

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ**

**IMPORTANȚA ANGIOGENEZEI TUMORALE ÎN
DIAGNOSTICUL ȘI TERAPIA TUMORILOR
CEREBRALE**

REZUMAT

CONDUcăTOR DE DOCTORAT:

PROF. UNIV. DR. ANICA DRICU

STUDENT- DOCTORAND:

ȘERBAN FLORENTINA

Studiile au fost parțial finanțate din proiectele:

FONDUL SOCIAL EUROPEAN, COD: POSDRU/159/1.5/S/133377

PN-II-ID-PCE-2011-3-1041-UEFISCDI-România

CRAIOVA

2018

CUPRINS

Introducere

I. Stadiul cunoașterii

1. Tumorile cerebrale. Generalități

- 1.1. Factori de risc. Epidemiologie. Incidență
- 1.2. Tipuri de tumori cerebrale
- 1.3. Simptomatologia tumorilor cerebrale
- 1.4. Diagnosticul tumorilor cerebrale
- 1.5. Tratamentul tumorilor cerebrale

2. Glioblastomul multiform

3. Angiogeneza tumorilor cerebrale

- 3.1 Angiogeneza tumorilor cerebrale. Generalitati
- 3.2 caile de semnalizare intracelulara
- 3.3 Calea Ras/MAPK/ERK
- 3.4 Inhibitori ai caii de semnalizare Ras
- 3.5 Calea P13K/AKT/mTOR
- 3.6 Inhibitori ai caii de semnalizare P13K/AKT/mTOR

4. Biomarkeri

- 4.1. ELTD1
- 4.2. VEGFR
- 4.3. PDGFR
- 4.4. EGFR

II. Contribuții personale

- 5. Scop și obiective
- 6. Material și metode
 - 6.1 Reactivi
 - 6.2 Culturi celulare
 - 6.3 Tratarea celulelor
 - 6.4 Manipularea celulelor și a soluțiilor de lucru

6.5 Transfecție siRNA

6.6 Determinarea proliferării celulare

6.7 Prelucrare imunohistochimică

6.8 Analiza statistică

7. Rezultate

7.1. Importanța ELTD1 ca marker tumoral și ca țintă terapeutică în tumorile cerebrale

7.2. Importanța PDGFR ca marker tumoral și ca țintă terapeutică în tumorile cerebrale

7.3. Importanța VEGFR ca marker tumoral și ca țintă terapeutică în tumorile cerebrale

7.4. Importanța EGFR ca marker tumoral și ca țintă terapeutică în tumorile cerebrale

7.5. Efectul inactivării semnalului intracelular asupra viabilității tumorilor cerebrale.

8. Discuții.

9. Concluzii

III. Bibliografie

Cuvinte cheie: tumori cerebrale, glioblastom, angiogeneza, inhibitori VEGFR, inhibitori PDGFR, ELTD1

Stadiul cunoașterii

Tumora cerebrală reprezintă o masă de celule anormale care se dezvoltă în țesuturile cerebrale sau pe învelișurile creierului, denumite meninge. Există două tipuri principale de tumori cerebrale: tumori cerebrale primare, care debutează în creier și tumori secundare sau metastaze cerebrale, care se dezvoltă în alte zone ale corpului și se răspândesc la creier, acestea din urmă fiind și cele mai frecvente, aproximativ jumătate din metastaze provenind din cancerul pulmonar. Cancerul cerebral reprezintă una dintre primele 10 cauze ale deceselor cauzate de cancer, fiind considerat o amenințare gravă la adresa sănătății.

Există o varietate de terapii folosite în tratamentul tumorilor cerebrale și anume intervenția chirurgicală, radioterapia și chimioterapia, terapia țintită, sau o combinație între acestea. Tratamentul diferă de la un pacient la altul și este ales în funcție de localizarea, volumul și gradul tumorii, rata de creștere, starea de sănătate a pacientului,

precum și de dorințele pacientului și ale familiei sale. Scopul tratamentului îl reprezintă îndepărtarea tumorii, ameliorarea simptomelor, îmbunătățirea funcției creierului sau a confortului pacientului.

