

A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

## **A IMPORTÂNCIA DA FLUORESCÊNCIA NA CIRURGIA DOS GLIOMAS**

TOMÁS JOSÉ TEIXEIRA MENDES CARVALHO

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSITÁRIO DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

ÁREA: NEUROCIRURGIA

PROFESSOR DOUTOR MARCOS BARBOSA

**Correspondência eletrónica:** [tomasjmc@gmail.com](mailto:tomasjmc@gmail.com)

A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

“Declare o passado, diagnostique o presente e preveja o futuro”

Hipócrates

## Sumário

Resumo .....	1
<i>Abstract</i> .....	3
Introdução .....	5
Material e Métodos .....	8
Resultados .....	8
Discussão e Conclusão .....	9
Metabolismo e mecanismos bioquímicos de 5-ALA .....	9
Aplicação e dosagem de ácido-5-aminolevulinico .....	11
Detecção da fluorescência de PpIX .....	11
Procedimento Cirúrgico .....	12
Extensão da ressecção tumoral .....	17
Morbilidade e segurança .....	20
Fluorescência emitida de acordo com o grau do glioma .....	23
Limitações e Vantagens .....	24
Aplicações futuras .....	26
Conclusão .....	27
Anexos .....	29
Anexo 1 – Escala de Performance de Karnofsky .....	29
Anexo 2 – National Institutes of Health Stroke Scale (NIH-SS) .....	30
Agradecimentos .....	38
Referências .....	39

## **Resumo**

**Contextualização:** Os gliomas representam 81% dos tumores primários malignos do cérebro. Apesar de serem relativamente raros, são causa de importante morbidade e mortalidade. Entre os fatores prognósticos mais relevantes, encontra-se a ressecção tumoral, a idade aquando do diagnóstico e a pontuação obtida na Escala de Performance de Karnofsky (KPS). Atualmente a cirurgia ainda permanece como terapêutica de 1ª linha, no entanto um factor importante que condiciona a realização deste procedimento, deve-se à dificuldade em distinguir intra-operatoriamente as margens de ressecção tumoral. Foi, neste contexto, que a fluorescência emitida pelo ácido-5-aminolevulinico (5-ALA) surgiu como um método auxiliar de identificação dos limites tumorais intra-operatoriamente em tempo real, com o intuito de ajudar a tomada de decisão clínica do neurocirurgião.

**Objetivo:** O objetivo deste artigo de revisão prende-se com a importância atual e futura desta técnica na ressecção de gliomas. Não só se pretende realizar uma análise da literatura disponível, relativamente à sua eficácia, mas também se procura entender a segurança e os riscos que esta implica.

**Material e Métodos:** De forma a realizar este artigo de revisão foi consultada a PubMed ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)) como base de dados. Assim recorrendo a um conjunto de palavras-chave, foi possível abranger artigos desde 1989 a 2014, contendo fontes em literatura inglesa e portuguesa. O facto de este tema, de certa forma, representar uma técnica cirúrgica emergente, condicionou as datas das publicações disponíveis. Encontram-se incluídos artigos de revisão, artigos originais, ensaios clínicos, editoriais, notas técnicas, entre outros.

**Resultados:** Os dados contidos neste artigo de revisão, procuram, sempre que possível, serem apoiados em informações compreendidas em fontes e estudos de metodologia fiável, rigorosa e cujos resultados permitam uma correta interpretação e extrapolação dos mesmos. Dada a

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

extensa pesquisa efetuada, foi necessário implementar critérios de inclusão com base nas palavras-chave enunciadas acima, na data de publicação do artigo, no autor do mesmo, o tipo de estudo realizado, bem como na sua metodologia e validade. Assim procedeu-se a uma leitura cuidada dos títulos e resumos dos artigos disponíveis, selecionando 75 artigos que preenchem os critérios atrás enunciados.

**Conclusão:** A ressecção guiada pela fluorescência permite ao neurocirurgião distinguir de forma mais precisa, as margens do glioma intra-operatoriamente em tempo real, e assim aumentar a incidência de ressecções tumorais radicais. Ao atingir este objetivo o doente é submetido a um menor número de reintervenções, apresentando maior sobrevida relativa e melhor resposta às terapêuticas adjuvantes, como a quimioterapia e a radioterapia. Relativamente à segurança da ressecção guiada pela fluorescência emitida pela protoporfirina IX (PpIX), os défices neurológicos transitórios provocados por uma ressecção mais extensa são compensados pelos benefícios a longo prazo para os doentes e justificados pelo uso de técnicas modernas, como a cirurgia guiada por fluorescência.

**Palavras-chave:** Glioma Maligno; Cirurgia Guiada por Fluorescência; Ácido 5-aminolevulinico; Ressecção Radical do Tumor; Ressecção Máxima Segura.

***Abstract***

**Background:** Gliomas represent about 81% of the primary malignant brain tumors. Despite being a rare condition, they stand for a major cause of morbidity and mortality. There are some important prognosis factors like tumor resection, age upon the diagnosis and the score on KPS. A major factor that difficult the neurosurgeon task in the resection of the tumor, resides in the ability to distinguish the borders of the tumor in real time surgery. Fluorescence-guided surgery has arrived as an auxiliary method to identify the borders of the tumor and facilitate the decision of the neurosurgeon.

**Aim:** The aim of this revision article is to evaluate the relevance of this relatively new technique in the resection of gliomas. Furthermore, it intends to ascertain the efficacy, safety and risks of the fluorescence-guided resection.

**Methods:** In order to analyze the available literature, a search was made in the PubMed (www.pubmed.com) database with the following key-words: malignant glioma, fluorescence guide surgery, 5-aminolevulinic acid, complete resection of the contrast-enhancing tumor and gross total resection. The search reveled articles from 1989 to 2014, containing portuguese and english literature. Since this technique is just emerging in neurosurgery, the available literature was limited. However, this revision article includes a variety of articles, such as revision articles, originals articles, clinical essays, editorials and technical notes.

**Results:** The information reviewed in this article intends to always be supported by the available data in the articles and studies published. Only supporting the information in reliable sources, can this article became scientific correct and trustworthy to the reader. Given the extent of the search conducted, it was necessary to implement inclusion criteria: the publication date, the author of the article, the type of the study, the condition in which it was

A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

accomplished. In this way, a selection of 75 articles was made after a careful reading of the titles and the abstract of the articles available.

**Conclusion:** Fluorescence-guided resection of malignant gliomas using 5-aminolevulinic acid allows the neurosurgeon to distinguish, in a more steadfast way, the local invasion of the brain tissue by the glioma. Given this advantage, it is possible to achieve extended resection, and therefore reducing the number of reinterventions, increasing the median survive and improving the response to adjuvant therapies. Concerning the security of this technique, some transitional neurological deficits have been reported due to an extended resection. However, the benefits from this procedure have a positive prognosis impact.

**Key-words:** Malignant Gliomas; Fluorescence Guide Surgery; 5-Aminolevulinic Acid; Complete Resection of the Contrast-Enhancing Tumor; Gross Total Resection.

## **Introdução**

Os gliomas representam 81% dos tumores primários malignos do cérebro. Apesar de serem relativamente raros, são causa de importante morbidade e mortalidade, contribuindo para aproximadamente 13.000 mortes e 18.000 novos casos por ano, nos Estados Unidos da América.<sup>1-3</sup> Entre eles, o glioblastoma (GBM) apresenta-se como o subtipo mais comum (45% dos gliomas) e também como um de pior prognóstico, dado o seu comportamento localmente invasivo, cuja sobrevida média não ultrapassa os 15 meses.<sup>3,4</sup> Este facto pode ser parcialmente explicado pela sua natureza invasiva e pela sua resistência a terapêuticas adjuvantes, como a radio e a quimioterapia.<sup>5</sup>

Os gliomas são essencialmente constituídos por 3 tipos de células: astrócitos, oligodendrócitos, ependimócitos ou mistos (astrócitos com oligodendrócitos) de acordo com a Organização Mundial de Saúde.<sup>6</sup> Esta instituição classifica os gliomas em graus histológicos de I-IV, com base no comportamento maligno de cada tumor. Assim os tipos histológicos mais representativos em adultos incluem: astrocitoma (grau I-IV), oligodendroglioma (grau II-III), e oligoastrocitoma (grau II-III).<sup>2,7</sup>

Entre os fatores prognósticos mais relevantes, encontra-se a ressecção tumoral, a idade aquando do diagnóstico e a pontuação obtida na Escala de Performance de Karnofsky (KPS) (Anexo 1).<sup>8,9</sup> A sobrevida também varia significativamente consoante o subtipo de glioma presente, podendo-se considerar que o astrocitoma pilocítico (de grau I), apresenta a maior sobrevida relativa. Por outro lado, como referido anteriormente o glioblastoma tem a menor sobrevida relativa dentro de todos os gliomas.<sup>3,10,11</sup>

De acordo com o ensaio clínico realizado pelo Instituto Nacional de Cancro do Canada, doentes com glioblastoma que receberam temozolomida juntamente com radioterapia pós-operatória, obtiveram um aumento na sobrevida média. Verificou-se que estes doentes possuíam uma sobrevida média no valor de 14.6 meses, comparativamente com 12.1 meses

A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

nos que receberam apenas radioterapia pós-operatória.<sup>12</sup> Desde a publicação destes resultados que a terapêutica combinada com temozolomida e radioterapia fazem parte do esquema *standard* para a terapêutica primária do glioblastoma com base no protocolo de Stupp.<sup>13</sup>

Atualmente a terapêutica cirúrgica ainda permanece como terapêutica de 1ª linha, sendo a ressecção tumoral um dos fatores mais importantes no prognóstico desta patologia.<sup>14,15</sup> É geralmente aceite que quanto mais completa for a ressecção tumoral, melhor será o resultado obtido, desde que as margens de segurança sejam respeitadas.<sup>8,16,17</sup> Para além destes dados, foi demonstrada a potenciação dos efeitos da terapêutica adjuvante (radioquimioterapia) através da citoredução mais completa.<sup>18</sup> No entanto, comprovou-se que com recurso à cirurgia convencional, este tipo de ressecção apenas é possível em menos de 30% dos gliomas diagnosticados por ressonância nuclear magnética (RNM) com uso de contraste.<sup>19-21</sup>

Um importante factor que condiciona a realização deste procedimento, deve-se à dificuldade em distinguir intra-operatoriamente as margens de ressecção tumoral em tempo real. Assim, com vista à resolução deste obstáculo, têm surgido novas técnicas, entre as quais se incluem a RNM intraoperatória, a ecografia intraoperatória, a Tomografia Computorizada (TC) intraoperatória e a cirurgia guiada por fluorescência.<sup>22-29</sup>

Foi neste contexto, que a fluorescência surgiu como um método auxiliar de identificação dos limites tumorais intra-operatoriamente, com o intuito de ajudar na tomada de decisão clínica do neurocirurgião em tempo real. A ressecção de gliomas malignos guiada através da fluorescência foi primeiramente desenvolvida por Stummer *et al.* em 1998, recorrendo à utilização do pró-fármaco Ácido-5-Aminolevulinico (5-ALA).<sup>30,31</sup> A implementação desta técnica é considerada mais simples, prática e barata do que as restantes alternativas acima descritas, não interferindo com as rotinas da prática cirúrgica.<sup>32</sup>

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

O objetivo deste artigo de revisão prende-se com o papel atual e futuro desta técnica na ressecção de gliomas. Não só se pretende realizar uma análise da literatura disponível, relativamente à sua eficácia mas também se procura entender a segurança e os riscos que esta implica. No final deste artigo pretendo concluir se os riscos de ressecções mais completas, recorrendo a esta técnica, são justificáveis ou não.

