



MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII
Universitatea de Medicină și Farmacie din
Craiova
ȘCOALA DOCTORALĂ

REZUMAT

TEZĂ DE DOCTORAT
STRATEGII NOI DE TRATAMENT PENTRU
GLIOBLASTOMUL MULTIFORM *IN VITRO*

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
PROF. UNIV. DR. DRICU ANICA

STUDENT – DOCTORAND:
FOLCUȚI CĂTĂLIN-ALEXANDRU

CRAIOVA
2020

Cuprins

TUMORILE CEREBRALE. GENERALITĂȚI.....	1
GLIOBLASTOMUL	1
2.1. Eterogenitatea și recurența tumorală (subtipuri: clasic, proneural, neural și mezenchimal). Glioblastomul este recunoscut pentru imensa lui eterogenitate în ceea ce privește căile de semnalizare, situl tumoral, fenotipul și compoziția sa genetică, epigenetică și moleculară.	1
2.2. Factorii genetici și moleculari în glioblastom.....	1
2.2.1. Receptorul factorului de creștere epitelial (EGFR)	1
2.2.2. PDGFR	2
2.2.3. PTEN.....	2
2.2.4. MGMT	2
2.2.5. IDH1/2.....	2
2.2.6. β-ARESTINA.....	2
2.3. Terapia pacienților cu GBM	2
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....	3
3.1. IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE GENERALE	3
3.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	3
3.2.1. Investigarea meta-analitică a efectului vaccinării cu celule dendritice și a terapiei virale în cazul pacienților diagnosticați cu gliome maligne.	3
3.2.2. EFECTUL INACTIVĂRII EGFR ASUPRA VIABILITĂȚII CELULELOR DE GLIOM MALIGN.....	4
3.3. STUDIUL INFLUENȚEI TRANSFECȚIEI CU B-ARESTINĂ 1 ASUPRA PROLIFERĂRII CELULELOR ȘI A RĂSPUNSULUI LA TRATAMENTUL CU TEMOZOLAMIDĂ ÎN CELULELE DE GLIOM MALIGN.....	5
4. CONCLUZII.....	9
BIBLIOGRAFIE	9

CUVINTE CHEIE: glioblastom, terapie, arestina, vaccinare, temozolamida

TUMORILE CEREBRALE. GENERALITĂȚI

Tumorile cerebrale reprezintă cele mai grave forme tumorale, ținând cont de faptul că sunt mase de celule maligne care afectează sistemele vitale în reglarea balanței neurologice (1). Tumorile cerebrale pot fi primare, clasificate în funcție de tipul de celulă care le-a generat și secundare – metastazele cerebrale – care au punct de plecare alt proces neoplazic din organism (2).

Glioamele reprezintă cele mai frecvente tipuri tumorale ale sistemului nervos central, totalizând un procent de aproximativ 80% din tumorile cerebrale primare. Aceste tipuri de tumori se pot dezvolta la orice vârstă, având un vârf al incidenței în decadele 5-6. Tumorile gliale sunt caracterizate de o mare eterogenitate intratumorală, potențial mare proliferativ și recurență tumorală (1). Din aceste motive, în ciuda ultimelor modalități terapeutice dezvoltate, rata medie de supraviețuire este mai mică de 15 luni (3).

Studierea caracteristicilor histologice ale glioamelor este crucială în identificarea mecanismelor moleculare care stau la baza limitărilor actuale ale terapiei și ale rezistenței glioamelor la chimioterapie citostatică și radioterapie.

GLIOBLASTOMUL

Glioblastomul, cea mai agresivă, invazivă și nediferențiată tumoră cerebrală, prezintă un prognostic sumbru, cu o rată medie de supraviețuire de 14,6 luni (4), în ciuda protocoalelor terapeutice moderne multimodale.

2.1. Eterogenitatea și recurența tumorală (subtipuri: clasic, proneural, neural și mezenchimal). Glioblastomul este recunoscut pentru imensa lui eterogenitate în ceea ce privește căile de semnalizare, situl tumoral, fenotipul și compoziția sa genetică, epigenetică și moleculară.

