

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

**STUDIUL EFECTULUI TERAPIEI ȚINTITE MOLECULAR ÎN
GLIOMUL UMAN DE GRAD ÎNALT PRIN MULTIPLE
MODALITĂȚI *IN VITRO***

REZUMAT

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

Prof. Univ. Dr. Dricu Anica

STUDENT-DOCTORAND:

Ștefan-Alexandru Artene

CRAIOVA

2017

CUPRINS

Introducere

Stadiul cunoașterii

1.1 Generalități și date istorice despre diagnosticul și clasificarea gliomului malign

1.2 Biomarkeri ai gliomului malign

1.3 Tratamentul în gliomul malign

1.3.1 Standardul actual de tratament

1.3.2 Terapia țintită molecular

1.3.3 Inhibitori ai căilor de semnalizare

1.3.4 Imunoterapie

Contribuții personale (studiul experimental)

2. Obiectivele studiului

3. Materiale și metode

3.1 Culturi celulare

3.2 Transfecția

3.3 Tratamentul cu temozolomidă

3.4 Testele de viabilitate celulară

3.5 Analiza statistică

3.6 Analiza sistematică

4. Rezultate

4.1 Analiza sistematică a efectului vaccinării cu celule celule dendritice versus combinația terapeutică dintre bevacizumab plus irinotecan

4.2 Efectele transfecției cu plasmid β -arrestină în culturi celulare de glioame maligne *in vitro*

4.3 Efectul transfecției cu siRNA ELTD1 în culturi celulare de glioame maligne *in vitro*

5. Discuții

6. Concluzii

7. Referințe

Cuvinte cheie: glioblastom, β -arrestina, eltd1, transfecție, citotoxicitate, analiză sistematică;

STADIUL CUNOAȘTERII

În ciuda progresului remarcabil observat în terapia altor forme de cancer, tratamentul în glioblastomul malign nu a reușit să aducă o îmbunătățire semnificativă în ceea ce privește supraviețuirea și calitatea vieții pacienților care suferă de această neoplazie. Elaborarea de noi terapii bazate pe modele preclinice cât și asocierea terapiilor acestor noi cu terapii mai vechi, consacrate în tratamentul gliomului malign, sunt esențiale pentru dezvoltarea de noi protocoale terapeutice.

În cadrul studiului nostru, am pus accentul pe următoarele puncte:

-determinarea efectului citotoxic al transfecției cu plasmid β -arrestină 1 și 2 asupra culturilor celulare de gliom malign;

-determinarea efectului citotoxic al transfecției cu siRNA ELTD1 asupra culturilor celulare de gliom malign;

-analiza sistematică a efectului pe care tratamentul imunoterapic bazat pe celule dendritice îl are comparativ cu protocolul terapeutic bazat pe agentul chimioterapic Irinotecan alături de terapia țintită molecular cu bevacizumab.

CONTRIBUȚII PERSONALE (STUDIUL EXPERIMENTAL)

Studiul nostru a atins următoarele obiective:

OBIECTIVUL NR.1. Compararea efectului tratamentului bazat pe combinația terapeutică dintre bevacizumab și irinotecan și terapia imună cu celule dendritice în cazul pacienților diagnosticați cu glioame maligne.

În cadrul studiului nostru am efectuat o analiză sistematică a studiilor din literatura de specialitate pentru pacienții care au primit bevacizumab și irinotecan sau vaccinare cu celule dendritice. Rezultatele au fost comparate prin prisma supraviețuirii medii, a beneficiului de supraviețuire cât și al beneficiului de supraviețuire ponderat.

OBIECTIVUL NR. 2 Evaluarea efectului transfecției cu β -arrestină 1 asupra proliferării și tratamentului cu temozolomidă în liniile celulare de gliom malign.

În cadrul studiului nostru am transfectat două culturi de glioame maligne U 343 MGa și CL 2:6 cu plasmid β -arrestină 1, pentru a observa cum supraexpresia β -arrestinei 1

influențează atât proliferarea celulelor tumorale cât și modul în care celulele de gliom malign răspund expunerii la agentul alchilant temozolomidă.

OBIECTIVUL NR. 3 Evaluarea efectului transfecției cu β -arrestină 2 asupra proliferării și tratamentului cu temozolomidă în liniile celulare de gliom malign.

În cadrul studiului nostru am transfectat două culturi de glioame maligne U 343MGa și CL 2:6 cu plasmid β -arrestină 2, pentru a vedea cum supraexpresia β -arrestinei 2 influențează atât proliferarea celulelor tumorale cât și modul în care celulele de gliom malign răspund la tratamentul cu temozolomidă.

OBIECTIVUL NR. 4 Evaluarea efectului transfecției cu siRNA ELTD1 asupra proliferării în liniile celulare de gliom malign.

