

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

TEZĂ DE DOCTORAT

**TERAPIA MOLECULARĂ A GLIOBLASTOMULUI PRIN
INHIBAREA SELECTIVĂ A RECEPTORILOR TIROZINKINAZICI**

REZUMAT

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

**STUDENT-DOCTORAND:
OANA DĂIANU**

**CRAIOVA
2017**

CUPRINS

ABREVIERI

INTRODUCERE

STADIUL CUNOAȘTERII

1. TUMORILE CEREBRALE. GENERALITĂȚI

- 1.1. Epidemiologie. Incidență. Localizare
- 1.2. Clasificare
- 1.3. Simptomatologia clinică
- 1.4. Diagnosticul și tratamentul tumorilor cerebrale

2. MECANISME MOLECULARE ȘI CELULARE ÎN DIAGNOSTICUL TUMORILOR CEREBRALE

- 2.1. RTK Generalități
- 2.2. Clasificarea și structura RTK
 - 2.2.1. Receptorul factorului de creștere epidermal
 - 2.2.2. Receptorul factorului de creștere derivat din plachete
 - 2.2.3. Receptorul factorului de creștere al endoteliului vascular
 - 2.2.4. ELTD1
- 2.3. RTKs și căile de activare a semnalului
 - 2.3.1. Calea MAPK
 - 2.3.2. Calea PI3K/Akt/mTOR
 - 2.3.3. PLC γ și JAK/STAT
- 2.4. Căile de semnalizare a RTKs în tumorile cerebrale

3. TERAPIA ȚINTITĂ ÎN TUMORILE CEREBRALE

- 3.1. RTKs ca ținte terapeutice în tumorile cerebrale
- 3.2. Inhibarea EGFR
- 3.3. Inhibarea PDGFR
- 3.4. Inhibarea VEGFR
- 3.5. Inhibarea ELTD1
- 3.6. Obstacole și viitoare studii

CONTRIBUȚII PERSONALE

4. OBIECTIVELE STUDIULUI

5. MATERIALE ȘI METODE

5.1. Materiale

5.2. Metode

5.2.1. Celule și culturile celulare

5.2.2. Tratarea celulelor

5.2.3. Determinarea viabilității celulare

5.2.3.1. Analiza Hemocitometrică

5.2.3.2. Metoda MTT

5.2.4. Manipularea probelor lichide și a suspensiilor celulare

5.2.5. Transfecția cu siRNA

5.2.6. Studiul ratei de supraviețuire a pacienților cu gliom malign recurent în urma tratamentului imunoterapeutic cu celule dendritice, comparativ cu tratamentul combinat cu bevacizumab și irinotecan

5.2.6.1. Strategia de căutare și selecția studiilor

5.2.6.2. Criterii de eligibilitate

5.2.6.3. Analiza datelor

5.2.7. Interacțiunea dintre tratamentul cu AG556 și TMZ

5.2.8. Analiza statistică

6. REZULTATE

6.1. Distribuția tumorilor în corelație cu tipul histologic, vârsta și sexul

6.1.1. Incidența tumorilor cerebrale în funcție de vârstă

6.1.2. Incidența tumorilor cerebrale în funcție de sexe

6.1.3. Studiu de metaanaliză

6.1.4. Efectul inactivării PDGFR asupra culturilor celulare de glioblastom

6.1.5. Efectul inactivării VEGFR asupra culturilor celulare de glioblastom

6.1.6. Efectul subexprimării ELTD1

6.1.7. Efectul inhibării EGFR asupra celulelor de gliom malign

6.1.8. Tratamentul cu TMZ

6.1.9. Tratamentul combinat AG556 + TMZ

7. DISCUȚII

8. CONCLUZII

9. BIBLIOGRAFIE

Cuvinte cheie: glioblastom, receptori tirozinkinazici, tratament combinat

STADIUL CUNOAȘTERII

Glioblastomul este cea mai agresivă tumoră malignă primară la adult, cu o rată de supraviețuire foarte scăzută și un prognostic limitat, în ciuda numeroaselor progrese diagnostice și terapeutice. De-a lungul ultimelor decenii au fost înregistrate eforturi în înțelegerea biologiei complexe a acestor tumori, punându-se accent pe detectarea unor noi biomarkeri ce ar putea permite detectarea precoce și dezvoltarea unor strategii terapeutice.

