

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
CAROL DAVILA
FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ
DISCIPLINA NEUROCHIRURGIE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**CORELAȚII CLINICO - IMAGISTICE ȘI DE BIOLOGIE CELULARĂ
ÎN GLIOBLASTOMUL MULTICENTRIC ȘI RECIDIVELE DE
GLIOBLASTOM**

REZUMAT

Conducător științific: Academician Prof. Dr. Leon Dănăilă

Doctorand: Cristian Năstase

**BUCUREȘTI
2008**

INTRODUCERE

În ciuda preocupărilor constante, de aproape jumătate de secol, privitoare la tratamentul tumorilor cerebrale maligne, există chiar și astăzi, numeroase semne de întrebare privind biologia tumorală și atitudinea terapeutică complexă multimodală, cu scopul tratării, prelungirii supraviețuirii și creșterii calității vieții pacienților suferinzi de tumori cerebrale. Seria gliomelor operate și tratate în **Clinica II Neurochirurgie din I.B.C.V. în prezent Institutul Național de Neurologie și Boli Neurovasculare București**, în intervalul 1990 – 2006, cuprinde 1231 pacienți iar analiza statistică s-a efectuat prin consultarea foilor de observație clinică a acestora, coroborate cu protocolul operator, precum și cu registrele de diagnostic histopatologic, din cadrul serviciului de anatomie-patologică, care confirmau diagnosticul de certitudine. Efortul de optimizare a atitudinii terapeutice, în diversele localizări ale gliomelor unice sau multiloculare, cât și a celor recidivate va continua, precum și strădaniile de a descoperi, noi alternative terapeutice, mai puțin agresive pentru creier în ansamblul său și cât mai eficiente și mai puțin nocive pentru pacient.

Mulțumesc colectivului de cercetare din cadrul Institutului de Patologie și Genetică Medicală “Victor Babeș” București, care m-a sprijinit constant în studierea markerilor de agresivitate tumorală, factorilor de angiogeneză cât și pentru ajutorul acordat în domeniul complex al biologiei moleculare și cercetării fundamentale. Lucrarea de față se constituie ca o încercare timidă, din partea unui clinician, de a aborda și aspecte de cercetare, în acest vast domeniu al biologiei celulare și moleculare, în cadrul vastului domeniu al patologiei tumorale intracraniene, concentrate asupra gliomelor cerebrale maligne cu origine astrocitară. Aceste încercări de a studia implicarea familiei de proteine constitutive a caveolelor și în special, a caveolinei-1 în oncogeneza diferitelor tipuri de tumori umane și care a devenit recent o preocupare majoră în domeniul neurooncologiei și biologiei moleculare, s-au constituit, în final în câteva rezultate pe care autorii le prezintă ca o primă etapă, având ca finalitate principală elaborarea unui protocol de tratament adjuvant în cazul gliomelor cerebrale maligne. Au fost evaluați comparativ imunohistochimic și seric, markeri-cheie inductori ai angiogenezei (bFGF, VEGF) în raport cu potențialul agresiv și cu tratamentul aplicat. A fost analizată expresia caveolinei-1 în comparație cu markerii-cheie ai angiogenezei VEGF și bFGF. Imunoreacția a fost observată atât la nivelul celulelor endoteliale, cât și la nivelul celulelor tumorale, în procent mai crescut la cele cu grad mare de agresivitate.

Acest studiu nu se dorește a fi decât un moment în acest efort neîntrerupt, ce are ca scop îmbunătățirea calității vieții acestei categorii de pacienți.

Mulțumirile mele se îndreaptă, în primul rând, către domnul **Academician Prof. Dr. Leon Dănăilă**, care mi-a sugerat acest studiu și alături de care am perceput complexitatea acestei patologii și mă simt onorat că am avut șansa de a mă instrui și a beneficia de cunoștințele și vasta sa experiență. De asemenea, îi mulțumesc pentru permisiunea de a utiliza datele de statistică și iconografia utilizată în lucrarea de doctorat și pentru sfaturile deosebit de prețioase, pe care mi le-a oferit, pe parcursul alcătuirii lucrării și pentru atenta supraveghere a tuturor etapelor acestui studiu.

Această lucrare reprezintă un punct de plecare, ca o premiză de dezvoltare a unor proiecte științifice în derulare, cu rezultate parțiale încurajatoare, care permit elaborarea unor ipoteze teoretice pentru activitatea practică ulterioară a colectivelor de cercetare implicate, pentru stabilirea unor strategii terapeutice noi, în domeniul neuro-oncologiei.

Capitolul I

Astrocitoamele sunt un grup tumoral heterogen având localizări și grade tumorale diverse, formate prin proliferarea tumorală a celulelor astrocitare. Sunt tumori infiltrative formate prin transformarea tumorală a astrocitelor fibrilare.

Grupul cuprinde un număr de entități ce nu sunt perfect delimitate între ele, existând atât o tendință de transformare dintr-una în alta, pe măsura acumulării de noi mutații genetice ce le conferă avantaje selective de creștere, proliferare și invazivitate:

- astrocitomul fibrilar-grad II (OMS),
- astrocitomul protoplasmatic-grad II (OMS),
- astrocitomul gemistocitic-grad II (OMS),
- astrocitomul anaplastic-grad III (OMS),
- glioblastomul-grad IV (OMS).

Glioblastomul multiform (GBL) poate fi considerat prin malignitatea sa înaltă „capul de serie” al astrocitoamelor difuze de tip fibrilar și reprezintă o provocare neuro-oncologică. Tratamentul acestui tip de tumoră este complex, multimodal aplicat pentru stoparea evoluției acestei tumori, prelungirea supraviețuirii și asigurarea unei calități a vieții acceptabile. Evoluția GBL este gravă cu durată medie de supraviețuire sub 1 an.

Considerații generale

Glioblastomul este o tumora cu origine neuroectodermală și reprezintă cea mai malignă tumora astrocitară cerebrală, fiind compusă, în cea mai mare parte, din astrocite neoplazice slab differentiate. Trăsăturile histopatologice includ polimorfism celular, atipii nucleare, activitate mitotică înaltă, proliferare microvasculară cu tromboze vasculare și necroze. În general, glioblastomul afectează adulții, cu predilecție între 45 și 70 ani și, de obicei, se localizează în emisferele cerebrale (10). Glioblastoamele se pot dezvolta din astrocitoame difuze de gradul II, astrocitoame anaplazice (glioblastom secundar), dar în mod frecvent ele se manifestă după o evoluție clinică scurtă, „de novo”, fără prezenta unei leziuni anterioare maligne (glioblastom primar). Astrocitomul anaplastic reprezintă, un astrocitom infiltrativ difuz cu anaplazie dispersată sau focală și cu un potențial proliferativ pronunțat. Astrocitoamele anaplastice se formează din astrocitoamele de grad inferior, dar pot fi, de asemenea, diagnosticate per primam, fără precizarea unei leziuni anterioare mai puțin maligne. Ele au o tendință intrinsecă pentru formarea malignă a glioblastoamelor. Astrocitoamele anaplastice mai pot fi denumite: „astrocitom malign” și „astrocitom de grad înalt”, dar acești termeni sunt într-un fel ambigui deoarece sunt, de asemenea, folosiți ocazional pentru glioblastoame (14).

Gradare.

În prezent există mai multe sisteme de gradare a gliomelor dar numai două sisteme au largă utilizare actuală: St. Anne-Mayo și WHO (World Health Organisation). Ambele se bazează pe existența (sau absența) a patru criterii: atipii nucleare, mitoze, proliferare microvasculară (proliferare endotelială vasculară) și necroza tumorală. Ambele sisteme definesc o scală având patru grade tumorale, diferențele aparând în funcție de prezenta sau absența celor patru caracteristici amintite în structura tumorii. Sistemul de gradare St. Anne - Mayo, ultimul apărut consideră drept tumori de gradul unu, tumorile care nu au nici unul din criteriile sus-mentionate; tumorile de grad doi, sunt cele care îndeplinesc un criteriu, cele de grad trei sunt cele care au două criterii, iar cele de grad patru sunt acele tumori care recunosc trei criterii, oricare ar fi acelea. Avantajul acestui sistem este ușurința în folosire, însoțită de o bună reproductibilitate prognostică.

WHO pornește de la premiza că cele patru variabile nu apar întâmplător ci secvențial, ordonat, pe măsura ce se acumulează intracelular tot mai multe modificări genice. Gliomurile care nu au nici un criteriu îndeplinit sunt considerate ca fiind de gradul întâi. Tumorile care au numai atipii nucleare sunt incluse printre gliomurile de gradul doi. Gliomurile care adaugă pe lângă atipii nucleare și mitoze atipice sunt considerate de gradul trei, sau anaplastice. Tumorile gliale care cumulează pe lângă atipii nucleare și mitoze unul dintre celelalte două criterii, indiferent care este acesta : proliferarea microvasculară sau necroza, sunt tumori având gradul patru. Astrocitomul anaplastic corespunde gradului III OMS. Glioblastomul multiform și variantele sale (GBL cu celule gigante și gliosarcomul) corespund gradului IV de malignitate.

Incidență. Glioblastomul este cea mai frecventă tumora cerebrală, reprezentând 50-60% din tumorile astrocitare și aproximativ 12-20% din toate neoplasmele intracraniene, existând totuși diferențe între autori. Astfel Russel și Rubinstein consideră că frecvența este între 15-20%, în timp ce Kleihues și Cavanee (14, 15), raportează numai 12-14%. Vârsta medie de apariție este 55 de ani, iar bărbații sunt mai frecvent afectați (sex ratio 1,5/1). În Europa, SUA și Canada, incidența raportată de Lantos, Vandenberg și Kleihues (15) este de 2-3 cazuri noi la o sută de mii de oameni pe an.

Localizare. Glioblastoamele se dezvoltă, de cele mai multe ori, din substanța albă subcorticală a emisferelor cerebrale (3). În statistica noastră, localizarile cele mai frecvente au fost: lob temporal 29%, lob parietal 25%, lob frontal 24% și lobul occipital 16%. Localizarile combinate fronto-temporale sau temporo-parietale sunt destul de frecvente (10) Tumora infiltrază structurile cerebrale adiacente: cortexul adiacent, ganglionii bazali, emisferul contralateral, pedunculii cerebrali, etc. Glioblastoamele intraventriculare sunt foarte rare, precum și cele cerebeloase și intraspinală (13). Localizarea astrocitoamelor anaplastice corespunde, în mare măsură, astrocitoamelor infiltrative difuze, în special în emisferele cerebrale. Deci, aceste tumori astrocitare

pot apărea în orice compartiment al SNC, emisfere cerebrale, fosa posterioară, tunchi cerebral, intramedular.

Etiologie. Este în bună măsură necunoscută, cel puțin până în prezent. Singurul factor etiologic ce a putut fi demonstrat prin studii extensive epidemiologice este radioterapia. Indiferent dacă aceasta s-a efectuat în scopul tratării adenoamelor hipofizare, craniofaringioamelor, germinoamelor, etc riscul de producere al unui gliom infiltrativ este de 16 – 20 de ori mai mare. Studiul efectuat de Hammond în 1991 pe 9720 de copii iradiati pentru leucemie limfoblastica acuta a dovedit cresterea de 22 de ori a riscului de a dezvolta tumori difuze astrocitare. Dupa iradierea cu o doza standard acesti copii dezvolta tumori cerebrale astrocitare la aproximativ 7 ani. De obicei, dupa radioterapie se dezvolta astrocitoame infiltrative de grad inferior, astrocitoame anaplazice, sau glioblastoame si numai rareori luand nastere gliosarcoame.

Factori predictivi. Aglomerarea familială a gliomelor difuze este cunoscută de mult timp. De obicei aceasta se datorește unor sindroame tumorale transmise genetic: sindromul Li-Fraumeni, sindromul Turcot, neurofibromatoza de tip 1, etc. Pacientii cu sindromul Li-Fraumeni sunt purtătorii unei mutații autozomal dominante, transmisă pe linie germinala, ce afectează gena supresoare tumorală P53, numită și “poliștistul genomului”. Acestia prezintă, atât în copilărie cât și în prima tinerețe, multiple tumori primare ale tesuturilor moi : osteosarcoame, cancere ale sanului, tumori cerebrale, leucemii, dar și carcinoame ale suprarenalei, etc.

Pacientii având sindromul Turcot sunt purtătorii unei afecțiuni autozomal dominante și posibil al unei afecțiuni autozomal recesive, ce se caracterizează prin asocierea a multiple neoplasme colorectale cu tumori neuroepiteliale: glioblastoame și meduloblastoame.

Bolnavii afectați de neurofibromatoza de tip 1 (boala von Recklinghausen), sunt purtătorii unei afecțiuni autozomal dominante ce modifică gena NF 1, situată pe cromozomul 17q12. Boala se caracterizează prin apariția a multiple neurofibroame, MPNST (malignant peripheral nerve sheath tumor), gliome de nerv optic, astrocitoame pilocitice, dar și alte gliome infiltrative, însoțite de pete café-au-lait, multiple formațiuni nevice axilare, tumori înghinale, hamartoame iridiene (noduli Lesch) și de diverse leziuni osoase. Progresia astrocitomului anaplastic în glioblastom este un factor grav de pronostic. Intervalul de timp variază considerabil, cu o medie de 2 ani și o perioadă de boală de 3 ani. Prezența unei componente oligodendrogliale este asociată cu o prelungire semnificativă a supraviețuirii (mai mult de 7 ani). Factorii, care prevăd rezultate clinice, au fost deseori analizați, făcându-se legătură cu aceia pentru pacienții cu glioblastom, și au demonstrat supraviețuire prelungită la pacienții mai tineri, scor Karnofsky preoperator ridicat, și rezecție cât mai extinsă a tumorii.