2.2.2 Factorii genetici și moleculari în glioblastom

2.2.21. Receptorul factorului de creștere epitelial (EGFR)

Studiile de specialitate din ultima decadă au demonstrat faptul că în cazul GBM peste 50% prezintă variante mutante ale EGFR, cea mai frecventă mutație fiind

reprezentată de amplificarea EGFR (aproximativ 40% din GB cu amplificarea EGFR sunt EGF mutante) (3).

2.2.2.2. PDGFR

În cazul GBM, s-a constatat faptul că supraexpresia PDGFR este prezentă într-un procent de 23%, având repercusiuni nefavorabile asupra prognosticului și supraviețuirii pacienților la care era prezentă și mutația IDH1.

2.2.2.3. PTEN

În 40% din cazurile de GBM s-a constatat o diminuare timpurie a expresiei PTEN (5-7), iar în 50-70% din cazurile de GB secundar și în 50-90% din GB primare s-a constatat pierderea heterozigoției cromozomului 10. În plus, s-a demonstrat că PTEN joacă un rol important în neurogeneză și gliogeneză (8-9).

2.2.2.4. MGMT

În cazul GBM, metilarea genei MGMT determină o creștere a sensibilității celulelor tumorale la acțiunea agenților alchilanți precum TMZ. În gliomele de grad mic, rolul și impactul clinic al statusului de metilare al MGMT rămâne în dezbatere științifică.

2.2.2.5. IDH1/2

Studii recente au relevat faptul că cea mai frecventă mutație în gliome este IDH1 R132H (10). De asemenea, s-au constatat mutații IDH în 80-90% din cazurile de gliome de grad II și III (10, 11).

2.2.2.6. β -ARESTINA

Un studiu recent *in vitro* efectuat pe culturi celulare tumorale de GBM a arătat o creștere a sensibilității acestora la TMZ prin activarea genei β -arr1 (12). Activitatea β -arestinei a fost asociată cu diferite tipuri de cancere, inclusiv GBM. Informațiile privind rolul exact al β -arestinei în gliomageneză, proliferare și răspuns terapeutic sunt însă încă insuficiente.

2.2.3. Terapia pacienților cu GBM

GBM rămâne și în prezent o provocare terapeutică în ciuda abordărilor multimodale și interdisciplinare. Provocările actuale în instituirea unui protocol terapeutic eficient constă în caracterul eterogen complex și în localizarea leziunilor tumorale (13).

Metodele terapeutice clasice rămân: terapia chirurgicală, chimioterapia și radioterapia. Noua generație a modalităților terapeutice cuprinde terapia țintită molecular, imunoterapia, terapia virală, terapia adoptivă, vaccinarea cu celule dendritice și terapia genetică.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

3.1. IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE GENERALE

OBIECTIVUL NR. 1

Investigarea meta-analitică a efectului terapiei virale în comparație cu terapia imună cu celule dendritice, în cazul pacienților diagnosticați cu gliome maligne.

OBIECTIVUL NR. 2

În acest studiu am analizat potențialul țintirii EGFR asupra viabilității celulelor de gliom malign.

OBIECTIVUL NR. 3

Studiul influenței transfecției cu β -arestină-1 asupra proliferării celulare și a răspunsului la tratamentul cu temozolomidă în celulele de gliom malign.

3.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

3.2.1. Investigarea meta-analitică a efectului vaccinării cu celule dendritice și a terapiei virale în cazul pacienților diagnosticați cu gliome maligne.

3.2.1.1. Meta-analiza OS și PFS în cazul vaccinării cu celule dendritice

Analiza noastră sistematică a vaccinării cu celule dendritice a integrat 9 studii de specialitate. În aceste studii au fost incluși 357 de pacienți, din care 104 pacienți s-au aflat în grupurile experimentale, iar 253 de pacienți în grupul de control. Din aceștia, 207 pacienți au fost nou-diagnosticați cu HGG (70 pacienți în grupul experimental și 137 în grupul de control al studiului) și 150 de pacienți au fost diagnosticați cu recidivă tumorală în cadrul HGG (34 de pacienți în grupul experimental și 116 în grupul de control). În ceea ce privește terapia combinată cu vaccinarea cu celule dendritice, a fost raportată o îmbunătățire a PFS (HR 0,49), însă cu CI 95% de 0,21-1,16. Din punct de vedere statistic, rezultatele obținute cu terapia prin vaccinarea cu celule dendritice a pacienților cu HGG nu a fost semnificativă ($p=0,10$).

