) apresentavam mutação. É possível que estes tumores com mutação progridam para tumores de grau mais elevado e assim, esta identificação num estadio precoce poderá ser útil ao clínico para o acompanhamento destes doentes, tentando melhorar o seu prognóstico mediante diferentes estratégias terapêuticas.

Alguns autores têm sugerido que, a identificação destas mutações também pode ser um bom marcador para distinguir astrocitomas pilocíticos (grau I) de astrocitomas difusos (grau II) quando a histologia é dúbia [106]. Por isso, a possibilidade deste marcador molecular ser útil na distinção destes subtipos, foi também testada nesta população. No entanto, devido, provavelmente, ao reduzido número de doentes em estudo, com estes subtipos tumorais ($n = 3$, astrocitomas pilocíticos e $n = 6$, astrocitomas difusos), os resultados obtidos não foram estatisticamente significativos. Contudo, verificou-se que nenhum astrocitoma pilocítico apresentou mutação e que 33% dos astrocitomas difusos tinham mutação *IDH1*. De notar que a frequência obtida para astrocitomas de grau II foi mais baixa do que a descrita na literatura, já que, Yan (2009) observou uma frequência superior a 70%. Também, Watanabe (2009) verificou que 88% dos astrocitomas de grau II tinham mutação *IDH1*. Assim, a importância deste marcador para diferenciar tumores astrocíticos de baixo grau ainda necessita de estudos adicionais mas, em casos de dúvida, na histologia poderá ser utilizado como um marcador complementar.

A idade média no diagnóstico dos indivíduos com e sem mutação está indicada na Tabela 15. Os doentes com mutação *IDH1* foram diagnosticados em idade mais novas (em média, 13 anos) do que aqueles que não apresentavam mutação ($p = 0,001$).

Tabela 15 – Média de idade no diagnóstico dos doentes com mutação e sem mutação.

<i>Média de idade no diagnóstico $\pm$ desvio padrão (anos)</i>	
<i>Mutação IDH1</i>	<i>Sem mutação IDH1</i>
46 $\pm$ 14	59 $\pm$ 15

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com o descrito em vários estudos publicados [7-9, 103]. Por exemplo, Ichimura e colaboradores (2009), observaram que a média de idades no diagnóstico dos doentes com glioblastomas com mutação foi de 41 anos e que os doentes sem mutação foram diagnosticados, em média, aos 56 anos [156].

4.2.4 Análise da sobrevida

A curva de *Kaplan-Meier* foi efectuada para observar diferenças na sobrevida entre os doentes com mutação e sem mutação (Figura 22).

A presença de mutações *IDH1* foi associada com o aumento da sobrevida ($p < 0,0001$). Verificou-se que, os doentes com mutação vivem, em média, mais tempo do que os doentes sem mutação (69 $\pm$ 4 meses e 15 $\pm$ 2 meses, respectivamente).

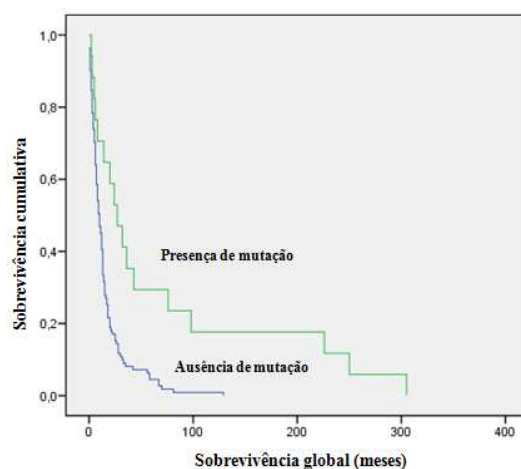


Figura 22 – Curva de *Kaplan-Meier* comparando a sobrevida dos doentes que apresentavam mutação *IDH1* e dos que não apresentavam mutação.

Este efeito das mutações *IDH1* no prognóstico dos doentes tem sido estudado por vários autores, segundo os quais, a sobrevida dos doentes com mutação parece ser significativamente maior do que a dos doentes sem mutação [102, 157].

Apesar de, no presente estudo, o aumento de sobrevida em doentes com mutação parecer não estar relacionado com o tipo de tratamento específico, verificou-se que os doentes tratados com agentes alquilantes sobreviveram mais tempo do que os doentes sem tratamento (81 ± 32 vs 52 ± 34 meses, respectivamente). Os doentes que foram submetidos a radioterapia de dose total de 60 Gray (Gy) tiveram um aumento de sobrevida, comparativamente aos que foram submetidos a radioterapia de dose total de 30 Gy (100 ± 38 meses e 14 ± 11 meses), no entanto, estes valores não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Assim, para a população estudada neste Projecto, a presença de mutação no gene *IDH1* mostrou ser um bom marcador de diagnóstico para distinguir glioblastomas primários de secundários. Em casos de dúvidas na análise histológica, eventualmente, este marcador poderá ajudar a diferenciar tumores astrocitários de baixo grau (grau I e II), no entanto, estudos adicionais são ainda necessários. A associação destas mutações a um prognóstico mais favorável e a idades mais precoces também foi verificada nesta população. Isto permitirá aos clínicos um acompanhamento controlado da progressão da doença e a atribuição de um prognóstico diferente entre os doentes com esta alteração e os que a não têm. Pelos motivos expostos, será relevante a identificação destas mutações em rotina hospitalar.

4.2.5 Avaliações adicionais

Ao longo da realização deste Projecto houve oportunidade de explorar algumas avaliações adicionais, relativamente aos objectivos previamente definidos, e que se descrevem em seguida.

4.2.5.1 Análise genética a nível somático e germinal

Em 12, dos 17 indivíduos que apresentavam mutação no gene *IDH1*, em tecido tumoral, foi possível realizar a pesquisa de mutações no DNA extraído de sangue periférico, de forma a demonstrar também, no presente estudo, que a ocorrência destas mutações acontece a nível somático. Exemplo ilustrativo dos resultados obtidos encontra-se na Figura 23.

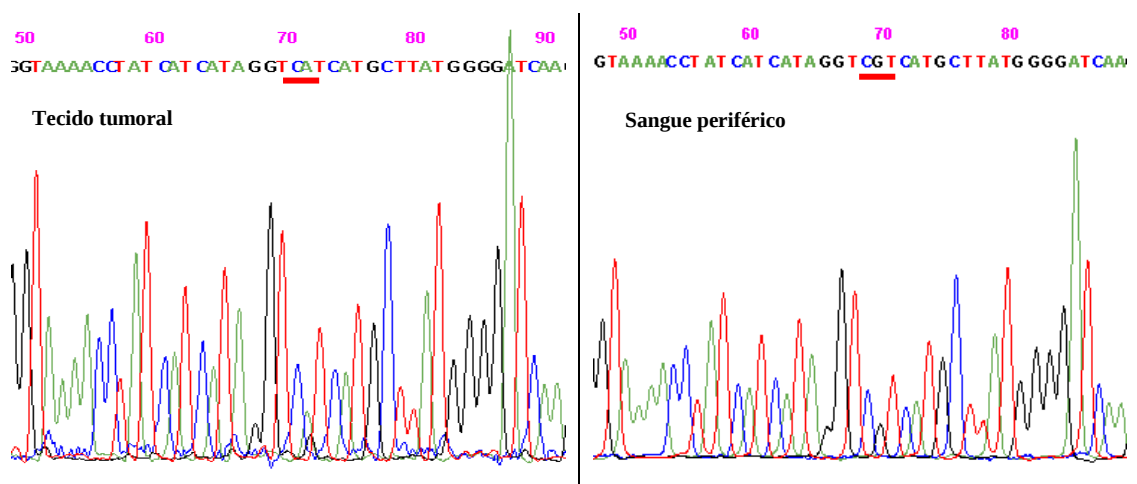


Figura 23 – Electroferogramas representativos da sequenciação do codão 132 do gene *IDH1* a partir de DNA extraído de tecido tumoral e sangue periférico.

Em todos os casos estudados, verificou-se que as mutações ocorreram apenas a nível do tecido tumoral e não estavam presentes no sangue periférico, tal como descrito por Sanson e também por Ichimura (2009) [102, 156].

4.2.5.2 Reprodutibilidade da técnica: amostras parafina vs tecido fresco

Apesar do DNA extraído de tecido fresco apresentar, de uma maneira geral, melhores resultados nos vários procedimentos laboratoriais do que o material parafinado, são as amostras em parafina que estão mais acessíveis, quando se fazem estudos retrospectivos envolvendo este tipo de tumores. Assim, no presente Projecto, também houve a oportunidade de testar a reprodutibilidade dos resultados de sequenciação nestes dois tipos de amostras, ajustando e otimizando protocolos que poderão ser validados em estudos posteriores ou serem implementados como rotina hospitalar. Para isso, sequenciaram-se 10 amostras de tecido fresco e 10 amostras de parafina, correspondentes aos mesmos indivíduos e a colheitas feitas no mesmo momento da cirurgia. Em 9 das 10 amostras estudadas, os resultados obtidos foram reprodutíveis. Neste grupo, foi possível identificar 4 amostras que, tanto em tecido fresco, como em tecido parafinado, apresentavam mutações no gene *IDH1*, enquanto que, em 5 amostras não se identificou qualquer tipo de mutação em ambos os tecidos. Porém, obtiveram-se resultados discrepantes em relação a uma amostra, dado que se verificou mutação em tecido fresco mas não em tecido parafina. Isto pode dever-se, eventualmente, à presença de células normais no bloco de parafina analisado. No entanto, era esperado que esta amostra tivesse mutação *IDH1*, dado que se tratava de um glioblastoma secundário (tumor que progrediu de uma lesão de baixo grau para alto grau) e que a segunda recidiva também apresentava mutação. Segundo a literatura, este tipo de mutações ocorrem no desenvolvimento inicial da doença [9].

Através deste estudo, pode-se observar que a Sequenciação é uma técnica exequível, tanto para amostras de DNA extraído de tecido fresco como de tecido incluído em parafina. Assim, será viável a implementação deste marcador num laboratório de rotina, mesmo quando as amostras disponíveis são apenas de tecido parafinado.

