

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA

FACULTATEA DE MEDICINĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

**Influența inhibării receptorilor tirozinkinazici și a căilor
de semnalizare asupra apoptozei celulare în tumorile
cerebrale**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

Prof. Univ. Dr. Anica Dricu

STUDENT DOCTORAND:

Alisa Mădălina Popescu

Studiile au fost parțial finanțate din proiectul:

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

**CRAIOVA
2018**

CUPRINS

INTRODUCERE	3
I. STADIUL CUNOAȘTERII.....	3
CAP. 1 TUMORI CEREBRALE	3
CAP. 2 ANGIOGENEZA.IPOTEZELE APARIȚIEI GLIOBLASTOMULUI. HETEROGENEITATEA TUMORALĂ.....	3
CAP. 3 RECEPTORII TIROZIN KINAZICI ȘI LIGANZII LOR	3
CAP. 4 CĂILE DE SEMNALIZARE ȘI INHIBITORII VEGF- VEGFR LA NIVELUL TUMORILOR CEREBRALE	3
II. CONTRIBUȚII PROPRII	5
CAP. 5 MATERIALE ȘI METODE	5
CAP. 6 REZULTATE	6
CAP. 7 DISCUȚII ȘI CONCLUZII.....	8
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	10

CUVINTE CHEIE :

tumori cerebrale, glioblastom, metastaze cerebrale, angiogeneză, inhibitori VEGF, curcumină.

INTRODUCERE

Tumorile cerebrale, divizate în tumori cu progresie lentă, benigne, sau cu progresie rapidă de tip malign, produc în general semne și simptome neurologice înainte de diagnosticul și tratamentul specific, pacienții cu tumori cerebrale având un nivel crescut de dizabilitate.

Glioblastomul (GB), descris pentru prima dată în 1926 în clasificarea tumorilor cerebrale de către Cushing, este cel mai frecvent cancer cerebral primar în rândul adulților și unul dintre cele mai agresive tumori cerebrale maligne. GB are o incidență de 1,26: 1 (bărbați vs femei), cu o rată de supraviețuire medie de 13-16 luni după terapia standard care presupune rezecția chirurgicală maximă, radioterapie și chimioterapie cu temozolomidă. Din păcate, prognosticul este nefavorabil, cu o rată de supraviețuire de 5% la cinci ani, cu o creștere mică a ratei de supraviețuire pentru pacienții diagnosticați cu vârsta sub 20 de ani.

În ciuda noilor progrese în descoperirea de medicamente, majoritatea noilor terapii specifice sunt încă în faze de studii clinice, atât ca tratamente singulare cât și în combinație cu chimioterapeutice standard (temozolomidă, carboplatină, cisplatină, lomustină) sau radioterapie.

I. STADIUL CUNOAȘTERII

Tumorile cerebrale rămân una din cauzele majore de deces prin cancer, deși la nivel mondial se observă o scădere a incidenței tumorilor intracraniene, în 2008 IARC (International Agency for Research on Cancer) estima o creștere a numărului de tumori cerebrale în țările dezvoltate: 5,8 cazuri la 100.000 de locuitori pentru bărbați și 4,4 la 100.000 de locuitori pentru femei, țările în curs de dezvoltare având o incidență mai mică a neoplasmelor: 3,2 la 100.000 de locuitori în rândul bărbaților și 2,8 la 100.000 de locuitori pentru femei.

Anumiți biomarkeri tumorali sunt studiați în contextul corelării acestora cu apariția și evoluția tumorilor, cei mai cunoscuți fiind: factorul de creștere vascular endotelial - VEGF, factorul de creștere fibroblastic - FGF, factorul de creștere plachetar– PDGF. Reacția celulelor endoteliale la nivelul vaselor tumorale la adulți este mediată de numeroși receptori tirozinkinazici (PDGFRA, VEGFR1, VEGFR2, EGFR). Numeroase studii au demonstrat supraexprimarea factorilor proangiogenici, inclusiv factorul de creștere fibroblastic, factorul de creștere a endoteliului vascular, factorul de creștere al trombocitelor endoteliale care promovează proliferarea celulelor endoteliale și migrarea în tumorile cerebrale primare.