## **Material e Métodos**

De forma a realizar este artigo de revisão foi consultada a PubMed (www.pubmed.com) como base de dados. Assim recorrendo às seguintes palavras-chave: *Malignant Glioma; Fluorescence Guide Surgery; 5-Aminolevulinic Acid; Complete Resection of the Contrast-Enhancing Tumor; Gross Total Resection*, foi possível abranger artigos desde 1989 a 2014, contendo fontes em literatura inglesa e portuguesa. O facto de este tema, de certa forma, representar uma técnica cirúrgica emergente, condicionou as datas das publicações disponíveis. Encontram-se incluídos artigos de revisão, artigos originais, ensaios clínicos, editoriais, notas técnicas, entre outros.

## **Resultados**

Num processo dinâmico, diferentes pesquisas foram sendo realizadas de acordo com os dados anteriormente recolhidos, dando a direção desejada a uma revisão, estruturada e esclarecedora. Os dados contidos neste artigo de revisão, procuram, sempre que possível, serem apoiados em informações compreendidas em fontes e estudos de metodologia fiável, rigorosa e cujos resultados permitam ao leitor uma correta interpretação e extrapolação dos mesmos.

Dada a extensa e vasta pesquisa efetuada, foi necessário implementar critérios de inclusão com base nas palavras-chave enunciadas acima, na data de publicação do artigo, no autor do mesmo, o tipo de estudo realizado, bem como na sua metodologia e validade. Assim procedeu-se a uma leitura cuidada dos títulos e resumos dos artigos disponíveis, seleccionando 75 artigos que preenchem os critérios atrás enunciados.

Com base na informação que considerei mais relevante em cada artigo, pretendo caracterizar o papel, atual e futuro, do uso da fluorescência intraoperativa na ressecção dos gliomas.

A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

## **Discussão e Conclusão**

### **Metabolismo e mecanismos bioquímicos de 5-ALA**

O 5-ALA é um pro-fármaco que é convertido através do mecanismo de síntese do grupo heme, numa molécula fluorescente protoporfirina IX (PpIX) nas neoplasias intracranianas. O ALA endógeno é formado na mitocôndria através da enzima ALA-sintetase I em glicina e succinil coenzima A pelo ciclo de krebs.<sup>33</sup> Desta forma, o ALA difunde-se para o citosol, local onde sofre modificações enzimáticas através das porfirinas intermediárias (porfobilinogênio, uroporfirinogênio III e coproporfirinogênio III) antes de retornar à mitocôndria. Nesta, a coproporfirinogênio oxidase atua formando o protoporfirinogênio IX que, posteriormente, sofre oxidação pela protoporfirinogênio IX oxidase criando o precursor final do grupo heme, a molécula fluorescente PpIX. Caso esta via prosseguisse a ferrolactase catalisaria a incorporação de ferro para esta molécula, produzindo assim o grupo heme. O ALA exógeno entra no citosol evitando os mecanismos de feedback negativo o que resulta em níveis aumentados de PpIX.<sup>33-35</sup>

Em tecidos sãos, a administração exógena de ALA induz a acumulação de PpIX em estruturas epiteliais e glandulares como a epiderme, mucosa, conjuntiva, endométrio, urotelio, fígado, rim, bexiga e glândulas mamárias.<sup>36</sup> As neoplasias com origem nestas estruturas possuem elevadas concentrações de PpIX. Assim, os tumores primários do cérebro, como os gliomas, sendo de origem neuroectodermica, desenvolvem grandes quantidades de PpIX após a administração de ALA exógeno.

A acumulação desta molécula fluorescente depende do tipo de neoplasia e do ambiente celular local. Nos tumores, ocorrem alterações da expressão e atividade da biossíntese do grupo heme, resultando num aumento na conversão de ALA para PpIX, num aumento do influxo de ALA através da disrupção da barreira hematoencefálica, na alteração de transportes

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

celulares, num aumento da neovascularização, na diminuição do efluxo de PpIX e na diminuição do metabolismo e conversão do PpIX para heme.<sup>34,37</sup>

O seu aumento é favorecido pela presença de acidose, hipoglicémia e hipertermia e diminuído na presença de hipoxia.<sup>33,38-40</sup> Nos gliomas, demonstrou-se que a acumulação de PpIX está relacionada com um aumento da proliferação celular, do ciclo celular e da densidade ótima de cultura celular.<sup>41-44</sup>

Por outro lado, existem fatores que influenciam o efluxo de ALA do líquido cefalorraquidiano. Este processo ocorre nos plexos coróides através do transportador de peptídeo 2. Comprovou-se que este se encontra francamente reduzido nos glioblastomas fluorescentes, apresentando níveis mais elevados nos gliomas de baixo grau comparativamente aos de alto grau.<sup>45,46</sup> Esta poderá ser uma possível explicação para o facto de os gliomas de baixo grau apresentarem menores intensidades de fluorescência, relativamente aos de alto grau, como veremos adiante.

Todos estes mecanismos que possibilitam a emissão de fluorescência do PpIX nos gliomas encontram-se sobre intensa discussão. No entanto, apesar de ainda não serem totalmente conhecidos, pensa-se que existem outros fatores locais que influenciam a formação de PpIX.

Com base em alterações enzimáticas, duas estratégias tem vindo a ser adotadas: a terapêutica de diferenciação e a de quelação de ferro, de forma a potenciar a produção de PpIX. A primeira (inclui a dexametasona, ácido retinóico e a vitamina D) demonstrou um aumento da concentração de PpIX em células prostáticas e queratinócitos, através de uma elevação de produção e de uma redução da fração de células com baixa concentração deste produto.<sup>1,47-49</sup> Uma possível explicação para este processo passa pelo aumento dos níveis da enzima coproporfirinogénio oxidase.<sup>1,47</sup>

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

Relativamente à terapêutica com quelação de ferro, ocorre uma redução da concentração de ferro disponível e conseqüentemente uma diminuição dos níveis da enzima ferrolactase, pelo que ocorre menor conversão de PpIX em heme.<sup>50,51</sup>

### **Aplicação e dosagem de ácido-5-aminolevulinico**

A dose atualmente utilizada é a de 20 mg/kg de 5-ALA, juntamente com dexametasona (4 mg 3 vezes por dia, durante 2 dias). Esta dosagem foi determinada após um estudo randomizado, duplamente cego em que três doses foram testadas (0.2 mg, 2 mg e 20 mg).<sup>34</sup> O mesmo estudo não demonstrou diferenças nos efeitos secundários deste fármaco. A dose ótima para atingir o valor máximo de fluorescência, sem afetar o tecido cerebral normal, ainda não foi determinada, sendo necessário realizar um maior número de estudos nesta área. No entanto a fluorescência demonstrada com a dose de 20 mg/kg, tem sido adequada para a detecção e ressecção dos gliomas.<sup>4</sup>

Nos protocolos clínicos o fármaco é administrado duas a três horas antes da indução anestésica por via oral, sendo dissolvido em 50 ml de água.<sup>4</sup> O valor máximo de fluorescência é atingido três horas após a indução anestésica, permitindo tempo suficiente para iniciar a cirurgia de ressecção tumoral.<sup>17</sup> No entanto, Stummer *et al.* relatam ter observado níveis de fluorescência 12-16 horas após a administração de ALA, não tendo encontrando níveis de fluorescência inferiores. Até ao momento não são conhecidas interações entre este fármaco e a indução anestésica.<sup>4</sup>

### **Deteção da fluorescência de PpIX**

De forma a produzir fluorescência, a molécula de PpIX tem de ser excitada por uma “luz azul” de comprimentos de onda de cerca de 375-440 nm.<sup>34,52-54</sup> Como resultado, a molécula emite uma cor vermelha com comprimentos de onda na ordem dos 620 a 710 nm.<sup>52-</sup>

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

<sup>54</sup> Quanto maior for a concentração intracelular de PpIX, maior será a intensidade gerada pela fluorescência.<sup>55,56</sup> A fluorescência diminui cerca de 36% a cada 25 min sob luz azul e 87 min sob luz branca.<sup>4</sup> Este fenômeno, conhecido como *photobleaching*, ocorre devido à degradação do fluorofore como consequência da exposição à luz. Este efeito reveste-se de particular importância nas margens do tumor, onde as concentrações de PpIX são menores, pelo que uma exposição demasiado prolongada à luz, pode conduzir à perda de fluorescência dessas mesmas zonas.<sup>4</sup> Nesta situação, a fluorescência pode ser restabelecida por sucção e remoção das camadas mais superficiais.<sup>4</sup> A intensidade da fluorescência também diminui quanto maior for a distância entre a fonte de luz e o tumor, uma vez que o poder de penetração da luz azul usada para estimular o tecido tumoral a emitir fluorescência é muito pequeno, assim tumores mais profundos serão de difícil visualização.<sup>4,32,54</sup>

Esta técnica poderá causar fotossensibilidade no tecido cerebral normal. No entanto, os baixos níveis de PpIX e os baixos níveis de energia fornecida pelo microscópio adaptado são insuficientes para gerar fototoxicidade cerebral.<sup>4</sup> De forma a obter uma maior sensibilidade, o ambiente na sala operatória deverá ser de luminosidade reduzida, desligando as lâmpadas de néon e direcionando as luzes cirúrgicas para fora do campo cirúrgico.<sup>4</sup> Estas medidas são essenciais para evitar que o tecido cerebral normal possa apresentar fluorescência vermelha, levando o neurocirurgião a ressecar tecido sã.

