
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Predictori pentru terapia personalizată a cancerului ovarian

Doctorand: **Andrea-Otilia Onisim**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Andrei Achimaș-Cadariu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

| | |
|---|----|
| INTRODUCERE | 1 |
| STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII | |
| 1. Dovezi epidemiologice și de cost-eficacitate a tratamentului în cancerul ovarian | 7 |
| 1.1. Cancerul ovarian din perspectiva epidemiologică actuală | 7 |
| 1.2. Aspecte economice și de cost-eficacitate în tratamentul cancerului ovarian | 8 |
| 2. Predictorii clinico-patologici în canceretele epiteliale ovariene | 11 |
| 2.1. Subtipul histologic | 11 |
| 2.2. Stadiul FIGO | 12 |
| 2.3. Volumul tumoral restant după chirurgia citoreductivă | 13 |
| 2.4. Markerii tumorali serologici | 13 |
| 2.5. Răspunsul la chimioterapia de linia I | 14 |
| 2.6. „BRCA-ness” | 15 |
| 2.7. Potențiali predictorii la nivelul tumorii și micromediului tumoral | 16 |
| 2.7.1. Predictorii angiogenici | 16 |
| 2.7.1.1. Densitatea microvasculară intratumorală | 16 |
| 2.7.1.2. Factorii proangiogenici | 16 |
| 2.7.1.3. Endotelinele | 17 |
| 2.7.2. Rolul componentei imune | 17 |
| 2.7.3. „Cancer-associated fibroblasts” | 18 |
| 2.8. Alți potențiali predictorii | 19 |
| 2.8.1. Moleculele de adeziune celulară | 19 |
| 2.8.2. Tranziția epitelial-mezenchimală | 20 |
| 2.8.3. „Cancer stem cells” | 21 |
| 3. Opțiuni terapeutice din perspectiva predictorilor clinico-patologici în canceretele epiteliale ovariene | 23 |
| 3.1. Chimioterapia neoadjuvantă | 23 |
| 3.2. Chimioterapia intraperitoneală | 24 |
| 3.3. Inhibitori ai angiogenezei | 25 |
| 3.4. „High-grade vs. low-grade” | 25 |
| 3.4.1. Aspecte terapeutice în carcinoamele seroase „high-grade” | 26 |
| 3.4.2. Aspecte terapeutice în carcinoamele seroase „low-grade” | 26 |
| 3.5. Chirurgia secundară | 27 |

| | |
|--|-----|
| CONTRIBUȚIA PERSONALĂ | |
| 1. Ipoteza de lucru/obiective | 31 |
| 2. Studiul 1 - Analiza rezultatelor și a cost-eficacității tratamentului primar al cancerului ovarian în regiunea de Nord-Vest a României | 33 |
| 2.1. Introducere | 33 |
| 2.2. Obiectiv | 34 |
| 2.3. Material și metodă | 34 |
| 2.4. Rezultate | 37 |
| 2.5. Discuții | 43 |
| 2.6. Concluzii | 47 |
| 3. Studiul 2 - Expresia nestinei și CD133 în carcinoamele seroase ovariene | 49 |
| 3.1. Introducere | 49 |
| 3.2. Ipoteza de lucru/obiective | 50 |
| 3.3. Material și metodă | 50 |
| 3.4. Rezultate | 54 |
| 3.5. Discuții | 74 |
| 3.6. Concluzii | 79 |
| 4. Studiul 3 - Rolul CD146 în carcinomul ovarian seros | 81 |
| 4.1. Introducere | 81 |
| 4.2. Ipoteza de lucru/obiective | 82 |
| 4.3. Material și metodă | 82 |
| 4.4. Rezultate | 86 |
| 4.5. Discuții | 98 |
| 4.6. Concluzii | 102 |
| 5. Concluzii generale | 103 |
| 6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei | 104 |
| REFERINȚE | 105 |

Cuvinte cheie: cancer ovarian epitelial, factori de prognostic, chirurgie citoreductivă, chimioterapie neoadjuvantă, angiogeneza, micromediul tumoral, celule stem tumorale.

INTRODUCERE

Cancerul ovarian se caracterizează prin cea mai mare letalitate dintre neoplaziile sferei ginecologice. Progresul tehnicilor chirurgicale și a tratamentelor sistemice a determinat o discretă îmbunătățire a supraviețuirii pacientelor în ultimii 25 de ani. Această rată crescută a mortalității se datorează în special diagnosticului bolii în stadii avansate, cu evoluție clinică marcată de recidive frecvente, în ciuda răspunsului inițial favorabil la tratamentul primar.

Până în prezent, în practica clinică, prognosticul pacientelor diagnosticate cu cancer ovarian este indicat de o serie de factori clinico-patologici ce reflectă caracteristici tumorale intrinseci (subtip histologic, grad de malignitate), legate de pacient (vârstă, status de performanță) sau de extensia bolii (stadiul FIGO). Acești factori, au un potențial predictiv pentru succesul tratamentului primar standard, se corelează cu riscul de recurență și cu supraviețuirea pacientelor diagnosticate cu carcinoame ovariene. Integrarea corectă a acestor factori prognostici justifică anumite strategii terapeutice alternative tratamentului standard.

Majoritare, cancerurile ovariene epiteliale reprezintă un grup heterogen de tumori, cu morfologie și modificări genetice distincte chiar în cadrul aceluiași subtip histologic. Pornind de la anumite trăsături moleculare, cercetările în domeniu urmăresc să evidențieze noi predictori pentru un comportament tumoral mai agresiv, pentru lipsa sau durată scurtă a răspunsului la chimioterapia convențională. Căile intricate, modulate de acești biomarkeri, pot corespunde unor teorii bine statuate legate de neoangiogeneza tumorală sau micromediul tumoral, sau unor ipoteze mai noi aferente tranziției epitelial-mezenchimale (EMT) sau celulelor stem canceroase (CSC). Majoritatea acestor biomarkeri nu au fost încă validați pentru utilizarea de rutină în practica clinică, din cauza dovezilor insuficiente. În mod contrar, prognosticul poate fi unul favorabil, cum este în cazul obiectivării unui fenotip „BRCAness” (dat în principal de prezența mutațiilor genelor supresoare tumorale BRCA1/2 sau de alte cauze de deficiență a recombinării omologe). Efectul poate fi unul predictiv pentru sensibilitatea la chimioterapia pe bază de platină, respectiv pentru activitatea unor terapii moleculare țintite, cum sunt inhibitorii PARP.