4.3 Avaliação da hipermetilação da região promotora do gene *MGMT*

4.3.1 Amostras estudadas

No presente trabalho, avaliou-se a hipermetilação da região promotora do gene *MGMT* em 38 amostras tumorais de doentes com diferentes tipos de gliomas, através de três kits de MS-MLPA já anteriormente descritos (Tabela 8).

Relativamente à histologia das amostras tumorais estudadas, verificou-se que os astrocitomas foram o tipo de glioma mais frequente (81,5%) e que os restantes grupos foram poucos representativos (Tabela 16). A população estudada foi constituída por 25 indivíduos do género masculino e por 13 indivíduos do género feminino, sendo a média de idade no diagnóstico de 57 ± 16 anos.

Tabela 16 –Distribuição das amostras tumorais em estudo para análise por MS-MLPA, de acordo com o tipo de glioma.

<i>Tipo histológico</i>	<i>Amostras estudadas</i>				<i>Total</i>
	<i>Astrocitomas</i>	<i>Oligodendrogliomas</i>	<i>Mistos</i>	<i>Ependimoma</i>	
<i>Nº amostras analisadas</i>	31	4	1	2	38

4.3.2 Análise da hipermetilação da região promotora do gene *MGMT* por MS-MLPA

A avaliação do estado de hipermetilação da região promotora do gene *MGMT* foi efectuada, inicialmente, através de dois kits que depois foram descontinuados, mas a avaliação prosseguiu através de um terceiro kit que surgiu no decorrer deste Projecto (como descrito em 3.4.3).

Para cada doente analisaram-se dois electroferogramas. Um deles foi resultado de uma reacção de PCR após hidrólise com a enzima de restrição, sensível à metilação (*HhaI*) e o outro foi o resultado de uma reacção que não foi sujeita a hidrólise pela enzima de restrição, conforme o procedimento descrito em 3.4.3.1. Os electroferogramas de todos os doentes em estudo foram analisados relativamente aos fragmentos controlo e foram identificadas as sondas de referência, para garantir o sucesso da reacção, nomeadamente, ao nível da desnaturação e da ligação. De seguida, avaliou-se, simultaneamente, o estado de hipermetilação dos vários dinucleótidos CpG específicos da região promotora do gene *MGMT*. Em cada electroferograma analisado, observaram-se os picos correspondentes às sondas específicas para as regiões CpG deste gene (Tabela 9). Sinteticamente, nesta pré-análise, verificou-se que os picos relativos às sondas de interesse se mantinham ou diminuía comparando os dois electroferogramas obtidos e correspondentes a cada indivíduo.

Exemplos ilustrativos dos resultados de electroforese capilar obtidos com os diferentes kits de MS-MLPA utilizados, estão representados na Figura 24.

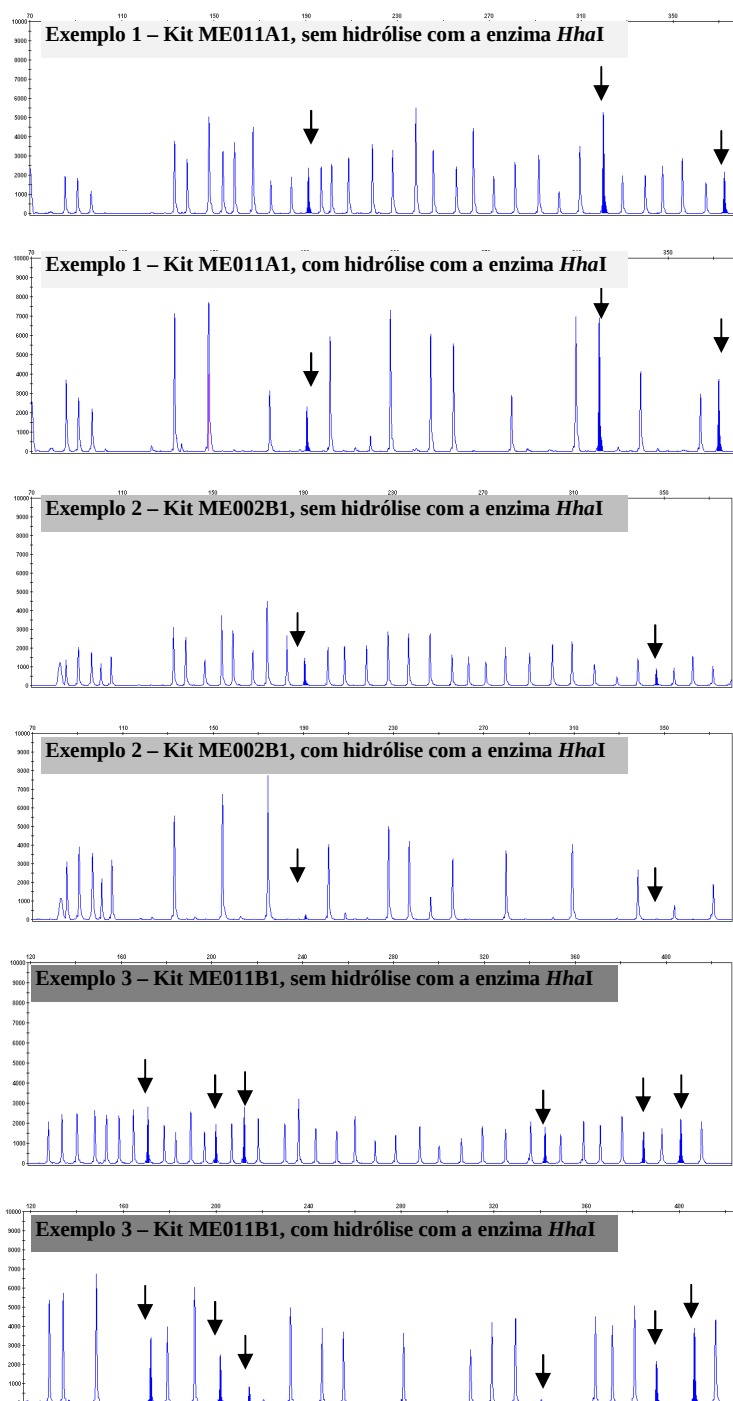


Figura 24 – Resultados das electroforeses capilares por MS-MLPA, utilizando os kits: ME011A1 (Exemplo 1), ME002B1 (Exemplo 2) e ME011B1 (Exemplo 3). Exemplos representativos dos padrões dos picos de amostras não sujeitas a hidrólise e de amostras submetidas a hidrólise pela enzima *HhaI*, consoante o kit utilizado. Os picos correspondentes às sondas que hibridam em regiões CpG da região promotora do gene *MGMT* estão identificados por setas.

A percentagem de hipermetilação foi calculada pela divisão das áreas dos picos normalizados das amostras metiladas (sujeitas à hidrólise pela enzima), pela área dos picos normalizados das amostras não metiladas (não sujeitas à hidrólise pela enzima de restrição), recorrendo a um software apropriado (como descrito em 3.4.3.1).

Para cada doente, calculou-se a média dos valores obtidos para todas as sondas em estudo para a região promotora do gene *MGMT*, de acordo com o procedimento adoptado por Jeuken e colaboradores, em 2007 [147]. Os *cut-offs* definidos foram, também, de acordo com os adoptados por este autor [147]. Assim, ausência de hipermetilação foi considerada quando a média das sondas foi inferior a 25%, hipermetilação média foi observada quando a média das sondas esteve entre 25% e 49% e hipermetilação moderada verificou-se quando a média das sondas esteve entre 50% e 74%. Nenhum doente revelou hipermetilação extensa ($\geq 75\%$).

4.3.3 Alterações epigenéticas observadas no gene *MGMT*

Em 9 amostras, tal como é possível observar através da Tabela 17, o estado de hipermetilação da região promotora foi analisado utilizando dois kits de MS-MLPA, nomeadamente, o ME011A1 e ME002B1, disponíveis no início deste estudo e que depois foram descontinuados. Assim, para estes indivíduos foram utilizados estes dois kits de forma a aumentar a informatividade do estado de hipermetilação da região promotora do gene, uma vez que, o primeiro tinha 3 sondas e o segundo tinha apenas 2, sendo uma delas (sonda 5670-L5146*) comum ao outro kit. Os resultados obtidos para estes doentes encontram-se descritos na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultado do estado de hipermetilação para as várias sondas específicas do gene *MGMT*, utilizando os kits ME011A1 e ME002B1.

Classificação histológica da amostra tumoral	Kit ME011A1			Kit ME002B1		Média
	Sonda 2239-L1261	Sonda 5670-L5146*	Sonda 7188-L5144	Sonda 5670-L5146*	Sonda 13716-L15582	
GBM	0,48	0,05	0,08	0,18	0,00	0,16
GBM	0,13	0,10	0,14	0,09	0,03	0,10
Oligodendroglioma anaplásico	0,55	0,53	0,77	0,57	0,57	0,60
GBM	0,15	0,10	0,04	0,15	0,14	0,12
Oligodendroglioma anaplásico	0,75	0,50	0,54	0,50	0,08	0,47
GBM	0,34	0,48	0,16	0,44	0,06	0,30
Ependimoma anaplásico	0,27	0,21	0,03	0,07	0,08	0,13
Astrocitoma difuso	0,55	0,26	0,05	0,03	0,02	0,18
GBM	0,10	0,38	0,52	0,15	0,62	0,35

De notar que, 5 destes 9 casos foram efectuados em duplicado, tendo-se verificado resultados reprodutíveis. Por falta de tempo, não foi possível fazer duplicados das experiências realizadas como recomendado na literatura [158], no entanto, este será um dos objectivos futuros deste trabalho.

Para as restantes 29 amostras, a hipermetilação foi avaliada utilizando o kit ME011B1, constituído por 6 sondas para a região promotora do gene em estudo (Tabela 18).

Tabela 18 – Resultado do estado de hipermetilação das diversas sondas específicas do gene *MGMT*, utilizando o kit ME011B1.