### **Procedimento Cirúrgico**

A cirurgia decorre da mesma forma de que se tratasse de um procedimento cirúrgico sem a aplicação de 5-ALA. Quer isto dizer que, à parte da administração deste fármaco e dos cuidados necessários a ter com a luz ambiente e cirúrgica, todo o procedimento decorre com relativa normalidade. Uma vez que a fluorescência, por norma, não atinge a superfície

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

craniana, a neuronavegação continua a ser uma técnica muito útil para o planejamento da craniotomia ou para determinar a localização dos tumores mais profundos.<sup>4</sup>

É na ressecção das margens tumorais que a fluorescência emitida pelo PpIX se torna particularmente vantajosa, sendo fundamental para que o neurocirurgião consiga distinguir em tempo real, o tecido cerebral normal do tecido tumoral invasivo e, desta forma, conseguir uma excisão tumoral completa.

Este é um processo dinâmico que envolve a troca constante entre “luz branca” e “luz azul” (375-440 nm), visto que a fluorescência apenas surge quando o PpIX se encontra diretamente iluminado pela “luz azul”. Significa isto, que a presença de sangue ou de outros tecidos interposta entre o glioma e a fonte de luz pode impedir a emissão de fluorescência. Logo é de extrema importância que o neurocirurgião efetue uma correta e ampla observação da cavidade tumoral sob “luz azul”, excluindo assim eventual tumor residual. A ausência desta exploração sob “luz azul” é a causa mais comum para a presença de tecido tumoral residual não ressecado.<sup>4</sup>

Quando se trata da visualização da fluorescência emitida, existem diferentes níveis de intensidade provocados pela presença de distintos tipos de células e de tecidos. De uma forma subjetiva, Stummer *et al.* e Hefti *et al.* classificaram a intensidade em áreas vermelhas, de intensidade forte, e em áreas cor-de-rosa, vagas, de intensidade fraca.<sup>30,52</sup> Num estudo em 2008, Hefti *et al.* classificaram as amostras recolhidas, sob “luz azul” e sob “luz branca” de acordo com a opinião subjetiva do cirurgião responsável. De seguida, a localização exata destas amostras foi registada em RNM pré-operatórias e, quando disponível, em imagens de Tomografia por Emissão de Positrões 18Fluoro-Etil-Tirosina (PET-18F). A correlação entre a histologia das amostras recolhidas, a sua intensidade de fluorescência (solida ou vaga), a sua aparência sob luz convencional (tecido cerebral normal, tumor provável, tumor ou necrose) e a sua apresentação na RNM, possibilitou atingir um valor estimado para a sensibilidade e

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

especificidade das diferentes modalidades. Assim, este grupo de trabalho apresentou uma sensibilidade de 98% e especificidade de 100% para as zonas de fluorescência vermelha, contrastando com uma sensibilidade de 76% e especificidade de 85% para as zonas cor-de-rosa. Contudo, estes valores são contudo superiores, quando comparados com os obtidos na cirurgia convencional com recurso à neuronavegação (especificidade 68% e sensibilidade 66%)<sup>52,57</sup>

No entanto, Díez *et al.* (2011) demonstraram uma melhoria nos resultados anteriormente publicados, em que as áreas vermelhas apresentam um valor preditivo positivo de 100% com uma sensibilidade de 85.7%, para gliomas de alto grau, e uma especificidade de 100%.<sup>41,42</sup> O mesmo estudo avaliou o valor preditivo positivo, a sensibilidade e especificidade da área rosada, cujos valores foram de 97, 85.4 e 92.3%, respetivamente.<sup>41,42</sup>

Neste estudo anatomo-patológico, o grupo realizou biopsias das diferentes zonas de fluorescência (zona vermelha e zona cor-de-rosa) e áreas não fluorescentes. Numa análise histológica, as áreas de fluorescência com forte intensidade, foram todas positivas para tumor sólido, compatível com GBM. Das 61 amostras recolhidas de áreas de fluorescência vaga, apenas duas evidenciaram a presença de tecido cerebral normal, enquanto 59 mostraram tecido anormal, com graus de atipia e hiperplasticidade diferentes, sendo que destas 5 comprovaram a existência de GBM. As áreas de fluorescência vagas, na sua maioria, correspondiam a zonas de infiltração tumoral difusa e não a zonas tumorais sólidas. As diferenças encontradas entre as áreas vermelhas e as cor-de-rosa foram estatisticamente significativas com  $P < 0.001$  segundo o teste de Mann-Whitney. Os autores efetuaram ainda 45 biopsias de zonas não fluorescentes, adjacentes à margem entre a região fluorescente e não fluorescente. Destas, 30 (67%) comprovaram a existência de tecido cerebral normal. Por outro lado 15 (33.3%) demonstraram a existência de diferentes graus de atipia e hiperplasticidade.<sup>42</sup>

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

No seguimento da análise histológica realizada, procedeu-se ao cálculo do índice mitótico recorrendo ao Ki 67. Assim para áreas fluorescentes sólidas o valor foi de 23.9%, contrastando com 6.4% em áreas vagas e 1.7% em zonas não fluorescentes estas diferenças relatadas foram estatisticamente significativas. Verificou-se ainda, uma correlação significativa entre a fluorescência e o índice mitótico segundo o teste de Spearman.<sup>42</sup>

Meses mais tarde, com base nos resultados em cima obtidos, Hefti *et al.* efetuou biopsias das diferentes zonas de fluorescência (zona vermelha e zona cor-de-rosa) e zona não fluorescente.<sup>41</sup> Das 72 amostras recolhidas de áreas fluorescentes vermelhas, todas corresponderam ao diagnóstico histológico de GBM. Nas áreas cor-de-rosa, foram retiradas 73 amostras, sendo que apenas duas delas não apresentavam patologia tumoral. Por fim, das 36 amostras recebidas de áreas não fluorescentes adjacentes a zonas cor-de-rosa, 66% foram consideradas como tecido cerebral normal e os restantes 33% como anormais, apresentando algumas células atípicas ou um ligeiro aumento na densidade celular.<sup>41</sup>

No mesmo ano, o grupo de Robert *et al.* realizou um estudo com 11 doentes diagnosticados com glioblastoma multiforme, cujo objetivo seria analisar a correlação entre a fluorescência intra-operatória e RNM pré-operatória, bem como entre a fluorescência detetada e os resultados histopatológicos. Os resultados obtidos, relativamente à capacidade de a fluorescência emitida identificar as áreas tumorais, foram os seguintes: sensibilidade de 75%, especificidade 71%, valor preditivo positivo de 95% e valor preditivo negativo de 26%.<sup>58</sup>

Estes resultados apontam para uma limitação importante desta técnica, sendo necessário melhorar a deteção da fluorescência intra-operatoriamente, de forma a obter melhor sensibilidade e especificidade das zonas cor-de-rosa e consequentemente maiores taxas de ressecções completas, como demonstrado por Valdes *et al* através de um estudo, no qual se realizou o doseamento quantitativo *ex vivo* de PpIX com índice proliferativo e graus

A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

histopatológicos de gliomas em 23 doentes submetidos a ressecção tumoral guiada por fluorescência.<sup>59</sup>

Neste, as amostras correspondentes a zonas fluorescentes intra-operatoriamente, evidenciaram níveis significativamente superiores de PpIX e de proliferação celular, estando correlacionadas com áreas de malignidade. No entanto, uma grande parte das biopsias que comprovaram a existência de tumor em áreas não fluorescentes apresentavam níveis de PpIX superiores a 0.1 µg/ml, o que significa que os métodos utilizados para detecção de PpIX não são suficientemente eficazes.<sup>59</sup>

Nesta linha de pensamento, Valdes *et al.* recorrendo a um espectrómetro, para doseamento quantitativo *in vivo* da fluorescência emitida, realizaram um estudo idêntico ao anterior em 14 doentes com gliomas de baixo e alto grau. Para todos os tumores encontraram um valor de sensibilidade de 84%, especificidade de 92%, valor preditivo positivo de 95% e valor preditivo negativo de 77%.<sup>60</sup>

Num estudo de fase II conduzido por Nabavi *et al.* com o intuito de avaliar a viabilidade desta técnica na ressecção de gliomas recorrentes, foi comprovado que a terapêutica prévia com radio ou quimioterapia não altera a fluorescência tumoral induzida pelo 5-ALA.<sup>61</sup>

Com base nos valores encontrados nestes estudos o neurocirurgião pode, na melhor evidência, entender que as áreas vermelhas correspondem a tumor, podendo ser ressecadas, mesmo em áreas eloquentes e que as zonas de coloração cor-de-rosa correspondem a áreas onde ocorre invasão tumoral no tecido cerebral.

Como em qualquer procedimento cirúrgico, a tomada de decisão do cirurgião deverá ser fundamentada na maior e mais completa informação possível. A ressecção guiada pela fluorescência do PpIX é apenas uma técnica adjuvante, que pretende facilitar a discriminação da área tumoral e não substituir o conhecimento neuroanatômico, de vascularização local,

A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

nem da função das áreas cerebrais afetadas.<sup>4</sup> O local até onde ressecar fica reservado para a decisão do neurocirurgião, com base na informação conjugada pelas mais diferentes técnicas utilizadas (clínica e imagiologia pré-operatória, RNM funcional, PET e eletrofisiologia).