3.2.1.2. Meta-analiza OS și PFS în cadrul terapiei virale

În cele 4 studii cuprinse în analiza sistematică a terapiei virale am identificat 642 de pacienți nou-diagnosticați cu HGG, grupul experimental a cuprins 237 de pacienți, iar grupul de control a cuprins 405 pacienți. În total, în metaanaliza OS au fost incluse 4 studii, iar în metaanaliza PFS au fost incluse 3 studii. În trei studii am observat un progres al OS, cel mai notabil fiind raportat de Wheeler et al (14) (HR 0,72, 95% CI: 0,54-0,97), pe când un studiu condus de Rainov (15) a raportat un beneficiu pentru pacienții aflați în grupul de control (HR 1.08, 95% CI: 0,81-1,46).

3.2.2. Efectul inactivării EGFR asupra viabilității celulelor de gliom malign

3.2.2.1. Tendința de creștere a celulelor netratate de gliom de grad înalt

În studiul de față am analizat proliferarea liniei celulare 11 HGG pe parcursul a 7 zile.

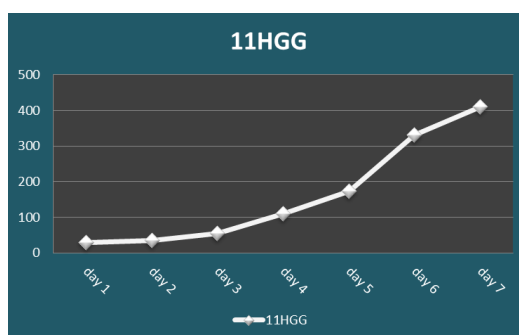


Fig. 1. Curba de creștere a celulelor de gliom de grad înalt

3.2.2.2. Efectul inactivării EGFR asupra celulelor de gliom de grad înalt

În cadrul acestui studiu am ales să investigăm efectul AG556 asupra liniei celulare 11 HGG pentru a putea formula o concluzie asupra citotoxicității acestui agent. Celulele de gliom malign de grad înalt au fost expuse unor diferite concentrații de AG556: 10 μ M, 20 μ M și 30 μ M. Ratele de proliferare celulară au fost calculate la 3 și 7 zile. Linia celulară 11 HGG a prezentat următoarele particularități în ceea ce privește citotoxicitatea agentului inhibitor utilizat: cel mai însemnat efect citotoxic s-a înregistrat în cazul creșterii concentrației de inhibitor la 30 μ M, constatându-se o reducere a numărului de celule maligne supraviețuitoare cu aproximativ 17% la 3 zile de tratament (Fig. 2). Această

valoarea s-a menținut constantă și nu s-au înregistrat creșteri semnificative ale procentajului citotoxicității induse la 7 zile de tratament cu AG 556 (Fig. 3).

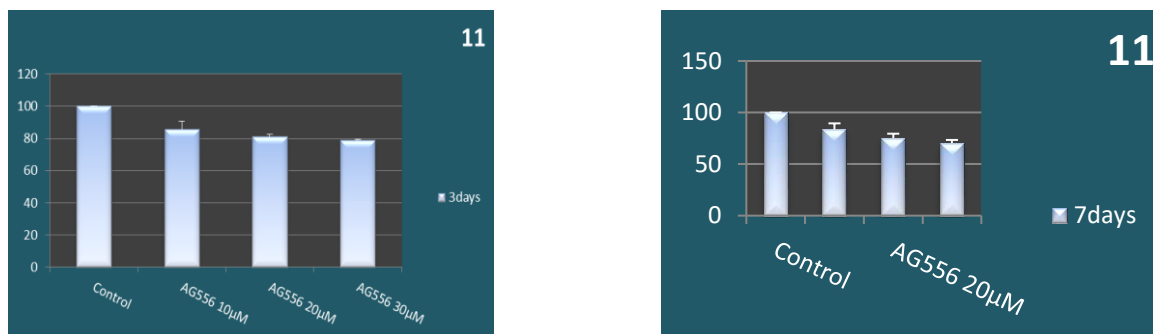
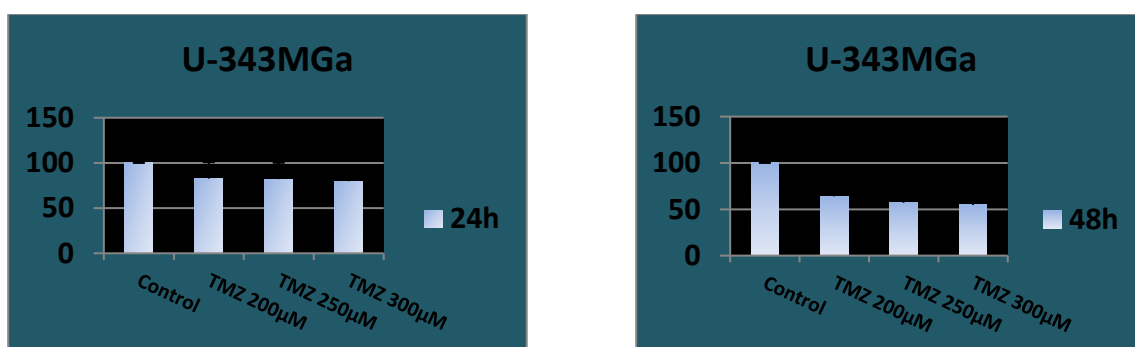