Vârsta și distribuția pe sexe. Glioblastomul poate apărea la orice vârstă, dar afectează în special adulții cu vârsta cuprinsă între 45 și 70 ani, media fiind 55 ani (8). Barbații par a fi mai frecvent afectați decât femeile (1,5/1). În unele statistici, vârsta medie de apariție a astrocitomului anaplastic este aproximativ 41 ani, adică o vârstă mai înaintată decât aceea a pacienților cu astrocitoame difuze de grad inferior (adică 34 ani), dar, în mod semnificativ, mai mică decât aceea a pacienților cu glioblastoame (adică 53 ani). Bărbații sunt mai frecvent afectați (raportul B:F este 1,8:1).

Trăsături clinice. Istoricul clinic al bolii este de obicei scurt (mai puțin de 3 luni în mai mult de 50% din cazuri), dacă neoplasmul nu s-a dezvoltat din astrocitoame difuze de gradul II sau astrocitoame anaplazice (glioblastom secundar). Deseori, după o manifestare epileptică cu simptome neurologice nespecifice, pacienții prezintă dureri de cap și tulburări de personalitate, iar semnele specifice ale hipertensiunii intracraniene devin rapid evidente (1). Simptomatologia clinică a glioblastoamelor multiforme este similară cu a astrocitoamelor difuze anaplazice cu diferența că primele se însoțesc de deficit neurologic focal cu debut brusc și rapid evolutiv. Astrocitoamele difuze de grad II și astrocitomul anaplastic infiltră tesutul cerebral intact fără a-l distruge, comparativ cu GBL care pe lângă efectul de masă produce și distrucția tisulară cerebrală, efectul clinic fiind deficitul neurologic focal. Hemoragia cerebrală acută poate sublinia debutul clinic al unui GBL dar aceasta se întâmplă în cazuri rare (3). Simptomatologia astrocitoamelor anaplazice sunt asemănătoare cu cele ale pacienților cu astrocitom difuz de grad II OMS. Caracteristice sunt

semnele si simptomele glioblastoamelor recurente (deficit neurologic crescut, crize epileptice, presiune intracraniană crescuta), urmând rezecția inițială a unui astrocitom difuz de grad mic. Nu rareori, pacienții prezintă astrocitom anaplastic după o anamneză de câteva luni, fără evidența unui astrocitom difuz precedent, de gradul II OMS.

Neuroimagingistica. Pe examinarea CT craniocerebrala, glioblastomul prezinta o forma neregulata, cu o zona periferica circulara (ring like) care capteaza intens substanta de contrast si o zonă centrală (hipodensă), ce reprezintă necroza (13). Imaginea unui proces tumoral infiltrativ, circinat sau complet neregulat, care prezinta in periferie un inel iodofil de contrast ce inconjură o zonă centrală hipodensă necrotică. GBL prezintă in jur o zonă întinsă de edem , cu aspect de hipodensitate.

Astrocitomul anaplastic se prezintă ca o masă neclar definită cu densitate scazută. Spre deosebire de astrocitoamele difuze de gradul II OMS, intensificarea contrastului parțial este de obicei observat, dar mărirea inelului tipic, al glioblastoamelor este absent. Creșterea cea mai rapidă a tumorii, cu dezvoltarea edemului perifocal poate conduce la extinderea masei și la presiunea intracraniană crescută. Imaginile obținute prin RM reflectă o marcată heterogenitate intratumorală, data de hemoragie (de varste diferite), necroze si hiper celularitate in grade variabile. În secventa T1, imaginile RMN evidentiaza o structura inelara periferica hipercaptanta de contrast, ce corespunde ariei tumorale cu celularitate crescuta si hipervascularizatie (fig.2, 3). Aceasta structura nu reprezinta marginea externa a tumorii, celule tumorale infiltrative putand fi usor identificate chiar si la 3 cm de marginea tumorală. In secventa T2 se observa focare de necroza chistica hiperintensa si arii hiper celulare care au intensitate mai redusa, inconjurate de un edem vasogenic cu semnal crescut (5).

Imaginile obtinute prin PET scan evidențiază consumul regional de glucoză, strans corelat cu gradul de hiper celularitate. Trebuie facută diferenta dintre recidiva tumorii și radionecroză, pe baza PET, care arată creșterea metabolismului glucozei în țesuturile recidivate față de hipometabolismul din radionecroză (7).

Uneori, GBL-ul este o leziune multicentrică, putand exista două tumori sincrone (simultan), detectate in focare independente in momentul primei evaluari sau metacrone, adica pot aparea la momente diferite in timp si pretand la confuzii cu metastazele. O parte din aceste focare tumorale au aspecte histologice diferite, ceea ce ar pleda pentru originea lor policlonala (11). Propensiunea siabilitatea de diseminare pun sub semnul intrebării asa-zisele glioblastoamele multifocale sau multicentrice (fig. 1). Probabil ca multe din leziunile secundare sau terțiare reprezinta de fapt zone favorabile de extensie si crestere a tumorii primare, ele intercomunicând într-un mod subtil prin intermediul celulelor numite „guerilla cells”.

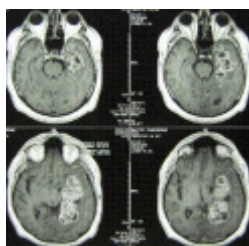


Fig.1. Aspect de GBL multicentric (extensie prin tracturile de substanta albă)

Imunoreactivitatea la GFAP este neomogena si inconstanta. Ea dovedeste doar originea gliala a celulelor tumorale, dar nu si pe cea astrocitara. Celulele tumorale fixeaza mai omogen si mai intens S100. Uneori glioblastomul prezinta si markeri epiteliali cum ar fi citokeratina.

Indicii de marcarea ai proliferării celulare cu K67/MIB-1 evidentiază o fractie de creștere tumorală situată între 15-20%. GBL se pot localiza în profunzimea emisferului cerebral și pot infiltra și corpul calos extinzându-se și în emisfera controlaterală, (GBL „în fluture”, fig. 2).

Celule maligne pot fi identificate și la distanța de cativa centimetri față de tumora propriu-zisă, si pot infiltra tracturile de substanta albă: corpul calos, fornixul, comisura alba anterioara si posterioara, radiatiile optice sau spatiul subependimar.

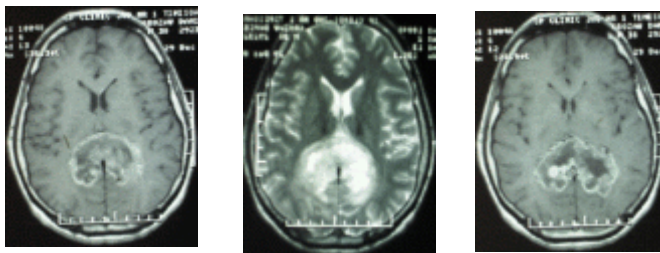


Fig. 2. Aspect IRM (secv. T1 - a, b și T2 - c), de GBL „în fluture”, extensia tumorii prin spleniusul corpului calos

Capitolul II

Anatomie patologică. Macroscopic, GBL este o tumoră imprecis delimitată, suprafața de secțiune arătând zone de culoare gălbuie (necroza), ce poate ocupa 80-90% din masa tumorii, înconjurată de zone periferice gri-murdar, unde masa tumorală are o consistență moale și zone brun-roșiatică care reprezintă hemoragii de vârste diferite, zone de hemoragie recentă, de culoare roșiatică și zone de culoare negricioase, ce semnifică hemoragii mai vechi (10). Zona periferică activă este de culoare gri-lucios, ce contrastează cu porțiunea centrală necrotică care apare mai gălbuie, fin granulată. Zona necrotică poate ocupa aproape 90% din masa tumorală. Uneori, hemoragiile mari pot produce confuzii cu accidentele vasculare hemoragice (fig. 3).

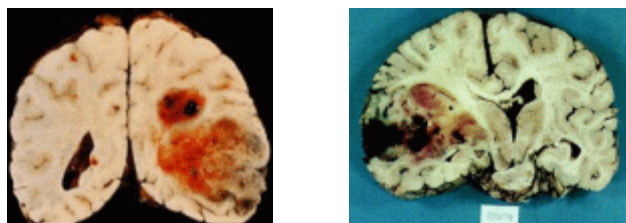


Fig. 3. Aspecte macroscopice de GBL

Zona centrală pseudochistică vizibilă macroscopic conține un țesut tumoral necrotic lichefiat de culoare brun-roșiatică datorată hemoragiei recente și produsilor de degradare ai hemoglobinei și are pereți de obicei neregulați, spre deosebire de astrocitoamele de grad inferior care posedă un chist bine delimitat (14). Această zonă de necroză centrală este înconjurată de o zonă hipercelulară asemănătoare unui inel. Cele mai multe glioblastoame apar în emisferele cerebrale, intraparenchimatose, cu epicentru în substanța albă, dar pot ajunge în contact cu leptomeningele și dura mater (4). Lobul cel mai frecvent afectat este cel frontal, urmat de cel temporal și parietal. Afectarea lobului occipital este rar.

Diagnostic diferențial. Intra cu adevărat în discuție numai două entități: metastaza carcinomatoasă și limfomul cerebral. Diferențierea unei metastaze carcinomatoase este adesea facilă dacă aspectul acesteia este tipic. Aceasta este o tumoră care nu infiltrază, având creștere centrifugă, este bine delimitată, este lipsită de trama fibrilară glială și de aspectul și de aspectul evident glial eozinofil al citoplasmei. Celulele metastatice au aspect carcinomatos, coeziv, nu difuz răspândite ca cele gliale și sunt de obicei mai mari și mai monomorfe. Localizarea metastazelor este de obicei spre periferia țesutului nervos în vecinătatea piei-mater, în timp ce majoritatea GBL sunt profunde infiltrând spre nucleii bazali. De multe ori, macroscopic un GBL se poate confunda cu o metastază, mai ales dacă GBL-ul are și o consistență mai dură datorată bogăției fibrelor de collagen și dacă acesta este situat mai superficial sau în contact cu leptomeningele. Limfomul primar cerebral apare la vârstnici, situarea sa este profundă ca și a GBL. Acesta poate prezenta contrast inelar după administrarea substanței de contrast. Pastrează însă patternul specific perivascular al limfocitelor mari, nu prezintă proliferări microvasculare, iar necrozele sunt unicelulare.

Aspectele microscopice sunt variabile; se prezintă ca o tumoră evident astroglială, datorită tramei fibrilare eozinofile, populată de o mare diversitate de celule astrocitare anaplastice având mari diferențe de volum, de tinctorialitate, un aspect pleomorf, cu numeroase atipii celulare și nucleare, precum și celule multinucleate, gigante, aneuploide cu aspect monstruos (acestea din urmă fiind considerate „marca” de GBL). Dacă aceste celule gigante multinucleate domina aspectul histopatologic, denumirea „glioblastom cu celule gigante” este justificată (9). Datorită anaplasiei crescute, uneori este greu de identificat originea astrocitara a tumorii (fig. 4, 6, 7). Pe lângă prezența celulelor gliale anaplastice, diagnosticul de GBL se precizează și pe baza activității mitotice, a proliferării vasculare și a necrozei (fig. 5). Proliferarea microvasculară este mai exprimată în jurul focarelor necrotice și la periferia zonei infiltrative (10) (fig. 8, 9, 10, 11).

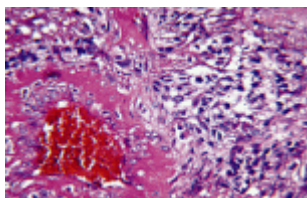


Fig. 4. Aspecte de anaplazie celulară

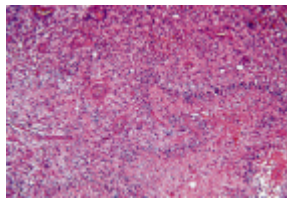


Fig. 5. Aspect de GBL secundar

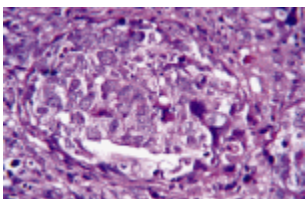


Fig. 6. Atipii celulare și nucleare (GBL monstrocellular, colorație H-E)

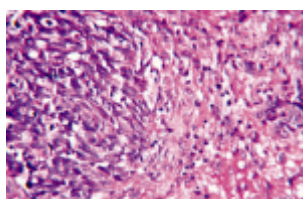


Fig.7. GBL secundar care se pierde într-o plajă celulară de astrocitom anaplastic

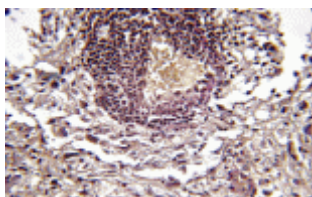


Fig.8. Celule tumorale dispuse perivascular (vanGieson)

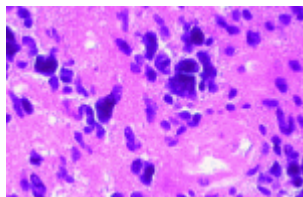


Fig.9. Aspect de GBL gigantocelular

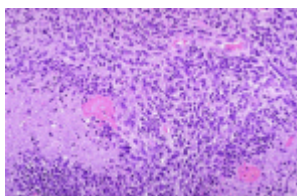


Fig. 10. GBL primar (H-E)

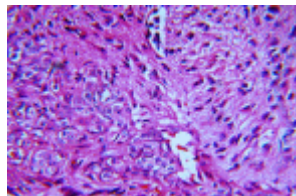


Fig. 11. GBL primar- grad ridicat de anaplazie (col. hematoxilină – eozină)

Uneori pot fi recunoscute printre celulele anaplastice și astrocite de tip fibrilar și gemistocite, recunoscând tranziția de la grade inferioare la gradul IV. GBL-ul secundar prezintă centrul tumoral cu aspect de glioblastom, ce se pierde treptat într-un astrocitom de grad III și ulterior într-o periferie de tip astrocitom fibrilar de grad II (13).

În ciuda evoluției clinice de scurtă durată, aceste tumori sunt de cele mai multe ori surprinzător de mari și pot afecta mai mult decât un lob cerebral; unele pot infiltra pedunculul cerebral spre trunchiul cerebral sau corpul calos spre emisfera contralaterală ("butterfly glioblastoma").