Classificação histológica da amostra tumoral	Kit ME011B1						Média
	Sonda 14136-L12791	Sonda 05670-L14276	Sonda 13716-15582	Sonda 12250-L14205	Sonda 14133-L15736	Sonda 14135-L16573	
GBM	0,48	0,06	0,03	0,22	0,04	0,70	0,26
GBM	0	0,03	0	0,07	0,05	0,14	0,06
GBM	0,02	0,1	0	0,05	0,13	0,12	0,07
Ependimoma anaplásico	0,06	0,05	0	0,04	0,05	0,06	0,04
GBM	0,37	0,05	0,21	0,23	0,14	0,58	0,26
GBM	0,02	0,02	0,07	0,17	0,13	0,71	0,19
GBM	0,06	0,02	0,02	0,02	0,10	0,07	0,05
Ependimoma anaplásico	0,35	0,72	0,02	0,57	1,15	0,34	0,53
GBM	0,77	0,46	0,05	0,18	0,26	0,46	0,36
GBM	0,42	0,06	0,04	0,19	0,49	0,28	0,25
GBM	0,03	0,07	0,05	0,04	0,68	0,41	0,21
Oligodendroglioma anaplásico	0,23	0,09	0,14	0,64	0,2	1,05	0,40
GBM	0,33	0,51	0,26	0,43	0,36	0,34	0,37
GBM	0,37	0,65	0,42	0,62	0,50	0,60	0,53
GBM	0,16	0,35	0,19	0,37	0,30	0,27	0,27
GBM	0,42	0,21	0,30	0,16	0,18	0,90	0,36
GBM	0,64	0,04	0,04	0,12	0,15	0,40	0,23
GBM	0,04	0,40	0,10	0,40	0,17	0,53	0,27
GBM	0,37	0,05	0,22	0,27	0,45	0,28	0,27
GBM	0,08	0,27	0,33	0,14	0,20	0,58	0,27
GBM	0	0,65	0,41	0,31	0,27	0,77	0,40
GBM	0,19	0,16	0,09	0,23	0,07	0,08	0,14
GBM	0	0,04	0,31	0,40	0,18	0,23	0,19
GBM	0,38	0,90	0,38	0,73	0,67	0,48	0,59
GBM	0,30	0,24	0,57	0,52	0,36	0,77	0,46
GBM	0,36	0,12	0,37	0,29	0,32	0,60	0,34
GBM	0,21	0,34	0,14	0,24	0,77	0,77	0,41
GBM	0,44	0,77	0,51	0,56	0,54	0,48	0,55
Oligodendroglioma anaplásico	0,39	0,44	0,35	0,62	0,59	0,99	0,56

Durante a realização deste Projecto, houve também a oportunidade de estudar a reprodutibilidade da técnica. Para isso, efectuou-se o MS-MLPA, recorrendo a 9 amostras de DNA de tecido tumoral fresco, comparado com amostras de DNA de tecido tumoral parafinado dos mesmos doentes. Resultados reprodutíveis foram verificados em geral, ou seja, quando uma sonda se apresentou metilada ou não metilada para o tecido fresco, o mesmo aconteceu para o tecido parafinado. No entanto, para um dos casos, observou-se uma ligeira diferença do estado de hipermetilação da região promotora do gene *MGMT*, facto que pode ser explicado pela presença de células normais numa das porções de tecido tumoral estudada, uma vez que, tumores cerebrais, se caracterizam por serem bastante infiltrativos. Outra potencial explicação para esta variabilidade é a metilação numa pequena proporção de células malignas [159-161].

Também no decorrer desta avaliação, houve amostras incluídas em parafina cujos resultados foram excluídos, devido ao DNA extraído de blocos de parafina se encontrar degradado e as sondas não conseguirem hibridar.

Para um indivíduo participante neste estudo, para além do tecido tumoral (tecido fresco e tecido incluído em parafina) avaliou-se também a hipermetilação em sangue periférico. Verificou-se que a nível do tecido tumoral este indivíduo apresentava uma hipermetilação moderada, 55% e 59%, respectivamente para tecido fresco e parafina, enquanto, ao nível do sangue periférico, se verificou ausência de hipermetilação, 6%, o que está de acordo com o esperado.

Os resultados obtidos por MS-MLPA para as 38 amostras estudadas, encontram-se apresentados, na Tabela 19.

Tabela 19 – Resultados obtidos por MS-MLPA para avaliar o estado de hipermetilação da região promotora do gene *MGMT*, de acordo com os diferentes subtipos de gliomas. Os números representam a totalidade de indivíduos nos quais foram observadas alterações epigenéticas.

Diagnóstico histológico	Astrocitoma pilocítico (I) Astrocitoma difuso (II) Astrocitoma anaplásico (III) GBM (IV)				Oligodendroglioma (II) Oligodendroglioma anaplásico (III)		Oligoastrocitoma (II) Oligoastrocitoma anaplásico (III)		Ependimoma (II) Ependimoma anaplásico (III)	
Hipermetilação da região promotora do gene <i>MGMT</i>										
<i>Ausente</i>	-	1	-	10	-	-	-	-	-	2
<i>Média</i>	-	-	-	17	-	2	-	-	-	-
<i>Moderada</i>	-	-	-	3	-	2	1	-	-	-
<i>Extensa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total das amostras 38	0	1	0	30	0	4	1	0	0	2

De acordo com a Tabela 19 e com os *cut-offs* definidos por Jeuken e colaboradores (2007), verificou-se que, em 30 glioblastomas (GBM) analisados, 10 não apresentaram hipermetilação da região promotora do gene em estudo, 17 apresentaram hipermetilação média e 3 apresentaram hipermetilação moderada. Em oligodendrogliomas anaplásicos, 2 apresentaram hipermetilação média e 2 apresentaram hipermetilação moderada. Por sua vez, o astrocitoma difuso e os ependimomas anaplásicos que entraram neste estudo, nenhum deles apresentou hipermetilação. O único caso de oligoastrocitoma que se estudou, revelou uma hipermetilação moderada para a região promotora em estudo. É importante referir que, o grupo de doentes foi heterogêneo, incluindo glioblastomas primários e secundários, os quais foram sujeitos a diferentes tipos de cirurgia e a diferentes tratamentos.

Porque o subtipo de tumor glioblastoma foi o mais representativo na população estudada, restringiu-se a avaliação a estes tumores. Trata-se de tumores de alto grau, geralmente submetidos a tratamentos por agentes alquilantes, podendo, por isso, beneficiar desta alteração epigenética [14, 162]. Vários estudos demonstraram que a

inativação do gene *MGMT* pela hipermetilação da região promotora parece aumentar a sensibilidade dos tumores à quimioterapia com agentes alquilantes e, conseqüentemente, contribuir para uma melhoria no prognóstico dos doentes com gliomas [15, 163-165]. Contudo, há outros estudos clínicos que questionam a verdadeira implicação do *MGMT* como marcador de prognóstico ou preditivo da quimioterapia com agentes alquilantes [163, 165, 166].

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que, 33% dos doentes com glioblastomas não apresentavam a região promotora do gene *MGMT* metilada e 67% dos doentes com glioblastomas apresentavam hipermetilação média ou moderada. Nenhum doente no estudo apresentou hipermetilação extensa (Figura 25).

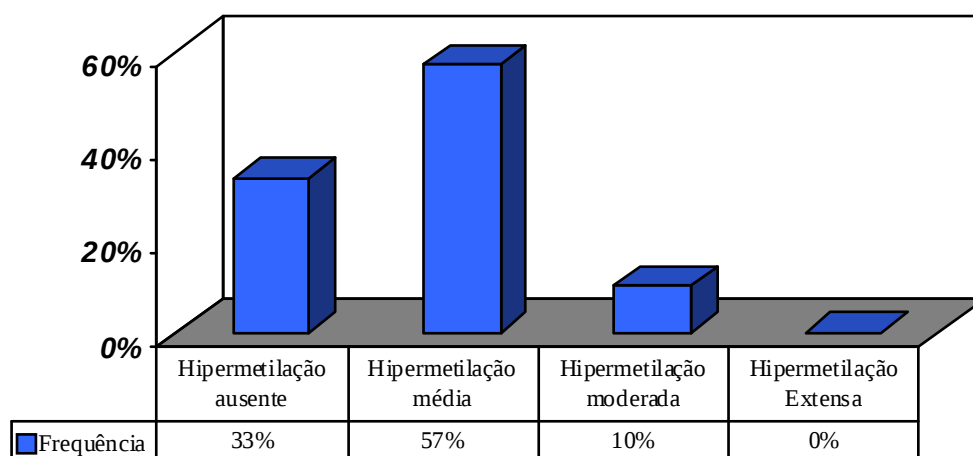


Figura 25 – Distribuição do estado de hipermetilação da região promotora do gene *MGMT* em glioblastomas.

De notar que, frequências relativamente semelhantes foram encontradas para a população estudada por Jeuken, em 2007, nomeadamente, 45% dos indivíduos não apresentavam hipermetilação e 55% apresentavam hipermetilação média, moderada ou extensa. Também, Hegi (2005), Cankovic (2007) e Zawlik (2009), consideraram que o silenciamento epigenético causado pela hipermetilação da região promotora do gene *MGMT* esteve presente em 40%-50% dos glioblastomas [164, 167, 168].

Curiosamente, em tumores oligodendrogliais têm-se observado também uma frequência elevada de hipermetilação na região promotora do gene *MGMT* [147, 169]. No entanto, para esta população foram apenas estudados 4 tumores oligodendrogliais (grau III), os quais apresentavam uma hipermetilação média ou moderada. Apesar da amostragem ser reduzida, estes resultados estão de acordo com o observado por Yang,

em 2009. Este autor verificou que, em 19 oligodendrogliomas anaplásicos que analisou, todos eles estavam hipermetilados, tendo concluído que todos os tumores oligodendrogliais de alto grau (grau III) apresentavam a região promotora do *MGMT* hipermetilado. Mollemann e colaboradores também associaram a hipermetilação deste gene à sua baixa ou ausente expressão em tumores oligodendrogliais e verificaram que, 88% destes tumores estavam metilados [169]. Apesar da população estudada no presente Projecto não ser constituída por oligodendrogliomas de grau II, foi observado por Esteller, uma frequência de hipermetilação mais baixa (31%) para estes tumores, comparativamente aos oligodendrogliomas anaplásicos (grau III) [170]. Assim, foi sugerido que, a hipermetilação do *MGMT* é uma alteração tardia na progressão de oligodendrogliomas [171]. Estudos futuros, nomeadamente nesta população de doentes dos HUC, poderão ajudar a comprovar esta hipótese.

