



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria Beatriz Baltazar Alves

**TERAPIAS AVANÇADAS PARA O
GLIOBLASTOMA**

**Dissertação no âmbito do mestrado em Biotecnologia
Farmacêutica orientada pela Professora Doutora Carla Vitorino e
pela Doutora Fátima Ventura apresentada à Faculdade de
Farmácia Da Universidade de Coimbra**

Julho de 2022

Maria Beatriz Baltazar Alves

Terapias Avançadas para o Glioblastoma

**Monografia realizada no âmbito do Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica,
orientada pela Professora Doutora Carla Vitorino e pela Doutora Fátima
Ventura apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**



1 2 9 0

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

Esta monografia representa a etapa final do meu percurso académico. Deste modo, o meu mais sincero obrigado a todos os que fizeram parte deste caminho:

À Professora Carla e ao Doutor Rui, por toda a ajuda, pelos conhecimentos transmitidos e pela disponibilidade.

À Doutora Fátima, por me ter recebido tão bem no INFARMED, IP, por toda a ajuda, pelos conhecimentos transmitidos e pela disponibilidade.

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo apoio incondicional e por acreditarem sempre em mim.

Aos meus avós, por mesmo longe estarem sempre perto.

Ao Tiago, à Sara e a todos os meus amigos, pelo carinho, palavras amigas e pela motivação constante.

A todos os colegas e docentes que fizeram parte deste percurso, pelos ensinamentos deixados.

Muito obrigada a todos!

Índice

1.Introdução.....	6
2.Glioblastoma: Definição e Prevalência.....	7
3.Classificação do Glioblastoma.....	13
4.Ambiente Imunológico no SNC.....	18
5.Diagnóstico Molecular.....	28
5.1.Biomarcadores com Evidência Clínica.....	30
5.1.1.Isocitrato Desidrogenase.....	30
5.1.2.Co-deleção 1p/19q.....	32
5.1.3.06-methylguanine-DNA Methyltransferase.....	32
5.1.4.Telomerase Reverse Transcriptase.....	33
5.2.Potenciais Biomarcadores.....	33
5.2.1.Biomarcadores Circulantes.....	33
5.2.1.1.Células Tumorais Circulantes (CTc).....	34
5.2.1.2.Vesículas Extracelulares (VEs).....	34
5.2.1.3.DNA Circulante (ctDNA).....	35
5.2.1.4.RNA Circulante (cirRNA).....	36
5.2.1.5.MicroRNAs.....	37
5.2.2.Recetor do Fator de Crescimento Epidérmico.....	39
5.2.3.Recetor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas Alfa.....	39
5.2.4.Perda de Heterozigosidade do Cromossoma 10 (LOH10q).....	39
5.2.5.Proteína p53.....	40
5.2.6.Fator de Crescimento Endotelial Vascular.....	40
5.2.7. Proteína I do Tipo Quitinase-3 (YKL-40).....	40
5.2.8.Proteína Glial Ácida Fibrilar.....	41
5.2.9.Trombospondina-1 (TSP-1).....	41
5.2.10.Osteopontina (OPN).....	41
5.2.11.Recoverina.....	41
5.2.12.Catepsina D.....	41
5.2.13.Citocinas.....	42
5.2.14.Proteína Morfogenética Óssea (BMP).....	42
5.2.15.Metaloproteinase 9 (MMP-9).....	42
5.2.16.Inibidor do Tecido da Metaloproteinase-1 (TIMP-1).....	43
5.2.17.Outras Proteínas.....	43
5.2.18.Pequenas Moléculas.....	43
5.2.19.Carga Mutacional do Tumor.....	44

5.2.20. Biomarcadores Relacionados com o Sistema Imunológico	44
5.2.20.1. Imunoglobulina E (IgE)	44
5.2.20.2. Cluster of Differentiation 14 e 23 (CD 14 e CD23)	44
5.2.21. Biomarcadores Relacionados com a Inflamação	44
5.2.21.1. Interleucina-6	45
5.2.21.2. Amilóide A1 (SAA1)	45
5.2.21.3. Glicoproteína Alfa 2-Heremans-Schmid (AHSG)	45
5.2.21.4. Proteínas de Choque Térmico 70 (HSP-70)	45
5.2.22. Biomarcadores Relacionados com o Estado Nutricional	45
5.2.23. Biomarcadores Associados à Coagulação	46
5.3. Outras Alterações Moleculares Presentes no GBM	46
5.3.1. Neurofibromina 1	46
5.3.2. Fusões Oncogénicas	47
6. Terapias Adotadas	47
6.1. Ressecção Cirúrgica Máxima	48
6.2. Radioterapia	49
6.3. Quimioterapia	50
6.4. Ácido 5-aminolevulínico	55
6.5. Bevacizumab	55
6.6. Carmustina	56
6.7. Optune	56
6.8. Terapias de Segunda Linha	57
7. Estratégias Terapêuticas em Ensaios Clínicos	59
7.1. Anticorpos Monoclonais para os Checkpoints Imunológicos	60
7.2. Células T-CAR	62
7.3. Terapia com Linfócitos Infiltrantes do Tumor	64
7.4. Terapia de Recetor de Células T	64
7.5. Vacinas	65
7.6. Terapia Génica	66
7.6.1. Vetores Virais	66
7.6.2. Vetores Não Virais	69
7.7. Imunoterapia Baseada em Macrófagos	70
7.8. Metabolismo do Colesterol	70
7.9. Hipertermia	70
7.10. Compostos Químicos	71
7.11. Pró-fármacos	73
7.12. Proteínas	73
7.13. Small Interfering RNA	74

7.14.Células Estaminais Neurais.....	74
8.Razões de Insucesso das Terapias.....	75
9.Medicamentos de Terapia Avançada: Definição.....	77
9.1.Sistema Regulamentar.....	79
9.2.Desafios Associados aos ATMPs.....	81
9.2.1.Novas Orientações Regulamentares.....	81
9.2.2.Centros Especializados.....	82
9.2.3.Acompanhamento.....	82
9.2.4.Acessibilidade e Sustentabilidade Financeira.....	82
9.2.5.Ensaio Clínico com ATMPs.....	83
9.2.6.Modelos Animais.....	84
9.2.7.Processo de Fabrico.....	84
9.3.Elaboração de um Pedido de AIM.....	85
9.3.1.Caraterização do Vetor.....	87
9.3.2.Caraterização dos Materiais Utilizados.....	88
9.3.3.Ausência de Virulência.....	90
9.3.4.Fabrico.....	91
9.3.5.Atributos Críticos de Qualidade (CQAs).....	93
9.3.6.Caraterização do Produto Final e Processo de Fabrico.....	93
9.3.7.Contaminantes.....	94
9.3.8.Estabilidade.....	98
10.O Papel da Bioinformática na Identificação de Potenciais Alvos Terapêuticos.....	100
10.1.Materiais e Métodos.....	101
10.1.1.Dados de <i>Microarray</i>	101
10.1.2.Identificação dos Genes Diferencialmente Expressos (DEGs).....	102
10.1.3.Análise de Informação com DisGeNET.....	102
10.1.4. <i>Heatmap</i>	102
10.1.5.Diagramas de Venn.....	102
10.1.6.Análise Integrada dos Genes.....	103
10.1.7.Enquadramento com as Terapias.....	103
10.1.8.Análise de Sobrevivência.....	103
10.2.Resultados.....	103
10.2.1.Identificação dos Genes Diferencialmente Expressos.....	103
10.2.2.Avaliação das Vias Moleculares.....	105
10.2.3.Análise Integrada dos Genes.....	106
10.2.4. Enquadramento com as Terapias.....	108
10.2.4.1. <i>Epidermal Growth Factor</i>	108
10.2.4.2.Via MAPK.....	110

10.2.4.3. <i>Placent Growth Factor</i>	111
10.2.4.4. Fator de Transição Epitelial Mesenquimal.....	111
10.2.4.5. <i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1</i>	112
10.2.4.6. Substrato do Recetor de Insulina I (IRS-1).....	112
10.2.4.7. Fator de Crescimento Endotelial Vascular	113
10.2.5. Análise de Sobrevida.....	113
11. Conclusão e Perspetivas Futuras.....	119
12. Referências Bibliográficas.....	122

Lista de Abreviaturas

5-FU: 5-fluorouracil

AAV: Adenovírus Associado

ABC: *ATP-binding Cassette*

AGR: Relação Albumina-Globulina

AHSG: Glicoproteína Alfa-2-*Heremans-Schmid*

AIM: Autorização de Introdução no Mercado

AKT: *Serine/Threonine Kinase*

AKT3: *AKT Serine/Threonine Kinase 3*

AMPAR: *Alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptor*

Ang2: *Angiopoietin-2*

AO: Oligodendroglioma Anaplásico

AP-1: *Activator Protein 1*

AP-2: *Activator Protein 2*

APC: Célula Apresentadora de Antígeno

APE-1: *Apurinic/aprimidinic Endonuclease 1*

APNG: Alqipurina-DNA-N-Glicosilase

ASCCI: *Activating Signal Cointegrator 1 Complex Subunit 1*

Atg8: *Autophagy-related Protein 8*

ATM: *Ataxia Telangiectasia Mutated*

ATMP: Medicamento de Terapia Avançada

ATP: Adenosina Trifosfato

ATR: *Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related Protein*

ATRX: *Alfa-thalassemia/mental Retardation, X-linked*

BBTB: *Blood-brain Tumor Barrier*

BCL-2: *B-cell Lymphoma-2*

BCL-X: *B-cell Lymphoma-Extra Large*

BER: Reparação por Excisão de Bases

BHE: Barreira Hematoencefálica

BMP: Proteína Morfogénica Óssea

BMP-2/7: Proteína Morfogénica Óssea-2/7

BMX: *BMX Non-Receptor Tyrosine Kinase*

BPC: Boas Práticas Clínicas

BPF: Boas Práticas de Fabrico

BPL: Boas Práticas Laboratoriais

BRAF: Proto-oncogene B-Raf
BVDV: Bovine Viral Diarrhea Vírus
CAR: Recetor de Antígeno Quimérico
CAT: Comité de Terapias Avançadas
CCAAT: Enhancer Binding Proteins (c/EBPs)
CCL2: Motif Chemokine Ligand 2
CCNI: Celular Communication Network Factor 1
CD: Citocina Desaminase
CD11b: Integrin Alpha-M
CD133: Cluster of Differentiation 133 ou Prominin 1
CD134: Cluster of Differentiation 134
CD137: Cluster of Differentiation 137
CD14: Cluster of Differentiation 14
CD151: Cluster of Differentiation 151 ou Raph Blood Group
CD155: Cluster of Differentiation 155
CD19: Cluster of Differentiation 19
CD23: Cluster of Differentiation 23
CD24: Cluster of Differentiation 24
CD25: Cluster of Differentiation 25
CD27: Cluster of Differentiation 27
CD33: Cluster of Differentiation 33
CD39: Cluster of Differentiation 39
CD40: Cluster of Differentiation 40
CD44: Cluster of Differentiation 44
CD47: Cluster of Differentiation 47
CD55: Cluster of Differentiation 55
CD59: Cluster of Differentiation 59
CD70: Cluster of Differentiation 70
CD73: Cluster of Differentiation 73
CD80: Cluster of Differentiation 80
CD86: Cluster of Differentiation 86
CD95L: Cluster of Differentiation 95 Ligando
CDK4/6: Cyclin Dependent Kinase 4/6
CDKN2A: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A

cDNA: DNA Complementar

CED: Entrega Aprimorada por Convecção

CHK1/2: *Checkpoint Kinase 1/2*

CHMP: Comité dos Medicamentos de Uso Humano

circRNA: RNA Circulante

CPEBI: *Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein 1*

CpG: Ilhas de Citosina-fosfato-guanina

CQA: Atributo Crítico de Qualidade

CSF-1: Fator 1 Estimulador de Colónias

CSFR-1: Recetor do Fator 1 Estimulante de Colónias

CTc: Células Tumorais Circulantes

CTD: *Common Technical Document*

ctDNA: DNA Circulante

CTH: *Cystationina Gamma-Liase*

CTLA-4: Proteína 4 Associada a Linfócitos T Citotóxicos

CTNBI: Catenina Beta 1

CXCL5/10/12: *C-X-C Motif chemokine Ligand 5/10/12*

CXCR2/4/7: *C-X-C Motif Chemokine Receptor 2/4/7*

CYB561: Citocromo B561

D-2HG: 2-hidroxiglutarato

DAMP: *Damage-associated molecular patterns DNA*

DDR1: *Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 1*

DEG: Gene Diferencialmente Expresso

DMFO: *Difluoromethylornithine*

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

E2F: *E2 Promoter Binding Factor*

E2F3: *E2F Transcription Factor 3*

E2F6: *E2F Transcription Factor 6*

E2F7: *E2F Transcription Factor 7*

ECM: Matriz Extracelular

EFEMP1: *EGF Containing Fibulin Extracellular Matrix Protein 1*

EGF: *Epidermal Growth Factor*

EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*

EGFRvIII: *Epidermal Growth Factor Receptor Variant III*

EM: Espectroscopia Eletrónica

EMA: Agência Europeia de Medicamentos

EMT: Transição Epitélio-mesenquimal

EPHB2: Recetor EPH B2

ERBB3: Recetor Erb-b2 Tirosina Cinase 3

ERK: *Extracellular Signal-regulated Kinases*

EUA: Estados Unidos da América

EZH2: *Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*

F3T3: FGFR3-TACC3

FA: Fibrinogénio

FAK: *Focal Adhesion Kinase*

FasL: Ligando Fas

FDA: *Food and Drug Administration*

FGF-b: *Basic-fibroblast Growth Factor*

FGFR: *Fibroblast Growth Factor Receptors*

FGFR3-TACC3: *Fibroblast Growth Factor Receptor 3-transforming Acidic Coiled-coil Containing Protein 3*

FISH: *Fluorescence In Situ Hybridization*

FoxP3/23: *Forkhead Box P3/23*

FPP: difosfato de farnesil

GABI: Proteína I de Ligação Associada a GRB2

GABRA1: *Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Alpha 1*

Gal-1/8/9: Galactina 1/8/9

GAS1/5/6: *Growth Arrest Specific 1/5/6*

GBM NOS: *Glioblastoma Not Otherwise Specified*

GBM: Glioblastoma

GBM-O: Glioblastoma com Componente de Oligodendroglioma

G-CIMP: *Cytosine-phosphate-guanine (CpG) Island Methylator Phenotype*

GCV: Ganciclovir

GDP: Difosfato de Guanina

GEO: *Gene Expression Omnibus*

GGPP: Difosfato de Geranyl

GLIPR-1: *GLI Pathogenesis Related 1*

GluRI: *Glutamate Receptor 1*

GNMB: Glicoproteína Nmb

GSC: Células-tronco Estaminais de Gliomas

GTMP: Medicamentos de Terapia Genética

GTP: Trifosfato de Guanina

HBV: Vírus da Hepatite B

HER2: *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*

H-FIRE: Eletroporação Irreversível de Alta Frequência

HGF: Fator de Crescimento de Hepatócitos

HIF- α : *Hypoxia-Inducible Factor Alfa*

HIFU: Ultrassom Focado de Alta Intensidade

HLA-A2: Antígeno Leucocitário Humano A2

HLA-E: Antígeno Leucocitário Humano E

HOTAIR: *Hox Transcript Antisense RNA*

HSP: Proteína de Choque Térmico

HSP-70/96: Proteína de Choque Térmico-70/96 quilo Dalton

HSV: Herpes Simplex

HSV-1: Herpes Simplex I

ICH: *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*

ICI: Inibidores dos *Checkpoints* Imunológicos

IDH 1/2: Isoforma 1/2 da IDH

IDH: Isocitrato Desidrogenase

IDO: Enzima Indoleamina 2,3-dioxigenase

IFN- γ : Interferão Gama

IgE: Imunoglobulina E

IGF1: *Insulin Like Growth Factor 1*

IGF1R: Recetor do Fator de Crescimento I Semelhante à Insulina

IGFBP-2: *Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2*

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IL-10: Interleucina 10

IL-13: Interleucina 13

IL-13 α 2: Recetor α 2 da Interleucina 13 do Antígeno

IL-1 β : Interleucina 1-beta

IL-2: Interleucina 2
IL-23: Interleucina 23
IL-4: Interleucina 4
IL-6: Interleucina 6
IL-8: Interleucina 8
ING4: Inibidor da Proteína de Crescimento 4
IRS-1: Substratos do Recetor de Insulina I
K⁺: Iões de Potássio
KDR: Recetor de Domínio de Inserção de Cinase
KPS: Desempenho *Karnofsky*
LAG-3: *Lymphocyte-Activation Gene 3*
LCR: Líquido Cefalorraquidiano
LGALS1: Galactina I
LIF: Fator Inibidor de Leucemia
LIG4: DNA ligase 4
LncRNA: *Long non-coding RNAs*
LOH10q: Perda de heterozigocidade do Cromossoma 10
LOX: Lisil Oxidase
LRRC4: *Leucine Rich Repeat Containing 4*
MAPK 1/8: *Mitogen-activated Protein Kinase 1/8*
MAPK: *Mitogen-activated Protein Kinase*
MBD2: *Methyl-CpG Binding Domain Protein 2*
MCP-1: Proteína Quimiotraente de Monócitos
MDM2: *Mouse Double Minute 2 Homolog*
MDSC: Células Supressoras Derivadas de Mieloide
MEK: *Mitogen-activated Protein Kinase*
MERTK: Proto Oncogene MER, Tirosina Cinase
MET: Fator de Transição Epitelial Mesenquimal ou *MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase*
MGMT: *O6-methylguanine-DNA Methyltransferase*
MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade
MHCI/II: Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe I/2
MICA/B: *MHC Classe I Chain-related Protein A and B*
MIF: Fator Inibidor de Migração de Macrófagos

miRNA: MicroRNA

ML: *Machine Learning*

MLH1: *MutL Homolog 1*

MLH3: *MutL Homolog 3*

MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

MMP: Metaloproteinase

MMP-2/9/14: Metaloproteinase-2/9/14

MMR: *Mismatch Repair*

MRI: Imagem de Ressonância Magnética

mRNA: RNA Mensageiro

MRS: Ressonância Magnética

MSH2/6: *MutS Homolog 2/6*

MSI: Instabilidade dos Microssatélites

mtDNA: DNA Mitocondrial

mTOR: *Mechanistic Target of Rapamycin Kinase*

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NBS1: *Nijmegen Breakage Syndrome 1*

NDRG1: *N-Myc Downstream Regulated 1*

NEFL: *Neurofilament Light Chain*

NF1: Neurofibromina 1

NFK- B: *Nuclear Factor Kappa B*

NGS: *Next-Generation Sequencing*

NK: *Natural Killer*

NKG2D: *Natural Killer Group 2 Member D*

NLR: *Razão Neutrófilos- Leucócitos*

NMDAR: *N-methyl-D-aspartate Receptor*

NOTCH 1: *NOTCH Recetor 1*

NSC: Células Estaminais Neurais

O6-MeG: O6-metilguanina

OLIG1/2: Fator de Transcrição de Oligodendrócitos 1/2

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPN: Osteopontina

OS: Sobrevida Global

PARP: Poli (ADP-ribose) Polimerase

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PD-1: *Programmed Cell Death Protein 1*

PDCD4: *Programmed Cell Death 4*

PDGF: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PDGFR: Recetor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PDGFRA: Recetor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas Alfa

PD-L1/2: *Programmed Cell Death Ligand 1/2*

PET: Tomografia por Emissão de Positrões

PFS: Sobrevivência Livre de Progressão

PGAF: Proteína Glial Ácida Fibrilar

PGF: *Placent Growth Factor*

PI3K: *Phosphoinositide 3-Kinase*

PI3KA: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, Subunidade Alfa Catalítica

PKB: *Protein Kinase B*

PKC: Proteína Cinase C

PMS1/2: *PMS1 Homolog 1/2*

PPE-I-3x: Promotor de Pré-Proendotelina Murino Modificado

PPIX: Protoporfirina IX

PRIority Medicines-PRIME: Designação de Medicamentos Prioritários

PROM I: Proliferina 1

PROSI: Proteína S

PsPD: Pseudoprogressão

PTEN: *Phosphatase and Tensin Homolog*

PTK2: Proteína Tirosina Cinase 2

PTP: Proteína Tirosina Fosfatase

Q-PCR: PCR-Quantitativo

qRT-PCR: PCR Quantitativo em Tempo Real

RAC1: *Rac Family Small GTPase 1*

RAF: *Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*

RAP1A: RAP1A, Membro da Família de Oncogenes RAS

Rb: Retinoblastoma

RBI: *RB Transcriptional Corepressor 1*

RCM: Resumo das Características do Medicamento

RCV: Vetor Competente para Replicação

RECK: *Reversion Inducing Cysteine Rich Protein With Kazal Motifs*

RIP1: *Receptor Interacting Serine/Threonine 1*

RIPK1: *Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1*

RNA: *Ácido Ribonucleico*

RNA-seq: *Sequenciamento de RNA*

ROS: *Espécies Reativas de Oxigênio*

RTK: *Receptor Tyrosine Kinase*

RTK1: *Receptor Tyrosine Kinase 1*

SAAI: *Amilóide A1*

SDF-1: *Stromal Cell Derived Factor 1*

SHH: *Sonic Hedgehog*

shRNA: *Short Hairpin RNA*

siRNA: *Small Interfering RNA*

SLC12A5: *Solute Carrier Family 12 Member 5*

SMAD: *Suppressor of Mothers Against Decapentaplegic Member 7*

SNC: *Sistema Nervoso Central*

SNHG12: *Small Nucleolar RNA Host Gene 12*

SOCS: *Supressor da Sinalização de Citocinas*

SOCS3: *Supressor da Sinalização de Citocinas 3*

SPI: *Fator de Transcrição Nuclear sp1*

SPP1: *Fosfoproteína 1*

SRF: *Fator de Resposta Sérica*

STAG2: *Stromal Antigen 2*

STAT3: *Signal Transducers and Activators of Transcription*

STAT5B: *Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 5B*

STC: *Terapia com Células Somáticas*

S-TRAIL: *Fator de Necrose Tumoral Solúvel*

SVZ: *Zona Subventricular*

SYT1: *Synaptotagmin 1*

TAA: *Tumor-associated Antigens*

TAM: *Macrófago Associado ao Tumor*

TCR: *Recetores para Antígeno nas Células T*

TEP: *Produtos de Engenharia de Tecidos*

TERT: *Telomerase Reverse Transcriptase*

TFRC: *Transferrin Receptor*

TGF- β : Fator de Transformação de Crescimento Beta

TGF- β 1: Fator de Transformação de Crescimento 1-Beta

Th1: *T helper 1*

TIE-2: Recetor de Angiopoietina 2

TIL: Monócitos Circulantes Infiltrantes

TIM-3: *T Cell Immunoglobulin and Mucin Domain-containing-3*

TIMP-1: Inibidor do Tecido da Metaloproteinase-1

TK: Timidina Cinase

TLR: *Toll-like Receptor*

TLR-4: *Toll-like Receptor 4*

TMB: Carga Mutacional do Tumor

TME: Microambiente Tumoral

TMZ: Temozolomida

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TNFR: Recetor do Fator de Necrose Tumoral

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

TP53: Proteína Tumoral p53

TRAF1: Fator 1/2 Associado ao Recetor de TNF

Treg: Células T reguladoras

TSP-1/2: Trombospondina 1/2

UALCAN: Universidade de ALabama em Birmingham Portal de análise de dados CANcro

UE: União Europeia

VE: Vesícula Extracelular

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGF2: Fator de Crescimento Endotelial Vascular 2

VEGFR: Recetor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular

WLS: Mediador de Secreção de Ligante Wnt

WSP1: *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Homolog 1*

XRCCI: *X-Ray Repair Cross Complementing 1*

YKL-40: Proteína 1 do Tipo Quitinase-3

ZEB2: *Zinc Finger E-box Binding Homeobox 2*

ZNF C2H2: *Zinc Fingers C2H2-type*

α -KG: α -cetogluturato

Resumo

O glioblastoma (GBM), tumor astrocítico maligno, é o tumor cerebral primário mais comum e mais agressivo, pois afeta de forma devastadora o sistema nervoso central (SNC).

Atualmente, as abordagens terapêuticas contam com a ressecção cirúrgica, seguida de radioterapia e quimioterapia, sendo a temozolomida (TMZ) o fármaco de primeira linha. No entanto, este regime terapêutico carece de eficácia, o que resulta numa sobrevida livre de progressão (PFS) mediana inferior a 7 meses e sobrevida global (OS) mediana não superior a 15 meses. A taxa de insucesso do tratamento é atribuída à heterogeneidade e capacidade invasiva do tumor, resistência à TMZ, agravada pela dificuldade em garantir que os fármacos atravessem efetivamente a barreira hematoencefálica (BHE). Assim, novas estratégias de tratamento são necessárias para prolongar a OS dos doentes. A utilização de terapias avançadas é, portanto, considerada como uma estratégia capaz de superar os obstáculos indicados.

As terapias avançadas podem compreender genes, células ou tecidos, de modo que a terapia génica, a terapia celular e a engenharia de tecidos estão incluídas aqui. Constituem a vanguarda das terapias inovadoras e oferecem a possibilidade de intervir em muitas doenças, incluindo o GBM, onde as opções de tratamento são limitadas.

Com isto em mente, esta dissertação visa explorar as atuais terapias avançadas para o GBM, juntamente com os desafios regulamentares que se impõem na sua introdução no mercado e o impacto das ferramentas de bioinformática para auxiliar o desenvolvimento da terapia através da identificação de potenciais biomarcadores ou moléculas para os diferentes alvos terapêuticos, visando a melhora na OS do doente.

Abstract

Glioblastoma, a malignant astrocytic tumor, is the most common primary brain tumor and the most aggressive in nature, devastatingly attacking the central nervous system.

Currently, therapeutic approaches rely on surgical resection, followed by radiotherapy and chemotherapy, with temozolomide (TMZ) as a first line drug. However, this therapeutic regimen lacks efficacy, which results in a median progression-free survival of less than 7 months, and a median overall survival not exceeding 15 months. Treatment failure is ascribed to tumor heterogeneity and invasiveness, TMZ resistance, compounded with the difficulty of ensuring that drugs effectively cross the dual blood brain barrier (BBB)-blood brain tumor barrier. Thus, new treatment strategies are needed to prolong the overall survival of patients. The use of advanced therapies is therefore considered as a strategy capable of overcoming the targeted obstacles.

Advanced therapies may comprise genes, cells, or tissues, so gene therapy, cell therapy and tissue engineering are included here. They constitute the vanguard of innovative therapies and offer the possibility of intervening in many diseases, including glioblastoma, wherein treatment options are limited.

With this in mind, this dissertation aims at exploring the current advanced therapies for glioblastoma, along with the regulatory challenges that arise for their introduction in the market. The impact of bioinformatics tools to assist therapy development and assessment of their performance will be also addressed, ultimately envisioning the improvement in overall patient survival.

I. Introdução

Cancro é o termo médico utilizado para doenças em que se verifica o crescimento anormal e descontrolado das células, causado por desregulações genéticas e ambientais que se vão acumulando e provocam o aparecimento de células com sinalização alterada, formando uma massa tumoral, embora os cancros que ocorrem no sangue, não formem massas tumorais. Os tumores são ecossistemas bastante complexos e heterogêneos com interações entre os diferentes componentes também complexas (Beatriz Gaspar, 2016).

Estas anomalias celulares podem distribuir-se por vários órgãos e onde quer que se instalem representam um risco à vida.

É a segunda principal causa de mortalidade nos países da União Europeia (UE) seguida pelas doenças cardiovasculares. Todos os anos, 2,6 milhões de pessoas são diagnosticadas com cancro e mais 1,2 milhões de pessoas morrem devido à doença, o que contribui para que o cancro seja considerado um dos principais fatores de mortes prematuras na UE (Cancro, Comissão Europeia).

O impacto na saúde individual é notável e além disso tem também efeitos sociais e económicos consideráveis. O impacto económico global do cancro na Europa é aproximadamente 100 mil milhões de euros por ano (Cancro, Comissão Europeia).

Neste sentido, apesar dos tumores cerebrais não serem os mais frequentes, são uma grande ameaça, apresentam uma elevada probabilidade de morte em 5 anos, mesmo com os avanços feitos nos tratamentos.

A rapidez com que um tumor cerebral cresce pode variar muito. No entanto, é a taxa de crescimento, bem como a localização que determinam como a função do sistema nervoso será afetada e a classificação, em tumor de baixo ou alto grau, é feita tendo em conta estes critérios. Os tumores benignos são os de baixo grau (I e II), o que significa que crescem lentamente e é menos comum existir uma recorrência e os tumores malignos, de alto grau (III e IV), são os mais propensos a gerar uma recorrência após o tratamento.

Dentro dos tumores benignos, os mais comuns são meningiomas, neuromas, tumores hipofisários e craniofaringiomas, já os tumores malignos incluem astrocitomas, oligodendrogliomas, GBMs e gliomas mistos.

Portanto, o enquadramento do GBM como um tumor cerebral maligno e a reduzida sobrevida dos doentes é o ponto de partida para a necessidade de melhorar a abordagem da doença, quer no desenvolvimento de novas terapias quer na identificação de novos biomarcadores que permitam a melhor monitorização dos doentes.

2. Glioblastoma: Definição e Prevalência

Considerando as várias características epigenéticas, genéticas e clínico-patológicas, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica os diferentes tipos de gliomas em gliomas de baixo grau (I e II) e gliomas de alto grau (III e IV), como referido anteriormente (Shaimaa M El-khayat et al., 2021).

A Figura I esquematiza a classificação dos vários tipos de câncros cerebrais, tendo em conta a classificação da OMS:

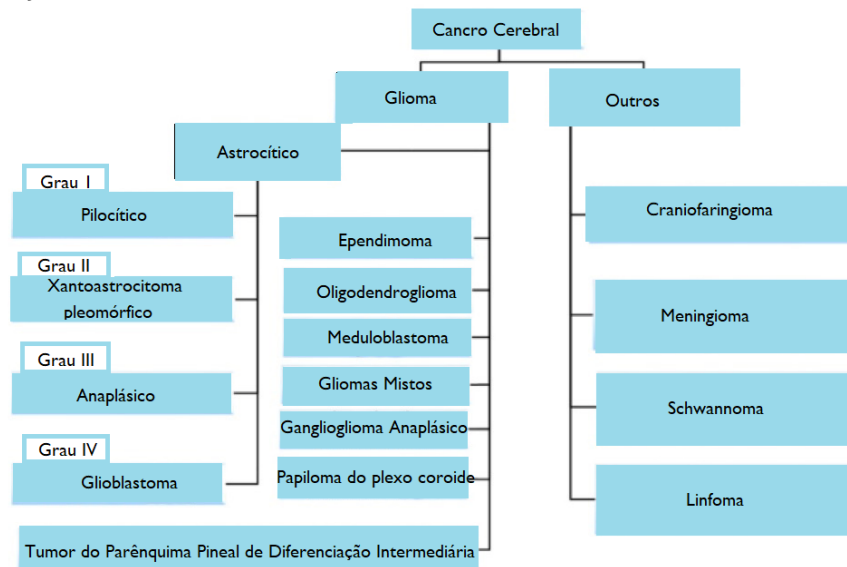


Figura I: Classificação dos vários tipos de cancro cerebral (Andrea Shergalis et al., 2016).

Os gliomas, por definição, são tumores cerebrais malignos que surgem nas células da glia presentes no SNC (Shaimaa M El-khayat et al., 2021).

As células da glia estão envolvidas em inúmeras funções bastante importantes, desde o desenvolvimento cerebral à manutenção do bom funcionamento de um cérebro já adulto. Representam cerca de metade do volume do cérebro, uma vez que apesar de menores são mais volumosas (Kristjan R. Jesse et al., 2004; Haines, 2013).

No SNC, dividem-se em microglia, células ependimárias, astrócitos e oligodendrócitos, sendo nestes dois últimos que ocorrem os gliomas (Kristjan R. Jesse et al., 2004; Haines, 2013).

Os astrócitos, encontram-se no encéfalo e na medula espinal, contribuem para a manutenção do ambiente químico necessário para ocorrer sinalização neuronal, regulam a composição do fluido extracelular, pois removem iões potássio (K^+) e neurotransmissores em torno das fendas sinápticas, assegurando também o transporte de nutrientes dos vasos sanguíneos para os neurónios (Haines, 2013).

Os oligodendrócitos existem apenas no encéfalo e têm como função a formação das bainhas de mielina que envolvem os axónios (Haines, 2013).

A microglia contribui para a defesa e proteção dos tecidos neurais ao participar nos mecanismos de imunidade inata e adaptativa. Neste sentido, em caso de ameaça à homeostase do SNC, a microglia pode desencadear uma rápida transformação, ou seja, passar do estado de repouso para estado ativo, de forma a migrar para o local da lesão, proliferar e fagocitar células e compartimentos celulares (Denise Rossum et al., 2004; Helmut Kettenmann et al., 2010).

Por sua vez, células endoteliais são células epiteliais de suporte, que delimitam o canal central e as cavidades ventriculares do SNC. Estruturalmente, estas células, formam a interface entre o líquido cefalorraquidiano (LCR) e o parênquima da medula espinhal e do cérebro, onde se localiza o fluido intersticial. A sua principal função é na formação da BHE (Catarina Garcia, 2019).

O GBM é definido como um glioma de quarto grau, localizado na substância branca do SNC. É considerado o tumor cerebral primário mais agressivo e o mais comum, representando cerca de 54% de todos os gliomas, 16% dos tumores intracranianos e corresponde a 2,5% das mortes a nível mundial por doenças oncológicas (Shaimaa M El-khayat et al., 2021; Osorio Neto et al., 2021; Artemiy S. Silantyev et al., 2019; Paulo Linhares, 2021).

O GBM localiza-se de forma mais comum na região supratentorial que engloba os lobos frontal, parietal, temporal e occipital, representados na Figura 2, sendo que a incidência é maior no lobo frontal, seguindo-se os lobos temporal e parietal (Ahmad F. Tamimi et al., 2017).

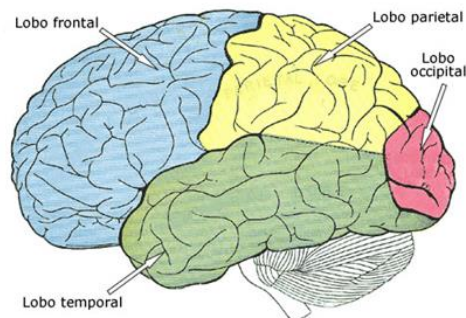


Figura 2: Localização da Região Supratentorial (Lobos Cerebrais, InfoEscola).

A localização supratentorial é mais prevalente em doentes mais idosos e, por isso é a mais frequente, enquanto a localização na medula espinhal e no cerebelo é mais rara. Quando o GBM se localiza no cerebelo os doentes são mais jovens, entre os 50 e os 56 anos, sendo esta localização anatómica menos comum em caucasianos e também nestes casos, o tumor é de menor tamanho. Por outro lado, a localização na medula espinhal tem uma idade média de ocorrência ainda menor, de 27 anos (Ahmad F. Tamimi et al., 2017).

A idade média de ocorrência do GBM, tal como mostra a Figura 3, é aos 64 anos com um pico de incidência entre os 75 e os 81 anos, diminuindo a partir dos 85 anos. De acordo

com dados dos Estados Unidos da América (EUA) é 1,58 vezes mais comum em homens do que em mulheres (Aaron C. Tan et al.,2020; Ahmad F. Tamimi et al.,2017).

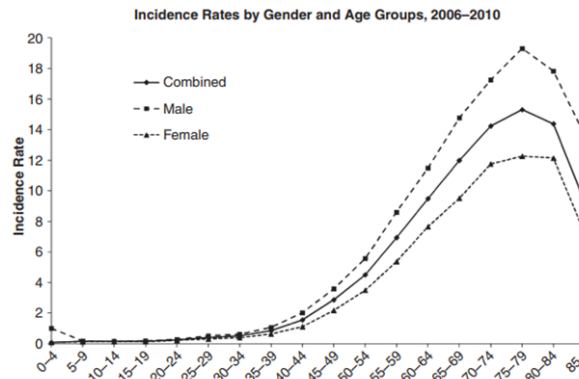


Figura 3: Incidência de GBM (Ahmad F. Tamini et al., 2017).

A taxa de incidência anual é de 3,19 por 100 000 pessoas nos EUA. Estas taxas são 2,5 vezes superiores em europeus e norte-americanos do que em afro-americanos (Ahmad F. Tamimi et al.,2017).

É de notar que as diferenças na incidência entre etnias podem ser explicadas pela presença de polimorfismos como o Arg399 Gin, um polimorfismo que resulta na alteração de aminoácidos em proteínas reparadoras do ácido desoxirribonucleico (DNA), nomeadamente, a proteína *X-Ray Repair Cross Complementing 1* (XRCCI), que atua na via de reparação por excisão de bases (BER). Este polimorfismo tem sido descrito como estando associado a um aumento do risco para desenvolver gliomas em asiáticos e GBM em caucasianos. No entanto, esta teoria é ainda algo controversa e requer confirmação (Ahmad F. Tamimi et al.,2017; Lei Jiang et al., 2013).

À semelhança de outros gliomas, o GBM afeta o SNC de forma devastadora. As células tumorais têm a capacidade de invadir agressivamente o parênquima cerebral vizinho, o que leva a uma infiltração peritumoral extensa de proliferações hipercelulares atípicas como mostram os testes de imagem usados no diagnóstico. Isto contribui para a classificação do GBM como uma doença cerebral total (Zsuzsanna Birkó et al., 2020; Artemiy S. Silantsev et al., 2019; Ana Miranda et al., 2017; Osorio Neto et al., 2021).

Apesar de ser detetada nos doentes uma carga tumoral significativa fora do tumor, as metástases extracranianas são uma característica rara, pois as células da glia neoplásicas têm dificuldade em atravessar as barreiras histológicas. Por isso, a metastização acontece apenas em 0,44% dos casos diagnosticados com GBM, normalmente quando os doentes já foram sujeitos anteriormente a uma craniotomia (Syreeta DeCordova et al.,2020; Osorio Neto et al., 2021).

Na idade pediátrica, o GBM é uma patologia rara. No entanto ao ocorrer, representa o tumor primário mais frequente, com uma taxa de sobrevivência de 2 anos de 12%, sendo uma das principais causas de morte, nesta faixa etária (Ahmad F. Tamimi et al.,2017; Kenneth Aldape et al.,2015).

Apesar das incertezas, parece ser claro que a ocorrência de GBM não envolve predisposição genética conhecida, nem existem evidências da sua associação a fatores de risco relacionados com estilos de vida como o tabagismo, drogas, hábitos alimentares ou utilização de telemóveis. Está associada à ocorrência de polimorfismos, identificados por análise genómica, como acima referido, mas também à exposição a radiação ionizante (Ahmad F. Tamimi et al.,2017; Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

Contudo, encontraram-se vários fatores que aumentam a predisposição a desenvolver GBM, nomeadamente um maior risco para desenvolvimento de asma, eczema ou psoríase, parece estar correlacionado com um menor risco para o aparecimento do GBM, devido a polimorfismos encontrados na linha germinativa que apresentam diferenças entre indivíduos doentes e os grupos controlo. Também a utilização de anti-inflamatórios durante períodos inferiores a 10 anos, parece conferir proteção contra o GBM. No entanto, são ainda hipóteses que precisam ser confirmadas (Ahmad F. Tamimi et al.,2017).

Dados recentes também relacionam as características da microbiota intestinal com o desenvolvimento do tumor, ou seja, alterações no eixo intestino-cérebro podem levar ao aparecimento de doenças no SNC. Muitos argumentos etiológicos têm sido reportados na literatura, mas ainda carecem de elucidação para permitir conclusões mais consistentes (Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

Para além dos fatores de risco já mencionados, verificou-se igualmente um aumento da incidência do GBM em doentes com síndromes tumorais hereditários como: Síndrome de Turcot e Síndrome de Li-Fraumeni (Ahmad F. Tamimi et al.,2017).

Como acima referido, histologicamente o GBM é um tumor astrocítico de alto grau, caracterizado pela proliferação microvascular e/ou necrose focal, e ainda rutura da BHE. As células são pleomórficas, mas a maioria possui núcleos hipercromáticos aumentados com cromatina agregada, contornos irregulares e quantidades variáveis de citoplasma (Osorio Neto et al., 2021; Roberto Jose Diaz et al., 2017).

As características histológicas do GBM são visíveis na Figura 4.

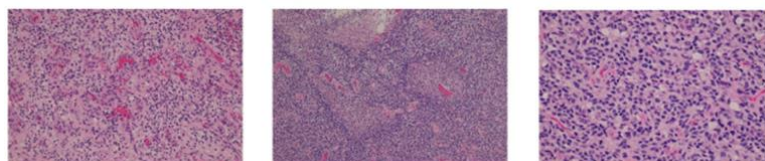


Figura 4: Características histológicas do GBM (Aaron C. Tan et al., 2020).

No GBM estão presentes células diferenciadas e indiferenciadas, com diferentes morfologias, mas com elevada capacidade de renovação e proliferação celular. Existe maior concentração de células neoplásicas no centro do tumor, e conseqüentemente também estão presentes hipóxia e necrose, verificando-se redução gradual destes fatores até à periferia do tumor (Syreeta DeCordova et al.,2020; Osorio Neto et al., 2021; Angela Armento et al., 2017).

À semelhança de outras doenças malignas, o GBM contém uma população de células com elevada tumorigenicidade, as células estaminais, responsáveis por garantir a heterogeneidade intra-tumoral. Resultam da transformação de células estaminais neurais (NSC) e têm elevada capacidade de se renovar, diferenciar e regenerar, por isso, garantem a recorrência e proliferação tumoral, assim como resistência à terapia, pois têm a capacidade de se adaptar às condições inflamatórias. Expressam diversos marcadores à superfície como *Cluster of Differentiation 44 (CD44)*, *Cluster of Differentiation 133* ou *Prominin-1 (CD133)*, *Cluster of Differentiation 151* ou *Raph Blood Group (CD151)* e *Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 1 (DDR1)* que podem facilitar o diagnóstico da doença (Alexander Ou et al., 2021; Ahmad F. Tamimi et al., 2017; Davide Schiffer et al.,2012; Ana Miranda et al., 2017).

Juntamente com a proliferação celular descontrolada, no GBM, estão presentes também infiltração local, instabilidade genómica e angiogénese (Syreeta DeCordova et al.,2020).

O facto dos GBMs serem tumores altamente heterogéneos dificulta a determinação da sua origem celular e ainda compromete a taxa de sobrevivência, que é maior quando a heterogeneidade tumoral é menor (Kristjan R. Jesse et al., 2004; Syreeta DeCordova et al.,2020; Alexander Ou et al., 2021).

A diminuição da sobrevida dos doentes também pode ser explicada pelas alterações na matriz extracelular (ECM) e pelo aumento da expressão de enzimas proteolíticas no tumor, devido a modificações genéticas e epigenéticas, que tornam o tumor mais agressivo e a doença com pior prognóstico (Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

Para que as células tumorais consigam invadir o cérebro saudável, a ECM é destruída por ação de vários mediadores como metaloproteases (MMP) e integrinas. A estes fenómenos junta-se a presença dos recetores *Alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptor (AMPA)*, *N-methyl-D-aspartate Receptor (NMDAR)* e a subunidade *Glutamate Receptor 1 (GluR1)* do AMPAR que favorecem não só a destruição da ECM como também a adesão celular e a sobre-expressão de canais de K^+ que contribuem para a elevada migração,

proliferação e sobrevivência tumoral, representando um pior prognóstico para o doente (Angela Armento et al., 2017).

Os sintomas do GBM variam de acordo com o tamanho e localização do tumor, sendo os mais relatados: cefaleias, náuseas, tonturas, confusão mental, dificuldade na fala, mudança de personalidade, convulsões e déficit neurológico focal (Syreeta DeCordova et al.,2020). No decurso da doença, os sintomas, não são só resultado da evolução patológica, mas também induzidos pelas terapias implementadas, exigindo inúmeros cuidados de suporte (Aaron C. Tan et al.,2020).

Após o diagnóstico de GBM, os doentes apresentam um maior risco para tromboembolismo devido ao aumento da ativação de fatores de coagulação. A necessidade de recorrer a uma cirurgia exige a realização de profilaxia com heparina de baixo peso molecular no pós-operatório, para reduzir o risco de hemorragia intracraniana associado à cirurgia, por outro lado também o uso prolongado de terapia para o tromboembolismo contribui para o risco de hemorragia intracraniana (Aaron C. Tan et al.,2020).

Adicionalmente, durante os tratamentos, existe ainda um risco aumentado de infecções oportunistas, como pneumonia, desencadeadas pela linfopenia induzida pelos fármacos oncolíticos utilizados (Aaron C. Tan et al.,2020).

Há também necessidade de recurso à terapia antiepilética quando ocorrem convulsões. Estas são mais frequentes na última semana de vida dos doentes, mesmo que não exista histórico anterior. Os fármacos antiepiléticos devem ser evitados durante o tratamento por interagirem com os fármacos citotóxicos, mas quando necessário é utilizado, mais frequentemente, o levetiracetam por estar associado a menor número de interações medicamentosas. No entanto, no estadio terminal, em que a disfagia e a alteração da consciência são comuns e dificultam a administração de medicamentos por via oral, são opções o diazepam retal ou midazolam bucal ou intranasal (Catarina Fernandes et al., 2017).

Os corticosteróides são igualmente usados para reduzir o edema peritumoral associado ao aumento do tamanho do tumor e conseqüentemente aumento da pressão intracraniana que resulta em dores de cabeça, náuseas, sonolência e distúrbios visuais. O uso destes fármacos deve, no entanto, ser muito controlado, pois podem levar a uma menor sobrevida, possivelmente devido ao efeito protetor contra o stress genotóxico induzido pela radioterapia e quimioterapia e que é necessário para a redução tumoral (Aaron C. Tan et al.,2020; Catarina Fernandes et al., 2017).

Estes doentes apresentam igualmente estados frequentes de confusão mental causada pela dor, por infecções e pelos desequilíbrios metabólicos. Nestas situações são

administrados haloperidol, risperidona e olanzapina, recorrendo-se a opióides sedativos se houver coexistência de dor ou sono e distúrbios comportamentais (Catarina Fernandes et al., 2017).

Na fase terminal, os sintomas da doença dificultam a administração de medicamentos, como explicado anteriormente, mas também resultam em problemas de nutrição e hidratação, sendo muitas vezes necessário recorrer à sedação paliativa quando o doente apresenta convulsões refratárias, agitação e delírios (Catarina Fernandes et al., 2017).

As características da própria doença, as consequências da sua evolução e próprio tratamento geram um aumento da morbidade e na diminuição da qualidade de vida dos doentes. É por isso clara a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas mais eficazes e mais seguras, capazes de aumentar a sobrevida e a qualidade de vida dos doentes (Aaron C. Tan et al., 2020).

3. Classificação do Glioblastoma

Os GBMs são divididos, de acordo com a OMS, em 2 categorias diferentes, cujas diferenças são resumidas na Tabela 1: GBM isocitrato desidrogenase (IDH) selvagem e GBM IDH mutada (David N. Louis et al., 2016).

Tabela 1: Diferenças entre os diferentes tipos de GBM (Artemiy Silantyev et al., 2019).