### **Extensão da ressecção tumoral**

À luz dos conhecimentos atuais, o tratamento que oferece melhor prognóstico aos doentes que apresentam gliomas malignos é a ressecção tumoral em conjunto com a radio e quimioterapia adjuvante. A cirurgia não só melhora a sobrevida, como pode ter um efeito potencializador da eficácia das terapêuticas adjuvantes.<sup>62</sup> Com base em estudos mais recentes, tem sido sugerido que o objetivo deve passar por obter a máxima ressecção segura possível<sup>8,17,46,63,64</sup>.

De forma a avaliar o impacto desta emergente técnica cirúrgica na extensão da ressecção tumoral, quatro estudos foram efetuados. Três deles foram executados pelo grupo *ALA-Glioma Study*.

Stummer *et al.* realizaram um estudo prospectivo em que 52 doentes foram submetidos à excisão de glioblastoma multiforme, guiada por fluorescência induzida pelo 5-ALA, demonstrando um acréscimo na ressecção radical destes tumores (63%), diminuição do tumor residual e aumento da sobrevida média. Este estudo demonstrou ainda maior sensibilidade na deteção de tumor residual *in vivo* comparativamente com a RNM com contraste pós-operatória.<sup>30</sup>

Através de um ensaio clínico de fase III em 2006, o mesmo grupo, veio reforçar a importância de atingir uma ressecção tumoral radical. A sobrevida média aumentou para 16.7 meses em doentes sujeitos a ressecção radical, comparativamente com 11.8 meses em doentes em que apenas foi possível realizar ressecções parciais. Este efeito verificou-se independentemente da técnica utilizada para obter uma ressecção radical, providenciando uma

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

evidência de nível 2b de que a ressecção completa melhora a sobrevida.<sup>53</sup> Ficou ainda comprovado, que doentes sob terapêutica adjuvante com temozolomida, obtinham melhores resultados quando submetidos a uma ressecção tumoral radical.<sup>12</sup>

Neste estudo, 322 doentes com suspeita diagnóstica de glioma maligno de alto grau, foram randomizados em dois braços de investigação distintos: metade (161) integrou o ramo da cirurgia convencional com o uso de “luz branca” e a outra metade foi sujeita a ressecção guiada pela fluorescência emitida pelo PpIX. Aos doentes do grupo 5-ALA foi-lhes administrado o fármaco três horas antes da indução de anestesia, de acordo com o protocolo acima descrito. Todos os doentes, independentemente do grupo em que se encontravam, receberam dexametasona 4 mg, três vezes ao dia, pelo menos dois dias antes da cirurgia e continuada até à obtenção da RNM às 72 horas pós-operatórias. Os neurocirurgiões efetuaram a máxima ressecção segura possível, com base nos meios imagiológicos disponíveis e na sua experiência clínica. No pós-operatório, todos os doentes foram submetidos a protocolo *standard* de radioterapia fracionada nos primeiros 14 dias. Apenas os doentes que mostraram suscetibilidade à quimioterapia, definida como a presença de metilação do gene 06-Metilguanina-DNA-Metiltransferase, foram sujeitos à mesma.<sup>53,65,66</sup>

Posteriormente foi realizada uma RNM às 72 horas e aos 3, 6, 9, 12, 15 e 18 meses pós-operatório. De forma a evitar viés, a análise volumétrica imagiológica foi efetuada por radiologistas sem conhecimento do procedimento utilizado.

No entanto, 52 doentes foram excluídos do estudo por diversas razões, sendo que ficaram 139 no ramo ALA e 131 no ramo convencional. É importante salientar que dos 270 doentes incluídos neste estudo, 261 (97%) apresentavam um glioma de grau IV. O seguimento destes doentes ocorreu durante 35.4 meses, pretendendo avaliar os seguintes parâmetros: incidência de ressecções completas, sobrevida livre de progressão aos 6 meses, tempo percorrido até reintervenção, volume tumoral residual, sobrevida e morbidade.

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

Este estudo, considerando a ressecção radical, como volume tumoral residual inferior a  $0.175 \text{ cm}^3$  presente na RNM pós-operatória, mostrou uma taxa de ressecção radical de 65% comparada com 36% no grupo sujeito a cirurgia convencional. Demonstrou-se assim, uma redução global de 29% ( $p=0.0001$ ) no número de doentes com tumor residual na RNM às 72 horas no ramo ALA relativamente ao ramo submetido à cirurgia convencional.<sup>53</sup>

Relativamente à sobrevida livre de progressão, definida como a proporção de doentes sem progressão radiológica aos 6 meses (ocorrência de novas lesões tumorais com volume superior a  $0.175 \text{ cm}^3$  ou aumento em 25% ou mais no volume residual tumoral), mostrou um aumento no grupo 5-ALA de 41%, enquanto no grupo convencional esse aumento foi de apenas 21%.<sup>53</sup> No entanto, a sobrevida não demonstrou melhorias estatisticamente significativas.

Por fim, este estudo mostrou ainda que os doentes submetidos a cirurgia com recurso ao 5-ALA foram sujeitos a menos reintervenções, nomeadamente entre os doentes com mais de 55 anos (10.2 meses no grupo 5-ALA contra 7.1 meses no grupo de cirurgia convencional).<sup>53</sup>

Posteriormente, Stummer *et al.* (2011), mostraram que a percentagem de doentes sem tumor residual na RNM às 72 horas era bastante superior nos doentes em que a técnica de fluorescência foi utilizada (63.6%), comparativamente aos doentes submetidos a cirurgia convencional (37.6%).<sup>32</sup>

Díez *et al.* (2011) apresentaram resultados ainda mais impressionantes com taxas de ressecção em 83.3% dos doentes, sendo a ressecção superior a 98% do volume e o volume médio ressecado de 99.8% recorrendo ao auxílio da fluorescência do PpIX.<sup>41</sup>

### **Morbilidade e segurança**

Levanta-se uma questão sobre a segurança desta técnica, afinal até que ponto podemos ressecar o tumor, com base na fluorescência emitida, sem provocar danos neurológicos? Existem poucos estudos randomizados com o objetivo de avaliar esta questão. No entanto, com base na análise de ensaios clínicos realizados sobre a extensão da ressecção tumoral orientada pela fluorescência emitida pelo PpIX, algumas conclusões começam a ganhar forma.

Numa análise dos resultados obtidos no ensaio clínico de fase III sobre o estudo do 5-ALA, Stummer *et al.* investigaram os danos neurológicos dos doentes em ambos os ramos do estudo. Para isto, recorreram ao KPS e ao *National Institutes of Health Stroke Scale* (NIH-SS). A primeira pretende avaliar o estado físico geral do doente, tendo sido realizada às 6 semanas e aos 3, 6, 9, 12, 15 e 18 meses. A NIH-SS (Anexo 2) avalia 15 funções neurológicas, variando desde 0 (funções otimizadas) a 36 (pior estado) pontos.<sup>32</sup> Esta foi efetuada ao segundo e sétimo dia pós-operatório, às 6 semanas e aos 3, 6, 9, 12, 15 e 18 meses.<sup>32</sup>

Assim, dentro das primeiras 48 horas pós-operatórias, 26% dos doentes com ressecção guiada por fluorescência pioraram neurologicamente em 1 a 3 pontos, na escala NIH-SS, comparativamente com 14.5% nos doentes submetidos a cirurgia convencional. No entanto, esta deterioração não provocou alterações na escala KPS, e não houve diferenças estatisticamente significativas em ambas as escalas ao sétimo dia, às 6 semanas ou aos 6 meses. Por outro lado, a deterioração às 48 horas, na escala NIH-SS, em 1 ponto ou mais, foi observada em 26.2% dos doentes no grupo ALA, contra 14.5% dos doentes no ramo convencional, sendo esta uma diferença estatisticamente significativa. Contudo aos 6 meses, o ramo ALA apresentava uma menor frequência de deterioração neurológica relativamente ao ponto de partida pré-operatório. O grupo ALA demonstrou ainda, que estes défices apenas

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

ocorreram em doentes que já apresentavam défices neurológicos de base e que não responderam à administração de corticosteroides.<sup>32</sup>

É possível que a ressecção de zonas de fluorescência cor-de-rosa em áreas eloquentes, seja a causa do aumento desta morbidade. Assim, o mesmo grupo investigou esta hipótese através de um estudo randomizado em que a “progressão” foi definida como o aumento de um ponto na escala de NIH-SS ou progressão tumoral documentada em meios imagiológicos. Ainda assim, o ramo ALA demonstrou um aumento (46%) na sobrevida livre de progressão relativamente ao ramo da cirurgia convencional (29%) ( $p=0.0331$ ).<sup>32</sup>

No mesmo seguimento, uma análise, independente do método utilizado, mostrou que os doentes em que foi possível realizar uma ressecção mais completa, levavam mais tempo a progredir na escala NIH-SS comparativamente com os doentes submetidos a ressecção incompleta (ao fim de 6 meses a taxa era de 76.6%. contra 66.2%;  $p=0.0036$ ).<sup>32</sup>

Díez Valle *et al.* (2011) apresentaram resultados semelhantes ao grupo “*Glioma ALA study*”, 25% dos pacientes demonstraram morbidade pós-operativa imediata, mas passado um mês a percentagem de doentes afetados diminuiu para 8.2%.<sup>41</sup> Mais recentemente, Díez Valle *et al.* (2013) realizaram um ensaio clínico, com o objetivo de avaliar se os doentes com tecido fluorescente residual, apresentavam um pior prognóstico comparativamente com os casos submetidos a ressecção radical. A morbidade encontrada ao fim de um mês pós-operatório foi de 8% para o grupo com tecido fluorescente residual contra 18.5% para o grupo sujeito a ressecção radical.<sup>67</sup> Esta diferença não foi estatisticamente significativa, ainda assim pode-se afirmar que existe um maior risco associado a ressecções mais completas. Estes resultados estão de acordo com as séries recentemente publicadas, como na investigação conduzida por *Stummer et al.* em que a taxa de morbidade às 6 semanas foi de 17.1%, comparativamente com 11.3% do ramo de cirurgia convencional ( $p=0.29$ ).<sup>32</sup>

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

Estes dados sugerem que quanto mais completa for a ressecção tumoral, melhor será o prognóstico do doente, apesar de se verificar uma deterioração significativa mas transitória das funções neurológicas após a cirurgia.