Em relação à idade, não se observou uma relação estatisticamente significativa entre o estado de hipermetilação da região promotora do gene *MGMT* e a média de idade no diagnóstico (Tabela 20), contrariamente ao observado por Mollemann que sugeriu que a hipermetilação é mais frequente em indivíduos mais velhos [169].

Tabela 20 – Médias de idade no diagnóstico dos doentes com glioblastomas consoante o estado de hipermetilação da região promotora do gene *MGMT*.

<i>Média de idade no diagnóstico ± desvio padrão (anos)</i>	
<i>Hipermetilação ausente</i>	<i>Hipermetilação presente</i>
61±12	62±11

4.3.4 Análise da sobrevida

Vários autores têm referido que a inactivação do gene *MGMT* pela hipermetilação da região promotora parece aumentar a sensibilidade dos tumores à quimioterapia com agentes alquilantes, contribuindo deste modo para uma melhoria no prognóstico dos doentes com gliomas [172-175].

Numa primeira fase deste estudo, analisou-se a hipermetilação da região promotora do gene *MGMT*, independentemente de os doentes terem feito tratamento, ou não. Nesta fase, não se observou uma relação estatisticamente significativa entre a sobrevida dos doentes que apresentavam a região promotora do gene *MGMT* hipermetilada e a sobrevida dos doentes que não apresentavam esta região hipermetilada (8 ± 1 vs 6 ± 1 meses, respectivamente) (Figura 26).

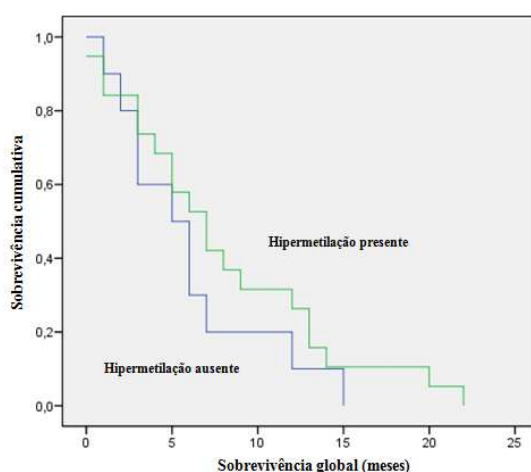


Figura 26 – Curva de *Kaplan-Meier* para doentes com glioblastomas comparando a sobrevida dos doentes com hipermetilação da região promotora do gene *MGMT* e dos doentes sem esta região hipermetilada.

No entanto e tendo em conta o referido na literatura, a hipermetilação da região promotora do gene *MGMT* poderá ser um factor vantajoso mas para os doentes que fazem tratamento por quimioterapia [14, 163, 176, 177].

No presente estudo, estratificou-se a análise tendo em conta o tratamento com quimioterapia/radioterapia. Nesta situação, verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre a existência de hipermetilação e tratamento e a sobrevida dos doentes ($p<0,001$). Confirmou-se que, os doentes que apresentavam a região promotora do gene *MGMT* hipermetilada e que foram sujeitos a tratamento, incluindo por agentes alquilantes, apresentaram uma sobrevida maior (14 ± 2 meses vs 5 ± 1 meses) (Figura 27).

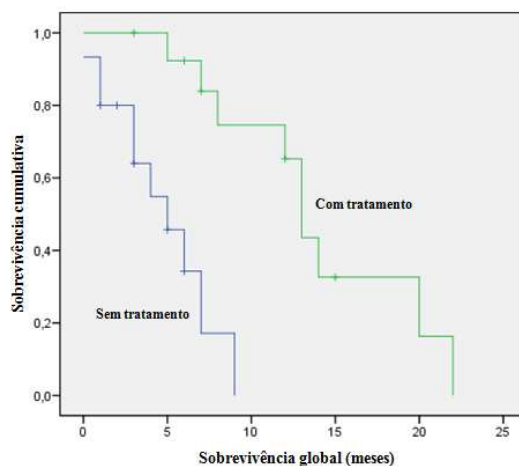
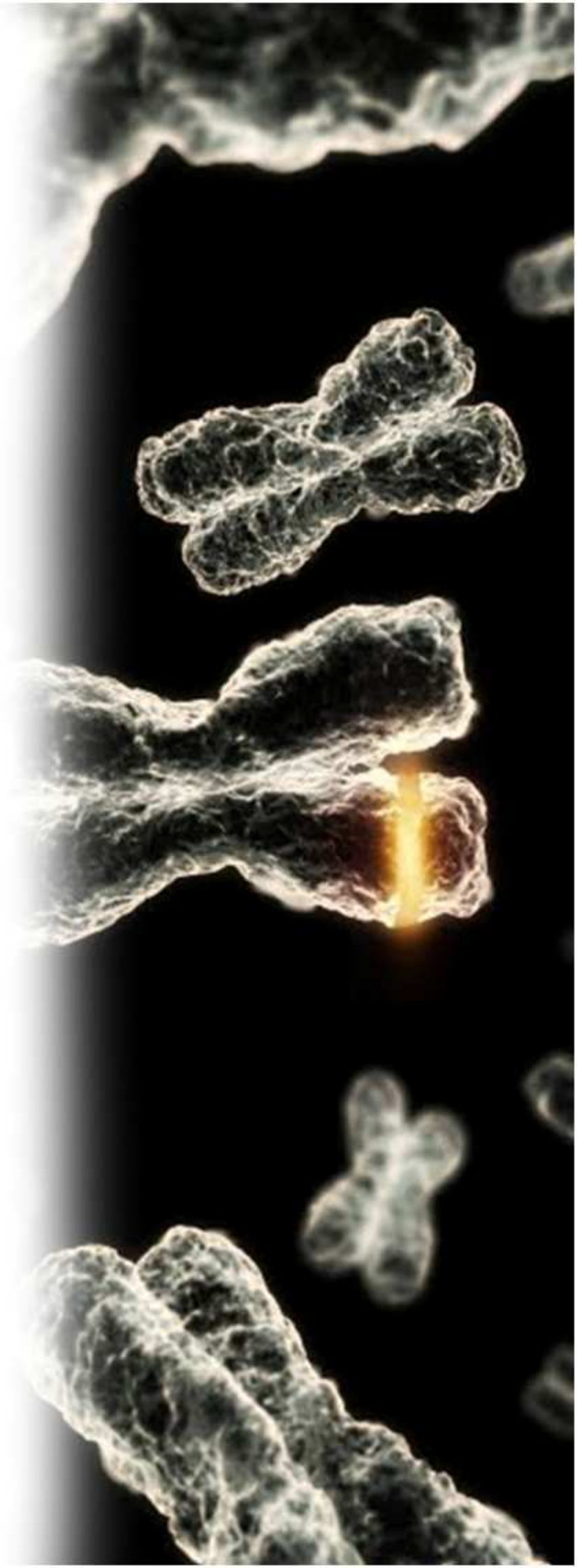


Figura 27 – Curva de *Kaplan-Meier* para doentes com glioblastomas e com a região promotora do gene *MGMT* hipermetilada, comparando a sobrevida dos doentes que não foram submetidos a quimioterapia com a sobrevida dos doentes que o foram.

Deste modo, a avaliação da hipermetilação da região promotora do gene *MGMT* poderá ser útil como marcador preditivo da resposta dos tumores à quimioterapia. A sua implementação num laboratório de rotina poderá fornecer informações importantes ao clínico ao nível das decisões terapêuticas mais adequadas para cada doente. Assim, a quimioterapia mediada pelos agentes alquilantes poderá apenas ser incorporada no regime de tratamento para os doentes que apresentem a região promotora do gene *MGMT* hipermetilada. Doentes sem esta região hipermetilada revelam menos probabilidade de terem benefícios terapêuticos com estes agentes e, por isso, não será indicado, para os mesmos, o tratamento por quimioterapia, evitando-se, assim, a toxicidade hematopoiética provocada por estes tratamentos.

aaagtcatgttggcaataatgtgatt
tggtttttttttcatggcccagaaat
ccaacttgtatgtgttttattccttat
ggatatctacacccattaagcaaggta
aattgagaaatgcatatatgtataac
atttacacacatttagctaaaggcaa
caaataaacttacaaataggcgtcca
acacattttttttcaaacatgctgtt
tttccttttatccttttattcagttat
atgatattgccatttttatgttggtat
tcatatgggttcaaccagatctgtggt
acactggctgcacaataggatcccct
aagtttttttgggtgggttttgtttgc
ttgatttgtttcctttgttttagtttc
gcttgagtaccaccctacacaaatta
tgaattccatgggggttcaggcatttt
gctccccagggtgaatctaattgtgcaa
agaaccaccaagattgtattaaaca
ccatcatgcataaaagaaaaaactgg
tactatgggttcacacctgtaatccta
ttggaggccaatttgggaagcactgct
ccaggagttagagactagcctggacg
agtgggtgcaaactcgctaattcttgta
aacatagcagaaccctgtctctacaa
aaaagtatttcaataattatgtcaat
tcatggaagagccagttttgtttatt
acaaagtgagtaggcgaagctgagtg
ggcatgtgcctatagtcccagctac
aggctgaggcctgaggatcccttaag
aggagttcaaggttacagctatgagc
tcacaccactgcctacgcaacagagc
accctgtctcgaaaaagaaaaagaaa
aactgactcggtagttgaaagcagcc
ctaaagcattccttctgctggaaa
tattgcttctttacttctgtaccagt
cttggttgccaaattaagcaaaaaaac
agtaaacaaaatcaaagttcagtgtt
actgaggtttcagactttcacagaaa
ttatgtcttaaaaggaccttaaaaaac
aatctctcatgctgaaatccagaggt
ttagccatcattgaaaacagtgtgt
gggtaaacagtttagtccttgagggg
taactttgttccactctgtggctaaa
atcctttcatcctggccaaagccttc
tagctcccagggggcccaagcaaggga
tagatggcagtggtgcaaactcgcta
gtgccatcattgaaaacagtgtgttg
gggtaaacagtttagtccttgagggg
taactttgttccactctgtggctaaa
atcctttcatcctggccaaagccttc
tagctcccagggggcccaagcaaggga
tagatggcagtggtgcaaactcgcta
gtaagatggcagtggtgcaaactcgct
ttgtccagatgcaatcgtacccctc

Conclusões e Perspectivas Futuras



5. Conclusões e Perspectivas Futuras

Nas últimas décadas, múltiplas têm sido as alterações identificadas, quer genéticas quer epigenéticas, associadas ao desenvolvimento e progressão de gliomas, que têm contribuído para o esclarecimento dos mecanismos moleculares inerentes à formação destes tumores. É importante referir que, compreender a patogénese da doença é crucial para a criação de estratégias eficazes no diagnóstico, prognóstico e controlo da doença.