GBL secundar rezulta din progresia astrocitoamelor difuze de grad II, trecând printr-o fază intermediară, astrocitomul anaplastic grad III. Tranziția între zonele care au încă diferențiere astrocitară recunoscută și celule anaplastice poate fi gradată sau bruscă. O schimbare bruscă în histologia tumorii poate reprezenta apariția unui nou fenotip tumoral prin dobândirea uneia sau a mai multor modificări genetice adiționale. Polimorfismul celular include grupuri de celule gigante, nediferențiate, lipidice și grupuri de celule mici, granulare. În plus, există și zone de celule fuziforme, bipolare, care formează ghemuri. Acumularea celulelor tumorale, polimorfice, cu membrană plasmatică bine conturată și lipsa proceselor celulare poate simula o metastază de carcinom sau de melanom. Celulele tumorale multinucleate sunt deseori considerate marca GBL, dar nu reprezintă o trăsătură obligatorie a acestuia și nu are o corelație cu evoluția clinică. În ciuda aspectului lor malign, aceste celule sunt considerate ca un tip de regresie tumorală. Dacă celulele gigante multinucleate domină aspectul histopatologic, denumirea „GBL cu celule gigante” este justificată. Celulele gigante multinucleate sunt frecvent considerate marca de GBL. Acestea apar pleomorfe și au dimensiuni crescute și sunt considerate tipice aspectului de GBL, dar în ciuda aspectului lor monstruos nu se asociază cu o malignitate crescută. Din contra aceste celule asociază un aspect regresiv al comportamentului tumoral. Dacă celulele gigante multinucleate domină aspectul histologic, denumire de „GBL cu celule gigante” este justificată.

Capitol III

Diagnostic. Istoricul clinic al bolii este de obicei scurt (mai puțin de 3 luni în mai mult de 50% din cazuri), dacă neoplasmul nu s-a dezvoltat din astrocitoame difuze de gradul II sau astrocitoame anaplastice (glioblastom secundar). Deseori, după o manifestare epileptică cu simptome neurologice nespecifice, pacienții prezintă dureri de cap și tulburări de personalitate, iar semnele specifice ale hipertensiunii intracraniene devin rapid evidente (1). Simptomatologia clinică a glioblastoamelor multiforme este similară cu a astrocitoamelor difuze anaplastice cu diferența că primele se însoțesc de deficit neurologic focal cu debut brusc și rapid evolutiv. Astrocitoamele difuze de grad II și astrocitomul anaplastic infiltrază țesutul cerebral intact fără a-l distruge, comparativ cu GBL care pe lângă efectul de masă produce și distrucția țesutului cerebral, efectul clinic fiind deficitul neurologic focal. Hemoragia cerebrală acută poate sublinia debutul clinic al unui GBL dar aceasta se întâmplă în cazuri rare (3). Simptomatologia astrocitoamelor anaplastice sunt asemănătoare cu cele ale pacienților cu astrocitom difuz de grad II OMS. Caracteristice sunt semnele și simptomele glioblastoamelor recurente (deficit neurologic crescut, crize epileptice, presiune intracraniană crescută), urmând rezecția inițială a unui astrocitom difuz de grad mic. Nu rareori, pacienții prezintă astrocitom anaplastic după o anamneză de câteva luni, fără evidența unui astrocitom difuz precedent, de gradul II OMS.

Neuroimagingistica. Pe examinarea CT craniocerebrală, glioblastomul prezintă o formă neregulată, cu o zonă periferică circulară (ring like) care captează intens substanța de contrast și o zonă centrală (hipodensă), ce reprezintă necroza (13). Imaginea unui proces tumoral infiltrativ, circinat sau complet neregulat, care prezintă în periferie un inel iodofil de contrast ce înconjură o zonă centrală hipodensă necrotică. GBL prezintă în jur o zonă întinsă de edem, cu aspect de hipodensitate (fig. 12.)

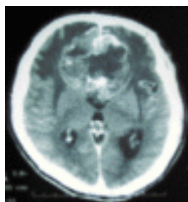
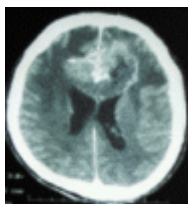


Fig. 12. GBL primar bifrontal (aspect CT cu substanță de contrast)



Astrocitomul anaplastic se prezintă ca o masă neclară definită cu densitate scăzută. Spre deosebire de astrocitoamele difuze de gradul II OMS, intensificarea contrastului parțial este de obicei observată, dar mărirea inelului tipic, al glioblastoamelor este absent. Creșterea cea mai rapidă a tumorii, cu dezvoltarea edemului perifocal poate conduce la extinderea masei și la presiunea intracraniană crescută. Imaginile obținute prin RM reflectă o marcată heterogenitate intratumorală, dată de hemoragie (de vârste diferite), necroze și hiper celularitate în grade variabile. În secvența T1, imaginile RMN evidențiază o structură inelară periferică hipercaptantă de contrast, ce corespunde ariei tumorale cu celularitate crescută și hipervascularizare (fig. 13). Aceasta structură nu reprezintă marginea externă a tumorii, celule tumorale infiltrative putând fi ușor identificate chiar și la 3 cm de marginea tumorală.

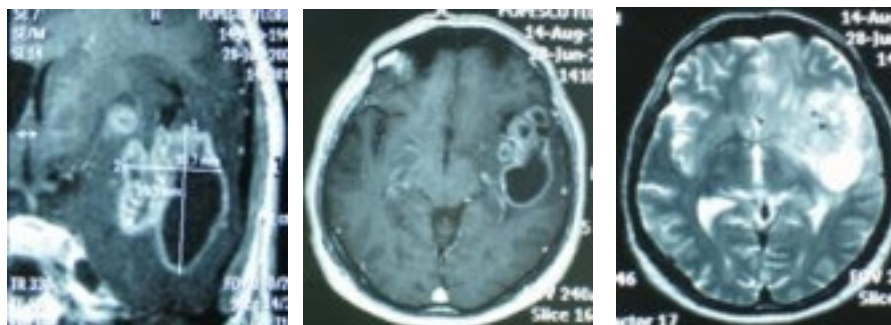


Fig. 13. Aspect IRM (T1 coronal, axial și T2 axial) de GBL (se observă inelul hipercaptant de gadolinium)

În secvența T2 se observă focare de necroză chistică hiperintensă și arii hipercelulare care au intensitate mai redusă, înconjurate de un edem vasogenic cu semnal crescut (5). Imaginile obținute prin PET scan evidențiază consumul regional de glucoză, strâns corelat cu gradul de hipercelularitate. Trebuie făcută diferența dintre recidiva tumorii și radionecroză, pe baza PET, care arată creșterea metabolismului glucozei în țesuturile recidivate față de hipometabolismul din radionecroză (7).

Capitolul IV

Recidiva și recreșterea tumorală. Deși tendința de a infiltra țesutul cerebral adiacent este o trăsătură comună tuturor tumorilor astrocitare difuze, GBL-ul are tendința naturală spre invazie, infiltrare și distrucție a țesutului cerebral adiacent (fig. 14).

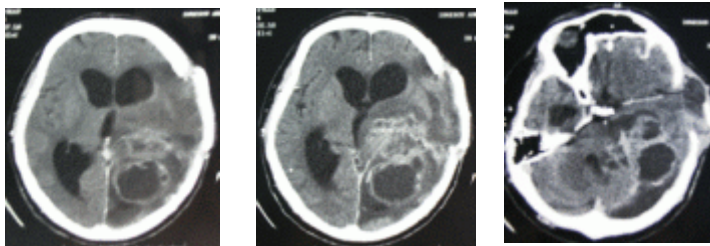


Fig. 14. GBL recidivat (expansiune la nivelul voletului)

O trăsătură caracteristică a GBL este extensia prin corpul calos spre emisferul cerebral contralateral, creând o leziune simetrică ("butterfly glioma"). Posibilitatea de extensie a fost observată și prin capsula internă, fornix, pedunculi cerebrali, comisura albă anterioară sau radiatiile optice etc. Aceste structuri pot apărea largite, dilatate sau distorsionate și pot servi drept cale de diseminare, permitând extensia tumorii la distanță și sugerând de multe ori aspectul de GBL multifocal (11). "Guerilla cells", celule maligne călătoare, pot fi identificate și la distanța de 3-4 cm de tumora propriu-zisă, de obicei în zona edematoasă peritumorală.

Modalitatea de creștere și invazie a unui astrocitom anaplastic (sau de grad II) este de tip infiltrativ, prin insinuarea celulelor tumorale printre celulele netumorale restante, ramase captive în interiorul tumorii. Periferia tumorală este imprecisă, astrocitoamele fibrilare par a se pierde treptat în țesutul normal inconjurator. În lungul tracturilor fibroase ale substanței albe pot fi găsite rare „guerilla cell” tumorale, aflate la mare distanță de tumora propriu-zisă. Ajunse fie subpial, fie perineuronal, fie perivascular, celulele tumorale se pot aglomera formând așa-zisele structuri secundare. Acestea sunt frecvent întâlnite în astrocitoamele anaplastice. GBL, spre deosebire de acestea produce distrucții tisulare masive fie prin necroza, fie prin hemoragii intratumorale. Extensia de-a lungul spațiilor perivasculare este altă cale tipică de diseminare a GBL, dar invazia intraluminală vasculară este extrem de rară – celulele tumorale nu pot strabate elastina din structura peretelui vascular, nesecretând elastază. Diseminarea pe cale hematogenă se produce doar în timpul manevrelor chirurgicale, spre țesuturi extraneurale (13). Metastazarea intraperitoneală via drenaj ventriculo-peritoneal a fost observată și se poate produce (2). În ciuda agresivității și gradului crescut de infiltrare tumorală, tendința GBL de a invade spațiul subarahnoidian este destul de rară, metastazele via LCR la distanță fiind ocazionale (14). Penetrarea durei mater, sinusurilor venoase sau a osului se produce în mod excepțional (10).

Glioblastoamele multifocale (multicentrice)

Întrebarea dacă glioblastoamele multiple (GBLM) și independente unul de celălalt, apar în cadrul aceluiași sindrom neoplazic este controversată. Aceasta se întâmplă deoarece chiar în examinările atente necropsice, pe secțiunile întregului creier, nu se pot întotdeauna demonstra conexiuni (legături), între gliomele multifocale evidente, sau se pot evidenția celule infiltrative de-a lungul căilor mielinizate și care sunt deseori mici, polare și slab diferențiate. În diverse statistici s-a concluzionat că circa 2,5% din GBLM sunt într-adevăr tumori independente.

GBLM pot fi într-adevăr policlonale și pot apărea infra și supratentorial, de exemplu în afara celor care diseminează pe rute accesibile cum ar fi LCR sau comisurile de substanță albă de pe linia mediană. GBLM care apar independent ar fi prin definiție cu origine policlonală și existența lor poate fi dovedită numai prin dozarea markerilor moleculari care permit o diferențiere între tumorile cu origine comună și cele independente.

Genetica moleculară. Formarea unei tumori este un proces complex ce implică acumularea de leziuni genetice, care afectează genele ce în mod normal reglează căile proliferării celulare, ale diferențierii, cât și ale morții celulare cerute de dezvoltarea oricărui organ. De obicei sunt afectate două tipuri de gene, care sunt ținta aleasă pentru dereglarea proceselor amintite. Pe de o parte sunt afectate oncogenele, care suferă fie amplificări, fie mutații activatoare, ce conduc prin proteinele rezultate la accelerarea creșterii celulare. Pe de altă parte sunt afectate genele supresoare tumorale,

al caror produs ar trebui să întrerupă creșterea celulară, care sunt modificate fie prin eliminare fizică, fie prin mutații cu rol de inactivare. Progresia tumorală de la astrocitoamele de grad inferior la cele anaplastice și mai apoi la glioblastom, se face prin acumularea în trepte a mai multor modificări genice. Astrocitoamele infiltrative de grad inferior se caracterizează prin prezența mutației P53 și prin supraexpresia PDGFR. Transformarea malignă a celulelor neuroepiteliale se produce diferit în cazul glioblastoamelor secundare comparativ cu glioblastoamele primare (11).

În glioblastoamele secundare procesul dediferențierii celulare se realizează secvențial, prin achiziția seriată a modificărilor genice. Procesul începe prin afectarea genei ce codifică proteina supresoare tumorală p53 ("polițistul genomului"), însoțită sau nu de pierderea heterozigotității cromozomului 17p (care conține gena menționată). Aceasta este cea mai precoce modificare genetică, detectabilă la majoritatea astrocitoamelor difuz infiltrative de grad II, și se asociază frecvent cu supraexprimarea PDGF (platelet-derived growth factor) și a receptorului sau PDGFR (15). Proteina P53 este codificată de gena TP53 situată pe cromozomul 17p13.1. Este o proteină având 53 kDa, care are multiple funcții în: reglarea ciclului celular, corectarea erorilor produse de afectarea ADN, moartea celulară programată (apoptoză), Diferențierea celulară și neovascularizație. Proteina P53 are mai multe funcții ce răspund fiecare de câte una din funcțiile mai sus amintite, dar cel mai important este domeniul central, care răspunde de legarea ADN-ului. Aceasta legare permite proteinei să acționeze ca reglator pozitiv, dar și negativ al transcripției de gene. Tocmai această regiune este afectată preferențial de mutațiile regionale ale genei P53, ele fiind de tipul „pierderea funcției”, scăzând în felul acesta capacitatea proteinei mutante de a-și exercita atribuțiile.