Entre os eventos adversos que ocorreram, incluem-se a fotossensibilidade, náuseas e vômitos, hipotensão moderada e alterações hepáticas. A fotossensibilidade pode ser provocada por uma exposição direta de luz durante 24 horas após a administração do 5-ALA. Recomenda-se a proteção da pele e dos olhos, durante toda a cirurgia e até um período de 24 a 48 horas, da iluminação intensa.<sup>4,68</sup> Stummer *et al.* identificaram o tempo que decorre entre a indução da anestesia e a preparação do doente, como o período de maior suscetibilidade a este efeito. Portanto, apenas são necessários baixos níveis de iluminação, durante a preparação cirúrgica e no período pós-operatório.<sup>4,69</sup> Utilizando estas precauções, não se registaram qualquer tipo de queimaduras cutâneas mas encontram-se documentados diversos casos de rubor moderado (durante 2 a 3 dias).<sup>4</sup> Desta forma o 5-ALA não deverá ser administrado em doentes com porfirias adquiridas ou hereditárias, durante a gravidez, nem juntamente com outras substâncias fototóxicas, como as tetraciclina, sulfonamidas, fluoroquinolonas ou fármacos porfirinogénicos.<sup>34</sup>

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos relativamente a exames complementares laboratoriais, exceto às 24 horas pós-operatórias em que a gama-glutamil transferase, a transaminase glutâmico oxalacética e a transaminase glutâmico pirúvica apresentavam valores superiores nos doentes do ramo 5-ALA, comparativamente com os restantes.

Dada a maior taxa de ressecção tumoral radical a incidência de eventos adversos no ensaio clínico multicêntrico de fase III foi de 58.7% no ramo ALA, contra 57.8% na cirurgia convencional segundo Stummer *et al.* ( $p=0.74$ ).<sup>32</sup> Verificou-se ainda, que a incidência de eventos adversos graves foi de 29.9% nos doentes submetidos a ressecção guiada por

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

fluorescência, comparativamente com 23.1% nos restantes doentes. Esta diferença não foi estatisticamente significativa, com exceção da hipertensão intracraniana que mostrou ocorrer maior frequência na cirurgia convencional (2.3% contra 0%,  $p=0.04$ ). Por outro lado a afasia foi mais frequente no grupo ALA (3.5% contra 0.6%,  $p=0.07$ ).<sup>32</sup>

Nabavi *et al.* apresentaram resultados idênticos num estudo clínico de fase II, tendo obtido uma incidência de eventos adversos de 58%, sendo os défices neurológicos (motores ou linguísticos) os principais responsáveis (36%). Registaram ainda 11% de eventos adversos graves, como hemiparesia e hemiplegia.<sup>61</sup>

## Fluorescência emitida de acordo com o grau do glioma

Os dados atuais sugerem que a acumulação de PpIX seja superior nos gliomas de alto grau do que nos de baixo grau. Este facto pensa-se que possa ser explicado devido a um aumento da proliferação celular, da disrupção da barreira hematoencefálica, da neovascularização, da diferença de expressão de transportadores membranares e de enzimas intracelulares.<sup>53,70</sup> Mesmo entre os diferentes gliomas de alto grau, a concentração desta substância difere, sendo superior nos de grau IV, como o glioblastoma, comparado com os de grau III, como por exemplo astrocitomas anaplásicos ou oligodendroglioma anaplásicos.<sup>55</sup>

No entanto, nos gliomas de baixo grau (I e II), a emissão de fluorescência macroscopicamente visível pelo 5-ALA é rara, pelo que esta técnica não deverá ser utilizada sem se recorrer a outros exames complementares como RNM ou a ecografia intra-operatórias. N. Sanai *et al.* realizaram um estudo com 10 doentes, cujo objetivo seria avaliar a visibilidade de fluorescência em gliomas de baixo grau, através do uso de um microscópio confocal.<sup>71</sup>

Posteriormente, foram recolhidas amostras do tecido analisado *in vivo* para poderem ser analisadas *ex vivo* através de meios histológico e sob o microscópio confocal. Não foi possível observar fluorescência tumoral a um nível macroscópico contudo, a nível

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

microscópico foi possível identificar a emissão de fluorescência intracelular em áreas infiltrativas. Os autores comprovaram que todo o presumível tumor emitia fluorescência identificável microscopicamente e que esta não se encontrava presente no tecido cerebral normal. Provaram ainda, a existência de uma forte correlação entre a análise de amostras de tecido *in vivo* e *ex vivo*.<sup>71</sup>

Existem ainda muitas questões por responder limitadas pela reduzida dimensão desta amostra, pelo que novos ensaios clínicos são necessários para avaliar a verdadeira segurança e eficácia desta técnica em gliomas de baixo grau. Neste sentido, foi iniciado um estudo “*The Barrow ALA Intraoperative Confocal Evaluation*” (*BALANCE*) pelos mesmos autores.<sup>71</sup>

### **Limitações e Vantagens**

Os gliomas de alto grau são caracterizados por uma grande heterogeneidade, apresentando áreas de baixo grau de diferenciação, alternadas com zonas de elevada proliferação celular e necrose. A região necrosada não emite fluorescência pelo que, caso se optasse por uma ressecção meramente baseada nesta técnica, seria impossível atingir o objetivo de ressecção tumoral radical. Felizmente, as áreas de necrose são visíveis sob visualização direta com luz normal, pelo que as duas técnicas se complementam.

Frequentemente, encontra-se uma lesão tumoral satélite afastada da massa tumoral principal. Uma vez que a luz ultravioleta (375-440 nm) usada para estimular a emissão de fluorescência, apenas possui um poder de penetração na ordem dos 0.5 mm da superfície, a maioria destas lesões satélites não seriam detetadas. A interposição de tecidos, fluidos ou outras substâncias entre o tumor e a fonte emissora de luz, representa uma limitação desta técnica, no sentido em que o poder de penetração é insuficiente para ultrapassar as barreiras interpostas. Surge assim um problema com tumores mais profundos, os quais tem maiores dificuldades em receber a luz necessária para emitir fluorescência detetável.<sup>4,54</sup>

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

Coloca-se ainda a questão de poderem existir casos, histologicamente comprovados de gliomas, que não emitam fluorescência após a administração do 5-ALA. Este aspeto ocorre com frequência nos gliomas de baixo grau, como descrito acima. No entanto, Hefti *et al.* relataram um caso de um doente com glioblastoma multiforme, histologicamente diagnosticado, que não apresentou fluorescência aquando da cirurgia.<sup>52</sup> Tratava-se de uma reintervenção num doente previamente sujeito a radio e quimioterapia concomitante levantando assim a questão sobre o papel das terapêuticas adjuvantes na interação com a administração de 5-ALA e consequente deteção de fluorescência.<sup>52</sup>

Outra limitação prende-se com as zonas de vaga fluorescência com a sua especificidade e sensibilidade, bem como a subjetividade na distinção entre o que são zonas vagas/cor-de-rosa e zonas sólidas/vermelhas. Neste campo estão a ser efetuados estudos recorrendo à quantificação da energia emitida pelas diferentes zonas. Hefti *et al.* concluíram que áreas de fluorescência fraca podem ser definidas como zonas que emitem entre 15 a 30% da fluorescência máxima emitida pelo tumor.<sup>52</sup>

Por outro lado, as vantagens desta técnica residem na sua facilidade de implementação, sendo facilmente adaptadas à rotina do neurocirurgião durante a cirurgia. Apresenta-se como uma alternativa segura, com poucos eventos adversos, exigindo apenas pequenas precauções de forma a evitar a fotossensibilidade dos tecidos.

Adicionalmente, ao contrário de outras técnicas adjuvantes, a resseção guiada por fluorescência permite a visualização de margens tumorais intra-operatoriamente em tempo real, sem sofrer o efeito de *brain shift* (uma deformação cerebral que ocorre durante a cirurgia, após a craniotomia, devido a inúmeros fatores especialmente o posicionamento do doente, edema cerebral ou devido a diferentes abordagens cirúrgicas) que ocorre na neuronavegação e com custos aceitáveis comparativamente à RNM intra-operatória.<sup>72</sup>

### **Aplicações futuras**

A ressecção guiada através da fluorescência é um processo muito recente, sendo extremamente promissor como uma ferramenta essencial para atingir maiores taxas de ressecção radical, com a menor morbidade possível. À medida que a tecnologia se desenvolve e se adapta às necessidades na identificação tumoral pela emissão de fluorescência do 5-ALA, assistimos à melhoria da sua sensibilidade e especificidade na caracterização da fronteira entre patologia tumoral e tecido cerebral normal.

Ainda assim, são necessários mais estudos sobre os mecanismos subjacentes à eficácia e à segurança da ressecção tumoral através da emissão de fluorescência. Uma possível direção de futuros estudos poderá passar pela quantificação e correlação entre a fluorescência detetada e a sua histopatologia, uma vez que a variabilidade da intensidade da fluorescência emitida pelo PpIX conduz a uma classificação subjetiva entre áreas de fluorescência sólida e vaga. De forma a reduzir esta subjetividade, são necessárias novas abordagens que permitam a quantificação em tempo real da intensidade da fluorescência ou que possibilitem uma melhor definição da fluorescência emitida. Assim, as zonas de fluorescência vaga, que geralmente correspondem a margens tumorais, ainda levantam dúvidas relativamente à sua ressecção. Apenas uma melhor caracterização das margens tumorais através da quantificação da fluorescência emitida poderá confirmar a potencialidade desta técnica na distinção intra-operatória dos locais de invasão tumoral ressecáveis, permitindo atingir uma maior taxa de ressecção radical.

Por outro lado, estão a surgir novas formas terapêuticas com base nesta técnica. Entre elas, a terapia fotodinâmica em que a destruição tumoral pode ser realizada através da emissão de um feixe de luz de alta energia que excita e destrói o PpIX, induzindo lesões significativas nas células dos gliomas.<sup>73,74</sup> Também estão a ser realizadas investigações farmacológicas com

A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

o intuito de utilizar o 5-ALA como um veículo transportador seletivo para produtos citotóxicos.<sup>75</sup>

Será expectável que ocorra um rápido desenvolvimento nos equipamentos requeridos por esta tecnologia, nomeadamente na adaptação de microscópicos cirúrgicos com provável integração de espectrómetros para quantificação da fluorescência emitida. Este avanço poderá permitir uma maior taxa de resseções completas, tornando a cirurgia guiada por fluorescência uma prática comum e diária na neurocirurgia.