Noi metode de tratament a glioblastomului sunt investigate în prezent, în cercetarea medicală. Din cauza capacității mari de a invada țesuturile învecinate, terapiile adjuvante sunt recomandate în gliomele maligne. Studii recente sugerează că amprenta genetică a fiecărui pacient va permite terapii moleculare personalizate, mai eficiente.

Cele mai frecvente alterări genetice în gliomul malign sunt reprezentate de mutații ale EGFR. O altă abordare terapeutică nouă este antiangiogeneza. Alți receptori utilizați curent ca ținte terapeutice în glioblastom sunt VEGFR și PDGFR. Studii recente au sugerat că ELTD1, receptor implicat în procesul de angiogeneză, are un rol important în progresia și dezvoltarea glioblastomului multiform.

CONTRIBUȚII PERSONALE

În cadrul acestui studiu am considerat necesară evidențierea unor biomarkeri mult mai specifici pentru gliomul malign, care ar putea face diagnosticarea și eventualele opțiuni terapeutice mult mai ușoare. Simultan am încercat blocarea unor receptori tirozinkinazici prin terapie țintită molecular cât și silențierea unor proteine receptori, pe care noi le-am considerat mult mai specifice pentru gliomul malign.

Studiul a atins următoarele obiective:

Obiectivul 1 - Studiul distribuției tumorilor în corelație cu tipul histologic, vârsta, sexul, mediul de proveniență urban-rural și distribuția geografică pe regiuni

În România nu există la această oră studii statistice disponibile care să înregistreze incidența tumorilor cerebrale, de aceea studiul nostru își propune să determine distribuția tumorilor cerebrale pe perioada 2006-2012, corelând vârsta și sexul, utilizând datele din registrul de tumori al Spitalul Bagdasar Arseni din București, Departamentul de Neurochirurgie, pentru 262 de pacienți care au fost incluși într-o Bancă de Tumori Cerebrale (BTB).

Obiectivul 2 - Studiul ratei de supraviețuire a pacienților cu gliom malign recurent în urma tratamentului imunoterapeutic cu celule dendritice, comparativ cu tratamentul combinat cu bevacizumab și irinotecan

Tratamentul standard pentru gliomul malign recurent constă din bevacizumab plus irinotecan. Vaccinarea cu celule dendritice s-a raportat în literatura de specialitate a fi o terapie inovativă, alternativă mai eficientă pentru tratamentul de gliom malign recurent. În cadrul acestui studiu, am considerat necesară comparația statistică a ratei de supraviețuire în urma celor două tipuri de tratament, fundamental diferite în ceea ce privește abordarea terapeutică.

Obiectivul 3 – Studiul efectului inhibării receptorilor tirozinkinazici asupra viabilității celulelor de GB in vitro

Modul fiziologic de acțiune al receptorilor tirozinkinazici este de a regla proliferarea celulară. Aceste proteine receptori și căile lor de semnalizare intracelulare sunt frecvent alterate genetic sau epigenetic în celulele canceroase, astfel conferă un avantaj de proliferare celulelor tumorale. Alături de VEGFR și PDGFR studiile recente sugerează că receptorul ELTD1 este, de asemenea, implicat în angiogeneza tumorală. Inhibitorii tirozinkinazici au fost intens studiați de-a lungul ultimilor ani, ca o terapie țintită moleculară de nișă, în tratamentul tumorilor cerebrale.

Scopul acestui obiectiv este de a analiza rolul receptorilor tirozinkinazici ca ținte terapeutice în terapia gliomului de grad înalt.