Apoptoza tumorală este indusă de inhibitorii selectivi ai angiogenezei, proliferarea tumorală și inhibarea căilor de semnalizare și este facilitată de activarea cascadei caspazelor. Caspazele 2, 8, 9 și 10 sunt asociate cu inițierea semnalizării apoptozei și legarea de proteinele receptor, numite „death receptors” (DR). Caspazele 3, 6 și 7 sunt studiate pentru rolul lor în reglarea apoptozei ca și caspaze efectoare.

Angiogeneza este indusă la începutul etapelor de dezvoltare a tumorilor maligne, fiind în mod patologic promovată de o multitudine de modificări genetice. În angiogeneza din glioblastom este caracteristică proliferarea microvasculară în jurul zonelor necrotice ca răspuns la mediul hipoxic, care, la rândul său, crește expresia factorilor angiogenici și a căilor de semnalizare (calea RAS/RAF/ERK/MAPK, PI3K/Akt și cascada de semnalizare WNT).

În prezent sunt în studiu un număr mare de metode alternative de tratament chimioterapic al tumorilor cerebrale: terapii țintite pentru factorii angiogenici, pentru factorii de creștere și receptorii acestora sau pentru proteinele intracelulare care reglează creșterea, proliferarea și gradul de invazivitate. Noile terapii moleculare țintite sunt concentrate asupra receptorilor tirozin kinazici (TRKs) angiogenici și inactivarea căilor lor de semnalizare, iar strategiile anti-angiogenice sunt unele dintre cele mai importante în abordarea clinică a terapiei moleculare.

O nouă metodă (metodă metronomică) pentru administrarea terapiei antiangiogenice este caracterizată prin scăderea dozei de medicamente și creșterea frecvenței de administrare a medicamentelor. Unele medicamente tradiționale, cum ar fi

ciclofosfamida și vinblastina au avut răspuns antiangiogenic semnificativ. Mai mult, atunci când se administrează prin metoda metronomică ciclofosfamidă și bevacizumab, au fost observate rezultate mai bune decât chimioterapia clasică cu bevacizumab.

Monitorizarea după tratament a tumorii se realizează cu CT cu contrast și RMN, noi criterii de răspuns imagistic ale tratamentului trebuie să fie formulate și pentru tomografia emițătoare de pozitroni (PET). De asemenea, markeri tumorali, cum ar fi CD31, CD34, CD105, factorul von Willebrand sunt utilizați pentru monitorizarea răspunsului pacienților la tratament.

Compușii naturali extrași din plante sunt tot mai mult folosiți în terapia cancerului sau ca medicamente chemopreventive. De fapt, multe dintre medicamentele anti-neoplazice folosite în ultimele decenii sunt fie obținute direct din plante, fie produse sintetice derivate din anumite structuri naturale. Medicamente cum ar fi alcaloizi din vinca (de exemplu: vincristină, vinblastină, vinorelbină, vindesină) extras din *Catharantus roseus*, taxani (de exemplu paclitaxel) extras din coaja copacului tisa Pacific s-au dovedit a fi unele dintre cele mai eficiente medicamente împotriva cancerului. Curcumina (diferuloymethane) este un polifenol derivat din rizom de planta *Curcuma longa*, cunoscută popular ca turmeric. Turmericul a fost folosit încă din antichitate (peste 2000 de ani în urmă), în medicina ayurvedica indiană pentru tratamentul unui număr de afecțiuni, spre exemplu: diferite infecții, arsuri, alergii, reumatism, tulburări hepatice, etc. În prezent, cercetătorii au descoperit noi proprietăți ale curcuminei precum: proprietăți antiproliferative, antimetastatice, antiangiogenice și capacitatea antimutagenică.

II. CONTRIBUȚII PROPRII

MATERIALE ȘI METODE

Liniile celulare GB9B și GB10B au fost obținute din probe tumorale recoltate de la pacienți diagnosticați cu glioblastom la spitalul Bagdasar Arseni din București. După ce un mic fragment din tumoare a fost triturat și filtrat, proba a fost centrifugată timp de 10 minute, iar celulele au fost resuspendate și puse în cultură folosind procedurile standard.

