

DISCUSSIÓ.

DISCUSSIÓ

L'angiogènesi, o neoformació de vasos sanguinis a partir de vasos previs, és imprescindible per al desenvolupament de tot teixit en creixement. Les neoplàsies malignes, per a assolir un volum més enllà de 2 mm, requereixen dels vasos sanguinis de forma necessària. És fora de dubte des de fa anys el paper crucial de l'angiogènesi al càncer (Folkman 1990). No solament el procés angiogènic és fonamental per al creixement del tumor primari, sinó que també facilita l'arribada de les cèl.lules tumorals a la sang, i la posterior implantació perifèrica en forma de metàstasis.

L'angiogènesi no té només implicacions patogèniques, sinó terapèutiques. Un tractament antiangiogènic seria teòricament poc tòxic, a l'incidir sobre processos quasi exclusius dels teixits neoplàstics (recordem que l'angiogènesi és present en molt poques condicions fisiològiques, com la curació de ferides, l'embriogènesi i el cicle menstrual), i evitaria el creixement tant del tumor primari com de les metàstasis.

Per plantejar un tractament antiangiogènic és precís un coneixement acurat i exacte de tots els seus mecanismes reguladors. Tot i haver estat descrits ja un gran nombre d'aquests, de ben segur que en el futur anirem assistint al descobriment de molts d'altres. De moment i actualment, el VEGF és el factor angiogènic al que se li atribueix un major protagonisme entre els factors activadors del procés. Això ve avalat per un gran nombre de publicacions científiques, que defensen el seu paper fonamental al procés angiogènic i les grans possibilitats de ser emprat com a diana terapèutica antineoplàstica.

Dintre la cronologia del procés angiogènic tumoral, sempre hem pensat que un dels moments on l'angiogènesi és més rellevant és a l'eclipsi maligne: aquell moment on la neoplàsia deixa de ser pre-invasiva per transformar-se en invasiva. Que un tumor comenci a envair ve acompanyat d'un canvi fenotípic qualitatiu que li confereix noves capacitats; dintre d'aquestes capacitats, l'angiogènesi ha de ser fonamental, tal i com ho escriuen literalment Hanahan i Folkman (1996): "És simplement l'angiogènesi una conseqüència inevitable allà on nòduls de cèl.lules en proliferació aberrant esdevenen limitats en mida per la manca de vascularització? O, més aviat, és el control del "switch angiogènic" una part important del repertori de qualitats que un tumor en desenvolupament ha d'adquirir per a assolir l'èxit? L'evidència assenyala cada vegada més la darrera alternativa....".

Aquesta Tesi Doctoral s'ha centrat sempre en el principal factor angiogènic reconegut actualment, el VEGF. En primer lloc s'ha tractat d'avaluar el paper d'aquest factor a les fases incipients del desenvolupament tumoral al melanoma maligne, tant cutani primari humà com

humà xenoempeltat a ratolins atímics. Això ha estat així en continuïtat amb els resultats obtinguts prèviament per la nostra línia d'investigació, centrada sempre en el paper de l'angiogènesi al melanoma maligne, i que ha resultat en l'obtenció del grau de Doctor per al Dr. Joaquim Marcoval i Caus. Una de les conclusions fonamentals de la Tesi Doctoral del Dr. Marcoval, al trobar major angiogènesi en aquells melanomes malignes cutanis invasors respecte als melanomes en fase exclusivament radial, és que en el melanoma maligne cutani primari humà l'angiogènesi té un paper crucial a les fases incipients del desenvolupament tumoral, al pas de fase radial a vertical, és a dir al moment de l'eclipsi maligne. Ara hem volgut avaluar si el VEGF és el mediador molecular responsable del desenvolupament del fenotip angiogènic a les fases incipients del desenvolupament tumoral. Tal i com s'indica en els resultats i es comentarà més endavant, efectivament hem demostrat un paper del VEGF en aquestes fases inicials del desenvolupament tumoral al melanoma maligne, tant cutani primari humà com en un model animal.

En segon lloc, i a banda de demostrar el paper patogènic del VEGF a les fases incipients del desenvolupament tumoral al melanoma maligne, hem volgut veure què passava si modificàvem genèticament l'expressió de VEGF en una línia de melanoma humà i la xenoempeltàvem posteriorment a ratolins atímics. L'objectiu principal seria, òbviament, aconseguir una inhibició del creixement tumoral i de les metàstasis gràcies a un tractament antiangiogènic anti-VEGF. D'altra banda també és interessant veure el comportament biològic d'una línia de melanoma quan adquireix una capacitat angiogènica molt superior a la normal. Ja hem vist als resultats, i es comenta més àmpliament encabat, que l'adquisició d'un fenotip més angiogènic ha suposat en general un avantatge per al creixement dels tumors inoculats; tot i així, els tumors més angiogènics no han estat capaços de desenvolupar metàstasis amb més facilitat en aquest model i, el que és més important, la inhibició de l'angiogènesi mitjançant tractament genètic anti-VEGF no ens ha permès de frenar el creixement dels tumors inoculats. Així, i degut a la complexitat del fenomen angiogènic, no sembla que incidint sobre un sol factor aconseguim frenar el creixement tumoral. Aspirar a dominar un procés complicat com és l'angiogènic controlant només un dels seus factors reguladors s'intueix com a massa simplista.