Obiectivul 4 – Evaluarea acțiunii sinergice de tip doză - răspuns in vitro a agentului chimic TMZ și a inhibitorului AG556

Administrarea terapiei combinate în tumorile cerebrale este o practică medicală standard, cu rezultate promițătoare. Agentul de alchilare TMZ este utilizat pentru tratamentul tumorilor cerebrale de grad mic și înalt. Se știe însă că glioblastomul este remarcabil de rezistent la tratamentul cu TMZ, mai multe molecule din familia receptorilor tirozinkinazici fiind suspectate că ar interfera cu acțiunea sa. Aceasta sugerează că abordările combinate care implică TMZ și inactivarea RTKs ar putea constitui o posibilă direcție terapeutică viitoare pentru această boală malignă. În cadrul acestui studiu, ne-am propus să evaluăm efectele tratamentului TMZ în asociere cu AG556, un inhibitor al activității EGFR, asupra celulelor de glioblastom.

MATERIAL ȘI METODĂ. Capitolul prezintă materialele utilizate în cercetare și proveniențele lor. Astfel, se face referire la mediul de cultură celulară, la kitul de determinare a creșterii celulare MTT, la serul fetal bovin (FBS), la antibiotice, tripsina, tamponul fosfat salin (PBS) utilizate. De asemenea, s-au utilizat inhibitorii SU1498, AG1433, AG556 și agentul TMZ.

Pentru implementarea Obiectivului nr. 1 s-a apelat la date din registrul de tumori al Spitalului Bagdasar Arseni din București, Departamentul de Neurochirurgie. Indicatorii urmăriți au fost ratele de incidență pentru principalele tumori cerebrale pentru perioada de 5 ani și relația lor cu vârsta și sexul.

Pentru implementarea Obiectivului nr. 2 s-a avut în vedere un studiu epidemiologic utilizat pentru a evalua în mod sistematic studiile de cercetare anterioare într-un domeniu specific, care furnizează o estimare mai precisă a efectului tratamentului sau a factorului de risc pentru o anumită afecțiune, comparativ cu studiile individuale.

Pentru implementarea Obiectivului nr. 3 am utilizat linia celulară de glioblastom GB8B sub acțiunea AG1433 și SU1498, linia GB1B sub acțiunea AG556 și TMZ.

Pentru implementarea Obiectivului nr. 4 în scopul stabilirii acțiunii sinergice a combinației AG556 + TMZ am utilizat linia celulară GB1B.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

- Studiu de metaanaliză

După prelucrarea datelor din literatura de specialitate pe baza criteriilor de eligibilitate au rămas 7 studii care au descris pacienții care au primit bevacizumab plus irinotecan și 7 studii care au descris pacienții care au primit imunoterapie cu celule dendritice. Un total de 381 de pacienți au fost incluși în studiul nostru sistematic cu 302 (79.26%) dintre aceștia primind bevacizumab plus irinotecan și 79 (20,74%) fiind vaccinați cu celule dendritice. Studiul a inclus 243 bărbați și 138 femei.

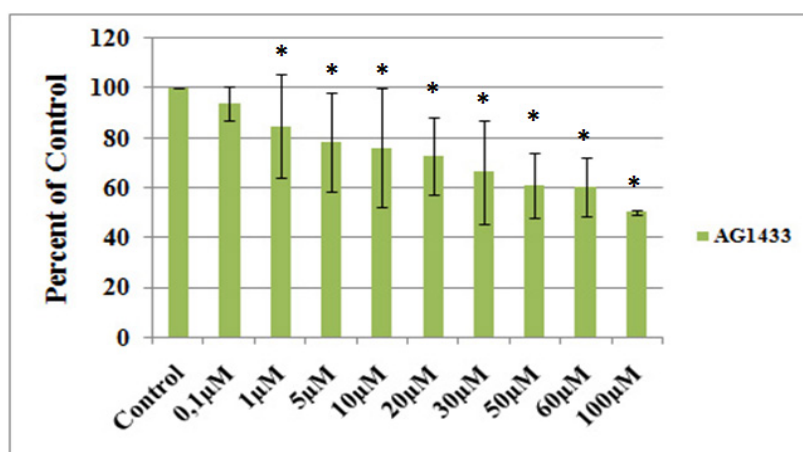
În ceea ce privește rezultatul tratamentului, valoarea medie raportată a MoS a fost de 7,5 (95% CI 4.84-10.16) luni pentru pacienții care au primit bevacizumab și irinotecan. Pentru pacienții care au primit vaccin cu celule dendritice, valoarea medie raportată a MoS a fost de 17,9 (95% CI; 11.34-24.46) luni. În comparație, studiile folosind bevacizumab și irinotecan au raportat un beneficiu în supraviețuire de $-0.02 \pm 2,00$, în timp ce creșterea medie a supraviețuirii a fost de $-0.01 \pm 4,54$ pentru grupul în care s-a folosit imunoterapie cu celule dendritice. În general, am observat că, în comparație cu protocolul bazat pe bevacizumab și irinotecan, vaccinarea cu celule dendritice nu are un efect statistic semnificativ asupra OS (P