Tratamentele cu citostatice, sau radioterapia afectează ADN – ul și produc astfel oprirea ciclului celular în faza G1 mediat de P53 sau chiar apoptoză, de fapt realizează aceste procese prin inducția proteinei P21. Celulele cărora le lipsește P53 nu pot avea rol inductor asupra P21, ca răspuns la afectarea ADN-ului. Studiile efectuate până în prezent nu au arătat mutații somatice ale ale lui P21, mai mult chiar exprimarea acestuia a fost crescută în cele mai multe dintre gliome, indiferent de gradul acestora, sugerând că cea afectată este funcția lui P53. Afectarea ciclului menționat conduce la fosforilarea proteinei Rb, permițând celulei să avanseze din faza G1 spre faza S (inițiind astfel diviziunea mitotică). În cele din urmă se produce amplificarea EGFR (epidermal growth factor receptor). Acesta este oncogenul cel mai frecvent amplificat în astrocitoamele anaplastice și în peste 50% din glioblastoamele de toate tipurile (11). Se presupune că astrocitoamele anaplastice sunt derivate din astrocite diferențiate sau celule precursori diferențierii astrocitice. Evoluția lor din astrocitoame difuze de gradul II OMS și progresia/transformarea lor în glioblastom sunt din punct de vedere morfologic bine definite și sunt sprijinite de descoperirile geneticii moleculare. Mai puțin clar este, dacă toate astrocitoamele anaplastice se dezvoltă din astrocitoame difuze de gradul II OMS, de exemplu incluzând acelea care prezintă clinic „de novo” fără leziune anterioară ușor de identificat (fig. 15).

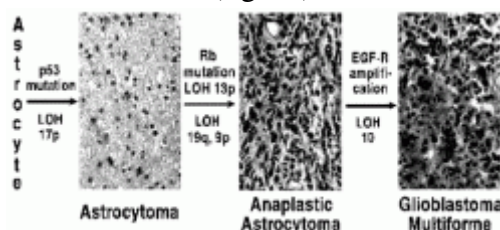


Fig. 15. Procesul de dediferențiere tumorală (schemă după Kleihues & Cavenee)

Modalitatea schimbărilor genetice, în special frecvența înaltă (mai mare decât 70%) a mutațiilor TP53, ar fi compatibilă cu ipoteza că astfel de tumori s-au dezvoltat rapid din astrocitoame difuze de gradul II OMS. Supraexpresia foarte rară a EGFR și a amplificării MDM2, în mod evident, sugerează că astrocitomul anaplastic poate numai în cazuri excepționale să fie considerat o leziune anterioară a glioblastomului primar.

Glioblastoamele primare prezintă modificări genice de mare amploare care se produc brutal, fără secvențialitate. Ele asociază supraexprimarea EGFR cu deleția cromozomului 10.

Receptorul factorului epidermic de crestere (EGFR)

EGFR este un receptor transmembranar a cărui funcție principală este detectarea liganzilor săi extracelulari: EGF și TGF-beta, urmând ca ulterior să conducă spre celula semnalul transductor rezultat. Gena care îl codifică este localizată pe cromozomul 7.

În tumorile astrocitare oncogene cel mai frecvent amplificată este gena EGFR. Ea este amplificată la mai mult 50% dintre GBL, dar și într-un număr suficient de important de astrocitoame anaplazice. De asemenea, a fost demonstrată exprimarea de către gliomele anaplazice a liganzilor EGFR: EGF și TGF-alfa, fapt care sugerează că aceste celule au cicluri autocrine cu rol stimulator al creșterii. Liganzii mai sus amintiți (EGF și TGF-beta) induc dimerizarea domeniului receptor monomeric, fapt care induce activarea domeniului tirozinkinazic urmată de fosforilarea tirozinelor receptorului. Semnalul activator este transmis mai departe pe calea unor proteine spre căile transductoare ce sunt constituite din fosfolipaza C-gama, Ras-MAPK sau STAT. În cele din urmă se produce internalizarea liganzilor, urmată de decuplarea lor lizozomală, fapt ce conduce la atenuarea semnalului mitogen. Amplificarea și supraexprimarea genei EGFR poate fi găsită la mai mult de 30% dintre GBL. Studii de ultima oră arată că aceste modificări sunt patognomonice pentru GBL primare. Dintre acestea mai mult de 60% prezintă supraexprimarea EGFR, simultan cu deleția cromozomului 10. În afara de EGFR, tumorile astrocitare mai exprimă și alți factori de creștere cum ar fi: PDGF, FGF (factorul fibroblastic de creștere), VEGF (factorul endotelial vascular de creștere).

PDGFR. Liganzii PDGF se leagă la receptorul tirozinkinazic de suprafață format și el din două proteine: PDGFR- alfa și PDGFR – beta situate pe cromozomii 4q11 – 12 și respectiv 5q33 – 35. Aderarea ligandului induce dimerizarea subunităților receptoare realizându-se trei variante: PDGFR-alfa-alfa, PDGFR-beta-beta și PDGFR alfa-beta. După legarea ligandului și activarea receptorului, activarea receptorului, activitatea mitogenă a celulei este stimulată pe aceleași cale ca și în cazul EGFR-ului. Deleția brațului scurt al cromozomului 17 în regiunea genei P53 este de multe ori asociată cu supraexprimarea receptorului PDGF-alfa, ceea ce ar putea sugera că mutația P53 ar favoriza supraexpresia receptorului PDGF alfa. În afara acestor mutații genice principale se mai descriu și afectări ale unor gene supresoare tumorale, cum sunt: DCC (deleted in colorectal cancer), deleția alelica a cromozomului 19q și pierderea heterozigozității cromozomului 22q (11).

Modificări cromozomiale la care nu au fost identificate modificările genice

Există un număr de deleții, semnificativ asociate cu progresia gliomelor, despre care s-a presupus că ar fi locul unor gene supresoare tumorale.

Cromozomul 10. Deleția unei copii a cromozomului 10 este un eveniment frecvent întâlnit la GBL, fiind însă rar în cazul astrocitoamelor de grad inferior. Punerea în evidență a genei implicate a fost întârziată datorită faptului că s-ar putea ca exista nu mai puțin de trei regiuni ale cromozomului care sunt implicate: 10q25, 10p și 10q în vecinătatea centromerului. Recent a fost izolată o gena numită MMAC1 sau PTEN, ce codifică o substanță cu activitate fosfatazică și care prezintă mutații la mai mult de 30% dintre GBL (9).

Cromozomul 19q. Delețiile sale alelice apar la mai mult de 40% dintre gliomele astrocitare de grad înalt. Deși se presupune că ar fi implicată o gena supresoare tumorală, identitatea acesteia nu este evidentă. Oricum se pare că cea mai probabilă regiune afectată este 19q13.3.

Cromozomul 22. Pierderea heterozigozității cromozomului 22q apare la 20-30% dintre gliomele de toate gradele ceea ce sugerează prezența în această regiune a unei gene supresoare tumorale implicată în primele trei faze ale tumorigenezei. Tot în aceeași regiune se găsește gena neurofibromatozei de tip II (NF2), dar analiza secvențială a genei NF2 în astrocitoame de toate gradele nu a arătat prezența unei mutații (fig. 16).

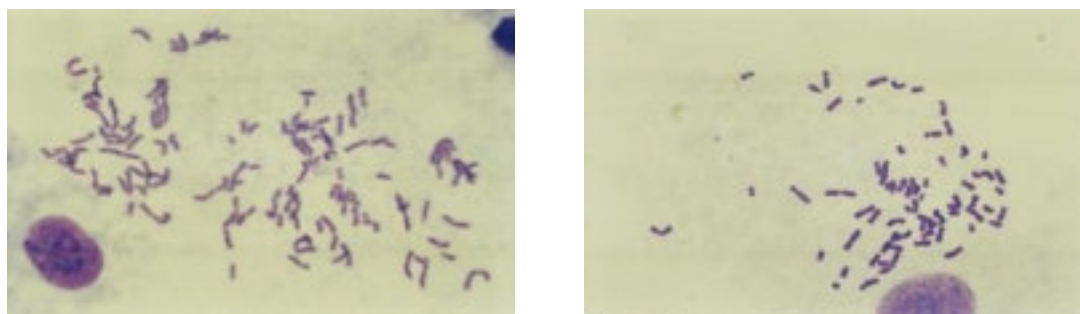


Fig. 16. Genomul unei celule tumorale (modificările cromozomiale 10q, 17p, 19q, 22q, apar cu frecvență crescută în GBL – ul multifom)

Amplificarea EGFR este rareori observată (în mai puțin de 10% din cazuri). Un studiu recent folosind 53 indicatori microsateliți pe 53 cazuri cu astrocitom anaplastic au raportat o frecvență mai mare de 60% a LOH pe cromozomul 10. Disparația cromozomului 6 are loc în aproximativ o treime din cazuri (5). Pierderea funcției normale a proteinei P53 poate induce un fenotip tumoral rezistent la droguri, la fel ca și dereglarea exprimării genice Bcl-2 sau Fas. Gena TP53 prezintă mutații la mai mult de 50% dintre GBL. Pe culturi de celule pierderea proteinei P53 s-a asociat invariabil cu o rezistență crescută la un mare număr de droguri. Reintroducerea acestei proteine prin transfer adenoviral se corelează cu restabilirea activității apoptotice și astfel la revenirea sensibilității normale la chimioterapie (7).

Capitolul V

Principii de tratament

Tratamentul este cel chirurgical, urmat de radioterapie conventională externă sau brahiterapie, chimioterapie. Tratamentul chirurgical trebuie să pună în balanță pe de o parte supraviețuirea mai lungă după rezecții tumorale mai largi, cu afectarea pe de altă parte a calității vieții. Excizia chirurgicală cât mai completă aduce o multitudine de avantaje printre care:

- scade efectul de masă;
- reduce frecvența hemoragiilor în patul tumoral (prin ablatia vaselor de neoformatie);
- facilitează terapiile adjuvante (atât radioterapia cu variantele sale cât și chimioterapia);
- îmbunătățește statusul neurologic al pacienților;
- îmbunătățește controlul medicamentos al crizelor epileptice etc.

Pacienții cu GBL multiform, tratați numai chirurgical, au un timp mediu de supraviețuire de cca. 16 săptămâni (13).

Biopsia stereotactică poate fi luată în considerare în situațiile când:

- tumora este situată într-o zonă elocventă a creierului,
- tumora este de mici dimensiuni, cu localizare profundă,
- când pacientul prezintă deficit neurologic minim,
- pentru a face diferență între un GBL și o altă tumora care poate fi tratată cu succes prin iradiere (ex. limfom), ambele fiind compatibile imagistic, pretând la confuzie (12)

Corticoterapia are eficiență în tratarea gliomelor cerebrale prin reducerea metabolismului cerebral al glucozei și reducerea edemului vasogenic (3).

Radioterapia produce modificări specifice, care trebuie recunoscute, atât pentru a putea urmări eficiența acesteia, cât și în scopul evitării unor confuzii diagnostice. Astfel, după un interval mai scurt pentru brahiterapie, mai lung pentru radioterapia conventională externă, tumora prezintă focare întinse, confluențe de necroză, direct proporționale cu doza administrată (7). Necroza exprimă o perioadă de repaus tumoral, caracterizată prin paucicelularitate, pleomorfism celular și mai ales prin apariția unei populații astrocitare gigantomcelulare care reprezintă o formă de degenerescență tumorală. După câteva luni se produce selecția unei subpopulații celulare cu agresivitate ridicată, aproape lipsită de radiosensibilitate (2). Doza uzuală de raze X folosită este de 50-60 Gy. Radioterapia externă (whole brain) nu a dovedit o eficiență mai mare comparativ cu iradierea focală (7). Radioterapia convențională aditională chirurgiei poate extinde perioada de supraviețuire cu aproximativ 39 de săptămâni. Radiochirurgia prin "gamma-knife" are efect bun în tumorile profunde de volum mic (1).

Efectele chimioterapiei asupra aspectelor celulare și histologice în GBL sunt puțin cunoscute și încă discutabile. Se consideră că agenții alchilanti produc un beneficiu în 10% din cazuri, toți având o eficacitate similară. Carmustina (BCNU), procarbazona, cisplatin, lomustina (CCNU), nimustina (ACNU), au fost primii agenți chemoterapeutici utilizați în gliomul malign. În încercarea de a reduce efectele adverse a chimioterapiei sistemice s-au încercat mai multe metode de a administra cât mai local citostaticul. Administrarea intraarterială de Carmustina a provocat deteriorare vizuală, leucoencefalopatie, toxicitate retiniană etc. S-a încercat administrarea locală peroperatorie, după excizia cât mai completă a tumorii, de carmustina - gel sau carmustina continuată în așa numiți "biscuiți" - wafers (7,7 mg în 200 mg polifeprosan). Unele studii randomizate au evidențiat că agenții alchilanti aplicați local pot crește supraviețuirea cu 9-13 săptămâni (7). Singurele complicații ale implanturilor cu citostatice constau în: edem cerebral, pot favoriza suprainfecția plăgii operatorii, creșterea incidenței crizelor epileptice, etc. Temodalul (temozolomida) este un alt agent alchilant, derivat de nitrozuree, utilizat ca anti-angiogenetic. Eficacitatea lui a fost pusă la îndoială datorită depresiei leucocitare și trombocitare pe care o produce (8).

Terapia fotodinamică este o terapie bimodală ce implică injectarea preoperatorie a unui compus fotosensibilizant ce se localizează selectiv în celulele tumorale, urmată de excizia chirurgicală standard a tumorii, iar cavitatea restantă este iluminată (iradiată) cu raze laser cu o anumită lungime de undă și care sunt absorbite de celulele tumorale fotosensibilizate. Preparatul

folosit este un derivat de hematoporfirină (Photofrin) și se administrează în doză de 5 mg/kgc cu 24 ore preoperator. Durata medie pentru fotoiradiere este de 30-60 minute modificând permanent direcția razei laser pe toată suprafața cavității de rezecție și irigând permanent cu ser pentru a preveni supraîncalzirea excesivă (1). Unele studii au evidențiat o prelungire a supraviețuirii cu cca. 18 săptămâni. Pacienții vor evita expunerea la soare pe o perioadă de 6-8 săptămâni după o astfel de procedură (1). Excizia chirurgicală a recidivei tumorale poate crește supraviețuirea cu aproximativ 36 de săptămâni, cu mențiunea că 10% din GBL pot recidiva la distanță de locația inițială (12).