No entanto, apesar dos avanços tecnológicos, quer ao nível da neuroimagem, quer das técnicas cirúrgicas, histológicas e das várias opções de tratamento disponíveis, o prognóstico dos doentes com gliomas continua a ser muito reservado. Assim, têm sido investigados, recentemente, novos marcadores neuro-oncológicos e tem sido avaliada a sua utilidade em termos do diagnóstico, prognóstico e valor preditivo de resposta ao tratamento.

Desta forma, no presente Projecto, a possibilidade de avaliar diferentes marcadores para um grupo de doentes com diferentes tipos de gliomas, seguidos nos HUC, apresentou-se como um grande desafio. Com esta avaliação esperou-se responder a algumas das perguntas com que os clínicos se têm vindo a deparar na sua prática diária, nomeadamente, no acompanhamento destes doentes e na progressão da doença. Também em termos terapêuticos e de prognóstico, a avaliação destes marcadores mostrou ser promissora para seleccionar doentes que pudessem vir a beneficiar de diferentes opções de tratamento, abrindo-lhes uma janela de esperança.

Foram três os marcadores que se avaliaram neste Projecto: a perda alélica 1p/19q, a presença de mutações nos genes *IDH1* e *IDH2* e o estado de hipermetilação da região promotora do gene *MGMT*.

As alterações cromossómicas, envolvendo as regiões 1p e 19q avaliadas neste Projecto, foram eventos comuns na população de gliomas estudada. A codelecção 1p/19q mostrou ser um bom marcador de diagnóstico em oligodendrogliomas, independentemente do grau. Pensa-se que, estudos futuros, que envolvam um maior número de indivíduos com oligodendrogliomas e portadores da codelecção poderão vir a ser mais informativos em termos de prognóstico/sobrevida dos doentes.

Assim, a implementação deste marcador de diagnóstico poderá ter uma grande utilidade na rotina de um laboratório de neuropatologia, quando a histologia não é

suficiente para a realização de um diagnóstico preciso. No entanto, é importante referir que a codelecção 1p/19q não deve ser analisada como critério isolado dado que, no presente estudo, 28% dos oligodendrogliomas não são portadores da codelecção. De notar que, nos doentes estudados também um número significativo de glioblastomas apresentaram a codelecção ou a perda isolada de uma destas regiões cromossómicas. Em termos futuros pretende-se que, à medida que o número de doentes estudados for aumentando, se consiga comparar a sobrevida deste grupo de glioblastomas com delecção com o grupo de glioblastomas sem delecção.

A importância da implementação deste teste como meio complementar de diagnóstico face à análise histológica e à avaliação clínica é reforçada, pelo facto de, alguns serviços de neurocirurgia já requererem a avaliação da codelecção 1p/19q no diagnóstico dos doentes com tumores oligodendrogliais.

Através dos resultados obtidos para o segundo marcador estudado, pesquisa de mutações no gene *IDH1*, foi possível identificar e caracterizar 3 mutações diferentes neste gene em 17 doentes portadores de mutação, enquanto, nenhuma mutação foi identificada no gene *IDH2*. Este marcador foi útil na distinção entre glioblastomas primários e secundários, o que sugere que estes dois subtipos tumorais constituem entidades geneticamente distintas. De notar que, estes dois tumores são indistinguíveis histologicamente, daí este marcador ter tido aqui um papel preponderante.

Mutações no gene *IDH1* foram identificadas em doentes diagnosticados, em média, 13 anos mais novos do que os doentes sem a mutação. A identificação das mutações neste gene poderá ajudar o clínico a estabelecer um prognóstico mais favorável ao doente pois o estudo revelou sobrevidas, em média, mais longas, para portadores da mutação, independentemente do tratamento a que foram submetidos.

Também a implementação deste marcador, a nível de rotina hospitalar, parece ser bastante útil, uma vez que, esta análise é exequível e rápida pois todas as mutações identificadas estão localizadas no codão 132 do gene *IDH1* o que implica estudar só esta região em particular, em termos de diagnóstico. A identificação de mutações em gliomas de grau II e III poderá ser relevante pois facilitará ao clínico a definição de mais campos de actuação terapêutica dado que é esperado que estes doentes tenham uma sobrevida mais longa e uma progressão da doença mais lenta. Também em termos futuros, a análise genética deste gene em doentes com gliomas poderá desempenhar um papel fulcral na selecção de doentes para potencial inclusão em ensaios clínicos onde

diferentes fármacos poderão ser testados ou novas combinações terapêuticas poderão ter lugar enquanto o tumor ainda apresenta um grau de malignidade susceptível de ser de alguma maneira controlado. Dado que nenhuma mutação no codão 172 do gene *IDH2* foi identificada e, já que, outros estudos também referem que estas mutações são muito raras, eventualmente, não se justificará a identificação desta alteração na rotina hospitalar.

A avaliação do terceiro marcador, o estudo da hipermetilação da região promotora do gene *MGMT*, permitiu concluir que uma elevada percentagem de glioblastomas apresenta a região promotora hipermetilada. Os doentes com esta região hipermetilada e que foram submetidos a quimioterapia/radioterapia apresentaram um aumento de sobrevida relativamente àqueles que tinham a região promotora hipermetilada mas não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento. Isto está de acordo com o esperado, uma vez que, a hipermetilação do gene *MGMT*, implica uma reduzida ou ausente expressão proteica. No caso dos glioblastomas, em particular, este facto trará vantagens para os doentes sujeitos a tratamento, uma vez que a ausência desta enzima de reparação, torna os tumores mais sensíveis ao tratamento, nomeadamente por agentes alquilantes. Aos doentes que não são sujeitos a tratamento, esta alteração epigenética só irá ser prejudicial, dado que, a falta da enzima de reparação do DNA, aumenta a acumulação de mutações em genes que poderão ser determinantes na progressão tumoral, tais como os oncogenes e os genes supressores tumorais.

Conclui-se, portanto, que a implementação deste marcador também poderá ser útil, dado o seu valor preditivo na resposta ao tratamento com agentes alquilantes, permitindo, no futuro, seleccionar os doentes que sejam sensíveis à quimioterapia e orientar os outros doentes para terapias alternativas, potencialmente mais eficazes, dado que aos agentes alquilantes vão ser resistentes. Contudo, é importante referir que estes resultados são preliminares e, por isso, torna-se importante alargar o número de doentes com glioblastomas avaliados para este marcador e, eventualmente, alargá-lo a doentes com oligodendrogliomas, dado que, para estes, parece também ser vantajoso quando apresentam esta alteração. Seria interessante, no futuro, alargar este estudo também aos tumores secundários verificando o estado de hipermetilação da região promotora mesmo após tratamentos a que tenham sido sujeitos, entre a primeira cirurgia e a recidiva. Existem, porém, diferentes aspectos que necessitam de ser clarificados, nomeadamente: se existem regiões CpG na região promotora do gene *MGMT* mais determinantes para o

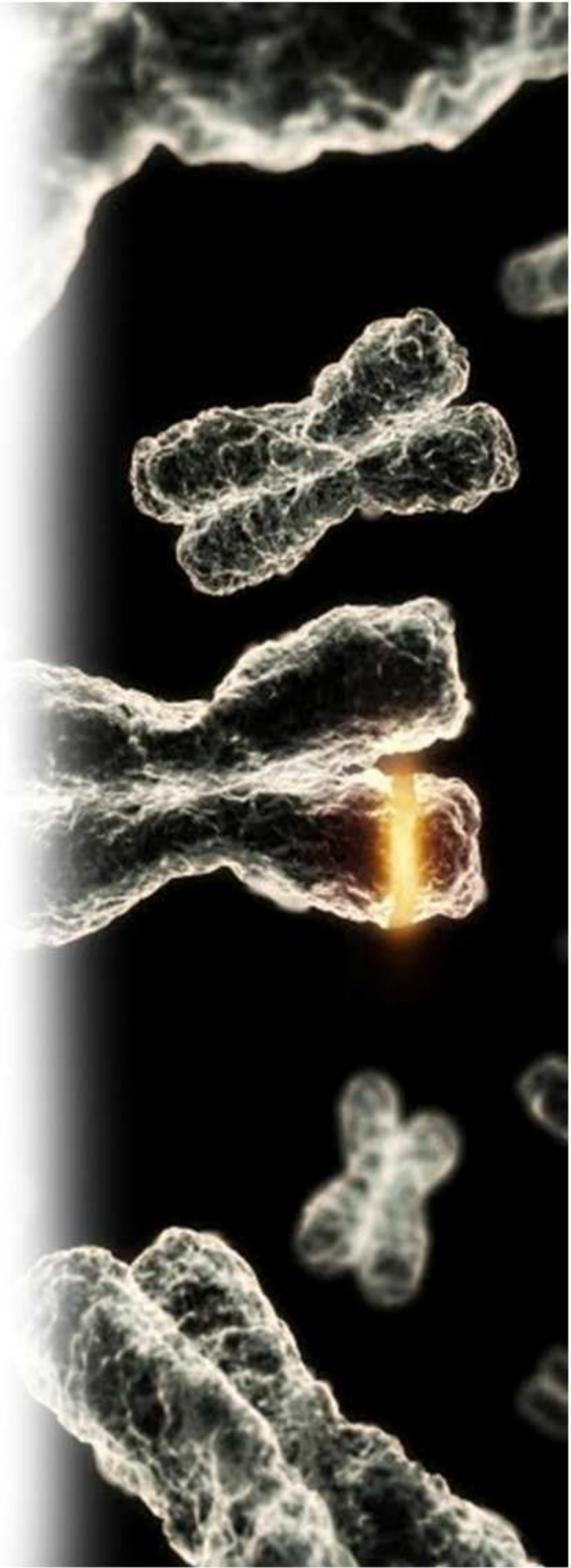
silenciamento do gene e, por isso, mais informativos quanto à quimiosensibilidade; se existe um *cut-off* de hipermetilação que se possa definir para identificar os doentes que vão responder ao tratamento por quimioterapia daqueles que vão ser resistentes e se existe uma correlação positiva entre a percentagem de hipermetilação e a sobrevida dos doentes. Também a comparação da expressão da proteína por imunohistoquímica e o estado de hipermetilação da região promotora pelo método usado no presente Projecto é um estudo a ser desenvolvido no futuro.