Caraterísticas	Glioblastoma Primário	Glioblastoma Secundário
Mutação no Gene da IDH	<5%	~80%
Doença Precedente	Não Identificada	Astrocitoma Difuso ou Anaplásico
Predominância	90%	<10%
Idade de Diagnóstico	62	44
Proporção (H:M)	1,42:1	1,05:1
Sobrevivência Geral Mediana: • Cirurgia e Radioterapia • Cirurgia. Radioterapia e quimioterapia	9,9 meses 15 meses	24 meses 31 meses
Localização	Zona Supratentorial	Frontal
Necrose	Extensiva	Limitada
Mutação no Promotor TERT	72%	26%
Mutação no Gene TP53	27%	81%
Mutação no Gene ATRX	Rara	71%
Mutação no Gene EGFR	35%	Rara
Mutação no Gene PTEN	25%	Rara

O GBM IDH selvagem representa 90% dos casos de GBM, é considerado primário, o mais frequente em doentes com mais de 55 anos e com localização supratentorial. Apresenta

maior taxa de expressão do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), mutações no gene *Phosphatase and Tensin Homolog* (PTEN), quando o doente já se encontra num estado mais avançado da doença, mutações no gene que codifica para a *Telomerase Reverse Transcriptase* (TERT), mutação no gene *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A* (CDKN2A), mais comum no GBM primário, embora também seja possível observar no GBM secundário e perda do braço longo do cromossoma 10 (10q) ou do braço curto do mesmo cromossoma (10p) (Aaron C. Tan et al.,2020; Melanie Y. Lombardi et al., 2017; Paulo Linhares, 2021).

Por outro lado, 10% dos GBMs apresentam mutações na IDH, sendo designados por GBMs secundários. Estão associados ao aparecimento de GBM em doentes mais jovens. Desenvolve-se a partir de astrocitoma ou oligodendroglioma de baixo grau. Este tipo de GBM apresenta mutações na proteína tumoral p53 (TP53), mais fáceis de detetar na fase inicial, mutações na isoforma I da IDH (IDH1) e no regulador transcricional *Alfa-thalassemia/mental Retardation, X-linked* (ATRX). Está igualmente associado a deleções no braço longo do cromossoma 19 (19p), sobre-expressão do recetor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e EGFR, juntamente com um fenótipo resultante da metilação nas ilhas de citosina-fosfato-guanina (CpG)(G-CIMP) que aparece num novo subgrupo de doentes mais jovens e com melhor prognóstico (Ahmad F. Tamimi et al.,2017; Aaron C. Tan et al.,2020; Melanie Y. Lombardi et al., 2017; David N. Louis et al., 2016).

Sabe-se que enquanto o GBM primário se caracteriza sobretudo pela necrose tumoral, especificamente necrose isquémica, o GBM secundário é mais semelhante ao oligodendroglioma por se desenvolver a partir de astrocitomas ou oligodendrogliomas de baixo grau, como já referido anteriormente (Hiroko Ohgaki et al., 2007; Ahmad F. Tamini et al., 2017).

As vias moleculares que levam ao aparecimento dos GBMs primário ou secundário também são diferentes, assim como a origem do tumor. Sob o ponto de vista histológico, são impossíveis de distinguir, no entanto o diagnóstico diferencial tem vindo a melhorar, sobretudo devido aos progressos feitos nas técnicas de genómica e bioinformática, por permitirem compreender com mais facilidade o perfil genético, epigenético e molecular da doença (Hiroko Ohgaki et al., 2007; Kenneth Aldape et al.,2015; Alireza Mansouri et al., 2017).

Assim, a nível histológico é possível fazer alguma diferenciação entre os GBMs secundários. Existem várias variantes como: GBM de células gigantes multinucleadas grandes e pleomórficas, gliossarcoma e GBM epitelioide, tal como é possível ver na Figura 5 (Aaron C. Tan et al.,2020).

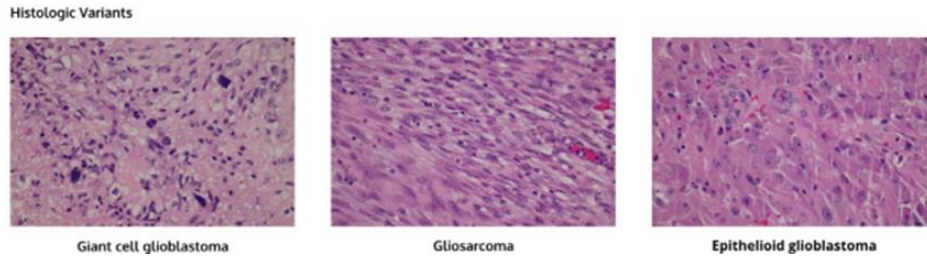


Figura 5: Diferenças histológicas entre as diversas variantes de GBM Secundário (Aaron C. Tan et al., 2020).

O GBM de células gigantes multinucleadas grandes e pleomórficas é caracterizado pela presença de células gigantes abundantes, com 500µm de diâmetro, onde a mitose acontece de forma atípica e proeminente com fragmentação da cromatina e proliferação celular, encontrando-se geralmente as células cercadas por estroma rico em reticulina. Apresentam mutações em TP53, amplificação de PTEN, sobre-expressão e deleção de p16 e ainda a presença da proteína glial ácida fibrilar (PGAF) (Yessica González-Cantú et al., 2011).

O gliosarcoma é característico do diagnóstico inicial, onde é menos frequente a metilação do promotor *O6-methylguanine-DNA Methyltransferase* (MGMT) e mutações no EGFR. Apresenta áreas astrocíticas malignas de alto grau e metaplasia mesenquimal semelhante ao sarcoma (Aaron C. Tan et al., 2020; Ahmad F. Tamimi et al., 2017; Kenneth Aldape et al., 2015).

No GBM epitelióide, as células são epitelióides, contêm citoplasma eosinofílico, cromatina vesicular, nucléolos proeminentes e apresentam a mutação V600E no proto-oncogene B-Raf (BRAF/V600E), mais evidente em doentes mais jovens (Aaron C. Tan et al., 2020; Ahmad F. Tamimi et al., 2017; Kenneth Aldape et al., 2015).

Apesar da histologia diferente, o tratamento não tem isso em conta e pelas imagens de ressonância magnética (MRS) há alguma dificuldade em distinguir GBM epitelióide de GBM de células gigantes (Aaron C. Tan et al., 2020).

Outra classificação possível para a doença é GBM com componente de oligodendroglioma (GBM-O) que se assemelha ao oligodendroglioma anaplásico (AO), facilmente distinguível de outros tipos de GBM através da co-deleção 1p/19q, ou seja, GBM-O tem ausência da co-deleção em 1p/19q e mutação em IDH, já o AO apresenta co-deleção em 1p/19q (Kenneth Aldape et al., 2015).

Adicionalmente, para se juntar à divisão tradicional de GBM primário ou secundário, surgiu o GBM *Not Otherwise Specified* (GBM NOS), caracterizado pela elevada heterogeneidade e por isso não pode ser incluído noutra categoria. Este diagnóstico é atribuído nas situações

em que avaliação das mutações na IDH não pode ser concluída (Ahmad F. Tamimi et al., 2017; Artemity S. Silantyev et al., 2019).

Os GBMs podem ainda ser classificados segundo o subtipo molecular ou transcricional, assim como resume a Figura 6, em neural, proneural, mesenquimal e clássico, porém considera-se os três últimos subtipos como os mais importantes (Syreeta DeCordova et al., 2020).

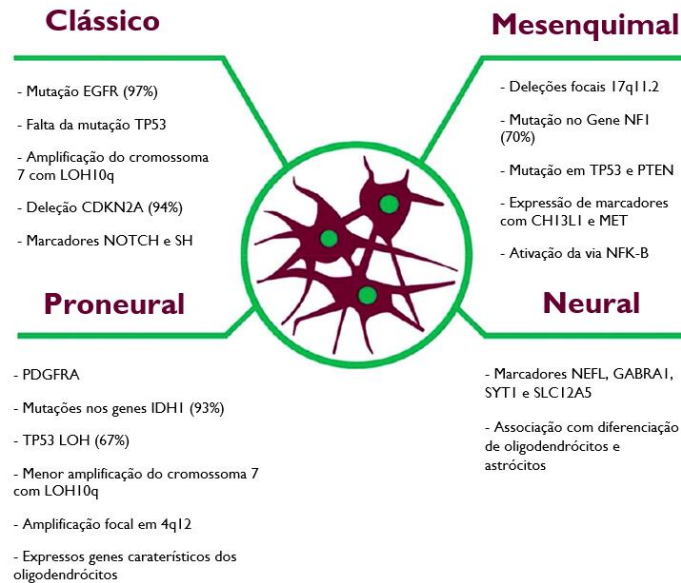


Figura 6: Diferenças entre os subtipos moleculares (Andrew Sasmita et al., 2017).

O subtipo neural do GBM é caracterizado pela presença de vários marcadores como *Neurofilament Light Chain* (NEFL), *Gamma-Aminobutyric Acid Receptor Subunit Alpha-1* (GABRA1), *Synaptotagmin 1* (SYT1) e *Solute Carrier Family 12 Member 5* (SLC12A5), que representam produtos de genes envolvidos no desenvolvimento e função do SNC. Este subtipo está mais associado ao aparecimento do GBM na interface entre o tecido tumoral e o parênquima cerebral e, ainda na zona periférica cerebral (Kenneth Aldape et al., 2015; Syreeta DeCordova et al., 2020; Shaimaa M. El-khayat et al., 2021; Melanie Y. Lombardi et al., 2017).

O subtipo clássico do GBM tem sobre-expressão de EGFR, uma deleção homozigótica no CDKN2A e não apresenta mutações na TP53 (Kenneth Aldape et al., 2015; Syreeta DeCordova et al., 2020; Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

O subtipo mesenquimal do GBM está associado ao pior prognóstico. Expressa *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) e *Enhancer-binding Proteins* (C/EBPs) (CCAAT), conta também com expressão de neurofibromina 1 (NF1), mutações no PTEN, diminuição na sinalização de *Mechanistic Target of Rapamycin Kinase* (mTOR), sobre-expressão de EGFR e mutações na CDKN2A (Kenneth Aldape et al., 2015; Syreeta DeCordova et al., 2020; Shaimaa M. El-khayat et al., 2021; Melanie Y. Lombardi et al., 2017).

As células mesenquimais expressam caspase-8 que consegue ativar o *Nuclear Factor Kappa B* (NFK-B), provoca o aumento de fator de crescimento endotelial (VEGF) e interleucina 8 (IL-8), conseqüentemente aumenta a angiogênese, que contribui para o desenvolvimento tumoral, o que lhe confere maior resistência e reduzida sobrevida (Alexander Ou et al., 2021; Syreeta DeCordova et al.,2020).

O subtipo proneural do GBM tem melhor prognóstico, expressa o recetor do fator de crescimento derivado de plaquetas alfa (PDGFRA) e mutações na IDH1, na Isoforma 2 da IDH (IDH 2) e em TP53. É ainda dividido em G-CIMP positivo ou negativo, de acordo com os padrões de metilação do DNA. É mais comum em doentes mais jovens e tem marcadores de prognóstico mais favoráveis (Kenneth Aldape et al.,2015; Syreeta DeCordova et al.,2020; Shaimaa M. El-khayat et al., 2021; Melanie Y. Lombardi et al., 2017).

À medida que se torna mais resistente e agressivo, o tumor tende a acumular macrófagos e a tornar-se mais semelhante ao estado mesenquimal. Esta conversão é devido à tempestade de citocinas que ocorre no microambiente tumoral (TME) (Alireza Mansouri et al., 2017; Miranda W. Yu et al.,2020; Syreeta DeCordova et al.,2020).

Os subtipos moleculares relacionam-se com a zona subventricular (SVZ), cuja localização é ilustrada na Figura 7.

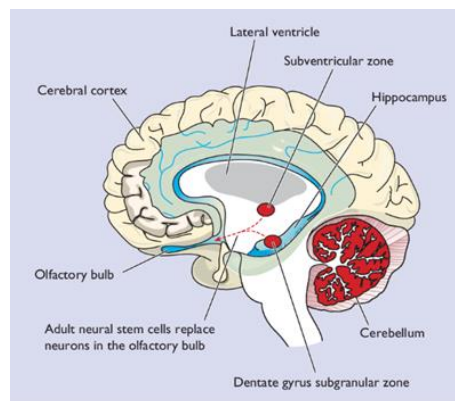


Figura 7: Localização da SVZ (Martínez-Silva et al., 2019).

Observou-se que o subtipo molecular neural e proneural encontram-se próximos da SVZ e têm mais semelhanças com as NSCs, contrariamente aos subtipos moleculares mesenquimal e clássico que se encontram mais afastados da SVZ (Andrew O. Sasmita et al., 2018). Com isto em mente, colocou-se a hipótese de que a proximidade à SVZ tem influência no comportamento tumoral. Os dados obtidos demonstraram que os tumores mais próximos da SVZ têm uma progressão tumoral mais rápida e por isso esses doentes têm menor sobrevida. Por outro lado, os subtipos moleculares mais afastados têm tendência a agregar-se. No entanto, são necessárias mais informações de forma a sustentar esta conclusão, pois o

subtipo mesenquimal é conhecido como o mais agressivo e com pior sobrevida, como foi dito anteriormente e esta hipótese vem contrariar essa afirmação (Andrew O. Sasmita et al., 2018).

A resposta ao tratamento do GBM vai também depender do subtipo molecular, e por isso a identificação é importante para adequar a terapia. Contudo, apesar de se poderem classificar em diferentes subtipos por terem diferentes anomalias genéticas, histologicamente são difíceis de distinguir. A identificação é possível após a ressecção cirúrgica, no entanto, a expressão de RNA mensageiro (mRNA) mostra uma heterogeneidade de assinaturas moleculares que dificulta a caracterização molecular da amostra (Ahmad F. Tamimi et al., 2017; Alexander Ou et al., 2021; Syreeta DeCordova et al., 2020).

4. Ambiente Imunológico no SNC

A heterogeneidade do GBM tem sido um grande obstáculo para estabelecer modelos pré-clínicos adequados e que sejam capazes de mimetizar a doença. No entanto, foram desenvolvidos organóides capazes de garantir a preservação da cito-arquitetura local e das interações intercelulares presentes no tumor original, tais como as assinaturas moleculares características e os gradientes de hipóxia. Portanto, compreender TME é fundamental para projetar estratégias terapêuticas (Alexander Ou et al., 2021).

O SNC está protegido pelo plexo coróide que regula a passagem de células imunes e solutos para LCR através das junções de oclusão e de bombas de efluxo. A Figura 8 representa as várias barreiras de acesso ao SNC (Abigail L. Mende et al., 2020; Antoine Louveau et al., 2015).

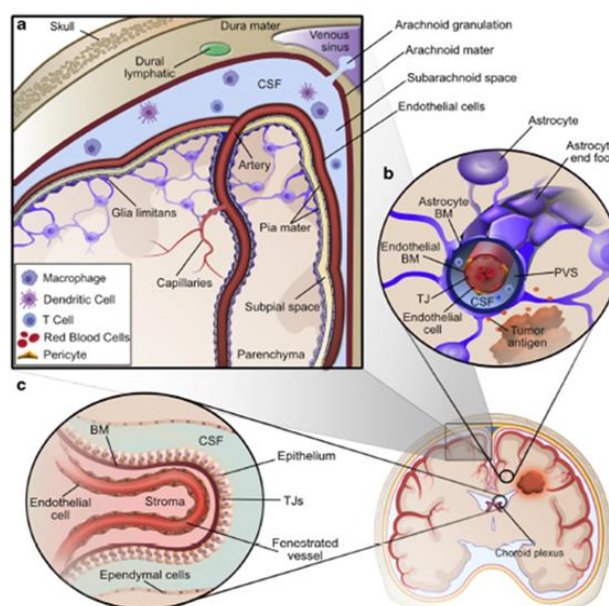


Figura 8: Barreiras anatómicas do SNC (Abigail L. Mende et al., 2020).

A entrada dos patógenos e células imunes circulantes é mediada pela BHE. Nas vénulas pós-capilares, a membrana basal endotelial é separada da glia, criando um espaço perivascular onde as células imunes podem circular, de forma a que os antígenos entrem no SNC (Abigail L. Mende et al., 2020; Alexander Ou et al., 2021).

A BHE é constituída, tal como é possível ver na Figura 9, por junções de oclusão, que são reforçadas por pericitos e células da glia, juntamente com claudinas e ocludinas associadas a terminais astrocíticos, pericitos e extremidades intermitentes de neurónios, que em conjunto contribuem para a homeostase cerebral (Alexander Ou et al., 2021; Abigail L. Mende et al., 2020).

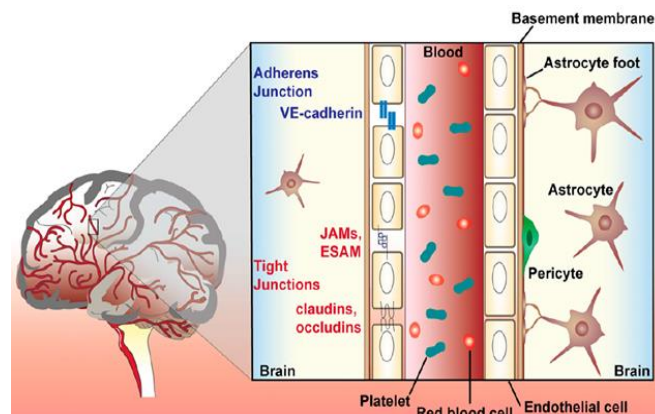


Figura 9: Constituição da BHE (Andrea Shergalis et al., 2018).

Os pericitos, provenientes de células estaminais de gliomas (GSCs), são importantes para garantir a integridade da BHE, pois sobre-expressam proteínas como *Non-Receptor Tyrosine Kinase (BMX)*, assim como ativam a sinalização por meio de STAT3 e permitem a manutenção da capacidade de renovação das GSCs (Alexander Ou et al., 2021).

A integridade da BHE é ainda reforçada por transportadores adenosina trifosfato (ATP)-binding Cassette (ABC), que juntamente com a glicoproteína-P controlam o transporte de agentes terapêuticos para fora do parênquima cerebral, o que contribui para a resistência aos fármacos (Alexander Ou et al., 2021).

Para além da BHE, a camada meníngea pial reveste as artérias à medida que penetram na superfície do cérebro, mas não reveste as veias que saem do parênquima cerebral. Numa segunda camada, existe a glia composta por astrócitos que reforçam a membrana basal das artérias e veias, bem como o próprio parênquima (Abigail L. Mende et al., 2020).

É ainda de considerar a barreira tumoral (*Blood-brain Tumor Barrier, BBTB*), ilustrada na Figura 10, a barreira existente entre os tecidos tumorais cerebrais e os vasos capilares, onde os vasos sanguíneos existentes fornecem oxigénio e nutrientes ao tumor, promovendo o

crescimento tumoral. A maior permeabilidade da BBTB aumenta a captação de fármacos (Ana Miranda et al., 2017).

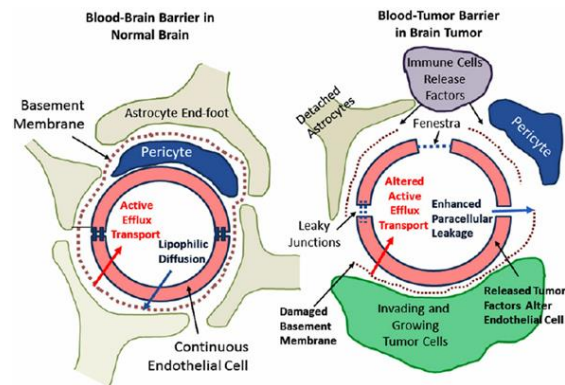


Figura 10: Diferenças entre BHE e BBTB (Solmaz Mojarad-jabali et al., 2022).

Devido a estas barreiras biológicas, o SNC tem sido considerado um órgão privilegiado sob o ponto de vista imunológico devido à falta de envolvimento linfático e também às propriedades da BHE. No entanto, investigações recentes contestaram esta certeza quando se descobriu que antígenos poderiam iniciar uma resposta imunológica no cérebro e por isso, sabemos hoje que o cérebro tem vigilância imunológica, sendo capaz de comunicar com o sistema imunológico periférico (Miranda W. Yu et al., 2021; Boyan Huang et al., 2021).

Assim, no SNC saudável estão presentes microglia, macrófagos, monócitos derivados do sangue, células derivadas de monócitos, células dendríticas, neutrófilos, células T e B, linfócitos inatos, células *Natural Killer* (NK) e pequenas quantidades de eosinófilos e mastócitos. Juntos são capazes de coordenar uma robusta resposta imunológica através dos sistemas imunológicos inato e adaptativo (Thomas Daubon et al., 2020; Syreeta DeCordova et al., 2020).

A microglia encontra-se em repouso, mas assim que se dá um estímulo inflamatório é ativada e recruta macrófagos resultantes de monócitos circulantes infiltrantes (TILs) responsáveis por aumentar a capacidade invasiva do tumor, devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1-beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Syreeta DeCordova et al., 2020).

A placa cribiforme, esquematizada na Figura 11, é vista como forma de saída das moléculas do LCR e do sistema imunológico do SNC. No entanto a verdadeira via pela qual os antígenos são libertados para dar início à resposta imunológica permanece por explicar (Antoine Louveau et al., 2015).

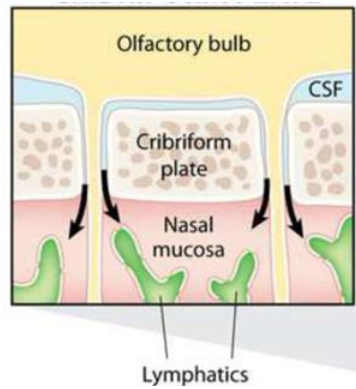


Figura 11: Esquema da placa cribiforme (Antoine Louveau et al., 2015).

As células apresentadoras de antígenos (APCs) podem atingir os gânglios linfáticos a partir da drenagem através das vilosidades aracnóides para os seios venosos centrais ou com drenagem do espaço subaracnóide para os vasos linfáticos através da placa cribiforme. O LCR também pode fazer drenagem através do perineuro das raízes dos nervos cranianos e espinhais ou dos vasos linfáticos durais da base do crânio (Abigail L. Mende et al., 2020).

A vigilância imunológica é muito complexa. Descobertas recentes mostraram que os canais linfáticos são paralelos aos seios venosos durais permitindo que as APCs no cérebro atravessem para os linfonodos cervicais profundos de modo a fazerem o *priming* de linfócitos T e B (Aaron C. Tan et al., 2020).

As vias linfáticas subaracnóides e durais permitem o tráfego de algumas células do sistema imunológico, que também pode ser facilitado pela perda de integridade da BHE. A rutura da BHE ocorre devido ao aumento da permeabilidade das junções de oclusão e a alterações nos níveis de claudina-1, 3 e 5. A IL-6 produzida pelas células endoteliais vasculares e pelos macrófagos associados ao tumor (TAMs) também contribuem para a rutura da BHE, pois a interação com as junções de oclusão, aumenta a dependência metabólica do GBM na glicólise aeróbica e promove o recrutamento de macrófagos pela via de sinalização de *C-X-C Motif Chemokine Ligand 5 (CXCL5)*. Esta via é ativada pela produção de quineurina dependente de enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) (Thomas Daubon et al., 2020).

A perda de integridade da BHE contribui para o aumento da tumorigenicidade, também pelas alterações observadas na expressão de aquaporinas que explicam a progressão tumoral, bem como a hipóxia associada ao GBM que resulta numa superprodução de fatores angiogênicos como VEGF e *Hypoxia-inducible Factor Alfa (hiF- α)*. Tal culmina na formação de uma rede vascular irregular, limitando o acesso a nutrientes, a células imunológicas e a agentes terapêuticos (Thomas Daubon et al., 2020).

Ao mesmo tempo, a rutura da BHE permite que as células T CD8⁺ migrem para o SNC e estimulem as respostas imunes inatas e adaptativas que produzem citocinas e quimiocinas

para recrutar linfócitos. É isto que explica as respostas imunológicas potentes (Ravi Medikonda et al., 2021; Abigail L. Mende et al., 2020).

No espaço perivascular, há interação entre as células tumorais com a BHE de forma a promover a sobrevivência, crescimento e fuga ao sistema imunológico. O fator de crescimento de hepatócitos (HGF), libertado pelas células tumorais, liga-se ao c-Met, um proto-oncogene, para formar células endoteliais mesenquimatosas, através da via Wnt/ β . Estas células garantem a proliferação, invasão celular e dão continuidade às condições de hipóxia para a manutenção das GSC, pela neovasculatura anormal que é formada (Alexander Ou et al., 2021).

Os pericitos ao interagirem com as células tumorais geram uma explosão oxidativa que promove a sobre regulação da proteína de membrana associada ao lisossoma 2A e autofagia mediada por chaperones, resultando em mais secreção de citocinas anti-inflamatórias como interleucina 10 (IL-10) e *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β). Aumenta a expressão de *Programmed Cell Death Ligand 1* (PD-L1) e diminui a expressão do complexo principal de histocompatibilidade classe 2 (MHCII) e da molécula co-estimuladora, gerando-se um ambiente de tolerância imunológica (Alexander Ou et al., 2021).

As células tumorais do GBM conseguem induzir linfopenia através da sinalização mediada pelo ligando Fas (FasL) e os TILs CD8⁺ que expressam moléculas co-inibidoras dos checkpoints imunológicos como *Programmed Cell Death Protein 1* (PD-1), a proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), imunoglobulina de células T, *T Cell Immunoglobulin and Mucin Domain-containing-3* (TIM-3) e *Lymphocyte-activation Gene 3* (LAG-3), o que torna as células T desgastadas, resultando em imunossupressão. As células do GBM também libertam um fator estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos para promover uma mudança na hematopoiese da medula óssea para linhagens granulocíticas, sendo mais uma causa para a redução de linfócitos (Alexander Ou et al., 2021). Também mutações genéticas e epigenéticas levam à perda do gene supressor tumoral PTEN, a sua inibição origina menor citotoxicidade, menor tráfego de células T, maior expressão de citocinas imunossupressoras e menor autofagia por meio da via dependente de *Phosphoinositide 3-kinase/Serine/threonine Kinase 1/mTOR* (PI3K/AKT) (Alexander Ou et al., 2021).

A escassez de células T efetoras no tumor é agravada pelo aumento de células T reguladoras (Treg) que suprimem a atividade das células T efetoras através de linfócitos T citotóxicos e secreção de citocinas TGF- β e IL-10. As células dendríticas presentes contribuem para o aumento de células Treg agravando a tolerância imunológica (Thomas Daubon et al., 2020; Abigail L. Mende et al., 2020). As células tumorais também libertam MHC *Class I Chain-related Protein A and B* (MICA/B), IL-10, TGF- β e antígeno leucocitário humano E

(HLA-E) para recrutar células Treg e inibir a atividade de células T e NK (Xing Wang et al., 2019).

Numa situação tumoral, a ativação de células T leva ao aumento de CTLA-4 expressando células Treg e a regulação positiva de CTLA-4 em linfócitos T citotóxicos interage com B7 na superfície das APCs, para reduzir a proliferação e sobrevivência de células T (Miranda W. Yu et al., 2021; Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

As células do GBM libertam *Motif Chemokine Ligand 2 (CCL2)*, *C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 (CXCL12)* e *Stromal Cell Derived Factor 1 (SDF-1)* que recrutam microglia e macrófagos. O CCL2 é o mais expresso e regula a migração penetrativa de TAM para o TME, expressando também um fator-1 estimulador de colônias (CSF-1) que funciona como contributo para o influxo de microglia e promoção da invasão tumoral (Syreeta DeCordova et al., 2020).

As células do glioma também têm dependência do metabolismo de aminoácidos acompanhada por uma captação elevada de aminoácidos de cadeia ramificada, através da sobre-expressão da transaminase I do aminoácido de cadeia ramificada. Os tumores libertam elevadas quantidades de cetoácido que aumentam a afluência de TAMs. Por seu lado, estes também conseguem levar à disfunção de células T através da expressão elevada da ectonucleosidase *Cluster of Differentiation 39 (CD39)* que juntamente com *Cluster of Differentiation 73 (CD73)* induz a produção de metabolitos imunossupressores como a adenosina (Thomas Daubon et al., 2020).

As células tumorais libertam igualmente várias moléculas responsáveis pela invasão, como a tenascina-c e a fibulina-3, que também promovem a sobrevivência e resistência à quimioterapia, assim como exossomas, que têm proteínas de fusão que promovem a transformação mesenquimal, *stemness*, capacidade invasiva do GBM e neovascularização endotelial (Alexander Ou et al., 2021).

A relação entre as células tumorais e o TME pode aumentar o crescimento do tumor e reduzir as hipóteses de sucesso terapêutico (Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

A grande diversidade no TME é ilustrada na Figura 12. Estão presentes células como linfócitos infiltrantes, TAMs, células supressoras derivadas de mielóides (MDSCs), outras células endoteliais, pericitos, assim como células malignas muito proliferativas (Alexander Ou et al., 2021; Steven Vleeschower et al., 2017).

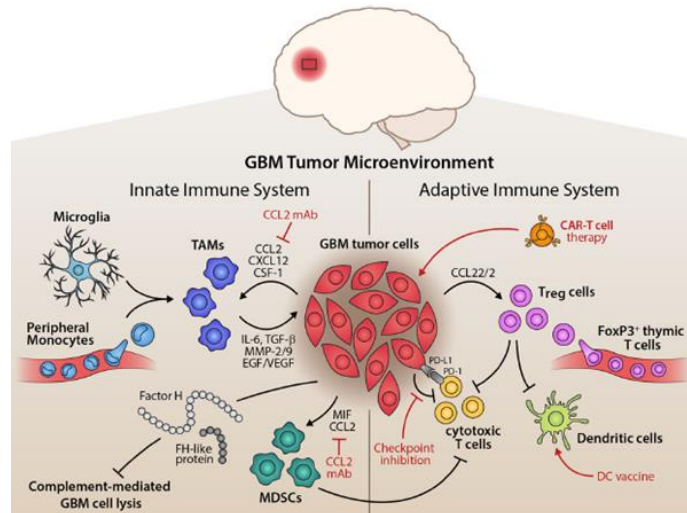


Figura 12: Microambiente Tumoral (Syreeta DeCordova et al., 2020).

Estão também presentes células T $CD4^+$ e $CD8^+$, NK e TAMs pró-inflamatórios inativos ou suprimidos. As células T inativas no TME expressam vários *checkpoints* e com o bloqueio de um único pode não ser possível ativar a resposta imune suprimida, embora as células T $CD4^+$ e $CD8^+$ tenham capacidade de atravessar a BHE, mesmo na ausência de inflamação (Abigail L. Mende et al., 2020; Boyan Huang et al., 2021; Xin Wang et al., 2019).

As células imunes residentes conseguem funcionar como células potenciais de apresentação de antígenos e as células T são ativadas nos nódulos linfáticos cervicais que entram no parênquima cerebral através do fluido cerebral (Boyan Huang et al., 2021; Xin Wang et al., 2019).

Os TAMs infiltram-se no TME, onde são a principal população presente, e apoiam o crescimento do glioma via fosfoproteína I (SPP1) que, por sua vez, inibe a apoptose de células tumorais, induz angiogênese e aumenta a tolerância aos TAMs. Portanto o aumento na presença de macrófagos indica uma diminuição da sobrevivência (Abigail L. Mende et al., 2020; Thomas Daubon et al., 2020).

Os TAMs têm dois fenótipos possíveis, um fenótipo pró-inflamatório e imunorreativo, M1, adquirido após estimulação por *Toll-like Receptor 4* (TLR 4) e interferão gama ($IFN-\gamma$), ou um fenótipo anti-inflamatório, M2, que após a exposição a interleucina 4 (IL-4), IL-10 e interleucina 13 (IL-13) agrava os efeitos imunossupressores (Alexander Ou et al., 2021).

Os TAMs M2 contribuem para a progressão do tumor, através da instabilidade genética, supressão da imunidade adaptativa por meio da expressão de *checkpoints* imunológicos e angiogênese. Ensaios *in vitro* mostraram que os TAMs conseguem suprimir a ativação de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$, pela liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-6, IL-10 e TGF- β e ainda aumentar a expressão de STAT3. Adicionalmente, expressam FasL

que contribui para a imunossupressão e para a diminuição de leucócitos no tumor (Ravi Medikonda et al., 2021; Abigail L. Mende et al., 2020; Syreeta DeCordova et al., 2020; Maria Martinez-Lage et al., 2019).

Outras citocinas imunossupressoras incluem prostaglandina E2 que suprime a proliferação de linfócitos e proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) e promove o recrutamento de células Treg (Sylvia C. Kurz et al., 2018).

A perda de PTEN e a produção de TAMs pela via de lisil oxidase (LOX), recruta macrófagos da via integrina $\beta 1$. A presença de LOX e integrina $\beta 1$ estão associadas a uma menor sobrevida em gliomas (Thomas Daubon et al., 2020).

Os macrófagos entram no tumor em resposta a quimiocinas mediadas por inflamação, sendo polarizados para M2 através de metabolitos como a quineurina, produzida por células do GBM. São as GSCs que libertam citocinas como citocina-1, inibidora de macrófagos, que permite a mudança de fenótipo pró-inflamatório para anti-inflamatório (Alexander Ou et al., 2021; Ravi Medikonda et al., 2021; Christopher M. Jackson et al., 2019).

As MDSCs, outras células presentes no TME, são uma população heterogênea de células mielóides imaturas que derivam de células estaminais hematopoiéticas pluripotentes, recrutadas pela regulação positiva de HIF- α . Estas células conseguem moderar a resposta imune adaptativa, inibindo a proliferação e funcionalidade das células T infiltrantes do tumor através da produção de citocinas anti-inflamatórias bem como promover a sobre regulação de PD-L1. Expressam *Integrin Alpha-M* (CD11b) e *Cluster of Differentiation 33* (CD33), sendo frequentes em GBM progressivos. Libertam espécies reativas de oxigênio (ROS) capazes de promover apoptose de células NK e células T ativadas. Expressam também IDO, metabolizam triptofano em quineurina, que compromete as respostas mediadas pelas células T citotóxicas e consequentemente, provocam maior imunossupressão, por induzir a apoptose de células imunes e proliferação de células Treg (Alexander Ou et al., 2021; Abigail L. Mende et al., 2020).

No TME, os monócitos convertem-se em MDSCs e macrófagos imunossupressores que contribuem para a progressão do tumor. Assim o bloqueio de MDSCs poderá ser uma possível vantagem no tratamento (Aida Karachi et al., 2018).

A imunossupressão sistêmica e intra-tumoral induzida pelo GBM limita as funções do sistema imunológico que se traduzirão numa alteração da imunidade celular, efeitos adversos da quimioterapia e aumento de células Treg, MDSCs e TAMs no sangue periférico (Abigail L. Mende et al., 2020; Aida Karachi et al., 2018; Ravi Medikonda et al., 2021).

Várias vias de sinalização suprimem a resposta imunológica, como a sinalização STAT3. A ativação de STAT3 induz a produção de citocinas imunossupressoras como IL-6, IL-10,

interleucina 23 (IL-23) e TGF- β . Em células dendríticas, a ativação de STAT3 leva à redução de apresentação de antígenos e regulação negativa de *Cluster of Differentiation 40* (CD40), *Cluster of Differentiation 80* (CD80), *Cluster of Differentiation 86* (CD86) e MHCII. A apresentação de antígenos por células dendríticas na presença de IL-10 e TGF- β induz a expressão de *Forkhead Box P3* (FOXP3) em células T CD4⁺ e aumenta o recrutamento de células Treg (Sylvia C. Kurz et al., 2018).

A imunossupressão induzida pelas células do GBM pode ser provocada pela libertação de citocinas pró-tumorais responsáveis pela polarização dos macrófagos para promover o recrutamento de células Treg, inibir a maturação das células dendríticas e a função das células NK ou pela expressão de moléculas imunossupressoras como PD-L1 que podem impedir a proliferação e ativação de células T (Boyan Huang et al., 2021).

A disfunção imune local do GBM também dificulta a resposta imunológica anti-tumoral, com a contribuição da regulação positiva das células Treg, após 10 dias da implantação do tumor. A libertação de células Treg é mediada pela libertação tumoral da citocina TGF- β e a regulação positiva da enzima IDO (Ravi Medikonda et al., 2021).

O TGF- β libertado pelo GBM aumenta a angiogénese, induz a regulação positiva de FoxP3 em células T CD4⁺ que se diferenciam em células Treg, prejudica a função das células NK, pela regulação negativa de *Natural Killer Group 2 Member D* (NKG2D), inibição de células T CD8⁺ efetoras e manutenção da população progenitora do glioma, agravando assim a imunossupressão (Abigail L. Mende et al., 2020; Sylvia C. Kurz et al., 2018).

As células Treg contribuem para a supressão da atividade do sistema imunológico, conseguem silenciar linfócitos T reativos, células dendríticas, macrófagos e células NK. Expressam *Forkhead Box P23* (FoxP23) e *Cluster of Differentiation 25* (CD25), suprimem a atividade e proliferação de células T efetoras através da produção de citocinas imunossupressoras como TGF- β e IL-10. As células Treg em abundância refletem um mau prognóstico devido à sua capacidade de inibir a função das células T infiltrantes, tendo a acumulação de células Treg no TME sido associada a recorrência do tumor e menor sobrevivência (Aida Karachi et al., 2018; Syreeta DeCordova et al., 2020; Sylvia C. Kurz et al., 2018).

A carga mutacional do tumor (TMB) é outro fator que influencia a resposta à terapia. A determinação de TMB é usada para prever como será a resposta à imunoterapia, uma vez que um tumor hipermutado mostra maior resposta à terapia anti-PD-1. Esta afirmação sugere que quando a carga mutacional é baixa, o tumor tem menos neoantígenos disponíveis para desencadear uma resposta imune anti-tumoral (Ravi Medikonda et al., 2021). O tumor pode evitar a resposta imunológica por não expressar neoantígenos de alta qualidade através de

citocinas imunossupressoras e ligandos dos *checkpoints* imunológicos ou perder neoantígenos (Sylvia C. Kurz et al., 2018).

Mutações somáticas acumulam-se à medida que o tumor se desenvolve e geram neoantígenos ou novos antígenos mutantes específicos do tumor capazes de serem reconhecidos pelo sistema imunológico e ativar a resposta mediada pelas células T CD8⁺ (Ravi Medikonda et al.,2021).

Por outro lado, a TMZ, convencionalmente utilizada nos doentes com GBM, anula os efeitos da terapia anti-PD-1, originando, conseqüentemente, um aumento de infiltração de macrófagos imunossupressores. A dose de TMZ é capaz de influenciar o número de células Treg e a eliminação destas células favorece a imunoterapia, por ser capaz de suprimir as respostas imunológicas funcionais, impede a formação de células T memória e diminui o número global de células B e T. No entanto para confirmar esta hipótese são necessários mais ensaios clínicos (Ravi Medikonda et al.,2021; Alexander Ou et al., 2021; Aida Karachi et al., 2018; John H. Sampson et al.,2011)

Ao mesmo tempo, os corticosteróides como a dexametasona inibem a resposta imunológica e, conseqüentemente, diminuem o benefício terapêutico da imunoterapia, devido à diminuição da proliferação e diferenciação de células T *naive* mediada por CTLA-4, assim como a radioterapia hipofracionada contribui para a imunossupressão sistêmica grave. Por sua vez, a radiação pode aumentar a TMB, permitindo o desenvolvimento de mais neoantígenos que serão reconhecidos pelo sistema imunológico (Abigail L. Mende et al., 2020; Ravi Medikonda et al.,2021).

O sistema complemento é também uma linha de defesa do sistema imunológico inato, podendo ser ativado por diferentes patógenos e células alteradas por anticorpos ligados a patógenos. São as proteínas reguladoras que têm como função proteger as células saudáveis do ataque por parte do sistema complemento. Estudos têm reportado a importância destas proteínas reguladoras, uma vez que as células do GBM podem expressar reguladores como fator H para proliferar sem controlo e resistir à morte mediada pelo sistema complemento (Syreeta DeCordova et al., 2020).

Outros reguladores do sistema complemento são também importantes como o *Cluster of Differentiation 59* (CD59) que protege contra a lise mediada pelo sistema complemento e se liga ao complexo C5b-8 para bloquear os locais de fixação do C9, e ainda o *Cluster of Differentiation 55* (CD55) que previne a ativação do complemento pela inibição da via clássica de ativação, esta é desencadeada pelo reconhecimento de complexos formados por antígenos

e anticorpos pela proteína C1 que se liga a porção Fc dos anticorpos imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina M (IgM) (Syreeta DeCordova et al., 2020; Ana Ferreira et al., 2019).

Trabalhos recentes têm sugerido que as células endoteliais que expressam IL-6 e o fator estimulador de colónias microambientais ativam AKT/mTOR e contribuem ainda mais para a imunossupressão (Alexander Ou et al., 2021).

Estudos pré-clínicos recentes mostraram que em gliomas malignos há um aumento da expressão de LGALS1 (Galactina-1 (Gal-1)) que codifica a Gal-1, uma proteína de ligação ao galactosídeo com características imunossupressoras. A menor expressão de LGALS1 indica menor capacidade de invasão, proliferação e também menos MDSCs, macrófagos e citocinas imunossupressoras (Alexander Ou et al., 2021).

Os diferentes subtipos transcricionais também têm diferentes ambientes imunológicos. O GBM mesenquimal exhibe elevada expressão de mediadores pró-inflamatórios juntamente com fatores imunossupressores, *checkpoints* imunológicos, TAMs, neutrófilos e células T CD4⁺, sendo assim é considerado o mais adequado para a imunoterapia (Thomas Daubon et al., 2020; Maria Martinez-Lage et al., 2019).

Por outro lado, o GBM proneural considera-se que tenha infiltração imunológica inferior comparativamente aos restantes subtipos moleculares do GBM, por terem sido caracterizadas apenas as principais populações de células do sistema imunológico, portanto para que se possa concluir sobre a suscetibilidade à imunoterapia é necessário realizar mais investigações (Maria Martinez-Lage et al., 2019).

5. Diagnóstico Molecular

O diagnóstico dos doentes é realizado por tomografia por emissão de positrões (PET), assim como a MRS, magnetoencefalografia, estimulação magnética transcortical, avaliação neuropsicológica e marcadores anatómicos de superfície (Jehad Zakaria et al., 2017).

A avaliação neuropsicológica envolve testes cognitivos, motores e psicológicos com o objetivo de avaliar a habilidade intelectual geral, desempenho no trabalho, assim como avaliar a funcionalidade cerebral durante a cirurgia necessária (Jehad Zakaria et al., 2017).

Os testes neurológicos e métodos de neuroimagem são usados como procedimentos de diagnóstico suplementares para avaliar o estadio da doença, porém estes testes são pouco sensíveis, nem sempre conseguem detetar a presença e a malignidade do tumor, podem causar hemorragias e danos cerebrais, não permitem a identificação da pseudoprogessão (PsPD), um fenómeno que ocorre nos doentes alguns meses após radioterapia e quimioterapia e se caracteriza por um aumento do tamanho do tumor na imagem radiológica, sem aumento de

sinais e sintomas neurológicos, e são muito dispendiosos (Kenneth Aldape et al., 2015; Shengtao Qu et al., 2015; Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

A dificuldade em diagnosticar é uma realidade, agravada pela administração de outros medicamentos anti-angiogénicos ou quimioterapia e radioterapia que podem influenciar os resultados de diagnóstico (Artemiy S. Silantyev et al., 2019; L. Saadatpour et al., 2016).

O diagnóstico é realizado quando a doença já se encontra em estado avançado, como consequência do lento processo de disseminação, típico nos tumores cerebrais, que favorece a adaptação à compressão e deformação causadas pela massa tumoral, gerando uma manifestação tardia ou ausente de sintomas, mesmo que já existam sinais morfológicos de penetração tumoral (Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

Atualmente, o diagnóstico mais preciso é feito por uma análise histológica de um tecido tumoral, obtido através de biópsia após a ressecção cirúrgica. O facto de serem estratégias que não têm em conta a possibilidade de a localização ser de difícil acesso, dificulta o diagnóstico. A biópsia por ser invasiva pode ter vários riscos associados, por isso é muitas vezes impraticável, assim como é considerada pouco confiável devido à heterogeneidade tumoral (Shufang Liang et al., 2011; Michael Krebs et al., 2014).

A avaliação pode ser feita, também a partir de uma biópsia líquida, minimamente invasiva, segura e reprodutível. No entanto, apresenta algumas limitações como a alta variabilidade das mutações genéticas e a baixa concentração dos analitos alvo, apesar do recurso a métodos analíticos cada vez mais evoluídos ter facilitado a análise histológica, para que a identificação de alterações genéticas seja cada vez mais perceptível (Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

Para tumores intracranianos, as biópsias líquidas são a fonte preferível, sendo o LCR o mais útil por revelar elevada sensibilidade e especificidade no diagnóstico. No entanto, os riscos associados à punção lombar não permitem que seja uma técnica rotineira na prática clínica, apesar de terem maior adesão e rendimento (Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

Para além do sangue e do LCR, a urina também é útil na deteção de biomarcadores, por ser capaz de acumular metabolitos, nomeadamente de baixo peso molecular provenientes do tumor. Pode ser uma abordagem a utilizar em combinação com outra(s) ferramenta(s) de diagnóstico e monitorização (Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

Uma dessas ferramentas consiste na espetrometria de massa por ser sensível, seletiva e reprodutível, ter alto desempenho, permitir a triagem dos doentes, analisar uma ampla gama de compostos, estabelecer o subtipo molecular do tumor e discriminar a transformação neoplásica de outras condições. No entanto, é necessário que a tecnologia de imagem consiga

acompanhar as necessidades médicas, embora estas tecnologias sejam já bastantes vantajosas porque no plasma, a concentração de moléculas provenientes do tumor é bastante reduzida, o que exige técnicas com baixos limites de deteção (Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

Também a natureza do tumor torna a identificação de biomarcadores mais difícil e a escolha dos biomarcadores corretos é fundamental na seleção do tratamento adequado e no aumento da sua eficiência (Artemiy S. Silantyev et al., 2019; L. Saadatpour et al., 2016).

Os biomarcadores são definidos como indicadores que podem ser objetivamente medidos de forma a avaliar o risco ou a presença de determinada doença, assim como a resposta à terapia. Existem 3 classes de biomarcadores: biomarcadores de diagnóstico, que identificam a doença, biomarcadores de prognóstico, que avaliam a evolução da doença e os biomarcadores preditivos, que predizem a resposta à terapêutica selecionada (Steven Gutman et al., 2006).

Um marcador tumoral ideal deve ser facilmente acessível para análise, recorrendo a técnicas simples, capazes de fornecer informações precisas sobre a presença e gravidade da doença, deve ter 100% de sensibilidade e especificidade, semi-vida suficiente para ser possível a sua deteção, ter a capacidade de refletir a carga tumoral, ser de baixo peso molecular, fundamental para o sucesso do biomarcador, e ainda a sua deteção e quantificação serem economicamente viáveis. Contudo, para serem utilizados na prática clínica, os biomarcadores não precisam ser ideais (Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

Uma vez que as características moleculares do GBM atualmente passíveis de avaliação são ainda muito restritas, a identificação de biomarcadores é, portanto, essencial para um diagnóstico fiável, o mais precoce possível, e para a seleção do melhor tratamento a instituir (Andrew O. Sasmita et al., 2018).

5.1. Biomarcadores com Evidência Clínica

Entre os biomarcadores com maior evidência clínica, no diagnóstico ou monitorização do GBM, encontram-se as mutações IDH 1, IDH 2 e no promotor MGMT, bem como a co-deleção em 1p/19q (Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

5.1.1. Isocitrato Desidrogenase

As mutações na IDH são as primeiras a aparecer no processo de formação do tumor, onde têm um papel fundamental. A deteção destas mutações é possível usando técnicas de imunohistoquímica, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ou espetrometria de massa a partir do tecido tumoral recolhido durante a biópsia (Andrew O. Sasmita et al., 2018).