Pornind de la stadiul actual al cunoașterii, ne-am propus să punem în evidență caracteristicile clinico-patologice și rezultatele terapeutice în cazul carcinoamelor seroase ovariene diagnosticate în perioada 2006-2011, în cadrul Institutului Oncologic „Prof. Dr. Ion Chiricuță” Cluj-Napoca. Am urmărit să evaluăm valoarea prognostică a acestor caracteristici clinico-patologice și să identificăm noi factori de prognostic

pentru carcinoamele seroase ovariene, prin analizarea expresiei unor proteine, markeri ai CSC (nestina, CD133), respectiv molecule de adeziune celulară (CD146), implicate în modularea unor procese esențiale pentru progresia tumorală, precum neoangiogeneza și tranziția epitelial-mezenchimală (EMT). Validarea unor noi biomarkeri ar justifica abordarea individualizată a cazurilor, în funcție de caracteristici tumorale intrinseci și de prevalența anumitor căi implicate în invazia și progresia tumorală, cu potențiale implicații în managementul terapeutic al acestor paciente prin strategii personalizate, cu îmbunătățirea consecutivă a rezultatelor privind supraviețuirea.

Contribuția personală

Ipoteza de lucru/obiective

Managementul terapeutic primar al pacientelor diagnosticate cu cancer ovarian determină de cele mai multe ori prognosticul acestor paciente. Chirurgia citoreductivă optimală (RO) posedă cel mai important rol prognostic, cu impact semnificativ asupra supraviețuirii pacientelor cu cancer ovarian. Predominanța diagnosticului bolii în stadii avansate, reprezintă primul factor care poate împiedica realizarea unui debulking optimal, cu analizarea oportunității chimioterapiei neoadjuvante și a chirurgiei de interval.

În primul studiu din cadrul tezei ne-am propus să evaluăm retrospectiv cazurile de cancer ovarian diagnosticate și tratate în cadrul Institutului Oncologic „Prof.Dr. Ion Chiricuță” (IOCN) în decursul a patru ani (2008-2011). Principalul obiectiv stabilit a fost de a compara cele două strategii de tratament primar a cancerului ovarian (chirurgie primară de debulking urmată de chimioterapie adjuvantă versus chimioterapia neoadjuvantă, chirurgie de interval și chimioterapie postoperatorie), atât din perspectiva eficacității cât și a costurilor, în cadrul unei analize de cost-eficacitate.

Cunoscând aspectele de cost-eficacitate aferente tratamentului primar al cancerului ovarian, ne-am propus identificarea unor noi predictorii prin care să definim mai bine subgrupul de paciente cu prognostic rezervat, în vederea optimizării managementului terapeutic al pacientelor cu cancer ovarian avansat.

Al doilea, respectiv al treilea studiu din partea de cercetare, au urmărit să evalueze într-o manieră retrospectivă, observațională, anumite caracteristici clinico-patologice și impactul acestora asupra evoluției clinice a bolii. În cadrul celui de-al doilea studiu al tezei, am selectat un lot omogen de paciente cu stadii avansate de carcinoame seroase ovariene tratate și urmărite în cadrul IOCN și ne-am propus să analizăm rolul prognostic și impactul clinic dat de expresia unor markeri ai celulelor stem canceroase (nestina, CD133) la nivelul tumorilor primare ovariene. În cel de-al treilea studiu, am extins analiza și la stadiile incipiente de carcinoame seroase ovariene, pentru a obiectiva diferențe ale expresiei moleculei de adeziune celulară-CD146 la nivelul tumorilor primare, în legătură cu alte caracteristici clinico-patologice și cu supraviețuirea pacientelor. Punerea în evidență a unor factori de prognostic

nefavorabil reprezintă una din etapele esențiale, în perspectiva unei abordări terapeutice personalizate.

Studiul 1. Analiza rezultatelor și a cost-eficacității tratamentului primar al cancerului ovarian în regiunea de Nord-Vest a României

Obiectiv

În contextul unor dovezi limitate, provenind în principal din țări vestice, studiul de față și-a propus să evalueze costurile, supraviețuirea și cost-eficacitatea aferente celor două modalități de tratament primar (chirurgia citoreductivă primară versus chimioterapia neoadjuvantă), aplicate pacientelor cu cancer ovarian avansat, tratate într-un centru oncologic terțiar ce deservește populația din Regiunea de Nord-Vest a României.

Material și metodă

Populația finală de studiu a cuprins 186 de paciente diagnosticate cu cancer ovarian avansat (stadii IIIC/IV) în perioada perioada ianuarie 2008 - decembrie 2011, tratate în cadrul Institutului Oncologic „Prof. Dr. Ion Chiricuță” din Cluj-Napoca (IOCN) prin chirurgie citoreductivă, urmată protocolul standard de chimioterapie, Paclitaxel 175mg/mp + Carboplatin AUC5, administrat la 3 săptămâni, și cele la care s-a administrat chimioterapie neoadjuvantă ca secvență terapeutică inițială, urmată de chirurgie de interval și chimioterapie postoperatorie conform aceluiași protocol.