Psihoterapia. Unele studii efectuate asupra profilului psihologic al unor pacienți tratați pentru GBL multiform au aratat că depresia și sentimentul lipsei de speranță de vindecare sunt asociate cu evoluție rapid înfaustă, în timp ce comportamentul combativ și optimist este însoțit de rezultate mai bune (6). Datele semnalate sugerează că endorfinele (mediatori biochimici ai emoțiilor), sunt implicate în reglarea imună prin influențarea activităților celulelor "natural killer" (6).

Imunoterapia aplicată în cazul GBL multiforme, după injectarea intravenoasă sau intracarotidiană de anticorpi monoclonali, produce o acumulare specifică la nivelul tumorii, dar ea este insuficientă pentru obținerea unui efect terapeutic (6). Bariera hematoencefalică poate constitui o piedică pentru pasajul anticorpilor monoclonali. Încercările de depășire a acestei piedici au constat în dechiderea barierei hemato-encefalice. Au existat încercări de injectare în restul tumoral, după excizia chirurgicală de limfocite "killer" sensibilizate, dar rezultatele favorabile nu s-au confirmat (2). Administrarea intravenoasă de imunomodulatori de tipul IL2, datorită creșterii edemului cerebral, nu poate constitui un tratament eficient împotriva GBL (6).

Durata medie de supraviețuire după tratament este aproximativ 8 luni (8). Pacienții mai tineri cu GBL secundar prezintă intervale ceva mai mari de supraviețuire, care pot ajunge până la 3-5 ani. Rezultatele tratamentului multimodal în GBL trebuie urmărite continuu clinic (statusul neurologic) și paraclinic (CT-scan și RMN repetate), asociate cu examen hematologic și biologic general (1) (fig. 17).

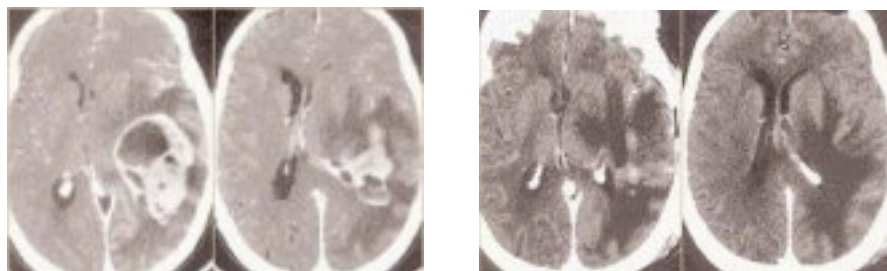


Fig.17 Aspect CT pre- și post - operator într-un caz de GBL temporo-parietal stâng

Cauza decesului provocat de acest tip de tumoră este neclară. Deși o parte dintre pacienți decedează datorită efectului de masă și hernierii cerebrale secundare, alții nu prezintă efect de masă semnificativ în momentul decesului (1). Deteriorarea neurologică progresivă și decesul sunt cauzate de afectarea cerebrală de cauze necunoscute (12).

Capitolul VI

Au fost analizați 1231 de pacienți care au fost operați pentru glioame cu origine astrocitară, de grade diferite (astrocitoame pilocitice, infiltrative de grad II, astrocitoame anaplastice de grad III, GBL unice și multicentrice, recidivate și gliosarcoame) între 1990-2006 în **serviciul de neurochirurgie al Institutului de Boli Cerebrovasculare București, (în prezent Institutul Național de Neurologie și Boli Neurovasculare) condus de acad. Prof.dr. Leon Dănăilă**. Acești pacienți au fost selectați pentru acest studiu după confirmarea histopatologică a fragmentelor tumorale și după ce tumora a fost încadrată în clasificarea OMS. Atitudinea terapeutică aplicată, de-a lungul timpului pe lotul studiat a fost în perfectă concordanță cu cea recomandată de BTSG (Brain Tumour Study Group)(13) și literatura internațională de specialitate. Această atitudine cuprinde: confirmarea histopatologică, prin chirurgie deschisă sau biopsie, cito-reducție chirurgicală maximală a volumului tumoral atunci când este posibil, fără a produce deficite neurologice suplimentare, radio- și chimioterapie, controale periodice, cu scopul urmăririi eventualelor recurențe și eventual reoperarea acestora etc.

VI. 2. Material clinic și metodă

Au fost analizați într-un mod retrospectiv, 1231 de pacienți, operați între 1990 - 2006 în același serviciu de neurochirurgie (**Institutul de Boli Cerebrovasculare “Vlad Voiculescu” București, în prezent Institutul Național de Neurologie și Boli Neurovasculare**). 346 (28,1%) dintre acești pacienți au prezentat glioame de grad mic (I și II), 214 (17,3%) au prezentat astrocitoame anaplastice, 113 (8,9%) au prezentat astrocitoame mixte (oligoastrocitoame) și 558 (45,3%) au prezentat GBL multiforme (fig.18).

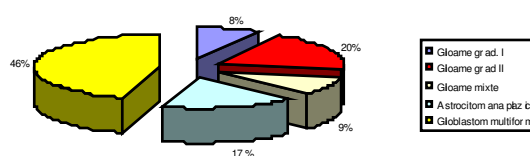


Fig. 18. Raportul procentual al pacienților operați pentru tumori astrocitare între 1990 și 2006

Din totalul de 558 GBL multiforme, 16 (2,8%) au avut localizare multicentrică și marea majoritate dintre pacienții care s-au prezentat la control, după 6 luni de la prima operație au prezentat recidivă tumorală mai mult sau mai puțin extinsă. Aceștia au fost selectați după examenul histopatologic și încadrarea într-una dintre clasificările uzitate în prezent (OMS sau clasificarea Daumas – Dupont). Termenul de gliom de grad mic este rezervat gradelor I și II, astrocitoamele de grad III și glioblastomul de grad IV fiind considerate glioame agresive cu grad mare de malignitate (142). Acest capitol prezintă într-un mod retrospectiv și analizează calitățile predictive ale unui set de criterii clinice, diagnostice și terapeutice la un lot de pacienți internați și tratați în **Clinica II Neurochirurgie a I.B.C.V. în intervalul ianuarie 1990 – decembrie 2006 (17 ani)** – tabel I. Studiile retrospective a 1231 pacienți (1990 – 2006) s-au efectuat și prin consultarea foilor de observație clinică a acestora, coroborate cu protocolul operator din condicile de operații, precum și cu registrele de diagnostic histopatologic, din cadrul serviciului de anatomie – patologică, care confirmau de fapt diagnosticul de certitudine.

Au fost urmăriți o serie de parametrii clinico-biologici și imagistici ai evoluției tumorale la acești pacienți:

- 1) Analiza primară a datelor de stare civilă a pacienților: vârsta, sexul, mediul de proveniență, profesia, condițiile de viață și muncă etc.
- 2) Analiza simptomatologiei bolnavilor: în care s-au luat în calcul simptomele și semnele clinice prezente la internarea bolnavului în clinică și intervalul scurs de la debut;
- 3) Analiza investigațiilor paraclinice, care au condus la precizarea diagnosticului și critica lor;
- 4) Analiza patologiei asociate, în asociere cu riscurile anestezice și chirurgicale;
- 5) Analiza gradului de rezecție chirurgicală, în funcție de localizarea tumorii și cu gradul de extensie a acesteia;
- 6) Proporția diverselor tipuri histologice de astrocitoame infiltrative, în funcție de grad, de

localizare etc. și compararea acestor date cu cele publicate în literatura de specialitate. 7) Analiza complicațiilor postoperatorii și a atitudinii terapeutice impuse de acestea, reintervenție chirurgicală, tratament oncologic sau terapie intensivă etc. 8) Analiza stării la externare, după scala de prognostic Karnofsky; 9) Timpul scurs de la prima operație până la recidivă, în corelație cu protocolul de tratament adjuvant urmat (sau nu) de pacient; 10) Exemplificări cu cele mai sugestive cazuri, cu imagini de control pre- și postoperator; 11) Analiza rezultatelor postoperatorii în contextul datelor din literatura de specialitate, în acest moment; 12) Concluzii (asupra rezultatelor obținute, noi direcții de studiu ce se pot desprinde din această lucrare).

Există și un mic lot de pacienți (34 la număr), aflați în studiu prospectiv, operați în cursul anilor 2005, 2006 și chiar în 2004, pentru diverse astrocitoame infiltrative de grad II și pentru astrocitoame anaplastice și chiar GBL multiforme care supraviețuiesc și care sunt sub urmărire clinico-imagistică periodică. Glioblastoamele multiforme luate în studiu au fost majoritar GBL primare “de novo”, fără o leziune premergătoare astrocitară (n=330/558), restul de 228 reprezintă GBL secundare, provenite din tumori astrocitare de grade reduse și care prin dediferențiere tumorală au evoluat către stadiul IV de malignitate, GBL multiform secundar. Toate astrocitoamele gemistocitice au prezentat progresie tumorală spre gradul IV și recidivă tumorală. Nici un caz de gliom de grad I, nu a progresat spre malignitate, după rezecție totală. Concluzia noastră este ca dediferențierea histologică și progresia clinică spre malignitate sunt cu atât mai reduse cu cât excizia tumorală inițială este mai completă. Pe lotul studiat doar 17,3% dintre pacienți au fost reoperați. Rezecția chirurgicală cât mai completă plus tratamentul adjuvant, a prelungit perioada de timp până la reoperarea recidivei și a scăzut incidența progresiei tumorale spre malignizare (fig.19).

Relația între gradul tumoral și recurența/ recreșterea tumorală

Gradul tumoral	Nr. de cazuri	Nr. de recidive	Persistența gradului tum.și după recidivă	Creșterea gradului tum. după recidivă
Grad I	98	0	0	0
Grad II	248	118	47	71
Grad III	214	171	59	112
GBL multiform	558	501	-	-

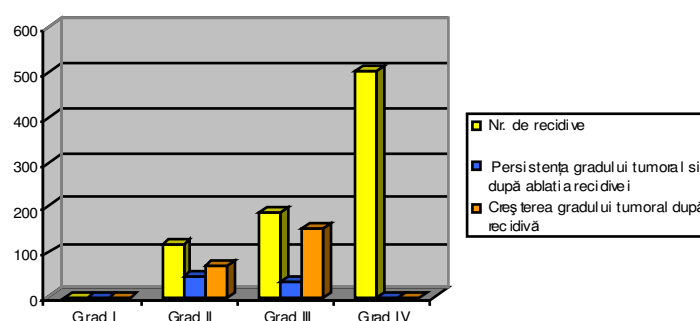


Fig. 19. Procentul recidivelor în funcție de gradul de malignitate a tumorii

Am realizat curbele Kaplan-Meier evaluând riscul de recidivă tumorală după utilizarea diferitelor tipuri de tratament chirurgical: biopsie stereotaxică, rezecția chirurgicală parțială și rezecția chirurgicală macroscopică completă (fig.20). Analiza statistică completă a curbei Kaplan-Meier pentru cele trei grupe de chirurgie demonstrează o diferență semnificativă între cele trei grupe ($p < 0,001$).

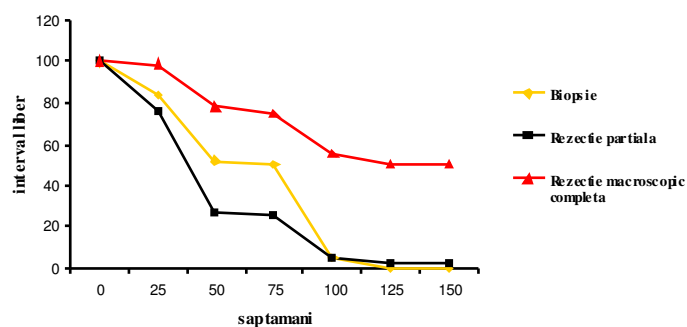


Fig. 20. Curbele Kaplan-Meier, evidențiază diferențele de supraviețuire în funcție de gradul de rezecție tumorală

În general tumorile astrocitare sunt tratate chirurgical, calitatea rezecției fiind evaluată în funcție de context, cu locația tumorii și cu alte opțiuni terapeutice (radio- și chimioterapie). Alegerea celei mai optime atitudini terapeutice, are ca scop prelungirea timpului de supraviețuire într-o condiție neurologică cât mai bună, având în vedere următorii parametri : rezecție chirurgicală cât mai completă, cuantificarea cât mai exactă a deficitelor neurologice pre- și postoperator, perioada de timp de la apariția primelor simptome, prezența și tipul crizelor epileptice, precocitatea aplicării tratamentului chirurgical etc. Postoperator statusul clinic al pacienților a fost evaluat prin scorul Karnofski.

Capitol VII

Procesul de angieneză. Evaluarea unor markeri ai angiogenezei în GBL multiform

Implicarea familiei de proteine constitutive a **caveolelor** și în special a **caveolinei-1** în oncogeneza diferitelor tipuri de tumori umane, a devenit recent o preocupare majoră în domeniul biologiei moleculare.

Tot mai multe studii *in vitro* sau *in vivo* (modele experimentale) prezintă rezultate privind rolul caveolinei-1 în supresia tumorală și reglarea procesului de angieneză. Au fost publicate totuși puține lucrări privind implicarea caveolinei-1 în reglarea acestor procese în patologia glioblastoamelor, tumori cerebrale cu grad înalt de proliferare și angieneză.

Material și metodă

Această etapă a lucrării cuprinde un număr total de 20 de cazuri de glioblastoame (8 femei și 12 bărbați), 18 pacienți fiind la prima intervenție iar la 2 pacienți s-a intervenit pentru recidivă tumorală, operate în Clinica de Neurochirurgie Institutului de Boli Cerebrovasculare „Vlad Voiculescu”, acad. prof. dr. Leon Dănăilă, în perioada ianuarie 2005 – mai 2005, în prezent Institutul Național de Neurologie și Boli Neurovasculare București. Fragmente de glioblastoame au fost prelevate intraoperator și repartizate în tampoane specifice prelucrării în vederea examinării morfologice, imunohistochemice și histochimice. Studiul clinic, imagistic, aprecierea gradului de invazivitate precum și caracterizarea intraoperatorie a tumorilor au fost efectuate în cadrul **Clinica de Neurochirurgie a I.N.B.C.V. București**. Analiza morfologică, analiza imunohistochimică - markeri de proliferare (Ki67) pentru evidențierea potențialului de proliferare, precum și analiza imunohistochimică a unor markeri ai angiogenezei VEGF (vascular endothelial growth factor) și β FGF (fibroblastic growth factor β) precum și expresia caveolinei – 1 au fost efectuate în cadrul **colectivului de cercetare din Institutul Național de Patologie și Genetică Medicală “Victor Babeș” București**. Fragmentele tumorale au fost fixate în formol tamponat 10%, deshidratate în etanol și incluse în parafină. Au fost efectuate secțiuni de 5 microni grosime, care au fost colorate cu hematoxilina-eozină (HE), după metodologia clasică și apoi examinate la microscopul optic și electronic.