A IDH 1 localiza-se no citoplasma e peroxissomas, enquanto IDH 2 se encontra nas mitocôndrias. Estas isoenzimas são bastante semelhantes, estando ambas envolvidas na fosforilação oxidativa mitocondrial, metabolismo da glutamina, lipogênese, detecção de glicose e regulação do estado redox celular (Johanna Mondesir et al., 2016).

As mutações em IDH 1 e IDH 2 estão associadas a 70-80% dos GBMs, considerando-se, por isso, marcadores confiáveis e objetivos para o diagnóstico e avaliação do prognóstico do GBM secundário, podendo os GBMs ser categorizados de acordo com 3 subtipos: IDH mutada com co-deleção 1p/19q, onde a sobrevivência é maior, IDH mutada sem co-deleção e IDH selvagem, onde há um pior prognóstico. No entanto, ainda não existem testes, implementados na prática clínica para avaliar a presença deste marcador (Aaron C Tan et al., 2020; Ahmad F. Tamimi et al., 2017; Syreeta DeCordova et al., 2020; Marta Mellai et al., 2013; Melanie Y. Lombardi et al., 2017).

As mutações podem ser heterozigóticas, missense, com substituição dos aminoácidos arginina 132 na IDH 1 e arginina 172 ou 140 na IDH 2. A mutação é capaz de diminuir a capacidade de converter isocitrato em α -cetoglutarato (α -KG), que consequentemente facilitará a proliferação das células tumorais (Johanna Mondesir et al., 2016).

As enzimas IDH 1 e IDH 2 catalisam a conversão de isocitrato em α -KG, numa reação dependente de NADP^+ , com redução de NADP^+ a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (Figura 13). (Johanna Mondesir et al., 2016).

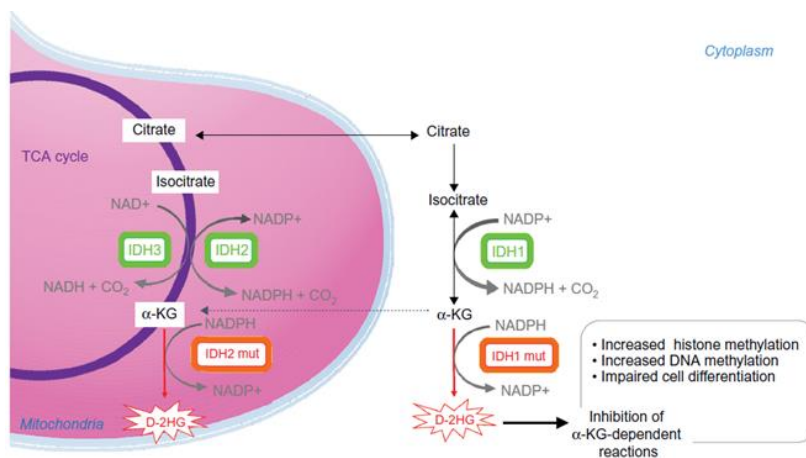


Figura 13: Mecanismo enzimático das Isoenzimas IDH (Johanna Mondesir et al., 2016).

O NADPH é um agente redutor celular essencial aos processos de destoxificação como a redução de glutatona e tiorredoxinas e ativação da catalase, envolvidos na proteção contra a toxicidade de ROS e danos oxidativos no DNA, sendo a IDH a principal produtora de NADPH no cérebro (Johanna Mondesir et al., 2016).

O metabolismo redutor α -KG/glutamina ao ser comprometido permite que as células tumorais mantenham *pools* de precursores biossintéticos e suprimam as espécies reativas de oxigénio mitocondrial, resultando na manutenção da proliferação celular (Johanna Mondesir et al., 2016).

O 2-hidroxioglutarato (D-2HG) é um oncometabolito resultante do metabolismo da IDH, sendo bastante comum no GBM do subtipo proneural e no GBM secundário. Os níveis de D-2HG podem ser medidos no plasma e na urina dos doentes com as mutações nas IDH 1 e IDH 2, sendo por isso de interesse para o diagnóstico e monitorização dos doentes. No entanto, os níveis deste metabolito nos doentes com GBM IDH mutada permanecem normais, o que sugere que a BHE impede a sua passagem para a circulação. Assim, a utilização de D-2HG como biomarcador ainda está por determinar. A espectroscopia por ressonância magnética nuclear permite medir os níveis de D-2HG *in vivo*, e correlacioná-los com o volume tumoral, sugerindo que a sua utilização como ferramenta não invasiva para o diagnóstico do GBM e posterior acompanhamento do tratamento (Johanna Mondesir et al., 2016; Melanie Y. Lombardi et al., 2017; Andrew O. Sasmita et al., 2018).

5.1.2. Co-deleção 1p/19q

A co-deleção é uma translocação que ocorre nos braços dos cromossomas 1p/19q e leva à perda da informação de 1p e 19q (Rafay Ahmed et al., 2014).

A deteção desta alteração genética é possível por *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) e PCR, sendo que FISH e PCR são as técnicas mais utilizadas (Matthias Preusser et al., 2012).

Os doentes com esta co-deleção apresentam uma progressão da doença mais lenta quando tratados com agentes alquilantes, sendo, por isso considerada um biomarcador preditivo do benefício da quimioterapia (Rafay Ahmed et al., 2014).

5.1.3. O6-methylguanine-DNA Methyltransferase

A metilação do promotor de MGMT é usada como biomarcador preditivo da resposta a TMZ, com mais frequência em GBM secundário, embora variações individuais precisem ser consideradas. É avaliada a partir de um tecido tumoral para biópsia com recurso a PCR, PCR combinado com MS, SYBR Green ou pirosequenciação (Andrew O. Sasmita et al., 2018).

O estado de metilação do promotor MGMT está muito presente quando o tumor é G-CIMP positivo e pode ser útil para fazer a triagem dos doentes que podem ser tratados com TMZ, assim como distinguir PsPD de progressão (Kenneth Aldape et al., 2015).

5.1.4. *Telomerase Reverse Transcriptase*

A telomerase humana, uma ribonucleoproteína, regula o comprimento dos telómeros e com isso desempenha um papel importante na imortalização celular e oncogénese. A maior expressão de TERT traduz-se num pior prognóstico (Kenneth Aldape et al., 2015).

A mutação do promotor TERT pode ser um marcador substituto ou confirmatório para a co-deleção 1p/19q. (Kenneth Aldape et al., 2015).

5.2. Potenciais Biomarcadores

Existem outros biomarcadores que podem ser úteis no diagnóstico, no prognóstico ou por terem capacidade preditiva (Paulo Linhares et al., 2020).

A Tabela 2 resume todos os marcadores considerados como potenciais que foram avaliados de forma a perceber a sua utilidade no GBM.

Tabela 2: Biomarcadores considerados promissores na avaliação do GBM (Paulo Linhares et al., 2020).

Proliferação Celular	Proliferação Vascular	Sistema Imunológico	Inflamação	Coagulação	Estado Nutricional
<ul style="list-style-type: none"> • AHSG • Catepsina D • CXCL10 • EGFR • GFAP • MMP-9 • OPN • Recoverina • PDGF-b • IGF-I • TGF-β • TNF-α • IL-8 	<ul style="list-style-type: none"> • BMP-2 • CXCL10 • MMP-9 • OPN • YKL-40 • VEGF • PDGF-b • TNF-β • TNF-α • TSPI 	<ul style="list-style-type: none"> • CD14 • CD23 • IgE • OPN • Recoverin • TGF-β • TNF-α • IL-6 	<ul style="list-style-type: none"> • CD23 • Albumina • Rácio N-L • Rácio P-L • SAAI 	<ul style="list-style-type: none"> • Fibrinogénio • Fatores de protrombinase 	<ul style="list-style-type: none"> • IGFBP-2 • Albumina

5.2.1. Biomarcadores Circulantes

Os biomarcadores circulantes são de maior acessibilidade por serem facilmente detetados no sangue ou no LCR, permitindo, por isso, um melhor acompanhamento da doença. No entanto, a sua determinação não está ainda implementada na prática clínica (Johan Kros et al., 2015).

O grande obstáculo à aplicação destes marcadores na prática clínica deve-se à heterogeneidade característica do tumor, assim como à curta semi-vida dos biomarcadores que afeta a monitorização segura e fiável da dinâmica da evolução fenotípica do tumor e das respostas ao tratamento (Manfred Westphal et al., 2015).

5.2.1.1. Células Tumorais Circulantes (CTc)

As CTc resultam da disseminação da doença, embora as metástases não sejam uma característica do GBM, devido à presença da BHE. Abandonam o tumor primário e entram em circulação, de forma ainda não conhecida, postulando-se ser resultado da elevada capacidade de invasão do tumor, que ajuda a ultrapassar a BHE ou mesmo interromper a sua função no desenvolvimento do tumor (Andrew O. Sasmita et al., 2018; Artemiy S. Silantyev et al., 2019, Zsuzsanna Birkó et al., 2020).

O fenótipo invasivo deve-se ao aumento da hipóxia tecidual resultante do crescimento tumoral. A transição epitélio-mesenquimal (EMT) permite que as células epiteliais percam a polaridade apical-basal, se separem das células vizinhas, adquiram uma morfologia semelhante à dos fibroblastos, invadam o estroma circundante e se tornem resistentes à apoptose. Durante este processo, as células tumorais perdem a expressão de alguns marcadores e começam a expressar proteínas do citoesqueleto mesenquimal, proteínas de adesão, fatores de crescimento e migração celular como o SLUG e cinases. A elevada expressão de SLUG implica angiogénese, maior invasão e migração celular. As vias Wnt e NOTCH também se encontram envolvidas neste processo, juntamente com TGF- β (Terence W. Friedlander et al., 2014; Melanie Y. Lombardi et al., 2017).

As CTc são semelhantes às células dos subtipos proneural e mesenquimal relativamente ao fenótipo e após quimiorradiação os seus níveis diminuem, podendo por isso apresentar um papel importante na monitorização dos doentes. São capazes de representar bem a heterogeneidade tumoral, juntamente com a possibilidade de poderem ser detetadas no sangue com recurso a ensaios de telomerase ou amplificação de EGFR. Trazem a vantagem de ser um procedimento minimamente invasivo e de baixo risco, embora sejam raramente encontradas, uma vez que o GBM é um tumor restrito ao cérebro, e por isso a deteção de CTc é bastante difícil, como já foi dito anteriormente (Andrew O. Sasmita et al., 2018; Artemiy S. Silantyev et al., 2019; Zsuzsanna Birkó et al., 2020).

Portanto, as conclusões sobre o potencial das CTc como biomarcador em GBM ainda são muito precoces, sendo necessária investigação adicional para compreender o seu papel no prognóstico e diagnóstico do GBM (Zsuzsanna Birkó et al., 2020).

5.2.1.2. Vesículas Extracelulares (VEs)

As VEs são vistas como um canal de comunicação intercelular. Conseguem mediar o transporte de fatores responsáveis pela proliferação, migração e invasão celulares, resistência ao tratamento e angiogénese (Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

Conseguem atravessar a BHE e podem ser encontradas no sangue, LCR, urina e saliva. A quantidade de VE em doentes é maior comparativamente a pessoas saudáveis, mostrando uma associação com a recorrência tumoral (Zsuzsanna Birkó et al., 2020; Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

Tal como as células circulantes, as VEs transportam fatores de crescimento oncogénicos, recetores, enzimas, fatores de transcrição, moléculas de sinalização e imunomodulação, proteínas, lípidos e metabolitos cuja composição reflete a realidade da célula de origem, ou seja, são indicadores do ambiente tumoral e são mais estáveis por estarem protegidas da rápida degradação. Alguns dos biomarcadores identificados nas VEs são o *Epidermal Growth Factor Receptor Variant III* (EGFRvIII), microRNA-21 (miRNA-21) ou mRNA da IDH (Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

Investigações recentes sugerem que as VEs libertadas de gliomas resistentes à TMZ transferem a resistência para outras células que ainda respondem à TMZ, tornando-as também resistentes. Sabe-se, por isso, que as VEs desempenham um papel importante não só na evolução tumoral como também na resposta à terapia (Zsuzsanna Birkó et al., 2020).

A ultracentrifugação, cromatografia de exclusão molecular, ultrafiltração e purificação por afinidade podem ser usadas para isolar VEs do plasma sanguíneo. Uma vez isoladas e desnaturadas, as técnicas de *Western Blotting*, espetrometria de massa e sequenciação podem ser usadas para analisar o conteúdo genómico das VEs (Keon Mahmoudi et al., 2015).

As VEs podem também ser úteis na identificação de PsPD, através do isolamento de exossomas de um doente sujeito a radio e quimioterapia para identificar marcadores que revelem a verdadeira progressão (Keon Mahmoudi et al., 2015).

Embora sejam alvos promissores para a utilização como biomarcadores, a sua deteção e quantificação em amostras clínicas permanece um desafio, não existindo ainda orientações sobre o uso destes biomarcadores na prática clínica (Dimitry Chistiakov et al., 2014; Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

5.2.1.3. DNA Circulante (ctDNA)

O ctDNA é um DNA fragmentado que pode ser libertado por células apoptóticas, necróticas, células em divisão rápida e CTCs (Zsuzsanna Birkó et al., 2020).

As concentrações de ctDNA são muito baixas, mas com a progressão tumoral aumentam, sendo um indicador que se relaciona com a carga e estado de desenvolvimento tumoral, assim como com a renovação celular. A análise das mutações que transportam pode ser uma ferramenta de avaliação precoce, constituindo uma vantagem no diagnóstico (Zsuzsanna Birkó et al., 2020; Paulo Linhares et al., 2020).

Assim, o ctDNA pode atuar não só como um potencial biomarcador, permitindo personalizar o tratamento, pois revela a composição real, heterogeneidade e evolução tumoral, conseguindo superar as dificuldades da MRS no acompanhamento do doente, uma vez que a doença progressiva e necrose nem sempre são fáceis de avaliar por técnicas de imagem como a PET (Paulo Linhares et al., 2020).

A deteção de ctDNA pode ser feita no sangue, LCR, saliva ou líquido pleural, na sua forma livre, em VE ou associados a proteínas. O LCR é o local onde se encontra em maiores quantidades, no entanto a punção lombar necessária tem menor probabilidade de sucesso por ser um procedimento de alto risco, estando contraindicada em doentes com aumento da pressão intracraniana (Zsuzsanna Birkó et al., 2020).

A avaliação é feita usando PCR baseado em gotículas e formas otimizadas de *Next-Generation Sequencing* (NGS), que apresenta uma melhor sensibilidade e especificidade (Zsuzsanna Birkó et al., 2020).

Existem alguns obstáculos que dificultam a implementação do uso de ctDNA na prática clínica, nomeadamente a baixa concentração dos compostos na circulação sistémica, possivelmente devido à baixa penetração na BHE, o que torna os ácidos nucleicos difíceis de serem identificados como moléculas circulantes e à sua curta semi-vida, inferior a 1,5 h e ao facto de serem rapidamente fagocitados (Artemiy S. Silantyev et al., 2019; Zsuzsanna Birkó et al., 2020).

Outros ácidos nucleicos circulantes promissores como o DNA mitocondrial (mtDNA) têm sido avaliados como potenciais biomarcadores para serem utilizados na prática clínica. Observou-se que uma maior concentração de mtDNA de leucócitos periféricos está associado a um maior risco para desenvolver glioma, com uma diminuição da OS após a recessão do tumor, uma menor quantidade de células NK e uma maior concentração de interleucina-2 (IL-2) e TNF- α (Zsuzsanna Birkó et al., 2020).

5.2.1.4. RNA Circulante (cirRNA)

O cirRNA é menos explorado que os ctDNA por ser menos estável, uma vez que circula livremente fora das células, sendo por isso facilmente degradados por enzimas ou está

incorporado em VEs. Está envolvido no processo oncogénico e é mais expresso nos tecidos neurais do que noutros tecidos. Encontra-se no sangue e noutros fluidos corporais, no entanto, o papel do cirRNA no desenvolvimento tumoral ainda precisa de ser elucidado, embora se pense que possa ser um bom biomarcador de prognóstico ou preditivo (Zsuzsanna Birkó et al., 2020; Johan Kros et al., 2015).

Apesar de todos os dados, ainda não foi validado como biomarcador de forma a que possa ser introduzido na prática clínica (Johan Kros et al., 2015).

Em particular, os *Long Noncoding RNA* (lncRNA) participam no início da progressão tumoral através da desregulação das cascatas de sinalização envolvidas. O *HOX transcript antisense RNA* (HOTAIR) é um lncRNA, detetado e associado a um pior prognóstico e sobrevida diminuída. O mesmo se verifica com o *Growth Arrest Specific 5* (GAS5). No entanto, uma maior expressão de HOTAIR aumenta a probabilidade de recorrência, contrariamente ao aumento da expressão de GAS5, cuja maior expressão está associada a uma redução da recorrência (Zsuzsanna Birkó et al., 2020).

5.2.1.5. MicroRNAs

Os miRNAs são moléculas pequenas não codificantes, constituídos por aproximadamente 22 nucleótidos, livres, circulantes, em grandes quantidades, que se relacionam com a progressão de células tumorais, são capazes de modular a expressão de genes específicos, degradando o mRNA correspondente ou bloqueando a maquinaria ribossomal (Andrew O. Sasmitha et al., 2018; Andrew O. Sasmitha et al., 2018; Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

Podem ser detetados, via *microarray* e análise por PCR, a partir de fluidos corporais como sangue, urina ou LCR, o que torna a sua deteção menos invasiva. São vistos como biomarcadores de prognóstico ou preditivos, capazes de estratificar os doentes (Andrew O. Sasmitha et al., 2018; Zsuzsanna Birkó et al., 2020).

Neste sentido, têm sido reportados vários miRNAs, cujo papel pode ser determinante no GBM. Um dos exemplos é o miRNA-10b, o qual se encontra frequentemente presente em todos os subtipos do GBM, ativando as caspases juntamente com a inibição do *B-cell Lymphoma 2* (BCL-2) e induzindo a proliferação celular. Para além de favorecer o processo tumoral, também contribui para a resistência à radioterapia por ativação da via de AKT (Andrew O. Sasmitha et al., 2018; Zsuzsanna Birkó et al., 2020).

Outro exemplo, é o miRNA-21, expresso em vários tipos de cancro, incluindo GBM. Tem a capacidade de afetar genes supressores tumorais como PTEN, *Reversion Inducing*

Cysteine Rich Protein With Kazal Motifs (RECK), FasL e *Programmed Cell Death 4* (PDCD4). A menor expressão de PDCD4 aumenta *Activator Protein 1* (AP-1) e a apoptose. A inibição de miRNA-21 leva a uma paragem do crescimento celular, aumenta a apoptose e tem um papel na diferenciação de células estaminais tumorais devido à regulação positiva da via FasL. Em GBM, é regulado positivamente, associando-se a uma pior sobrevida e os seus níveis diminuem com a terapêutica, o que pode significar que é um bom biomarcador para a resposta à terapia, à semelhança dos miRNA-128 e miRNA-342 (Andrew O. Sasmita et al., 2018; Zsuzsanna Birkó et al., 2020; Ying Zhang et al., 2017).

Outro miRNA, o miRNA-15 interrompe a proliferação celular. Uma maior expressão de miRNA-15 indica uma maior sobrevida e também por isso é considerado um biomarcador de prognóstico (Andrew O. Sasmita et al., 2018).

O promotor do miRNA-137, hipermetilado em amostras de GBM, interfere na diferenciação celular e regula negativamente o gene alvo, o *GLI Pathogenesis Related 1* (GLIPR-1) (Andrew O. Sasmita et al., 2018; Ying Zhang et al., 2017).

Os miRNA-127, miRNA181d, miRNA-603 e miRNA-648 conseguem modelar a resistência à TMZ, silenciando os promotores de MGMT (Andrew O. Sasmita et al., 2018).

Também o aumento de miRNA-221, miRNA-222, miRNA-210, miRNA-182 e miRNA-454 pode ser associado à progressão tumoral e à baixa sobrevida (Zsuzsanna Birkó et al., 2020).

O miRNA-221 regula o ciclo celular, inibe a apoptose, regulando positivamente o p53 que atua induzindo morte celular via ligação a BCL-2 e *B-cell Lymphoma-extra Large* (BCL-X) (Ying Zhang et al., 2017).

Os miRNA-82 e miRNA-381 facilitam o crescimento de células de GBM *in vitro* e *in vivo*. O *Leucine Rich Repeat Containing 4* (LRRC4) é o gene alvo destes miRNAs. A inibição de LRRC4 inibe a expressão e transcrição de *Activator Protein 2* (AP-2) regulando a sinalização de *Extracellular Signal-regulated Kinases/ Mitogen-activated Protein Kinase* (ERK/MAPK) e PI3K/AKT. A regulação positiva de LRRC4 induz ainda a expressão de miRNA-185 que inibe a motilidade e aumenta a invasão e proliferação celulares (Peilyao Li et al., 2017).

O miRNA-17-92 está envolvido na diferenciação, apoptose e proliferação de NSC (Ying Zhang et al., 2017).

A subexpressão de miRNA-101 em GBM suprime a expressão do *Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein 1* (CPEB1) revertendo o estado de metilação do promotor CPEB1, regulando as histonas relacionadas com a metilação, H3K27me3 e

H3K4me2, e diminuindo a presença destas histonas. A menor expressão de CPEBI desencadeou a senescência dependente de p53 (Peilyao Li et al., 2017).

Atualmente, não podem ser usados como biomarcadores fidedignos, por também estarem associados a outras condições fisiológicas como inflamação. Apesar dos ensaios pré-clínicos revelarem resultados promissores, existem algumas considerações a ter em conta como: a presença flutuante dos miRNAs e a baixa sensibilidade e especificidade dos métodos usados para a sua deteção (Andrew O. Sasmita et al., 2018; Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

5.2.2. Recetor do Fator de Crescimento Epidérmico

A mutação e amplificação de EGFR estão associadas a um pior prognóstico e pior resposta à radioterapia. Trata-se de um indicador de mau prognóstico e maior crescimento do tumor, o aumento da proliferação celular é devido à sua expressão nos tecidos e no sangue ser superior em doentes, sendo mais frequente em GBM primário e no subtipo clássico (Paulo Linhares et al., 2020; Kenneth Aldape et al., 2015; Shaimaa M. El- Khayat et al., 2015; Hiroko Ohgaki et al., 2007; Andrew O. Sasmita et al., 2018).

Este biomarcador é avaliado usando imunohistoquímica (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.3. Recetor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas Alfa

O PDGFRA pode atuar como um biomarcador de prognóstico, em específico para o subtipo proneural. A sua deteção utiliza técnicas de hibridização (Andrew O. Sasmita et al., 2018).

A amplificação do tipo alfa de PDGFR aparece em 15% dos GBMs, sobretudo no subtipo proneural. É uma deleção *in-frame* de 243 pares de bases dos exões 8 e 9 que irá resultar num domínio extracelular truncado. Contornar este estado é possível com a utilização de inibidores de PDGFRA. Uma amplificação deste recetor está correlacionada com o crescimento agressivo do tumor (Kenneth Aldape et al., 2015).

5.2.4. Perda de Heterozigosidade do Cromossoma 10 (LOH10q)

A LOH10q diminui a proteção contra o processo tumoral. A sua avaliação é feita através da análise dos microssatélites e por PCR. São vários os cromossomas afetados, no entanto o 10q é o mais comum, sendo considerado um bom marcador de prognóstico para GBM primário e secundário, sendo mais frequente em indivíduos com mais de 40 anos (Andrew O. Sasmita et al., 2018).

5.2.5. Proteína p53

A proteína p53, codificada pelo gene TP53, é avaliada por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Estas mutações aparecem no início do desenvolvimento do GBM o que torna possível a sua utilização como biomarcador de diagnóstico, embora mais estudos sejam necessários (Andrew O. Sasmita et al., 2018).

5.2.6. Fator de Crescimento Endotelial Vascular

O VEGF é um medidor de vascularização. Tem baixa especificidade por estar envolvido tanto em condições tumorais como não tumorais. No entanto, o VEGF é altamente regulado em doentes com GBM. É libertado pelas células tumorais em hipóxia e distribuído pelo tumor por difusão. Assim, vai-se ligando aos recetores das células endoteliais da membrana plasmática, levando a uma cascata de sinalização que aumenta a proliferação e migração das células endoteliais, assim como a permeabilidade dos vasos sanguíneos tumorais. Adicionalmente, identificaram-se vários polimorfismos no VEGF capazes de influenciar o risco e prognóstico em gliomas (Paulo Linhares, 2021).

O aumento da expressão de Gal-1 contribui para o crescimento e migração celular, assim como resistência à terapia por estimular a secreção de VEGF e a apoptose de células T (Ana Miranda et al., 2017).

A baixa concentração no sangue dificulta a utilização de VEGF como biomarcador. Para aumentar a especificidade, é necessária validação extensiva. Como tal, os resultados ainda não são consistentes para que se possa considerar um biomarcador de diagnóstico ou de prognóstico (Paulo Linhares et al., 2020; Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

5.2.7. Proteína I do Tipo Quitinase-3 (YKL-40)

A YKL-40 é uma glicoproteína produzida por células tumorais, inflamatórias e estaminais, que tem provavelmente um papel na proliferação e diferenciação celular, apoptose, estimulação da angiogénese, regulação positiva do VEGF, na remodelação do tecido extracelular e na atividade das MMPs. No entanto, estas conclusões ainda carecem de ser confirmadas *in vivo* (Paulo Linhares et al., 2020; Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

YKL-40 é sobre-expressa em gliomas, apenas no tecido tumoral. Os níveis séricos aumentam 24h após a resseção cirúrgica e em níveis mais baixos representam melhor sobrevida. Assim, considera-se que os níveis séricos de YKL-40 determinados na primeira semana após a cirurgia podem ser um biomarcador para gliomas de alto grau, mais

especificamente um marcador bioquímico putativo, apesar de ainda não haver evidências suficientemente robustas para suportar o seu valor como ferramenta de triagem, prognóstico, preditor de resposta ao tratamento ou como ferramenta de monitorização de doentes (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.8. Proteína Glial Ácida Fibrilar

A PGAF é uma proteína de filamento intermediário expressa em astrócitos como parte do citoesqueleto e pode ser utilizada como marcador específico. No entanto, não é capaz de prever a sobrevivência e recorrência do tumor (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.9. Trombospondina-I (TSP-I)

A TSP-I tem propriedades inibidoras do crescimento tumoral e a angiogénese, mas os estudos realizados não mostraram diferenças entre os níveis de TSP-I em indivíduos doentes e saudáveis, o que torna difícil concluir sobre a sua relevância como biomarcador preditivo (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.10. Osteopontina (OPN)

A OPN é uma glicofosfoproteína com propriedades de citocina e quimiocina, implicada na progressão tumoral de vários cancros sistémicos. Os níveis de expressão estão relacionados com a malignidade do tumor e com a progressão, assim maior expressão de OPN associa-se à baixa sobrevida dos doentes (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.11. Recoverina

A recoverina é uma proteína de ligação de cálcio citoplasmática. Os níveis mais elevados são encontrados no humor vítreo do olho, por se ligar a anticorpos dos doentes com retinopatia associada ao cancro. Os níveis de recuperação aumentam 10 vezes, o que pode ser significar que se trata de um marcador tumoral de glioma útil especialmente em doença recorrente. No entanto, a baixa especificidade e sensibilidade dos métodos utilizados para a sua deteção são um obstáculo à utilização da recoverina como um biomarcador (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.12. Catepsina D

A catepsina D facilita a progressão do tumor e é amplamente expressa no cérebro, sendo uma das características mais comuns nas amostras de astrocitomas de alto grau (Paulo Linhares et al., 2020).

A concentração sérica pode ser um indicador potencial da agressividade biológica do glioma, mas num número restrito de doentes, o que dificulta conclusões definitivas sobre a sua utilização como biomarcador (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.13. Citocinas

As citocinas são proteínas sinalizadoras ligadas à angiogénese, crescimento celular, diferenciação de células estaminais e regulação de respostas imunológicas, incluindo vigilância imunológica tumoral e imunossupressão induzida pelo tumor. Ensaio clínico revelaram que os níveis plasmáticos de *Transforming Growth Factor Beta 1* (TGF- β 1) pré-operatórios são maiores em doentes sem cirurgia comparativamente com doentes já submetidos a cirurgia em que se observa uma diminuição de TGF- β 1. Em GBM, TGF- β atua como um fator oncogénico aumentando o crescimento e invasão celulares (Paulo Linhares et al., 2020).

Estudos recentes relatam também uma nova mutação no gene TGF- β latente da proteína de ligação 4 encontrada em 10% dos casos de GBM recorrente (Syreeta DeCordova et al., 2020).

5.2.14. Proteína Morfogénica Óssea (BMP)

As BMPs fazem parte da família do TGF- β e podem ser úteis por estarem associadas ao prognóstico. No entanto, o papel da proteína morfogénica óssea 2 (BMP-2) ainda não foi explicado, parecendo inibir o crescimento dos tumores, angiogénese e diferenciação das células estaminais (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.15. Metaloproteinase 9 (MMP-9)

A MMP-9 foi detetada em células tumorais estando associada à neovascularização de tumores, promoção da invasão celular e resistência aos tratamentos. Verifica-se uma correlação dos níveis séricos de MMP-9 com o tumor. Contudo, por não ter uma relação com o tamanho, sobrevida ou resposta aos tratamentos, não tem utilidade na determinação do estado de doença e por isso não é considerada um marcador de prognóstico clinicamente relevante (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.16. Inibidor do Tecido da Metaloproteinase-I (TIMP-I)

O TIMP-I é uma glicoproteína expressa em vários tecidos e células. Um nível elevado prediz uma diminuição na sobrevida, e devido ao facto dos níveis de TIMP-I serem superiores em doentes pode ser um bom indicador de sobrevivência. É detetada preferencialmente por imunorreatividade do que por deteção direta dos níveis tecidulares e plasmáticos (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.17. Outras Proteínas

Diversas proteínas, que podem ser utilizadas como biomarcadores do GBM, são detetadas em tecidos e em matrizes líquidas como sangue, urina e LCR de doentes com GBM, através de análise proteómica e expressão génica (Andrew O. Sasmita et al., 2018).

Entre as proteínas mais representativas encontram-se as proteínas relacionadas com a angiogénese (*Basic-fibroblast Growth Factor (FGF-b)*, *Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2 (IGFBP-2)*, *Angiopoietin-2 (Ang2)*, *Epidermal Growth Factor (EGF)*, proteínas da matriz extracelular (*TSP-1* e *Trombospondina 2 (TSP-2)*), *Cyr61/ Cellular Communication Network Factor 1 (CCNI)*, *OPN*), MMPs, proteínas associadas à linha celular, fator inibidor de migração de macrófagos (*MIF*) e proteínas funcionalmente relacionadas (*Cluster of Differentiation 24 (CD24)*, *CD44*, *C-X-C Motif Chemokine Receptor Type 2 (CXCR2)*, *C-X-C Motif Chemokine Receptor Type 4 (CXCR4)*) (Andrew O. Sasmita et al., 2018).

O problema da sua utilização como biomarcadores no GBM prende-se com a falta de especificidade, devido à associação destas proteínas a outros estados patológicos, sejam eles tumorais ou não e também à baixa concentração em que podem existir nos fluidos biológicos (Andrew O. Sasmita et al., 2018).

5.2.18. Pequenas Moléculas

A alteração das concentrações de pequenas moléculas, das células tumorais para as células vizinhas, pode atuar como biomarcador de diagnóstico e prognóstico. Aqui incluem-se lípidos celulares, metabolitos, compostos orgânicos e monómeros capazes de se difundir através das membranas celulares, atingindo os espaços intra e extracelulares. Porém, devido à sua baixa especificidade e baixo peso molecular, consideram-se biomarcadores pouco informativos, e por isso são usados para refinar o diagnóstico, combinados com outros métodos como a MRS. Um exemplo destas pequenas moléculas reside na identificação, por espetrometria de massa, de produtos metabólicos como a N-óxido-trimetilamina, N-

atsetilputrestina e uridina que facilitam a identificação das principais diferenças entre o tecido saudável e tumoral (Artemiy S. Silantyev et al., 2019; Andrew O. Sasmita et al., 2018).

Os metabolitos são moléculas pequenas, com baixo potencial para o prognóstico, tendo maior relevo no diagnóstico rápido e permitindo determinar os limites do tumor sendo, por isso um auxílio para o procedimento cirúrgico (Andrew O. Sasmita et al., 2018).

5.2.19. Carga Mutacional do Tumor

A TMB reflete a estabilidade genómica e a eficiência dos mecanismos de reparação do DNA. Não está presente em níveis muito elevados em gliomas, embora, pareça estar associado ao grau do tumor, sendo por isso um potencial biomarcador em gliomas que nunca foram tratados com quimioterapia (Nalin Leelatian et al., 2021).

5.2.20. Biomarcadores Relacionados com o Sistema Imunológico

Os fatores imunológicos desempenham um papel importante no glioma por contribuírem para a manutenção da homeostase cerebral (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.20.1. Imunoglobulina E (IgE)

Níveis mais elevados de IgE implicam uma maior sobrevida e menor risco de desenvolver glioma do que níveis de IgE normais, o que explica o fator de risco de glioma estar inversamente relacionado com sensibilização alérgica. No entanto, devem ser realizados mais estudos para obter melhor evidência e permitir tirar melhores conclusões (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.20.2. Cluster of Differentiation 14 e 23 (CD14 e CD23)

O CD14 é um componente importante nos *Toll-like Receptor* (TLRs) e o CD23 um mediador da resposta alérgica com propriedades pró-inflamatórias que pode melhorar a apresentação de antígenos e regular a produção de IgE. Níveis elevados de CD23 podem ser úteis para o diagnóstico e prognóstico da doença, por isso o CD23 pode ser usado como um biomarcador de risco (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.21. Biomarcadores Relacionados com a Inflamação

A inflamação aumenta o risco para cancro pois o microambiente promove o desenvolvimento do tumor. A razão neutrófilos/linfócitos (NLR) é um marcador hematológico

da inflamação sistémica e sabe-se que NLR elevada significa elevado número de neutrófilos ou menor número de linfócitos, portanto o aumento do número de neutrófilos pode promover o crescimento tumoral que tem uma correlação com a OS mais curta (Paulo Linhares et al., 2020, Chen F et al., 2017).

5.2.21.1. Interleucina-6

A IL-6 está envolvida na angiogénese e na progressão tumoral. Embora esteja associada a uma sobrevida mais curta, pode ser usada como marcador associado ao prognóstico (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.21.2. Amilóide AI (SAAI)

A SAAI é produzida pelo fígado em resposta à inflamação e afeta a proliferação, migração e invasão de linhas celulares de GBM. Níveis séricos elevados de SAAI estão relacionados com o mau prognóstico em vários cancros sistémicos. No entanto, no GBM não se encontrou nenhuma relação entre SAAI e a sobrevida dos doentes (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.21.3. Glicoproteína Alfa 2-Heremans-Schmid (AHSG)

A AHSG é uma proteína sérica circulante proveniente do fígado que se liga aos recetores tirosina cinase. A baixa concentração de AHSG relaciona-se com a proliferação tumoral, mas não se pode considerar um biomarcador específico para GBM, por se relacionar com outras patologias cerebrais e tumorais (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.21.4. Proteínas de Choque Térmico 70 (HSP-70)

Níveis aumentados de anticorpos anti-HSP70 foram encontrados em doentes com GBM, sendo por isso usados como biomarcadores. No entanto, as proteínas de choque térmico (HSP) podem não ser responsáveis pela resposta à terapia por não terem mostrado resultados promissores e por isso são um biomarcador fraco e pouco robusto (Paulo Linhares et al., 2020).

HSP70 apresentou melhores resultados quando associada a BMP-2 e *C-X-C Motif Chemokine Ligand 10* (CXCL10) (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.22. Biomarcadores Relacionados com o Estado Nutricional

A associação entre o estado nutricional e inflamatório pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento do GBM e por isso proteínas como albumina e IGFBP-2 podem ser consideradas um biomarcador de prognóstico (Paulo Linhares et al., 2020).

A albumina sérica é um indicador de nutrição/desnutrição, estando também associada à inflamação sistémica, menor taxa de albumina implica OS diminuída e níveis elevados de IGFBP-2 (Paulo Linhares et al., 2020).

A relação albumina/globulina (AGR) pré-operatória pode refletir tanto a desnutrição como a inflamação. Um baixo valor de AGR indica melhor prognóstico (Paulo Linhares et al., 2020).

Observou-se também que o fibrinogénio (FA) tem um papel fundamental na proliferação e migração celulares, assim como na angiogénese, mas o FA associa-se a melhor prognóstico independentemente de OS e PFS (Paulo Linhares et al., 2020).

5.2.23. Biomarcadores Associados à Coagulação

A trombina está envolvida no desenvolvimento, proteção e regeneração do cérebro, facilita as respostas inflamatórias, apoptose, proliferação/modulação celular e angiogénese no GBM (Paulo Linhares et al., 2020).

Os fragmentos de protrombina estão mais elevados em doentes com GBM. No entanto, serão necessários mais dados para aferir o seu papel como biomarcador (Paulo Linhares et al., 2020).

5.3. Outras Alterações Moleculares Presentes no GBM

Existem outras assinaturas moleculares desreguladas que apesar de não terem ainda sido investigadas como biomarcadores se encontram alteradas no GBM.

5.3.1. Neurofibromina I

A NFI está presente em 15% das amostras de glioma. Este gene é inativado por mutação ou por degradação excessiva proteossomal mediada pela hiperativação da proteína cinase C (PKC), sendo mais comum no subtipo mesenquimal por existir maior agressividade e capacidade invasiva do tumor (Kenneth Aldape et al., 2015; Syreeta DeCordova et al., 2020).

Está envolvido na regulação negativa das vias de sinalização RAS e mTOR. Níveis mais baixos de NFI levam a um aumento da proliferação e migração celulares, por promoverem o recrutamento de macrófagos e microglia (Kenneth Aldape et al., 2015).

5.3.2. Fusões Oncogénicas

As fusões oncogénicas foram recentemente descobertas num subconjunto de doentes com GBM IDH selvagem em acumulação com proteínas de fusão *Fibroblast Growth Factor Receptor 3-transforming Acidic Coiled-coil Containing Protein 3* (FGFR3-TACC3) (Douglas A. Mata et al., 2020).

Acredita-se que FGFR3-TACC3 promove a sinalização a jusante através da via MAPK, formação mitocondrial e metabolismo, recrutando TACC3 endógeno para longe do fuso mitótico que leva à progressão mitótica retardada (Douglas A. Mata et al., 2020).

As fusões F3T3 (FGFR3-TACC3) são um evento estrutural raro, mas recorrente, resultando numa proteína de fusão *in-frame* com atividade de cinase constitutiva e efeitos mitogénicos reversíveis pela inibição de *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGFR), que tem sido alvo de ensaios pré-clínicos (Douglas A. Mata et al., 2020).

O aparecimento de F3T3 é quase exclusivo quando há mutações em EGFR e no PDGFRA verificando-se um aumento da amplificação de *Cyclin Dependent Kinase 4* (CDK4) e *Mouse Double Minute 2 Homolog* (MDM2). Pensa-se que a presença de F3T3 se relacione com o subtipo mesenquimal ou o *Receptor Tyrosine Kinase 1* (RTK I) (Douglas A. Mata et al., 2020).

Os doentes onde é detetado F3T3 são caracterizados por uma ativação mitocondrial, podendo ser sensíveis a inibidores da cadeia respiratória mitocondrial e do metabolismo oxidativo. No entanto não se sabe como se comportam em relação à recorrência, progressão e agressividade do tumor (Douglas A. Mata et al., 2020).

Histologicamente, apresentam núcleos semelhantes a oligodendroglioma monomórfico, redes capilares de “*chicken-wire*” e microcalcificações (Douglas A. Mata et al., 2020).

Em ensaios pré-clínicos, a inibição de TACC3 mostrou conseguir inibir o crescimento celular. Estes avanços podem garantir uma melhoria no diagnóstico, embora mais estudos sejam necessários (Douglas A. Mata et al., 2020).

6. Terapias Adotadas

Tendo em conta as condições da doença, as abordagens terapêuticas implementadas são muito limitadas. Atualmente, as terapias são pouco eficazes, o que é demonstrado pelas altas taxas de recidivas, resistência que vai surgindo gradualmente, juntamente com o grau de degradação do doente que também não contribui para o sucesso (Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

Os tratamentos instituídos conferem uma PFS de 7 a 9 meses e OS de 15 meses, acabando o tumor por voltar a ocorrer em 100% dos doentes, e por isso, os resultados ficam muito longe do esperado (Shaimaa M El-khayat et al., 2021).

As opções terapêuticas são estabelecidas de acordo com o tamanho e localização do tumor, tratamentos anteriores, idade, mutações IDH, escalas de desempenho de *Karnofsky* (KPS), metilação do promotor MGMT, padrões de recidiva e fatores de prognóstico (Catarina Fernandes et al., 2017).

Ao longo dos anos, os esforços conduzidos para se encontrar um tratamento com mais vantagens, relativamente aos já existentes, têm sido muitos, contrariamente ao tempo médio de sobrevida dos doentes com GBM o qual é ainda reduzido tal como o número de tratamentos aprovados (Shaimaa M El-khayat et al., 2021; Ahmad F. Tamimi et al., 2017).

6.1. Ressecção Cirúrgica Máxima

A ressecção máxima cirúrgica é considerada a abordagem convencional, garantindo uma vida mais longa aos doentes operáveis, comparativamente aos doentes onde a remoção cirúrgica máxima do tumor não é possível, devido ao facto de envolver zonas importantes do cérebro (Catarina Fernandes et al., 2017).

Existem várias considerações a ter em conta, tais como a idade, a localização do tumor e os resultados apresentados em exames de imagem, funcionais e neuropsicológicos, de forma a garantir o maior sucesso da ressecção cirúrgica máxima (Ahmad F. Tamimi et al., 2017; Zsuzsanna Birkó et al., 2020; Catarina Fernandes et al., 2017).

Há ainda que ter em conta o grau de invasão do tecido cerebral. Ao ser considerado um glioma difuso, como é o caso do GBM, apresenta infiltração difusa no parênquima cerebral, implicando uma maior dificuldade em erradicar o tumor, comparativamente a gliomas mais circunscritos, mais fáceis de remover. Desta forma, devido a este crescimento infiltrativo, o GBM é considerado um tumor não tratável cirurgicamente (Kenneth Aldape et al., 2015; Artemiy S. Silantyev et al., 2019).

Os doentes são sujeitos à ressecção cirúrgica com o objetivo de, posteriormente, a partir dos tecidos tumorais avaliar a histologia, melhorar as condições de tratamento complementar, a sobrevida e a qualidade de vida. Para além do diagnóstico histológico, a ressecção cirúrgica contribui ainda para a genotipagem do tumor e redução do volume tumoral. No entanto, nos casos onde a ressecção cirúrgica não é possível, ou em doentes com comorbilidades, a biópsia aberta é uma opção, para se poder avaliar a histologia tumoral (Aaron C. Tan et al., 2020; Catarina Fernandes et al., 2017).

6.2. Radioterapia

A radioterapia após a cirurgia é um dos procedimentos mais utilizados no tratamento do GBM, sendo administrado, habitualmente, 60 Gy em frações de 2 Gy ao longo de 6 semanas em combinação com TMZ, embora quando se verifica o envolvimento de considerável tronco cerebral ou grande volume tumoral, se diminua a dose. A implementação da radioterapia só acontece 2 a 4 meses após a cirurgia para garantir que a cicatrização ocorreu (Aaron C. Tan et al., 2020).

A necrose é um risco associado à radioterapia, principalmente quando a administração ocorre de forma concomitante à quimioterapia. Outros riscos são o desenvolvimento de toxicidade cutânea, úlceras gastrointestinais, inchaço, infertilidade, queda de cabelo, pneumonite e doenças cardíacas (Ana Miranda et al., 2017; Aaron C. Tan et al., 2020; Catarina Fernandes et al., 2017).

A radioterapia induz a morte de células tumorais, consegue reprogramar o TME através do recrutamento e ativação de células T efetoras. No entanto, também se provou que a radiação pode promover a progressão maligna dos gliomas (Alireza Mansouri et al., 2017).

Doses baixas, ≤ 2 Gy, reprogramam os TAMs para um fenótipo M1 e estabilizam os vasos sanguíneos tumorais, podendo ser uma estratégia para atenuar o fenótipo supressor das células Treg. Vários estudos demonstraram que diferentes doses e frações podem ser combinadas com co-estimuladores de células T para aumentar a capacidade de *homing* e a atividade (Xin Wang et al., 2019).

A radioterapia hipofracionada juntamente com TMZ promove maior OS, mas um menor fracionamento é aconselhado a doentes mais frágeis. Esta combinação facilita a passagem da TMZ pela BHE e promove a conversão do pró-fármaco (Aaron C. Tan et al., 2020; Ana Miranda et al., 2017).

Apesar dos benefícios da radioterapia há ainda algumas limitações a ter em conta, nomeadamente o facto da radioterapia não ser eficaz em zonas de hipóxia, assim como a ocorrência da doença residual mínima, ou seja, células tumorais residuais que permanecem após terapia, persistindo na corrente sanguínea ou em órgãos distantes (Ana Miranda et al., 2017).

Outra limitação da radioterapia é a resistência, esquematizada na Figura 14, que vai surgindo, pela presença da proteína *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein* (WSP1), sobre-expressa em células radorresistentes, que juntamente com o *Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit* (EZH2), cuja expressão é aumentada com os tratamentos, promovem a

infiltração de células inflamatórias Ly6G derivadas de mielóides que induzem a passagem de células de GBM para NSCs resistentes (Alexander Ou et al., 2021).

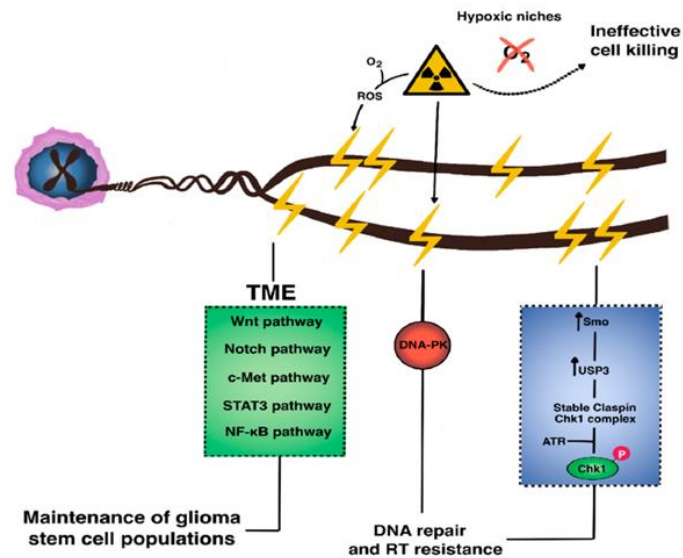


Figura 14: Resistência à Radioterapia (Alexander Ou et al., 2021).

A via Smo, uma proteína transmembranar do tipo recetor acoplado à proteína G codificada pelo gene SMO, é também responsável pela resistência à radioterapia. Mais concretamente através da ativação da enzima de desubiquitinação protease específica que se liga ao *Checkpoint Kinase 1* (CHK1) para ser fosforilada pela *Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related Protein* (ATR). O silenciamento desta via de sinalização permite aumentar a apoptose, assim como a proteína A, que se verificou ser altamente expressa em gliomas de alto grau, contribuindo para a resistência à apoptose pelo aumento da capacidade proliferativa (Alexander Ou et al., 2021).