Am analizat supraviețuirea globală a pacientelor, costurile aferente fiecărei strategii de tratament primar (intervenție chirurgicală, tratament chimioterapic, cheltuieli de spitalizare) și am realizat o analiză de cost-eficacitate prin estimarea ratei de creștere a cost-eficacității (ICER – incremental cost-effectiveness ratio) și a ratei medii a cost-eficacității (ACER- average cost-effectiveness ratio).

Concluzii

1. Într-un lot reprezentativ de paciente cu cancer ovarian avansat, tratate în cadrul IOCN în perioada 2008-2011, chirurgia primară de debulking urmată de chimioterapie adjuvantă a fost strategia terapeutică predominantă; chimioterapia neoadjuvantă urmată de chirurgie de interval și chimioterapie postoperatorie a reprezentat o opțiune terapeutică doar pentru o treime dintre paciente.
2. Majoritatea pacientelor din lotul de studiu au prezentat stadiul FIGO IIIC, iar mediana vârstei pacientelor a fost 56 de ani.
3. S-a observat un trend crescător privind utilizarea chimioterapiei neoadjuvante pe parcursul perioadei studiate (2008-2011).
4. În grupul de paciente tratate prin chirurgie primară de debulking s-a notat o frecvență mai mare cu 10% a intervențiilor chirurgicale cu grad de complexitate ridicat, față de grupul tratat prin chirurgie de interval.

5. Ambele strategii terapeutice au demonstrat eficacitate similară. Supraviețuirea la 5 ani s-a situat între 30-40% în ambele grupe de tratament.
6. Costurile aferente tratamentului au fost mai mari în grupul tratat prin chimioterapie neoadjuvantă, comparativ cu grupul tratat prin chirurgie primară de debulking, cu un cost incremental de 590.22 €.
7. Chimioterapie neoadjuvantă s-a dovedit a fi o strategie terapeutică mai puțin cost-eficientă comparativ cu chirurgia primară de debulking la paciente cu cancer ovarian stadiul FIGO IIIC/IV.

Studiul 2. Expresia nestinei și CD133 în carcinoamele seroase ovariene

Obiective

Obiectivele cercetării de față au fost investigarea unor asocieri existente între expresia markerilor de celule stem canceroase (CSC), nestina și CD133, și anumiți parametri clinico-patologici, precum și potențialul impact asupra supraviețuirii pacientelor cu cancer ovarian avansat.

În plus, s-a urmărit validarea nestinei ca nou marker endotelial pentru estimarea neoangiogenezei tumorale prin determinarea concordanței cu microvasele tumorale CD34-pozitive.

Material și metodă

Populația de studiu a inclus 85 de paciente diagnosticate în perioada ianuarie 2006-noiembrie 2011 cu carcinoame ovariene seroase în stadiu avansat (stadiul FIGO III/IV), care au beneficiat de tratament standard primar efectuat în cadrul IOCN: chirurgie citoreductivă primară (optimală (R0), respectiv suboptimală, cu dimensiunea tumorilor restante sub 10 mm) și chimioterapie adjuvantă pe bază de platină.

Au fost evaluate caracteristici clinico-patologice precum: stadiul FIGO, gradul de malignitate, prezența ascitei și/sau a carcinomatozei peritoneale, nivelul seric inițial al antigenului CA125, protocoalele de chimioterapie utilizate, timpul până la progresia bolii, tipul de progresie (recidivă pelvină/ reșută peritoneală sau la distanță), răspunsul la chimioterapie cuantificat în funcție de intervalul de timp de la finalizarea tratamentului până la progresia bolii ("progression-free interval"- PFI).

Expresia nestinei și CD133 s-a analizat pe blocuri de parafină obținute prin tehnica tissue microarray (TMA) din zone reprezentative de la nivelul tumorilor primare ovariene, prin intermediul colorațiilor imunohistochimice obținute cu ajutorul anticorpilor monoclonali anti-CD133 (clona AC133, MACS Miltenyi Biotec, Germany) și anti-nestina (10c2, SC:23927, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, U.S.A).

În funcție de intensitatea colorației imunohistochimice și de procentul de celule pozitive, expresia nestinei a fost considerată pozitivă dacă mai mult de 30% din celulele tumorale au prezentat o intensitate a colorației moderată sau puternică,

respectiv pentru CD133 când mai mult de 10% din celulele tumorale au fost colorate moderat spre puternic. În caz contrar, cazurile au fost considerate cu expresie negativă pentru cei doi markeri.

Pe secțiunile de tissue microarray s-a cuantificat de asemenea densitatea microvasculară tumorală (MVD) prin numărarea microvaselor cu colorație pozitivă pentru CD34, respectiv pentru nestină, având în vedere expresia endotelială a acesteia la nivelul microvaselor din stroma tumorală.

Concluzii

1. În lotul de paciente cu stadii avansate de carcinoame seroase ovariene tratate prin chirurgie de debulking urmată de chimioterapie adjuvantă în cadrul IOCN, nivelul preoperator al CA125, chirurgia primară suboptimală și răspunsul la chimioterapie au fost singurii factori de prognostic independenți pentru supraviețuire.
2. Imunoreactivitatea la nivelul celulelor tumorale a celor doi markeri ai CSC investigați, nestina și CD133, s-a obiectivat în 49.4%, respectiv 24.7% dintre cazurile de carcinoame seroase ovariene analizate.
3. Expresia nestinei și CD133 la nivelul celulelor tumorale nu s-a asociat cu parametrii clinico-patologici evaluați în mod curent: vârstă, grad de malignitate, prezența/absența ascitei maligne sau a carcinomatozei peritoneale.
4. Pozitivitatea CD133 nu a avut un impact semnificativ statistic asupra supraviețuirii fără progresia bolii (PFS) sau a supraviețuirii globale (OS), chiar dacă mediana OS a fost mai mică cu 10 luni în grupul CD133-pozitiv.
5. Expresia nestinei la nivelul celulelor tumorale s-a dovedit a fi factor de prognostic independent atât pentru supraviețuirea fără progresia bolii (PFS) cât și pentru supraviețuirea globală (OS) a pacientelor.
6. Analizarea expresiei endoteliale a nestinei la nivelul microvascularizației tumorale, a relevat o densitate crescută a microvaselor nestin-pozitive în 40% din cazuri.
7. Nestina poate fi considerată un marker endotelial fiabil pentru cuantificarea angiogenezei tumorale, având în vedere concordanța cu densitatea microvasculară determinată prin expresia CD34.