### **Conclusão**

Com base na literatura disponível, podemos afirmar que a cirurgia guiada pelo 5-ALA é mais convincente do que a cirurgia convencional guiada por neuronavegação, na deteção das margens tumorais intra-operatoriamente, permitindo maiores taxas de resseção completa, ao mesmo tempo que aumenta a sobrevivência dos doentes, proporcionando-lhes uma melhor qualidade de vida.

A fluorescência emitida pelo PpIX melhora os resultados obtidos, quando o objetivo passa pela máxima resseção tumoral, de forma segura nos gliomas de alto grau. A sua especificidade e sensibilidade em zonas de fluorescência vermelha são muito elevadas, algo que contrasta com os valores obtidos em áreas onde a fluorescência é vaga. Ainda assim, recorrendo ao uso de espectrómetros para uma análise quantitativa da fluorescência emitida nestas áreas, é possível obter valores de especificidade e sensibilidade suficientemente elevados para que o neurocirurgião possa confiar na fidedignidade desta técnica.

Para se poder introduzir esta técnica na prática neurocirúrgica é necessário um conhecimento prévio dos mecanismos e características bioquímicas do 5-ALA, bem como um microscópio adaptado (com emissão de luz azul e um filtro de espectro) e ligeiras precauções de forma a evitar fotossensibilidade dos tecidos.

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

A ressecção guiada pela fluorescência, permite ao neurocirurgião distinguir de forma mais precisa as margens do glioma intra-operatoriamente, e assim aumentar a incidência de ressecções tumorais radicais. Ao atingir este objetivo o doente é submetido a um menor número de reintervenções, apresentando maior sobrevida média e melhor resposta às terapêuticas adjuvantes como a quimioterapia e a radioterapia.

Relativamente à segurança da ressecção guiada pela fluorescência emitida pelo PpIX, os défices neurológicos transitórios provocados por uma ressecção mais extensa são compensados pelos benefícios a longo prazo para os doentes e justificados pelo uso de técnicas modernas, como a cirurgia guiada por fluorescência. Entre os doentes submetidos a citorredução, apenas se encontram sob risco os que não tenham respondido ao tratamento com esteroides ou que já apresentassem défices neurológicos de base.

No entanto, é necessário melhorar alguns aspetos, nomeadamente a resolução de imagem e as características ergonómicas dos instrumentos requeridos e a aplicação desta técnica em gliomas de baixo grau.

Investigações futuras sobre gliomas malignos deveram continuar a recolher mais dados sobre a eficácia, segurança e a implementação da fluorescência na ressecção tumoral, para que desta forma seja possível realizar avaliações sobre a relação entre extensão da ressecção realizada e os efeitos benéficos que esta permite.

Em suma, com base no contexto clínico e na integração do resultado dos mais variados exames complementares de diagnóstico e terapêuticos disponíveis, a decisão final pertence ao neurocirurgião. A cirurgia guiada pela fluorescência apresenta-se apenas como uma técnica auxiliar, não devendo ser utilizada em regime de exclusividade mas sim no contexto de outros métodos complementares que forneçam informação acessória.

**Anexos**

**Anexo 1 – Escala de Performance de Karnofsky**

(<http://www.hospicepatients.org/karnofsky.html>)

Able to carry on normal activity and to work; no special care needed.	100	Normal no complaints; no evidence of disease.
	90	Able to carry on normal activity; minor signs or symptoms of disease.
	80	Normal activity with effort; some signs or symptoms of disease.
Unable to work; able to live at home and care for most personal needs; varying amount of assistance needed.	70	Cares for self; unable to carry on normal activity or to do active work.
	60	Requires occasional assistance, but is able to care for most of his personal needs.
	50	Requires considerable assistance and frequent medical care.
Unable to care for self; requires equivalent of institutional or hospital care; disease may be progressing rapidly.	40	Disabled; requires special care and assistance.
	30	Severely disabled; hospital admission is indicated although death not imminent.
	20	Very sick; hospital admission necessary; active supportive treatment necessary.
	10	Moribund; fatal processes progressing rapidly.
	0	Dead

**Anexo 2 – National Institutes of Health Stroke Scale (NIH-SS)**

([http://www.ninds.nih.gov/doctors/nih\\_stroke\\_scale.pdf](http://www.ninds.nih.gov/doctors/nih_stroke_scale.pdf))

**Instructions**

**1a. Level of Consciousness:** The investigator must choose a response if a full evaluation is prevented by such obstacles as an endotracheal tube, language barrier, orotracheal trauma/bandages. A 3 is scored only if the patient makes no movement (other than reflexive posturing) in response to noxious stimulation.

0 = Alert; keenly responsive;

1 = Not alert; but arousable by minor stimulation to obey, answer, or respond;

2 = Not alert; requires repeated stimulation to attend, or is obtunded and requires strong or painful stimulation to make movements (not stereotyped);

3 = Responds only with reflex motor or autonomic effects, or totally unresponsive, flaccid, and areflexic.

**1b. LOC Questions:** The patient is asked the month and his/her age. The answer must be correct—there is no partial credit for being close. Aphasic and stuporous patients who do not comprehend the questions will score 2. Patients unable to speak because of endotracheal intubation, orotracheal trauma, severe dysarthria from any cause, language barrier, or any other problem not secondary to aphasia are given a 1. It is important that only the initial answer be graded and that the examiner not “help” the patient with verbal or non-verbal cues.

0 = Answers both questions correctly;

1 = Answers one question correctly;

2 = Answers neither question correctly.

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

**1c. LOC Commands:** The patient is asked to open and close the eyes and then to grip and release the non-paretic hand. Substitute another one-step command if the hands cannot be used. Credit is given if an unequivocal attempt is made but not completed due to weakness. If the patient does not respond to command, the task should be demonstrated to him or her (pantomime), and the result scored (i.e., follows none, one, or two commands). Patients with trauma, amputation, or other physical impediments should be given suitable one-step commands. Only the first attempt is scored.

0 = Performs both tasks correctly;

1 = Performs one task correctly;

2 = Performs neither task correctly.

**2. Best Gaze:** Only horizontal eye movements will be tested. Voluntary or reflexive (oculocephalic) eye movements will be scored, but caloric testing is not done. If the patient has a conjugate deviation of the eyes that can be overcome by voluntary or reflexive activity, the score will be 1. If a patient has an isolated peripheral nerve paresis (CN III, IV, or VI), score a 1. Gaze is testable in all aphasic patients. Patients with ocular trauma, bandages, pre-existing blindness, or other disorder of visual acuity or fields should be tested with reflexive movements, and a choice made by the investigator. Establishing eye contact and then moving about the patient from side to side will occasionally clarify the presence of a partial gaze palsy.

0 = Normal;

1 = Partial gaze palsy; gaze is abnormal in one or both eyes, but forced deviation or total gaze paresis is not present;

2 = Forced deviation, or total gaze paresis is not overcome by the oculocephalic maneuver.

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

**3. Visual:** Visual fields (upper and lower quadrants) are tested by confrontation, using finger counting or visual threat, as appropriate. Patients may be encouraged, but if they look at the side of the moving fingers appropriately, this can be scored as normal. If there is unilateral blindness or enucleation, visual fields in the remaining eye are scored. Score 1 only if a clear-cut asymmetry, including quadrantanopia, is found. If patient is blind from any cause, score 3. Double simultaneous stimulation is performed at this point. If there is extinction, patient receives a 1, and the results are used to respond to item 11.

0 = No visual loss;

1 = Partial hemianopia.;

2 = Complete hemianopia;

3 = Bilateral hemianopia (blind including cortical blindness).

**4. Facial Palsy:** Ask—or use pantomime to encourage—the patient to show teeth or raise eyebrows and close eyes. Score symmetry of grimace in response to noxious stimuli in the poorly responsive or non-comprehending patient. If facial trauma/bandages, orotracheal tube, tape, or other physical barriers obscure the face, these should be removed to the extent possible.

0 = Normal symmetrical movements;

1 = Minor paralysis (flattened nasolabial fold, asymmetry on smiling);

2 = Partial paralysis (total or near-total paralysis of lower face);

3 = Complete paralysis of one or both sides (absence of facial movement in the upper and lower face).

**5. Motor Arm:** The limb is placed in the appropriate position: extend the arms (palms down) 90 degrees (if sitting) or 45 degrees (if supine). Drift is scored if the arm falls before 10

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

seconds. The aphasic patient is encouraged using urgency in the voice and pantomime, but not noxious stimulation. Each limb is tested in turn, beginning with the non-paretic arm. Only in the case of amputation or joint fusion at the shoulder, the examiner should record the score as untestable (UN) and clearly write the explanation for this choice.

0 = No drift; limb holds 90 (or 45) degrees for full 10 seconds;

1 = Drift; limb holds 90 (or 45) degrees, but drifts down before full 10 seconds; does not hit bed or other support;

2 = Some effort against gravity; limb cannot get to or maintain (if cued) 90 (or 45) degrees, drifts down to bed, but has some effort against gravity;

3 = No effort against gravity; limb falls;

4 = No movement;

UN = Amputation or joint fusion, explain.

**6. Motor Leg:** The limb is placed in the appropriate position: hold the leg at 30 degrees (always tested supine). Drift is scored if the leg falls before 5 seconds. The aphasic patient is encouraged using urgency in the voice and pantomime but not noxious stimulation. Each limb is tested in turn, beginning with the non-paretic leg. Only in the case of amputation or joint fusion at the hip, the examiner should record the score as untestable (UN) and clearly write the explanation for this choice.

0 = No drift; leg holds 30-degree position for full 5 seconds;

1 = Drift; leg falls by the end of the 5-second period but does not hit the bed;

2 = Some effort against gravity; leg falls to bed by 5 seconds but has some effort against gravity;

3 = No effort against gravity; leg falls to bed immediately;

4 = No movement;

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

UN = Amputation or joint fusion, explain.