Terapia țintă se referă la utilizarea medicamentelor sau a altor substanțe cu rol în a identifica și ataca celulele canceroase, lăsând neafectate celulele normale. O astfel de terapie este tratamentul cu anticorpi monoclonali, administrați în perfuzie, care utilizează anticorpi făcuți în laborator dintr-un singur tip de celulă a sistemului imunitar. Anticorpii monoclonali se atașează de anumite substanțe, omorând apoi celulele canceroase, prin blocarea creșterii lor sau împiedicându-le să se răspândească. Mai pot fi folosite și pentru transportul unor medicamente, toxine sau materiale radioactive, eliberate direct la celulele canceroase. În tratarea gliomelor maligne recurente se folosesc agenții țintă și anume bevacizumab care se leagă de factorul de creștere endotelial vascular (VEGF); precum și gefitinib, erlotinib și imatinib care vizează receptorii factorului de creștere epidermal și ai factorului de creștere derivat din trombocite (EGFR, PDGFR).

Angiogeneza este un proces complex, bine organizat, ce presupune formarea de noi vase de sânge, datorită migrării, creșterii și diferențierii celulelor endoteliale, formând astfel pereții interiori ai vaselor de sânge. Acest proces este controlat de diferite proteine numite activatori angiogenici și inhibitori. La nivelul sistemului nervos central, angiogeneza joacă un rol important în mai multe stări, precum hipoxia, infarcturile, infecțiile și cancerule.

Studiile realizate au arătat faptul că tumorile determină răspândirea de noi vase de sânge de la vascularizația înconjurătoare, deci, suprimarea procesului de angiogeneza ar putea inhiba creșterea tumorii. Glioblastoamele reprezintă tumorile cerebrale cu cel mai înalt grad de malignitate, ce se caracterizează prin vascularizare extinsă și un nivel ridicat de invazie.

În angiogeneza glioblastoamelor, rolul cel mai important îl au factorii angiogenici, ca de exemplu factorul de creștere vascular endotelial (VEGF), factorul de creștere epidermal (EGF), angiopoietina-2, factorul de creștere derivat din plachete (PDGF), factorul de creștere fibroblast bazic și factorul de creștere al hepatocitelor (HGF). Odată

cu informațiile aflate despre mediatorii angiogenici și a căilor de semnalizare, s-au identificat noi ținte care trebuie exploatate terapeutic în tumorile cerebrale. Anumite studii au arătat faptul că celulele tumorale promovează angiogeneza deoarece secretă anumite vezicule extracelulare care poartă microARN, „long non-coding”- ARN și proteine, vezicule care sunt capturate de celulele endoteliale, în interiorul cărora activează semnalizarea proangiogenică.

II. Contribuții personale

5. Scop și obiective

Obiectivul numărul 1. Evaluarea ELTD1 ca marker tumoral și ca țintă terapeutică în tumorile cerebrale

Obiectivul numărul 2. Evaluarea PDGFR ca marker tumoral și ca țintă terapeutică în tumorile cerebrale

Obiectivul numărul 3. Evaluarea VEGFR ca marker tumoral și ca țintă terapeutică în tumorile cerebrale

Obiectivul numărul 4. Evaluarea inhibării concomitente a PDGFR și VEGFR asupra tumorilor cerebrale

Obiectivul numărul 5. Evaluarea EGFR ca marker tumoral și ca țintă terapeutică în tumorile cerebrale

Obiectivul numărul 6. Efectul inactivării semnalului intracelular asupra viabilității tumorilor cerebrale

Glioblastomul, un fenotip înalt malign al tumorii cerebrale, este, în general, incurabil. ELTD1 este considerat un nou potențial marker pentru glioblastom, deși nu sunt încă disponibile date funcționale pentru a caracteriza această moleculă. De

exemplu, nu este clar dacă acest receptor poate fi utilizat ca o moleculă țintă în terapia glioblastomului.