Studiul 3. Rolul CD146 în carcinomul ovarian seros

Obiective

Prin acest studiu, ne-am propus să investigăm rolul prognostic al expresiei CD146 în carcinoamele seroase ovariene și un potențial rol predictiv, prin evaluarea impactului asupra supraviețuirii și a răspunsului la chimioterapie pe bază de platină, în relație cu alte caracteristici clinico-patologice.

Prin urmare, obiectivele studiului au fost:

- investigarea asocierilor existente între expresia CD146 la nivelul celulelor tumorale și parametrii clinico-patologici urmăriți: vârsta la momentul diagnosticului, stadiul FIGO, nivelul seric al CA125 preoperator, carcinomatoza peritoneală, ascita malignă, gradul de malignitate, tipul de reșută;
- impactul expresiei CD146 la nivelul celulelor tumorale asupra rezultatelor în termeni de supraviețuire fără progresia bolii (PFS) și supraviețuire globală (OS) a pacienților cu carcinoame ovariene seroase;
- posibilitatea predicției răspunsului la chimioterapia pe bază de platină în funcție de expresia CD146 la nivelul celulelor tumorale;
- evaluarea rolului CD146 ca biomarker endotelial pentru microvascularizația tumorală, prin raportare la densitatea microvasculară (MVD) determinată prin CD34.

Material și metodă

Populația de studiu a cuprins 102 paciente diagnosticate cu carcinoame seroase ovariene în perioada ianuarie 2006-noiembrie 2011, care au efectuat tratamentul primar în cadrul IOCN: chirurgie citoreductivă primară (optimală (RO), respectiv suboptimală, cu dimensiunea tumorilor restante sub 10 mm) și chimioterapie adjuvantă pe bază de platină. Au fost incluse atât stadii incipiente (FIGO I/II) cât și avansate de boală (FIGO III/IV).

Pentru realizarea obiectivelor propuse au fost colectate retrospectiv date cu privire la caracteristicile clinico-patologice ale pacienților: stadiul FIGO, gradul de malignitate, prezența ascitei și/sau a carcinomatozei peritoneale, nivelul seric inițial al antigenului CA125, timpul până la progresia bolii și tipul de progresie (recidivă pelvină/ reșută peritoneală sau la distanță), răspunsul la chimioterapia pe bază de platină cuantificat în funcție de intervalul de timp de la finalizarea tratamentului până la progresia bolii ("progression-free interval"- PFI).

Pe blocurile de parafină obținute prin tehnica tissue microarray (TMA) din zone reprezentative ale tumorilor primare ovariene, s-au realizat colorațiile imunohistochimice pentru determinarea expresiei CD146, utilizând anticorpul monoclonal primar de șoarece anti-CD146 uman (clone N 1238, NCL-CD146, MCAM, Novocastra Lypophilized, Leica Biosystems). S-a observat imunoreactivitatea CD146 la nivelul membranei celulelor tumorale, precum și la nivelul stromei tumorale, cu predilecție la nivelul celulelor endoteliale ale microvaselor tumorale. În funcție de intensitatea colorației și procentul de celulele tumorale imunoreactive, expresia CD146 la nivelul celulelor tumorale a fost considerată pozitivă în cazul în care mai mult de 10% din celulele tumorale au prezentat o colorație moderată sau intensă.

Densitatea microvasculară intratumorală (MVD) a fost cuantificată prin numărul de vase pozitive pentru CD34. S-a evaluat de asemenea expresia endotelială a CD146 prin identificarea zonelor hipervascularizate la nivel tumoral și numărarea microvaselor imunoreactive pentru CD146.

Concluzii

1. Analizarea specimenelor tumorale aferente pacientelor cu carcinoame seroase ovariene stadii incipiente și avansate, a evidențiat în aproximativ jumătate din cazuri o expresie membranară pozitivă a CD146 la nivelul celulelor tumorale.
2. Expresia moleculei de adeziune CD146 la nivelul celulelor tumorale a fost similară indiferent de vârsta pacientelor la momentul diagnosticului, nivelul seric properator al CA125, stadiul FIGO, prezența/absența ascitei maligne.
3. Pozitivitatea CD146 la nivelul citoplasmei celulelor endoteliale ale microvaselor tumorale și concordanța cu densitatea de microvase tumorale CD34- pozitive, confirmă rolul CD146 ca marker endotelial, util pentru cuantificarea angiogenezei tumorale.
4. Hiperexpresia CD146 la nivelul celulelor tumorale a fost mai frecventă în subgrupul de pacientele cu progresii rapide după chimioterapia adjuvantă pe bază de platină și s-a asociat semnificativ statistic cu un risc mai mare de rezistență la chimioterapie.
5. Independent de vârsta pacientelor sau stadiul bolii, expresia CD146 crescută la nivelul celulelor tumorale s-a asociat cu un impact negativ asupra supraviețuirii fără progresia bolii (PFS) și a supraviețuirii globale (OS), demonstrând un rol prognostic cert pentru OS.