= 0,535) și nu îmbunătățește statistic creșterea supraviețuirii ponderate ($P = 0,620$) pentru pacienții cu gliome maligne.

- Efectul inactivării PDGFR asupra culturilor celulare de glioblastom

Pentru a analiza efectul inhibării PDGFR am utilizat o linie celulară de glioblastom (GB8B). Celulele tumorale GB8B au fost expuse la AG1433 utilizând concentrații de medicament de 0,1, 1, 5, 10, 20, 30, 50, 60, 100 μM . Efectul inhibitorului privind viabilitatea celulară a fost investigat la 72 ore.

Tratamentul cu AG1433 a produs 15% citotoxicitate în rândul celulelor GB8B, începând cu concentrația de 1 μM . Concentrațiile de 5, 10 și 20 μM AG1433 au produs moartea a aproximativ 25% din celule. Concentrațiile mai mari de AG1433 (50 și 60 μM) a indus moartea a peste 40% din celule și concentrația maximă de 100 μM cu AG1433 a indus moartea a peste 50% din celulele GB8B.

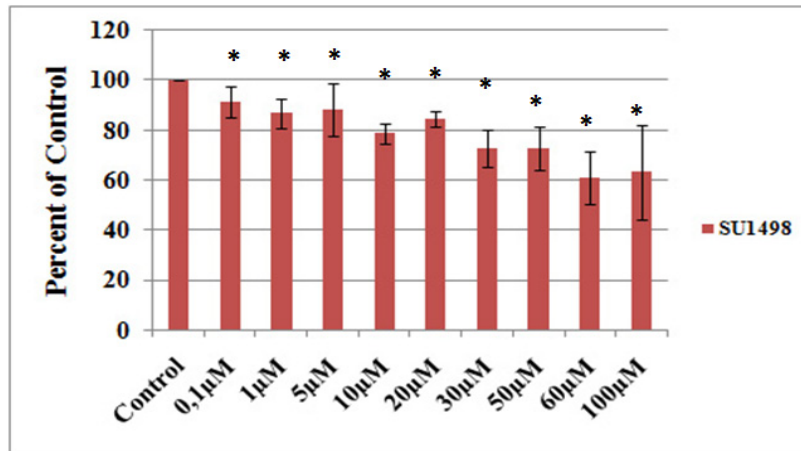


Efectul inhibării PDGFR asupra celulelor de glioblastom GB8B

- Efectul inactivării VEGFR asupra culturilor celulare de glioblastom

Pentru a analiza efectul inhibării VEGFR am utilizat o linie celulară de glioblastom (GB8B). Celulele tumorale GB8B au fost expuse la SU1498 utilizând concentrații de 0,1, 1, 5, 10, 20, 30, 50, 60, 100 μM . Efectul inhibitorului privind viabilitatea celulară a fost investigat după 72 de ore.