Metoda imunohistochimică

S-a utilizat metoda imunohistochimică indirectă tristadială ABC - Hsu, modificată de Bussolati și Gugliotta. Desfășurarea tehnicii s-a efectuat după următoarele secvențe:

- obținerea de secțiuni de 5 microni grosime din blocurile de parafină și aplicarea acestora pe lame tratate cu adeziv tisular ICA (Abbott);
- secțiunile deparafinate sunt trecute într-o soluție de apă oxigenată 0,3% pentru inhibarea peroxidazei endogene;
- după rehidratare, secțiunile sunt spălate în tampon fosfat salin pH 7,4 (PBS - „phosphate buffered saline”);
- secțiunile se incubează 20 min. cu ser normal (ser de capră) pentru legarea situsurilor nespecifice de tip Fc;
- se aplică anticorpul primar, (ser policlonal de GBL) sau anticorpul monoclonal de șoarece (anti-alfa subunități, p53 și bcl-2) în diluția de lucru în PBS-BSA-azidă și se incubează peste noapte;
- a doua zi se spală și se incubează cu anticorpul secundar biotinitat, 30 min. la temperatura camerei, spălare în tampon PBS;

Anticorpi monoclonali și seruri policlonale - parametri de lucru:

- urmează incubarea cu complexul ABC, 45 min. (Kit Vector Burlingame, USA), în diluția de lucru în tampon carbonat;
- după spălare în apa curentă se dezvoltă într-o soluție care conține 10 mg 3,3'-diaminobenzidină (DAB) în 88 ml PBS și 0,25% apă oxigenată;
- în cazul markerilor nucleari p53 și Ki67 s-a efectuat o amplificare a reacției de culoare cu ajutorul unor săruri de metal greu. În laboratorul Institutului “Victor Babeș” se utilizează clorura de Ni sau Co 1%;
- urmează contracolorarea nucleară cu hemalaun - Meyer, deshidratarea și montarea în balsam de Canada. Această metodă imunohistochimică este relativ simplă, iar amplificarea semnalului obținut este optimă. Reacția de culoare la nivel celular este, fie difuză citoplasmatic, fie fin granulară, exprimând grade diferite de intensitate.

Imunoreactivitatea este exprimată procentual prin numărul de celule pozitive pentru fiecare anticorp:

- 0 - 10% celule pozitive = reactivitate foarte slabă;

- 10 - 25% celule pozitive = reactivitate slabă, ușoară;
- 25 - 50% celule pozitive = reactivitate moderată;
- peste 50% celule pozitive = reactivitate intensă, marcantă.

Evaluare clinică. Din cei 20 de pacienți, 8 pacienți au fost femei și 12 bărbați. Repartiția cazurilor pe grupe de vârstă evidențiază preponderența cazurilor pentru decadele 4,5 și 6 (fig.21).

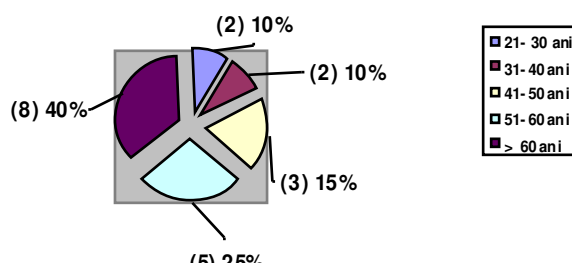


Fig. 21. Distribuția pacienților analizați pe grupe de vârstă;

SIMPTOME	Nr. PACIENTI
Hipertensiune intracraniană	16
Alterarea conștienței	7
Deficite neurologice	12
Crize epileptice > 2 ani	4
Crize epileptice apărute recent	7
Tulburări psihice	6

18 pacienți au fost operați pentru prima dată, la 2 pacienți s-a intervenit chirurgical pentru recidivă tumorală. Sub aspect clinic, 5 pacienți au prezentat sindrom de hipertensiune intracraniană (HIC), 7 pacienți, alterarea stării de conștiență (somniale), 12 pacienți au prezentat deficite neurologice (hemipareză), 4 pacienți au prezentat crize cu debut de mai mult de 2 ani înaintea internării și 7 pacienți au prezentat crize secundar generalizate cu debut recent. Cefaleea și eventual crizele epileptice au fost simptomele inițiale de debut acuzate de 17 pacienți, ajungând în final să fie acuzate de toți pacienții.

Evaluare radiologică

Computer tomografia cerebrală și rezonanța magnetică nucleară rămân investigațiile de elecție în patologia tumorală cerebrală. Toți pacienții au fost investigați prin computer tomografie cerebrală și 12 pacienți prin rezonanță magnetică nucleară, cu administrarea obligatorie a substanței de contrast. Angiografia cerebrală nu se practică de rutină în gliomele cerebrale, ea a fost realizată doar la 2 pacienți.

Tomografia computerizată cranio-cerebrală (CT)

Următoarele caracteristici imagistice, corelate cu structura anatomopatologică diferențiază imagistic gliomele cerebrale în funcție de gradul lor de malignitate :

- WHO (World Health Organisation) grad I : masă tumorală hipodensă, care nu fixează substanța de contrast și nu are efect de masă ;
- WHO grad II : masă tumorală hipodensă, care nu fixează substanța de contrast dar are efect de masă ;
- WHO grad III : masă tumorală hipo/izo/hiperdensă, frust neomogenă care fixează intens și neomogen substanța de contrast, efect de masă asupra structurilor cerebrale învecinate ;
- WHO grad IV : masă tumorală hipo/izo/hiperdensă, neomogenă care fixează intens și neomogen substanța de contrast, cu dispoziție inelară spre periferie și zone hipodense centrale care pot sugera prezența necrozei, efect de masă asupra structurilor cerebrale învecinate.

Există și cazuri rare în care gliomele maligne de grad înalt, nu fixează substanța de contrast.

Imagistica prin rezonanță magnetică (IRM)

Rezonanța magnetică nucleară indică mai precis diferența de semnal între componentele tumorale, ca și între tumoră și edemul tumoral. Este indicată în special în momentul în care este nevoie de o definiție clară a dimensiunilor nodulului tumoral sau a regiunilor tumorale active. Imaginile RMN se suprapun ca și caracteristici peste imaginile CT, tumorile hipodense pe CT apar hipointense în T1 și hiperintense în T2. Tumorile au fost localizate în lobul frontal la 5 pacienți, temporal la 7 pacienți, temporal cu extensie în valea silviană și lobul frontal la 4 pacienți (localizare fronto-temporală), occipital la 2 pacienți și prezentau extensie contralaterală prin corpul calos (gliom „în fluture”) și alți 2 pacienți, un pacient cu tumoră frontală și un pacient cu tumoră parieto-occipitală (fig. 22).

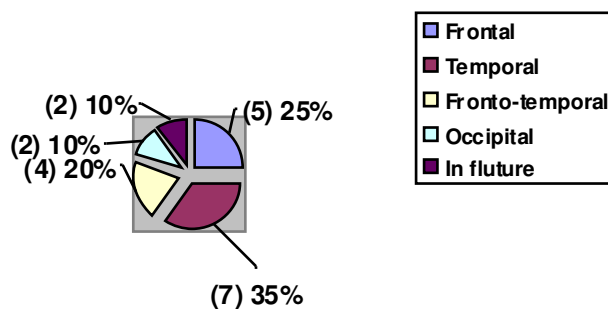


Fig. 22. Distribuția pacienților în funcție de localizarea tumorii;

Examenul histopatologic a evidențiat aspecte variabile, unele tumori fiind hipercelulare, formate din același tip celular, iar altele prezentând pleomorfism celular și nuclear cu numeroase celule multinucleate, uneori gigante). De asemenea s-au remarcat zone de necroză sau zone de proliferare vasculară. Examenul microscopic a evidențiat în general tumori imprecis delimitate, suprafețele de secțiune prezentând zone de culoare galbuie (necroza) ce a ocupat uneori 80-90% din masa tumorii, înconjurată de zone gri, periferice unde masa tumorală prezenta o consistență moale sau zone brum roșiatice, reprezentând hemoragii de vârste diferite (fig. 23, 24).

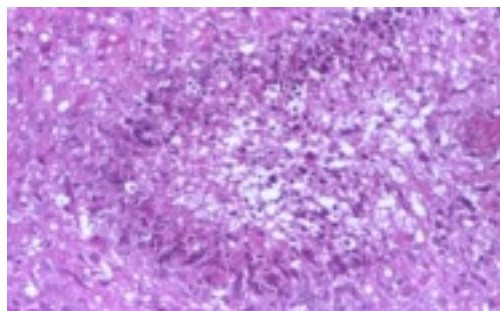


Fig.23. Zona de necroză într-un glioblastom.

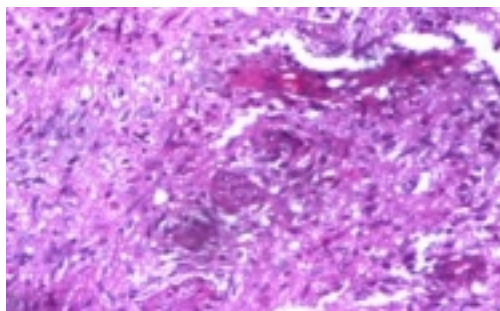


Fig.24. Proliferări vasculo-endotheliale în cadrul unui GBL - HE, 20x

Factorul principal de gravitate al glioblastomului este dat de caracterul său infiltrativ, slab delimitat față de parenchimul cerebral din jur, ceea ce face practic imposibilă rezecția completă a tuturor celulelor neoplazice. La aceasta se adaugă și potențialul de recidivă deosebit de ridicat, datorat mării capacități proliferative a celulelor tumorale (indice Ki-67 crescut). Se constată frecvente mutații ale genei p53, precum și supraexpresia PDGF (Platelet Derived Growth Factor), PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor), EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) și VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).

În această etapă au fost studiate 20 cazuri de glioblastoame (8 femei și 12 bărbați), 18 pacienți fiind la prima intervenție iar la 2 pacienți s-a intervenit pentru recidivă, selecționate pe baza datelor clinice, imagistice și observațiilor intraoperatorii. La investigarea imagistică (CT/RMN) tumorile au prezentat următoarele caracteristici: mase neomogene hipodense, izodense (izointense sau hipointense în T1) - 20 pacienți; infiltrative (marginile tumorii sunt greu de distins) - 20 pacienți; cu zone hiperdense (hemoragii, mai rar calcificări) - 6 pacienți; cu o zonă centrală de necroză sau chist - 7 pacienți; deplasează structurile liniei mediane și/sau comprimă creierul adiacent - 14 pacienți; fixează intens și neomogen substanța de contrast (în special sub forma unui

inel periferic) - 16 pacienți; edem peritumoral digitiform - 18 pacienți. Examenul anatomopatologic efectuat a evidențiat: - astrocitom grad II - 4 cazuri; - astrocitom grad III - 2 cazuri (unul dintre cazuri prin recidiva unui astrocitom protoplasmatic); - glioblastom - 14 cazuri. În acest studiu tumorile au prezentat un potențial de proliferare exprimat prin Ki 67 variabil între 4 și 20 %; de asemenea, majoritatea tumorilor investigate au prezentat o expresie crescută a proteinei p53. Prezența caveolinei-1 prin analiza imunohistochimică a fost evidențiată în 60% din cazuri cu exprimare în celulele endoteliale vasculare, imunoreactivitatea exprimând grade variabile în tumorile analizate. Într-un caz de tumoră recidivată - iradiată a fost evidențiată expresia caveolinei-1 și în celulele tumorale. În această etapă au fost studiate 20 de cazuri de glioblastoame (8 femei și 12 bărbați), 18 pacienți fiind la prima intervenție iar la 2 pacienți s-a intervenit pentru recidivă. Vizualizarea expresiei pentru caveolina-1 a fost restrânsă la nivelul celulelor endoteliale, imunoreactivitatea exprimând grade variabile în tumorile analizate. Într-un singur caz de tumoră recidivată - iradiată a fost evidențiată expresia caveolinei-1 și în celulele tumorale. Este necesară continuarea studiilor pentru evaluarea interrelației funcționale între caveoline și markerii angiogenezei în tumorigeneza glioblastoamelor, fapt ce va crea un interes major în descoperirea unor noi ținte terapeutice. S-a observat că expresia VEGF în GBL de novo este mai crescută decât expresia ei în GBL secundare. Au fost obținute date care susțin o corelare pozitivă între Ki67 și VEGF aceasta putând sugera că VEGF ar putea să joace un rol în creșterea și proliferarea celulelor gliale, deși expresia receptorilor VEGF în celulele tumorale este încă enigmatică. Inhibitorii angiogenezei, în afară de efectul lor asupra apoptozei, influențează procesele de transcripție a factorilor de creștere a celulelor canceroase, ca și transferul de semnal în celulele endoteliale. Ei pot influența migrarea celulelor endoteliale, sugerând posibilitatea utilizării lor în terapie. Terapia antiangiogenică are potențial de terapie antitumorală deoarece angiogeneza este un proces cheie în comportamentul tumoral. Cazuistica examinată cuprinde un număr total de 20 de cazuri de glioblastoame (8 femei și 12 bărbați), 18 pacienți fiind la prima intervenție iar la 2 pacienți s-a intervenit pentru recidivă - operate în Clinica de Neurochirurgie a I.N.B.C.V. Cazuistica ce va fi prezentată în continuare se bazează pe un număr de 20 de pacienți cu astrocitoame difuze de grad II, anaplastice și glioblastoame supratentoriale internate în **Clinica de Neurochirurgie a I.N.B.C.V. - București**, ale căror piese anatomopatologice au fost explorate prin tehnici histopatologice și imunohistochimice. Prezentarea se concentrează asupra analizei comparative a unor markeri cheie ai angiogenezei VEGF și bFGF și expresiei caveolinei-1 la pacienții luați în studiu. Examenul histopatologic a evidențiat aspecte variabile, unele tumori fiind hipercelulare, formate din același tip celular, iar altele prezentând pleomorfism celular și nuclear cu numeroase celule multinucleate, uneori gigante. De asemenea s-au remarcat zone de necroză sau zone de proliferare vasculară precum și pleomorfism celular și nuclear și mitoze atipice. Evaluarea aspectelor clinice a relevat următoarea simptomatologie: hipertensiune intracraniană - 16 cazuri; alterarea conștienței - 7 cazuri; deficite neurologice - 12 cazuri; crize epileptice > 2 ani - 4 cazuri; crize epileptice apărute recent - 7 cazuri; tulburări psihice - 6 cazuri. A fost analizată expresia caveolinei-1 în comparație cu markerii cheie ai angiogenezei VEGF și bFGF. Imunoreacția pentru VEGF a fost observată atât la nivelul celulelor endoteliale cât și în cele tumorale, în procent mai ridicat în cele cu grad înalt de agresivitate. bFGF a prezentat o imunoreacție mai pronunțată decât VEGF în celulele tumorale, în concordanță cu gradul de agresivitate tumorală. Vizualizarea expresiei pentru caveolina-1 a fost restrânsă la nivelul celulelor endoteliale, imunoreactivitatea exprimând grade variabile în tumorile analizate. Într-un caz de tumoră recidivată iradiată a fost evidențiată expresia caveolinei-1 și în celulele tumorale. Factorul principal de gravitate al glioblastomului este dat de caracterul sau infiltrativ, slab delimitat față de parenchimul cerebral din jur, ceea ce face practic imposibilă rezecția completă a tuturor celulelor neoplazice. La aceasta se adaugă și potențialul de recidivă deosebit de ridicat, datorat mării capacități proliferative a celulelor tumorale (indice Ki67 crescut). Se constată frecvente mutații ale genei p53, precum și supraexpresia PDGF, PDGFR, EGFR și VEGF. Tumorigeneza glioblastoamelor este un proces încă neelucidat, implicând dereglări ale ciclului celular, proliferarea și angiogeneza. Caveolele sunt invaginații ale membranei citoplasmatică, în formă de omega, cu diametru între 50-100 nm, bogate în colesterol, cu înveliș