Concluzii generale

1. Prin compararea celor două strategii de tratament primar pentru stadiile avansate de cancer ovarian, chirurgia primară de debulking urmată de chimioterapie postoperatorie versus chimioterapie neoadjuvantă urmată de chirurgie de interval, s-a observat o eficacitate similară, asociată însă cu un profil de cost-eficacitate în defavoarea chimioterapie neoadjuvante.
2. Dintre caracteristicile clinico-patologice evaluate de rutină la pacientele cu carcinoame seroase ovariene, nivelul preoperator crescut al CA125, volumul tumoral restant postoperator în cavitatea peritoneală și rezistența la chimioterapie, s-au asociat cu o supraviețuire redusă a pacientelor cu carcinoame seroase ovariene în stadiu avansat.
3. În urma analizei imunohistochemice a markerilor de celule stem canceroase evaluați, imunoreactivitatea nestinei la nivelul celulelor tumorale s-a dovedit a fi factor de prognostic independent, cu impact negativ atât pentru supraviețuirea fără progresia bolii (PFS) cât și pentru supraviețuirea globală (OS) a pacientelor.
4. Expresia pozitivă a moleculei de adeziune CD146 la nivelul celulelor tumorale, poate indica un risc mai mare de rezistență la chimioterapie, respectiv un risc mai mare de progresie a bolii și de deces.

5. Nestina și CD146 pot fi utilizați ca markeri endoteliali pentru cuantificarea angiogenezei tumorale, însă nivelul lor de expresie endotelială nu posedă o valoare prognostică semnificativă, conform rezultatelor noastre.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Pornind de la aspectele teoretice expuse în cadrul tezei cu privire la potențiali predictorii pentru individualizarea și personalizarea tratamentului cancerului ovarian epitelial, am urmărit să evaluăm două strategii terapeutice fezabile în stadiile avansate de boală (chimioterapia neoadjuvantă urmată de chirurgie de interval versus tratamentul standard, chirurgie primară de debulking urmată de chimioterapie adjuvantă) din punct de vedere al eficacității, dar și al costurilor tratamentului primar. Există puține studii care au comparat cele două modalități de abordare terapeutică din perspectiva cost-eficacității, dintre care și mai puține provin din țări ale Europei Centrale și de Est. Absența unor date publicate privind cost-eficacitatea tratamentului primar al cancerului ovarian în țara noastră, conferă originalitate acestei lucrări.

Cunoașterea aspectelor de cost-eficacitate aferente opțiunilor terapeutice disponibile, este indispensabilă pentru a optimiza managementul terapeutic al pacienților cu cancer ovarian avansat. În mod indirect, aceste informații sugerează necesitatea validării unor noi factori de prognostic, care să justifice anumite alternative terapeutice și alocarea unor resurse suplimentare pentru anumite subgrupuri de pacienți cu cancer ovarian.

Ținând cont că factorii de prognostic utilizați în mod tradițional nu pot prezice heterogenitatea comportamentului clinic al bolii și a răspunsului la tratamentul primar, am propus noi biomarkeri care se regăsesc în cadrul unor ipoteze de actualitate privind dezvoltarea și progresia tumorală a carcinoamelor seroase ovariene, cum sunt: teoria celulelor stem canceroase, tranziția epitelial-mezenchimală, neoangiogeneza. Această lucrare subliniază utilitatea desfășurării unor studii specifice pentru subtipuri histologice de cancer ovarian epitelial, având ca finalitate definirea unor grupe prognostice și identificarea unor potențiale ținte terapeutice.

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

Predictors of personalized therapy for ovarian cancer

Doctoral candidate: **Andrea-Otilia Onisim**

Doctoral supervisor: **Prof. Dr. Andrei Achimaș-Cadariu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

| | |
|---|----|
| INTRODUCTION | 1 |
| CURRENT STATE OF KNOWLEDGE | |
| 1. Epidemiological and cost-effectiveness evidence of treatment in ovarian cancer | 7 |
| 1.1. Ovarian cancer from the current epidemiological perspective | 7 |
| 1.2. Economic and cost-effectiveness aspects in the treatment of ovarian cancer | 8 |
| 2. Clinicopathological predictors in epithelial ovarian cancer | 11 |
| 2.1. Histological subtype | 11 |
| 2.2. FIGO stage | 12 |
| 2.3. Residual tumor volume after cytoreductive surgery | 13 |
| 2.4. Serum tumor markers | 13 |
| 2.5. Response to first-line chemotherapy | 14 |
| 2.6. BRCA-ness | 15 |
| 2.7. Potential tumor and tumor microenvironment predictors | 16 |
| 2.7.1. Angiogenic predictors | 16 |
| 2.7.1.1. Intratumoral microvessel density | 16 |
| 2.7.1.2. Proangiogenic factors | 16 |
| 2.7.1.3. Endothelins | 17 |
| 2.7.2. Role of the immune component | 17 |
| 2.7.3. Cancer-associated fibroblasts | 18 |
| 2.8. Other potential predictors | 19 |
| 2.8.1. Cell adhesion molecules | 19 |
| 2.8.2. Epithelial-mesenchymal transition | 20 |
| 2.8.3. Cancer stem cells | 21 |
| 3. Therapeutic options from the perspective of clinicopathological predictors in epithelial ovarian cancer | 23 |
| 3.1. Neoadjuvant chemotherapy | 23 |
| 3.2. Intraperitoneal chemotherapy | 24 |
| 3.3. Inhibitors of angiogenesis | 25 |
| 3.4. High-grade vs. low-grade | 25 |
| 3.4.1. Therapeutic aspects in high-grade serous carcinomas | 26 |
| 3.4.2. Therapeutic aspects in low-grade serous carcinomas | 26 |
| 3.5. Secondary surgery | 27 |

| | |
|---|-----|
| PERSONAL CONTRIBUTION | |
| 1. Working hypothesis/objectives | 31 |
| 2. Study 1 – Analysis of results and cost-effectiveness of primary treatment for ovarian cancer in the Romanian North-Western Region | 33 |
| 2.1. Introduction | 33 |
| 2.2. Objective | 34 |
| 2.3. Material and method | 34 |
| 2.4. Results | 37 |
| 2.5. Discussions | 43 |
| 2.6. Conclusions | 47 |
| 3. Study 2 – Nestin and CD133 expression in ovarian serous carcinomas | 49 |
| 3.1. Introduction | 49 |
| 3.2. Working hypothesis/objectives | 50 |
| 3.3. Material and method | 50 |
| 3.4. Results | 54 |
| 3.5. Discussions | 74 |
| 3.6. Conclusions | 79 |
| 4. Study 3 – The role of CD146 in ovarian serous carcinoma | 81 |
| 4.1. Introduction | 81 |
| 4.2. Working hypothesis/objectives | 82 |
| 4.3. Material and method | 82 |
| 4.4. Results | 86 |
| 4.5. Discussions | 98 |
| 4.6. Conclusions | 102 |
| 5. General conclusions | 103 |
| 6. Originality and innovative contributions of the thesis | 104 |
| REFERENCES | 105 |