**7. Limb Ataxia:** This item is aimed at finding evidence of a unilateral cerebellar lesion. Test with eyes open. In case of visual defect, ensure testing is done in intact visual field. The finger-nosefinger and heel-shin tests are performed on both sides, and ataxia is scored only if present out of proportion to weakness. Ataxia is absent in the patient who cannot understand or is paralyzed. Only in the case of amputation or joint fusion, the examiner should record the score as untestable (UN) and clearly write the explanation for this choice. In case of blindness, test by having the patient touch nose from extended arm position.

0 = Absent;

1 = Present in one limb;

2 = Present in two limbs;

UN = Amputation or joint fusion, explain.

**8. Sensory:** Sensation or grimace to pinprick when tested, or withdrawal from noxious stimulus in the obtunded or aphasic patient. Only sensory loss attributed to stroke is scored as abnormal and the examiner should test as many body areas [arms (not hands), legs, trunk, face] as needed to accurately check for hemisensory loss. A score of 2, “severe or total sensory loss,” should only be given when a severe or total loss of sensation can be clearly demonstrated. Stuporous and aphasic patients will, therefore, probably score 1 or 0. The patient with brainstem stroke who has bilateral loss of sensation is scored 2. If the patient does not respond and is quadriplegic, score 2. Patients in a coma (item 1a=3) are automatically given a 2 on this item.

0 = Normal; no sensory loss;

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

1 = Mild-to-moderate sensory loss; patient feels pinprick is less sharp or is dull on the affected side; or there is a loss of superficial pain with pinprick, but patient is aware of being touched;

2 = Severe or total sensory loss; patient is not aware of being touched in the face, arm, and leg.

**9. Best Language:** A great deal of information about comprehension will be obtained during the preceding sections of the examination. For this scale item, the patient is asked to describe what is happening in the attached picture, to name the items on the attached naming sheet, and to read from the attached list of sentences. Comprehension is judged from responses here, as well as to all of the commands in the preceding general neurological exam. If visual loss interferes with the tests, ask the patient to identify objects placed in the hand, repeat, and produce speech. The intubated patient should be asked to write. The patient in a coma (item 1a=3) will automatically score 3 on this item. The examiner must choose a score for the patient with stupor or limited cooperation, but a score of 3 should be used only if the patient is mute and follows no one-step commands.

0 = No aphasia; normal;

1 = Mild-to-moderate aphasia; some obvious loss of fluency or facility of comprehension, without significant limitation on ideas expressed or form of expression. Reduction of speech and/or comprehension, however, makes conversation about provided materials difficult or impossible. For example, in conversation about provided materials, examiner can identify picture or naming card from patient's response;

2 = Severe aphasia; all communication is through fragmentary expression; great need for inference, questioning, and guessing by the listener. Range of information that can be

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

exchanged is limited; listener carries burden of communication. Examiner cannot identify materials provided from patient response;

3 = Mute, global aphasia; no usable speech or auditory comprehension.

**10. Dysarthria:** If patient is thought to be normal, an adequate sample of speech must be obtained by asking patient to read or repeat words from the attached list. If the patient has severe aphasia, the clarity of articulation of spontaneous speech can be rated. Only if the patient is intubated or has other physical barriers to producing speech, the examiner should record the score as untestable (UN) and clearly write the explanation for this choice. Do not tell the patient why he/she is being tested.

0 = Normal;

1 = Mild-to-moderate dysarthria; patient slurs at least some words and, at worst, can be understood with some difficulty;

2 = Severe dysarthria; patient's speech is so slurred as to be unintelligible in the absence of or out of proportion to any dysphasia, or is mute/anarthric;

UN = Intubated or other physical barrier, explain.

**11. Extinction and Inattention (formerly Neglect):** Sufficient information to identify neglect may be obtained during the prior testing. If the patient has a severe visual loss preventing visual double simultaneous stimulation, and the cutaneous stimuli are normal, the score is normal. If the patient has aphasia but does appear to attend to both sides, the score is normal. The presence of visual spatial neglect or anosagnosia may also be taken as evidence of abnormality. Since the abnormality is scored only if present, the item is never untestable.

0 = No abnormality;

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

1 = Visual, tactile, auditory, spatial, or personal inattention, or extinction to bilateral simultaneous stimulation in one of the sensory modalities;

2 = Profound hemi-inattention or extinction to more than one modality; does not recognize own hand or orients to only one side of space.

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Professor Doutor Marcos Barbosa pela paciência, apoio científico, incentivo e disponibilidade que demonstrou aquando da formação desta Tese.

Agradeço à minha Família por todo o apoio, amizade e sacrifícios feitos ao longo destes anos.

Agradeço ao Afonso, à Andreia e ao Tiago pelo incansável entusiasmo, paciência, motivação e inspiração que me proporcionaram ao longo deste processo.

Agradeço aos meus Amigos que me acompanharam nesta aventura por estarem sempre presentes em todas as ocasiões.

Referências

- 1 Sinha a K, Anand S, Ortel BJ, Chang Y, Mai Z, Hasan T et al. Methotrexate used in combination with aminolaevulinic acid for photodynamic killing of prostate cancer cells. *Br J Cancer*. 2006; 95: 485–95.
- 2 Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE et al. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro Oncol*. 2014; 16: 896–913.
- 3 Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol*. 2013; 15 Suppl 2: ii1–56.
- 4 Tonn J-C, Stummer W. Fluorescence-guided resection of malignant gliomas using 5-aminolevulinic acid: practical use, risks, and pitfalls. *Clin Neurosurg*. 2008; 55: 20–26.
- 5 Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol*. 2003; 21:1624–1636.
- 6 Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007; 114: 97–109.
- 7 Barchana M, Margalio M, Liphshitz I. Changes in brain glioma incidence and laterality correlates with use of mobile phones-a nationwide population based study in Israel. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13: 5857–63.
- 8 Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg*. 2001; 95: 190–198.

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

- 9 Bauchet L, Mathieu-Daudé H, Fabbro-Peray P, Rigau V, Fabbro M, Chinot O et al. Oncological patterns of care and outcome for 952 patients with newly diagnosed glioblastoma in 2004. *Neuro Oncol.* 2010; 12: 725–735.
- 10 Sant M, Minicozzi P, Lagorio S, Børge Johannesen T, Marcos-Gragera R, Francisci S. Survival of European patients with central nervous system tumors. *Int J Cancer.* 2012; 131: 173–85.
- 11 Jakola AS. Comparison of a Strategy Favoring Early Surgical Resection vs a Strategy Favoring Watchful Waiting in Low-Grade Gliomas Surgical Resection vs Waiting in Low-Grade Gliomas. *JAMA.* 2012; 1.
- 12 Stupp R, Mason W, van den Bent MJ, Weller M, Fisher BM, Taphoorn MJB et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 987–96.
- 13 Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, Chakravarti A. Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 4127–36.
- 14 Keles GE, Lamborn KR, Berger MS. Low-grade hemispheric gliomas in adults: a critical review of extent of resection as a factor influencing outcome. *J Neurosurg.* 2001; 95: 735–45.
- 15 Kim D, Kim KH, Yazdanfar S, So PTC. High speed handheld multiphoton multifoci microscopy. *Multiphot Microsc Biomed Sci Iv.* 2004; 5323: 267–272\,r442.
- 16 Pichlmeier U, Bink A, Schackert G, Stummer W. Resection and survival in glioblastoma multiforme: an RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients. *Neuro Oncol.* 2008; 10: 1025–34.
- 17 Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC et al. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: Identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery.* 2008; 62: 564–74.

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

- 18 Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009; 10: 459–66.
- 19 Albert FK, Forsting M, Sartor K, Adams HP, Kunze S. Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis. 1994.
- 20 Barker FG, Prados MD, Chang SM, Gutin PH, Lamborn KR, Larson DA et al. Radiation response and survival time in patients with glioblastoma multiforme. 1996.
- 21 Kowalczyk A, Macdonald RL, Amidei C, Dohrmann G, Erickson RK, Hekmatpanah J et al. Quantitative imaging study of extent of surgical resection and prognosis of malignant astrocytomas. *Neurosurgery.* 1997; 41: 1028–1038.
- 22 Graça J, Palma T. Avaliação dos gliomas cerebrais. Por técnicas avançadas de Ressonância Magnética. *Acta Medica Portuguesa.* 2003.
- 23 Kubben PL, ter Meulen KJ, Schijns OEMG, ter Laak-Poort MP, van Overbeeke JJ, van Santbrink H. Intraoperative MRI-guided resection of glioblastoma multiforme: A systematic review. *Lancet Oncol.* 2011; 12: 1062–70.
- 24 Behbahaninia M, Martirosyan NL, Georges J, Udovich JA, Kalani MYS, Feuerstein BG et al. Intraoperative fluorescent imaging of intracranial tumors: A review. *Neurosurg.* 2013; 115: 517–28.
- 25 Floeth FW, Sabel M, Ewelt C, Stummer W, Felsberg J, Reifenberger G et al. Comparison of <sup>18</sup>F-FET PET and 5-ALA fluorescence in cerebral gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2011; 38: 731–41.
- 26 Zhao S, Wu J, Wang C, Liu H, Dong X, Shi C et al. Intraoperative fluorescence-guided resection of high-grade malignant gliomas using 5-aminolevulinic acid-induced

- porphyrins: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *PLoS One*. 2013; 8:e63682.
- 27 Eljamel S, Petersen M, Valentine R, Buist R, Goodman C, Moseley H et al. Comparison of intraoperative fluorescence and MRI image guided neuronavigation in malignant brain tumours, a prospective controlled study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013; 10: 356–61.
- 28 Tsugu A, Ishizaka H, Mizokami Y, Osada T, Baba T, Yoshiyama M et al. Impact of the combination of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence with intraoperative magnetic resonance imaging-guided surgery for glioma. *World Neurosurg*. 2011; 76: 120–7.
- 29 Pogue BW, Gibbs-Strauss SL, Valdés PA, Samkoe KS, Roberts W, Paulsen KD et al. Review of Neurosurgical Fluorescence Imaging Methodologies. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*. 2010; 16: 1–30.
- 30 Stummer W, Novotny A, Stepp H, Goetz C, Bise K, Reulen HJ. Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. *J Neurosurg*. 2000; 93: 1003–13.
- 31 Stummer W, Stocker S, Wagner S, Stepp H, Fritsch C, Goetz C et al. Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *Neurosurgery* 1998; 42: 518–526.
- 32 Stummer W, Tonn J-C, Mehdorn HM, Nestler U, Franz K, Goetz C et al. Counterbalancing risks and gains from extended resections in malignant glioma surgery: a supplemental analysis from the randomized 5-aminolevulinic acid glioma resection study. *J Neurosurg*. 2011; 114: 613–23.