Em termos clínicos, seria um enorme benefício para os doentes com esta patologia se houvesse possibilidades de criar inibidores de MGMT que fossem administrados antes do tratamento com agentes alquilantes como a temozolomida, tornando os tumores mais sensíveis a estes agentes, modelando, assim, a resistência.

Numa época de investigação translacional e de grandes avanços tecnológicos e científicos é importante ter a capacidade de proporcionar aos doentes os melhores meios de cuidados de saúde. Este facto, inclui a realização de um diagnóstico preciso, o mais cedo possível, de forma a prever e controlar o prognóstico para cada caso e ainda personalizar o tipo de tratamento mais adequado e eficaz para doentes previamente seleccionados. Assim, através dos resultados obtidos neste Projecto, a análise destes três marcadores, em laboratórios de rotina, poderá trazer vantagens, tanto ao nível do diagnóstico como do prognóstico e, ainda, das decisões terapêuticas.

gtgctcatgtgtgcaataacgtgattt
gtttttttttttcatggcccagaaatt
ccaacttgatatgtgtttttattcctt
ggatatctacaccattaagcaaggta
aattgagaaatgcatatatgtataact
atttacacacatttagctaaaggcaac
caaataaacttacaaataggcgtccat
acacatttttttcaaacatgctgttt
tttccttttatcctttttattcagttat
atgatattgccattttttatgttggtac
ccatatgggttcaaccagatctgtggtt
acactggctgcacaataggatcccctt
aagtttttttgggtgggtttgttttgct
ttgatttgtttctttgttttagtttca
gcttgagtaccaccctacacaaattac
tgaattccatgggggttcaggcattttt
gtccccagggtgaatctaattgtgcaac
agaaccaccaagattgtattaaacat
ccatcatgcataaaagaaaaaactggc
tactatgggttcacacctgtaatccta
ttggaggccaatttggaagcactgctt
ccaggagtttgagactagcctggacga
agtgggtgcaaactcgctaattctgtac
aacatagcagaaccctgtctctacaac
aaaagtatttcaataattatgtcaatt
tcatggaagagccagttttgtttattc
acaaagtgagtagggcgaagctgagtg
ggcatgtgcctatagtcccagctact
aggctgaggcctgaggatcccttaagc
aggagttcaaggttacagctatgagct
tcacaccactgcctacgcaacagagca
accctgtctcgaaaaagaaaaagaaac
aactgactcggtagttgaaagcagcct
ctaaagcattccttcctgcctggaaac
cattgcttctttacttctgtaccagta
cttggttgccaaattaagcaaaaaaact
agtaaacaaaatcaaagttcagtggtt
actgaggtttcagactttcacagaaag
ctatgtcttaaaaggaccttaaaaac
aatctctcatgctgaaatccagaggtt
ctgtagccatcattgaaaacagtgtgtt
gggtaaacagtttagtccttgaggggt
caactttgttccactctgtggctaaac
atcctttcatcctggccaaagccttca
cagctcccagggggccaagcaagggac
cagatggcagtggtgcaaactcgctac
gtgccatcattgaaaacagtgtgttga
gggtaaacagtttagtccttgaggggt
caactttgttccactctgtggctaaac
atcctttcatcctggccaaagccttca
cagctcccagggggccaagcaagggac
cagatggcagtggtgcaaactcgctac
gtaagatggcagtggtgcaaactcgct
ctgtaagatggcagtggtgcaaactcg

Referências bibliográficas



6. Referências Bibliográficas

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
2. Negrini, S., V.G. Gorgoulis, and T.D. Halazonetis, *Genomic instability--an evolving hallmark of cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol. **11**(3): p. 220-8.
3. Ohgaki, H., et al., *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6892-9.
4. Huse, J.T. and E.C. Holland, *Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma*. Nat Rev Cancer. **10**(5): p. 319-31.
5. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas*. Cancer Sci, 2009. **100**(12): p. 2235-41.
6. Fu, Y., et al., *Glioma-derived mutations in IDH: from mechanism to potential therapy*. Biochem Biophys Res Commun. **397**(2): p. 127-30.
7. Balss, J., et al., *Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors*. Acta Neuropathol, 2008. **116**(6): p. 597-602.
8. Watanabe, T., et al., *IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas*. Am J Pathol, 2009. **174**(4): p. 1149-53.
9. Yan, H., et al., *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. N Engl J Med, 2009. **360**(8): p. 765-73.
10. Bleeker, F.E., et al., *The prognostic IDH1(R132) mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma*. Acta Neuropathol. **119**(4): p. 487-94.
11. Nobusawa, S., et al., *IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(19): p. 6002-7.
12. Hadnagy, A., R. Beaulieu, and D. Balicki, *Histone tail modifications and noncanonical functions of histones: perspectives in cancer epigenetics*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(4): p. 740-8.
13. Esteller, M., et al., *A gene hypermethylation profile of human cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(8): p. 3225-9.
14. Hegi, M.E., et al., *Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity*. J Clin Oncol, 2008. **26**(25): p. 4189-99.
15. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents*. N Engl J Med, 2000. **343**(19): p. 1350-4.
16. Nygren, A.O., et al., *Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(14): p. e128.
17. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
18. Schwartzbaum, J.A., et al., *Epidemiology and molecular pathology of glioma*. Nat Clin Pract Neurol, 2006. **2**(9): p. 494-503; quiz 1 p following 516.
19. Pelengaris, S., Khan, M, *The Molecular Biology of Cancer*, ed. Blackwell and Publishing. 2006. 1-30; 63-65, 120-157, 383.

20. Kamangar, F., G.M. Dores, and W.F. Anderson, *Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world*. J Clin Oncol, 2006. **24**(14): p. 2137-50.
21. Organization, W.H., *World Health Statistics*. WHO Press. 2007, Geneva.
22. Ferlay, J., et al., *Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006*. Ann Oncol, 2007. **18**(3): p. 581-92.
23. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer.
24. Kumar, V.e.a., *Basic Pathology*, ed. Saunders. 2003.
25. Brennan, P., *Gene-environment interaction and aetiology of cancer: what does it mean and how can we measure it?* Carcinogenesis, 2002. **23**(3): p. 381-7.
26. Pecorino, L., *Molecular Biology of Cancer – Mechanisms, Targets and Therapeutics*, ed. Oxford. 2005. 1-14, 69, 70, 80, 96.
27. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2005*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(1): p. 10-30.
28. Rickert, C.H. and W. Paulus, *Epidemiology of central nervous system tumors in childhood and adolescence based on the new WHO classification*. Childs Nerv Syst, 2001. **17**(9): p. 503-11.
29. Ferlay J, B.F., Pisani P, Parkin DM, *GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*. Cancer Incidence and Mortality Worldwide (CR-rom) ed. 2004, Lyon.
30. Wrensch, M., et al., *Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature*. Neuro Oncol, 2002. **4**(4): p. 278-99.
31. Preston, S.M., *The Gliomas: Epidemiology*. 1st ed ed, ed. W.B.S. Company. 1999, Philadelphia.
32. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Epidemiology and etiology of gliomas*. Acta Neuropathol, 2005. **109**(1): p. 93-108.
33. Kleihues, P. and L.H. Sobin, *World Health Organization classification of tumors*. Cancer, 2000. **88**(12): p. 2887.
34. Figarella-Branger, D. and C. Bouvier, *[Histological classification of human gliomas: state of art and controversies]*. Bull Cancer, 2005. **92**(4): p. 301-9.
35. Maher, E.A., et al., *Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter*. Genes Dev, 2001. **15**(11): p. 1311-33.
36. Dunbar, E. and A.T. Yachnis, *Glioma diagnosis: immunohistochemistry and beyond*. Adv Anat Pathol. **17**(3): p. 187-201.
37. Ponten, J., *Precancer biology: importance and possible prevention. Introduction*. Cancer Surv, 1998. **32**: p. 1-3.
38. Chintala, S.K., J.C. Tonn, and J.S. Rao, *Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas*. Int J Dev Neurosci, 1999. **17**(5-6): p. 495-502.
39. Burger, P.C., et al., *Pathology of diencephalic astrocytomas*. Pediatr Neurosurg, 2000. **32**(4): p. 214-9.
40. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
41. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1445-53.
42. Zhu, J.Z., H. L.; Wong, E. T, *Cancer of Nervous System: Molecular Genetics of Brain Tumors*. 2nd ed ed, ed. L.W. Wilkins. 2005, Philadelphia. 793.