Key words: epithelial ovarian cancer, prognostic factors, cytoreductive surgery, neoadjuvant chemotherapy, angiogenesis, tumor microenvironment, tumor stem cells

INTRODUCTION

Ovarian cancer is characterized by the highest lethality among gynecological neoplasms. The progress of surgical techniques and systemic treatments has led to a slight improvement in patient survival over the past 25 years. This increased mortality rate is mainly due to the fact that the disease is diagnosed at advanced stages, clinical evolution being marked by frequent recurrences, despite a favorable initial response to primary treatment.

To date, in clinical practice, the prognosis of patients diagnosed with ovarian cancer is indicated by a series of clinicopathological factors that reflect intrinsic tumor characteristics (histological subtype, degree of malignancy), characteristics related to patients (age, performance status) or to disease extension (FIGO stage). These factors have a predictive potential for the success of standard primary treatment, they are correlated with the recurrence risk and survival of patients diagnosed with ovarian carcinomas. The correct integration of these prognostic factors justifies certain therapeutic strategies alternative to standard treatment.

Being the most common type of ovarian cancer, epithelial ovarian cancers represent a heterogeneous group of tumors, with distinct morphology and genetic changes even within the same histological subtype. Starting from certain molecular features, studies in this area aim to highlight new predictors for a more aggressive tumor behavior, for the absence or short duration of response to conventional chemotherapy. The intricate pathways modulated by these biomarkers can correspond to well-founded theories regarding tumor neoangiogenesis or tumor microenvironment, or to more recent hypotheses related to epithelial-mesenchymal transition (EMT) or cancer stem cells (CSCs). The majority of these biomarkers have not yet been validated for routine use in clinical practice because of insufficient evidence. In a contrary manner, prognosis can be favorable, like in the case of the identification of a “BRCA-ness” phenotype (mainly induced by the presence of mutations in BRCA1/2 tumor suppressor genes or by other homologous recombination deficiency causes). The effect can be predictive for sensitivity to platinum-based chemotherapy, for the action of targeted molecular therapies such as PARP inhibitors, respectively.

Starting from the current state of knowledge, we aimed to evidence the clinicopathological characteristics and therapeutic results in the case of ovarian serous carcinomas diagnosed in the period 2006-2011 at the “Prof. Dr. Ion Chiricuța”

Oncology Institute Cluj-Napoca. We aimed to assess the prognostic value of these clinicopathological characteristics and to identify new prognostic factors for ovarian serous carcinomas, by analyzing the expression of some proteins, CSC markers (nestin, CD133) and cell adhesion molecules (CD146), respectively, involved in the modulation of essential processes for tumor progression, such as neoangiogenesis and epithelial-mesenchymal transition (EMT). The validation of new biomarkers would justify the individualized approach to cases, depending on intrinsic tumor characteristics and the prevalence of certain pathways involved in tumor invasion and progression, with potential implications in the therapeutic management of these patients by personalized strategies, with the consecutive improvement of survival outcomes.

Personal contribution

Working hypothesis/objectives

The primary therapeutic management of patients diagnosed with ovarian cancer most frequently determines the prognosis of these patients. Optimal cytoreductive surgery (R0) has the most important prognostic role, with a significant impact on the survival of patients with ovarian cancer. The predominance of diagnosis at advanced stages is the first factor that can prevent optimal debulking, with the analysis of the possibility of neoadjuvant chemotherapy and interval surgery.

In the first study of the thesis, we aimed to retrospectively assess the ovarian cancer cases diagnosed and treated at the “Prof. Dr. Ion Chiricuță” Oncology Institute (IOCN) over a period of four years (2008-2011). The main objective was to compare the two strategies for the primary treatment of ovarian cancer (primary debulking surgery followed by adjuvant chemotherapy versus neoadjuvant chemotherapy, interval surgery and postoperative chemotherapy), from the viewpoint of both effectiveness and costs, in a cost-effectiveness analysis.

Knowing the cost-effectiveness aspects involved by the primary treatment of ovarian cancer, we attempted to identify new predictors allowing to better define the subgroup of patients with reserved prognosis, in order to optimize the therapeutic management of patients with advanced ovarian cancer.

The second and the third study of the research aimed to evaluate in a retrospective observational manner certain clinicopathological characteristics and their impact on the clinical evolution of the disease. In the second study of the thesis, we selected a homogeneous group of patients with advanced stages of ovarian serous carcinomas treated and followed up at IOCN, and we attempted to analyze the prognostic role and the clinical impact of the expression of some cancer stem cell markers (nestin, CD133) in primary ovarian tumors. In the third study, analysis was extended to the early stages of ovarian serous carcinomas, in order to evidence differences in the expression of the cell adhesion molecule CD146 in primary tumors, in relation to other clinicopathological characteristics and patient survival. Evidencing

unfavorable prognostic factors is one of the essential stages of a personalized therapeutic approach.