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

- 33 Ishizuka M, Abe F, Sano Y, Takahashi K, Inoue K, Nakajima M et al. Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy. *Int Immunopharmacol*. 2011; 11: 358–65.
- 34 Colditz MJ, Leyen K Van, Jeffree RL. Aminolevulinic acid (ALA)-protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 2: Theoretical, biochemical and practical aspects. *J Clin Neurosci*. 2012; 19:1611–16.
- 35 Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer*. 1997; 79:2282–308.
- 36 Krammer B, Plaetzer K. ALA and its clinical impact, from bench to bedside. *Photochem Photobiol Sci*. 2008; 7: 283–89.
- 37 Ennis SR, Novotny A, Xiang J, Shakui P, Masada T, Stummer W et al. Transport of 5-aminolevulinic acid between blood and brain. *Brain Res*. 2003; 959: 226–34.
- 38 Wyld L, Reed MW, Brown NJ. The influence of hypoxia and pH on aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy in bladder cancer cells in vitro. *Br J Cancer*. 1998; 77: 1621–7.
- 39 Wyld L, Tomlinson M, Reed MWR, Brown NJ. Aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy: cellular responses to glucose starvation. *Br J Cancer*. 2002; 86: 1343–7.
- 40 Georgakoudi I, Keng PC, Foster TH. Hypoxia significantly reduces aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX synthesis in EMT6 cells. *Br J Cancer*. 1999; 79: 1372–7.
- 41 Díez Valle R, Tejada Solis S, Idoate Gastearena MA, García De Eulate R, Domínguez Echávarri P, Aristu Mendiroz J. Surgery guided by 5-aminolevulinic fluorescence in

- glioblastoma: Volumetric analysis of extent of resection in single-center experience. *J Neurooncol.* 2011; 102: 105–13.
- 42 Idoate MA, Díez Valle R, Echeveste J, Tejada S. Pathological characterization of the glioblastoma border as shown during surgery using 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence. *Neuropathology.* 2011; 31: 575–82.
- 43 Fukuda H, Paredes S, Batlle AM. Tumor-localizing properties of porphyrins. In vitro studies using the porphyrin precursor, aminolevulinic acid, in free and liposome encapsulated forms. *Drug Des Deliv.* 1989; 5: 133–39.
- 44 Steinbach P, Weingandt H, Baumgartner R, Kriegmair M, Hofstädter F, Knüchel R. Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid. *Photochem Photobiol.* 1995; 62: 887–95.
- 45 Takahashi K, Ikeda N, Nonoguchi N, Kajimoto Y, Miyatake SI, Hagiya Y et al. Enhanced expression of coproporphyrinogen oxidase in malignant brain tumors: CPOX expression and 5-ALA-induced fluorescence. *Neuro Oncol.* 2011; 13: 1234–43.
- 46 Zimmermann M, Stan AC. PepT2 transporter protein expression in human neoplastic glial cells and mediation of fluorescently tagged dipeptide derivative beta-Ala-Lys-Nepsilon-7-amino-4-methyl-coumarin-3-acetic acid accumulation. *J Neurosurg.* 2010; 112: 1005–14.
- 47 Ortel B, Chen N, Brissette J, Dotto GP, Maytin E, Hasan T. Differentiation-specific increase in ALA-induced protoporphyrin IX accumulation in primary mouse keratinocytes. *Br J Cancer.* 1998; 77: 1744–51.
- 48 Ortel B, Sharlin D, O'Donnell D, Sinha AK, Maytin E V, Hasan T. Differentiation enhances aminolevulinic acid-dependent photodynamic treatment of LNCaP prostate cancer cells. *Br J Cancer.* 2002; 87: 1321–27.

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

- 49 Sato N, Moore BW, Keevey S, Drazba JA, Hasan T, Maytin E V. Vitamin D enhances ALA-induced protoporphyrin IX production and photodynamic cell death in 3-D organotypic cultures of keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2007; 127: 925–34.
- 50 Berg K, Anholt H, Bech O, Moan J. The influence of iron chelators on the accumulation of protoporphyrin IX in 5-aminolaevulinic acid-treated cells. *Br J Cancer.* 1996; 74: 688–97.
- 51 Chang SC, MacRobert AJ, Porter JB, Bown SG. The efficacy of an iron chelator (CP94) in increasing cellular protoporphyrin IX following intravesical 5-aminolaevulinic acid administration: An in vivo study. *J Photochem Photobiol B Biol.* 1997; 38: 114–22.
- 52 Hefti M, von Campe G, Moschopoulos M, Siegner A, Looser H, Landolt H. 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX fluorescence in high-grade glioma surgery: a one-year experience at a single institution. *Swiss Med Wkly Off J Swiss Soc Infect Dis Swiss Soc Intern Med Swiss Soc Pneumol.* 2008; 138: 180–5.
- 53 Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 2006; 7: 392–401.
- 54 Stummer W, Stepp H, Möller G. Technical principles for protoporphyrin-IX-fluorescence guided microsurgical resection of malignant glioma tissue. *Acta Neurochir.* 1998; : 995–1000.
- 55 Johansson A, Palte G, Schnell O, Tonn J-C, Herms J, Stepp H. 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels in tissue of human malignant brain tumors. *Photochem Photobiol.* 2010; 86: 1373–8.

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

- 56 Ishihara R, Katayama Y, Watanabe T, Yoshino A, Fukushima T, Sakatani K. Quantitative spectroscopic analysis of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence intensity in diffusely infiltrating astrocytomas. *Neurol Med Chir.* 2007; 47: 53–7.
- 57 Panciani PP, Fontanella M, Schatlo B, Garbossa D, Agnoletti A, Ducati A et al. Fluorescence and image guided resection in high grade glioma. *Clin Neurol Neurosurg.* 2012; 114: 37–41.
- 58 Roberts DW, Valdés PA, Harris BT, Fontaine KM, Hartov A, Fan X et al. Coregistered fluorescence-enhanced tumor resection of malignant glioma: relationships between  $\delta$ -aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence, magnetic resonance imaging enhancement, and neuropathological parameters. *J Neurosurg.* 2011; 114: 595–603.
- 59 Valdés S PA, Kim A, Brantsch M, Niu C, Moses ZB, Tosteson TD et al.  $\delta$ -aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX concentration correlates with histopathologic markers of malignancy in human gliomas: The need for quantitative fluorescence-guided resection to identify regions of increasing malignancy. *Neuro Oncol.* 2011; 13: 846–56.
- 60 Valdés PA, Leblond F, Kim A, Harris BT, Wilson BC, Fan X et al. Quantitative fluorescence in intracranial tumor: implications for ALA-induced PpIX as an intraoperative biomarker. *J Neurosurg.* 2011; 115: 11–17.
- 61 Nabavi A, Thurm H, Zountsas B, Pietsch T, Lanfermann H, Pichlmeier U et al. Five-aminolevulinic acid for fluorescence-guided resection of recurrent malignant gliomas: A phase II study. *Neurosurgery.* 2009; 65: 1070–6.
- 62 Stummer W, Kamp MA. The importance of surgical resection in malignant glioma. *Curr Opin Neurol.* 2009; 22: 645–9.

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

- 63 Sanai N, Berger MS. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery*. 2008; 62: 753–64.
- 64 Sanai N, Polley M-Y, McDermott MW, Parsa AT, Berger MS. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J Neurosurg*. 2011; 115: 3–8.
- 65 Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005; 352: 997–1003.
- 66 Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 4189–99.
- 67 Aldave G, Tejada S, Pay E, Marigil M, Bejarano B, Idoate MA et al. Prognostic value of residual fluorescent tissue in glioblastoma patients after gross total resection in 5-aminolevulinic acid-guided surgery. *Neurosurgery*, 2013; 72: 915–20.
- 68 Piacquadio DJ, Chen DM, Farber HF, Fowler JF, Glazer SD, Goodman JJ et al. Photodynamic therapy with aminolevulinic acid topical solution and visible blue light in the treatment of multiple actinic keratoses of the face and scalp: investigator-blinded, phase 3, multicenter trials. 2004.
- 69 Scott CB, Scarantino C, Urtasun R, Movsas B, Jones CU, Simpson JR et al. Validation and predictive power of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) recursive partitioning analysis classes for malignant glioma patients: a report using RTOG 90-06. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1998; 40: 51–5.
- 70 Stepp H, Beck T. Fluorescence guided resection for malignant glioma using 5-aminolevulinic acid. *Biomed Biomed Imaging From Nano to Macro*. 2006; 55: 20–6.

## A importância da fluorescência na cirurgia dos gliomas

- 71 Sanai N, Snyder LA, Honea NJ, Coons SW, Eschbacher JM, Smith KA et al. Intraoperative confocal microscopy in the visualization of 5-aminolevulinic acid fluorescence in low-grade gliomas. *J. Neurosurg.* 2011; 115: 740–8.
- 72 Nimsky C, Ganslandt O, Hastreiter P, Fahlbusch R. Intraoperative compensation for brain shift. *Surg Neurol* 2001; 56: 357–65.
- 73 Kantelhardt SR, Leppert J, Kantelhardt JW, Reusche E, Hüttmann G, Giese A. Multiphoton excitation fluorescence microscopy of brain-tumour tissue and analysis of cell density. *Acta Neurochir.* 2009; 151: 253–62.
- 74 Kantelhardt SR, Diddens H, Leppert J, Rohde V, Hüttmann G, Giese A. Multiphoton excitation fluorescence microscopy of 5-aminolevulinic acid induced fluorescence in experimental gliomas. *Lasers Surg Med.* 2008; 40: 273–81.
- 75 Berkovitch-Luria G, Weitman M, Nudelman A, Rephaeli A, Malik Z. Multifunctional 5-aminolevulinic acid prodrugs activating diverse cell-death pathways. *Invest New Drugs.* 2012; 30: 1028–38.