6.3. Quimioterapia

A quimioterapia de 1ª linha é a TMZ. O benefício é maior em doentes com metilação do promotor MGMT, no entanto, a combinação com radioterapia mostrou melhores resultados pelo aumento da OS em adultos recém-diagnosticados, segundo um esquema posológico de 75 mg/m² diariamente ou usada apenas como terapia adjuvante em 6 ciclos (125-200 mg/m²). A TMZ foi o fármaco que demonstrou ter maior impacto na sobrevivência (Ana Miranda et al., 2017; Aaron C. Tan et al., 2020; Sang Y. Lee., 2016).

Vários investigadores têm defendido a administração de TMZ ao longo de mais de 6 ciclos. Com isto em vista, têm surgido vários ensaios clínicos para avaliar o benefício da administração de TMZ em 12 semanas, mas as conclusões são pouco consistentes porque apesar de mostrarem aumento da PFS e OS, apresentam algumas limitações tais como o

aumento da toxicidade que implica diminuição da qualidade de vida e a inclusão de doentes com ausência da metilação do promotor MGMT (Catarina Fernandes et al., 2017).

A TMZ trata-se de um pró-fármaco alquilante de administração oral com capacidade de atravessar a BHE devido à sua natureza lipofílica. Os tumores cerebrais possuem um pH mais alcalino em comparação com o tecido saudável circundante o que favorece a ativação do pró-fármaco. Exibe uma farmacocinética linear com excelente biodisponibilidade, apresenta poucos efeitos adversos, apesar do risco de desenvolver complicações hematológicas, fadiga e infeções ter aumentado com a sua administração (Jihong Zhang et al., 2012; Catarina Fernandes et al., 2017).

Com o nome químico 3metil-4oxoimidazo-1,2,3,5-tetrazina-8 carboxamida, a TMZ é um derivado da imidazotetrazina, estável a um pH inferior a 5, hidrolisado a pH superior a 7 em 5-(3 metiltriazen-1-il) imidazol-4 carboxamida. Por sua vez, este composto reage com água para libertar 5-aminoimidazol-4-carboxamida e um catião metildiazónio bastante reativo, que vai ser responsável por metilar o DNA na posição N7 da guanina, mas também em N3 adenina e resíduos O6 da guanina (Jihong Zhang et al., 2012).

A Figura 15 esquematiza as proteínas envolvidas na reparação do DNA responsáveis por originar resistência, embora sejam os mecanismos desencadeados pela O6-metilguanina (O6-MeG) que irão ser abordados em maior detalhe, uma vez que se encontram relacionados com MGMT, um importante marcador do GBM.

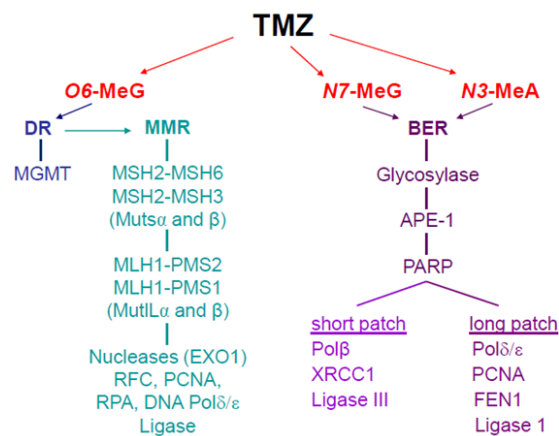


Figura 15: Proteínas envolvidas na reparação do DNA (Jihong Zhang et al., 2012).

A TMZ é capaz de parar o ciclo celular em G2/M por adição de um grupo metil às purinas e pirimidinas do DNA, o que se traduz em danos celulares e conduz à apoptose. Contudo, grande parte dos doentes é resistente ao tratamento devido ao sistema de reparação do DNA MGMT (Shaimaa M El-khayat et al., 2021; Sang Y. Ler et al., 2016).

A toxicidade da TMZ é mediada pela O6-MeG resultando numa lesão mutagénica e tóxica. Quando esta mutação não é reparada, a O6-MeG emparelha incorretamente com a

timina no momento em que o DNA se está a replicar, ou seja, há alquilação em massa do DNA provocada pela quimioterapia que origina um emparelhamento incorreto das bases. Se a O6-MeG não for reparada devido à baixa expressão de MGMT, forma pares de bases com a timina. Estas bases não vão ser reconhecidas pelas proteínas de reparação do DNA, *MutL Homolog 1* (MLH1), *MutS Homolog 2* (MSH2), *MutS Homolog 6* (MSH6) e *PMS1 Homolog 2* (PMS2), o que origina morte celular. Portanto, para o sucesso da terapia é necessária a existência de baixo nível de MGMT e *Mismatch Repair* (MMR) funcional, tal como mostra a Figura 16 (Jihong Zhang et al., 2012; Giulio Cabrini et al., 2015).

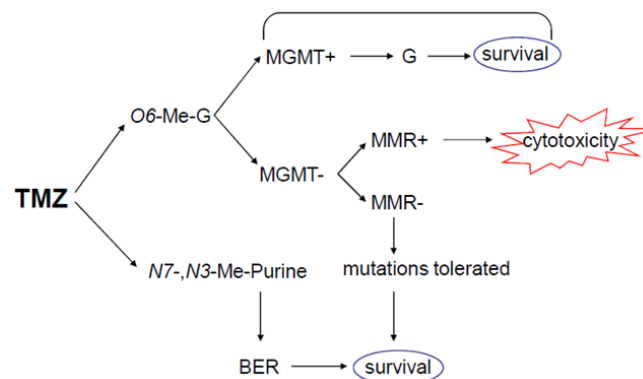


Figura 16: Resposta à TMZ (Jihong Zhang et al., 2012).

O gene MGMT encontra-se no cromossoma 10, mais especificamente em 10q26.3, com expressão elevada no núcleo central hipovascular do tumor, onde é mais expresso devido à ativação transcricional ser ativada pela hipóxia (Giulio Cabrini et al., 2015).

O MGMT codifica uma proteína capaz de fazer a reparação do DNA alterado através da transferência do grupo metil da guanina para a cisteína e neutralizar os efeitos citotóxicos da TMZ nas células do tumor, ou seja, protege as células dos agentes carcinogénicos e as células tumorais dos agentes alquilantes (Aida Karachi et al., 2018; Jihong Zhang et al., 2012).

A metilação de MGMT, comum no processo tumoral, é mediada pela 5' metilcitosina metiltransferase e ocorre na citosina das ilhas CpG, conseguindo impedir a ligação do fator de transcrição e silenciando o gene, sendo a função de MGMT suprimida (Jihong Zhang et al., 2012).

A expressão de BMP-2 demonstrou diminuir a expressão de MGMT através da regulação negativa de hIF-1 α . O hIF-1 α é capaz de aumentar a expressão *N-Myc Downstream Regulated 1* (NDRG1) que se liga e estabiliza a proteína MGMT. Também p53 suprime a transcrição de MGMT através do sequestro do fator de transcrição nuclear sp1 (SP1). De igual modo, a di-metilação da lisina 9 da histona 3 foi considerada relevante no silenciamento de MGMT (Maryam Moradi et al., 2017; Giulio Cabrini et al., 2015).

Portanto, maior acetilação das histonas indica maior expressão de MGMT e, conseqüentemente, mais resistência à TMZ. Sendo assim a metilação de MGMT é considerada um marcador preditivo da resposta à TMZ, uma vez que a elevada atividade de MGMT torna as células tumorais resistentes ao tratamento. Verificou-se também que a presença de mais grupos metil tornam as células radiosensíveis, independentemente do nível de expressão de MGMT (Maryam Moradi et al., 2017; Giulio Cabrini et al., 2015).

Adicionalmente, existem outros responsáveis pelos mecanismos de resposta à quimioterapia. Os complexos de MMR têm também um papel fundamental, como visto anteriormente, por serem capazes de reconhecer e ligar-se às lesões que surgem no DNA. Daí a importância do seu estado funcional para que a resposta à TMZ seja mais eficaz (Jihong Zhang et al., 2012; Giulio Cabrini et al., 2015).

A perda de MMR induz um fenótipo caracterizado por instabilidade de microssatélites (MSI). A perda da expressão é definida como ausência de imunorreatividade nuclear para uma ou mais das proteínas MMR (Nalin Leelation et al., 2021).

As proteínas-chave da MMR condicionam a sensibilidade a agentes alquilantes que são comumente usados no glioma, incluindo a TMZ. Defeitos em MMR conduzem à resistência à TMZ e MSI induzido por MMR, importante para prever a resposta à imunoterapia em muitos cânceres. No GBM recorrente, mutações em MMR são frequentes (Nalin Leelation et al., 2021). É ainda de destacar a ocorrência de BER, um mecanismo envolvido na remoção e reparação de nucleótidos danificados não volumosos, gerados por ROS, radiação ionizante e agentes alquilantes. A TMZ também promove a metilação das purinas em N7 e N3 que juntamente com O6-MeG constituem a maior parte das lesões. Estas mutações são depois reparadas por BER (Jihong Zhang et al., 2012).

A maior expressão da proteína alquilpurina-DNA-N-glicosilase (APNG), uma enzima de BER que atua na reparação de N3-metiladenina e N7-metilguanina, está presente em doentes com pior OS, comparativamente a doentes sem APNG (Sang Y. Lee et al., 2016).

A bioinformática também confirmou o papel de vários miRNAs como importantes fatores na expressão do gene MGMT. Contudo, carece ainda de mais resultados de investigação (Giulio Cabrini et al., 2015).

Neste sentido, foram feitos esforços na tentativa de encontrar alternativas para doentes em que a MGMT não estivesse metilada. No entanto, a ocorrência de efeitos adversos graves, como eventos hematológicos, trombocitopenia e neutropenia, em consequência de uma baixa expressão de MGMT na medula óssea, que por isso a torna mais frágil à toxicidade, levou ao abandono destas estratégias (Giulio Cabrini et al., 2015; Jihong Zhang et al., 2012).

Uma das estratégias sugeridas é a 6-benzilguanina que se liga ao MGMT transferindo o grupo benzil para um resíduo de cisteína que inativa a MGMT. Este composto não é incorporado nas células (Giulio Cabrini et al., 2015, Jihong Zhang et al., 2012).

Outra estratégia consiste em inibir o mecanismo de BER através da inibição de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), que demonstrou capacidade em potencializar a ação da TMZ, por contornar a resistência. Os inibidores de moléculas de *Apurinic/aprimidinic Endonuclease I* (APE-I), intermediárias na via BER que estão envolvidas na ativação de fatores de transcrição como p53, NFK-B, AP-1 e hIF- α , são capazes de potencializar a toxicidade (Jihong Zhang et al., 2012).

Outro mecanismo que origina resistência à TMZ é o gene hospedeiro de ácido ribonucleico (RNA) nucleolar não codificado altamente expresso em gliomas malignos devido à desmetilação epigenética do seu promotor. A regulação negativa de MGMT origina a ligação a SPI, *Small Nucleolar RNA Host Gene 12* (SNHG12) ativa a via *Mitogen-activated Protein Kinase 1* (MAPK1) e *E2F Transcription Factor 7* (E2F7), o que leva à proliferação celular e transição G1/S através da via MAPK1/ERK. *Mitogen-activated Protein Kinase 8* (MAPK8) também está altamente expresso em células resistentes à TMZ (Alexander Ou et al., 2021).

As células resistentes à TMZ expressam EGFRvIII e regulam positivamente *E2F Transcription Factor 6* (E2F6), um repressor transcricional independentemente do retinoblastoma (Rb) que promove a reparação de DNA e o TNF- α libertado por TAMs, também está envolvido na conversão do subtipo proneural para mesenquimal em células quimio e radiorresistentes (Alexander Ou et al., 2021).

Para além de todos os mecanismos já explorados de resistência à TMZ, as alterações genéticas e epigenéticas induzidas pelos fármacos ajudam a selecionar as células resistentes. Isto traduz-se em menor absorção celular, maior efluxo do fármaco para fora das células que originará inativação intracelular, alterações de genes relacionados com a apoptose e mutações nos alvos dos fármacos e consequentemente resistência à TMZ (Jihong Zhang et al., 2012).

Como é sabido, a quimioterapia tem vários efeitos secundários que dependem da dose, do mecanismo de ação do fármaco e também do estado imunológico do doente. Náuseas, mielossupressão e trombocitopenia em consequência da administração de quimioterapia são alguns dos sintomas relatados. Verificou-se que a TMZ também tem uma ação imunomoduladora, nomeadamente através da alteração da proliferação de células T, da proporção de células Treg e também na morte de monócitos, para além de induzir instabilidade cromossómica, alteração do crescimento celular, capacidade invasiva do tumor e

migração celular (Aida Karachi et al., 2018; Aaron C. Tan et al., 2020; Alireza Mansouri et al., 2017).

6.4. Ácido 5-aminolevulínico

A Comissão Europeia, na sequência de um parecer favorável da Agência Europeia de Medicamentos (EMA), concedeu autorização de comercialização ao medicamento órfão (designação de 2002) Gliolan, um pó para administração oral, tendo como substância ativa cloridrato do ácido 5-aminolevulínico (Gliolan, EMA).

O ácido 5-aminolevulínico é absorvido pelas células e convertido enzimaticamente em derivados fluorescentes, nomeadamente protoporfirina IX (PPIX). Como as células tumorais absorvem mais substância ativa acumulam-se nas células tumorais níveis mais elevados de PPIX do que no tecido normal. Quando irradiado por luz azul num comprimento de onda específico, o PPIX no tumor brilha em vermelho intenso, enquanto o tecido cerebral normal permanece azul. Isso permite ao cirurgião visualizar o tumor com mais clareza durante a cirurgia cerebral e removê-lo com mais precisão, não afetando o tecido cerebral saudável (Gliolan, EMA).

Este procedimento aumenta a taxa de ressecção cirúrgica máxima, embora exija a necessidade de cuidados extra perto de zonas eloquentes, nomeadamente as zonas que controlam a fala, leitura ou a capacidade motora (Catarina Fernandes et al., 2017).

6.5. Bevacizumab

O bevacizumab, usado no GBM recorrente, é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga ao recetor de VEGF, ou seja, impede a ligação de VEGF ao recetor do fator de endotelial vascular (VEGFR) e consequentemente inibe a angiogénese. Pelo contrário, também aumenta os níveis de MMP, contribuindo para o desenvolvimento tumoral, o que pode explicar o insucesso da terapia que muitas vezes é reportada (Yaning Wang et al., 2021; Boyan Huang et al., 2021; Alexander Ou et al., 2021; Melanie Y. Lombardi et al., 2017).

A *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o bevacizumab, em 2009, com base em dois ensaios clínicos de fase II, que mostraram um aumento na PFS e OS, mas maior toxicidade. (Roberto Jose Diaz et al., 2017; Aaron C. Tan et al., 2020; Yaning Wang et al., 2021).

Apesar de aprovado pela FDA, a EMA não recomendou a introdução no mercado do bevacizumab para o tratamento do GBM por considerar que não existiam provas que justificassem o seu benefício nesta doença. Os dados apresentados mostraram melhoria em PFS, sem alterações na OS, diminuição da qualidade de vida e da função neurocognitiva. Ao

mesmo tempo, nenhum biomarcador mostrou ser eficaz para avaliar a resposta ao medicamento (Yaning Wang et al., 2021; Catarina Fernandes et al., 2017).

A Organização Europeia para a Investigação e Tratamento de Cancro desenvolveu um ensaio clínico para avaliar a eficácia de bevacizumab combinado com lomustina. Os resultados também não mostraram vantagem na OS, possivelmente devido à diferença de dosagens utilizadas nos ensaios clínicos que suportaram os dados apresentados, aos diferentes tratamentos após a progressão tumoral, aos biomarcadores usados e à mutação na IDH que pode aumentar a sensibilidade ao tratamento (Yaning Wang et al., 2021).

Observou-se também que o bevacizumab compromete a interpretação dos exames de imagem (Joost Dejaegher et al., 2017).

6.6. Carmustina

Aprovado pela FDA, o Gliadel Wafer é o nome comercial de um implante composto pela combinação de carmustina e polifeprosan 20. A carmustina pertence a uma classe de medicamentos conhecidos como agentes alquilantes. Atua de forma a diminuir ou interromper o crescimento das células tumorais, enquanto o polifeprosan 20 ajuda a controlar a libertação de carmustina no cérebro. O implante é colocado no cérebro onde o tumor foi anteriormente removido. O seu benefício na sobrevida é questionável assim como os potenciais efeitos adversos, sendo por isso a sua utilização ainda é controversa (Catarina Fernandes et al., 2017; FDA).

Um ensaio clínico de fase III realizado em 14 países, incluindo EUA, Alemanha, França, Reino Unido, Escócia, Finlândia e Israel, sugeriu um prolongamento da OS em doentes recém-diagnosticados com glioma maligno que receberam implantes de Wafer Gliadel (Toshihiko Luchi et al., 2022).

6.7. Optune

As terapias locorregionais, aprovadas pela FDA, foram um grande avanço no campo da terapia para o GBM. O TTFields, com o nome comercial de Optune, consiste na aplicação de campos elétricos alternados de baixa intensidade no couro cabeludo dos doentes recém-diagnosticados com GBM, juntamente com TMZ. Tem a capacidade de interromper a divisão celular e destruir as células tumorais através da indução do desalinhamento dos microtúbulos durante a divisão celular, segregação cromossómica aberrante e bolha citoplasmática durante

a anáfase (Aaron C. Tan et al.,2020; Ahmad F. Tamimi et al.,2017; Catarina Fernandes et al., 2017)

O TTFields consegue uma maior sobrevida quando a doença tem localização supratentorial, contudo ainda existe debate acerca dos seus efeitos benéficos assim como, do custo, toxicidade cutânea no local onde os transdutores são aplicados e alterações na qualidade de vida. Neste sentido, mais investigações são necessárias para perceber se realmente existe benefício e também para permitir um acompanhamento a longo prazo dos doentes. Apesar de toda a controvérsia, 43% dos doentes que receberam este tratamento permanecem vivos ao fim de dois anos, comparativamente ao grupo que apenas recebeu TMZ (Aaron C. Tan et al.,2020; Ahmad F. Tamimi et al.,2017; Catarina Fernandes et al., 2017).

6.8. Terapias de Segunda Linha

São vários os fatores que contribuem para o limitado sucesso das terapias, atualmente disponíveis para o GBM, como o tamanho, a multifocalidade e localização do tumor, bem como a idade e o estado geral do doente. Em caso de recidiva, sabe-se que a sobrevida é melhor quando os doentes têm uma idade inferior a 60 anos e $KPS \geq 70$, porém, não há terapias de 2ª linha, devido ao facto das opções serem menos lineares e não haver orientações específicas para ajudar na tomada de decisão (Aaron C. Tan et al.,2020; Catarina Fernandes et al., 2017).

Pode recorrer-se à ressecção cirúrgica adicional, apenas 6 meses após a primeira intervenção e em doentes jovens com bom KPS e com características clínicas e radiológicas favoráveis, o que faz com que nem todos os doentes sejam elegíveis (Aaron C. Tan et al., 2020).

Outra abordagem é a reirradiação ou combinações de TMZ com lomustina, carmustina ou reexposição a TMZ, porém, os resultados mostram-se limitados e apenas doentes com metilação no promotor MGMT podem usufruir dos benefícios. De igual forma a combinação com procarbazina ou vincristina pode ter alguma atividade, mas a utilização é limitada por causa da toxicidade (Aaron C. Tan et al., 2020).

A reirradiação pode ser realizada recorrendo a várias técnicas especiais como a braquiterapia, radioterapia estereotáxica fracionada, radiocirurgia estereotáxica e radioterapia modulada por intensidade com ou sem novos agentes sistémicos (Catarina Fernandes et al., 2017).

O tamanho e localização do tumor devem ser considerados na avaliação da segurança da reirradiação, uma vez que a reirradiação é aplicada em doentes já submetidos a radiação, mas com doses mais altas aumentando o risco de necrose (Catarina Fernandes et al., 2017).

A radiocirurgia estereotáxica e a radioterapia estereotáxica hipofracionada fornecem resultados promissores quando comparadas com a quimioterapia isolada em GBM recorrente. No entanto, nenhuma técnica ideal foi estabelecida devido às amostras heterogêneas, diferentes desfechos e às diferentes características dos doentes provenientes dos diferentes tratamentos instituídos inicialmente, na segunda ou terceira recorrência e pela ausência de comparação (Catarina Fernandes et al., 2017).

A radiação fracionada convencionalmente não apresenta dados clínicos suficientes para que se possa recomendar em GBM recorrente (Catarina Fernandes et al., 2017).

É possível usar a braquiterapia em GBM recorrente após a ressecção cirúrgica. Esta técnica consiste na utilização de sementes de iodo I 25 e um catéter contendo a solução de I-125. Para os doentes poderem ser submetidos a esta técnica precisam de apresentar tumores ressecáveis, bom KPS e reduzido volume tumoral, porém muitas vezes a escolha dos doentes não respeita estes critérios, por isso dificulta a chegada a conclusões sobre o impacto que possa vir a ter na vida dos doentes (Catarina Fernandes et al., 2017).

Os tratamentos de combinação de quimioterapia com reirradiação ou bevacizumab mostraram ser eficazes e seguros. No entanto, os ensaios clínicos não são randomizados e sendo, por isso, necessários dados adicionais (Aaron C. Tan et al., 2020).

A lomustina e carmustina já constituíram a terapia de primeira linha, por serem fármacos bastante lipofílicos e com isso terem facilidade em atravessar a BHE, no entanto, a citotoxicidade, nefrotoxicidade e mielossupressão resultantes da administração ditaram o fim da sua utilização na terapia inicial (Melanie Y. Lombardi et al., 2017; Catarina Fernandes et al., 2017).

Outros agentes como irinotecano combinado com TMZ, testado em ensaios clínicos de fase II, mostrou ser eficaz no tratamento de GBM recorrente, embora a sua utilização na prática clínica seja limitada. A metilação do promotor de MGMT também pode ser preditivo da resposta a estes agentes terapêuticos (Catarina Fernandes et al., 2017).

Outros regimes de combinação com TMZ foram avaliados, mas o facto de não existir um braço comparador, a heterogeneidade nos critérios de inclusão, o número de recidivas e tratamentos anteriores a que os doentes já foram submetidos limita a comparação dos dados quanto à eficácia (Catarina Fernandes et al., 2017).

Apesar dos esforços conduzidos para tratar o GBM com eficiência, atualmente, não existem terapias capazes de o fazer, uma vez que após quimiorradiação concomitante convencional e quimioterapia adjuvante, os doentes apresentam recorrência em 6 meses, sendo o GBM considerado incurável (Aaron C. Tan et al., 2020; Kenneth Aldape et al., 2015; Alexander Ou et al., 2021). Neste sentido, são vários os ensaios clínicos desenvolvidos com vários alvos em vista e recorrendo a várias abordagens terapêuticas na tentativa de encontrar melhores soluções.

7. Estratégias Terapêuticas em Ensaios Clínicos

Face aos restritos tratamentos disponíveis para o GBM, vários ensaios clínicos têm sido desenvolvidos na tentativa de encontrar uma terapia eficaz.

Neste âmbito, a imunoterapia tem sido o grande foco por permitir superar a imunorresistência das células tumorais com o objetivo de erradicar o tumor, tal como já foi descrito anteriormente (Miranda W. Yu et al., 2021; Ravi Medikonda et al., 2021). A Figura 17 resume as possíveis estratégias de imunoterapia para o GBM.

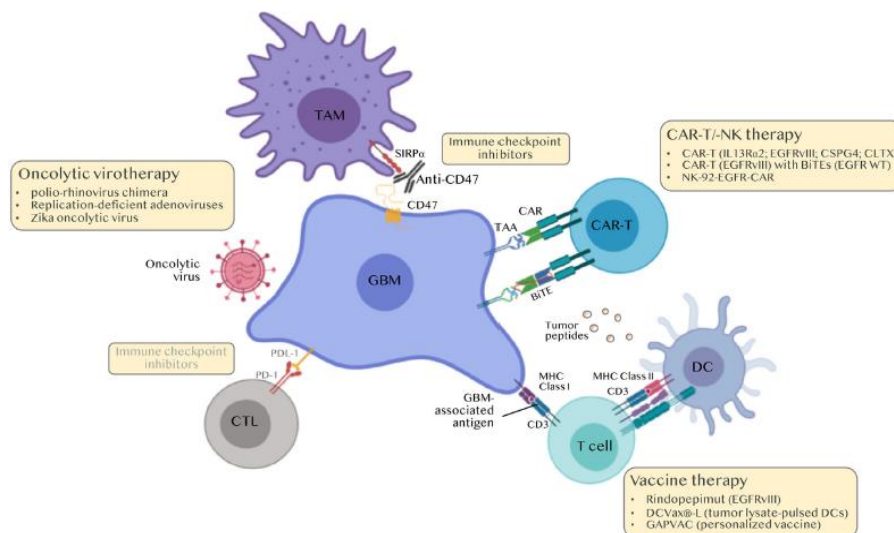


Figura 17: Resumo das estratégias de imunoterapia (Thomas Daubon et al., 2020).

O GBM consegue “escapar” ao sistema imunológico e por isso a imunoterapia tem sido uma grande aposta, devido aos sucessos verificados noutros tumores. Esta estratégia permite garantir que é possível “atacar” as células tumorais, sem haver efeitos adversos graves, porque o que é feito é capacitar o sistema imunológico do doente orientando-o para destruir o tecido tumoral (Boyan Huang et al., 2021; Miranda W. Yu et al., 2021).

Também se acredita que expor o doente a radiações ionizantes potencia os efeitos da imunoterapia por destruição direta e indireta das células tumorais. A radiação ativa as vias de

sinalização reguladas pelo interferão e regula positivamente o TGF- β , altera o TME e promove a ativação de células T CD8⁺ (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

7.1. Anticorpos Monoclonais para os Checkpoints Imunológicos

Os *checkpoints* imunológicos asseguram a integridade do sistema imunológico, existindo atualmente um interesse crescente nos inibidores dos *checkpoints* imunológicos (ICI), uma vez que são regulados positivamente pelas células tumorais (Miranda W. Yu et al., 2021; Melanie Y. Lombardi et al., 2017).

Os ICI são anticorpos monoclonais que bloqueiam os *checkpoints* imunológicos e evitam que os tumores regulem negativamente a resposta imunológica. Com o bloqueio de PD-1 conseguem inibir a supressão da ativação e proliferação das células T citotóxicas que destruiriam o tumor, promovendo a mudança do equilíbrio normal do sistema imunológico adaptativo para a ativação de mais células Treg no tumor (Ravi Medikonda et al., 2020; Syreeta DeCordova et al., 2020; Tresa McGranahan et al., 2019; Sylvia C. Kurz et al., 2018).

A Figura 18 exemplifica a forma de atuação dos *checkpoints* imunológicos.

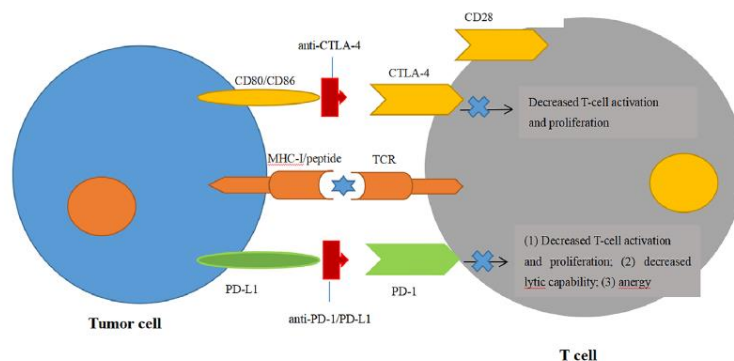


Figura 18: Mecanismo de ação dos inibidores dos *checkpoints* imunológicos (Boyuan Huang et al., 2021).

O recetor PD-1 é expresso em células T e tem dois ligandos, o PD-L1 e o *Programmed Cell Death Ligand 2* (PD-L2). O PD-L1 é encontrado em células Treg imunossupressoras, TAMs e outras células tumorais, já o PD-L2 encontra-se em células dendríticas e macrófagos. A expressão de PD-L1 é dependente de IL-6, por isso a inibição de IL-6 diminui a expressão de PD-L1 (Syreeta DeCordova et al., 2020; Sylvia C. Kurz et al., 2018). Sabe-se, também, que MSI assim como a estabilidade genética dos tumores desempenham um papel importante na previsão das respostas aos inibidores de PD-1 (Tresa McGranahan et al., 2019).

Tendo em vista o bloqueio de PD-1, são vários os ensaios clínicos desenvolvidos de forma a perceber o potencial dos ICI no tratamento do GBM. O pembrolizumab foi testado como tratamento neoadjuvante onde se verificou uma melhoria na OS comparativamente aos doentes que receberam apenas terapia adjuvante. O pembrolizumab potencia a regulação

positiva de células T, expressão génica de IFN- γ e regulação negativa de genes relacionados com a progressão do ciclo celular (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

O CTLA-4 é outro *checkpoint* imunológico expresso em células T ativadas e células Treg no TME, que se liga aos ligandos CD80 ou CD86, levando à redução da ativação e proliferação de células T efetoras, bem como ao aumento da ativação e recrutamento de células Treg e MDSCs para o TME. O bloqueio de CTLA-4 resulta no aumento da resposta imunológica dependente de células T auxiliares (Syreeta DeCordova et al., 2020; Sylvia C. Kruz et al., 2018; Drew M. Pardoll et al., 2012).

O ensaio clínico, *Checkmate 143*, de fase II avaliou o nivolumab, direcionado ao PD-I e ipilimumab, direcionado ao CTLA-4, em GBM recorrente, mostrando que o nivolumab é melhor tolerado em comparação com a combinação, no entanto, os dados da fase III ainda não foram reportados. Quando utilizado em monoterapia o nivolumab não causou alterações significativas comparativamente ao bevacizumab em combinação com a radioterapia ou com a TMZ, mesmo em doentes com o promotor MGMT metilado (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021; Miranda W. Yu et al., 2021).

Em ensaios pré-clínicos, a combinação de anti-CTLA-4, anti-PD-I e anti-IDO mostrou ser potente a erradicar o GBM comparativamente à monoterapia (Ravi Medikonda et al., 2021). O *Cluster of Differentiation 27* (CD27) é outro *checkpoint* imunológico que num ensaio clínico de fase I revelou ser importante na indução da apoptose das células T através da ligação ao *Cluster of Differentiation 70* (CD70) nas células tumorais e ao recetor CD27 nas células T (Ravi Medikonda et al., 2021).

A LAG-3 é uma molécula de membrana regulada positivamente em linfócitos infiltrantes e expressa em células T desgastadas. A ligação de LAG-3 ao MHCII em APCs e células tumorais resulta na redução da ativação de células T e células NK. Um ensaio clínico de fase I combinou um anti-LAG-3 com anti-PD-I, mas os resultados ainda não estão disponíveis (Drew M. Pardoll et al., 2012; Ravi Medikonda et al., 2021).

Uma nova estratégia é a combinação de anti-PD-I, em terapia neoadjuvante e adjuvante com resseção cirúrgica, que mostrou maior OS comparativamente a resseção cirúrgica isolada. Num ensaio clínico de fase II, os agentes anti-PD-I, usados como terapia neoadjuvante após a resseção cirúrgica, mostraram maior libertação de quimiocinas, maior diversidade clonal de recetores para antígeno nas células T (TCR) e mais infiltração de células imunológicas no tumor, mas nenhum benefício foi provado, pois apesar dos resultados promissores, o bloqueio de PD-I não afetou a OS em gliomas hipermutados com falta de TILs (Ravi Medikonda et al., 2021; Thomas Daubon et al., 2020).

Inibir o ponto de verificação de fagocitose *Cluster of Differentiation 47 (CD47)* usando um anticorpo anti-CD47 humanizado, o Hu5F9-G4, demonstrou resultados positivos em ensaios pré-clínicos. O anti-CD47 em combinação com TMZ aumenta a fagocitose e estimula as células T CD8⁺ citotóxicas (Thomas Daubon et al., 2020).

O TIM-3 é um marcador de superfície expresso em linfócitos *T helper 1 (Th1)* e induz apoptose celular após ligação a galactina 9 (Gal-9) podendo também ser um possível alvo (Xing Wang et al., 2019).

Outros alvos podem potenciar a atividade dos inibidores de PD-1, tais como a: IDO, que inibe a proliferação de células T e conseqüentemente a sua apoptose, juntamente com a acumulação de células Treg que implica diminuição dos níveis de triptofano. Um aumento de IFN- γ implica aumento de IDO. Um ensaio clínico de fase I concluiu que a IDO causa resistência adaptativa dos tumores aos bloqueios da via PD-1/PD-L1 (Xing Wang et al., 2019).

Outro alvo possível é o 4-1BBB (*Cluster of Differentiation 137 (CD137)*) expresso em células T, APCs e células T CD8⁺ citotóxicas e que é capaz de modular a atividade das células T CD4, células NK, monócitos e APCs para potenciar a imunidade das células T. Em ensaios pré-clínicos, mostrou rejeição completa do tumor, e já em ensaios clínicos de fase Ib, os resultados revelam toxicidade dependente da dose (Xing Wang et al., 2019).

Outro alvo é OX40 (*Cluster of Differentiation 134 (CD134)*), um co-estimulador da família do fator de necrose tumoral (TNF) e expresso em células T CD4⁺ de memória ativada e células Treg CD4⁺ e FoxP3, sendo menos expresso em células T CD8⁺ ativadas. O reconhecimento do recetor de células T de antígenos pode regular positivamente o OX40. A estimulação desta via aumentou a função de células T efetoras para destruir tumores e conseqüentemente aumentar a eficácia terapêutica de PD-1 (Xing Wang et al., 2019).

Outros estudos estão a considerar inibir os *checkpoints* imunológicos com radiação, o que demonstrou aumentar o *pool* de neoantígenos potenciais e melhorar a apresentação ao complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC I) desses antígenos por células tumorais e APCs (Sylvia C. Kurz et al., 2018).

7.2. Células T-CAR

A terapia com células T-CAR surge com o objetivo de aumentar a atividade anti-tumoral das células T do próprio doente que passam a expressar um recetor de antígeno quimérico (CAR). Desta forma, é possível, superar o silenciamento que as células de GBM são capazes de fazer ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC), impedindo o reconhecimento e conseqüentemente a atividade anti-tumoral, pois o recetor das células T

necessita de ser reconhecido pelo MHC. Ultrapassado isso, as células T-CAR são ativadas, proliferam e recrutam outras células imunológicas através da liberação de citocinas e quimiocinas. A Figura 19 exemplifica o mecanismo de ação das células T-CAR (Abigail L. Mende et al., 2020; Sylvia C. Kurz et al., 2018).

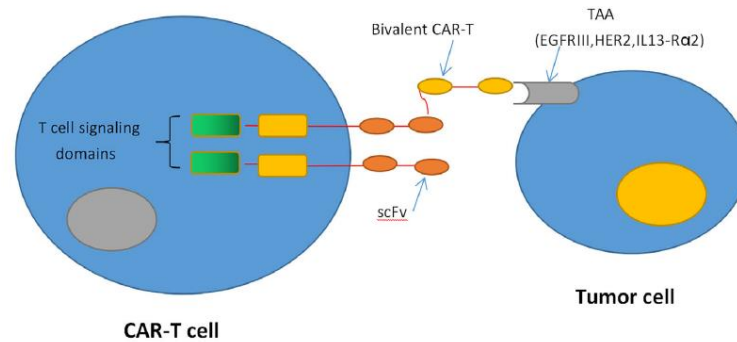


Figura 19: Mecanismo de ação das células T-CAR (Boyuan Huang et al., 2021).

A entrega de células T-CAR administradas por via intravenosa demonstrou maior número de linfócitos ativos no tumor comparativamente à distribuição intra-tumoral, intracavitária e/ou intraventricular que pode melhorar a durabilidade da resposta, com especial destaque para a administração intraventricular que demonstrou mais infiltração, mais penetração no núcleo tumoral e maior persistência (Abigail L. Mende et al., 2020).

A entrega intracavitária das células T-CAR resultou num controlo do tumor localizado, sem efeito distante, contrariamente à entrega intraventricular adjuvante em que se verificou regressão da doença, no entanto provou-se que várias barreiras como a existência de: antígenos tumorais expressos heterogeneamente, persistência limitada, *homing* a locais diferentes do tumor e imunossupressão mediada pelo TME, são responsáveis pelos resultados, insatisfatórios, apontando para a necessidade de melhorar a entrega das células T-CAR (Abigail L. Mende et al., 2020).

O recetor $\alpha 2$ da interleucina 13 do antígeno (IL-13R $\alpha 2$) está presente em 75% dos GBMs, sendo associado a um mau prognóstico e maior capacidade de invasão tumoral. Os resultados dos ensaios clínicos mostraram uma boa tolerância às células T-CAR direcionadas a este alvo e ainda um aumento robusto de citocinas e quimiocinas inflamatórias no LCR (Boyuan Huang et al., 2021; Abigail L. Mende et al., 2020).

O ensaio clínico de fase I, NCT04003649, em recrutamento, tem como objetivo investigar os efeitos secundários das células imunes específicas do tumor cerebral (células T IL13Ralpha2-CAR) no tratamento de doentes com doença leptomeníngea de GBM, ependimoma ou meduloblastoma. Outro ensaio clínico de fase I, NCT04661384, ativo e já sem recrutamento, visa estudar os efeitos secundários e a melhor dose da imunoterapia no

tratamento de doentes com glioma maligno recorrente ou refratário com células T geneticamente modificadas por um lentivírus para expressar um recetor quimérico4 IBB-coestimulatório específico para IL13R α 2, *hinge-optimized* e um *Cluster of Differentiation 19* (CD19) truncado (clinicaltrials.gov.pt).

Os efeitos secundários e a melhor dose de células T-CAR com um domínio direcionado ao tumor de clorotoxina no tratamento de doentes com GBM recorrente metaloproteinase 2 (MPP-2) positivo, serão também avaliados num ensaio clínico de fase I, ainda em recrutamento. As vacinas obtidas a partir de um vírus modificado por genes são também promissoras para ajudar o organismo a construir uma resposta imunológica eficaz na destruição de células tumorais (NCT04214392, clinicaltrials.gov.pt).

7.3. Terapia com Linfócitos Infiltrantes do Tumor

No momento da ressecção do tumor são recolhidos linfócitos específicos do tumor, que são isolados e modificados geneticamente para ativar um recetor de uma proteína presente nas células tumorais e, posteriormente, administrados ao doente (Lynes J et al., 2018; Dunn If et al., 2013).

Esta terapia pode ser bastante promissora no tratamento do GBM, uma vez que utiliza células T do doente que já reconhecem o tumor. Apesar das hipóteses animadoras, existem algumas questões que devem ser estudadas com cuidado e superadas, como os potenciais efeitos tóxicos e o risco de síndrome de libertação de citocinas (Lynes J et al., 2018; Dunn If et al., 2013).

7.4. Terapia de Recetor de Células T

Os recetores de células T podem reconhecer e ligar-se a antígenos para induzir apoptose (Brown MP et al., 2019; Hughes MS et al., 2019).

As células T obtidas do sangue periférico do doente, geneticamente modificadas para melhorar o reconhecimento do antígeno a administrar ao doente têm somado sucessos noutros tumores como no melanoma metastático. Após os bons resultados com esta abordagem terapêutica, a investigação tem sido intensificada de forma a ser possível a sua utilização em gliomas de alto grau, desde que algumas limitações sejam superadas, como contornar o silenciamento que as células do GBM fazem ao MHC, impedindo que as células T sejam reconhecidas e consequentemente exerçam a sua atividade (Brown MP et al., 2019; Hughes MS et al., 2019).

7.5. Vacinas

Outra estratégia de imunoterapia são as vacinas não preventivas. A vacinação com antígenos tumorais aumenta o recrutamento de células T efetoras específicas do antígeno para o tumor, de forma a adquirir uma imunidade mediada por células (Sylvia C. Kurz et al., 2019; Tresa McGranahan et al., 2019; Abigail L. Mende et al., 2020).

As vacinas de células dendríticas são uma das abordagens possíveis. As células dendríticas processam e apresentam o antígeno para que os linfócitos T, células NK e citocinas consigam estimular a resposta imune e eliminar as células tumorais (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021; Boyuan Huang et al., 2021).

As células dendríticas isoladas do doente são estimuladas *ex vivo*, por antígenos tumorais ou moléculas do MHC que expressam mRNA, antes da administração ao doente (Boyuan Huang et al., 2021).

A DCVax-L é uma vacina de células dendríticas autólogas com lisado tumoral extraído da recessão do tumor. Encontra-se em fase III de ensaios clínicos com o objetivo de melhorar os benefícios seja em monoterapia ou em combinação (Ravi Medikonda et al., 2020).

Também se projetou uma vacina de células dendríticas direcionada a vários alvos, de forma a que a resposta imunológica seja mais robusta, uma vacina autóloga pulsada com o peptídeo de classe I do *Tumor-associated Antigens* (TAA) altamente expresso em gliomas que mostrou uma resposta sustentada. Os resultados não permitiram grandes conclusões. Apesar de alguns ensaios clínicos não terem mostrado nenhuma resposta significativa, outros mostraram algum benefício, na melhoria da OS. Para se obter uma conclusão sustentada mais ensaios clínicos de fase III são necessários (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021; Boyuan Huang et al., 2021).

O desafio aqui, devido à heterogeneidade do tumor, passa por obter um lisado tumoral adequado para gerar vacinas (Boyuan Huang et al., 2021).

Outras vacinas que constituem alternativas válidas são as vacinas de peptídeos, concebidas para interagir com os TAAs que derivam de mutações expressas pelos tumores ou com os TAAs que resultam de proteínas normais sobre-expressas que se encontram tanto no tecido tumoral como no normal (Boyuan Huang et al., 2021).

Com o objetivo de abranger um maior número de antígenos e consequentemente maior sucesso, pensou-se em vacinas multipeptídicas para induzir uma forte resposta de células T aos vários antígenos tumorais (Abigail L. Mende et al., 2021).

IMA950 é um exemplo, sendo composta por 9 peptídeos sintéticos restritos a antígeno leucocitário humano A2 (HLA-A2), dois peptídeos de ligação do MHCII e um peptídeo derivado do vírus da hepatite B (HBV) restrito a HLA-A2, procurou-se avaliar a sua imunogenicidade. Esperava-se que fosse capaz de estimular células T citotóxicas de forma a destruir células tumorais, em combinação com bevacizumab. Porém os resultados obtidos não indicaram nenhum benefício comparativamente aos doentes não vacinados (Boyuan Huang et al., 2021).

Outras vacinas têm com alvo a mutação IDH 1, como a R132H que mostrou indução da resposta imune, com toxicidade razoável, em ensaios clínicos de fase I e ainda a vacina H3.3K27 para o mesmo alvo capaz de prolongar significativamente OS (Boyuan Huang et al., 2021; Abigail L. Mende et al., 2021).

SurVaxM é outra vacina de peptídeos em desenvolvimento, o alvo é a survivina, uma proteína anti-apoptótica, responsável pela sobrevivência das células tumorais, expressa em 95% dos casos de GBM. Um ensaio clínico de fase I mostrou resultados promissores (Ana Beatriz Bogalho, 2019).

Para suportar todas as conclusões sobre os benefícios destas terapias é ainda necessário mais trabalho de investigação (Boyuan Huang et al., 2021).

7.6. Terapia Génica

A terapia génica consiste em entregar genes supressores tumorais ou pró-fármacos recorrendo a vetores virais ou não virais como nanopartículas poliméricas e não poliméricas (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

7.6.1. Vetores Virais

Os vírus oncolíticos são introduzidos nas células tumorais e após a sua replicação provocam a morte celular, com consequente resposta inflamatória e imunológica iniciada pela libertação dos mediadores inflamatórios, *Damage-associated Molecular Patterns* (DAMPs) e TAAs. Entre os vírus mais usados destacam-se o herpes simplex (HSV), os retrovírus e os adenovírus associados (AVV) (Abigail L. Mende et al., 2020).

O herpes simplex 1 (HSV-1) é um vírus DNA com envelope que graças à sua natureza neurotrópica é muito utilizado para transdução de genes no SNC. Ensaios clínicos mostram que HSV-1 ao ser injetado intracranianamente juntamente com TMZ garante uma sobrevida de 1 ano em caso de GBM (Abigail L. Mende et al., 2020; Junsheng Li et al., 2021).

Os retrovírus precisam de uma célula hospedeira em divisão ativa para suportar a replicação viral e podem atuar como transportadores seletivos de transgenes pro-citotóxicos exógenos, ou seja, são capazes de entregar genes suicidas às células tumorais e incorporá-los no genoma do hospedeiro (Abigail L. Mende et al., 2020; Junsheng Li et al., 2021).

O primeiro ensaio clínico com retrovírus utilizou uma timidina cinase (TK) do HSV, que é um gene suicida, em combinação com o ganciclovir (GCV), um pró-fármaco. O complexo HSV-TK converteu o GCV na forma ativa, ou seja, trifosfato de GCV, que inibe a replicação do DNA e a divisão das células tumorais, mas o ensaio clínico mostrou uma transfeção limitada no tumor o que inviabilizou a terapia (Shaimaa M. El-Khayat et al., 2021; Junsheng Li et al., 2021).

Outros ensaios clínicos usaram um retrovírus, o TOCA511 que entrega o gene da citosina desaminase às células tumorais. A enzima citosina desaminase (CD) converte o pró-fármaco 5-fluorocitosina em 5-fluorouracil (5-FU) que é ativo e causa morte das células tumorais, tendo também mostrado conseguir atuar como radio-sensibilizador e promover um aumento de 5-FU no interior do tumor. O ensaio clínico de fase III mostrou uma sobrevida melhorada em doentes com duas ou mais recorrências (Junsheng Li et al., 2021).

Os AAV são vírus DNA, sem envelope, bastante utilizados, que após endocitose não integram o genoma do hospedeiro. O ONYX-015 é um AAV, construído para inibir o bloqueio de p53, que em ensaios clínicos de fase I mostrou não estar associado a efeitos adversos e ao mesmo tempo consegue inibir o crescimento tumoral (Junsheng Li et al., 2021; Andrew O. Sasmith et al., 2018).

O DNX-2401 (Tasadenoturev) é também um AAV modificado para replicar e destruir seletivamente as células tumorais que apresentam mutações em Rb, através de uma deleção de 24 pares de bases no gene E1, que o torna incapaz de replicar em células normais. Nas células tumorais, provoca-lhes necrose e infiltração de células imunes intra-tumorais, estimulando a resposta tumoral contínua. Um ensaio clínico de fase I não relatou toxicidade assim como demonstrou uma redução tumoral (Junsheng Li et al., 2021; Sónia Tejada et al., 2018; NHS, 2017; Frederick F. Lang et al., 2018).

O DNX-2401 obteve a designação de medicamento órfão para o tratamento de glioma em 2014, tendo sido considerado elegível para o programa de avaliação de medicamentos prioritários (*PRiority Medicines-PRIME*) em 2016, com base nos dados não-clínicos e clínicos exploratórios para o tratamento do GBM (Lista da EMA consultada a 1/02/2022).

Atualmente, está a avaliar-se a combinação de DNX-2401 com pembrolizumab em doentes com GBM recorrente. Os resultados em ensaios pré-clínicos mostraram eficácia. Em

ensaio clínico, os participantes com GBM recorrente receberam uma única injeção intratumoral de DNX-2401 e após 7 a 9 dias, administraram-se 200 mg de pembrolizumab, uma vez a cada 3 semanas, durante 2 anos ou até a progressão da doença ou toxicidade observada ser considerada inaceitável. A sobrevida foi melhorada e não se verificou toxicidade nem nenhum problema de segurança, o que aumenta as expectativas em relação ao sucesso da terapia (Sónia Tejada et al., 2018; NHS, 2017).