striat de caveolină și sunt implicate în reglarea unor căi de semnalizare. Caveolinele sunt o clasă de proteine cu proprietatea de a oligomeriza și sunt necesare și suficiente pentru formarea caveolelor. Caveolina-1 (Cav-1), o proteină membranară integrală și componentă principală a caveolelor *in vivo*, a fost prima proteină localizată în caveole (Murata și colab. 1995). Cei trei membri ai acestei familii, caveolinele 1, 2 și 3 sunt proteine codificate de gene diferite. Locusurile ce codifică proteinele Cav-1 și Cav-2 sunt plasate pe cromozomul 7 (7q31.1), în timp ce caveolina 3 este codificată de o genă de pe cromozomul 3 (3p25). Deosebit de interesantă este implicarea cav-1 în patogenia transformării maligne a celulelor, tumorigeneză și metastazare. Există controverse în ceea ce privește rolul caveolinelor, de supresor tumoral sau pro-oncogen, în funcție de tipul sau stadiul tumoral. Trei mecanisme pot conduce la inactivarea funcțională a rolului de supresor tumoral al cav-1: fosforilarea tirozinei, fosforilarea serinei și o mutație punctiformă dominant-negativă, P132L. Capacitatea Cav-1 și caveolelor de a modula semnalizarea are implicații importante în procesul transformării celulare și al dezvoltării tumorale.

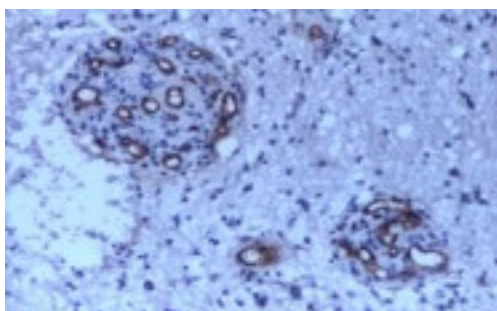


Fig. 25. Reacție pozitivă pentru CD34 în celulele tumorale perivasculare IHC 20X

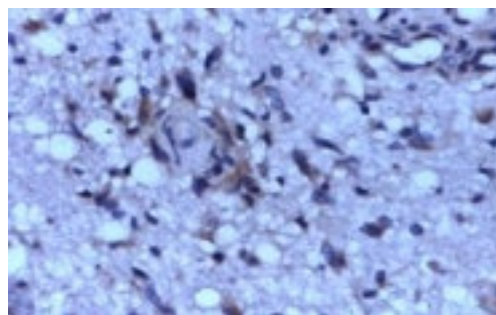


Fig. 26. Pozitivare citoplasmatică pentru VEGF în endoteliul vascular (vase cu proliferare glomeruloidă) într-un glioblastom. IHC 20X

S-a demonstrat implicarea caveolinei 1 și a domeniului său structural în reglarea într-o manieră negativă a mecanismelor de semnalizare prin intermediul altor proteine, incluzând sintetaza oxidului nitric, receptorul factorului de creștere epidermal (EGFR), Src tirozin-kinaza, H-Ras și c-Neu. Un alt supresor tumoral destul de bine caracterizat p53, pare a fi direct implicat în reglarea expresiei caveolinei-1.

Atât în țesutul normal cât și în țesutul tumoral prin analiza imunohistochimică s-a evidențiat paralelism între markerii angiogenezei și caveolina-1. De asemenea markerul cheie al angiogenezei VEGFR2 a prezentat pozitivarea reacției în celulele reactive din țesutul netumoral sau cel de la periferia tumorii. În zona peritumorală caveolina 1 a prezentat reacție pozitivă și în celulele reactive. În ceea ce privește analiza țesutului tumoral markerii de angiogeneză VEGF și VEGFR2 au exprimat o reacție pozitivă difuză – citoplasmatică. (fig. 26). Analiza imunohistochimică a caveolinei 1 a prezentat reacție pozitivă în celulele endoteliale vasculare și de asemenea în celulele tumorale, de tip membranar și citoplasmatic.

Comparând țesutul tumoral cu cel normal, s-a observat o expresie crescută a caveolinei-1 în celulele tumorale.

Analiza "western blot" a adus completări cercetărilor la nivel imunohistochimic referitor la expresia diferențiată a caveolinei -1 la nivelului țesutului cerebral. În țesutul tumoral prin analiza "western blot" imunodectia pentru caveolina-1 s-a realizat la un nivel mai mare comparativ cu cea obținută din țesutul normal. (fig.27).



a / b

Fig. 27. Nivelul expresiei caveolinei 1 în țesut normal (a) și tumoral(b) - metoda "western blot".

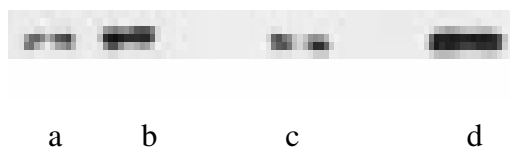


Fig. 28. Nivelul caveolinei-1 în țesut normal (a,c) și tumoral - glioblastom (b, d).

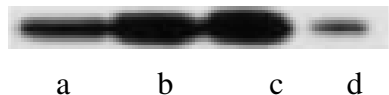


Fig. 29. Variații ale expresiei cav-1 prin determinarea western blot la nivelul unor glioblastoame (a, b, c) și în țesut normal (d).

Determinarea nivelului caveolinei-1 prin metoda "Western blot" a evidențiat aceeași conduită a acestui marker ca și la analiza imunohistochimică, respectiv un nivel mai crescut în cazul țesutului tumoral comparativ cu cel normal (fig. 28, 29).

Aceste studii preliminare remarcă o variație a nivelului caveolinei-1 în raport cu gradul tumorii; se impun noi studii care să cuprindă un lot mai mare de pacienți pentru o concluzie definitivă. Caveolinele au un rol paradoxal în dezvoltarea tumorală. Sunt implicate atât în supresia tumorală cât și în oncogeneza. Expresia crescută a caveolinelor duce la inhibarea căilor de semnalizare, ca de exemplu cea a factorilor de creștere. S-a demonstrat că anumite celule tumorale care exprimă caveolina sunt mult mai agresive și metastatice datorită potențialului de creștere independent. Mijloacele prin care caveolina inhibă creșterea și transformarea celulară nu sunt elucidate chiar în cazul în care caveolina-1 are cu adevărat caracteristici în supresia tumorală. Deoarece caveolina-1 este o proteină ce interacționează și reglează o varietate de căi de semnalizare, este posibil ca această proteină să regleze similar protooncogenele. Date fiind dovezile ce confirmă rolul caveolinei-1 în tumorigeneza, au fost efectuate multe studii clinice pentru examinarea variațiilor caveolinei-1 într-o varietate de cancere la om. Analizele pe probele de cancer de sân au evidențiat că până la 16% din aceste cazuri au avut mutația punctiformă a genei CAV-1 (P132L), iar majoritatea acestor mutații au fost depistate în cancerele invazive. Pornind de la această descoperire, Lee și colaboratorii au examinat comportamentul mutantei CAV-1 (P132L) pe o cultură de celule mamare și au constatat că este localizată diferit și reținută în aparatul Golgi. În cancerele gastro-intestinale rolul caveolinei-1 este mai puțin clar. De exemplu, atât expresia ARNm și cât și a proteinei sunt reduse în liniile celulare din carcinoamele de colon. În opoziție cu aceste constatări mai multe studii au arătat creșteri ale expresiei de caveolină în țesutul tumoral colonic. În mucoasa normală de colon expresia caveolinei-1 a fost crescută în 6% din probe iar în cea din adenocarcinom în 78%. Alte studii similare au arătat că 45% din pacienții cu cancer cu celule scuamoase al esofagului aveau nivele crescute ale expresiei caveolinei-1. Mai mult, expresia caveolinei-1 a fost corelată negativ cu supraviețuirea pe termen lung. Totuși, o examinare a tumorilor france de colon a arătat că 67% din aceste cancere aveau un nivel scăzut al expresiei caveolinei-1. Astfel, este dificil de enunța o concluzie definitivă asupra contribuției nivelului expresiei caveolinei-1 în patogeneza cancerelor gastro-intestinale în contextul acestei contradicții. Caveolina-1 este considerată supresor tumoral și în același timp contribuie la progresia metastatică a cancerului de prostată prin acțiuni anti-apoptotice. Capacitatea alternanței acestor funcții de supresie a creșterii tumorale și de stimulare a creșterii tumorale nu a fost încă pe deplin explicată. Caveolina-1 a fost depistată în serul pacienților cu cancer de prostată. Expresia caveolinei-1 este de asemenea asociată cu metastazele pulmonare și adenocarcinoamele de pancreas și corelată negativ cu supraviețuirea pacienților. Elucidarea rolului cav-1 în tumorigeneză oferă importante perspective terapeutice, prin dezvoltarea de noi vectori cu acțiune pe ținte moleculare specifice, responsabile de fenotipul malign (fig.30, 31). O posibilă abordare este ținerea farmacologică a căilor de semnalizare ce joacă un rol important în transformarea și progresia tumorală. Clark (2000) susține că, prin inhibare transmiterii semnalului – reglarea negativă a hsp90 cu 17-alilamino-17

demetoxigelanamicina – expresia Cav-1 ar putea fi inhibată în celulele canceroase. În studiul nostru tumorilor au prezentat un potențial de proliferare exprimat prin Ki-67 variabil între 4 și 20 %; de asemenea, majoritatea tumorilor investigate au prezentat o expresie crescută a proteine p53.