Celulele au fost crescute în flacoane de culturi de celule menținute într-un incubator umidificat cu aer 95%, 5% atmosferă de CO₂, la 37⁰C. Celulele au fost însămânțate în plăci de cultură cu 96 de godeuri (3 x 10³ celule/godeu) și au fost tratate cu diferite concentrații de curcumină, SU1498 (inhibitor selectiv al VEGFR2), AG1433 (un inhibitor cu moleculă mică al PDGFR) și BEZ235 (un inhibitor dual al PI3K/mTOR) timp de trei zile. Apoptoza a fost analizată folosind ApoTarget Caspase-3 (CPP32) Colorimetric Protease Assay kit, ApoTarget Caspase-8 (FLICE) Colorimetric Protease Assay kit, ApoTarget Caspase-9 (Mch6/Apaf-3) Colorimetric Protease Assay kit folosind recomandările producătorului.

Analiza statistică a fost realizată utilizând Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, Statele Unite ale Americii), al XLSTAT și IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, Statele Unite ale Americii). Pentru a testa normalitatea datelor s-a utilizat testul Anderson-Darling. Analiza de variantă (ANOVA) și testul t au fost utilizate pentru analiza semnificației diferențelor dintre grupurile de studiu. Valorile nivelului de probabilitate p<0,05 au fost considerate semnificative statistic. Toate datele sunt reprezentate ca media ± deviația standard (SD). Toate experimentele au fost realizate în trei exemplare.

REZULTATE

În acest studiu, am folosit patru linii celulare de glioblastom GB9B. Acestea sunt linii celulare de glioblastom aflate în pasaj mic, stabilite de la eșantioane tumorale prelevate de la pacienți diagnosticați cu glioblastom, după însămânțarea concentrației de 2x10⁴ celule de glioblastom GB9B în plăci de 6 godeuri au fost puse în culturi în DMEM/ amestec nutrient F-12 HAM timp de 72 de ore.

Am analizat efectul AG1433 (un inhibitor cu moleculă mică al PDGFR) asupra celulelor GB9B. Pentru a examina efectul medicamentului asupra viabilității celulare, celulele GB9B crescute exponențial, au fost expuse la doze crescătoare de AG1433 (0,1, 1, 5, 10, 20, 30, 50, 60 și 100 μM) timp de trei zile, iar efectul citotoxic al inhibitorului a fost evaluat prin testul MTT. Cele mai mari concentrații de AG1433

(100 μ M) au determinat scăderea semnificativă a viabilității celulare la 50,3% la 48 de ore și la 56,5% la 72 de ore.

Am analizat efectul SU1498, inhibitor selectiv al VEGFR2 asupra celulelor GB9B. Am observat că celulele GB9B au răspuns la tratament într-o manieră de dependență a dozei în funcție de timp.

Dozele de BEZ235 utilizate în experimentele noastre au fost mult mai mici în comparație cu cele de AG1433 și SU1498. Cel mai bun efect citotoxic al inhibitorului cu moleculă mică a fost obținut la concentrația de 100 nM.

S-a investigat activitatea caspazei 3, caspazei 8 și a caspazei 9 după tratarea celulelor GB9B cu AG1433, SU1498 și BEZ235. Trei ore după tratarea celulelor de GB cu AG1433, toate cele trei caspaze au fost activate. La 8 ore după tratament doar caspaza 3 și caspaza 8 au rămas activate, în timp ce la 24 de ore după tratament doar caspaza 3 era încă activă. După tratarea celulelor GB9B cu inhibitor VEGFR cu molecula mică, tirfostina SU1498, caspaza 3 s-a activat la trei ore după administrare și a rămas activă la 8 ore și 48 de ore după tratament. Caspaza 9 și caspaza 8 au fost activate numai la 48 de ore de la administrarea SU1498. Când am tratat celulele GB9B cu BEZ235, inhibitor dual cu moleculă mică al căii de semnalizare intracelulară PI3K/Akt/mTOR, s-a observat că la 3 ore după tratament au fost activate caspaza 3 și caspaza 8. La 8 ore și la 48 de ore după administrarea medicamentului au fost activate toate cele trei caspaze în timp ce la 24 de ore după administrarea BEZ235, doar caspaza 3 și caspaza 8 au fost active.