Fig. 2, 3. Efectul inhibitorului AG 556 asupra inactivării EGFR în linia celulară 11 HGG la 3, respectiv 7 zile de tratament

3.3. Studiul influenței transfecției cu β -arestină 1 asupra proliferării celulelor și a răspunsului la tratamentul cu temozolomidă în celulele de gliom malign

3.3.1. Efectul tratamentului cu TMZ asupra celulelor de gliom malign

Experimentul nostru a urmărit, în primă fază, testarea efectului citotoxic al agentului alchilant TMZ asupra a două linii celulare de gliom malign: 18 HGG și U-343MGa. Ulterior tratării liniilor celulare cu diferite concentrații ale agentului alchilant (200 μ M, 250 μ M și 300 μ M), am urmărit scăderea proliferării celulare la 24h, 48h și 72h.



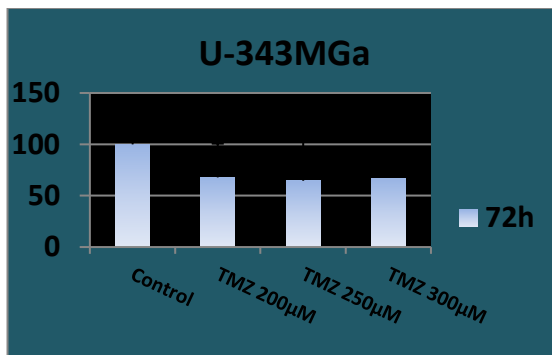
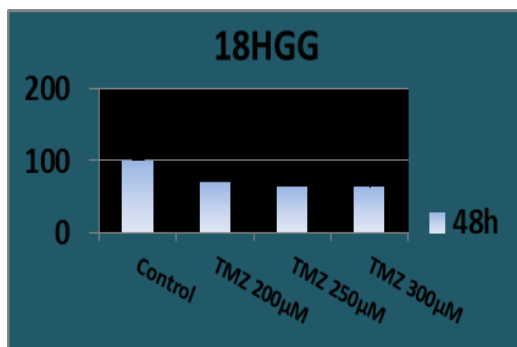
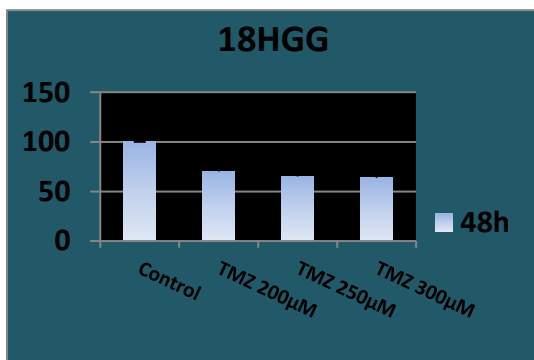


Fig. 4, 5, 6. Efectul tratamentului cu TMZ la 24, 48, 72 h în linia celulară U-343MGa