O valaciclovir combinado com um AAV, injetado no pós-operatório, em combinação com radioterapia, seguida de TMZ adjuvante em doentes com diagnóstico recente, demonstrou resultados pouco benéficos comparativamente ao tratamento convencional, o que leva a considerar que os estudos com vetores virais mostraram apenas uma pequena vantagem na sobrevivência, sendo a chegada ao tecido tumoral a principal barreira para o sucesso terapêutico (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

Outros vírus possíveis são os lentivírus, mais estáveis comparativamente aos retrovírus, tendo sido usados como vetor que expressa *Short hairpin RNA* (shRNA) para regular negativamente BCL-2 e o fator de necrose tumoral solúvel (S-TRAIL) para induzir apoptose, conseguiu aumentar a expressão das caspases 3 e 7, deste modo podendo melhorar a sensibilidade do GBM à radioterapia (Junsheng Li et al., 2021).

Também a entrega de miR-100 usando transfeção por lentivírus aumentou a sensibilidade à quimioterapia, assim como a entrega de *Growth Arrest Specific 1* (GAS1) ou PTEN, pode traduzir-se na inibição do GBM (Junsheng Li et al., 2021).

Outras estratégias envolvem vacinas de poliovírus atenuado que têm como alvo o CD155 que é sobre-expresso no GBM. Neste âmbito, encontra-se a decorrer um ensaio clínico de fase 2 em combinação com a lomustina para avaliar a eficácia (Boyuan Huang et al., 2021).

O ParvOryx01 é um vírus oncolítico que está a ser avaliado em ensaios clínicos de Fase I/IIa para o tratamento de GBM e os resultados foram apelativos pois demonstrou melhorar a sobrevivência e estimular o sistema imunológico para combater o tumor (Ana Beatriz Bogalho, 2019).

O polio-rinovírus quimérico, PVSRIPO, liga-se ao recetor CD155 encontrado em várias células neoplásicas. Estudos pré-clínicos de tratamento com PVSRIPO têm mostrado resultados promissores, nomeadamente pela regressão tumoral. Um ensaio clínico de fase I revelou melhoria na OS (Ana Beatriz Bogalho, 2019).

O vírus Zika também está a ser inspecionado em estudos *in vitro* e *in vivo*. As conclusões são positivas, pois o vírus Zika tem atividade oncolítico em GSCs, sendo, no entanto, necessários mais dados (Ana Beatriz Bogalho, 2019).

Outro estudo de fase I, ainda em recrutamento, tem como objetivo estudar a melhor dose e os efeitos secundários do AAV, DNX-2401, no tratamento de doentes com glioma de alto grau recorrente (NCT03896568, clinicaltrials.gov.pt).

Portanto, a terapia génica tem sido uma estratégia para combater as várias alterações genéticas características do GBM, tal como a via p53 que se encontra desregulada na maioria dos doentes com GBM. O p53 é codificado por TP53, e o seu funcionamento correto causa a paragem do ciclo celular e apoptose. Sempre que alterações celulares forem detetadas, há maior transcrição de p21, CDKN2A liga-se a proteínas ciclinas e inibe as suas funções de interromper a progressão do ciclo celular, portanto a mutação implica perda da função supressora tumoral (M. Touat et al., 2017; Andrew O. Sasmith et al., 2018; Alexander Ou et al., 2021; Melanie Y. Lombardi et al., 2017; Kenneth Aldape et al., 2015).

Estão também reportados alguns estudos com o objetivo de reativar a via do p53 através de um AAV ou outras abordagens farmacológicas. Contudo, em ambos os casos, os resultados não foram os esperados, possivelmente devido à baixa potência e à dificuldade em penetrar a BHE (Ana Beatriz Bogalho, 2019).

7.6.2. Vetores Não Virais

Os vetores não virais incluem as nanopartículas poliméricas e não poliméricas. Relativamente a estas últimas, foram avaliados sistemas como lipossomas, nanopartículas de ouro ou de RNA. Neste âmbito, foi realizado um ensaio clínico com um lipossoma direcionado ao recetor da transferina SG-53 que encapsula DNA do gene p53. Foi observado que o lipossoma conseguiu atravessar a BHE, levando à redução de MGMT e à apoptose, confirmando os resultados já obtidos em ensaios pré-clínicos. Neste momento, está a decorrer um ensaio clínico de fase II para avaliar os benefícios da combinação de vetores não virais com TMZ em doentes com GBM recorrente (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

Outro exemplo envolve uma nanopartícula de ouro carregada com um *Small Interfering RNA* (siRNA) e que em ensaios pré-clínicos mostrou ser capaz de atravessar a BHE e aumentar a apoptose (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

Também as nanopartículas de RNA que transportam anti-miRNA-21 têm demonstrado o efeito de regressão do tumor em xenoenxertos, com resultados promissores. No entanto, ainda se encontram em fase pré-clínica (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

7.7. Imunoterapia Baseada em Macrófagos

Estratégias adicionais passam pela atividade anti-tumoral de células mielóides e NK (Thomas Daubon et al., 2020).

Os TAMs do GBM não apresentam células estimuladoras para a ativação das células T e intervêm na angiogênese. Neste sentido a inibição do CSF-1 é bastante importante na diferenciação e sobrevivência de macrófagos. Em ensaios pré-clínicos, a inibição do recetor do fator 1 estimulante de colónias (CSFR-1) leva a que os macrófagos adquiram um fenótipo anti-tumoral. Em ensaios clínicos, foi possível observar que não foi atingida a eficácia pretendida, provavelmente devido às mutações nas vias PTEN e PI3K. Posteriormente, em ensaios pré-clínicos, foram combinados com radioterapia aumentando a sobrevivência quando a entrega da nanopartículas ocorreu localmente. Apresentaram melhoria em comparação com a mesma terapia sem radioterapia (Miranda W. Yu et al., 2021).

7.8. Metabolismo do Colesterol

O cérebro produz colesterol que é extremamente importante no desenvolvimento de neoplasias, sendo por isso visto como um potencial alvo na terapia. As estatinas conseguem inibir a 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG)-CoA redutase (HMGCR), envolvida na via do mevalonato, para bloquear a síntese de difosfato de geranylgeranyl (GGPP) e difosfato de farnesil (FPP), que são necessários para ativar várias proteínas, incluindo Rho, Rac1 e Ras. A alteração de Ras por estatinas regula o desenvolvimento celular, sobrevivência, migração, invasão, metástase e apoptose através das vias de sinalização a jusante (Amir R. Afshari et al., 2021).

Assim, vários estudos mostraram que as estatinas como a atorvastatina podem exercer atividade anti-tumoral através da inibição da via do mevalonato (Ana Beatriz Bogalho, 2019; Amir R. Afshari et al., 2021).

7.9. Hipertermia

A hipertermia consiste no aumento da temperatura no local do tumor até cerca de 41°C-46°C, o que vai danificar as células tumorais. O aumento da temperatura pode ser feito utilizando micro-ondas, ultrassons ou nanopartículas. Apesar dos resultados precoces, esta abordagem parece promissora seja em monoterapia ou em combinação com quimioterapia de forma a alterar a BHE para que o fármaco alcance ao tumor (Ana Beatriz Bogalho, 2019).

7.10. Compostos Químicos

Um ensaio clínico de fase II, avaliou o palbociclib, um inibidor de CDK4 e de *Cyclin Dependent Kinase* (CDK6), relacionadas com o Rb. Os resultados não foram promissores, mas acredita-se que foram selecionados os doentes sem alterações na via Rb, por isso, os resultados poderão ser mais favoráveis, sendo necessário obter dados adicionais (Ana Beatriz Bogalho, 2019).

O Rb em células não proliferativas é hiperfosforilado e liga-se ativamente ao fator de transcrição *E2 Promoter Binding Factor* (E2F). A ligação Rb-E2F impede a transcrição de genes fundamentais para a mitose e o ciclo celular é interrompido no ponto de verificação G1/S. Em células proliferativas, EGF induz a formação de ciclina D1 e a ativação de complexos cinase-ciclina. A fosforilação de *RB Transcriptional Corepressor 1* (Rb1) via CDK4/ciclina D permite o progresso do ciclo celular com expressão aumentada de p53 via p14 Arf ativada (Alireza Mansouri et al., 2017).

A regulação negativa de Rb pode ser feita por proteínas inibidoras de cinase dependente de ciclina e CDKN2A-116 que previne a fosforilação de Rb (Melanie Y. Lombardi et al., 2017).

Os repressores a montante das vias de sinalização p53 e Rb, como o CDK4, que fosforila e inativa Rb e MDM2, contribuem ainda mais para a patologia, por serem capazes de induzir a proliferação celular e inibir a supressão tumoral, respetivamente (Kenneth Aldape et al., 2015).

A amplificação de MDM2 está presente sempre que se encontra a mutação em TP53. Nesse sentido, a inibição de MDM2 pode ser vista como uma estratégia terapêutica futura, por regular negativamente o p53. Este quando se apresenta mutado é resistente à inibição de MDM2 (Alexander Ou et al., 2021; Hiroko Ohgaki et al., 2007; Ana Miranda et al., 2017).

O *Difluoromethylornithine* (DMFO) é um inibidor irreversível da ornitina descarboxilase, que está envolvida na síntese de poliaminas e reduz a proliferação de células tumorais. A associação entre DMFO, TMZ e radiação, mostrou em ensaios pré-clínicos, aumentar a morte celular, estabelecendo uma nova perspectiva para a terapia, embora mais estudos sejam necessários. A via biossintética da poliamina é muito importante para as células, pois produz poliaminas responsáveis por muitos processos celulares, nomeadamente, proliferação, desenvolvimento e crescimento celular (Ana Beatriz Bogalho, 2019).

O bortezomib, um inibidor do proteossoma de primeira geração, interfere com a adesão celular, angiogénese e comunicação intercelular mediada por citocinas, afetando o TME durante a formação do tumor e favorecendo a quimioterapia ao inibir NFK-B. Um ensaio

clínico de fase II realizado para avaliar o bortezomib em combinação com radioterapia em GBM recém-diagnosticado, evidenciou melhoria na PFS mesmo em doentes com o promotor MGMT metilado. No entanto, os resultados permanecem controversos pois o fármaco está associado ao desenvolvimento de eventos adversos graves. Um ensaio de braço único foi desenvolvido. O tamanho da amostra foi significativamente menor do que o controlo, portanto ainda existem muitas inconsistências sobre o impacto do bortezomib no tratamento do GBM (Yaning Wang et al., 2021).

O marizomib utiliza o mesmo mecanismo de ação do bortezomib, mas com melhor permeabilidade da BHE e sobrevida superior em modelos animais. São esperados os dados dos ensaios pré-clínicos em curso (Yaning Wang et al., 2021).

As proteínas anormais são degradadas pelo proteossoma na formação e desenvolvimento tumoral. Por isso, a atividade do proteossoma nas células tumorais é superior, o que faz com que estes fármacos tenham sido considerados como possíveis tratamentos eficazes (Yaning Wang et al., 2021).

A ativação das vias de sinalização mTOR também está envolvida na maioria dos GBM. A proteína mTOR é uma cinase serina/treonina que regula o crescimento celular e desempenha um papel fundamental na regulação da síntese de proteínas. As mutações em mTOR estão envolvidas em muitas neoplasias. O facto de mTOR ter como vias reguladoras PI3K/PTEN/AKT e RAS/RAF/MEK/ERK faz com que qualquer mutação numa das proteínas de uma das vias implique alterações noutra via (Zhang et al., 2011; Kenneth Aldape et al., 2015).

O everolimus inibe o crescimento celular por inibição de mTOR. Um ensaio clínico de fase III mostrou eficácia na redução tumoral em astrocitomas de células gigantes subependimárias, porém para GBM os resultados não foram promissores. O sirolimus e temsirolimus são outros fármacos da mesma classe cuja eficácia também provou ser limitada (Yaning Wang et al., 2021).

O voxtalisib é outro inibidor de mTOR/PI3K que em ensaios clínicos de fase II mostrou poucos benefícios. O buparlisib é outro fármaco da mesma classe que se encontra em desenvolvimento (Ana Beatriz Bogalho, 2019).

Dados recentes de ensaios pré-clínicos relacionam a hipóxia local induzida pela radioterapia com o aumento da secreção do SDF-1. Este fator liga-se aos seus recetores de quimiocinas CXCR4 e *C-X-C Motif Chemokine Receptor 7* (CXCR7) fazendo com que os monócitos da medula óssea entrem no tumor, produzindo assim novos vasos sanguíneos e contribuindo para a recorrência. A inibição desta via poderia aumentar a taxa de controlo local de tumores após a radioterapia e prolongar o tempo de sobrevivência dos doentes.

Ensaio clínico de fase I e II foram realizados para avaliar o efeito de um inibidor de CXCR4, o plerixafor. Os dados já obtidos revelaram melhorar a OS e PFS comparativamente ao grupo controlo, o que parece interessante para prosseguir a investigação, apesar dos ensaios clínicos já realizados, à semelhança de outros, terem uma amostra pequena e serem realizados em braço único, o que confere desvantagens ao estudo (Yaning Wang et al., 2021).

O cilengitid é um inibidor de integrina avaliado em ensaios clínicos de fase II, como o CORE ou o CENTRIC que mostraram ineficácia mesmo em combinação com TMZ (Yaning Wang et al., 2021).

A anfotericina B consegue reprogramar as células mielóides e induzir um fenótipo imunoestimulador capaz de impedir o crescimento de GSCs *in vitro* e crescimento tumoral *in vivo* (Steven de Vleeschouwer et al., 2017).

Outros fármacos com possível vantagem são os inibidores da histona desacetilase. Encontram-se em fase de ensaios pré-clínicos, para avaliar a eficácia em combinação com TMZ ou bevacizumab (M. Toutat et al., 2017).

7.11. Pró-fármacos

O iniparib é um pró-fármaco que foi inicialmente utilizado no tratamento do cancro da mama, mas pode ter ação noutros cancros. A sua atividade não passa apenas pela inibição de PARP, sendo o efeito anti-tumoral obtido pela libertação de um ião radical nitro ativado que se liga às proteínas de selénio, como a tiorredoxina redutase, para originar citotoxicidade. Dados do ensaio clínico de fase III sugerem uma melhoria na OS, no entanto, as conclusões são controversas por ter sido realizado em braço único sendo a randomização fundamental para que as conclusões sejam consistentes. Por outro lado, os ensaios clínicos foram concluídos há vários anos e o cálculo de OS varia de acordo com o ensaio clínico o que influencia a conclusão (Yaning Wang et al., 2021).

7.12. Proteínas

O *Cluster of Differentiation* ligando (CD95L), também conhecido por Fas, é membro da família TNF e está altamente relacionado com a homeostase imunológica e com a eliminação do tumor (Yaning Wang et al., 2021).

APG101 é uma proteína de fusão que pode ligar-se a CD95L, bloqueando-o e com isso inibe os efeitos da ligação de CD95L ao seu recetor. Um ensaio clínico de fase II mostrou que os doentes com baixos níveis de metilação CpG2 no promotor CD95L tiveram um efeito

terapêutico mais baixo que o CD95L, podendo ser apontado como um potencial biomarcador (Yaning Wang et al., 2021).

O ONC201 é um antagonista seletivo do recetor acoplado à proteína G, *Dopamine Receptor D2* (DRD2), que ao ligar-se ao DRD2 é capaz de induzir a apoptose independentemente de p53 e consequentemente inativar AKT/ERK, sem afetar as células normais (Yaning Wang et al., 2021).

Os recetores acoplados à proteína G regulam as funções fisiológicas através da regulação da transdução do sinal intracelular (Yaning Wang et al., 2021).

Um ensaio clínico de fase II em monoterapia revelou ONC201 é bem tolerado e com atividade terapêutica em doentes com GBM, mas são necessários ensaios clínicos adicionais (Yaning Wang et al., 2021).

Devido à heterogeneidade do tumor, são cada vez mais necessárias estratégias com diferentes alvos combinados como HSPs, nomeadamente a proteína de choque térmico-96 quilodalton (HSP-96), uma vez que a sua expressão nas células tumorais está aumentada. Por este motivo, estas proteínas constituem um instrumento útil no combate ao GBM (Boyuan Huang et al., 2021; Ana Beatriz Bogalho, 2019).

Após a ressecção cirúrgica, libertam-se HSPs, que se ligam aos antigénios tumorais, formando a vacina que depois será administrada ao doente para ser apresentada ao MHC I e se dar o reconhecimento por parte das células T citotóxicas. Em ensaios clínicos de fase II de uma vacina com HSP-96 foi observada melhoria na sobrevivência dos doentes. No entanto, são necessários mais ensaios clínicos para avaliar a segurança, tolerabilidade e eficácia na combinação com bevacizumab. Verificou-se que a administração da vacina após indução de linfopenia diminui a eficácia (Boyuan Huang et al., 2021; Ana Beatriz Bogalho, 2019).

7.13. *Small Interfering RNA*

O siRNA é uma molécula de RNA de fita dupla que não é codificante, tem uma estrutura curta e bem definida, geralmente entre 20 e 24 pares de bases. A Gal-I é também vista com potencial na terapêutica, tendo a administração de um siRNA direcionado à Gal-I, sido tolerado e relevado maior sensibilidade à TMZ. Mostrou ainda uma sinergia promissora com anticorpos monoclonais anti PD-I (Steven de Vleeschouwer et al., 2017).

7.14. Células Estaminais Neurais

Um ensaio clínico de fase I, ainda sem recrutar, pretende estudar o efeito de múltiplas doses de NSC-CRAd-S-pk7 no tratamento de doentes com gliomas de alto grau recorrentes.

O NSC-CRAAd-S-pk7 consiste em NSCs que carregam um vírus para destruir células tumorais, podendo com o aumento da dose incrementar o número de células tumorais mortas (NCT03072134, [clinicaltrials.gov.pt](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03072134)).

8. Razões de Insucesso das Terapias

Até ao momento, os benefícios das várias abordagens terapêuticas para o tratamento do GBM têm sido reduzidos, a sobrevida dos doentes em pouco foi alterada, devido a diversas limitações como a heterogeneidade tumoral, apresentação de antígenos, tráfego de células imunológicas e infiltração tumoral. Os tumores também têm a capacidade de se adaptar ao bloqueio (Miranda W. Yu et al., 2021; Ravi Medikonda et al., 2020; Abigail L. Mende et al., 2021; Alexander Ou et al., 2021).

A exposição crónica a antígenos resulta em células T desgastadas e sobre-expressão de PD-1 em células tumorais, onde os inibidores de PD-1 não conseguem inverter todos os fatores que causam a inibição das células T. Com a exposição a ICI pode ainda haver regulação positiva das vias compensatórias imunossupressoras induzidas pelo tumor o que inclui as vias dos *checkpoints* imunológicos que causa desgaste nas células T (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021; Syreeta DeCordova et al., 2020).

A elevada carga mutacional é um requisito para o bom funcionamento da imunoterapia, o que não acontece no GBM e por isso, a imunoterapia ainda não teve os resultados esperados no tratamento deste tipo de tumores (Miranda W. Yu et al., 2021).

As MDSCs permanecem como uma fonte de resistência ao tratamento, embora inicialmente consigam restaurar a função das células T e ainda a alta TMB, acabando por comprometer o sucesso desta terapia (Miranda W. Yu et al., 2021).

Aliado a isto, as falhas de eficácia justificam-se também pela dificuldade em ultrapassar a BHE, onde as bombas de efluxo e os transportadores ABC desempenham um papel principal o que inviabiliza a quantidade de fármaco que chega ao tumor, juntamente com mecanismos de resistência que se vão gerando. A passagem através da BHE só é possível para moléculas idealmente com peso molecular inferior a 400 Dalton, o que juntamente com a linfopenia sistémica e a expressão reduzida de células T com recetores PD-1 contribuem também para o fracasso da eficácia das terapias. Portanto, a dificuldade de passagem e administração de fármacos através da BHE ainda é um problema apesar de 80 anos de investigação nesta área (Andrea Shergalis et al., 2018; Melanie Y. Lombardi et al., 2017; Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

Apesar das falhas relacionadas com a eficácia da terapia, efeitos adversos como eventos inflamatórios e autoimunes, edema, encefalite autoimune e síndrome da libertação de citocinas foram reportados e contribuíram para o insucesso da terapêutica, embora em alguns ensaios clínicos os efeitos adversos não tenham sido de grau elevado e permitiram concluir que uma maior toxicidade é sinónimo de melhor resposta, embora a taxa de resposta varie com as características do doente e do tumor (Xing Wang et al., 2019; Ravi Medikonda et al., 2020; Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

A falha no acesso de fármacos ao mercado também se justifica pelo desenho dos ensaios clínicos. Quando o fracasso acontece em ensaios clínicos de fase III, isto deve-se ao facto de muitos ocorrerem sem a fase antecedente ter terminado ou apesar da fase II ter sido concluída, os resultados serem negativos. Portanto, a chave para um desfecho positivo de ensaios clínicos de fase III reside num melhor desenho da fase II. Outra justificação é o seguimento da investigação clínica com alteração de condição clínica entre as fases, de GBM recorrente para recém-diagnosticado, por exemplo (Yaning Wang et al., 2021).

O desenho do ensaio clínico em braço único traz desvantagens, obriga a utilização de grupos históricos de controlo que não se relacionam convenientemente com o fármaco em estudo, aliado ao facto de o GBM se tratar de uma doença órfã e como tal o número de participantes em ensaios clínicos é limitado (Yaning Wang et al., 2021).

O cálculo de OS também pode diferir entre os vários grupos experimentais, assim como o tamanho da amostra, o que faz com que em ensaios clínicos de fase II, a amostra seja mais pequena quando comparada com ensaios clínicos de fase III, influenciando as conclusões extraídas, por imprecisão estatística (Yaning Wang et al., 2021).

Os biomarcadores podem contribuir para a diminuição das falhas detetadas, ao serem incorporados como critérios de inclusão dos ensaios clínicos (Yaning Wang et al., 2021). Aliado a isto, surge o facto das técnicas de monitorização dos tratamentos não acompanharem as necessidades e, por isso, não se consegue perceber bem qual o impacto dos tratamentos. Assim, a evolução da imunoterapia exige evolução também dos métodos instrumentais. As técnicas de imagem usadas como MRS, PET ou perfusão de ressonância magnética dinâmica precisam de mais sensibilidade, especificidade e maior resolução de imagem (Abigail L. Mende et al., 2021).

Várias tentativas têm sido feitas no sentido de marcar linfócitos *ex vivo* com um radionuclídeo ou sonda de MRI na superfície da célula ou projetar células T CD8⁺ citolíticas para expressar um radionuclídeo, gene repórter PET ou imagem de ressonância magnética (MRI). Para outras condições inflamatórias como a esclerose múltipla, que à semelhança do

GBM é uma doença no SNC, nanopartículas de óxido de ferro ultrapequenas também têm sido usadas para criar imagens de células imunes infiltrativas onde a BHE está intacta (Abigail L. Mende et al., 2021).

No sentido de superar algumas destas dificuldades, surgem os medicamentos de terapia avançada (ATMPs), já com bastante destaque em ensaios clínicos, como já foi referido anteriormente e que apresentam elevado potencial quer no transporte através da BHE quer no próprio modo de ação que potencia a eficácia.

9. Medicamentos de Terapia Avançada: Definição

O aumento do conhecimento científico e o desenvolvimento tecnológico traduziu-se numa forte aposta em abordagens terapêuticas promissoras para a prevenção e o tratamento de doenças humanas, com necessidades terapêuticas ainda sem resposta. A pandemia foi também uma oportunidade de melhorar a procura de novas estratégias capazes de fazer frente aos novos desafios (Denis Horgan et al., 2020; Joana Gomes, 2015).

O rápido progresso da biologia celular e molecular, a revolução genómica e as ferramentas de edição de genes, facilitaram o aparecimento de ATMPs e o caminho parece promissor. Em janeiro de 2019, cerca de 1000 ensaios clínicos estavam em curso, neste campo da terapia (Alliance for regenerative medicine: recommendations for timely access to ATMPs in Europe, 2019).

As instituições académicas, hospitais e pequenas empresas são maioritariamente os responsáveis pelo desenvolvimento destas estratégias terapêuticas. Até junho de 2019, 14 ATMPs receberam autorização de introdução no mercado, na Europa (Joana Gomes, 2015; J. Pedro Pinheiro, 2019).

O grande foco de desenvolvimento é oncologia, sobretudo terapias com células T-CAR, juntamente com o domínio cardiovascular, musculoesquelético, SNC, endócrino e dermatológico, tal como demonstrado no gráfico da Figura 20 (Alliance for regenerative medicine: recommendations for timely access to ATMPs in Europe, 2019).

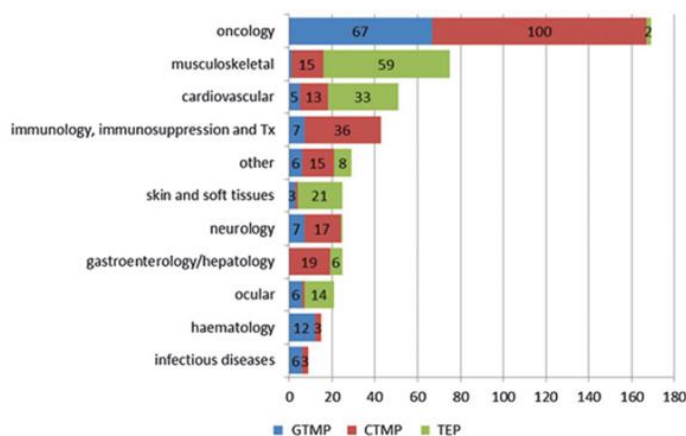


Figura 20: Distribuição das áreas de investigação para ATMPs (Tomas Boran et al., 2016).

Os ATMPs representam uma classe de biofármacos complexa e inovadora que se dividem em quatro categorias: medicamentos de terapia com células somáticas (STCs), produtos de engenharia de tecidos (TEPs), medicamentos de terapia genética (GTMPs) e ATMPs combinados (Carolina Iglesias-Lopez et al., 2019).

A Figura 21 representa um diagrama de classificação para ATMPs.

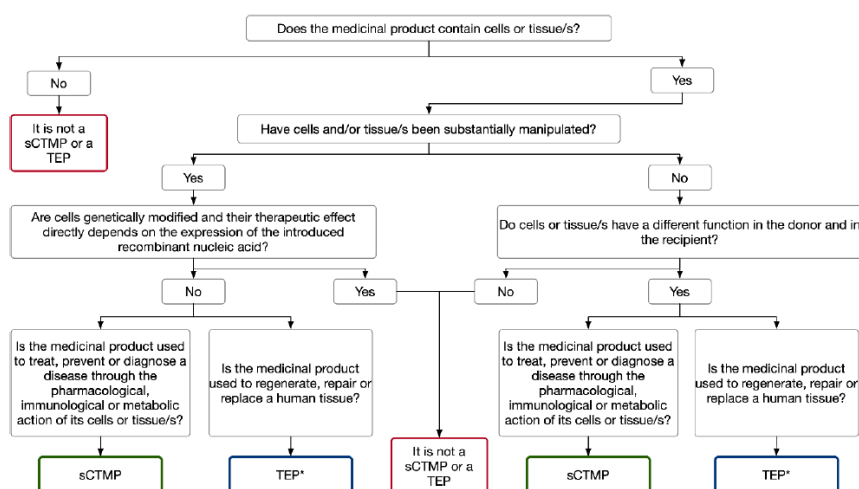


Figura 21: Diagrama de classificação de ATMPs (Marina López-Paniagua et al., 2021).

Os GTMPs são medicamentos biológicos em que as substâncias ativas contêm ou consistem em ácidos nucleicos recombinantes para serem administrados a humanos com o objetivo de regular, reparar, substituir, adicionar ou eliminar uma sequência genética. Não englobam vacinas contra doenças infecciosas e incluem vetores virais e não virais como DNA plasmídeo, vírus e células geneticamente modificadas (Regulamento (CE) N°1394/2007).

Os STCs são medicamentos biológicos que contêm ou consistem em células ou tecidos sujeitos a manipulação em que as características biológicas, funções fisiológicas ou propriedades estruturais relevantes para uso clínico pretendido foram alteradas, ou de células ou tecidos que não se destinam a ser usados para a mesma função no recetor e no dador. São administrados para tratar, prevenir ou diagnosticar uma doença. Para ser considerado SCT, as

células ou tecidos devem ter sido substancialmente manipulados de modo a atingir o mecanismo de ação pretendido em humanos (Regulamento (CE) N°1394/2007).

Os TEPs contêm ou consistem em células ou tecidos de engenharia com objetivo de regenerar, reparar ou substituir um tecido. As células ou tecidos podem ser viáveis ou não, assim como de origem humana ou animal (Regulamento (CE) N°1394/2007).

Os ATMPs combinados contêm células ou tecidos acoplados a dispositivos médicos como parte do medicamento (Regulamento (CE) N°1394/2007).

Os ATMPs caracterizam-se por atributos únicos que os tornam diferenciadores como o potencial curativo, assim como o efeito duradouro e positivo na qualidade de vida dos doentes, podendo requerer de uma só utilização e, por isso, não há problemas de adesão à terapêutica por parte do doente (Alliance for regenerative medicine: recommendations for timely access to ATMPs in Europe, 2019).

Trazem vantagens para os sistemas de saúde por reduzirem os custos hospitalares, terapêuticos e de enfermagem, a sua utilização confere menos hospitalizações, comorbilidades e tratamentos associados, ou seja, economia de custos, mais saúde e qualidade de vida, por reduzirem a ocorrência de co-morbilidades (Alliance for regenerative medicine: recommendations for timely access to ATMPs in Europe, 2019).

9.1. Sistema Regulamentar

O sistema regulamentar europeu de medicamentos é formado por 50 autoridades reguladoras dos 31 países do Espaço Económico Europeu, a Comissão Europeia e a EMA (EMA, 2016).

A nível regulamentar existe inúmera documentação que suporta a submissão de um pedido de AIM. O regulamento europeu número 1394/2007 do Parlamento Europeu e do Conselho define um quadro regulamentar adaptado a ATMPs com o objetivo de harmonizar a informação relativa ao pedido de AIM destes produtos (S. Lucas- Samuel, 2013).

A EMA é o organismo responsável pela avaliação científica dos pedidos de autorização de introdução no mercado (AIM) de todos os medicamentos na UE, submetidos a um pedido de autorização centralizado. Devido à complexidade e novidade que os ATMPs trouxeram, surgiu a necessidade de criar um novo comité que avalia todos os dados referentes a terapias avançadas, o Comité de Terapias Avançadas (CAT) (S. Lucas-Samuel, 2013; Regulamento (CE) N°1394/2007).

O CAT é responsável pela elaboração de pareceres sobre qualidade, segurança e eficácia de cada ATMP. O pedido emitido pelo CAT segue para, posteriormente, validação

pelo Comité dos Medicamentos para Uso Humano (CHMP) da EMA. O CAT é ainda responsável por fornecer recomendações sobre a classificação de ATMPs, assim como disponibilizar aconselhamento científico (Artigo 17 do Regulamento (CE) N° 1394/2007). As pequenas e médias empresas podem ainda submeter ao CAT pedidos de certificação sobre os dados de qualidade e não clínicos disponíveis, numa tentativa de atrair capital e facilitar a transferência das suas investigações para entidades capazes de completar o desenvolvimento (Joana Gomes,2015; S. Lucas-Samuel, 2013; Artigo 18 do Regulamento (CE) 1394/2007).

O quadro regulamentar foi concebido para garantir a livre circulação destes medicamentos na UE para facilitar o seu acesso ao mercado e para fomentar a competitividade das empresas farmacêuticas europeias, garantindo a proteção da saúde pública. São várias os caminhos a seguir para que o medicamento chegue ao mercado e a Figura 22 ilustra essas diferentes possibilidades (CAT,2010)

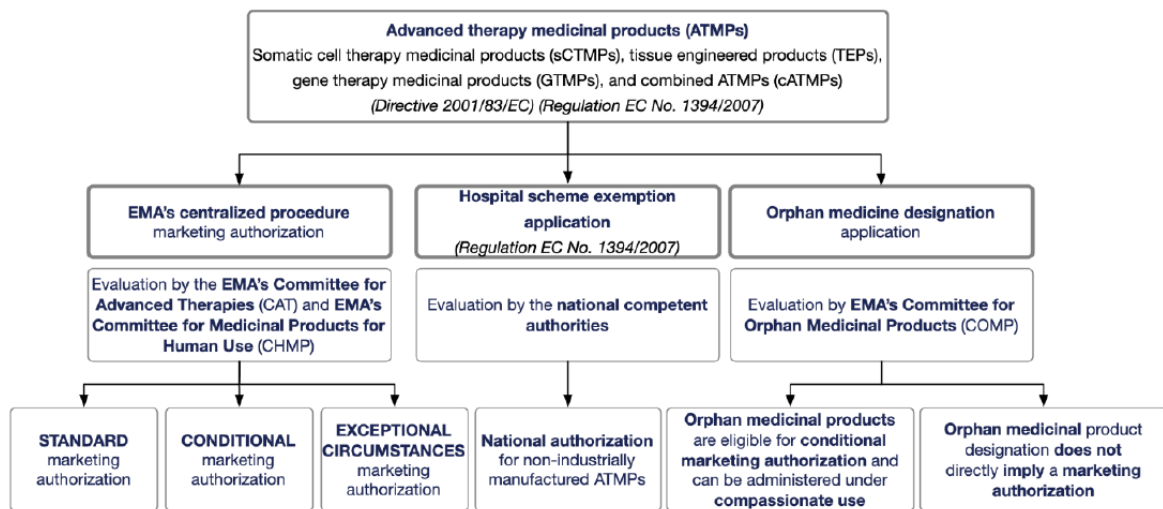


Figura 22: Caminhos Regulamentares a Seguir para ATMPs (Marina López-Paniagua et al., 2021).

O procedimento centralizado permite a comercialização do medicamento com uma única avaliação e a autorização é válida para toda a UE, sem necessitar de pedidos de AIM às entidades reguladoras de cada país. É obrigatório para medicamentos de biotecnologia, para novas substâncias ativas e para patologias como: síndrome da imunodeficiência adquirida, neoplasias, doenças neurodegenerativas, diabetes, doenças autoimunes e outras disfunções imunitárias, doenças virais e medicamentos órfãos (Regulamento (CE) N°726/2004).

O procedimento centralizado compreende diferentes formas de autorização tais como: autorização de introdução no mercado convencional, condicional e em situações excepcionais, como por exemplo, uma doença rara, emergente ou uma situação clínica para a qual será muito difícil obter dados adicionais para além daqueles submetidos com o pedido inicial (Carolina Iglesias-Lopez et al., 2019; Regulamento (CE) N° 726/2004).

No caso do pedido de autorização condicional, o requerente tem de apresentar os dados clínicos robustos que comprovem uma relação risco-benefício positiva, mas que ainda não estejam completos havendo ainda estudos a realizar. Nestes casos, o requerente tem ainda que demonstrar que não há alternativas terapêuticas, ou estas são muito limitadas, para a condição clínica a tratar e que a situação é revertida com a aprovação do medicamento em questão, bem como provar que as vantagens da disponibilização do fármaco são superiores aos riscos corridos pelos doentes ao não usufruírem da terapia (Regulamento (CE) N° 507/2006).

Um ATMP pode ser classificado como medicamento órfão se a doença para a qual se destina é uma doença de risco ou cronicamente debilitante, não afeta mais de 5 em cada 10000 pessoas, não existe outra terapêutica satisfatória, ou seja, vem preencher uma lacuna, oferece benefícios aos doentes e não é provável que a sua comercialização possa gerar receitas que justifiquem o investimento, sem a utilização de incentivos, nomeadamente ao nível de aconselhamento acerca dos ensaios necessários para garantir qualidade, eficácia e segurança ou apoios para investigação ou desenvolvimento (Regulamento (CE) N°847/2000; Regulamento (CE) N°141/2000; Marina López-Paniagua et al., 2021).

Para acelerar o processo de chegada dos medicamentos ao mercado, a EMA lançou a iniciativa PRIME, um procedimento que permite aumentar o apoio no desenvolvimento de medicamentos para necessidades médicas não atendidas (EMA; Carolina Iglesias-Lopez et al., 2019).

Este esquema baseia-se na comunicação entre o requerente e a EMA desde as fases mais iniciais do desenvolvimento do medicamento, o que facilita o acesso a incentivos para gerar dados robustos sobre eficácia e segurança, de forma a aceder à avaliação acelerada no momento do pedido de AIM, que culmina na chegada mais rápida do novo medicamento aos doentes (Regulamento n°141/2000; EMA).

9.2. Desafios Associados aos ATMPs

A complexidade e a novidade dos ATMPs, aliada à heterogeneidade intrínseca a estes medicamentos, levanta a necessidade de adaptação para fazer frente a novos desafios, nomeadamente: novas orientações regulamentares, centros especializados, acompanhamento, acessibilidade e sustentabilidade financeira, ensaios clínicos com ATMPs, modelos animais e o processo de fabrico que serão abordados com maior detalhe nas secções seguintes.

9.2.1. Novas Orientações Regulamentares

Os sistemas reguladores não fornecem regulamentos claros e específicos para uso, gestão e monitorização dos ATMPs. As implicações éticas para dadores, doentes e governos devem ser consideradas, bem como deve estar bem presente o risco de autorizar produtos ou terapias que não têm benefícios, eficácia ou segurança. É imperativo criar orientações capazes de acompanhar os avanços científicos, benefícios e riscos destas terapias (PANDRH, 2018).

Em termos regulamentares, existem quatro riscos a ter em conta: risco de infeção devido à contaminação ou reativação de microrganismos, que levanta problemas de segurança, imunogenicidade e tumorigenicidade, risco de exposição acidental de profissionais de saúde, violação dos direitos dos dadores vivos por falta de informação e a administração a doentes cuja segurança e/ou eficácia não foi verificada. À semelhança de outros medicamentos também para os ATMPs é importante ter em conta informações sobre qualidade, cumprimento das boas práticas de fabrico (BPF, GMP ou *Good Manufacturing Practises*) no desenvolvimento e fabrico do ATMP, das boas práticas clínicas (BPC, GCP ou *Good Clinical Practises*) durante os ensaios clínicos de suporte ao pedido de AIM e boas práticas de laboratório (BPL, GLP ou *Good Laboratory Practises*) na realização dos estudos não clínicos e de segurança ambiental (PANDRH, 2018; CAT, 2010)

Assim, é necessário maior clareza e harmonização nas regulamentações para ATMP para promover o desenvolvimento e comercialização destas terapias a nível global (Tracy TL Yu et al., 2018).

9.2.2. Centros Especializados

Os tratamentos com ATMPs são procedimentos especializados e devendo ser realizados apenas em centros especializados autorizados pelas autoridades nacionais de saúde (PANDRH, 2018).

9.2.3. Acompanhamento

Ao mesmo tempo que são necessárias orientações para acesso ao mercado de ATMPs é igualmente essencial uma base regulamentar consistente para acompanhar o pós-autorização, a fim de prevenir o uso não autorizado desses tipos de terapias e também para que a monitorização da segurança durante e após a administração (PANDRH, 2018).

9.2.4. Acessibilidade e Sustentabilidade Financeira

Do ponto de vista económico, os ATMPs são medicamentos muito dispendiosos e apresentam dificuldades em ser comparticipados pelos estados, pois o seu custo pode comprometer a sustentabilidade dos sistemas de saúde. O custo destes medicamentos está associado não só ao investimento necessário para o seu desenvolvimento utilizando tecnologias novas, específicas e complexas, como ao facto de na sua maioria se destinarem a doenças órfãs e, portanto, ao tratamento de um número limitado de doentes com a consequente produção de lotes de pequeno tamanho (Paula Salmikangas et al., 2015).

Para as entidades financiadoras a novidade traz incertezas, nomeadamente ao nível da magnitude e duração do efeito, assim como da eficácia e segurança, ou seja, dúvidas relacionadas com a falta de evidência sobre o comportamento que o ATMP terá a longo prazo (Alliance for regenerative medicine: recommendations for timely access to ATMPs in Europe, 2019).

Embora o desenvolvimento de um ATMP envolva incertezas científicas e técnicas agravadas pela experiência limitada do uso clínico e comercial, a avaliação socioeconómica também deve ser sujeita a uma mudança de paradigma de modo a que o investimento financeiro e de recurso humanos feito no desenvolvimento e avaliação destes medicamentos não se perca na decisão de financiamento da sua utilização e não comprometa o acesso dos doentes que verdadeiramente necessitam destas terapias inovadoras e para os quais estas foram autorizadas (Denis Horgan et al., 2020).

9.2.5. Ensaios Clínicos com ATMPs

O número de doentes envolvidos no desenvolvimento clínico de um ATMP é pela natureza desta abordagem terapêutica mais pequeno, o que torna a evidência sobre a sua eficácia e segurança conclusões mais difícil de obter (Mark D. Smith et al., 2013).

A integração e a persistência do ATMP no doente para produzir um efeito terapêutico é um desafio principalmente quando se trata de terapia somática ou terapia génica com células transformadas, pois as células vivas são frágeis e o seu comportamento *in vivo* depende do microambiente e interação entre os recetores específicos ou moléculas de superfície celular e os seus respetivos ligandos. As células são reativas a este ambiente e por isso podem alterar o seu fenótipo, padrão de migração e outras características. Assim, sempre que o ambiente muda, as células tendem a mudar em conformidade poderá trazer alterações na eficácia e segurança. Também encontrar marcadores celulares apropriados e específicos pode ser um desafio (CAT,2010).

No caso de uma terapia génica em que o tratamento é único na vida do doente, atingir a expressão génica estável e duradoura é outro desafio, no entanto isto pode ser ultrapassado com a utilização de um vetor adequado, melhorando o desenho do vetor ou escolhendo o modo de administração mais adequado (CAT,2010).

Outro problema é a falta de eficácia provocada muitas vezes por falhas na transferência génica, a par das questões éticas de segurança, mutagénese de inserção ou alteração da expressão génica como causa de oncogénese. Os vetores virais com ferramentas de edição de genes podem induzir alterações nas células-alvo que conduzam à morte, ou por outro lado, existir imunidade pré-existente contra o vetor utilizado que pode impedir a incorporação do vetor nas células dos tecidos ou órgãos onde a expressão génica é necessária. Para evitar estes riscos, o desenho do vetor pode ser otimizado (CAT,2010; Denis Horgan et al., 2020).

Outra da dificuldade no desenvolvimento, avaliação e autorização de um ensaio clínico envolvendo um ATMP é o seu mecanismo de ação que muitas vezes (ainda) não é conhecido ou não é bem compreendido assim como os efeitos adversos e a eficácia que podem depender das características de cada doente. Deste modo, a utilização de um ATMP durante um ensaio clínico exige cuidados adicionais em doenças com risco de vida onde os participantes podem não sobreviver à administração do medicamento experimental (Denis Horgan et al., 2020).

Posto isto, a monitorização da segurança pós-comercialização é necessária, no entanto, os dados de segurança são muito restritos devido ao pequeno número de doentes a que se destinam que dificulta a sua farmacovigilância (Alliance for regenerative medicine: recommendations for timely access to ATMPs in Europe, 2019).

9.2.6. Modelos Animais

Encontrar modelos animais relevantes para a demonstração da prova de conceito e exploração das potenciais questões de segurança de um ATMP constitui um desafio, porque o sistema imunológico dos animais acaba por reconhecer as células humanas como estranhas e “atacá-las”, bem como devido às diferenças existentes entre o ambiente real em que se pretende o uso do medicamento e o projetado nos animais. Por este motivo, não existem bons modelos animais ideais para avaliação da segurança de ATMPs, o que dificulta o seu desenvolvimento científico (Egbert Reinhardt et al., 2013; CAT,2010; Denis Horgan et al., 2020).

9.2.7. Processo de Fabrico

Os desafios no que respeita ao desenvolvimento farmacêutico e ao processo de fabrico de um ATMP, são ainda muitos, sendo necessário o recurso a processos de fabrico robustos devidamente controlados, consistentes e adequados para o doente (Denis Horgan et al., 2020).

Os ATMPs necessitam de cumprir elevadas exigências de fabrico devido à personalização de muitas das terapias. Naqueles que envolvem o uso de células, estas células são produzidas individualmente, os vírus comportam-se de diferentes formas, o que exige condições e processos específicos, padrões consistentes, caracterização de materiais de partida, processos e infraestruturas, constituindo um desafio para os fabricantes (Alliance for regenerative medicine: recommendations for timely access to ATMPs in Europe, 2019).

A comprovação da consistência do processo de fabrico de um ATMP através da implementação de controlos adequados é muitas vezes dificultada pela ausência de ensaios de potência robustos, falta de monografias na farmacopeia para as matérias-primas, falta de pessoal bem treinado para o fabrico e falta de tecnologia o que leva à necessidade de desenvolvimento de novos procedimentos para produções mais consistentes (Denis Horgan et al., 2020).

Para as terapias génicas, a purificação do vírus pode ser um constrangimento por ausência de processos de purificação mais eficientes e elevados custos de produção envolvidos, principalmente quando se passa para um aumento da escala também é um desafio a considerar juntamente com os elevados custos de produção que estão envolvidos (Denis Horgan et al., 2020).

9.3. Elaboração de um Pedido de AIM

Para obter a AIM de um ATMP, tal como acontece com todos os outros medicamentos que utilizam o procedimento centralizado para a sua autorização, é necessário fornecer à EMA um conjunto de informação relativa ao medicamento (Procedimento Centralizado, EMA).

Entre as informações necessárias fornecer pelos requerentes que submetem o pedido de AIM encontram-se a referência ao grupo de doentes a que o medicamento se destina e os benefícios que causa nessa população, assim como se existe uma necessidade médica a ser preenchida, dados referentes aos aspetos de qualidade como propriedades químicas e físicas, estabilidade, pureza e atividade biológica e prova de que foi desenvolvido em conformidade com os requisitos internacionais para a produção de medicamentos, realização de ensaios pré-clínicos e de realização de ensaios clínicos, ou seja, exige-se o cumprimento de BPF, BPL e BPC. Também o mecanismo de ação, a farmacocinética e os efeitos adversos são informações cruciais para concessão de uma AIM, juntamente, com um plano de avaliação dos riscos após

o acesso ao mercado e informações acerca de possíveis estudos no pós-comercialização, tendo sempre presente que a complexidade característica dos ATMPs exige maior atenção a diversos processos para o desenvolvimento adequado (Marina López-Paniagua et al., 2021; EMA).

O *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) reúne as autoridades reguladoras de medicamentos e a indústria farmacêutica da Europa, Japão e EUA, entre outras regiões e países com o objetivo de harmonizar os aspetos de segurança, qualidade e eficácia (EMA, 2016). No âmbito da ICH foi definido como deve ser organizada a documentação a submeter às autoridades regulamentares para um pedido de AIM. Um pedido de AIM deve ser, então, organizado num *Common Technical Document* (CTD) que se divide em 5 módulos (ICH):

- Módulo 1: informação administrativa, regional e nacional, formulário de pedido de AIM, resumo das características do medicamento (RCM), folheto informativo e rotulagem propostas.
- Módulo 2: Sumário geral de qualidade e avaliação pré-clínica, juntamente com sumário e avaliação crítica clínica.
- Módulo 3: Documentação química, farmacêutica e biológica, processo de fabrico, matérias-primas e descrição do produto.
- Módulo 4: Relatórios dos ensaios toxicológicos e farmacológicos não clínicos da substância ativa e do medicamento, assim como estudos farmacodinâmicos.
- Módulo 5: Inclui dados de ensaios de farmacocinéticos, estudos de farmacodinâmica, bem como dados de eficácia e segurança clínica e relatórios dos ensaios clínicos realizados e apresentados como suporte do pedido de AIM (ICH).