Am evaluat modul în care diferiți inhibitori tirfostine (SU1498, AG1433 și BEZ235) au indus apoptoza în linia celulară de glioblastom GB10B prin determinarea activității caspazelor 3, 8 și 9, știind că caspaza 3 este o protează executoare, în timp ce caspazele 8 și 9 sunt inițiatori ai apoptozei. Astfel, am evaluat activitățile caspazelor 3, 8 și 9 la 3, 8, 24 și 48 de ore după tratamentul cu inhibitorii SU1498, AG1433 și BEZ235. S-a evaluat activitatea caspazei 3, caspazei 8 și a caspazei 9 după tratarea a trei linii celulare (GB3B, GB4B, GB5B) cu curcumină la 4 ore, la 8 ore, la 12 ore, la 24 de ore și 48 de ore.

DISCUȚII ȘI CONCLUZII

O parte a studiului nostru a folosit două linii celulare de glioblastom aflate în pasaj mic: GB9B și GB10B, în scopul determinării efectului unor inhibitori ai receptorilor tirozinkinazici. Utilizarea liniilor celulare este primul pas care conduce cercetarea spre studiile clinice. De fapt, cele mai importante studii preclinice care investighează citotoxicitatea unor medicamente specifice folosesc linii celulare standard. Cu toate acestea, rezultatele acestor studii de multe ori nu corespund observațiilor *in vivo*. Una dintre cauzele ar putea fi faptul că liniile celulare tumorale etablate nu reușesc să reproducă heterogenitatea tumorii. O altă cauză este faptul că toate culturile celulare cu celule canceroase aflate în pasaje înalte acumulează o serie de mutații. Spre deosebire de liniile celulare standard, culturile de celule tumorale aflate în pasaj mic sunt capabile să păstreze fenotipul și genotipul tumorii originale. Rata de proliferare a celulelor de GB, GB9B aflate în pasaj mic a fost 0,3024, iar timpul de dublare a fost de 2,29 zile.

În studiul nostru celulele de glioblastom au răspuns într-o manieră de dependență a dozei de timp la inhibarea PDGFR de către tirfostinul AG1433. Cu toate acestea, medicamentul a fost incapabil să inducă mai mult de 57% citotoxicitate, chiar și la o concentrație de 100 μM , care este raportată a fi foarte ridicată. Astfel, efectele citotoxice ale AG1433 asupra celulelor GB9B au fost modeste, iar valorile calculate pentru IC₂₅ și IC₅₀, rezultate în urma tratamentului cu AG1433 pe linia GB10B au fost de 1,8 și respectiv 67,4 μM .

Deși AG1433 și SU1498 au avut efect citotoxic asupra proliferării celulelor GB9B, activitatea lor antitumorală nu a fost eficace cum era de așteptat. O explicație a acestei observații ar putea fi co-activarea tirozin kinazelor alternative care duc la activarea altor cascade de semnalizare intracelulară. Printre acestea se numără fosfatidilinozitol-3 kinaza (PI3K) și protein kinaza B (AKT)/ ținta rapamicinei la mamifere (mTOR), ambele foarte importante în gliomogeneză prin reglarea creșterii și supraviețuirii celulare. Este deja cunoscut faptul că în aproape 70% din glioblastoame calea de semnalizare intracelulară PI3K/AKT/mTOR este supraactivată.

Apoi, ne-am dorit să determinăm dacă inhibitorii cu moleculă mică utilizați în experimentele noastre sunt capabili să activeze caspazele 3, 8 și 9 în celulele GB9B.

De fapt, în ultimii ani, au fost descrise medicamente care sunt capabile să activeze sintetic caspazele. Printre acestea sunt molecule mici activatorii caspazelor. În acest studiu s-a determinat capacitatea inhibitorilor cu moleculă mică AG1433, SU1498 și BEZ235, de a activa caspazele: 8, 9 și 3 pe linia de celule GB9B. S-a constatat că AG1433 a activat toate cele trei caspaze la 3 ore după administrare. După 8 ore, numai caspaza 3 și caspaza 8 au fost încă activate. Același efect a fost observat la 48 de ore după tratament, în timp ce la 24 de ore numai caspaza 3 a fost activată. Tratamentul cu SU1498, inhibitor VEGFR, a activat numai caspaza 3 la trei ore și la 8 ore, pe când după administrarea medicamentului timp de 48 de ore, toate cele trei caspaze au fost activate. Tratamentul celulelor GB9B cu BEZ235, la trei ore și 24 de ore după administrare a determinat activarea caspazei 3 și caspazei 8. La 8 ore și la 24 de ore după administrarea medicamentului toate trei caspazele au fost activate.