Astfel, la 24 de ore de tratament cu TMZ s-a constatat în linia celulară U-343MGa o scădere a viabilității celulare expuse la o concentrație de 200 µM de 17,32%. La concentrația de 250 µM s-a identificat un procent de 17,88% celule neviabile, iar la concentrația maximă de 300 µM s-a observat cea mai crescută citotoxicitate de 20,17%. (Fig. 4). În ceea ce privește rezultatele tratamentului cu TMZ la 48 de ore, a fost înregistrată o creștere importantă a efectului citotoxic asupra liniei celulare U-343MGa, astfel (Fig. 5): la concentrația de 300 µM s-a observat cel mai important efect citotoxic, însumând un procent de 45,3%. La 72 de ore de la inițierea tratamentului liniei celulare U-343MGa cu TMZ, citotoxicitatea celulelor tumorale a fost redusă în comparație cu tratamentul la 48 de ore (Fig. 6):

În ceea ce privește cea de-a doua linie celulară, linia 18 HGG, tratată cu aceleași concentrații de agent alchilant timp de 24, 48, respectiv 72 de ore, s-au înregistrat valori similare cu cele din linia U-343MGa (Fig. 7, 8, 9).



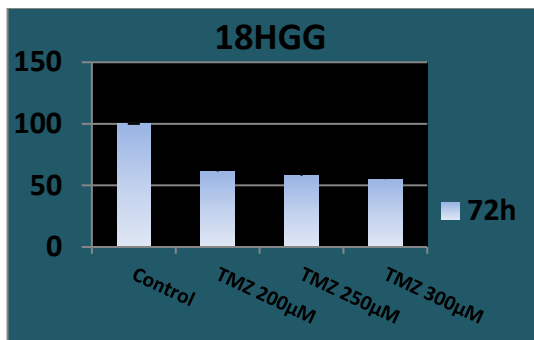


Fig. 7, 8, 9. Efectul tratamentului cu TMZ la 24, 48, 72 h în linia celulară 18 HGG

3.3.2. Studiul influenței transfecției cu β -arestină asupra răspunsului la tratamentul cu TMZ a liniei celulare U-343MGa