43. Peiffer, J. and P. Kleihues, *Hans-Joachim Scherer (1906-1945), pioneer in glioma research*. Brain Pathol, 1999. **9**(2): p. 241-5.
44. Tohma, Y., et al., *PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 1998. **57**(7): p. 684-9.
45. Batchelor, T.T., et al., *Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(1 Pt 1): p. 228-33.
46. Kleihues, P. and H. Ohgaki, *Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors*. Toxicol Pathol, 2000. **28**(1): p. 164-70.
47. Society, A.C. *What Are the Risk Factors for Cancer?* . 2008 [cited.
48. Wen, P.Y. and S. Kesari, *Malignant gliomas in adults*. N Engl J Med, 2008. **359**(5): p. 492-507.
49. Relling, M.V., et al., *High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites*. Lancet, 1999. **354**(9172): p. 34-9.
50. Sanson, M., J. Thillet, and K. Hoang-Xuan, *Molecular changes in gliomas*. Curr Opin Oncol, 2004. **16**(6): p. 607-13.
51. Louis, D.N., *Molecular pathology of malignant gliomas*. Annu Rev Pathol, 2006. **1**: p. 97-117.
52. Ichimura, K., et al., *Molecular pathogenesis of astrocytic tumours*. J Neurooncol, 2004. **70**(2): p. 137-60.
53. *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1061-8.
54. Mckernan, R.O., Thomas, D. G. T, *The clinical study of gliomas*. In Brain Tumours: scientific basis, clinical investigation and current therapy, ed. Butterworths. 1980, London. 194-230.
55. Todd, N.V., T. McDonagh, and J.D. Miller, *What follows diagnosis by computed tomography of solitary brain tumour? Audit of one year's experience in South East Scotland*. Lancet, 1987. **1**(8533): p. 611-2.
56. Eoli, M., et al., *Molecular markers of gliomas: a clinical approach*. Neurol Res, 2006. **28**(5): p. 538-41.
57. Laws, E.R., Jr. and M.E. Shaffrey, *The inherent invasiveness of cerebral gliomas: implications for clinical management*. Int J Dev Neurosci, 1999. **17**(5-6): p. 413-20.
58. Riemenschneider, M.J., et al., *Molecular diagnostics of gliomas: state of the art*. Acta Neuropathol.
59. Roerig, P., et al., *Molecular classification of human gliomas using matrix-based comparative genomic hybridization*. Int J Cancer, 2005. **117**(1): p. 95-103.
60. Smith, J.S., et al., *Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas*. J Clin Oncol, 2000. **18**(3): p. 636-45.
61. Bigner, S.H., et al., *Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization*. Am J Pathol, 1999. **155**(2): p. 375-86.
62. Reifenberger, J., et al., *Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p*. Am J Pathol, 1994. **145**(5): p. 1175-90.
63. von Deimling, A., et al., *Evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astrocytomas, oligodendrogliomas, and mixed gliomas*. Cancer Res, 1992. **52**(15): p. 4277-9.

64. Rosenberg, J.E., et al., *Refined deletion mapping of the chromosome 19q glioma tumor suppressor gene to the D19S412-STD interval*. *Oncogene*, 1996. **13**(11): p. 2483-5.
65. Cairncross, J.G., et al., *Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas*. *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(19): p. 1473-9.
66. Chahlav, A., et al., *Impact of chromosome 1p status in response of oligodendroglioma to temozolomide: preliminary results*. *J Neurooncol*, 2003. **61**(3): p. 267-73.
67. Weller, M., et al., *Combined 1p/19q loss in oligodendroglial tumors: predictive or prognostic biomarker?* *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(23): p. 6933-7.
68. Cairncross, G., et al., *Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(18): p. 2707-14.
69. Ricard, D., et al., *Dynamic history of low-grade gliomas before and after temozolomide treatment*. *Ann Neurol*, 2007. **61**(5): p. 484-90.
70. Jenkins, R.B., et al., *A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma*. *Cancer Res*, 2006. **66**(20): p. 9852-61.
71. Griffin, C.A., et al., *Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006. **65**(10): p. 988-94.
72. Ducray, F., S. El Hallani, and A. Idbaih, *Diagnostic and prognostic markers in gliomas*. *Curr Opin Oncol*, 2009. **21**(6): p. 537-42.
73. Ichimura, K., et al., *1p36 is a preferential target of chromosome 1 deletions in astrocytic tumours and homozygously deleted in a subset of glioblastomas*. *Oncogene*, 2008. **27**(14): p. 2097-108.
74. Idbaih, A., et al., *Two types of chromosome 1p losses with opposite significance in gliomas*. *Ann Neurol*, 2005. **58**(3): p. 483-7.
75. Benetkiewicz, M., et al., *NOTCH2 is neither rearranged nor mutated in t(1;19) positive oligodendrogliomas*. *PLoS One*, 2009. **4**(1): p. e4107.
76. Dong, S., et al., *Transcriptional inactivation of TP73 expression in oligodendroglial tumors*. *Int J Cancer*, 2002. **98**(3): p. 370-5.
77. Barbashina, V., et al., *Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(3): p. 1119-28.
78. McDonald, J.M., et al., *Attenuated expression of DFFB is a hallmark of oligodendrogliomas with 1p-allelic loss*. *Mol Cancer*, 2005. **4**: p. 35.
79. McDonald, J.M., et al., *The SHREW1 gene, frequently deleted in oligodendrogliomas, functions to inhibit cell adhesion and migration*. *Cancer Biol Ther*, 2006. **5**(3): p. 300-4.
80. Tews, B., et al., *Hypermethylation and transcriptional downregulation of the CITED4 gene at 1p34.2 in oligodendroglial tumours with allelic losses on 1p and 19q*. *Oncogene*, 2007. **26**(34): p. 5010-6.
81. Riemenschneider, M.J., J. Reifenberger, and G. Reifenberger, *Frequent biallelic inactivation and transcriptional silencing of the DIRAS3 gene at 1p31 in oligodendroglial tumors with 1p loss*. *Int J Cancer*, 2008. **122**(11): p. 2503-10.

82. Wolf, R.M., et al., *p190RhoGAP can act to inhibit PDGF-induced gliomas in mice: a putative tumor suppressor encoded on human chromosome 19q13.3*. Genes Dev, 2003. **17**(4): p. 476-87.
83. Kunitz, A., et al., *DNA hypermethylation and aberrant expression of the EMP3 gene at 19q13.3 in Human Gliomas*. Brain Pathol, 2007. **17**(4): p. 363-70.
84. Bello, M.J., et al., *hRAD54 gene and 1p high-resolution deletion-mapping analyses in oligodendrogliomas*. Cancer Genet Cytogenet, 2000. **116**(2): p. 142-7.
85. Raghavan, R., et al., *Pediatric oligodendrogliomas: a study of molecular alterations on 1p and 19q using fluorescence in situ hybridization*. J Neuropathol Exp Neurol, 2003. **62**(5): p. 530-7.
86. Perry, A., et al., *Small cell astrocytoma: an aggressive variant that is clinicopathologically and genetically distinct from anaplastic oligodendroglioma*. Cancer, 2004. **101**(10): p. 2318-26.
87. Sasaki, H., et al., *PTEN is a target of chromosome 10q loss in anaplastic oligodendrogliomas and PTEN alterations are associated with poor prognosis*. Am J Pathol, 2001. **159**(1): p. 359-67.
88. Brandes, A.A., et al., *Correlations between O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation status, 1p and 19q deletions, and response to temozolomide in anaplastic and recurrent oligodendroglioma: a prospective GICNO study*. J Clin Oncol, 2006. **24**(29): p. 4746-53.
89. Aldape, K., P.C. Burger, and A. Perry, *Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(2): p. 242-51.
90. Gadj, M., et al., *Is the 1p/19q deletion a diagnostic marker of oligodendrogliomas?* Cancer Genet Cytogenet, 2009. **194**(1): p. 12-22.
91. Kang, M.R., et al., *Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers*. Int J Cancer, 2009. **125**(2): p. 353-5.
92. Geisbrecht, B.V. and S.J. Gould, *The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30527-33.
93. Xu, X., et al., *Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33946-57.
94. Lee, S.M., et al., *Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(11): p. 1185-96.
95. Winkler, B.S., N. DeSantis, and F. Solomon, *Multiple NADPH-producing pathways control glutathione (GSH) content in retina*. Exp Eye Res, 1986. **43**(5): p. 829-47.
96. Ying, W., *NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(2): p. 179-206.
97. Pollard, P.J. and P.J. Ratcliffe, *Cancer. Puzzling patterns of predisposition*. Science, 2009. **324**(5924): p. 192-4.
98. Zhao, S., et al., *Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha*. Science, 2009. **324**(5924): p. 261-5.
99. Dang, L., et al., *Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate*. Nature. **465**(7300): p. 966.