Neste sentido, é importante ter presente que a complexidade dos medicamentos biotecnológicos, entre os quais ATMPs, exige diferentes considerações farmacêuticas e biofarmacêuticas durante o desenvolvimento de forma a garantir que o produto final é seguro, eficaz, demonstra reprodutibilidade no processo de fabrico e a longo prazo apresenta estabilidade (CPMP/BWP/328/99; CAT,2010).

Tendo em consideração este enquadramento regulamentar, bem como a investigação clínica a decorrer na área do GBM, a grande expectativa no tratamento deste tumor são os medicamentos de base génica, ou seja, os GTMPs. Para tal, são vários os aspetos fundamentais a ser considerados, na altura de elaborar o módulo 3 do CTD, tais como: a caracterização do vetor, caracterização dos materiais utilizados, ausência da virulência, fabrico, atributos críticos

da qualidade, contaminantes e estabilidade que são abordados detalhadamente nas secções seguintes.

9.3.1. Caracterização do Vetor

A caracterização do vetor deve incluir identificação de todos os seus componentes, características genotípicas e fenotípicas, identidade, pureza, potência, atividade biológica da sequência terapêutica, eficiência de transdução e mecanismo de ação devido à sua importância para a especificidade do GTMP (EMA/CAT/80183/2014; EMA/CAT/GTWP/671639/2008). Para todos os vetores utilizados deve ser apresentada o máximo de informação possível. Quando o vetor é um plasmídeo, a eficiência de transfeção e o número de cópias na célula devem ser descritas assim como forma e local de origem de replicação, identificação das diferentes formas do plasmídeo e a demonstração da ausência ou presença de CpG, a par da constituição do plasmídeo, transgene, gene de seleção e outras sequências que devem ser fornecidas. Para vetores bacterianos é necessário ainda descrever o isolamento, sequências de nucleótidos, funções e principais características do genoma da bactéria, sendo que não é exigida a sequenciação total, mas apenas das regiões manipuladas (EMA/CAT/80183/2014; EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

Nestes casos, os dados de sequência dos elementos terapêuticos e genéticos necessários para a seletividade/regulação/controlo bem como dados de mapeamento usando endonucleases de restrição devem ser fornecidos para complementar os dados de sequência inseridos ou excluídos para uso seguro do GTMP, garantido que não existem sequências oncogénicas conhecidas. A integridade e homogeneidade do genoma ou plasmídeo bacteriano recombinante e a estabilidade genética do vetor bacteriano e da sequência terapêutica devem ser investigadas (EMA/CAT/80183/2014).

Para bactérias transformadas, os testes devem incluir a presença das sequências de plasmídeo e elementos reguladores associados, números de cópias de plasmídeo, proporção de bactérias com e sem vetor, identidade fenotípica, identidade imunológica (incluindo os componentes bacterianos geneticamente modificados), análise das sequências terapêuticas e elementos de seletividade. A ausência de bactérias e bacteriófagos contaminantes, esterilidade fúngica e homogeneidade entre frascos de bancos de célula deve ser assegurada (EMA/CAT/80183/2014).

O mesmo tipo de informação deve ser apresentado para vetores virais à exceção de que estes exigem a sequenciação de todo o genoma viral. Para vetores virais deve ser incluído tropismo, capacidade de infetar células, virulência, capacidade de replicação, proporção de

partículas infecciosas para não infecciosas e características imunológicas e ainda o tamanho médio das partículas e agregados e os locais de inserção determinados a par do potencial de inserção e riscos associados (EMA/CAT/80183/2014; EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

Para os vetores plasmídicos de RNA e DNA vários aspetos semelhantes necessitam de ser documentados como a caracterização da identidade, integridade genética, ausência de agentes estranhos e esterilidade, para além da confirmação da sequência, presença/ausência de características específicas, como sequências CpG (EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

Para um vetor de ácido nucleico complexado, ou seja, associado a uma nanopartícula, as características do vetor, componentes de complexo e a sequência de ácido nucleico deve ser investigada, juntamente com a estrutura do complexo e interação entre os veículos e o DNA carregado negativamente (EMA/CAT/80183/2014).

O histórico de todo material biológico utilizado no fabrico do medicamento deve ser referenciado, porém quando as informações são limitadas, é avaliado o impacto dessas lacunas de conhecimento através da avaliação de risco (EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

O uso de penicilina ou outros antibióticos beta-lactâmicos durante a produção da substância ativa ou no produto final, assim como o uso de sequências de DNA não relacionadas como marcadores de seleção que podem acabar nas células geneticamente modificadas finais, deve ser evitado, por poderem gerar sensibilidade nos indivíduos (EMA/CAT/80183/2014; EMA/CAT/GTWPP/671639/2008).

Todas as modificações genéticas são consideradas etapas onde o controlo é crítico, por isso têm de ser descritas detalhadamente e validadas, sejam intencionais ou não como mutações específicas, inserções, deleções ou rearranjos para qualquer componente em comparação com as sequências naturais. Ao usar vetores de integração, a multiplicidade de infeção deve ser mantida no mínimo demonstrado como eficaz em estudos de eficiência de transdução e estudos clínicos (EMA/CHMP/VWP/141697/2009; EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

9.3.2. Caracterização dos Materiais Utilizados

Para todas as matérias-primas devem ser consideradas informações detalhadas sobre origem, processo de fabrico, controlo, caracterização, desenvolvimento do processo de fabrico, controlo de etapas críticas, validação do processo, procedimentos analíticos, estabilidade e ausência de contaminantes (EMA/CAT/GTWPP/671639/2008).

Para as diferentes matérias-primas são diferentes as exigências e por isso quando se trata de bancos de sementes de vírus deve apresentar-se testes de identidade genética e

imunológica, integridade do genoma viral, expressão de sequências, atividade biológica, ausência de agentes adventícios e vírus competentes para replicação (RCV), homogeneidade entre frascos e sequência completa dos elementos terapêuticos e reguladores (EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

Quando materiais de partida se tratam de bancos de células bacterianas devem ser testados também quanto à identidade fenotípica, genômica e imunológica, presença/ausência de sequências necessárias para o uso seguro de GTMP, nomeadamente ausência de bactérias, plasmídeos e bacteriófagos contaminantes, esterilidade fúngica e ainda homogeneidade dos stocks (EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

Para bancos de células bacterianas transformadas, os testes devem incluir a presença dos plasmídeos ou genoma contendo a sequência terapêutica e elementos reguladores, número de cópias de plasmídeo e proporção de células com ou sem plasmídeo (EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

Os bancos de células eucarióticas devem ser caracterizados no que respeita à estirpe, genotipagem/fenotipagem, pureza, número de células, viabilidade celular, verificação da estrutura plasmidal/transgênica/auxiliar, estabilidade genética, número de cópias, identidade e integridade das sequências, testes para vírus contaminantes e endógenos, ausência de bactérias e fungos, micoplasma e espiroplasma. Para as linhagens celulares comerciais devem ser apresentadas descrições detalhadas do seu projeto, construção e produção (EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

No caso de células geneticamente modificadas com potencial proliferativo, a estabilidade genética e homogeneidade deve ser elucidada, assim como mudanças no fenótipo, proliferação, diferenciação e funcionalidades devem ser discutidas, juntamente com a atividade imunológica por modificação enzimática também deve ser avaliada. A ocorrência de grandes deleções, translocações cromossômicas e outras alterações genômicas em grande escala devem ser contabilizadas (EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

Em materiais complexados, as nanopartículas usadas na produção são consideradas matérias-primas e por isso são necessárias informações sobre ensaios de qualidade e pureza assim como caracterização e comparabilidade para demonstrar equivalência entre os lotes utilizados. Adicionalmente, para ácidos nucleicos complexados é necessário abordar o impacto em termos de segurança da formação do complexo *in vivo* (EMA/CAT/80183/2014; EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

O número de cópias do vetor por célula também deve ser justificado em relação aos dados de segurança e ao uso pretendido do produto (EMA/CAT/GTWPP/671639/2008).

No caso de substâncias medicamentosas combinadas com materiais de suporte, os estudos de caracterização devem ser repetidos para a substância no estado combinado. A natureza e a força da combinação envolvida devem ser exploradas (EMA/CAT/80183/2014).

9.3.3. Ausência de Virulência

Os vetores são parte integrante das terapias gênicas, por isso é fundamental verificar ausência de patogenicidade ou existência de imunidade prévia dos doentes ao vetor. Nesse sentido, todos os acessórios virais considerados não essenciais devem ser eliminados ou ser demonstrada a incompetência de replicação, e simultaneamente é necessário reduzir a semelhança do vetor com outros agentes patogênicos humanos. Para além disto, devem ser fornecidas informações sobre os parâmetros do processo e controlos realizados para prevenir a contaminação da linha celular (EMA/CAT/80183/2014).

É importante avaliar a competência de replicação, pois o vírus pode persistir algum tempo e replicar-se, após administração do GTMP. A caracterização de qualquer agente capaz de replicação é essencial. Sempre que há RCV deve ser justificada a sua utilização, embora a sua aceitação seja apenas em condições onde seja extremamente necessário para a eficácia. Ao mesmo tempo, a ausência de RCV deve ser demonstrada com um ensaio de sensibilidade adequado e validado principalmente quando se trata de vírus da família *Retroviridae* (EMA/CAT/80183/2014; EMEA/CHMP/ICH/449035/2009).

Em casos justificados, pode ser aceitável libertar lotes de vetores com um limite superior para RCV. Nesses casos, a justificação para o limite deve incluir todos os dados não clínicos e/ou clínicos para lotes com níveis semelhantes (EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

Os testes para retrovírus passam por ensaios para avaliar a capacidade de infetar culturas de células sensíveis e estudos de espectroscopia eletrónica (EM). Se a capacidade de infetar não for detetada e nenhum retrovírus ou partículas semelhantes a retrovírus forem observados por EM ou transcriptase reversa, outros ensaios apropriados devem ser realizados para detetar retrovírus que podem ser não infecciosos (CPMP/ICH/295/95).

Para além dos riscos de patogenicidade dos vetores virais, também se deve considerar o risco de mutagénese por inserção, capaz de induzir oncogenicidade ou tumorigenicidade em humanos, assim como a capacidade de transmissão na linha germinativa (EMA/CAT/80183/2014).

O risco relativo de integração na linha germinativa relaciona-se ao tipo de vetor, dose, via, local de administração, perfil de biodistribuição, capacidade de replicação e o potencial

integrativo de cada vetor. O risco é maior quando são utilizados lentivírus e retrovírus, pois têm enzimas virais que permitem que o vetor se integre e replique (CHMP/ICH/46999 I/2006).

O teste para a presença de vetores nas gónadas deve ser feito recorrendo a PCR-Quantitativo (Q-PCR). Se não for detetado não são necessários estudos adicionais. No entanto, caso esteja presente, os animais dos ensaios pré-clínicos têm de ser estudados e se a deteção for persistente a situação deve ser discutida pela autoridade reguladora. O facto de não existirem métodos não invasivos de monitorização da expressão viral nas mulheres, a avaliação de risco deve basear-se em dados não clínicos (CHMP/ICH/46999 I/2006).

Sempre que for utilizada edição de genes deve ser totalmente caracterizada para estabelecer até que ponto o sítio alvo está corretamente editado e se ocorreram alterações não intencionais fora do alvo, como por exemplo, a utilização de ferramentas de CRISP/Cas9 deve mostrar que não são expressas fora do alvo pretendido e caso se verifique deve ser justificado (EMA/CAT/GTWPP/671639/2008).

9.3.4. Fabrico

O processo de fabrico pode afetar a qualidade e estabilidade do medicamento, por isso, todos os métodos analíticos utilizados para libertação dos lotes seja da substância ativa ou produto final devem ser validados, principalmente no que respeita à sua sensibilidade. Deve ser estabelecido um lote de referência para ser usado para padronizar os ensaios a executar na libertação e estabilidade. Para tal, devem ser estabelecidos o perfil de estabilidade e as condições de armazenamento desses lotes de referência (EMA/CAT/80183/2014; CPMP/BWP/328/99).

Qualquer variação presente deve ter em consideração a variabilidade do bioensaio utilizado para determinar a potência do produto, particularmente quando é necessário um ensaio biológico *in vivo* para esta determinação (CPMP/BWP/328/99).

Nos estudos de estabilidade, as vias de degradação incluindo os mecanismos e cinética de degradação, devem ser definidos através dos métodos adequados (CPMP/BWP/328/99).

Os resultados obtidos podem ser úteis para determinar como a formulação e as condições utilizadas no processo de fabrico e acondicionamento, incluindo aquelas relacionadas com mudanças de temperatura, pH, concentração salina, pressão, terão impacto na integridade das substâncias ativas, de forma a que a sua degradação seja minimizada (CPMP/BWP/328/99).

No fim de cada etapa do processo de fabrico, devem ser estabelecidos e desenvolvidos parâmetros analíticos (controlos em processo), que podem incluir número de passagens, taxas

de crescimento e viabilidade celular, biocarga e endotoxinas, identidade, pureza e rendimento. Não é possível usar a autoclave para esterilização deste tipo de produtos, por isso na maioria das vezes são esterilizados por filtração antes do enchimento realizado em condições de assépsia (CPMP/BWP/328/99; EMA/CAT/80183/2014).

No desenvolvimento do processo de fabrico, todos os excipientes ou diluentes utilizados na preparação do vetor têm de ser descritos e mostrar que não afetam a eficácia e segurança do vetor (EMA/CAT/80183/2014).

Deve ser feita referência à potencial degradação durante o processo de fabrico que afeta as principais propriedades do vetor, como infecciosidade, formas não infecciosas, e de plasmídeo com eficácia de transdução reduzida ou degradação de complexos de ácido nucleico por meio de, por exemplo, oxidação ou despolimerização. Ao mesmo tempo que deve ser demonstrada a capacidade do processo para remover ou inativar qualquer vírus auxiliar, híbridos ou competentes para replicação gerados ou utilizados durante o fabrico ou ainda a existência de componentes do sistema de produção que possam apoiar a sua formação (EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

Sempre que há policatiões, proteínas, polímeros ou ácidos nucleicos complexados são necessários detalhes do respetivo processo de produção, bem como dos parâmetros e controlos para todos os componentes do vetor final (EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

A descrição, documentação e resultados dos estudos de validação e/ou avaliação devem ser fornecidos para etapas críticas ou ensaios críticos usados no processo de fabrico. No final do desenvolvimento do processo, o processo de fabrico deve ser validado para demonstrar consistência (EMA/CAT/GTWP/671639/2008; ICH).

Na validação dos processos de fabrico, deve-se incluir ausência de contaminantes adventícios, enzimas modificadoras e ácidos nucleicos, remoção de partículas infecciosas, vetores livres remanescentes, eficiência de transdução ou transfeção, cópia de vetor e número, identidade, integridade e nível de expressão do transgene, estrutura e função das moléculas expressas, remoção do ácido nucleico alvo e de impurezas associadas à modificação genética (EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

É também importante que todas as interações entre os componentes devem ser investigadas e a potencial imunogenicidade deve ser retratada quando adequado (CPMP/BWP/328/99).

Em caso de mudanças no processo de fabrico, estudos de comparabilidade entre o pós e pré mudança são necessários para avaliar o impacto da diferença na segurança, eficácia e qualidade. Para alterações de elevado risco devem incluir-se controlos em processo, caracterização, testes

de libertação e estudos de estabilidade, assim como outros parâmetros de processo relevantes na comparação de pré e pós alteração (EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

Podem ser necessários estudos *in vivo* para demonstrar que quaisquer alterações no processo de fabrico não afetam o perfil de segurança e eficácia do produto quando resultados de análises físico-químicas e testes *in vitro* indicam uma mudança nas propriedades do produto (EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

9.3.5. Atributos Críticos de Qualidade (CQAs)

Durante o processo de fabrico, devem ser avaliados todos CQAs de forma a garantir a qualidade do lote. Os CQAs aparecem associados a limites aceitáveis (ICH).

A gama de CQAs deve incluir potência e identidade, infeciosidade ou eficiência de transdução *in vitro*, dados de aparência e propriedades físico-químicas, opalescência, pH, índice de refração e osmolaridade, número de partículas, esterilidade e endotoxinas. Devem ainda ser incluídas a avaliação da integridade do vetor e ensaios para excipientes críticos como albumina ou outros materiais usados na formulação, particularmente quando estes garantem a bioatividade esperada e/ou mantêm a estabilidade do vetor formulado final. Quando o produto final engloba um dispositivo médico podem ser necessários testes de libertação específicos (EMA/CAT/80183/2014).

9.3.6. Caracterização do Produto Final e Processo de fabrico

Tal como para todos os medicamentos, as propriedades físico-químicas e biológicas de um GTMP que podem influenciar o desempenho do medicamento e o seu fabrico devem ser discutidas (EMA/CHMP/ICH/167068/2004).

A caracterização da substância ativa deve incluir vários parâmetros fundamentais como: identidade e viabilidade celular das células usadas para produção do vírus no caso de terapia génica utilizando vetores virais ou de terapia génica usando células geneticamente modificadas, bem como fenótipo/morfologia celular, heterogeneidade da população celular, capacidade de proliferação e/ou diferenciação das células geneticamente modificadas, funcionalidade celular, eficiência da transdução/transfeção, sequência e integridade do transgene, estabilidade genética após proliferação e/ou diferenciação *in vitro*, identidade e atividade do produto génico expresso, número de cópias do vetor por célula, perfil de integração vetorial, eliminação de vetores/trangenes, libertação de vetores das células, RCV e possibilidade de reativação (a menos que já tenha sido demonstrado ao nível dos materiais de partida), bem como

persistência de ferramentas de edição de genes nas células e modificações genéticas no alvo e fora do alvo (EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

Juntamente com propriedades ou características físicas, químicas, biológicas ou microbiológicas da substância ativa e do produto final, os limites aceitáveis para cada característica devem ser fornecidos e demonstrado serem apropriados para garantir a qualidade desejada do produto, a qual é em primeiro lugar garantida por um adequado controlo do processo de fabrico. Os controlos do processo de fabrico devem abranger aspetos como: identidade, estabilidade, integridade genómica, número de cópias vectoriais, eficiência de transdução/transfecção, modificações dentro e fora do alvo, identidade, pureza da célula alvo, cinética de crescimento, viabilidade, temperatura, pH, bem como consumo médio de nutrientes e concentrações de metabolitos produzidos (EMA/CAT/GTWPP/671639/2008).

9.3.7. Contaminantes

Dado o elevado risco do aparecimento de impurezas, vários aspetos têm de ser abordados tais como ausência de contaminantes adventícios, ausência de enzimas modificadoras de ácidos nucleicos, remoção de partículas infecciosas, ausência de vetor livre, eficiência de transdução/transfecção, número de cópias de vetor, identidade e integridade do transgene (e outras regiões se for necessário), nível de expressão do transgene, estrutura e função da molécula expressa, remoção ou eliminação das sequências de ácido nucleico alvo quando apropriado e remoção ou redução de impurezas associadas à modificação genética (EMA/CAT/GTWPP/671639/2008).

A determinação da pureza de um GTMP recorrendo a células geneticamente modificadas deve combinar vários métodos, ou seja, a confiança de que o vírus está ausente do produto final, não será resultado apenas de testes diretos para a sua presença, mas também de uma demonstração de que o regime de purificação é capaz de remover e/ou inativar os vírus (CPMP/ICH/295/95).

A pureza destes medicamentos está relacionada com o tipo de célula, por isso, o grau de pureza deve ser definido a partir da natureza, o uso pretendido do produto e do grau de consistência do processo de produção (EMA/CAT/GTWPP/671639/2008).

Contudo, o tipo e extensão dos testes virais e estudos de remoção/inativação viral dependerão de vários fatores e devem ser considerados caso a caso. Assim, a abordagem usada pelos fabricantes para garantir a segurança viral deve ser explicada e justificada (CPMP/ICH/295/95).

Existem várias fontes de contaminação a ter em conta como: vírus do *master cell bank*, células latentes presentes que podem gerar infeção e podem ser introduzidos por derivação de linhagens celulares de animais infetados, contaminação durante o manuseamento das células ou do meio através da utilização de reagentes biológicos contaminados, vírus para indução da expressão de genes específicos que codificam uma proteína desejada, excipientes contaminados (CPMP/ICH/295/95).

As impurezas podem incluir igualmente proteínas ou DNA da célula hospedeira, vírus ou sequências auxiliares ou de empacotamento, resíduos de materiais biológicos introduzidos durante as produções como soro ou albumina bovina, antibióticos, lixiviáveis de equipamentos e materiais (ex. filtros), endotoxinas, RCV e quaisquer proteínas co-expressas com o transgene. Outras impurezas adicionais que requerem consideração podem incluir vírus híbridos no caso da produção de vetores virais, lípidos e polissacarídeos de sistemas de produção que envolvem fermentações bacterianas e RNA ou DNA cromossómico no caso de plasmídeos. Das impurezas relacionadas com o processo podem constar vetores com sequências eliminadas, rearranjadas, híbridas ou mutantes devem ser identificadas e os seus níveis quantificados. As possibilidades de sequências de DNA estranhas estarem presentes no vetor devem também ser exploradas (EMA/CAT/80183/2014).

Deve ser ainda dada especial atenção ao desenvolvimento e utilização das células para evitar a possibilidade de contaminação cruzada com outras células, vírus ou agentes adventícios. Para linhagens celulares comerciais, todos os detalhes da sua construção devem ser fornecidos, incluindo a natureza e localização do ácido nucleico viral auxiliar e as suas proteínas codificadas (EMA/CHMP/VWP/141697/2009).

O uso de materiais de origem não ruminante é o ideal, no entanto algum material dessa origem pode ser necessário na produção de medicamentos biológicos. Nestes casos a natureza e a qualidade do soro bovino utilizado influencia o produto acabado sendo um risco para a sua segurança, portanto testes de segurança viral têm de ser realizados pelo fornecedor do soro e o requerente tem de assegurar que todos os testes foram realizados convenientemente (EMA/CHMP/BWP/457920/2012).

O fornecedor do soro deve documentar o processo de colheita do material, formação e mistura de *pools* intermediários, a produção e processamento do lote final de soro. O estado de saúde do dador deve vir bem definido e documentado, assim como é fundamental a rastreabilidade. O certificado deve conter o número do catálogo, número de lote, o país de origem dos animais, volume final do lote, data de fabrico e o prazo de validade, e ainda demonstrar e certificar que o soro é exclusivamente de origem bovina. O teor de proteínas

séricas e as propriedades físico-químicas do soro também deverão ser indicadas juntamente com os resultados dos testes de crescimento celular. Nenhuma bactéria, fungo, micoplasma ou vírus deve ser detetado no lote final (EMA/CHMP/BWP/457920/2012).

Os testes gerais devem ser realizados em pelo menos duas linhagens celulares distintas para confirmar ausência de contaminantes. As células de controlo devem ser cultivadas com um soro previamente demonstrado livre de contaminantes virais como vírus hemadsorventes, vírus da parainfluenza 3 e agentes citopáticos como o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina ou ainda o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Por ser prevalente no soro de bovinos, a presença de BVDV deve ser testada utilizando anticorpos anti-BVDV na validação do processo de inativação viral, juntamente com a escolha de representantes de diferentes famílias virais com diferentes graus de resistência aos tipos de tratamento utilizados (CPMP/ICH/295/95; EMA/CAT/80183/2014; EMA/CHMP/BWP/457920/2012).

Uma amostra representativa de volume não processado, removida do reator de produção antes do processamento é uma das formas mais adequadas para avaliar a contaminação adventícia. Os vírus são escolhidos para serem semelhantes a possíveis contaminantes do processo de fabrico, em especial os passos de purificação, e representarem uma alargada variedade de propriedades físico-químicas a fim de testar a capacidade do processo de fabrico de eliminar o vírus. Deve justificar-se a escolha de cada vírus selecionado e ainda ser incluído um ensaio sensível e confiável que demonstre a eficiência na transdução (CPMP/BWP/268/95).

A presença de anticorpos no material de partida pode afetar o comportamento de um vírus nas etapas de partição ou inativação. Os estudos da validação da segurança viral devem levar isso em consideração. O PCR é o método mais eficaz para detetar a presença de genomas virais (CPMP/BWP/268/95).

A extensão dos estudos de validação da segurança viral necessários varia dependendo do processo de fabrico e do tipo de produto, ou seja, depende da espécie de origem do material de partida, se é material de origem variável ou definido e da estabilidade do mesmo (CPMP/BWP/268/95).

Pode ser necessário estabelecer distinção entre inativação e remoção se existir a possibilidade de que um tampão usado em mais de uma etapa de depuração possa contribuir para a inativação durante cada etapa. Se tal se verificar deve ser demonstrada se a sua atividade é temporária (CPMP/ICH/295/95).

No caso de a utilização de vetores oncolítico no GTMP, a presença de variantes moleculares e agentes adventícios merece especial atenção (EMA/CHMP/ICH/607698/2008).

Os vetores de terapia gênica que não sejam vetores bacterianos devem ser microbiologicamente estéreis, uma vez que não se pode utilizar métodos de esterilização direta (EMA/CAT/80183/2014).

Para vetores virais, o número de partículas vazias, agregados e RCV devem ser controlados. Limites de DNA plasmídico e outras impurezas também devem ser incluídas. Todos limites de impurezas devem ser justificados com respeito à segurança clínica. Quando se usa um vetor viral para transdução, o nível de partículas infecciosas no produto final deve ser determinado e mantido abaixo de um limite justificado. Ao usar transposições deve mostrar-se que o produto final está livre da atividade da transposase. Na edição de genes idealmente, as ferramentas de edição de genes não devem estar presentes no produto final, devendo ser incluídas nas especificações de liberação um ensaio para determinar a presença destas ferramentas (EMA/CAT/GTWPP/671639/2008).

Sempre que existem produtos de tecidos ovinos, caprinos ou bovinos deve também ter-se em conta a possibilidade de contaminação por agentes responsáveis por encefalopatia espongiiforme transmissível (CPMP/BWP/268/95).

Qualquer produto intermédio deve ser avaliado de acordo com o potencial contaminante, devendo por isso, ser implementado um processo de purificação eficaz de forma a eliminar ou reduzir impurezas para níveis qualificados não-clínica e clinicamente. Todas as etapas de fabrico devem ser consideradas de forma a minimizar riscos de contaminação ou promover a eliminação de contaminantes (EMA/CAT/80183/2014).

O objetivo dos estudos de validação da segurança viral é fornecer evidências de que o processo de produção irá efetivamente inativar e/ou remover vírus que estão associados ao processo de fabrico ou dos materiais de partida (CPMP/BWP/268/95).

Não é necessário validar todas as etapas do processo de fabrico na perspetiva de contribuírem para a segurança viral. A validação da segurança viral deve ser realizada num laboratório independente, pois de acordo com as BPF não é permitida a introdução de qualquer vírus nas instalações destinadas ao fabrico da substância ativa, intermediários ou produto acabado (CPMP/BWP/268/95).

Podem existir vários fatores passíveis de interferir com a da capacidade do processo de fabrico remover ou eliminar os vírus tais como: as estirpes diferentes, propriedades imprevisíveis dos vírus nativos como associações com lípidos. É possível que o vírus escapando à primeira etapa de remoção possa ser mais resistente às etapas subsequentes. A presença de vírus nativos pode afetar a partição do vírus ou a sua suscetibilidade à inativação química, mas também pode complicar o desenho do estudo ao neutralizar a infetividade. Diferenças nos

parâmetros de produção como temperatura ou teor de proteína podem produzir grandes diferenças na redução da infetividade do vírus por qualquer mecanismo (CPMP/BWP/268/95).

Uma vez que as possibilidades de aplicação de etapas de eliminação de vírus durante a produção são limitadas para muitos tipos de GTMPs, a segurança viral desses produtos deve ser garantida pela aplicação de uma combinação de medidas, como: seleção e controlo de matérias-primas e equipamentos/material, exclusão de entrada de agentes estranhos durante o processo de produção e aplicação de etapas no processo de purificação de vetores que, quando possível, fornecem capacidades de eliminação/inativação de vírus relevantes (EMA/CAT/GTWP/671639/2008).

9.3.8. Estabilidade

Não existe um perfil de estabilidade padrão por existirem poucas orientações sobre quais as especificações a cumprir para o produto ser libertado. Assim cada requerente deve delinear e justificar o perfil de estabilidade do seu produto e apresentar um protocolo detalhado para a avaliação da estabilidade da substância ativa que inclui especificações bem definidas (CPMP/ICH/138/95).

Quando são propostos prazos de validade de um ano ou menos, os estudos de estabilidade em tempo real devem ser realizados mensalmente durante os primeiros 3 meses e depois em intervalos de 3 meses. Quando o prazo de validade da substância ativa e do produto final é superior a um ano, os ensaios de estabilidade devem ser realizados de 3 em 3 meses, no primeiro ano, de 6 em 6 meses, no segundo ano, passando em seguida para uma frequência anual. Todos os lotes devem ser representativos de todas as condições a que o produto final irá ser submetido, embora possam ser usados outros recipientes, desde que utilize o mesmo sistema de fecho (CPMP/ICH/138/95).

Existem características do produto que devem ser monitorizadas nos ensaios de estabilidade como aspeto visual (cor, opacidade, tempo de dissolução), partículas visíveis, pH, testes de esterilidade e de integridade do material de acondicionamento serem realizados no início e no fim do prazo de validade estabelecido. Devem igualmente ser monitorizados em todos os pontos do protocolo de estabilidade, a concentração de aditivos ou excipientes que se possam degradar durante o período de validade do medicamento, produtos de degradação da substância ativa e potência/atividade biológica. Os dados recolhidos durante os ensaios vão permitir definir as condições de armazenamento, incluindo a temperatura e eventualmente humidade necessárias para garantir estabilidade. O recipiente selecionado deve demonstrar proteger da humidade e da luz se a substância for fotossensível. A tampa utilizada também

deve mostrar que consegue manter as condições ideais para que o produto mantenha a pureza e potência (CPMP/ICH/I 38/95).

Os dados de estabilidade devem ser obtidos nas futuras condições de conservação, ou seja, em tempo real ou a longo prazo, mas também em condições aceleradas, de stress, como temperaturas elevadas e em condições de degradação forçada relevantes para o produto de interesse, pois fornecem evidências sobre o prazo de validade e conseguem avaliar a degradação do medicamento em condições extremas de conservação, o que também é favorável para validar os testes escolhidos para integrar o protocolo de estabilidade como verdadeiros indicadores de estabilidade (CPMP/ICH/I 38/95).

O teste de potência deve fazer parte dos testes de estabilidade quando a atividade biológica do produto pode ser medida. Em alguns produtos biotecnológicos, a potência depende da conjugação da substância ativa com um segundo componente ou adjuvante. A dissociação das substâncias ativas do transportador usado em conjugados ou de adjuvantes deve ser analisada em estudos em tempo real, incluindo condições propostas para o transporte. A avaliação da estabilidade pode ser difícil devido às limitações dos testes in vitro e nestes casos pode usar-se um teste substituto (CPMP/ICH/I 38/95).

Para fins de estabilidade, os testes de pureza devem concentrar-se na determinação de produtos de degradação. Os limites de degradação aceitáveis devem ser derivados dos perfis analíticos dos lotes da substância ativa e do medicamento usado nos estudos pré-clínicos e clínicos (CPMP/ICH/I 38/95).

Sempre que forem encontradas alterações significativas na formação de produtos de degradação durante os estudos de estabilidade, deve-se considerar os riscos potenciais e a necessidade de caracterização e quantificação de produtos de degradação dentro da estabilidade de longo prazo. Todos os limites propostos devem ser justificados (CPMP/ICH/I 38/95).

Em geral, as especificações de prazo de validade devem ser derivadas das especificações de libertação, com ênfase adicional nas características indicativas de estabilidade dos testes usados para produtos de degradação. Integridade do vetor, potência biológica (incluindo capacidades de transdução) e dosagem são atributos críticos do produto que devem sempre ser incluídos nos estudos de estabilidade (CPMP/ICH/I 38/95).

No caso de produtos formulados com material associado, deve-se estudar a estabilidade do complexo formado com a substância ativa. Quando relevante, a estabilidade do medicamento após reconstituição ou descongelamento deve ser devidamente investigada, incluindo a compatibilidade com quaisquer diluentes/solventes usados na reconstituição e, se

apropriado, compatibilidade com os dispositivos usados para administração. O prazo de validade recomendado para o produto já reconstituído, diluído ou aberto deve ser justificado com dados de estabilidade obtidos em condições que simulem o uso do produto (CPMP/ICH/138/95).

Neste sentido, o foco nos GTMPs como terapias inovadoras e com eficácia demonstrada em ensaios clínicos para o GBM, combinado com as ferramentas de bioinformática pode ser útil para alcançar o tratamento eficaz da doença, uma vez que a bioinformática trouxe inúmeras vantagens que são referidas nas secções seguintes.

10. O Papel da Bioinformática na Identificação de Potenciais Alvos Terapêuticos

A bioinformática é um campo interdisciplinar que combina ciência da computação e bioestatística com ciências biológicas e biomédicas (Jason H. Moore et al., 2007).

A capacidade de sequenciar milhares a milhões de moléculas de DNA numa única máquina, juntamente com o projeto do genoma humano e o rápido desenvolvimento das tecnologias de processamento de dados estimulou a rápida ascensão da bioinformática por permitir a gestão, análise e interpretação de dados de experiências biológicas e estudos observacionais (Jason H. Moore et al., 2007; Jeff Gauthier et al., 2019; Nuno Agostinho, 2016).

A introdução de métodos computacionais para a compreensão de sistemas biológicos aumentou a magnitude dos dados acumulados em estudos envolvendo o genoma, transcriptoma ou proteoma, o que exige o desenvolvimento de novas ferramentas (Kening Li et al., 2020; Dilara Ayyildiz et al., 2019).

Os dados do perfil genético, epigenético e transcriptómico fornecem informações úteis capazes de melhorar as estratégias de tratamento do cancro, pois são conhecimento útil para orientar o caminho terapêutico de cada doente e consequentemente melhorar os resultados. As abordagens de bioinformática permitem identificar os genes envolvidos em vários tipos de cancro e facilitam o diagnóstico molecular, a classificação patológica, avaliação terapêutica, previsão da resistência à terapia e avaliação da suscetibilidade à recorrência da neoplasia, assim como trazem vantagens no cálculo de todas as combinações possíveis de forma interativa e na identificação de uma terapia combinada, ou seja, permitem chegar a combinações de fármacos com o objetivo de potenciar o sucesso do tratamento (Mingfa Liu et al., 2017; Kening Li et al., 2020; Dilara Ayyildiz et al., 2019; Yameng Wu et al., 2021).

Todo o desenvolvimento nas abordagens de bioinformática tem sido essencial na descoberta de fármacos anti-tumorais. A análise de redes biológicas, *machine learning* (ML) e análise integrada multi-ômica desempenham papéis importantes em quase todos os aspetos

de descoberta de fármacos anti-tumorais, tais como, na identificação de possíveis alvos, simulação do comportamento do fármaco num meio aquoso ou definição do sítio ativo de proteínas (Kening Li et al., 2020).

Embora as vantagens da bioinformática sejam cada vez de maior importância, existem ainda algumas limitações nomeadamente, os modelos preditivos computacionais dependerem do tipo de dados com mais semelhança com a realidade, de igual modo a combinação de vários conjuntos de dados tem potencial de desenvolver modelos preditivos mais precisos, a necessidade de validações de modelos *in silico* recorrendo a modelos animais clinicamente relevantes e obtenção de dados de doentes (Kening Li et al., 2020).

No entanto, o aumento do poder computacional e o acesso a conjuntos de dados maiores demonstram claramente a superioridade das abordagens ML sobre a abordagem estatística clássica (Furkan M. Torun et al., 2021).

Com o objetivo de ilustrar a implementação destas ferramentas na identificação de potenciais biomarcadores do GBM, nas secções que se seguem são apresentadas algumas metodologias de análise de dados obtidos a partir de dados genéticos de doentes com vista a permitir um processamento da informação gerada de forma integrada e robusta.

10.1. Materiais e Métodos

10.1.1. Dados de *Microarray*

O *Gene Expression Omnibus* (GEO) é uma plataforma aberta para armazenar dados genéticos dos doentes. Para a análise feita no âmbito desta monografia foram usados 4 conjuntos de dados de perfil de expressão, o GSE4290, GSE2223, GSE15824 e GSE4412, de forma a conferir maior robustez e consistência às conclusões (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

O GSE4290 abrange dados de expressão de amostras do Hospital Henry Ford (EUA), 23 amostras são não tumorais, mais concretamente de doentes com epilepsia e 157 amostras são tumorais (26 de astrocitomas, 50 de oligodendrogliomas e 81 de GBM) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=gse4290>).

O GSE2223 contém dados de expressão de 50 tumores cerebrais gliais e 4 amostras de cérebros saudáveis obtidos usando *microarrays* de DNA complementar (cDNA). As amostras tumorais compreendem 1 amostra de glioma astrocítico de baixo grau, 1 amostra de astrocitoma anaplásico, 2 amostras de astrocitomas pilocíticos juvenis e 31 amostras de GBM (2 amostras de GBM secundário e 2 amostras de gliossarcoma), 8 amostras

oligodendrogliais (5 de oligodendrogliomas e 3 de oligodendrogliomas anaplásicos) e 6 amostras de oligoastrocitomas anaplásicos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE2223>).

O GSE15824 é composto por 30 amostras de tumor, mais especificamente, 12 amostras de GBM primário e 3 de GBM secundário, 8 amostras de astrocitomas, 7 amostras de oligodendrogliomas e 5 linhas celulares de GBM (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE5824>).

Por último, o GSE4412 contempla 74 amostras sendo 24 amostras de glioma de grau III e 50 amostras de glioma grau IV (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE4412>).

10.1.2. Identificação dos Genes Diferencialmente Expressos (DEGs)

A análise prosseguiu com a utilização de GEO2R, uma ferramenta para identificar os DEGs em cada um dos conjuntos de dados anteriormente apresentados (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>).

10.1.3. Análise de Informação com DisGeNET

A elaboração do diagrama de Venn, recorre ao Jvenn, de forma a encontrar a lista de genes comuns entre os quatro conjuntos de dados iniciais: GSE4290, GSE2223, GSE15824 e GSE4412 (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/index.html>).

Após esta determinação foi necessário estabelecer a comparação desta lista com os resultados provenientes da pesquisa por “Glioblastoma” na plataforma DisGeNET que agrupa coleções públicas de genes e as suas variantes associadas a doenças humanas, originando uma lista de genes mais restrita (<https://www.disgenet.org/>).

10.1.4. Heatmap

Posteriormente para avaliar a expressão desses genes procedeu-se à elaboração de *heatmaps*, recorrendo ao UALCAN (Universidade de Alabama em Birmingham Portal de Análise de Dados CANcro). Assim, é possível separar os genes sobre-expressos e subexpressos, de forma a entender a influência de cada tipo de genes no GBM (<http://ualcan.path.uab.edu/>).

10.1.5. Diagramas de Venn

Após a separação dos genes de acordo com a sua expressão, por análise dos *heatmaps*, a lista de genes subexpressos e sobre-expressos foi integrada com a informação disponível no DisGeNET para o GBM, através de um diagrama de Venn, de forma a obter um número de genes ainda mais específico e o mesmo foi feito para os genes sobre-expressos (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

10.1.6. Análise de Enriquecimento de Ontologia Génica

Os genes obtidos foram analisados pela ferramenta DAVID, para encontrar as vias moleculares envolvidas na análise das amostras (<https://david.ncifcrf.gov/>).

10.1.7. Análise Integrada dos Genes

A informação foi submetida à elaboração de um hub de genes, através do STRING, para avaliar as interações entre os genes, separadamente para os genes sobre-expressos e subexpressos de forma a avaliar quais os mais relevantes e conseguir extrair a informação referente às vias moleculares envolvidas no GBM (https://string-db.org/cgi/input?sessionId=b4dvmuuhINf9&input_page_active_form=multiple_identifiers).

10.1.8. Enquadramento com as Terapias

Após todo o procedimento de análise bioinformática é importante associar as terapias disponíveis para estes alvos. Estas baseiam-se em terapias direcionadas, que utilizam o conhecimento sobre o crescimento, disseminação tumoral e as vias moleculares envolvidas para alcançar as células tumorais (Ana Beatriz Bogalho, 2019).

10.1.9. Análise de Sobrevida

A análise de sobrevida foi feita para cada um dos genes encontrados nas amostras que se revelaram mais pertinentes, recorrendo ao UALCAN, onde o valor de p-valor <0,05 foi o utilizado para identificar os genes com mais interesse para o GBM (<http://ualcan.path.uab.edu/>).

10.2. Resultados

10.2.1. Identificação dos Genes Diferencialmente Expressos

Da análise do GEO2R (GSE4290, GSE2223, GSE15824 e GSE4412) resultaram os seguintes gráficos com os DEGs de cada conjunto de dados (Figura 23). De realçar que os genes identificados a vermelho correspondem a genes sobre-expressos, os genes identificados a azul encontram-se subexpressos, enquanto que os identificados a preto não apresentam variação de expressão.

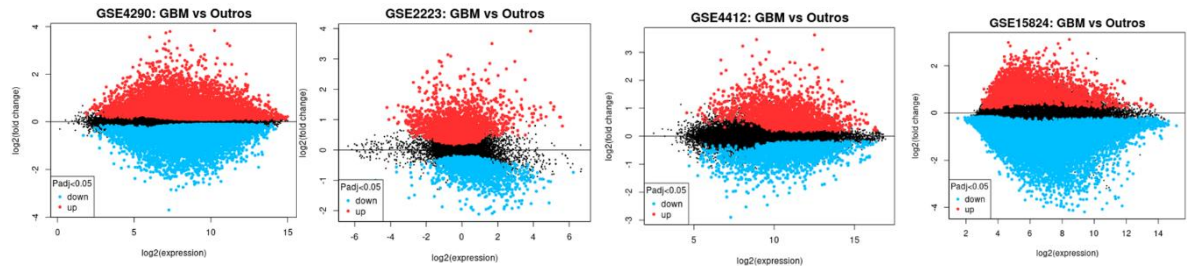


Figura 23: Expressão dos genes dos conjuntos de dados considerados.

A Figura 24 corresponde aos *heatmaps* utilizados para identificar quais os genes subexpressos ou sobre-expressos nas amostras de GBM analisadas.

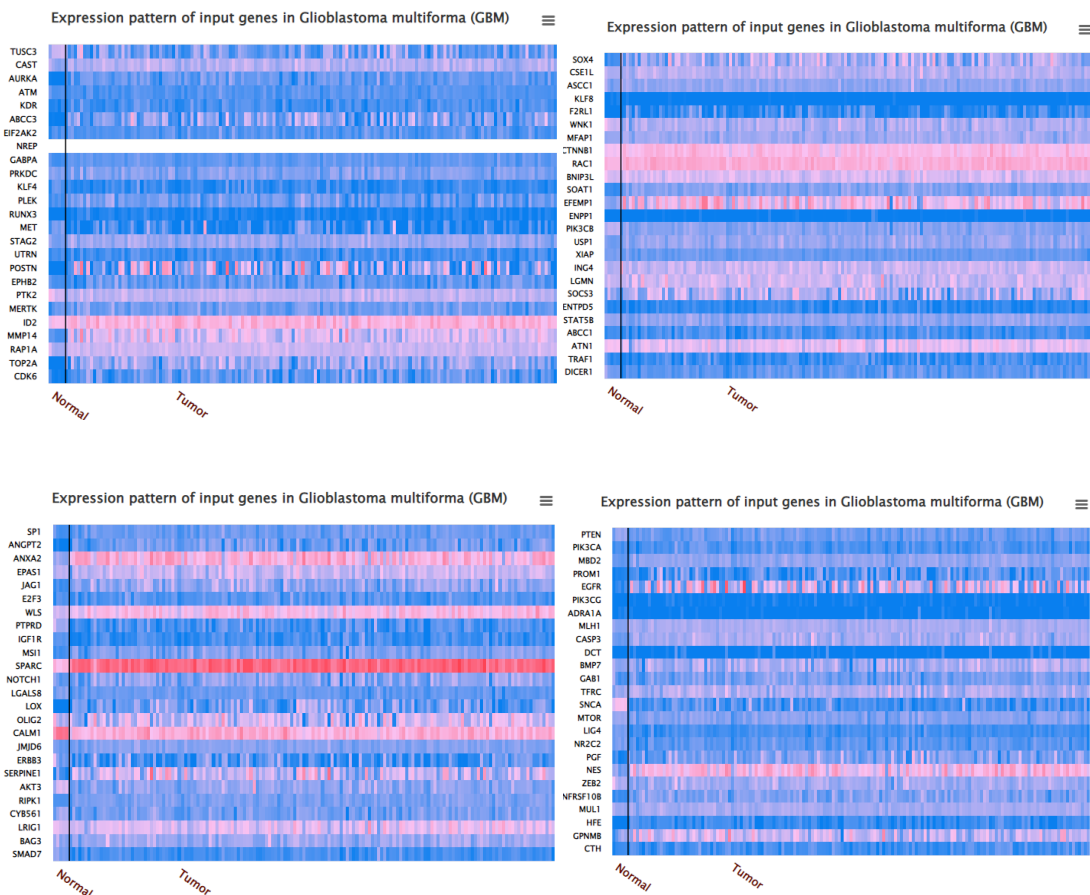


Figura 24: Heatmaps.

Após a separação dos genes de acordo com a sua expressão ilustrada pelos heatmaps procedeu-se à análise integrada com os dados disponíveis na DisGeNET, recorrendo a diagramas de Venn (Figura 25).

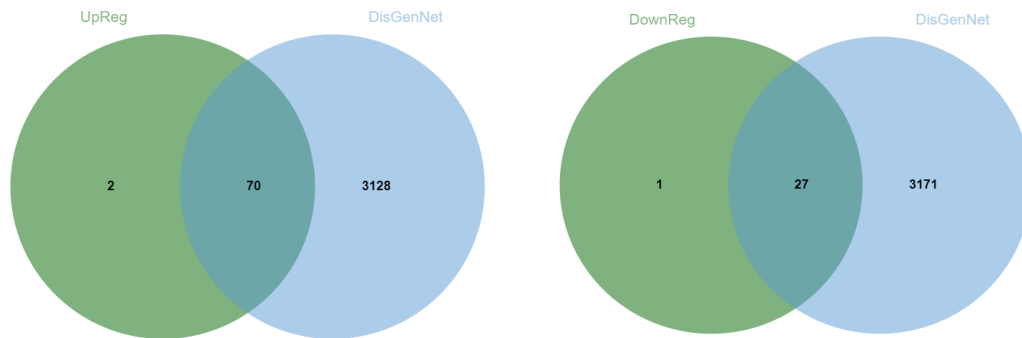


Figura 25: Diagramas de Venn.

Da análise, pode inferir-se que 70 genes se encontram sobre-expressos e 27 genes se encontram subexpressos. Esta informação foi subseqüentemente explorada, de acordo com as vias moleculares mais significativas no glioblastoma.

10.2.2. Avaliação das Vias Moleculares

A avaliação individual dos genes anteriormente reportados como mais diferencialmente expressos permitiu identificar às vias moleculares mais significativas.

As tabelas que se seguem resultam da análise realizada pela ferramenta DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>).

Tabela 3: Lista de genes subexpressos após análise pelo DAVID.