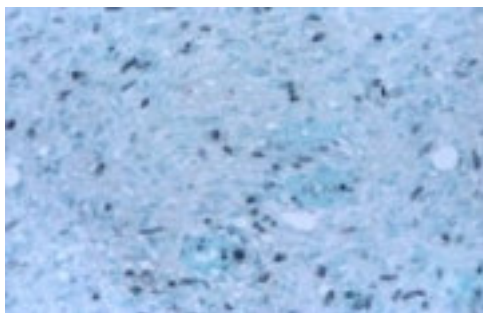


Fig. 30. Expresie pozitivă pentru Ki67–15%

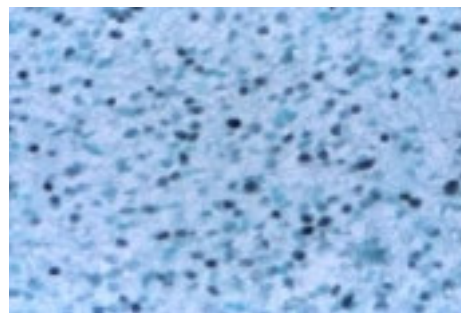


Fig. 31. Expresie pozitivă pentru p53 – 50 % IHC20X

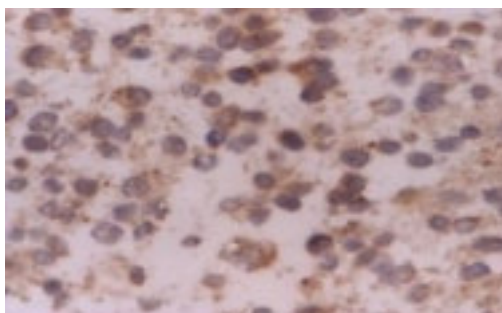


Fig. 32. Reacție intens pozitivă pentru VEGF

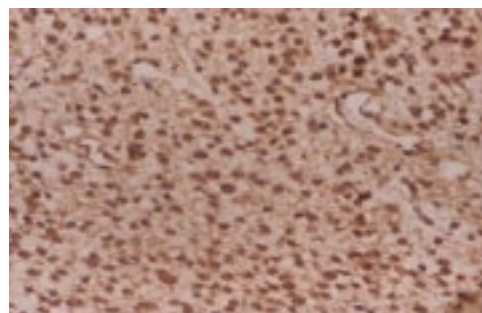


Fig. 33. Reacție intens pozitivă difuză pentru bFGF în celule tumorale GBL detaliu IHC20X

S-a demonstrat ca bFGF stimulează proliferarea celulelor cu origine mezodermala și neuroectodermala, inclusiv fibroblaste, celule endoteliale, astrocite, oligodendrocite, neuroblaste, keratinocite, osteoblaste, celule musculare netede și melanocite. bFGF este chemotactic și mitogen pentru celulele endoteliale in vitro, inducând producerea de către celulele endoteliale a unor factori implicați în migrația celulelor endoteliale capilare. bFGF induce diferențierea neuronilor, supraviețuirea, regenerarea și salvarea neuronilor in vitro și in vivo de la leziuni ce induc moartea. bFGF stimulează funcțiile non-mitogene ale celulelor gliale, cum ar fi migrația și a fost localizat în aria hipocampică, stem cerebrale și izocortex. Numeroase studii efectuate pe *Xenopus* și embrioni de șoareci au demonstrat implicarea bFGF în modularea dezvoltării și diferențierii embrionare. Acestea cât și alte observații in vitro sugerează că bFGF joacă un rol în modularea in vitro a proceselor normale de angiogeneză, vindecarea rănilor și repararea tesuturilor, dezvoltarea embrionară și diferențierea, funcția neuronală și degenerarea neurală. Activitatea biologică a bFGF este mediată printr-un sistem de receptori duali, tirozin kinazici de înaltă afinitate (fig 32, 33). ARN mesager și proteina bFGF sunt exprimate și secretate de către astrocite și de toate tipurile de tumori gliale. bFGF poate acționa ca modulator al diferențiere gliale, al creșterii și diferențierii cât și ca factor paracrin al angiogenezei. bFGF și VEGF au probabil efecte sinergice, cel mai probabil bFGF modulează expresia VEGF în celulele endoteliale prin mecanisme de acțiune auto- și paracrină. Recent a fost propusă o cascada complexă de factori gliali angiogenici și mitogeni, aceasta coincide cu inducerea expresiei bFGF și a angiogenezei gliale. S-a demonstrat ca angiogeneza se corelează cu comportamentul biologic tumoral, capacitatea de metastazare, de recidivă, prognosticul, și răspunsul slab la tratament în diferite tipuri tumorale solide. Microvascularizația intratumorală poate fi corelată cu comportamentul tumoral. Angiogeneza prezintă unele particularități în GBL, legate de circulația sanguină la acest nivel și capacitatea secretorie atât a unor factori angiogenici cât și a unor inhibitori ai acestora. Rezultatele privind angiogeneza în GBL sunt încă subiect de controversă științifică, unele lucrări raportând relații pozitive între factorii angiogenezei și dimensiunea, statusul endocrin sau potențialul agresiv al tumorii, în timp ce alte studii susțin inexistența sau slaba corelație între factorii menționați. S-a observat ca expresia VEGF în GBL de

novo este mai crescuta decat expresia ei in GBL secundare. Au fost obtinute date care sustin o corelare pozitiva intre Ki67 si VEGF aceasta putand sugera ca VEGF ar putea sa joace un rol in cresterea si proliferarea celulelor gliale, desi expresia receptorilor VEGF in celulele tumorale este inca enigmatică. Inhibitorii angiogenezei, in afara de efectul lor asupra apoptozei, influentează procesele de transcriptie a factorilor de crestere a celulelor canceroase, ca si transferul de semnal in celulele endoteliale. Ei pot influenta migrarea celulelor endoteliale, sugerând posibilitatea utilizării lor in terapie. Terapia antiangiogenică are potențial de terapie antitumorală deoarece angiogeneza este un proces cheie in comportamentul tumoral.

Rezultate

1. A fost evaluat fenotipul angiogenic prin analiza comparativă imunohistochimică si serică a unor markeri cheie inductori ai angiogenezei (bFGF, VEGF) in raport cu potentialul agresiv.
2. Analiza serică a VEGF si bFGF a fost efectuată prin metoda enzimatică sandwich ELISA. A fost evidentiata o diferenta netă între lotul de pacienti cu GBL de novo si lotul cu GBL secundare, atât in cazul VEGF cât si bFGF.
3. Nivelele serice ale VEGF la pacienti variaza între 144.54 pg/ml si 261.81 pg/ml, cu o medie de 199,77 pg/ml (GBL de novo) versus 95.45 pg/ml (lot GBL secundare).
4. Nivelele serice ale bFGF la pacienti variaza între 4.28 pg/ml si 9.28 pg/ml, cu o medie de 6,25 pg/ml (GBL) versus 4,64 pg/ml (GBL secundare).
5. Analiza imunohistochimică a demonstrat prezenta expresiei VEGF si bFGF in majoritatea cazurilor studiate, cu preponderenta in GBL de novo invazive, ceea ce concorda cu potentialul de proliferare – Ki67.

Concluzii

Tumorile cerebrale reprezintă una dintre problemele cele mai complexe din patologia neurochirurgicală, atât prin frecvența mare și incidența crescută, cât și prin prognosticul deosebit de infaust și afectarea unui segment activ al populației.

Pe parcursul întregii teze, atât în partea generală, cât și în partea specială, ce reprezentat analiza lotului de glioblastoame și de tumori astrocitare de grade diferite, operate și tratate în Clinica de neurochirurgie a **Institutului Național de Neurologie și Boli Neurovasculare** în intervalul 1990 – 2006, am încercat să punctez, probleme de larg interes, pe care le ridică glioblastoamele în general și GBL multiloculare sau recidivate în particular, atât sub raportul aspectelor teoretice, cât și al atitudinilor practice, aplicative, ce au reieșit din cazurile studiate. Patologia tumorilor de origine astrocitară, a GBL în special, reprezintă una dintre problemele centrale, de interes ale neurochirurgiei. Tumorile primare ale sistemului nervos central (exceptând tumorile meningelor cerebrale), reprezintă 2% dintre tumorile primare dar sunt răspunzătoare de 7% dintre cauzele de mortalitate înainte de vârsta de 70 ani, la pacienții cu neoplasme. Glioblastomul multiform reprezintă între 12 - 20 % dintre tumorile cerebrale, fiind cea mai frecventă tumoră glială reprezentând 50-60% dintre tumorile astrocitare de toate gradele. Există o netă preferință pentru sexul masculin, sex-ratio M/F este de 1,5/1, vârful incidenței fiind în decada a șasea, între 50-60 de ani. Este destul de rar în primele trei decade de viață, sub 3% și excepțional la copii. Cercetările de citogenetică efectuate de diverși autori au argumentat existența a două subtipuri de glioblastom: primar și secundar. Glioblastomul primar apare la vârstnici, fiind de la început o tumoră extrem de malignă și agresivă. El se definește prin deleția cromozomului 10, însoțită de amplificarea EGF și a receptorului său. Glioblastomul secundar apare la vârste mai tinere prin transformarea anaplastică în trepte a unui astrocitom difuz de tip fibrilar într-unul anaplastic și apoi în glioblastom. Evoluția acestuia exprimată prin timpul de supraviețuire este net superioară GBL primar. Acesta se însoțește de delețiile alelice ale cromozomilor 9q și 13q cât și de amplificarea mai rară a 12q. Toate aceste modificări cromozomiale duc la afectarea ciclului reglator p15/p16//CDK4/CDK4/CDK6/RB și conduc la transformarea anaplastică a gliomelor difuze de tip fibrilar. În întregul sistem nervos central, neuronii sunt înconjurați de celule de susținere, elemente numite celule neurogliale, anume astrocite, care oferă un suport din punct de vedere structural și ocupă spațiile dintre neuroni și procesele neuronale și oligodendrocite, diferite din punct de vedere histologic de astrocite și având în principiu rolul de a sintetiza mielină.

Tumorile cerebrale astrocitare sunt împărțite în trei mari categorii: astrocitoame, astrocitoame anaplastice (WHO/OMS grad III) și glioblastoame multiforme, acestea din urmă fiind cele mai frecvente tumori gliale. Clasificarea histologică a unei tumori gliale ca și tumoră astrocitară depinde de recunoașterea unor zone cu celule tumorale care posedăcaractere astrocitare și exprimă produși ai unor gene întâlnite predominant la nivelul acestor celule. Astrocitoamele difuze (WHO grad II) se dezvoltă preferențial la nivelul emisferelor cerebrale, macroscopic fiind leziuni slab delimitate, cu celularitate moderată și infiltrare difuză a parenchimului cerebral, dar fără distrugerea acestor structuri. Spre deosebire de acestea astrocitoamele anaplastice, localizate de asemenea preferențial la nivelul emisferelor cerebrale, sunt caracterizate de semne de anaplasie focală sau difuză, precum atipii celulare, hiper celularitate și activitate mitotică marcată, în vreme ce glioblastomul, cu localizare preferențial supratentorială, este de cele mai multe ori reprezentat de o masă necrotică, cu hemoragii intracerebrale și o zonă marginală de țesut tumoral, hiper celulară, atipii nucleare și activitate mitotică, dar mai cu seamă proliferare microvasculară și necroze. Gliomalele sunt un grup heterogen de tumori la nivelul cărora defecte genetice specifice au fost asociate unor caracteristici distincte din punct de vedere al morfologiei tumorale. Cele mai frecvent implicate tulburări moleculare implică EGFR, PDGFR, fosfatidilinositol 3-kinaza, Ras, p53 etc. Cauzele principale pentru care tumorile gliale sunt capabile să eludeze răspunsul imun al gazdei sunt slaba lor imunogenitate, incapacitatea de a exprima antigene tumorale specifice precum și efectele modulatorie ale diversilor produși sintetizați de tumoră, capabili de a modula sistemul imun. Un număr de citokine sintetizate de către celulele tumorale contribuie într-o măsură semnificativă la imunosupresia indusă de neoplasm, anume TGFβ (transforming growth factor β), prostaglandina E2

și interleukina 10. Capacitatea cav-1 și caveolelor de a modula semnalizarea are implicații importante în procesul transformării celulare și al oncogenezei. Un alt supresor tumoral destul de bine caracterizat, p53, pare a fi direct implicat în reglarea expresiei caveolinei 1. Nivelele de expresie a cav-1 sunt scăzute, neschimbate sau crescute, depinzând de tipul celular tumoral. Interesant este și faptul că în celule tumorale derivate din același tip celular, nivelul de expresie al cav-1 sunt crescute sau scăzute. Elucidarea rolului cav-1 în formarea tumorală are importante perspective terapeutice. Planurile anterioare de tratament al cancerului aveau în principal o componentă citotoxică, de distrucție a celulelor maligne iar dezvoltarea actuală de noi medicamente este îndreptată spre terapii țintite care acționează pe ținte moleculare specifice, responsabile de fenotipul malign sau chiar la nivelul defectului genetic. O posibilă abordare este țintirea farmacologică a căilor de transmitere a semnalului ce joacă un rol important în transformarea și progresia malignă. Datorită heterogenității expresiei cav-1 în diferite tumori, terapiile având drept țintă cav-1, vor trebui să ia în considerație rolul specific sau funcțiile acestei proteine într-un anumit tip particular de celulă tumorală.

Cercetările curente nu au stabilit clar un rol pentru Cav-1 în ceea ce privește oncogeneza și progresia tumorală. Studiile viitoare vor scoate la iveală fără îndoială noi relații între Cav-1 și o varietate de căi de semnalizare, oferind noi ocazii de dezvoltare a unor terapii anti-tumorale ce ținesc Cav-1 și caveolele, atât în tumori primare cât și în cazul metastazelor.

Creșterea celulelor tumorale este reglată de câteva citokine ce acționează de manieră autocrină sau paracrină, prin urmare stimularea sintezei acelor citokine cu efecte citolitice poate determina, de asemenea, blocarea proliferării tumorale și chiar inducerea apoptozei celulelor tumorale. Două asemenea molecule, $INF\alpha$ și $INF\beta$ (interferon α și β), capabile să întârzie progresia tumorală, suferă o expresie deficitară, în particular în cazul gliomelor maligne, ca urmare a unei pierderi a informației genetice la nivelul brațului scurt al cromozomului 9. Celulele tumorale pot fi modificate cu ajutorul vectorilor virali sau plasmidelor ADN în sensul exprimării unei mari varietăți de gene, *in vivo* sau *in vitro*, care codifică pentru antigene tumorale, citokine sau molecule accesorii, fapt care poate crește imunogenitatea celulei tumorale și răspunsul imun al gazdei direcționat împotriva acestora. Este necesară continuarea studiilor pentru evaluarea interrelației funcționale între caveoline și markerii angiogenezei în tumorigeneza glioblastomelor, fapt ce va crea un interes major în descoperirea unor noi ținte terapeutice. Strategiile terapeutice utilizate în prezent în tumorile cerebrale, în special în cazul gliomelor maligne sunt aplicate diferențiat, fie în faze preclinice, *in vitro* sau experimental, fie în faze clinice și se alătură ca tratament adjuvant triadei clasice: chirurgie, radioterapie, chimioterapie. Orice tentativă de a descoperi noi modalități de abordare terapeutică a acestor entități patologice, tumorile cerebrale astrocitare maligne, reprezintă nouă speranță de a crește calitatea vieții celor care au suferit intervenții chirurgicale, un proces în înțelegerea și abordarea complexă a patologiei tumorale cerebrale. Aceste studii vor fi continuate în viitor, iar noi tehnici și metode de cercetare experimentală vor fi aplicate cu scopul final de a găsi metode terapeutice alternative în tratamentul tumorilor cerebrale prin cunoașterea unor aspecte complexe ale comportamentului celular tumoral *in vitro* sau chiar *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA LA AUTORI