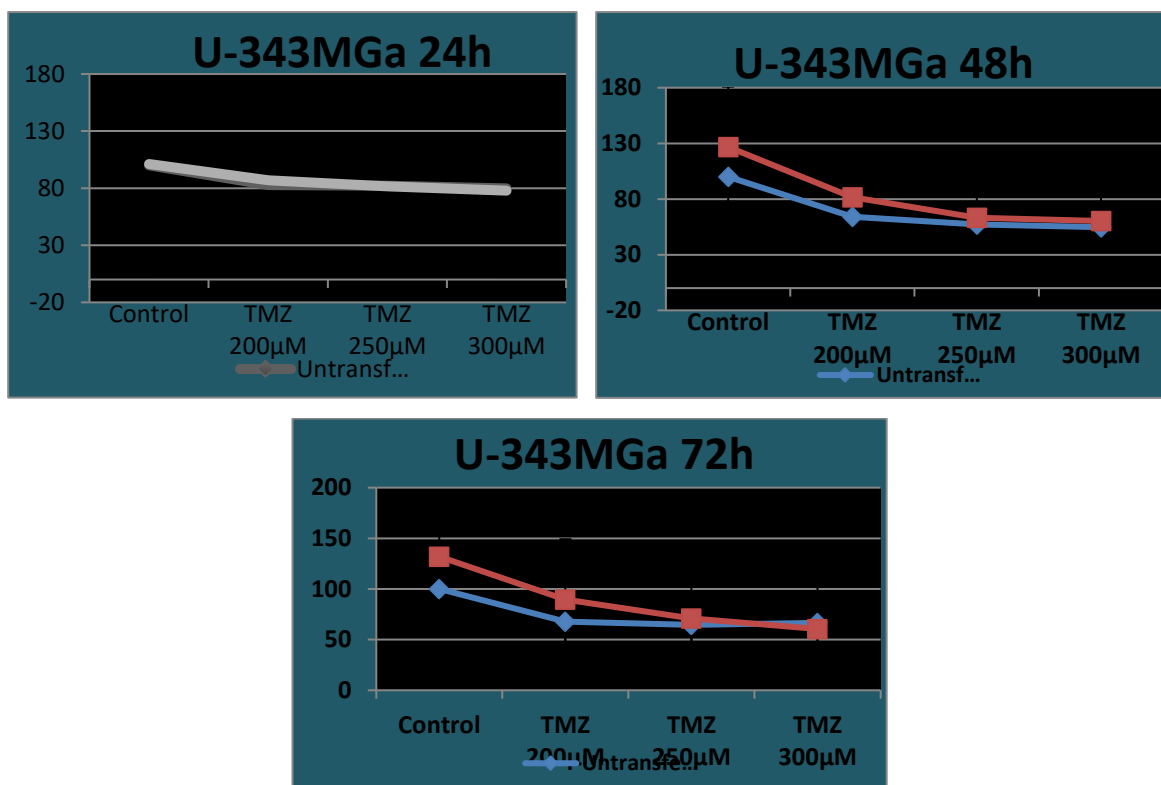


Fig. 10, 11, 12. Influența transfecției cu β -arestină asupra răspunsului la tratamentul cu TMZ a liniei celulare U-343MGa la 24, 48 și 72 h de tratament

La 24 de ore de tratament, transfecția cu β -arr1 a contracarat cu aproximativ 4% efectul tratamentului cu 200 μ M TMZ, însă acest rezultat nu poate fi considerat semnificativ din punct de vedere statistic ($p > 0.05$) (Fig. 10).

Rezultatele obținute au arătat că la 48 de ore de la transfecția cu β -arr1 proliferarea liniei celulare U-343MGa a înregistrat o creștere semnificativă, cu un procent de 26% în comparație cu grupul celular de control ($p \leq 0.05$) (Fig. 11). La 72 de ore de la inițierea tratamentului cu TMZ în concentrație maximă, de 300 μ M, transfecția cu β -arr1 nu a prevenit citotoxicitatea ($p \geq 0.05$) (Fig. 12).

3.3.3. Studiul influenței transfecției cu β -arestină asupra răspunsului la tratamentul cu TMZ a liniei celulare 18 HGG

Transfecția cu β -arr1 a determinat scăderea viabilității celulare în linia celulară 18 HGG

și a prezentat o influență moderată asupra efectului citotoxic al tratamentului cu temozolomidă

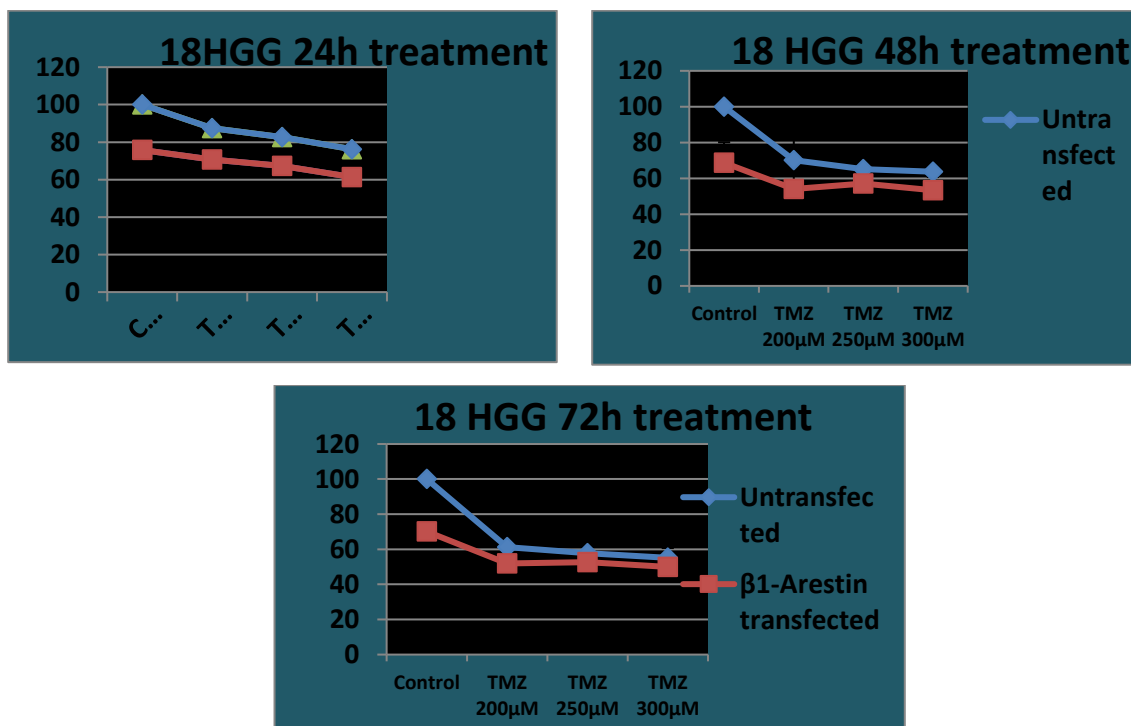


Fig. 13, 14, 15. Influența transfecției cu β -arestină asupra răspunsului la tratamentul cu TMZ a liniei celulare 18 HGG la 24, 48 și 72 h de tratament