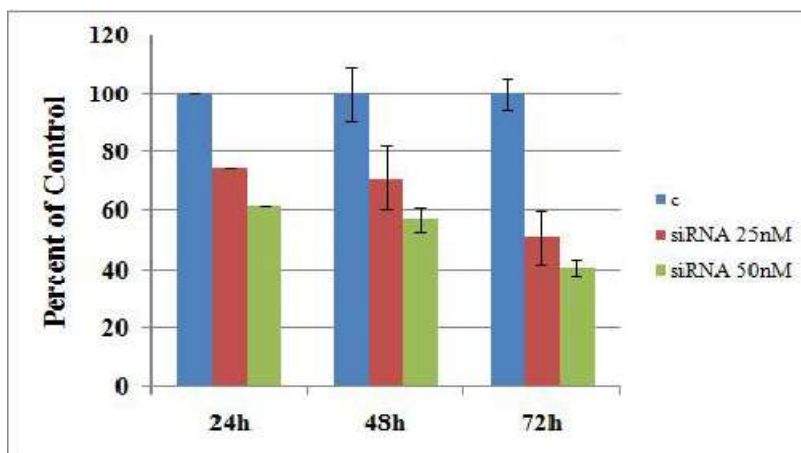
Rezultatele arată că tratamentul cu 0,1 μM SU1498 a indus citotoxicitate celulară de 10%. Concentrațiile de SU1498 de 1-20 μM au determinat o scădere a viabilității de 15-20%, tratamentul cu 30 și 40 μM SU1498 a scăzut viabilitatea celulară cu 29%, iar dozele de 60 și 100 μM SU1498 au provocat moartea celulară a 60% din celulele tumorale, după 72 de ore după tratament.



Efectul inhibării VEGFR asupra celulelor de glioblastom GB8B

- Efectul subexprimării ELTD1

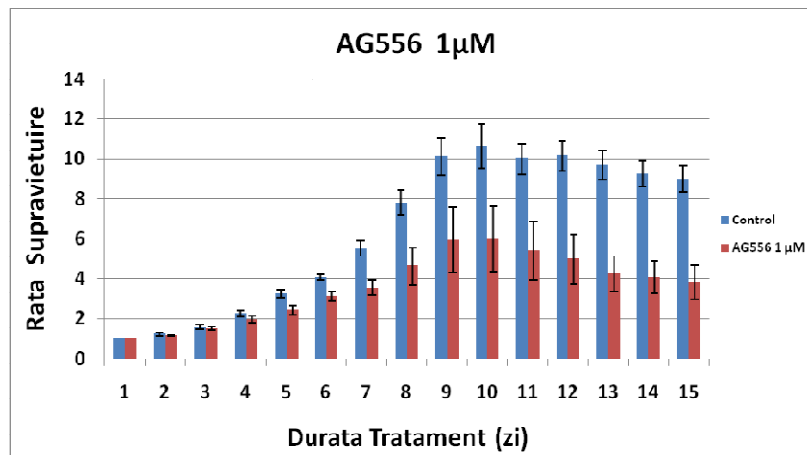
Blocarea funcției receptorului ELTD1 afectează apariția de noi vase de sânge și dezvoltarea lor, reducând creșterea tumorii și îmbunătățind supraviețuirea. Inhibarea funcției receptorului ELTD1 în celulele de glioblastom GB8B a fost făcută prin transfectare cu siRNA. Celulele au fost transfectate cu siRNA-ELTD1 (25 și 50 nM) și incubate pentru 24, 48 și 72 ore. S-a înregistrat o scădere semnificativă a supraviețuirii celulare după 72 ore de tratament pentru ambele doze. Silențierea ELTD1 cu 25 nM siARN a indus moartea a aproximativ 25% din celule la 24 și 48 de ore, iar 25 nM siRNA-ELTD1 au indus moartea a 50% din celule la 72 ore. 50 nM de siRNA ELTD1 au avut o citotoxicitate de 40% la 24 și 48 de ore și au determinat moartea a 60% din celule la 72 ore.



Efectul de inhibare a ELTD1 prin siARN asupra viabilității celulelor de glioblastom in vitro