În studiul actual, ELTD1, PDGFR, VEGFR și calea lor intracelulară comună P13K/mTOR au fost analizate ca țintele potențiale în glioblastom. Rezultatele noastre arată că tratamentul cu AG1433 și SU1498 au un efect citotoxic moderat asupra celulelor de glioblastom. De asemenea, în celulele de glioblastom, s-a înregistrat un procent ridicat de citotoxicitate indusă de BEZ235 (un inhibitor dublu al căii p13k/mTOR) la concentrații nanomolare, comparative cu AG1433 (un PDGFR inhibitor) și SU1498 (un inhibitor al VEGFR), care au fost citotoxici la concentrații micromolare. De asemenea, studiul nostru arată pentru prima dată că inhibarea receptorului ELTD1 cu siRNA induce moartea celulelor în glioblastom, sugerând că acest receptor poate fi important în tratamentul glioblastomului.

Glioblastoamele au suferit, în general, modificări substanțiale în ceea ce privește managementul de abordare al dezvoltării tehnicilor noi de chimioterapie, neurochirurgie și radioterapie.

În ciuda acestor schimbări semnificative, managementul GBM și prognosticul rămân încă proaste, cu o rată de supraviețuire de numai 5% în cinci ani.

Discuții

În ciuda abordărilor terapeutice actuale, glioblastomul rămâne una dintre formele cele mai letale de cancer. Cele două idei mai importante în tratamentul cancerului sunt terapia țintită și tratamentul personalizat.

În timp ce chimioterapicele sunt concepute generic și afectează toate celulele într-un mod similar, terapiile specifice caută să țintească o alterare specifică. Acestea oferă șansa de a acționa numai asupra celulelor canceroase, lăsând intacte celulele normale.

Au fost identificate în glioblastom mai multe căi de semnalizare care jucând un rol major în tumorigeneză, rezistența la tratament și regresia bolii, cum ar fi receptorii factorilor de creștere, moleculele din cascada de semnalizare intracelulară.

PDGFR, VEGFR și alți receptori tirozin kinazici au fost raportați a fi supraexprimați în gliom, în timp ce inhibarea receptorilor s-a descoperit că induce moartea celulelor ca terapie unică sau în combinații.

S-a arătat anterior că inactivarea PDGFR prin AG1433 induce moarte celulară scăzută în linii de celule primare de gliom de grad înalt, în timp ce acțiunea atât asupra PDGFR, cât și asupra VEGFR crește riscul de moarte celulară în comparație cu inhibarea singură a unuia dintre receptori.

Folosind un pasaj scăzut de linie de celule de glioblastom, în studiul actual s-a constatat de asemenea că tratamentul cu un inhibitor de PDGFR (AG1433) folosit singur induce o citotoxicitate scăzută după 3 zile.

Într-un studiu cu glioma stem-like cells, tratamentul cu SU1498 și bevacizumab a arătat efecte semnificative în inhibarea creșterii tumorii, mai ales în asociere cu radioterapia.

În acest studiu s-a constatat că tratamentul cu SU1498 a avut un efect citotoxic scăzut pe culturi de celule de glioblastom.

Proteinele receptorilor tirozin kinazici (de exemplu EGFR, PDGFR, VEGFR, etc) supraexprimați sau mutațiile genei activează Ras-Raf-MEK-ERK și PI3K-Akt-mTOR, rezultând în proliferarea celulară necontrolată a celulelor tumorale.

Inhibitorii unei singure molecule arată în mod normal activitate anti-tumorală modestă sau deloc, atunci când sunt utilizate ca terapie unică, dar atunci când sunt utilizate în combinație cu alte metode terapeutice cum ar fi radioterapia sau chimioterapia efectul citotoxic este îmbunătățit. .

Multe studii au arătat efectele BEZ235 în inhibarea căii PI3K/AKT/mTOR în diferite tipuri de cancere, cum ar fi tumorile rezistente la cisplatină unde radiațiile și BEZ235 au întârziat creșterea tumorii. În acest studiu s-a observat rata mare de citotoxicitate în liniile celulare de GB8B după tratamentul cu acest inhibitor la concentrații nanomolare, comparativ cu AG1433 și SU1498 care au avut efect citotoxic numai la concentrații micromolare.