OFFICIAL_GENE_SYMBOL	Nome do gene
ADRA1A	adrenocorticoesteróide 1A (ADRA1A)
AKT3	AKT serina/treonina quinase 3 (AKT3)
ATN1	atrofina 1 (ATN1)
CALM1	calmodulina 1 (CALM1)
CYB561	citocromo b561 (CYB561)
DCT	dopacromo tautomerase (DCT)
DICER1	dicer 1, ribonuclease III (DICER1)
E2F3	Fator de transcrição E2F 3 (E2F3)
ERBB3	receptor_erb-b2_tirosina quinase 3 (ERBB3)
IGF1R	Receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina (IGF1R)
KLF4	Kruppel como fator 4 (KLF4)
KLF8	Kruppel como fator 8 (KLF8)
LGALS8	galectina 8 (LGALS8)
LIG4	DNA ligase 4 (LIG4)
CONHECEU	MET proto-oncogene, receptor de tirosina quinase (MET)
NR2C2	subfamília de receptores nucleares 2 grupo C membro 2 (NR2C2)
PIK3CB	fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase catalítica subunidade beta (PIK3CB)
PTEN	fosfatase e homólogo de tensina (PTEN)
PTK2	proteína tirosina quinase 2 (PTK2)
PTPRD	receptor de proteína tirosina fosfatase tipo D (PTPRD)
SMAD7	Membro da família SMAD 7 (SMAD7)
SNCA	sinucleína alfa (SNCA)
STAT5B	transdutor de sinal e ativador de transcrição 5B (STAT5B)
TUSC3	candidato a supressor de tumor 3 (TUSC3)
WNK1	WNK proteína quinase 1 deficiente em lisina (WNK1)
XIAP	Inibidor de apoptose ligado ao X (XIAP)
ZEB2	dedo de zinco E-box vinculativo homeobox 2 (ZEB2)

Tabela 4: Lista de genes sobre-expressos após análise pelo DAVID.

OFFICIAL_GENE_SYMBOL	Gene Name		
ABCC1	ATP binding cassette subfamily C member 1(ABCC1)	GPNMB	glicoproteína nmb (GPNMB)
ABCC3	ATP binding cassette subfamily C member 3(ABCC3)	HFE	regulador homeostático de ferro (HFE)
ANGPT2	angiotensin II(ANGPT2)	ID2	inibidor de ligação de DNA 2 (ID2)
ANXA2	annexin A2(ANXA2)	ING4	inibidor do membro da família de crescimento 4 (ING4)
ASCC1	activating signal cointegrator 1 complex subunit 1(ASCC1)	JAG1	ligante Notch canónico irregular 1 (JAG1)
ATM	ATM serine/threonine kinase(ATM)	JMJD6	domínio jumonji contendo 6_arginina demetilase e lisina hidroxilase (JMJD6)
AURKA	aurora kinase A(AURKA)	KDR	receptor de domínio de inserção de quinase (KDR)
BAG3	BAG cochaperone 3(BAG3)	LGMN	leguminosas (LGMN)
BMP7	bone morphogenetic protein 7(BMP7)	SALMÃO DEFUMADO	lisil oxidase (LOX)
BNIP3L	BCL2 interacting protein 3 like(BNIP3L)	LRIG1	repetições ricas em leucina e domínios semelhantes a imunoglobulina 1 (LRIG1)
CASP3	caspase 3(CASP3)	MBD2	proteína de domínio de ligação de metil-CoG 2 (MBD2)
CAST	calpastatin(CAST)	MERTK	Proto-oncogene MEF, tirosina quinase (MERTK)
CDK6	cyclin dependent kinase 6(CDK6)	MFAP1	proteína 1 associada a microfibrila (MFAP1)
CSE1L	chromosome segregation 1 like(CSE1L)	MLH1	mutl homólogo 1 (MLH1)
CTH	cystathionine gamma-lyase(CTH)	MMP14	metaloproteidase de matriz 14 (MMP14)
CTNNB1	catenin beta 1(CTNNB1)	MSI1	proteína de ligação de RNA musashi 1 (MSI1)
EFEMP1	EGF containing fibulin extracellular matrix protein 1(EFEMP1)	MUL1	proteína ligase 1 de ubiquitina mitocondrial E3 (MUL1)
EGFR	epidermal growth factor receptor(EGFR)	NES	nestina(NES)
EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2(EIF2AK2)	NOTCH1	receptor de entalhe 1 (NOTCH1)
ENPP1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1(ENPP1)	OLIG2	fator de transcrição de oligodendrócitos 2 (OLIG2)
ENTPD5	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5 (inactive) (ENTPD5)	PGF	fator de crescimento placentário (PGF)
EPAS1	endothelial PAS domain protein 1(EPAS1)	PIK3CA	fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase catalítica subunidade alfa (PIK3CA)
EPHB2	EPH receptor B2(EPHB2)	PIK3CG	fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase de subunidade catalítica gama (PIK3CG)
F2RL1	F2R like trypsin receptor 1(F2RL1)	PLEK	pleckstrina (PLEK)
GAB1	GRB2 associated binding protein 1(GAB1)	POSTN	periostina (POSTN)
GABPA	GA binding protein transcription factor subunit alpha(GABPA)		

PRKDC	proteína quinase, subunidade catalítica ativada por DNA (PRKDC)
PROM1	prominina 1 (PROM1)
RAC1	Família Rac pequena GTPase 1 (RAC1)
RAP1A	RAP1A, membro da família de oncogenes RAS (RAP1A)
RIPK1	serina/treonina quinase 1 de interação com o receptor (RIPK1)
RUNX3	Fator de transcrição da família RUNX 3 (RUNX3)
SERPINA1	serpina família E membro 1 (SERPINE1)
SOAT1	esterol O-aciltransferase 1 (SOAT1)
SOCS3	supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3)
SOX4	Fator de transcrição SRY-box 4 (SOX4)
SP1	fator de transcrição Sp1 (SP1)
SPARC	proteína secretada ácida e rica em cisteína (SPARC)
STAG2	antígeno estromal 2 (STAG2)
TFRC	receptor de transferrina (TFRC)
TOP2A	DNA topoisomerase II alfa (TOP2A)
TRAF1	Fator 1 associado ao receptor de TNF (TRAF1)
USP1	peptidase 1 específica de ubiquitina (USP1)
UTRN	utrofina (UTRN)
WLS	Mediador de secreção de ligante Wnt (WLS)

10.2.3. Análise Integrada dos Genes

Os hubs foram representados de forma a avaliar a interação entre os diferentes genes que através desta análise de bioinformática se concluiu estarem envolvidos no desenvolvimento do GBM.

Neste sentido, a partir dos genes representados no hub para os genes sobre-expressos (Figura 26), consideram-se como os mais relevantes por estarem relacionadas com as vias moleculares, os seguintes genes: o *Activating Signal Cointegrator 1 Complex Subunit 1* (ASCC1), *Serine/Threonine Protein Kinase* (ATM), *BCL2 Interacting Protein 3 Like* (BNIP3L), proteína morfogenética óssea 7 (BMP7), caspase 3, CDK6, EGFR, EGF, *Containing Fibulin Extracellular Matrix Protein 1* (EFEMPI), recetor EPH B2 (EPHB2), proteína I de ligação associada a GRB2

(GABI), recetor de domínio de inserção de cinase (KDR), proto oncogene e MER, tirosina cinase (MERTK), MLH1, matriz metaloproteinase 14 (MMP-14), NOTCH recetor 1 (NOTCH1), fator de transcrição de oligodendrócitos 2 (OLIG2), Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase, subunidade alfa catalítica (PIK3A), Placental Growth Factor (PGF), prominina 1 (PROM1), Rac Family Small GTPase 1 (RAC1), RAPIA, membro da família de oncogenes RAS (RAPIA), Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1 (RIPK1), supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3), SPI, fator 1 associado ao recetor de TNF (TRAF1) e mediador de secreção de ligando Wnt (WLS).

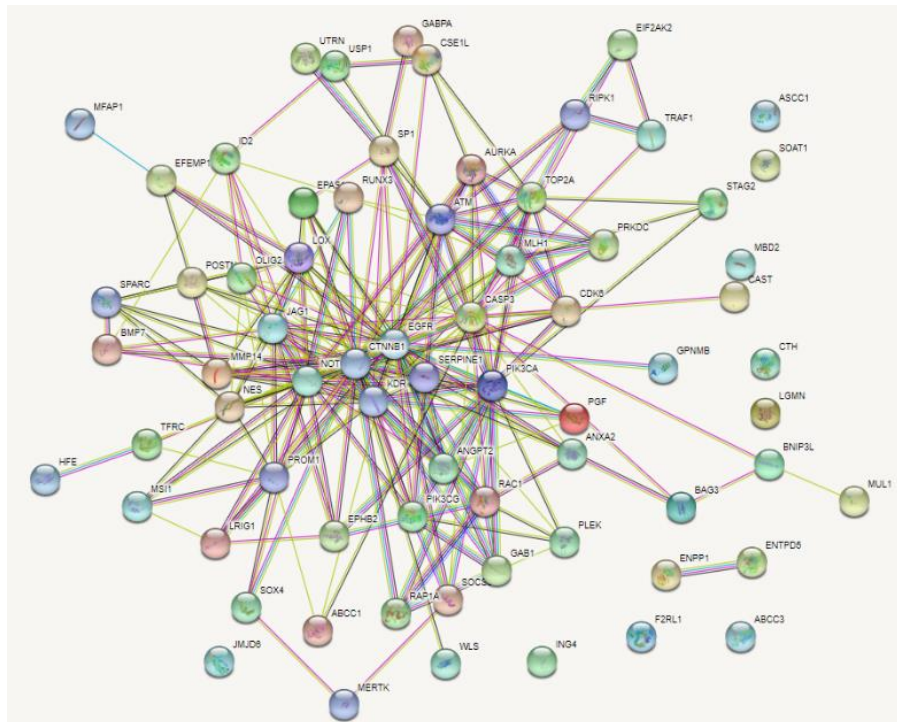


Figura 26: Hub de genes sobre-expressos no GBM.

Por outro lado, de acordo com o hub de genes da Figura 27, os genes subexpressos mais relevantes são: AKT, Serine/Threonine Kinase 3 (AKT3), E2F Transcription Factor 3 (E2F3), recetor Erb-b2 tirosina cinase 3 (ERBB3), recetor do fator de crescimento I semelhante à insulina (IGF1R), MET, PTEN, proteína tirosina cinase 2 (PTK2), transdutor de sinal e ativador de transcrição 5B (STAT5B) e Zinc Finger E-box binding Homeobox 2 (ZEB2).

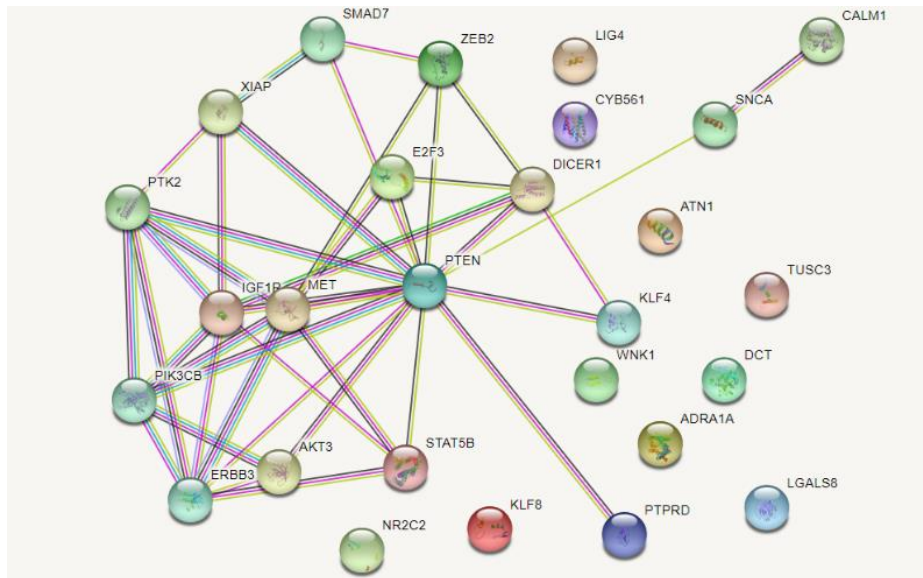


Figura 27: Hub de genes subexpressos no GBM.

Estes genes relacionam-se com vias como: MAPK8, NFK-B, Wnt, *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK), STAT, PI3K, NOTCH, p53, TGF- β , AP-1, DNA PARP, Rb, EGFR/PTEN/AKT/mTOR, MET e VEGF, as quais estão relacionadas com a diferenciação, proliferação, adesão e crescimento celular, apoptose, respostas imunológicas e a danos celulares, regulação génica pós-transcricional e correção de danos no DNA.

10.2.4. Enquadramento com as Terapias

Neste sentido, dos genes anteriormente demonstrados como envolvidos no GBM, os seguintes merecem particular destaque, devido ao facto de serem considerados alvo de inúmeros ensaios clínicos.

10.2.4.1. *Epidermal Growth Factor*

Várias categorias de fármacos têm como alvo o EGFR e o seu co-recetor o *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER2), na tentativa de serem eficazes no GBM. Como terapia de primeira geração foram testados o gefitinib, erlotinib e lapatinib e de segunda geração o afatinib, neratinib e dacomitinib. Embora os ensaios clínicos tenham provado que os inibidores de primeira geração e o erlotinib têm ação em EGFR, não apresentam qualquer efeito nas vias a jusante, consequentemente não mostraram benefícios no tratamento de GBM quando comparados com os tratamentos atualmente utilizados. Acredita-se que falta de eficácia destas abordagens se deve sobretudo à dificuldade na penetração cerebral e à baixa

especificidade por atuarem em diversos alvos tirosina cinase. (Yaning Wang et al., 2021; Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

Outra das categorias de medicamentos com ação direta ou indireta sobre o EGFR são os anticorpos monoclonais. O despatuximab é um anticorpo monoclonal que tem como alvo o EGFR ligado a um inibidor da tubulina. Os ensaios clínicos de fase I revelaram baixa toxicidade, mas estão a decorrer ensaios clínicos adicionais para a obtenção de conclusões mais consistentes (Yaning Wang et al., 2021; Shaimaa M. El-khayat et al., 2021; Ana Beatriz Bogalho, 2019).

O nimotuzumab, em ensaios clínicos de fase III, falhou nos resultados esperados para OS e PFS, embora tenha revelado alguma eficácia em doentes com o promotor MGMT não metilado (Yaning Wang et al., 2021; Shaimaa M. El-khayat et al., 2021; Ana Beatriz Bogalho, 2019).

Sabe-se que a ativação de VEGF contribui para a resistência de EGFR. Tendo em consideração este mecanismo, testou-se também o bevacizumab em combinação com erlotinib. No entanto, os resultados não mostraram benefício comparativamente ao bevacizumab em monoterapia. Outras combinações estão a ser avaliadas para perceber quais as vantagens no tratamento (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

Dentro dos ATMPs, a terapia com células T-CAR tem merecido particular destaque. Neste âmbito, encontra-se em ensaios clínicos de fase I, com recrutamento por iniciar, um tratamento com células T-CAR direcionadas para o EGFRvIII com vista a avaliar a sua eficácia e segurança no tratamento de doentes com doença leptomeníngea de GBM. A administração das células T EGFRvIII-CAR aos doentes pode ajudar a reconhecer e destruir as células tumorais (NCT05063682, clinicaltrials.gov.pt).

Um outro ensaio clínico de fase I com células T-CAR, em recrutamento, tem como objetivo acompanhar a eficácia e segurança a longo prazo em doentes com GBM recém-diagnosticado ou recorrente tratados com células T CARv3-TEAM-E. As células T CARv3-TEAM-E resultaram de linfócitos T traduzidos por um lentivírus que codifica um CAR direcionado ao antígeno EGFRvIII acoplado a células T selvagem (NCT05024175, clinicaltrials.gov.pt).

Apesar das dificuldades ainda registadas, os resultados têm sido promissores em relação à infiltração de células T-CAR, embora os efeitos no crescimento e recorrência sejam pouco conclusivos (Tresa McGranahan et al., 2019).

Os desafios passam por superar a proliferação e persistência das células T, o ambiente imunossupressor tumoral e ainda a identificação dos antígenos específicos do tumor, portanto

mais investigações são necessárias para perceber como melhorar a sobrevivência (Thomas Daubon et al., 2020; Boyuan Huang et al., 2021).

A solução pode passar por considerar vários antígenos como alvos, de forma a obter uma resposta mais robusta (Boyuan Huang et al., 2021).

Também em ensaios clínicos está a vacina *Rindopepimut*, uma vacina direcionada a EGFRvIII que por ser exclusivamente expresso em GBM reduz a toxicidade. No entanto, não é expresso em todos os doentes, o que restringe a sua utilização. Em ensaios clínicos de fase III, comparativamente à TMZ em monoterapia, mostrou uma diminuição no volume tumoral, mas sem benefícios clínicos, o que levou à interrupção do ensaio clínico. A perda de expressão de EGFRvIII, juntamente com células inunológicas infiltradas como macrófagos e neutrófilos que promovem a resistência à terapia anti-angiogénica em vários tumores, também dificulta a durabilidade da resposta. Estudos mais recentes mostraram que mais investigações são necessárias para determinar a população ideal e também o regime de tratamento (Abigail L. Mende et al., 2021; Ravi Medikonda et al., 2020; Boyuan Huang et al., 2021).

Também o alvo HER2, expresso em 80% dos casos de GBM, mostrou ser promissor, como foi anteriormente mencionado. No entanto, por ser expresso também em células saudáveis, acrescenta risco de toxicidade fora do alvo terapêutico (Boyuan Huang et al., 2021).

Não obstante, está em curso um ensaio clínico de fase I para avaliar os efeitos secundários e a melhor dose de células T de memória no tratamento de doentes com glioma grau II-IV recorrente ou refratário, recorrendo a células T traduzidas para expressar um recetor quimérico 41BB, co-estimulador específico para HER2 e um *Cluster of Differentiation 19* (CD19) truncado. Os resultados são esperados em dezembro de 2023 (NCT03389230, clinicaltrials.gov.pt).

10.2.4.2. Via MAPK

A via MAPK também tem sido objeto de interesse, pois apenas uma pequena proporção dos GBMs abriga mutações em BRAF. Um exemplo desta abordagem é o sorsfenib, um inibidor da *Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase* (RAF) que mostrou eficácia limitada (Alexander Ou et al., 2021).

Outros exemplos são a ezastaurina que tem como alvo as vias diretamente relacionadas com MAPK, PKC e PI3K/AKT, podendo suprimir a proliferação celular e angiogénese. Em ensaios clínicos de Fase III, comparou-se a eficácia e segurança da combinação com lomustina em doentes com GBM recorrente, não estando os resultados ainda disponíveis (Yaning Wang et al., 2021).

O gene BRAF, membro da família RAF, é um oncogene e o seu produto proteico desempenha um papel importante na proliferação, diferenciação, apoptose e sobrevivência celular. Está presente em 5% dos casos de GBM (Kenneth Aldape et al., 2015).

A mutação BRAF/V600E é muito comum no SNC. A sua inibição pode prevenir a ocorrência e progressão de tumores. Com isto em vista, o vemurafenib foi avaliado num ensaio clínico de fase II, no entanto o desenho do estudo apresenta limitações que dificultam a chegada a uma conclusão (Yaning Wang et al., 2021).

Também se depositam esperanças noutros inibidores, nomeadamente o dabrafenib e o trametinib em coadministração (Yaning Wang et al., 2021).

Por se ter verificado que inibidores de BRAF podem causar resistência tumoral têm sido estudadas combinações com outros inibidores direcionados para a *Mitogen-activated Protein Kinase* (MEK), o que mostrou ser promissor (Yaning Wang et al., 2021).

10.2.4.3. Placent Growth Factor

O PGF está diretamente relacionado com a via do PDGFR, tendo sido identificados vários agentes com ação nesta via considerada promissora no tratamento do GBM.

Um exemplo de um inibidor direcionado ao PDGFR, é o imatinib. A sua atividade em GBM foi avaliada em ensaios clínicos. No entanto, o crescimento do tumor e a OS permaneceram sem alteração, seja em monoterapia ou em combinação com outros agentes terapêuticos, como a hidroxiureia. Recentemente, estudos *in vitro* mostraram que o imatinib aumenta a migração e invasão de células do GBM, o que explica a ausência de eficácia do fármaco (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

O desatinib, nintedanib e sunitinib também foram avaliados, mas os resultados não foram os expectáveis embora, o sunitinib esteja a ser alvo de mais ensaios clínicos de forma a perceber o seu potencial terapêutico quando combinado com outros agentes alquilantes (Ana Beatriz Bogalho, 2019).

10.2.4.4. Fator de Transição Epitelial Mesenquimal

O MET é um membro da família tirosina cinase e juntamente com o seu ligando, o HGF, estabelece a via HGF/MET. Esta via está desregulada em tumores e com a sua ativação anormal são promovidas a proliferação e sobrevivência do tumor. Deste modo, a inibição desta via pode ser potencial para a terapia (Yaning Wang et al., 2021).

O onartuzumab é um fármaco anti-MET que, num ensaio clínico de fase II já concluído (NCT01632228), foi administrado em combinação com bevacizumab, não tendo mostrado nenhum benefício, para além de se ter verificado efeitos adversos. No entanto, os dados apontam para que sejam os doentes com metilação no promotor MGMT aqueles que mais poderão beneficiar da terapia (Yaning Wang et al., 2021).

Apesar dos dados não terem demonstrado benefício clínico significativo, quando os investigadores agruparam os doentes de acordo com os biomarcadores, a vantagem do fármaco foi mais evidente, realçando a importância dos biomarcadores nos critérios de inclusão em ensaios clínicos, para que as conclusões possam ser consistentes (Yaning Wang et al., 2021).

10.2.4.5. Tumor Necrosis Factor Receptor I

O TNRF1 é um recetor da família de TRAF1 que está a ser alvo de um ensaio clínico de fase II, NCT04406272, usando o ofranergene obadenovec (VB-111), uma terapia génica, para o GBM recorrente ou progressivo (Andrew J. Brenner et al., 2020).

O VB-111 é um AAV não replicante que transporta um transgene Fas-quimera pró-apoptótico humano (Fas e TNRF1) sob o controlo de um promotor de pré-proendotelina murino modificado (PPE-1-3x). Tem como alvo a expressão do recetor de morte celular Fas-quimérico para vasos sanguíneos angiogénicos, levando à apoptose direcionada desses vasos, portanto, foi projetado para interromper a neovascularização independentemente das vias de sinalização pró-angiogénicas utilizadas pelos tumores, ultrapassando a dificuldade que pode ser estabelecida pelos mecanismos de resistência inerentes que se geram. Além disso, o VB-111 promove a ativação intra-tumoral específica do sistema imunológico, induzindo assim uma resposta imune anti tumoral que inclui a infiltração tumoral de células T CD4 e CD8 (Andrew J. Brenner et al., 2020).

Os resultados dos ensaios clínicos são bastante satisfatórios com VB-111 em monoterapia e também em combinação com bevacizumab com benefício significativo de OS e PFS, perfil de segurança favorável e uma resposta radiológica típica (Andrew J. Brenner et al., 2020).

10.2.4.6. Substrato do Recetor de Insulina I (IRS-1)

O IRS-1, um substrato de IGF1R, está a ser estudado num ensaio clínico de fase I, em recrutamento, com o objetivo de obter informações de segurança em pequenos grupos de

indivíduos, que receberam vírus HSV geneticamente modificado para que o gene IRS-1 aumente a resposta imune ao tumor (NCT03657576, clinicaltrials.gov).

10.2.4.7. Fator de Crescimento Endotelial Vascular

O VEGF está diretamente relacionado com PGF. Sendo o GBM um tumor altamente vascularizado, o VEGF é um alvo a ter em consideração, especialmente, o fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGF2) (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

Com isto em vista, são vários os agentes terapêuticos que foram avaliados em ensaios clínicos, tais como o vatalanib e sorafenib que têm um demonstrado um efeito reduzido tanto em combinação com quimioterapia e radioterapia como em monoterapia, mas não o suficiente para que possam ser consideradas terapias viáveis (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

Outro exemplo é o tivozanib que apesar de mostrar efeitos anti-angiogénicos, não tem mostrado resultados favoráveis na alteração do volume do tumor (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

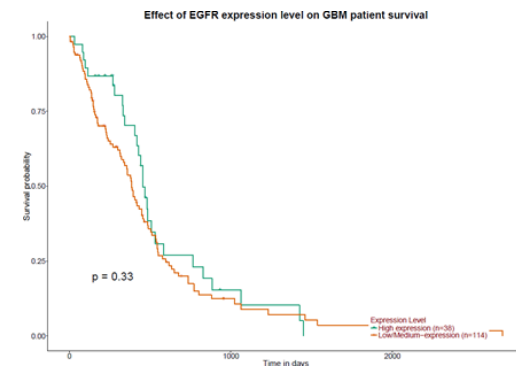
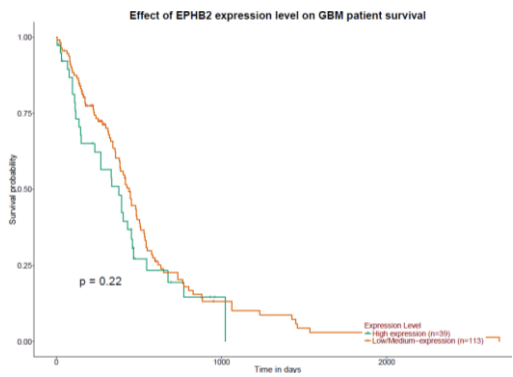
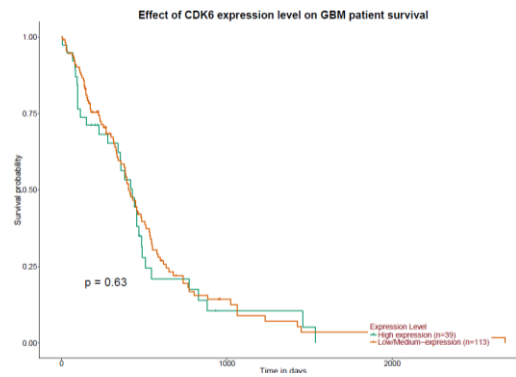
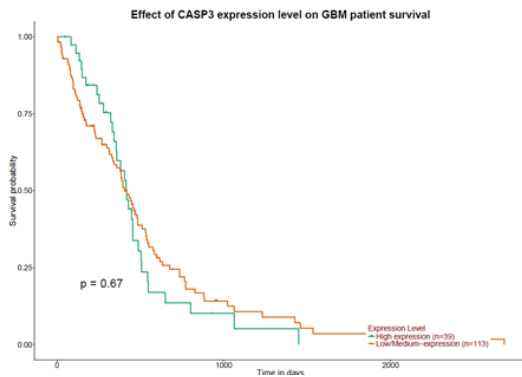
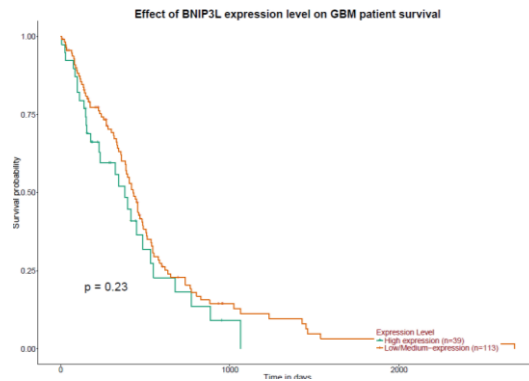
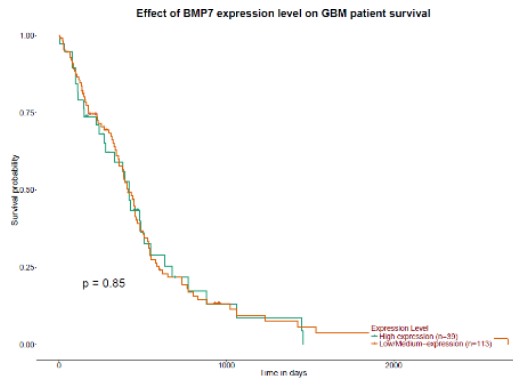
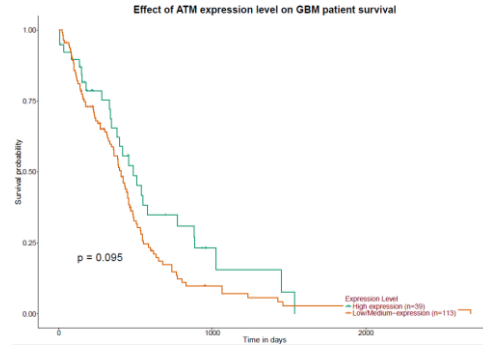
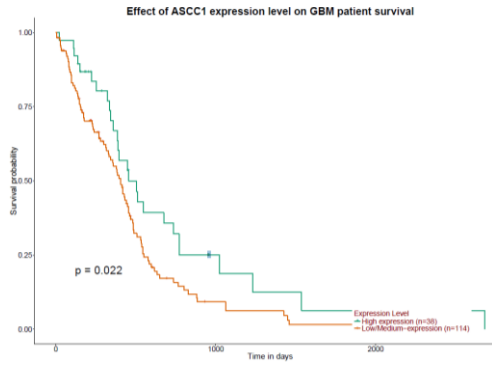
Os mesmos resultados insatisfatórios foram reportados em combinações de pazopanib e lapatinib. O mesmo se verificou com o cediranib que mostrou uma pequena melhoria no estado neurológico dos doentes, no entanto, a PFS e a OS permaneceram inalteradas comparativamente ao grupo controlo (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021; Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

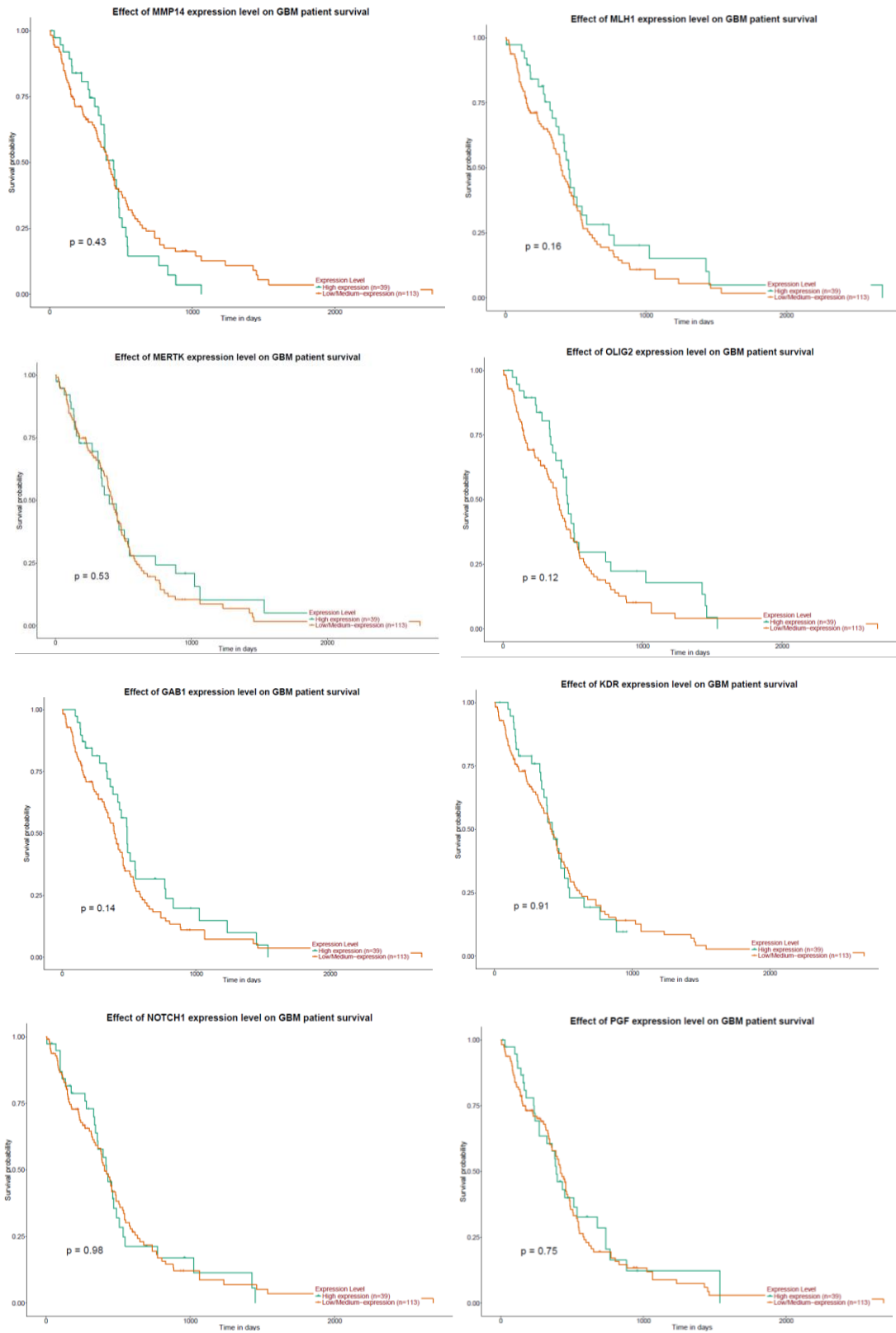
Vários estudos sugerem que a modificação da via de sinalização de FGFR estimula a progressão de GBM, o que tem motivado a avaliação de vários fármacos foi avaliada em ensaios clínicos. Exemplos disso são o lenvatinib, ponatinib, dovitinib que atuam em múltiplas cinases relacionadas com o VEGF. Estudos *in vitro* mostraram ser capazes de suprimir o crescimento do tumor comparativamente com a TMZ. No entanto, são ainda necessários mais resultados que comprovem a utilização destes fármacos (Shaimaa M. El-khayat et al., 2021).

O regorafenib inibe a angiogénese e a proliferação celular ao interagir com VEGFR, PDGFR, FGFR, o recetor de angiopoietina 2 (TIE-2), fator de leucemia 1 e o gene BRAF. Apesar de aprovado nos EUA e na UE para outros tumores, ensaios clínicos em curso para o GBM mostram resultados promissores, porém existindo algumas desvantagens, nomeadamente efeitos adversos importantes (Yaning Wang et al., 2021).

10.2.5. Análise de Sobrevida

A Figura 28 contém as curvas de Kaplan-Meier, de sobrevivência relativas aos genes sobre-expressos considerados relevantes após a análise bioinformática.





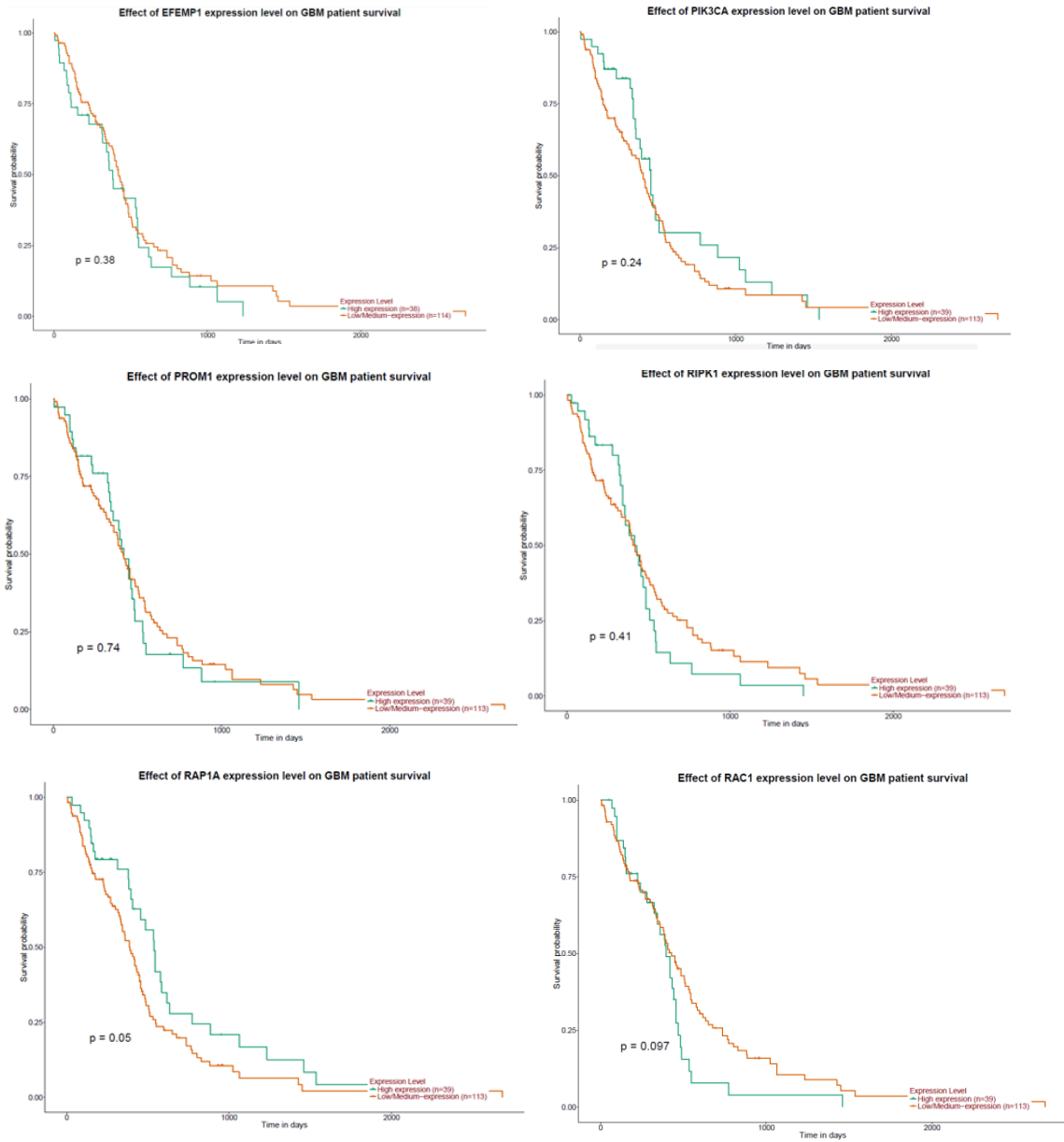
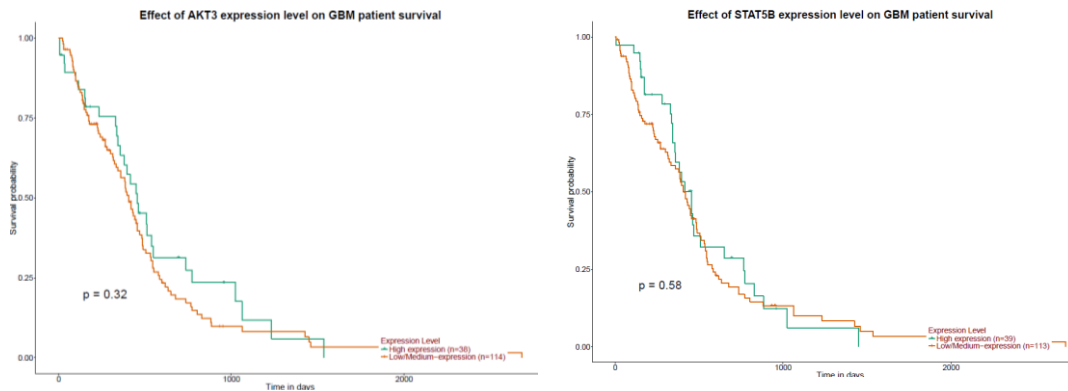


Figura 28: Curvas de Kaplan-Meier para os genes sobre-expressos no GBM.

A Figura 29 contém as curvas de Kaplan-Meier de sobrevivência para os genes subexpressos.



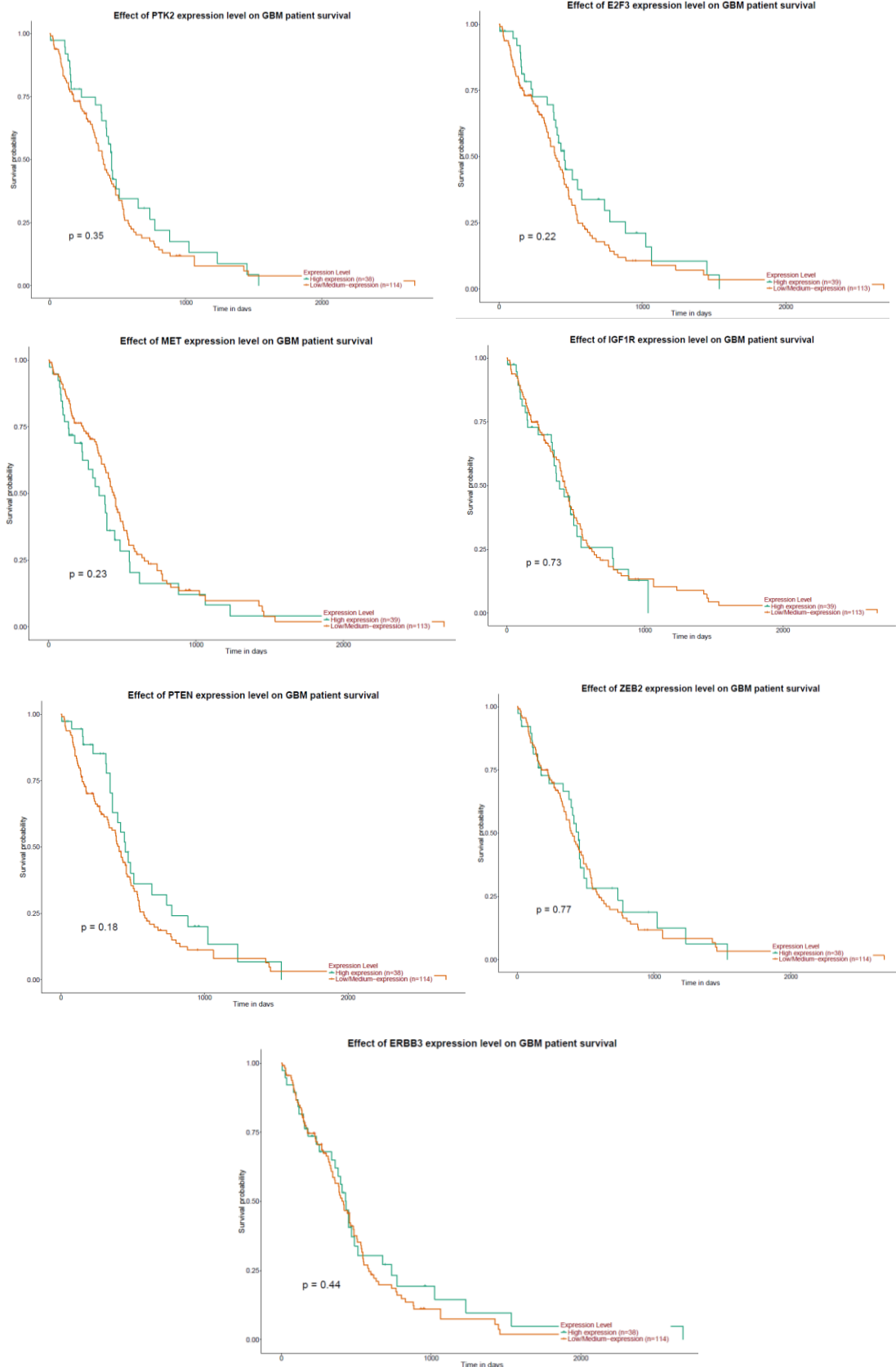


Figura 29: Curvas de Kaplan-Meier para os genes subexpressos no GBM

As curvas de Kaplan-Meier permitem-nos comparar os diferentes genes em relação à sobrevivência e de acordo com o valor p excluir todos os genes que não podem ser considerados possíveis alvos para o GBM, por não serem estatisticamente significativos. Assim

após a avaliação das curvas de sobrevivência, apenas três genes são considerados estatisticamente significativos, por apresentarem um p-valor inferior a 0,05. Todos são sobre-expressos no GBM: ASCCI, RAPIA e SOCS3. A sobre-expressão de ASCCI mostrou-se relacionada com o aumento da OS do doente, assim como RAPI, contrariamente a SOCS3, em que a subexpressão da proteína revela ser favorável para o aumento da OS dos doentes. Portanto, apenas ASCCI, RAPIA e SOCS3 podem ser considerados alvos promissores para utilização no tratamento do GBM.

II. Conclusão e Perspetivas Futuras

Apesar dos esforços conduzidos para tratar o GBM com eficiência, atualmente, não existem terapias capazes de o fazer, uma vez que os doentes apresentam frequentemente recorrência após 6 meses do tratamento, sendo o GBM considerado incurável.

Várias razões podem ser enumeradas como causas do insucesso terapêutico: ausência de especificidade dos fármacos disponíveis e desenvolvimento de mecanismos de resistência pelas células tumorais, natureza heterogénea e agressiva do tumor, existência de barreiras biológicas que limitam o acesso e acumulação dos agentes terapêuticos na biofase (cérebro), ausência de alvos/biomarcadores robustos, altamente necessários para o sucesso da medicina de precisão para que se possam selecionar doentes capazes de beneficiar dos tratamentos, bem como e o estabelecimento de desenhos de ensaios clínicos que tenham em consideração esses biomarcadores.

Os obstáculos na identificação de alvos terapêuticos são, sobretudo, a falta de especificidade por estarem envolvidos em vários processos fisiológicos e patológicos. No entanto novas abordagens, incluindo o estabelecimento de ensaios clínicos que envolvam vários braços visando a triagem de múltiplos alvos, podem favorecer a identificação de biomarcadores mais sensíveis e específicos.

A deteção de ácidos nucleicos circulantes e a análise de vários parâmetros baseados em espetrometria de massa são as abordagens mais promissoras a serem utilizadas por apresentarem várias vantagens como a elevada especificidade, capacidade de caracterizar o estado do doente, discriminar a transformação neoplásica e identificar o subtipo molecular.

No futuro, a combinação de vários biomarcadores pode ser bastante útil e, nesse sentido, devem ser consolidadas as investigações já efetuadas.

Apesar dos vários ensaios clínicos já realizados, a identificação de terapias eficazes é complexa e apresenta algumas limitações ao sucesso das terapias, nomeadamente no desenho do ensaio clínico, incluindo o viés de seleção, o reduzido tamanho da amostra e a heterogeneidade da doença, causada pela presença de diferentes subpopulações celulares, assim como, a agressividade e crescimento tumoral.

É importante também pensar que os regimes posológicos e as vias de administração das terapias são essenciais para o subsequente sucesso. A via intranasal pode ser usada na administração do fármaco por estar diretamente relacionada com as regiões intracranianas e por garantir melhor distribuição e menos efeitos adversos graves.

Outro aspeto importante está relacionado com a população pediátrica, pois enquanto nos adultos se sabe quais as vias moleculares envolvidas no aparecimento da doença, nas

crianças não acontece o mesmo. Sabe-se que se encontram envolvidos no desenvolvimento de GBM em crianças a mutação em ATRX, presente em 44% dos casos em pediatria, mutações somáticas recorrentes em H3F3A (*H3 Histone, Family 3A*), um gene que codifica a variante H3.3 da histona 3 que originam alterações nos aminoácidos, amplificação de PDGFRA, ganho do cromossoma 7 e ainda perdas no cromossoma 10.

Nos adultos, as perdas de cromossomas acontecem em 9q, 22q, 13q, 14q e 6q, já os ganhos ocorrem nos cromossomas 19 e 20, assim como a mutação TERT que aparece de forma menos frequente em pediatria, é bastante recorrente nos adultos.