- Efectul inhibării EGFR asupra celulelor de gliom malign

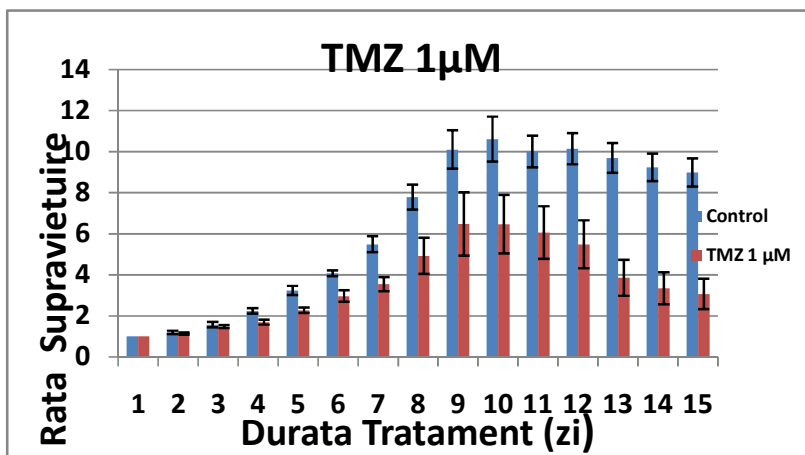
Studiul actual a investigat efectele inactivării EGFR asupra viabilității celulelor tumorale cerebrale GB1B. Celulele au fost supuse inhibării specifice EGFR cu AG556 (1, 5 și 10 μM) timp de 24 ore și apoi agentul a fost îndepărtat prin spălare și celulele au fost mai apoi incubate în mod continuu până la 15 zile. AG556 a inhibat creșterea celulară într-o manieră dependentă de timp și de doză. În linia GB1B de glioblastom, 1 μM de AG556 a determinat o scădere a raportului de viabilitate celulară cu aproximativ 1 în ziua 6; 3 în ziua 8 și peste 5 în zilele 12, 13, 14 și 15 comparativ cu celulele netratate.



Tratamentul cu 1 μM AG556

- Tratamentul cu TMZ

Am analizat efectul TMZ asupra celulelor tumorale de glioblastom (linia GB1B). Celulele tumorale GB1B au fost tratate cu 1 μM sau 5 μM de TMZ timp de 24 de ore. Tratamentul cu 1 μM TMZ a indus inhibarea semnificativă ($P \leq 0,05$) a viabilității celulare în cultura GB1B începând din ziua a cincea și crescând odată cu trecerea timpului. Rata de viabilitate a GB1B a scăzut cu aproximativ 1 la cinci și șapte zile după tratamentul cu 1 μM TMZ, cu 3 la opt și nouă zile, cu aproximativ 4 la unsprezece și douăsprezece zile și cu circa 6 la treisprezece, paisprezece și șaptesprezece zile, comparativ cu celulele netratate.



Tratamentul cu 1 µM TMZ

- Tratamentul combinat AG556+TMZ

În cadrul studiului au fost evaluate efectele interacțiunii dintre combinațiile terapeutice dintre A556 și TMZ, utilizând modelul multiplicativ, astfel:

- efect aditiv se produce când $I_{1,2} = I_1 + I_2$;
- efect sinergic se produce când $I_{1,2} > I_1 + I_2$;
- efect antagonist se produce când $I_{1,2} < I_1 + I_2$;

În urma evaluării interacțiunii dintre cele două molecule am constatat că în linia celulară GB1B, nici una dintre combinații nu a produs un efect terapeutic sinergic, în comparație cu abordarea terapeutică unică. Astfel, rezultatele noastre arată că în linia de celule GB1B, 17(20.24%) din tratamentele combinate au produs un efect aditiv, în timp ce 67 (79.76%) dintre acestea au avut un rezultat subaditiv.

CONCLUZII

1. Vârsta pacienților este un factor important în incidența tumorilor cerebrale, numărul cel mai mare de cazuri înregistrându-se la grupa de vârstă 55-65 ani, succedată de grupa de vârstă 45-55 de ani.
2. În studiul pe care l-am realizat am remarcat o tendință de apariție a tumorilor cerebrale la vârste mai mici decât cele raportate în literatură.
3. Gliosarcomul, meningiosarcomul și meduloblastomul au fost mai frecvente la bărbați.
4. Schwanomul și meningiomul au fost mai frecvente la femei.
5. Astrocitomul, hemangioblastomul, hemangiopericitomul și neurocitomul au fost egal distribuite pe sexe.
6. În comparație cu tratamentul cu bevacizumab + irinotecan, tratamentul cu celule dendritice nu a arătat un beneficiu semnificativ în supraviețuirea pacienților cu gliom malign recurent.
7. Analiza viabilității celulare obținută în urma inactivării receptorilor membranari PDGFR, VEGFR și EGFR, utilizând compușii cu moleculă mică AG1433, SU1498 și AG556, arată o citotoxicitate moderată în celulele de GB.
8. Blocarea expresiei ELTD1 în celulele de glioblastom prin utilizarea siRNA s-a dovedit a fi mai eficientă decât inhibarea funcției PDGFR, VEGFR sau EGFR prin utilizarea compușilor cu moleculă mică.
9. În urma tratamentului combinat dintre AG556 și TMZ aproximativ 20% din combinații au produs un efect aditiv, în timp ce 80% dintre acestea au rezultat într-un efect subaditiv.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Aguilera DG, Mazewski C, Hayes L, et al. Prolonged survival after treatment of diffuse intrinsic pontine glioma with radiation, temozolamide, and bevacizumab: report of 2 cases. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013; 35: e42–e46.