În ultimii ani, o serie de alți biomarkeri cu potențial în diagnosticul și terapia gliomului au fost studiați. Recent, Rhee A. și colab. au descris ELTD1 ca un biomarker

important în gliom, ce diferențiază un gliom de grad scăzut față de un gliom de grad înalt.

Deoarece siRNAs au fost mai bine studiate în ultima vreme, potențialul lor terapeutic a crescut. Totuși există încă probleme care trebuie abordate în ceea ce privește eliberarea țintită a acestora către celulele tumorale.

Modul lor de acțiune a fost identificat ca diferențierea indusă în celulele tumorale și oprirea creșterii în celulele normale de glioblastom. În studiul nostru, celulele GB8B au fost transfectate cu ELTD1siRNA obținându-se cea mai mare citotoxicitate dintre toate tratamentele folosite pentru a inhiba acțiunea receptorilor de membrană celulară sau a căilor lor comune de semnalizare intracelulară.

În concluzie, rezultatele noastre au arătat ca tratamentul cu AG1433 și SU1498 induce citotoxicitate moderată în celulele de glioblastom.

Tratamentul ELTD1-siRNA este cel mai eficient în inducerea morții celulare din celulele de glioblastom.

Concluzii

Deși datele actuale publicate în legătură cu funcția și structura ELTD1 sunt destul de limitate, receptorul pare a fi foarte important, nu numai ca biomarker, dar și ca țintă moleculară în glioblastom.

Inhibarea expresiei proteinei ELTD1 a determinat o scădere semnificativă a proliferării celulare în randul liniei de GBM GB8B, doza maximală de siRNA ELTD1 determinând moartea a mai mult de jumătate din celulele din cultură.

Inhibarea receptorilor VEGFR și PDGFR utilizând tirfostinele AG1433 (anti-PDGFR) și SU1498 (anti-VEGFR) au determinat o citotoxicitate modestă atât în monoterapie cât și combinat asupra culturilor de GBM GB8B și GB10B. Acest fapt s-ar putea datora redundanței semnalului produs de către receptorii blocați cât și a capacității celulei maligne de recruta receptori de suprafață multipli care la rândul lor activează căi de semnalizare multiple.

EGFR reprezintă unul dintre cei mai importanți receptori în progresia HGG, atât prin procentajul mare de mutații/supraexpresii întâlnite în rândul tumorilor cât și a numărului impresionant de căi de semnalizare recrutate. Inhibarea EGFR în rândul celulelor de HGG 8, 18 și 38 folosind tirstostina AG556 a produs un efect citotoxic modest, comparativ cu cel obținut cu tirstostinele anti-VEGFR și anti-PDGFR.

Inhibarea căii de semnalizare *PI3K/AKT/mTOR* folosind inhibitorul BEZ235 în liniile celulare GB8B a produs un efect citotoxic mai pronunțat comparativ cu cel obținut cu inhibitorii tirozinkinazici anti receptori de suprafață. Pentru dozele maxime de 60nM respectiv 100 nM, inhibitorul BEZ235 a produs moartea a două treimi dintre celulele de GBM.

Producerea unui efect citotoxic mai intens prin inhibarea unor căi de semnalizare în aval comparativ cu inhibarea receptorilor tirozinkinazici demonstrează capacitatea acestor receptori de a activa simultan căi de semnalizare comune. Privând acești receptori de o cale de semnalizare importantă duce la moartea celulelor a căror proliferare stimulată de activitatea unuia sau a mai multor receptori tirozinkinazici.

Deși perspectivele actuale de tratament în HGG sunt limitate, una din abordările cele mai studiate de către cercetători este tratamentul combinat atât între agenții terapeutici clasici cum ar fi chimioterapia cât și cea folosind agenți terapeutici mai noi precum inhibitorii tirozinkinazici sau imunoterapia. O abordare cu potențial deosebit în GBM, explorată în alte forme de cancer, este inhibarea simultană atât a receptorilor de suprafață cât și a căilor de semnalizare în aval, abordare care ar putea îmbunătăți supraviețuirea pacienților care suferă de această neoplazie incurabilă.

Bibliografie selectivă