4. CONCLUZII

Analiza noastră a demonstrat faptul că abordarea terapeutică bazată pe vaccinarea cu celule dendritice prezintă o îmbunătățire a supraviețuirii generale a pacienților cu gliome de grad înalt nou-diagnosticate (HR=0.65) și recurente (HR=0.63) și a supraviețuirii fără progresie a bolii (HR=0.49) în comparație cu terapia virală.

În cadrul experimentului nostru, inactivarea EGFR cu ajutorul agentului citotoxic AG556 a determinat o scădere a proliferării celulare proporțională cu doza de inhibitor. Acest efect a fost observat la 3 zile de tratament, viabilitatea celulară fiind independentă de pelungirea tratamentului la 7 zile.

Transfecția cu β -arr1 a determinat o creștere a proliferării celulare în linia celulară U343 MGa și a contracarat efectul citotoxic al temozolomidei.

Transfecția cu β -arr1 a determinat scăderea viabilității celulare în linia celulară 18 HGG și a prezentat o influență moderată asupra efectului citotoxic al tratamentului cu temozolomidă.

BIBLIOGRAFIE

1. Rajesh Y., Ispita Pal, Payel Banik et al. Insights into molecular therapy of glioma: current challenges and next generation blueprint. 2017; 38:591-613.
2. Chen L., Zou X. Wang Y. et al. Central nervous system tumors: a single center pathology review of 34,140 cases over 60 years. BMC Clin Pathol. 2013; 13:1-4.
3. Simge Y, Anna K, Ihsan S et al. Management of patients with high-grade glioma. EMJ Oncol. 2014; 2:91-99.
4. Farina H, Kanza M, Kahkashan P et al. Glioblastoma Multiforme: a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. Asian Pac J Cancer Prev. 2017; 18(1):3-9.
5. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, et al. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. J Natl Cancer Inst. 2001; 93(16):1246–1256.

6. Srividya MR, Thota B, Shailaja BC, et al. Homozygous 10q23/PTEN deletion and its impact on outcome in glioblastoma: a prospective translational study on a uniformly treated cohort of adult patients. *Neuropathology*. 2011; 31(4):376–383.
7. Carico C, Nuno M, Mukherjee D, et al. Loss of PTEN is not associated with poor survival in newly diagnosed glioblastoma patients of the temozolomide era. *PLoS One*. 2012; 7(3):e33684.
8. Chenn A, Walsh CA. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science*. 2002; 297(5580):365-369.
9. Fraser MM, Zhu X, Kwon CH, Uhlmann EJ, Gutmann DH, Baker SJ. Pten loss causes hypertrophy and increased proliferation of astrocytes in vivo. *Cancer Res*. 2004; 64(21):7773–7779.
10. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*. 2009; 118:469–74.
11. Cohen AL, Holmen SL, Colman H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep*. (2013) 13:345.
12. Lan T, Wang H, Zhang Z, Zhang M, Qu Y, Zhao Z, Fan X, Zhan Q, Song Y, Yu C. Downregulation of beta-arrestin 1 suppresses glioblastoma cell malignant progression via inhibition of Src signaling. *Experimental cell research*; 2017; 357(1):51-58.
13. Kesari S. Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments. *Semin Oncol*. 2011; 38:2-10.
14. Wheeler, L. A. et al. Phase II multicenter study of gene-mediated cytotoxic immunotherapy as adjuvant to surgical resection for newly diagnosed malignant glioma. *Neuro-oncology*. 2016; 18:1137–1145.
15. Stragliotto, G. et al. Effects of valganciclovir as an add-on therapy in patients with cytomegalovirus-positive glioblastoma: a randomized, double-blind, hypothesis-generating study. *International journal of cancer*. 2013; 133:1204–1213.