Artene ȘA, Turcu-Știolică A, Hartley R, et al. Dendritic cell immunotherapy vs bevacizumab plus irinotecan in recurrent malignant glioma patients: a survival gain analysis. *OncoTargets and Therapy* 2016; 9: 6669–6677.

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, et al. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87: 3336–3343.

Batchelor TT, Duda DG, Di Tomaso E, et al. Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2817–2823.

Brandes AA, Stupp R, Hau P, et al. EORTC study 26041-22041: phase I/II study on concomitant and adjuvant temozolomide (TMZ) and radiotherapy (RT) with PTK787/ZK222584 (PTK/ZK) in newly diagnosed glioblastoma. *Eur J Cancer* 2010; 46: 348–354.

Calzolari F, Appolloni I, Tutucci E, et al. Tumor progression and oncogene addiction in a PDGF-B-induced model of gliomagenesis. *Neoplasia* 2008; 10: 1373–1382.

Carapancea M, Alexandru O, Fetea AS, et al. Growth factor receptors signaling in glioblastoma cells: therapeutic implications. *J Neuro-oncology* 2009; 92: 137-147.

Davis-Smyth T, Chen H, Park J, et al. The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *EMBO J* 1996; 15: 4919–4927.

Dong Y, Jia L, Wang X, et al. Selective inhibition of PDGFR by imatinib elicits the sustained activation of ERK and downstream receptor signaling in malignant glioma cells. *Int J Oncol* 2011; 38: 555–569.

Fournier E, Birnbaum D, Borg JP. Receptors for factors of the VEGF family. *Bull Cancer* 1997;84: 397–403.

Kim Y, Kim E, Wu Q, et al. Platelet-derived growth factor receptors differentially inform intertumoral and intratumoral heterogeneity. *Genes Dev* 2012; 26:1247–1262.

Lamoreaux WJ, Fitzgerald MEC, Reiner A, et al. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase a and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res* 1998; 55: 29–42.

Martinho O, Longatto-Filho A, Lambros MB, et al. Expression, mutation and copy number analysis of platelet-derived growth factor receptor A (PDGFRA) and its ligand PDGFA in gliomas. *Br J Cancer* 2009; 101: 973–982.

Nazarenko I, Hede SM, He X, et al. PDGF and PDGF receptors in glioma. *Ups J Med Sci* 2012; 117: 99–112.

Prados MD, Chang SM, Butowski N, et al. Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 579-584.

Scott AM, Lee FT, Tebbutt N, et al. A phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 4071–76.

Seetharam L, Gotoh N, Maru Y, et al. A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF). *Oncogene* 1995; 10: 135–147.

Takahashi T, Shirasawa T, Miyake K, et al. Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: FLT-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209: 218–226.

Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd, et al. Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1253-1259.

Waltenberger J, Claessonwelsch L, Siegbahn A, et al. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem* 1994; 269: 26988–26995.

Yang W, Barth RF, Wu G, et al. Development of a syngeneic rat brain tumor model expressing EGFRvIII and its use for molecular targeting studies with monoclonal antibody L8A4. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 341–50.

Zhang Y, Guessous F, Kofman A, et al. XL-184, a MET, VEGFR-2 and RET kinase inhibitor for the treatment of thyroid cancer, glioblastoma multiforme and NSCLC. *IDrugs* 2010; 13: 112–121.