Study 1. Analysis of results and cost-effectiveness of primary treatment for ovarian cancer in The North-Western Region of Romania

Objective

In the context of limited evidence, mainly provided by Western countries, this study aimed to evaluate costs, survival and cost-effectiveness related to the two modalities of primary treatment (primary cytoreductive surgery versus neoadjuvant chemotherapy) administered to patients with advanced ovarian cancer, treated in a tertiary cancer center for the Romanian North-Western Region population.

Material and method

The final study population included 186 patients diagnosed with advanced ovarian cancer (stages IIIC/IV) in the period January 2008 - December 2011, treated at the "Prof. Dr. Ion Chiricuță" Oncology Institute in Cluj-Napoca (IOCN) by cytoreductive surgery followed by the standard chemotherapy protocol, paclitaxel 175 mg/m² + carboplatin AUC5, administered at 3 weeks, versus neoadjuvant chemotherapy as the initial therapeutic sequence, followed by interval surgery and postoperative chemotherapy according to the same protocol. We analyzed overall patient survival, costs involved by each primary treatment strategy (surgery, chemotherapy, hospitalization costs), and we conducted a cost-effectiveness analysis by estimating the incremental cost-effectiveness ratio (ICER) and the average cost-effectiveness ratio (ACER).

Conclusions

1. In a representative group of patients with advanced ovarian cancer, treated at IOCN in the period 2008-2011, primary debulking surgery followed by adjuvant chemotherapy was the predominant therapeutic strategy; neoadjuvant chemotherapy followed by interval surgery and postoperative chemotherapy represented a therapeutic option only for one third of the patients.
2. The majority of the patients in the study group had stage FIGO IIIC, and the patients' median age was 56 years.
3. An increasing tendency of using neoadjuvant chemotherapy over the studied period (2008-2011) was observed.

4. In the group of patients treated by primary debulking surgery, there was a 10% higher frequency of surgical interventions with a high degree of complexity compared to the group treated by interval surgery.
5. Both therapeutic strategies demonstrated a similar efficiency. The 5-year survival rate was between 30-40% in both treatment groups.
6. Treatment costs were higher in the group treated by neoadjuvant chemotherapy compared to the group treated by primary debulking surgery, with an incremental cost of 590.22 €.
7. Neoadjuvant chemotherapy proved to be a less cost-effective therapeutic strategy compared to primary debulking surgery in patients with ovarian cancer stage FIGO IIC/IV.

Study 2. Nestin and CD133 expression in ovarian serous carcinomas

Objectives

The objectives of this study were to investigate the associations between the expression of cancer stem cell (CSC) markers, nestin and CD133, and some clinicopathological parameters, as well as their potential impact on the survival of patients with advanced ovarian cancer.

In addition, the study was aimed at validating nestin as a new endothelial marker for the estimation of tumor neoangiogenesis by determining its concordance with CD34-positive tumor microvessels.

Material and method

The study population included 85 patients diagnosed in the period January 2006 – November 2011 with advanced ovarian serous carcinomas (stage FIGO III/IV), who received standard primary treatment at IOCN: primary cytoreductive surgery (optimal (R0) and suboptimal, with a residual tumor size smaller than 10 mm) and platinum-based adjuvant chemotherapy.

The following clinicopathological characteristics were assessed: FIGO stage, degree of malignancy, presence of ascites and/or peritoneal carcinomatosis, initial serum level of CA125 antigen, chemotherapy protocols used, progression-free interval, type of progression (pelvic recurrence/peritoneal or distant metastasis), response to chemotherapy quantified depending on the progression-free interval (PFI).

Nestin and CD133 expression was analyzed in paraffin blocks obtained using the tissue microarray (TMA) technique from representative areas of primary ovarian tumors, by immunohistochemical staining obtained by means of anti-CD133 (AC133

clone, MACS Miltenyi Biotec, Germany) and anti-nestin (10c2, SC:23927, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, U.S.A) monoclonal antibodies.

Depending on the intensity of immunohistochemical staining and on the percentage of positive cells, nestin expression was considered positive if more than 30% of tumor cells were moderately or intensely stained, and CD133 expression was considered positive if more than 10% of tumor cells were moderately to intensely stained. Otherwise, expression was considered negative for the two markers.

In tissue microarray sections, tumor microvessel density (MVD) was also quantified by counting positively stained microvessels for CD34 and nestin, respectively, considering endothelial nestin expression in tumor stromal microvessels.

Conclusions

1. In the group of patients with advanced ovarian serous carcinomas treated by debulking surgery followed by adjuvant chemotherapy at IOCN, preoperative CA125 levels, suboptimal primary surgery and response to chemotherapy were the only independent prognostic factors for survival.
2. Tumor cell immunoreactivity for the two investigated CSC markers, nestin and CD133, was evidenced in 49.4% and 24.7%, respectively, of the analyzed ovarian serous carcinoma cases.
3. Nestin and CD133 expression in tumor cells was not associated with the currently assessed clinicopathological parameters: age, degree of malignancy, presence/absence of malignant ascites or peritoneal carcinomatosis.
4. CD133 positivity did not have a statistically significant impact on progression-free survival (PFS) or overall survival (OS), even if the median OS was 10 months shorter in the CD133-positive group.
5. Nestin expression in tumor cells proved to be an independent prognostic factor for both the patients' progression-free survival (PFS) and overall survival (OS).
6. The analysis of endothelial nestin expression in tumor microvessels revealed an increased density of nestin-positive microvessels in 40% of the cases.
7. Nestin can be considered a reliable endothelial marker for the quantification of tumor angiogenesis, taking into consideration its concordance with microvessel density determined based on CD34 expression.

Study 3. The role of CD146 in ovarian serous carcinoma

Objectives

In this study, we aimed to investigate the prognostic role of CD146 expression in ovarian serous carcinomas and its potential predictive role, by evaluating its impact on survival and response to platinum-based chemotherapy, in relation to other clinicopathological characteristics.