Neste sentido, a bioinformática tem vindo a abrir novos caminhos na identificação de vias moleculares e biomarcadores promissores permitam fazer a monitorização dos tratamentos ou a triagem dos doentes. Cada vez mais os biomarcadores ómicos conferem robustez, sensibilidade e confiabilidade à previsão de respostas a medicamentos, diagnóstico precoce, diagnóstico diferencial ou prognóstico do curso da doença, mas também a orientar as decisões de tratamento e adequação das terapias às populações adequadas, com vista a aumentar as taxas de sucesso e reduzir os custos dos tratamentos, numa era em que cada vez mais se verificam os benefícios da medicina de precisão e por isso esta é também um grande aliado no tratamento do GBM.

A necessidade de um tratamento eficaz para o GBM é real. Com isto em mente, os cientistas acreditam que sejam as GSCs as principais responsáveis pela recorrência, por isso as vias responsáveis pela sua manutenção, nomeadamente a via de sinalização NOTCH e Wnt/ β -catenina, têm sido alvo de várias investigações com o objetivo de impedir o reaparecimento do tumor. Desta forma pensa-se que o futuro passa por ter em conta este aspeto que parece ser uma excelente solução para o GBM.

Outras possibilidades de terapia passam pela combinação de inibidores VEGF com terapia génica, que já se encontra em avaliação em ensaios clínicos.

Outro desafio é a distribuição no SNC. Para tentar contornar estes obstáculos, a administração promovida por convecção (CED) é considerada bastante promissora, pois permite a entrega local de moléculas de elevada massa molecular através de um cateter de pequeno calibre inserido no crânio. Baseia-se em impulsos por pressão para que o fluido seja empurrado através do espaço intersticial, não causando edema cerebral e não sendo afetado pela perda capilar ou metabolismo da macromolécula. No entanto, ainda são necessários progressos.

Outra estratégia possível para contrariar as limitações é a sinergia entre a radioterapia e quimioterapia. Pensa-se que a radioterapia induz necrose tumoral e libertação de antigénios,

uma vez que a radiação aumenta a TMB, consequentemente mais antígenos são desenvolvidos, sendo a apresentação de antígenos aumentada e a resposta imunológica anti-tumoral mais robusta. Foi observado também que a radioterapia hipofracionada induz imunossupressão e por isso é considerada um melhor complemento à imunoterapia

Têm sido também desenvolvidas outras estratégias como a eletroporação irreversível de alta frequência (H-FIRE) e o ultrassom focado de alta intensidade (HIFU). Enquanto que na primeira a membrana celular sofre eletroporação, ou seja, ocorre transformação fisiológica causada por campos elétricos na membrana, abrindo poros que permitem a entrega, por exemplo, de material genético, o HIFU baseia-se no fornecimento de energia acústica de elevada intensidade numa área localizada do corpo, promovendo um aumento da temperatura local. Consegue remover o tecido tumoral e apesar de não atravessar o crânio, porque os ossos absorvem as ondas, o HIFU traz enormes benefícios como o menor risco de sangramento e de danos noutras partes do cérebro, tratando-se de uma cirurgia não invasiva.

Relativamente à imunoterapia, quando utilizada como agente único pode não ser suficiente para contornar a imunossupressão no GBM. Portanto, as atenções concentram-se sobretudo em explorar alternativas que passam pela combinação de terapias e na seleção dos doentes de acordo com as suas características.

Os ATMPs surgem na vanguarda da inovação e trouxeram alguma esperança face à terapia tradicional, pois conseguem superar muitas destas barreiras. Desta forma, para que cheguem ao doente é necessário haver acompanhamento por parte das autoridades reguladoras, uma vez que os requisitos regulamentares devem adaptar-se à novidade que os ATMPs representam, de forma a conseguirem dar resposta a todas as etapas do desenvolvimento do medicamento, mas também à variabilidade relacionada com a fonte dos materiais biológicos. Ao mesmo tempo, a rapidez no progresso na área das terapias avançadas exige um rápido desenvolvimento regulamentar para poder acompanhar a inovação. Também as entidades financiadoras devem focar-se nos benefícios demonstrados, pois apesar de todas as dúvidas que os ATMPs ainda geram, também já revelaram ser soluções vantajosas e bastante válidas no tratamento de necessidades médicas não satisfeitas.

O futuro passará certamente pela combinação de estratégias ómicas de forma a facilitar o desenvolvimento do medicamento, juntamente com o foco em terapias cada vez mais inovadoras, de forma a aumentar a eficácia e prolongar e melhorar a qualidade de vida dos doentes.

12. Referências Bibliográficas

1. JESSEN, Kristjan R. - **Glial cells**. International Journal of Biochemistry and Cell Biology. ISSN 13572725. 36:10 (2004) 1861–1867. doi: 10.1016/j.biocel.2004.02.023.
2. LOUIS, David N. et al. - **The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary**. Acta Neuropathologica. ISSN 14320533. 131:6 (2016) 803–820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
3. TAMIMI, Ahmad Faleh; JUWEID, Malik - **Epidemiology and Outcome of Glioblastoma**. Glioblastoma. 2017) 143–153. doi: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch8.
4. JIANG, Lei et al. - **Association between the XRCCI Polymorphisms and Glioma Risk: A Meta-Analysis of Case-Control Studies**. PLoS ONE. ISSN 19326203. 8:1 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0055597.
5. ALDAPE, Kenneth et al. - **Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers**. Acta Neuropathologica. ISSN 14320533. 129:6 (2015) 829–848. doi: 10.1007/s00401-015-1432-1.
6. SCHIFFER, Davide et al. - **Glioblastoma cancer stem cells: Basis for a functional hypothesis**. Stem Cell Discovery. ISSN 2161-6760. 02:03 (2012) 122–131. doi: 10.4236/scd.2012.23017.
7. LOPES ABATH NETO, Osorio; ALDAPE, Kenneth - **Morphologic and Molecular Aspects of Glioblastomas**. Neurosurgery Clinics of North America. ISSN 15581349. 32:2 (2021) 149–158. doi: 10.1016/j.nec.2021.01.001.
8. OHGAKI, Hiroko; KLEIHUES, Paul - **Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma**. American Journal of Pathology. ISSN 00029440. 170:5 (2007) 1445–1453. doi: 10.2353/ajpath.2007.070011.
9. MONDESIR, Johanna et al. - **IDH1 and IDH2 mutations as novel therapeutic targets: Current perspectives**. Journal of Blood Medicine. ISSN 11792736. 7:2016) 171–180. doi: 10.2147/JBM.S70716.
10. YAN, Hai et al. - **IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas**. The New England Journal of Medicine. 360(8) (2009) 765–773. doi:10.1056/NEJMoa0808710.

11. MIRANDA, Ana et al. - **Breaching barriers in glioblastoma. Part I: Molecular pathways and novel treatment approaches.** International Journal of Pharmaceutics. ISSN 18733476. 531:1 (2017) 372–388. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.07.056.
12. NOUSHMEHR, Houtan et al. - **Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma.** Cancer Cell. 17:5 (2011) 510–522. doi: 10.1016/j.ccr.2010.03.017.
13. FRATTINI, Veronique et al. - **The integrated landscape of driver genomic alterations in glioblastoma.** Nature Genetics. ISSN 10614036. 45:10 (2013) 1141–1149. doi: 10.1038/ng.2734.
14. MATA, Douglas A. et al. - **Genetic and epigenetic landscape of IDH-wildtype glioblastomas with FGFR3-TACC3 fusions.** Acta neuropathologica communications. ISSN 20515960. 8:1 (2020) 186. doi: 10.1186/s40478-020-01058-6.
15. POPESCU, Alisa Madalina et al. - **Targeting the VEGF and PDGF signaling pathway in glioblastoma treatment.** International Journal of Clinical and Experimental Pathology. ISSN 19362625. 8:7 (2015) 7825–7837.
16. PAULSSON, Janna; EHNMAN, Monika; ÖSTMAN, Arne - **PDGF receptors in tumor biology: Prognostic and predictive potential.** Future Oncology. ISSN 17448301. 10:9 (2014) 1695–1708. doi: 10.2217/fon.14.83.
17. REARDON, David A.; WEN, Patrick Y.; MELLINGHOFF, Ingo K. - **Targeted molecular therapies against epidermal growth factor receptor: Past experiences and challenges.** Neuro-Oncology. ISSN 15235866. 16:January (2014) viii7–viii13. doi: 10.1093/neuonc/nou232.
18. ZUCCARINI, Mariachiara et al. - **The role of wnt signal in glioblastoma development and progression: A possible new pharmacological target for the therapy of this tumor.** Genes. ISSN 20734425. 9:2 (2018) 1–21. doi: 10.3390/genes9020105.
19. JIMENEZ-PASCUAL, Ana; A. SIEBZEHRUBL, Florian - **Fibroblast Growth Factor Receptor Functions in Glioblastoma.** Cells. 8:7 (2019) 715. doi: 10.3390/cells8070715.
20. SASMITA, Andrew Octavian; WONG, Ying Pei; LING, Anna Pick Kiong - **Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme.** Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology. ISSN 17437563. 14:1 (2018) 40–51. doi: 10.1111/ajco.12756.

21. SILANTYEV, Artemiy S. et al. - **Current and Future Trends on Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma: From Molecular Biology to Proteomics.** Cells. ISSN 20734409. 8:8 (2019). doi: 10.3390/cells8080863.
22. LINHARES, Paulo et al. - **Glioblastoma: Is there any blood biomarker with true clinical relevance?** International Journal of Molecular Sciences. ISSN 14220067. 21:16 (2020) 1–16. doi: 10.3390/ijms21165809.
23. BIRKÓ, Zsuzsanna et al. - **Novel molecular markers in glioblastoma—benefits of liquid biopsy.** International Journal of Molecular Sciences. ISSN 14220067. 21:20 (2020) 1–14. doi: 10.3390/ijms21207522.
24. SAADATPOUR, L. et al. - **Glioblastoma: Exosome and microRNA as novel diagnosis biomarkers.** Cancer Gene Therapy. ISSN 14765500. 23:12 (2016) 415–418. doi: 10.1038/cgt.2016.48.
25. TAN, Aaron C. et al. - **Management of glioblastoma: State of the art and future directions.** CA: A Cancer Journal for Clinicians. ISSN 0007-9235. 70:4 (2020) 299–312. doi: 10.3322/caac.21613.
26. LEELATIAN, Nalin; HONG, Christopher S.; BINDRA, Ranjit S. - **The Role of Mismatch Repair in Glioblastoma Multiforme Treatment Response and Resistance.** Neurosurgery Clinics of North America. ISSN 15581349. 32:2 (2021) 171–180. doi: 10.1016/j.nec.2020.12.009.
27. ZHANG, Jihong; F.G. STEVENS, Malcolm; D. BRADSHAW, Tracey - **Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance.** Current Molecular Pharmacology. ISSN 18744672. 5:1 (2012) 102–114. doi: 10.2174/1874-470211205010102.
28. CABRINI, Giulio et al. - **Regulation of expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and the treatment of glioblastoma (Review).** International Journal of Oncology. ISSN 17912423. 47:2 (2015) 417–428. doi: 10.3892/ijo.2015.3026.
29. BINABAJ, Maryam Moradi et al. - **The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials.** Journal of Cellular Physiology. ISSN 10974652. 233:1 (2018) 378–386. doi: 10.1002/jcp.25896.
30. LEE, Sang Y. - **Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme.** Genes and Diseases. ISSN 23523042. 3:3 (2016) 198–210. doi: 10.1016/j.gendis.2016.04.007.

31. HEGI, Monika E. et al. - **MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma.** *New England Journal of Medicine.* ISSN 0028-4793. 352:10 (2005) 997–1003. doi: 10.1056/nejmoa043331.
32. KARACHI, Aida et al. - **Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma.** *Neuro-Oncology.* ISSN 15235866. 20:12 (2018) 1566–1572. doi: 10.1093/neuonc/noy072.
33. DIAZ, Roberto Jose et al. - **The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma.** *Journal of Neuro-Oncology.* ISSN 15737373. 133:3 (2017) 455–467. doi: 10.1007/s11060-017-2477-x.
34. SAMPSON, John H. et al. - **Greater chemotherapy-induced lymphopenia enhances tumor-specific immune responses that eliminate EGFRvIII-expressing tumor cells in patients with glioblastoma.** *Neuro-Oncology.* ISSN 15228517. 13:3 (2011) 324–333. doi: 10.1093/neuonc/noq157.
35. LOUVEAU, Antoine; HARRIS, Tajie H.; KIPNIS, Jonathan - **Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege.** *Trends in Immunology.* ISSN 14714981. 36:10 (2015) 569–577. doi: 10.1016/j.it.2015.08.006.
36. YANG, Isaac et al. - **The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology.** *Journal of Clinical Neuroscience.* ISSN 09675868. 17:1 (2010) 6–10. doi: 10.1016/j.jocn.2009.05.006.
37. DAUBON, Thomas et al. - **Glioblastoma Immune Landscape and the Potential of New Immunotherapies.** *Frontiers in Immunology.* ISSN 16643224. 11: October (2020) 1–17. doi: 10.3389/fimmu.2020.585616.
38. DECORDOVA, Syreeta et al. - **Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma.** *Frontiers in Immunology.* ISSN 16643224. 11: July (2020) 1–18. doi: 10.3389/fimmu.2020.01402.
39. OU, Alexander et al. - **Molecular mechanisms of drug resistance in glioblastoma.** *International Journal of Molecular Sciences.* ISSN 14220067. 22:12 (2021). doi: 10.3390/ijms22010351.
40. YU, Miranda W.; QUAIL, Daniela F. - **Immunotherapy for Glioblastoma: Current Progress and Challenge.** *Frontiers in Immunology.* ISSN 16643224. 12: May (2021) 1–12. doi: 10.3389/fimmu.2021.676301.
41. MARTINEZ-LAGE, Maria et al. - **Immune landscapes associated with different glioblastoma molecular subtypes.** *Acta Neuropathologica Communications.* ISSN 20515960. 7:1 (2019) 1–12. doi: 10.1186/s40478-019-0803-6.

42. MENDE, Abigail L. et al. - **Current Advances in Immunotherapy for Glioblastoma.** Current Oncology Reports. ISSN 15346269. 23:2 (2021). doi: 10.1007/s11912-020-01007-5.
43. HUANG, Boyuan et al. - **Current Immunotherapies for Glioblastoma Multiforme.** Frontiers in Immunology. ISSN 16643224. 11: March (2021) 1–12. doi: 10.3389/fimmu.2020.603911.
44. MEDIKONDA, Ravi et al. - **A review of glioblastoma immunotherapy.** Journal of Neuro-Oncology. ISSN 15737373. 151:1 (2021) 41–53. doi: 10.1007/s11060-020-03448-1.
45. MCGRANAHAN, Tresa et al. - **Current State of Immunotherapy for Treatment of Glioblastoma.** Current Treatment Options in Oncology. ISSN 15346277. 20:3 (2019). doi: 10.1007/s11864-019-0619-4.
46. KURZ, Sylvia C.; WEN, Patrick Y. - **Quo Vadis—Do Immunotherapies Have a Role in Glioblastoma?** Current Treatment Options in Neurology. ISSN 15343138. 20:5 (2018). doi: 10.1007/s11940-018-0499-0.
47. LI, Junsheng et al. - **Viral Gene Therapy for Glioblastoma Multiforme: A Promising Hope for the Current Dilemma.** Frontiers in Oncology. ISSN 2234943X. 11: May (2021) 1–8. doi: 10.3389/fonc.2021.678226.
48. TOUAT, M. et al. - **Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights.** Annals of Oncology. ISSN 15698041. 28:7 (2017) 1457–1472. doi: 10.1093/annonc/mdx106.
49. MCGINNIS, Gwendolyn J.; RABER, Jacob - **CNS side effects of immune checkpoint inhibitors: Preclinical models, genetics and multimodality therapy.** Immunotherapy. ISSN 17507448. 9:11 (2017) 929–942. doi: 10.2217/imt-2017-0056.
50. LV, Li et al. - **Efficacy and safety of dendritic cell vaccines for patients with glioblastoma: A meta-analysis of randomized controlled trials.** International Immunopharmacology. ISSN 18781705. 83: January (2020). doi: 10.1016/j.intimp.2020.106336.
51. PARDOLL, Drew M. - **The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy.** Nature Reviews Cancer. ISSN 1474175X. 12:4 (2012) 252–264. doi: 10.1038/nrc3239.
52. WANG, Xin et al. - **Challenges and potential of PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy for glioblastoma.** Journal of Experimental and

- Clinical Cancer Research. ISSN 17569966. 38:1 (2019). doi: 10.1186/s13046-019-1085-3.
53. JACKSON, Christopher M.; CHOI, John; LIM, Michael - **Mechanisms of immunotherapy resistance: lessons from glioblastoma.** Nature Immunology. ISSN 15292916. 20:9 (2019) 1100–1109. doi: 10.1038/s41590-019-0433-y.
 54. XIU, Joanne et al. - **Multi-platform molecular profiling of a large cohort of glioblastomas reveals potential therapeutic strategies.** Oncotarget. ISSN 19492553. 7:16 (2016) 21556–21569. doi: 10.18632/oncotarget.7722.
 55. EL-KHAYAT, Shaimaa M.; ARAFAT, Waleed O. - **Therapeutic strategies of recurrent glioblastoma and its molecular pathways «Lock up the beast».** Ecancermedicalsecience. ISSN 17546605. 15:2021. doi: 10.3332/ECANCER.2021.1176.
 56. HAMER, Philip C. De Witt et al.- **Small molecule kinase inhibitors in glioblastoma: a systematic review of clinical studies.** Neuro-Oncology. 12(3) (2010). 304–316, doi:10.1093/neuonc/nop068.
 57. EMA. - **O Sistema Regulador Europeu de Medicamentos.** Site da EMA. (2016).
 58. PANDRH. – **Regulation of Advanced Therapy Medicinal Products.** Ninth Conference of the Pan American Network for Drug Regulatory Harmonization. (2018).
 59. LUCAS-SAMUEL, S. - **Thérapie innovante: Du cadre réglementaire européen au cadre réglementaire national.** Transfusion Clinique et Biologique. ISSN 12467820. 20:2 (2013) 221–224. doi: 10.1016/j.tracli.2013.02.006.
 60. IGLESIAS-LÓPEZ, C. et al. - **Regulatory framework for advanced therapy medicinal products in Europe and United States.** Frontiers in Pharmacology. ISSN 16639812. 10: July (2019) 1–14. doi: 10.3389/fphar.2019.00921.
 61. CARVALHO, Marta; SEPODES, Bruno; MARTINS, Paula - **Regulatory and scientific advances in gene therapy: state of the art in clinical applications and the supporting European regulatory framework.** 4:2017) 1–33.
 62. LÓPEZ-PANIAGUA, Marina et al. - **Advanced therapy medicinal products for the eye: Definitions and regulatory framework.** Pharmaceutics. ISSN 19994923. 13:3 (2021) 1–18. doi: 10.3390/pharmaceutics13030347.
 63. SALMIKANGAS, Paula et al.- **Marketing Regulatory Oversight of Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs) in Europe: The EMA/CAT Perspective.** American Society of Gene and Cell Therapy. (2015). doi: 10.1007/978-3-319-18618-4_6.

64. FLORY, Egbert; REINHARDT, Jens - **European regulatory tools for advanced therapy medicinal products**. Transfusion Medicine and Hemotherapy. ISSN 16603818. 40:6 (2013) 409–412. doi: 10.1159/000356364.
65. YU, Tracy T. L. et al. - **Recent progress in European advanced therapy medicinal products and beyond**. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. ISSN 22964185. 6: SEP (2018) 1–8. doi: 10.3389/fbioe.2018.00130.
66. SMITH, Mark D. et al. - **Whither advanced therapy medicinal products?** Transfusion Medicine and Hemotherapy. ISSN 16603818. 40:6 (2013) 449–452. doi: 10.1159/000356514.
67. CAT. **Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them**. NATURE REvIEWS | Drug Discovery. (2010).
68. HORGAN, Denis et al. - **Propelling Healthcare with Advanced Therapy Medicinal Products: A Policy Discussion**. Biomedicine Hub. ISSN 2296-6870. 5:3 (2020) 1–23. doi: 10.1159/000511678.
69. ABOU-EL-ENEIN, Mohamed; ELSANHOORY, Ahmed; REINKE, Petra - **Overcoming Challenges Facing Advanced Therapies in the EU Market**. Cell Stem Cell. ISSN 18759777. 19:3 (2016) 293–297. doi: 10.1016/j.stem.2016.08.012.
70. BORÁŇ, Tomáš et al. - **Clinical Development and Commercialization of Advanced Therapy Medicinal Products in the European Union: How Are the Product Pipeline and Regulatory Framework Evolving?** Human Gene Therapy Clinical Development. ISSN 23248645. 28:3 (2017) 126–135. doi: 10.1089/humc.2016.193.
71. COMISSÃO EUROPEIA. - **Diretiva 2002/812/CE do Parlamento Europeu e do Conselho**. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. (2002).
72. COMISSÃO EUROPEIA. - **Diretiva 2002/623/CE do Parlamento Europeu e do Conselho**. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. (2002).
73. COMISSÃO EUROPEIA. - **Diretiva 2004/23/CE do Parlamento Europeu e do Conselho**. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. (2004).
74. COMISSÃO EUROPEIA. - **Diretiva 2001/18/CE do Parlamento Europeu e do Conselho**. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. (2001).
75. COMISSÃO EUROPEIA. - **Diretiva 2006/17/CE do Parlamento Europeu e do Conselho**. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. (2006).
76. COMISSÃO EUROPEIA. - **Diretiva 2009/120/CE do Parlamento Europeu e do Conselho**. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. (2009).

77. COMISSÃO EUROPEIA. - **Regulamento (CE) N°1394/2007 Parlamento Europeu e do Conselho.** Jornal Oficial das Comunidades Europeias. (2007).
78. COMISSÃO EUROPEIA. - **Regulamento (CE) N°507/2007 Parlamento Europeu e do Conselho.** Jornal Oficial das Comunidades Europeias. (2006).
79. COMISSÃO EUROPEIA. - **Regulamento (CE) N°847/2007 Parlamento Europeu e do Conselho.** Jornal Oficial das Comunidades Europeias. (2000).
80. COMISSÃO EUROPEIA. - **Regulamento (CE) N°141/2000 Parlamento Europeu e do Conselho.** Jornal Oficial das Comunidades Europeias. (2000).
81. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. - **Guideline No. 4447/00 on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use.** Committee for Medicinal Products for Human Use. June (2006) 1–12.
82. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. - **Guideline No. 473191 on Environmental Risk Assessments for Medicinal.** July 2007 (2006) 1–14.
83. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. - **Reflection paper on clinical aspects related to tissue engineered products Reflection paper on clinical aspects related to tissue engineered products.** March (2012) 1–6.
84. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. - **Reflection paper on classification of advanced therapy medicinal products Reflection paper on classification of Advanced Therapy Medicinal Products.** April (2012) 1–19.
85. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. - **Reflection paper on stem cell-based medicinal products.** January (2011) 1-14.
86. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). - **The Common Technical Document for the registration of pharmaceuticals for human use: Quality- M4Q(RI) Quality overall summary of module 2 module 3.** Setembro (2002) 1-17.
87. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. - **Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products.** March (2018) 1–41.
88. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. - **Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells.** April (2012).
89. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. – **Guideline No 607698 Oncolytic Viruses.** Outubro (2009) 1-6.
90. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. – **Guideline No 2458/03 on development and manufacture of lentiviral vectors.** Outubro (2004) 1-8.

91. 74. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). - General principles to address the risk of inadvertent germline integration of gene therapy vectors. October (2006) 1–3.
92. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). – **Note for Guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses.** August (1996)
93. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. – **Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of live recombinant viral vectored vaccines.** January (2011) 1-14
94. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Guideline on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products.** May (2013) 1–8.
95. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. - **Guideline No 410869 on human cell-based medicinal products.** September (2008) 1-25.
96. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. - **Development Pharmaceuticals for biotechnological and biological products- Annex to note for guidance on development pharmaceuticals.** April (2000).
97. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). -**Topic Q 5 C: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products - Step 5.** December (1996).
98. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). -**Topic Q5B Quality of Biotechnological Products: Analysis of the Expression Construct in Cell Lines Used for Production of r-DNA Derived Protein Products Step. Guidance.** July (1996).
99. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). – **Topic Q7: Note for guidance on good manufacturing practice for active pharmaceutical ingredients.** November (2000).
100. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). -**Topic Q 8 (R2) Pharmaceutical Development, Step 5: Note for Guidance on Pharmaceutical Development.** June (2009).
101. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). - **Topic Q5A (R1) Note for guidance on quality of biotechnological products: Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of humans or animal origin.** October (1997).

102. TEJADA, Sonia et al. - **DNX-2401, an oncolytic virus, for the treatment of newly diagnosed diffuse intrinsic pontine gliomas: A case report.** *Frontiers in Oncology*. ISSN 2234943X. 8: MAR (2018) 1–5. doi: 10.3389/fonc.2018.00061.
103. Horizon Scanning Research & Intelligence Centre. - **DNX-2401 for recurrent glioblastoma – in combination with pembrolizumab.** Disponível em: <https://www.biospace.com/article/releases/dnatrix-presents-positive-results-from-the-phase-2-captive-keynote-192-study-of-dnx-2401-in-combination-with-pembrolizumab-for-glioblastoma-at-the-2019-sno-annual-meeting/>
104. LANG, Frederick F. et al. - **Phase I study of DNX-2401 (delta-24-RGD) oncolytic adenovirus: replication and immunotherapeutic effects in recurrent malignant glioma.** *Journal of Clinical Oncology*. ISSN 15277755. 36:14 (2018) 1419–1427. doi: 10.1200/JCO.2017.75.8219.
105. COMISSÃO EUROPEIA. - **Diretiva 2001/83/CE do Parlamento Europeu e do Conselho.** *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. (2001).
106. LOUIS, David N. et al. - **The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary.** *Neuro-Oncology*. ISSN 15235866. 23:8 (2021) 1231–1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106.
107. MOLITOR, Robert et al. - **New trends in bioinformatics: From genome sequence to personalized medicine.** *Experimental Gerontology*. ISSN 05315565. 38:10 (2003) 1031–1036. doi: 10.1016/S0531-5565(03)00168-2.
108. AYYILDIZ, Dilara; PIAZZA, Silvano - **Introduction to Bioinformatics.** In *Methods in Molecular Biology*. [S.l.] : Humana Press Inc., 2019v. 1986. p. 1–15.
109. LI, Kening et al. - **Bioinformatics Approaches for Anti-cancer Drug Discovery.** *Current Drug Targets*. ISSN 13894501. 21:1 (2019) 3–17. doi: 10.2174/1389450120666190923162203.
110. ANASHKINA, Anastasia A.; LEBERFARB, Elena Y.; ORLOV, Yuriy L. - **Recent trends in cancer genomics and bioinformatics tools development.** *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN 14220067. 22:22 (2021). doi: 10.3390/ijms222212146.
111. YUAN, Yang et al. - **Multi-Omics Analysis Reveals Novel Subtypes and Driver Genes in Glioblastoma.** *Frontiers in Genetics*. ISSN 16648021. 11:2020). doi: 10.3389/fgene.2020.565341.

112. SILANTYEV, Artemiy S. et al. - **Current and future trends on diagnosis and prognosis of glioblastoma: From molecular biology to proteomics.** Cells. ISSN 20734409. 8:8 (2019). doi: 10.3390/cells8080863.
113. WANG, Liang Bo et al. - **Proteogenomic and metabolomic characterization of human glioblastoma.** Cancer Cell. ISSN 18783686. 39:4 (2021) 509-528.e20. doi: 10.1016/j.ccell.2021.01.006.
114. YOU, Yujie et al. - **Developing the novel bioinformatics algorithms to systematically investigate the connections among survival time, key genes and proteins for Glioblastoma multiforme.** BMC Bioinformatics. ISSN 14712105. 21:2020). doi: 10.1186/s12859-020-03674-4.
115. VALDEBENITO, Jessica; MEDINA, Felipe - **Machine learning approaches to study glioblastoma: A review of the last decade of applications.** Cancer Reports. ISSN 25738348. 2:6 (2019). doi: 10.1002/cnr2.1226.
116. CHEN, Xiaojie et al. - **Identification of potential crucial genes and molecular mechanisms in glioblastoma multiforme by bioinformatics analysis.** Molecular Medicine Reports. ISSN 17913004. 22:2 (2020) 859–869. doi: 10.3892/mmr.2020.11160.
117. GUBANOVA, Natalya V. et al. - **Glioblastoma gene network reconstruction and ontology analysis by online bioinformatics tools.** Journal of integrative bioinformatics. ISSN 16134516. 18:4 (2021). doi: 10.1515/jib-2021-0031.
118. ZHANG, Yu et al. - **Bioinformatics analysis of potential core genes for glioblastoma.** Bioscience Reports. ISSN 15734935. 40:7 (2020). doi: 10.1042/BSR20201625.
119. RAHMATI, Yazdan; ALIVAND, Mohammadreza; MOLLANOORI, Hasan - **MiR-330-3p and miR-485-5p as biomarkers for glioblastoma: An integrated bioinformatics and experimental study.** Computational Biology and Chemistry. ISSN 14769271. 92:2021). doi: 10.1016/j.compbiolchem.2021.107458.
120. QI, Fuwei et al. - **Bioinformatics analysis of high-throughput data to validate potential novel biomarkers and small molecule drugs for glioblastoma multiforme.** Journal of International Medical Research. ISSN 14732300. 48:7 (2020). doi: 10.1177/0300060520924541.
121. ZHOU, Lingqi et al. - **Bioinformatics analyses of significant genes, related pathways and candidate prognostic biomarkers in glioblastoma.** Molecular

- Medicine Reports. ISSN 17913004. 18:5 (2018) 4185–4196. doi: 10.3892/mmr.2018.9411.
122. WANG, Ye Cheng; TIAN, Zhen Bo; TANG, Xu Qing - **Bioinformatics screening of biomarkers related to liver cancer**. BMC Bioinformatics. ISSN 14712105. 22:2021). doi: 10.1186/s12859-021-04411-1.
123. YANG, Qi et al. - **Candidate Biomarkers and Molecular Mechanism Investigation for Glioblastoma Multiforme Utilizing WGCNA**. BioMed Research International. ISSN 23146141. 2018:2018). doi: 10.1155/2018/4246703.
124. AHMED, Swalih P.; CASTRESANA, Javier S.; SHAHI, Mehdi H. - **Glioblastoma and mirnas**. Cancers. ISSN 20726694. 13:7 (2021). doi: 10.3390/cancers13071581.
125. KIRSTEIN, Anna; SCHMID, Thomas E.; COMBS, Stephanie E. - **The role of mirna for the treatment of mgmt unmethylated glioblastoma multiforme**. Cancers. ISSN 20726694. 12:5 (2020). doi: 10.3390/cancers12051099.
126. CAO, Hang; WANG, Feiyifan; LI, Xue Jun - **Future Strategies on Glioma Research: From Big Data to the Clinic**. Genomics, Proteomics and Bioinformatics. ISSN 22103244. 15:4 (2017) 263–265. doi: 10.1016/j.gpb.2017.07.001.
127. RAHMAN, Md Habibur et al. - **Bioinformatics and machine learning methodologies to identify the effects of central nervous system disorders on glioblastoma progression**. Briefings in Bioinformatics. ISSN 14774054. 22:5 (2021). doi: 10.1093/bib/bbaa365.
128. BURUIANĂ, Andrei et al. - **The roles of miRNA in glioblastoma tumor cell communication: Diplomatic and aggressive negotiations**. International Journal of Molecular Sciences. ISSN 14220067. 21:6 (2020). doi: 10.3390/ijms21061950.
129. BEAM, Andrew L.; KOHANE, Isaac S. - **Big data and machine learning in health care**. JAMA - Journal of the American Medical Association. ISSN 15383598. 319:13 (2018) 1317–1318. doi: 10.1001/jama.2017.18391.
130. ZOLOTOVSKAIA, Marianna A. et al. - **Disparity between inter-patient molecular heterogeneity and repertoires of target drugs used for different types of cancer in clinical oncology**. International Journal of Molecular Sciences. ISSN 14220067. 21:5 (2020) 1–18. doi: 10.3390/IJMS21051580.
131. BZDOK, Danilo; KRZYWINSKI, Martin; ALTMAN, Naomi - **Points of Significance: Machine learning: A primer**. Nature Methods. ISSN 15487105. 14:12 (2017) 1119–1120. doi: 10.1038/nmeth.4526.

132. ORLOV, Yuriy L.; BARANOVA, Ancha V.; TATARINOVA, Tatiana V. - **Bioinformatics methods in medical genetics and genomics.** International Journal of Molecular Sciences. ISSN 14220067. 21:17 (2020) 1–5. doi: 10.3390/ijms21176224.
133. BANELLI, Barbara et al. - **MicroRNA in glioblastoma: An overview.** International Journal of Genomics. ISSN 23144378. 2017:2017). doi: 10.1155/2017/7639084.
134. ORLOV, Yuriy L. et al. - **Medical genetics, genomics and bioinformatics aid in understanding molecular mechanisms of human diseases.** International Journal of Molecular Sciences. ISSN 14220067. 22:18 (2021). doi: 10.3390/ijms22189962.
135. BOOTH, T. C. et al. - **Machine learning and glioma imaging biomarkers.** Clinical Radiology. ISSN 1365229X. 75:1 (2020) 20–32. doi: 10.1016/j.crad.2019.07.001.
136. ZHANG, Ning et al. - **Research progress of gliomas in machine learning.** Cells. ISSN 20734409. 10:11 (2021). doi: 10.3390/cells10113169.
137. LECLERCQ, Mickael et al. - **Large-scale automatic feature selection for biomarker discovery in high-dimensional omics data.** Frontiers in Genetics. ISSN 16648021. 10: MAY (2019). doi: 10.3389/fgene.2019.00452.
138. GLAAB, Enrico et al. - **Biomarker discovery studies for patient stratification using machine learning analysis of omics data: A scoping review.** BMJ Open. ISSN 20446055. 11:12 (2021). doi: 10.1136/bmjopen-2021-053674.
139. CHANG, Chun Hung; LIN, Chieh Hsin; LANE, Hsien Yuan - **Machine learning and novel biomarkers for the diagnosis of alzheimer's disease.** International Journal of Molecular Sciences. ISSN 14220067. 22:5 (2021) 1–12. doi: 10.3390/ijms22052761.
140. BOOTH, Thomas C. et al. - **Imaging Biomarkers of Glioblastoma Treatment Response: A Systematic Review and Meta-Analysis of Recent Machine Learning Studies.** Frontiers in Oncology. ISSN 2234943X. 12:2022). doi: 10.3389/fonc.2022.799662.
141. ABSTRACT, Graphical et al. - **Transparent exploration of machine learning for biomarker discovery from proteomics and omics data.** [s.d.]. doi: 10.1101/2021.03.05.434053.

142. ALHASAN, Ayman S. - **Clinical Applications of Artificial Intelligence, Machine Learning, and Deep Learning in the Imaging of Gliomas: A Systematic Review.** Cureus. 2021). doi: 10.7759/cureus.19580.
143. YANOVICH-ARAD, Gali et al. - **Proteogenomics of glioblastoma associates molecular patterns with survival.** Cell Reports. ISSN 22111247. 34:9 (2021). doi: 10.1016/j.celrep.2021.108787.
144. HERNÁNDEZ, Marta et al. - **Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis.** Revista Argentina de Microbiologia. ISSN 03257541. 52:2 (2020) 150–161. doi: 10.1016/j.ram.2019.06.003.
145. MOORE, Jason H. - **Bioinformatics.** Journal of Cellular Physiology. ISSN 00219541. 213:2 (2007) 365–369. doi: 10.1002/jcp.21218.
146. GAUTHIER, Jeff et al. - **A brief history of bioinformatics.** Briefings in Bioinformatics. ISSN 14774054. 20:6 (2019) 1981–1996. doi: 10.1093/bib/bby063.
147. CHEN, Kang et al. - **Identification and Validation of Hub Genes Associated with Bladder Cancer by Integrated Bioinformatics and Experimental Assays.** Frontiers in Oncology. ISSN 2234943X. 11:2021). doi: 10.3389/fonc.2021.782981.
148. CUI, Kai et al. - **Hub biomarkers for the diagnosis and treatment of glioblastoma based on microarray technology.** Technology in cancer research & treatment. ISSN 15330338. 20:2021). doi: 10.1177/1533033821990368.
149. GUBANOVA, Natalya V. et al. - **Glioblastoma gene network reconstruction and ontology analysis by online bioinformatics tools.** Journal of integrative bioinformatics. ISSN 16134516. 18:4 (2021). doi: 10.1515/jib-2021-0031.
150. GÜVEN, Emine; AFZAL, Muhammad; KAZMI, Imran - **Screening the Significant Hub Genes by Comparing Tumor Cells, Normoxic and Hypoxic Glioblastoma Stem-like Cell Lines Using Co-Expression Analysis in Glioblastoma.** Genes. ISSN 20734425. 13:3 (2022) 518. doi: 10.3390/genes13030518.
151. LIU, Mingfa et al. - **The identification of key genes and pathways in glioma by bioinformatics analysis.** Journal of Immunology Research. ISSN 23147156. 2017:2017). doi: 10.1155/2017/1278081.
152. ZHANG, Delong et al. - **Identification of hub genes related to prognosis in glioma.** Bioscience Reports. ISSN 15734935. 40:5 (2020). doi: 10.1042/BSR20193377.

153. XU, Baowei - **Prediction and analysis of hub genes between glioblastoma and low-grade glioma using bioinformatics analysis.** *Medicine*. ISSN 15365964. 100:3 (2021) e23513. doi: 10.1097/MD.00000000000023513.
154. JIMENEZ, F. et al. - **Activated caspase 3 and cleaved poly(ADP-ribose)polymerase in salivary epithelium suggest a pathogenetic mechanism for Sjögren's syndrome.**
155. CHENG, Fangling; GUO, Dongsheng - **MET in glioma: Signaling pathways and targeted therapies.** *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. ISSN 17569966. 38:1 (2019). doi: 10.1186/s13046-019-1269-x.
156. GUAN, Hongyu et al. - **Sp1 is upregulated in human glioma, promotes MMP-2-mediated cell invasion and predicts poor clinical outcome.** *International Journal of Cancer*. ISSN 00207136. 130:3 (2012) 593–601. doi: 10.1002/ijc.26049.
157. KARIM, Baktiar O. et al. - **Prom1 function in development, intestinal inflammation, and intestinal tumorigenesis.** *Frontiers in Oncology*. ISSN 2234943X. 4: NOV (2014). doi: 10.3389/fonc.2014.00323.
158. ULASOV, Ilya et al. - **The emerging role of MMP14 in brain tumorigenesis and future therapeutics.** *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. ISSN 18792561. 1846:1 (2014) 113–120. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.03.002.
159. PAGANIN, Maddalena; FERRANDO, Adolfo - **Molecular pathogenesis and targeted therapies for NOTCH1-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia.** *Blood Reviews*. ISSN 0268960X. 25:2 (2011) 83–90. doi: 10.1016/j.blre.2010.09.004.
160. PARK, Seongmi et al. - **The receptor interacting protein 1 inhibits p53 induction through NF- κ B activation and confers a worse prognosis in glioblastoma.** *Cancer Research*. ISSN 00085472. 69:7 (2009) 2809–2816. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4079.
161. PHANE ROCCHI, Sté et al. - **Determination of Gab1 (Grb2-Associated Binder-1) Interaction with Insulin Receptor-Signaling Molecules [Em linha]**
Disponível em [www:<URL:
https://academic.oup.com/mend/article/12/7/914/2754427>](https://academic.oup.com/mend/article/12/7/914/2754427).
162. FUJIOKA, Shuichi et al. - **NF- κ B and AP-1 Connection: Mechanism of NF- κ B-Dependent Regulation of AP-1 Activity.** *Molecular and Cellular Biology*. ISSN 0270-7306. 24:17 (2004) 7806–7819. doi: 10.1128/mcb.24.17.7806-7819.2004.

163. LIU, Wei et al. - **The Roles of EphB2 in Cancer**. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. ISSN 2296634X. 10:2022). doi: 10.3389/fcell.2022.788587.
164. LI, Yue et al. - **BNIP3L/NIX-mediated mitophagy: molecular mechanisms and implications for human disease**. *Cell Death and Disease*. ISSN 20414889. 13:1 (2022). doi: 10.1038/s41419-021-04469-y.
165. SU, Yu Ting et al. - **MerTK inhibition decreases immune suppressive glioblastoma-Associated macrophages and neoangiogenesis in glioblastoma microenvironment**. *Neuro-Oncology Advances*. ISSN 26322498. 2:1 (2020). doi: 10.1093/naon/vdaa065.
166. LORIMER, Ian A. J. - **Aberrant Rac pathway signalling in glioblastoma. Small GTPases**. ISSN 21541256. 12:2 (2021) 81–95. doi: 10.1080/21541248.2019.1612694.
167. SHERGALIS, Andrea et al. - **Current challenges and opportunities in treating glioblastomas**. *Pharmacological Reviews*. ISSN 15210081. 70:3 (2018) 412–445. doi: 10.1124/pr.117.014944.
168. YAN, Fang et al. - **Molecular characterization of the BMP7 gene and its potential role in shell formation in *Pinctada martensii***. *International journal of molecular sciences*. ISSN 14220067. 15:11 (2014) 21215–21228. doi: 10.3390/ijms151121215.
169. DAI, Lirui et al. - **SOCS proteins and their roles in the development of glioblastoma (Review)**. *Oncology Letters*. ISSN 17921082. 23:1 (2022). doi: 10.3892/ol.2021.13123.
170. Rossum, Denise et al. – **Microglia**. *Metabolic Brain Disease*, Vol. 19, Nos. 3/4, December 2004 (C 2004).
171. Ferreira, Ana et al. - **Diseases associated with the deficiency of the complemente system**. *Archives of Health Sciences* (2019). DOI: 10.17696/2318-3691.26.1.2019.1397
172. SHEN, Xianli et al. - **Glioma-induced caspase 3 inhibition in microglia 1 promotes a tumor-supportive phenotype 2**.
173. TSIGELNY, Igor F. et al. - **Molecular mechanisms of OLIG2 transcription factor in brain cancer**. *Oncotarget* 53074 [Em linha] Disponível em [www:<URL: www.impactjournals.com/oncotarget/>](http://www.impactjournals.com/oncotarget/).
174. WANG, Zhuo et al. - **EFEMPI promotes the migration and invasion of osteosarcoma via MMP-2 with induction by AEG-1 via NF-κB signaling**

- pathway** [Em linha] Disponível em [www:<URL:www.impactjournals.com/oncotarget/>](http://www.impactjournals.com/oncotarget/).
175. WU, Jing et al. - **MerTK as a therapeutic target in glioblastoma**. *Neuro-Oncology*. ISSN 15235866. 20:1 (2018) 92–102. doi: 10.1093/neuonc/nox111.
176. GHOUMID, Jamal et al. - **ZEB2 zinc-finger missense mutations lead to hypomorphic alleles and a mild Mowat-Wilson syndrome**. *Human Molecular Genetics*. ISSN 09646906. 22:13 (2013) 2652–2661. doi: 10.1093/hmg/ddt114.
177. ATMPs) Reviewers: Editor [Em linha] Disponível em WWW:<URL:www.ddrmedic.com>. ISBN 978-989-20-5366-0.
178. MEDICINES AGENCY, European - **Procedural advice on the evaluation of advanced therapy medicinal product in accordance with Article 8 of Regulation (EC) No 1394/2007** [Em linha] Disponível em WWW:<URL:www.ema.europa.eu/contact>.
179. TRINDADE, Vinícius et al. - Gliomas: marcadores tumorais e prognóstico
PALAVRAS-CHAVE
180. **Two main endogenous neurogenic regions contain multipotent adult neural... | Download Scientific Diagram** - [Em linha] [Consult. 8 jun. 2022]. Disponível em [WWW:<URL:https://www.researchgate.net/figure/Two-main-endogenous-neurogenic-regions-contain-multipotent-adult-neural-stem-cells-the_fig1_314386272>](https://www.researchgate.net/figure/Two-main-endogenous-neurogenic-regions-contain-multipotent-adult-neural-stem-cells-the_fig1_314386272).
181. VLEESCHOUWER, Steven DE (ED.) - **Glioblastoma** [Em linha]. [S.l.]: Codon Publications, 2017 Disponível em [WWW:<URL:https://exonpublications.com/index.php/exon/issue/view/6>](https://exonpublications.com/index.php/exon/issue/view/6). ISBN 9780994438126.
182. WANG, Yaning et al. - **Imposing Phase II and Phase III Clinical Trials of Targeted Drugs for Glioblastoma: Current Status and Progress**. *Frontiers in Oncology*. . ISSN 2234943X. 11:2021). doi: 10.3389/fonc.2021.719623.
183. Vieira, Paulo et al. (2021). **Estudo de biomarcadores em glioblastomas: correlação clínica e molecular** (Tese de doutoramento, Faculdade Medicina, Porto, Portugal)
184. Ponciano, Filipa et al. (2013). **A influência dos assuntos regulamentares do desenvolvimento até à submissão**. (Atribuição do título de especialista em assuntos regulamentares, Ordem dos Farmacêuticos)

185. Gaspar, Beatriz et al. (2016). **Biomarcadores em gliomas: conhecimento atual e perspetivas futuras.** (Dissertação de mestrado, Faculdade de Farmácia, Coimbra, Portugal)
186. Pinheiro, João et al. (2019). **Terapias Avançadas: Perspetiva Regulamentar.** (Dissertação de mestrado, Faculdade de Farmácia, Coimbra, Portugal)
187. Costa, Joana et al. (2016). **Terapias avançadas – Enquadramento legal e regulamentar.** (Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciência da Saúde, Porto, Portugal)
188. Gomes, Joana et al. (2015). **Medicamentos de Terapia Avançada na União Europeia: Uma Perspetiva Regulamentar.** (Dissertação de mestrado, Faculdade de Farmácia, Coimbra, Portugal).
189. Lourenço, Lúcia et al. (2019). **Aspetos de Qualidade críticos para Farmacovigilância de Medicamentos de Terapia Génica - Células Geneticamente Modificadas.** (Dissertação de mestrado, Faculdade de Farmácia, Coimbra, Portugal) disponível em:
190. Bogalho, Ana et al. (2019). **Innovative Therapeutic Approaches to Fight Glioblastoma.** (Dissertação de mestrado, Faculdade de Farmácia, Lisboa, Portugal).
191. Agostinho, Nuno et al. (2016). **BIOINFORMATICS APPLICATION FOR ANALYSIS AND VISUALISATION OF ALTERNATIVE SPLICING IN CANCER.** (Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências, Lisboa, Portugal).
192. European Medicines Agency. (2019). European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en>
193. Cancro. (n.d.). Health.ec.europa.eu. Retrieved July 5, 2022, from https://health.ec.europa.eu/non-communicable-diseases/cancer_pt#cancro-uma-abordagem-conjunta
194. ICH. (2019). ICH Official web site : ICH. Ich.org. <https://www.ich.org/>
195. DAVID: Functional Annotation Tools. (2009). Ncifcrf.gov. <https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>
196. jvenn: an interactive Venn diagram viewer. (n.d.). Jvenn.toulouse.inra.fr. <http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/index.html>
197. geo. (2019). Home - GEO - NCBI. Nih.gov. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>
198. Ualcan.path.uab.edu/analysis. (n.d.). Ualcan.path.uab.edu. Retrieved July 5, 2022, from <http://ualcan.path.uab.edu/cgi-bin/TCGAExHeatMap2KK.pl>