100. Struys, E.A., et al., *Mutations in the D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene cause D-2-hydroxyglutaric aciduria*. Am J Hum Genet, 2005. **76**(2): p. 358-60.
101. Aghili, M., F. Zahedi, and E. Rafiee, *Hydroxyglutaric aciduria and malignant brain tumor: a case report and literature review*. J Neurooncol, 2009. **91**(2): p. 233-6.
102. Sanson, M., et al., *Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas*. J Clin Oncol, 2009. **27**(25): p. 4150-4.
103. Parsons, D.W., et al., *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1807-12.
104. Gravendeel, L.A., et al., *Segregation of non-p.R132H mutations in IDH1 in distinct molecular subtypes of glioma*. Hum Mutat. **31**(3): p. E1186-99.
105. Bleeker, F.E., et al., *IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors*. Hum Mutat, 2009. **30**(1): p. 7-11.
106. Ducray, F., Y. Marie, and M. Sanson, *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. N Engl J Med, 2009. **360**(21): p. 2248-9; author reply 2249.
107. Weller, M., 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*. J Clin Oncol, 2009. **27**(34): p. 5743-50.
108. Capper, D., et al., *Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation*. Acta Neuropathol, 2009. **118**(5): p. 599-601.
109. Esteller, M., *The necessity of a human epigenome project*. Carcinogenesis, 2006. **27**(6): p. 1121-5.
110. Yu, J., et al., *Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma*. BMC Cancer, 2004. **4**: p. 65.
111. Espada, J., et al., *Human DNA methyltransferase 1 is required for maintenance of the histone H3 modification pattern*. J Biol Chem, 2004. **279**(35): p. 37175-84.
112. Esteller, M. and J.G. Herman, *Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours*. J Pathol, 2002. **196**(1): p. 1-7.
113. Esteller, M., *CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future*. Oncogene, 2002. **21**(35): p. 5427-40.
114. Waha, A., et al., *Epigenetic silencing of the protocadherin family member PCDH-gamma-A11 in astrocytomas*. Neoplasia, 2005. **7**(3): p. 193-9.
115. Drablos, F., et al., *Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(11): p. 1389-407.
116. Ludlum, D.B., *DNA alkylation by the haloethylnitrosoureas: nature of modifications produced and their enzymatic repair or removal*. Mutat Res, 1990. **233**(1-2): p. 117-26.
117. Pegg, A.E., *Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases*. Mutat Res, 2000. **462**(2-3): p. 83-100.
118. Srivenugopal, K.S., et al., *Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea*. Biochemistry, 1996. **35**(4): p. 1328-34.

119. Pegg, A.E., *Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents.* Cancer Res, 1990. **50**(19): p. 6119-29.
120. Ochs, K. and B. Kaina, *Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent.* Cancer Res, 2000. **60**(20): p. 5815-24.
121. Delaney, J.C. and J.M. Essigmann, *Effect of sequence context on O(6)-methylguanine repair and replication in vivo.* Biochemistry, 2001. **40**(49): p. 14968-75.
122. Coulondre, C. and J.H. Miller, *Genetic studies of the lac repressor. IV. Mutagenic specificity in the lacI gene of Escherichia coli.* J Mol Biol, 1977. **117**(3): p. 577-606.
123. Karran, P. and M. Bignami, *DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability.* Bioessays, 1994. **16**(11): p. 833-9.
124. Teicher BA, D.V.J., Hellman S., Rosenberg SA, *Antitumor alkylating agents.* 5th ed ed. Cancer: principles and practice of oncology, ed. Lippincott-Raven. 1997, Philadelphia. 405-18.
125. Paz, M.F., et al., *CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(15): p. 4933-8.
126. Gerson, S.L., *MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(4): p. 296-307.
127. Brabender, J., et al., *Quantitative O(6)-methylguanine DNA methyltransferase methylation analysis in curatively resected non-small cell lung cancer: associations with clinical outcome.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(1): p. 223-7.
128. Esteller, M. and J.G. Herman, *Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer.* Oncogene, 2004. **23**(1): p. 1-8.
129. McMurry, T.B., *MGMT inhibitors--The Trinity College-Paterson Institute experience, a chemist's perception.* DNA Repair (Amst), 2007. **6**(8): p. 1161-9.
130. Schold, S.C., Jr., et al., *O6-benzylguanine suppression of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in anaplastic gliomas.* Neuro Oncol, 2004. **6**(1): p. 28-32.
131. Curran, W.J., Jr., et al., *Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials.* J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(9): p. 704-10.
132. Nakamura, M., et al., *Genetic analysis to complement histopathological diagnosis of brain tumors.* Histol Histopathol, 2007. **22**(3): p. 327-35.
133. Grobbs, B., et al., *An ecto-nucleotide pyrophosphatase is one of the main enzymes involved in the extracellular metabolism of ATP in rat C6 glioma.* J Neurochem, 1999. **72**(2): p. 826-34.
134. Rooprai, H.K., et al., *The role of integrin receptors in aspects of glioma invasion in vitro.* Int J Dev Neurosci, 1999. **17**(5-6): p. 613-23.
135. Asthagiri, A.R., et al., *Advances in brain tumor surgery.* Neurol Clin, 2007. **25**(4): p. 975-1003, viii-ix.
136. Walker, M.D., et al., *Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery.* N Engl J Med, 1980. **303**(23): p. 1323-9.
137. Tsao, M.N., et al., *The American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO) evidence-based review of the role of radiosurgery for malignant glioma.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. **63**(1): p. 47-55.

138. Stupp, R., et al., *Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions*. J Clin Oncol, 2007. **25**(26): p. 4127-36.
139. Fine, H.A., et al., *Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults*. Cancer, 1993. **71**(8): p. 2585-97.
140. Taverna, P., et al., *Influence of O6-methylguanine on DNA damage and cytotoxicity of temozolomide in L1210 mouse leukemia sensitive and resistant to chloroethylnitrosoureas*. Anticancer Drugs, 1992. **3**(4): p. 401-5.
141. Tentori, L., et al., *Triazene compounds induce apoptosis in O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase deficient leukemia cell lines*. Leukemia, 1995. **9**(11): p. 1888-95.
142. Newlands, E.S., et al., *Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials*. Cancer Treat Rev, 1997. **23**(1): p. 35-61.
143. Brada, M., et al., *Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with glioblastoma multiforme at first relapse*. Ann Oncol, 2001. **12**(2): p. 259-66.
144. Sayagues, J.M., et al., *Intratumoral patterns of clonal evolution in meningiomas as defined by multicolor interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): is there a relationship between histopathologically benign and atypical/anaplastic lesions?* J Mol Diagn, 2004. **6**(4): p. 316-25.
145. Vital, A.L., et al., *Intratumoral patterns of clonal evolution in gliomas*. Neurogenetics. **11**(2): p. 227-39.
146. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
147. Jeuken, J.W., et al., *MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas*. Lab Invest, 2007. **87**(10): p. 1055-65.
148. Schouten, J.P., et al., *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(12): p. e57.
149. Henken, F.E., et al., *Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis*. Br J Cancer, 2007. **97**(10): p. 1457-64.
150. Mahajan, D. and R.A. Prayson, *Repeated molecular testing in gliomas: a retrospective study of 53 cases*. Am J Clin Pathol, 2009. **132**(1): p. 118-24.
151. Perry, A., et al., *Ancillary FISH analysis for 1p and 19q status: preliminary observations in 287 gliomas and oligodendroglioma mimics*. Front Biosci, 2003. **8**: p. a1-9.
152. Hergersberg, M., et al., *Age at diagnosis and loss of heterozygosity on chromosome 1p and 19q in oligodendroglial tumors*. J Neurooncol, 2006. **80**(2): p. 215-7.
153. Giannini, C., et al., *Anaplastic oligodendroglial tumors: refining the correlation among histopathology, 1p 19q deletion and clinical outcome in Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402*. Brain Pathol, 2008. **18**(3): p. 360-9.
154. Homma, T., et al., *Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(9): p. 846-54.
155. van den Bent, M.J., et al., *IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: a report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group*. Clin Cancer Res. **16**(5): p. 1597-604.

156. Ichimura, K., et al., *IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas*. Neuro Oncol, 2009. **11**(4): p. 341-7.
157. Labussiere, M., et al., *Prognostic markers in gliomas*. Future Oncol. **6**(5): p. 733-9.
158. Bax, D.A., et al., *Molecular and phenotypic characterisation of paediatric glioma cell lines as models for preclinical drug development*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5209.
159. Blanc, J.L., et al., *Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas*. J Neurooncol, 2004. **68**(3): p. 275-83.
160. Margison, G.P., et al., *Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase*. Carcinogenesis, 2003. **24**(4): p. 625-35.
161. Lenz, G., et al., *Promoter methylation and expression of DNA repair genes hMLH1 and MGMT in acute myeloid leukemia*. Ann Hematol, 2004. **83**(10): p. 628-33.
162. Wick, W., et al., *One week on/one week off: a novel active regimen of temozolomide for recurrent glioblastoma*. Neurology, 2004. **62**(11): p. 2113-5.
163. Kamiryo, T., et al., *Correlation between promoter hypermethylation of the O6-methylguanine-deoxyribonucleic acid methyltransferase gene and prognosis in patients with high-grade astrocytic tumors treated with surgery, radiotherapy, and 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea-based chemotherapy*. Neurosurgery, 2004. **54**(2): p. 349-57; discussion 357.
164. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
165. Balana, C., et al., *O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(4): p. 1461-8.
166. Brell, M., et al., *Prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(14): p. 5167-74.
167. Cankovic, M., et al., *A simplified laboratory validated assay for MGMT promoter hypermethylation analysis of glioma specimens from formalin-fixed paraffin-embedded tissue*. Lab Invest, 2007. **87**(4): p. 392-7.
168. Zawlik, I., et al., *Promoter methylation and polymorphisms of the MGMT gene in glioblastomas: a population-based study*. Neuroepidemiology, 2009. **32**(1): p. 21-9.
169. Mollemann, M., et al., *Frequent promoter hypermethylation and low expression of the MGMT gene in oligodendroglial tumors*. Int J Cancer, 2005. **113**(3): p. 379-85.
170. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia*. Cancer Res, 1999. **59**(4): p. 793-7.
171. Lavon, I., et al., *Longitudinal assessment of genetic and epigenetic markers in oligodendrogliomas*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(5): p. 1429-37.
172. Esteller, M., *Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes*. Eur J Cancer, 2000. **36**(18): p. 2294-300.
173. Stupp, R., et al., *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a*

- randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. Lancet Oncol*, 2009. **10**(5): p. 459-66.
174. Herrlinger, U., et al., *Phase II trial of lomustine plus temozolomide chemotherapy in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: UKT-03. J Clin Oncol*, 2006. **24**(27): p. 4412-7.
175. Everhard, S., et al., *MGMT methylation: a marker of response to temozolomide in low-grade gliomas. Ann Neurol*, 2006. **60**(6): p. 740-3.
176. Bello, M.J., et al., *Hypermethylation of the DNA repair gene MGMT: association with TP53 G:C to A:T transitions in a series of 469 nervous system tumors. Mutat Res*, 2004. **554**(1-2): p. 23-32.
177. Nakamura, M., et al., *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. **22**(10): p. 1715-9.