În cadrul studiului nostru am transfectat două linii de glioame maligne GB5B și GB8B cu siRNA ELTD1 pentru a observa cum inactivarea genei ELTD1 influențează proliferarea celulelor tumorale.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În cadrul studiului nostru, am comparat efectele tratamentului chimioterapic cu irinotecan alături de cel țintit molecular cu bevacizumab cu terapia imună cu celule dendritice în cazul pacienților cu glioame maligne de grad înalt. Un număr total de 381 de pacienți din 14 trialuri clinice diferite au fost incluși în studiul nostru. 302 pacienți au primit irinotecan plus bevacizumab în timp ce doar 79 dintre aceștia au fost vaccinați cu celule dendritice. Conform rezultatelor obținute din prelucrarea datelor publicate în literatură de specialitate, imunoterapia bazată pe vaccinarea cu celule dendritice nu a adus beneficii semnificative pentru pacienții din grupul care a fost vaccinat cu celule dendritice. În timp ce supraviețuirea medie a fost semnificativ mai ridicată în cazul bolnavilor care au primit imunoterapie, acest aspect nu s-a reflectat în beneficiul de supraviețuire calculat de noi pentru toți pacienții. Din totalul de 7 trialuri clinice care au abordat tratamentul cu celule dendritice, doar două studii au înregistrat un beneficiu de supraviețuire pozitiv, arătând astfel că această opțiune este similară altor variante de tratament paleativ în glioamele maligne de grad înalt.

În ceea ce privește transfecția cu plasmid β -arestină, în cadrul experimentului nostru am demonstrat că supraexpresia genei β -arr 1 sporește rezistența la tratamentul cu TMZ în două culturi de gliome maligne (U 343 MGa and CI 2:6). Trebuie menționat că efectul a fost mai pronunțat în cazul liniei CI 2:6. O explicație ar fi diferențele fenotipice acumulate de cele două linii de celule imortalizate de-a lungul nenumăratelor pasaje suferite. În cadrul experimentului nostru, am analizat și maniera în care supraexpresia β -arr 2 influențează răspunsul la tratamentul cu TMZ. În ambele linii celulare, supraexpresia β -arr 2 a influențat răspunsul la tratamentul exclusiv pentru doza maximă admisă în experimentul nostru, de 300 μ M TMZ, crescând sensibilitatea celulelor transfectate la tratamentul cu agentul alchilant. Pentru restul dozelor din experimentul nostru, transfecția cu β -arr 2 a produs efecte contradictorii sau nu a influențat deloc răspunsul la expunerea la TMZ. De asemenea, transfecția cu β -arr 2 nu a influențat semnificativ proliferarea celulelor care nu au fost tratate cu TMZ. Aceste rezultate arată că acțiunea β -arr 2 este foarte puțin înțeleasă, ea fiind simultan considerată ca supresoare cât și potențatoare pentru diferite tipuri de cancer, subliniind existența unor mecanisme încă necunoscute care guvernează activitatea acestei gene.

În studiul nostru, liniile celulare GB5B și GB8B a fost transfectate cu siRNA anti-ELTD1 și au demonstrat o citotoxicitate neobișnuit de mare. Aceste rezultate crează un număr extraordinar de mare de posibilități în tratamentul gliomelor maligne, prin prisma asocierii cu terapii mai vechi sau mai noi care, individual, nu au prezentat eficiența dorită. Astfel, asocierea cu siRNA anti-ELTD1 a acestor tratamente ar putea dovedi, în viitor, un efect sinergic cu beneficii reale pentru pacienții care suferă de acest cancer incurabil.

CONCLUZII

STUDIUL NR.1 Analiza sistematică a efectului tratamentului cu bevacizumab alături de irinotecan comparativ cu imunoterapia bazată pe vaccinarea cu celule dendritice.

Studiul nostru a demonstrat că abordarea terapeutică bazată pe vaccinarea cu celule dendritice nu a fost superioară combinației terapeutice dintre irinotecan și bevacizumab nici în termeni de supraviețuire medie ($P=0.535$) și nici în ceea ce privește beneficiul de

supraviețuire ponderată ($P=0.620$) pentru pacienții diagnosticați cu gliome maligne de grad înalt recurente.

STUDIUL NR.2 Efectul transfecției cu plasmid β -arrestină 1 în culturile de celule U-343 MGa și CL 2:6, asupra proliferării și răspunsului la tratament.

În cadrul experimentului nostru s-a observat că transfecția cu plasmid β -arrestină 1 a determinat o intensificare a proliferării celulelor din liniile celulare U-343 MGa și CL 2:6. De asemenea, s-a observat că transfecția cu β -arrestină 1 contracarează efectul citotoxic al agentului alchilant temozolomidă. Efectul transfecției cu β -arrestină 1 a fost mai pronunțat în cadrul culturii celulare CL 2:6 decât U-343 MGa.

STUDIUL NR.3 Efectul transfecției cu plasmid β -arrestină 2 în culturile de celule U-343 MGa și CL 2:6, asupra proliferării și răspunsului la tratament.