Consequently, the objectives of the study were:

- investigation of associations between CD146 expression in tumor cells and the monitored clinicopathological parameters: age at diagnosis, FIGO stage, preoperative serum CA125 level, peritoneal carcinomatosis, malignant ascites, degree of malignancy, type of recurrence;
- impact of CD146 expression in tumor cells on results in terms of progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in patients with ovarian serous carcinomas;
- possibility of predicting response to platinum-based chemotherapy depending on CD146 expression in tumor cells ;
- evaluation of the role of CD146 as an endothelial biomarker for tumor microvascularization, based on microvessel density (MVD) determined by CD34.

Material and method

The study population included 102 patients diagnosed with ovarian serous carcinomas in the period January 2006 – November 2011, who received primary treatment at IOCN: primary cytoreductive surgery (optimal (R0) and suboptimal, with a residual tumor size smaller than 10 mm) and platinum-based adjuvant chemotherapy. Both early stages (FIGO I/II) and advanced stages (FIGO III/IV) of the disease were included.

To achieve the proposed objectives, data were retrospectively collected regarding the clinicopathological characteristics of the patients: FIGO stage, degree of malignancy, presence of ascites and/or peritoneal carcinomatosis, initial serum level of CA125 antigen, progression-free interval and type of progression (pelvic recurrence /peritoneal or distant metastasis), response to platinum-based chemotherapy quantified depending on the progression-free interval (PFI).

In paraffin blocks obtained using the tissue microarray (TMA) technique from representative areas of primary ovarian tumors, immunohistochemical staining was performed in order to determine CD146 expression using the mouse anti-human CD146 primary monoclonal antibody (clone N 1238, NCL-CD146, MCAM, Novocastra Lyophilized, Leica Biosystems). CD146 immunoreactivity was observed in the tumor cell membrane as well as in the tumor stroma, particularly in tumor microvessel endothelial cells. Depending on the intensity of staining and the percentage of

immunoreactive tumor cells, CD146 expression in tumor cells was considered positive when more than 10% of tumor cells were moderately or intensely stained. Intratumoral microvessel density (MVD) was quantified based on the number of CD34-positive vessels. CD146 endothelial expression was also evaluated by identifying hypervascularized tumor areas and by counting microvessels immunoreactive for CD146.

Conclusions

1. The analysis of tumor samples from patients with early and advanced ovarian serous carcinomas evidenced in about half of the cases a positive CD146 expression in the tumor cell membrane.
2. The expression of the cell adhesion molecule CD146 in tumor cells was similar regardless of the patients' age at diagnosis, preoperative serum CA125 levels, FIGO stage, presence/absence of malignant ascites.
3. CD146 positivity in the endothelial cell cytoplasm of tumor microvessels and its concordance with CD34-positive tumor microvessel density confirm the role of CD146 as an endothelial marker, useful for the quantification of tumor angiogenesis.
4. CD146 overexpression in tumor cells was more frequent in the subgroup of patients with rapid progression following platinum-based adjuvant chemotherapy, and was statistically significantly associated with a higher risk of resistance to chemotherapy.
5. Independently of the patients' age or the disease stage, high CD146 expression in tumor cells was associated with a negative impact on progression-free survival (PFS) and overall survival (OS), demonstrating a definite prognostic role for OS.

General conclusions

1. By comparing the two primary treatment strategies for advanced stages of ovarian cancer, primary debulking surgery followed by postoperative chemotherapy versus neoadjuvant chemotherapy followed by interval surgery, a similar effectiveness was observed, which was, however, associated with a cost-effectiveness profile to the disadvantage of neoadjuvant chemotherapy.
2. Of the clinicopathological characteristics routinely assessed in patients with ovarian serous carcinomas, high preoperative CA125 levels, postoperative residual tumor volume in the peritoneal cavity and resistance to chemotherapy were associated with low survival of patients with advanced stage ovarian serous carcinomas.
3. Following immunohistochemical analysis of the evaluated cancer stem cell markers, nestin immunoreactivity in tumor cells proved to be an independent prognostic factor,

with a negative impact both on the patients' progression-free survival (PFS) and overall survival (OS).

4. The positive expression of the cell adhesion molecule CD146 in tumor cells can indicate a higher risk of resistance to chemotherapy, and a higher risk of disease progression and death.

5. Nestin and CD146 can be used as endothelial markers for the quantification of tumor angiogenesis, but their endothelial expression levels do not have a significant prognostic value, according to our results.

Originality and innovative contributions of the thesis

Starting from the theoretical aspects exposed in the thesis regarding potential predictors for the individualization and personalization of treatment for epithelial ovarian cancer, we aimed to assess two therapeutic strategies feasible in advanced disease stages (neoadjuvant chemotherapy followed by interval surgery versus standard treatment, primary debulking surgery followed by adjuvant chemotherapy) in terms of effectiveness, as well as primary treatment costs. There are few studies that have compared the two therapeutic approaches from the point of view of cost-effectiveness, and even fewer of these are Central and Eastern European studies. The absence of published data regarding the cost-effectiveness of primary treatment for ovarian cancer in Romania confers originality to this thesis. The knowledge of cost-effectiveness aspects related to the available therapeutic options is indispensable for optimizing the therapeutic management of patients with advanced ovarian cancer. Indirectly, this information suggests the need to validate new prognostic factors justifying certain therapeutic alternatives and the allocation of additional resources for certain subgroups of patients with ovarian cancer.

Taking into consideration the fact that traditional prognostic factors cannot predict the heterogeneity of the clinical disease behavior and of the response to primary treatment, we proposed new biomarkers that underlie current hypotheses regarding the development and progression of ovarian serous carcinomas, such as: the cancer stem cell theory, epithelial-mesenchymal transition, neoangiogenesis. This thesis highlights the usefulness of specific studies for histological subtypes of epithelial ovarian cancer, with the purpose of defining prognostic groups and identifying potential therapeutic targets.