În lucrarea de față s-a constatat că *in vitro* curcumina distruge celulele de glioblastom, într-un mod dependent de doză. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu alte studii care au demonstrat efectul benefic al tratamentului cu turmeric, nu numai pe tumori cerebrale, ci și pe alte tipuri de linii celulare tumorale solide, cum ar fi de: sân, colon, pancreas, plămân

În acest studiu s-au folosit trei linii celulare primare aflate în pasaj mic izolate din tumori de glioblastom (GB3B, GB4B, GB5B). Rata de proliferare a fost aproximativ la fel pentru toate cele trei linii celulare. De fapt, timpul de dublare celular al liniei GB3B s-a dovedit a fi cu 5 ore mai mic decât cel al liniei celulare GB4B și cu 10 ore mai mic decât cel al liniei celulare GB5B, dar diferența dintre ele nu a fost semnificativă statistic. Toate liniile celulare studiate au răspuns într-un mod dependent de doză la tratament. Cea mai scăzută concentrație de curcumină care a indus moartea celulară în celulele de glioblastom a fost 1 μ M pentru toate liniile celulare.

În acest studiu s-a determinat capacitatea curcuminei de a activa caspazele: 8, 9 și 3 pe liniile de celulare GB3B, GB4B și GB5B. S-a constatat că curcumina a activat caspazele 3 și 9 la 4 și respectiv 8 ore după administrare pe toate liniile celulare studiate. După 8 ore, caspaza 8 a fost activată pe linia GB4B. La 12 ore după tratamentul cu curcumină caspaza 3, caspaza 9 precum și caspaza 8 sunt activate pe

toate liniile celulare. Caspazele 3 și 9 sunt active pe toate liniile celulare la 24 de ore. Același efect a fost observat la 48 de ore după tratament.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

R. Ahmed, M. J. Oborski, M. Hwang, F. S. Lieberman, și J. M. Mountz, „Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods”, *Cancer Manag. Res.*, vol. 6, pp. 149-170, 2014.

D. Hanahan și R. A. Weinberg, „Hallmarks of cancer: the next generation”, *Cell*, vol. 144, nr. 5, pp. 646-674, mar. 2011.

Q. T. Ostrom, H. Gittleman, P. Liao, C. Rouse, Y. Chen, J. Dowling, Y. Wolinsky, C. Kruchko, și J. Barnholtz-Sloan, „CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011”, *Neuro-Oncol.*, vol. 16 Suppl 4, pp. iv1-63, oct. 2014.

G. P. Dunn, M. L. Rinne, J. Wykosky, G. Genovese, S. N. Quayle, I. F. Dunn, P. K. Agarwalla, M. G. Chheda, B. Campos, A. Wang, C. Brennan, K. L. Ligon, F. Furnari, W. K. Cavenee, R. A. Depinho, L. Chin, și W. C. Hahn, „Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma”, *Genes Dev.*, vol. 26, nr. 8, pp. 756-784, apr. 2012.

A. Ropper, M. Samuels, și J. Klein, *Adams and Victor's Principles of Neurology 10th Edition*. McGraw Hill Professional, 2014.

K. J. Gotink și H. M. W. Verheul, „Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action?”, *Angiogenesis*, vol. 13, nr. 1, pp. 1-14, mar. 2010.

M. G. McNamara, S. Sahebjam, și W. P. Mason, „Emerging biomarkers in glioblastoma”, *Cancers*, vol. 5, nr. 3, pp. 1103-1119, 2013.

J. S. Logue și D. K. Morrison, „Complexity in the signaling network: insights from the use of targeted inhibitors in cancer therapy”, *Genes Dev.*, vol. 26, nr. 7, pp. 641-650, ian. 2012.

R.-Y. Bai, V. Staedtke, și G. J. Riggins, „Molecular Targeting of Glioblastoma: Drug Discovery and Therapies”, *Trends Mol. Med.*, vol. 17, nr. 6, pp. 301-312, iun. 2011.

B. B. Aggarwal, C. Sundaram, N. Malani, și H. Ichikawa, „Curcumin: the Indian solid gold”, în *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*, Springer, 2007, pp. 1-75.

B. B. Aggarwal, A. Kumar, A. C. Bharti, și others, „Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies”, *Anticancer Res*, vol. 23, nr. 1A, pp. 363-398, 2003.