În cadrul experimentului nostru, transfecția cu plasmid β -arrestină 2 a produs efecte contradictorii asupra proliferării și răspunsului la tratament. În cazul celulelor care nu au fost expuse la TMZ, transfecția cu β -arr 2 a produs atât o scădere cât și o creștere a proliferării comparativ cu celulele netransfectate, pentru liniile celulare U-343 MGa și CL 2:6. În ceea ce privește răspunsul la tratamentul cu TMZ, s-a observat un efect constant de sporire al citotoxicității exclusiv pentru doza de 300 μ M, restul dozelor producând fie sporirea sau scăderea citotoxicității fie neavând niciun efect semnificativ statistic. Pentru elaborarea unor concluzii definitive asupra rolului pe care nivelul β -arrestina 2 îl are asupra proliferării și răspunsului la tratament, sunt necesare studii aprofundate asupra modului în care aceasta interacționează cu diferite mecanisme intrinseci ale gliomelor maligne.

STUDIUL NR.4 Efectul transfecției cu siRNA ELTD1 în culturile de celule GB5B și GB8B.

Transfecția cu siRNA ELTD1 a produs o scădere a proliferării în ambele linii direct proporțională cu doza de siRNA folosită și timpul de expunere. Astfel, la 72h, doza de 50 nM siRNA ELTD1 a înjumătățit capacitatea de proliferare a celulelor de GBM din liniile GB5B și GB8B. Acest efect citotoxic pronunțat prezintă un potențial deosebit, putând fi asociat altor abordări terapeutice în speranța producerii unui efect cumulativ sinergic superior altor tratamente folosite în monoterapie.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica*. 2016;131(6):803-20.
2. Scherer HJ. A Critical Review: The Pathology of Cerebral Gliomas. *Journal of neurology and psychiatry*. 1940;3(2):147-77.
3. Kirkpatrick DB. The first primary brain-tumor operation. *Journal of neurosurgery*. 1984;61(5):809-13.
4. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*. 2005;352(10):987-96.
5. 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. *The Lancet Oncology*. 2009;10(5):459-66.
6. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(5):341-54.
7. Padfield E, Ellis HP, Kurian KM. Current Therapeutic Advances Targeting EGFR and EGFRvIII in Glioblastoma. *Frontiers in oncology*. 2015;5:5.
8. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature reviews Drug discovery*. 2004;3(5):391-400.
9. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, 2nd, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(30):4722-9.
10. Chang CN, Huang YC, Yang DM, Kikuta K, Wei KJ, Kubota T, et al. A phase I/II clinical trial investigating the adverse and therapeutic effects of a postoperative autologous dendritic cell tumor vaccine in patients with malignant glioma. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2011;18(8):1048-54.

11. Xu X, Stockhammer F, Schmitt M. Cellular-based immunotherapies for patients with glioblastoma multiforme. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:764213.
12. Bokstein F, Shpigel S, Blumenthal DT. Treatment with bevacizumab and irinotecan for recurrent high-grade glial tumors. *Cancer*. 2008;112(10):2267-73.
13. Yu JS, Liu G, Ying H, Yong WH, Black KL, Wheeler CJ. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer research*. 2004;64(14):4973-9.
14. Buchanan FG, DuBois RN. Emerging roles of beta-arrestins. *Cell cycle*. 2006;5(18):2060-3.
15. Lefkowitz RJ, Rajagopal K, Whalen EJ. New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors. *Molecular cell*. 2006;24(5):643-52.
16. Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Progress in neurobiology*. 2002;66(2):61-79.
17. Jing X, Zhang H, Hu J, Su P, Zhang W, Jia M, et al. beta-arrestin 2 is associated with multidrug resistance in breast cancer cells through regulating MDR1 gene expression. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(2):1354-63.
18. Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current molecular pharmacology*. 2012;5(1):102-14
19. Raghuvanshi SK, Nasser MW, Chen X, Strieter RM, Richardson RM. Depletion of beta-arrestin-2 promotes tumor growth and angiogenesis in a murine model of lung cancer. *Journal of immunology*. 2008;180(8):5699-706.
20. Towner RA, Jensen RL, Colman H, Vaillant B, Smith N, Casteel R, et al. ELTD1, a potential new biomarker for gliomas. *Neurosurgery*. 2013;72(1):77-90; discussion 1.
21. Zhang G, Huang S, Wang Z. A meta-analysis of bevacizumab alone and in combination with irinotecan in the treatment of patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2012;19(12):1636-40.
22. Liebelt BD, Finocchiaro G, Heimberger AB. Principles of immunotherapy. *Handbook of clinical neurology*. 2016;134:163-81.

23. Favara DM, Banham AH, Harris AL. A review of ELTD1, a pro-angiogenic adhesion GPCR. *Biochemical Society transactions*. 2014;42(6):1658-64.
24. Masiero M, Simoes FC, Han HD, Snell C, Peterkin T, Bridges E, et al. A core human primary tumor angiogenesis signature identifies the endothelial orphan receptor ELTD1 as a key regulator of angiogenesis. *Cancer cell*. 2013;24(2):229-41.
25. Scherman D, Rousseau A, Bigey P, Escriou V. Genetic pharmacology: progresses in siRNA delivery and therapeutic applications. *Gene therapy*. 2017;24(3):151-6.