1.- Valoració de l'angiogènesi i l'expressió del VEGF als melanomes cutanis primaris humans.

1.1.- Valoració de l'expressió del VEGF a melanomes malignes cutanis primaris.

Ja està descrita a la literatura mèdica l'expressió de VEGF al melanoma maligne, tant cutani primari (Bayer-Garner, 1999; Salven, 1997-II; Straume, 2001; Redondo, 2003) com metastàtic (Salven, 1997-II; Vlaykova, 1999; Straume, 2001; Redondo, 2003). Pràcticament tots els estudis examinen mitjançant immunohistoquímica melanomes inclosos en blocs de parafina, a l'igual que ho fem nosaltres.

Els diferents estudis descriuen que entre un 20 i un 98% de melanomes cutanis primaris expressen VEGF, al ser estudiats mitjançant immunohistoquímica. En el nostre cas, 8 de 53 melanomes cutanis primaris humans no expressaven VEGF. Així, un 84.9% dels nostres melanomes expressen VEGF, proporció clarament superior a d'altres estudis, exceptuant el de Straume i cols. El grau de quantificació de la immunotinció en el nostre estudi anava de 0 a 3 (7 melanomes grau 0, 18 melanomes grau 1, 16 melanomes grau 2, 4 melanomes grau 3). La presència de melanomes cutanis primaris que no expressen VEGF significa probablement que per al desenvolupament del fenotip angiogènic les cèl.lules de melanoma poden optar per altres factors angiogènics diferents al VEGF. Alternativament, dos grups de treball diferents descriuen mecanismes alternatius a l'angiogènesi tradicional que empren les cèl.lules de melanoma per arribar al torrent vascular: el primer grup (Leenders, 2002) ens parla de la “co-opció vascular” o aprofitament dels vasos sanguinis pre-existents per part del melanoma en un model animal de metàstasis cerebrals de melanoma; el segon grup (Maniotis 1999; Folberg 2000) descriu el “mimetisme vascular” o “vasculogenic mimicry”, mitjançant el qual el melanoma cutani primari genera estructures tridimensionals que funcionen com a vasos sanguinis, sense angiogènesi real.

Tots els nostres melanomes eren de baix risc (nivell de Breslow ≤ 1 mm). Això era així perquè els havíem pre-seleccionat, doncs ens ha interessat sempre estudiar l'angiogènesi a les fases inicials de la malaltia, moment on creiem que és més important. Malgrat l'estadi més temprà, la presència de 84.9% de positivitat per al VEGF contrasta amb els altres estudis, que no solament

troben un menor percentatge, sinó que habitualment examinen melanomes en estadis més avançats, i la majoria coincideixen a dir que aquells melanomes més primers expressen el VEGF encara amb menor freqüència. De tota manera, la nostra metodologia no era estrictament la mateixa que a d'altres estudis. Nosaltres destriavem dintre el melanoma aquelles zones on la immunotinció de les cèl.lules neoplàstiques era més intensa, comparant llavors el grau d'aquesta amb el grau d'immunotinció dels queratinocits; en canvi, d'altres estudis el que feien no era quantificar el grau d'immunotinció de les cèl.lules neoplàstiques comparant-lo amb els queratinocits, sinó que quantificaven el percentatge de cèl.lules neoplàstiques que expressaven VEGF, prescindint de si el grau de tinció era més o menys intens; nosaltres no vàrem contemplar-ho així. Malgrat tot, queda clar que nosaltres detectem una expressió de VEGF en els nostres melanomes major que a d'altres estudis, i més temprana, donant-li un especial valor al factor a les fases inicials del desenvolupament tumoral al melanoma maligne cutani primari.

1.2.- Quantificació de l'expressió de VEGF als melanomes malignes cutanis primaris a la fase radial / vertical.

A l'observar el valor de la immunotinció per al VEGF segons el nivell de Breslow, trobem una dada que crida molt l'atenció, i que considerem fonamental: els melanomes en fase radial, que són aquells que no han patit el canvi cap a l'eclipsi maligne, expressen menys VEGF, essent la diferència significativa amb el test exacte de Fisher ($p=0.002$) respecte a aquells melanomes que ja envaïxen. Aquest resultat ja ha estat publicat pel nostre grup (Marcoval, 1997), en un estudi on a més vàrem demostrar una major angiogènesi al melanoma cutani primari en el seu pas de fase radial a vertical. Erhard i cols. (1997), de forma simultània a nosaltres, va descriure les mateixes troballes, una major angiogènesi a la fase vertical respecte a la radial, i una major expressió de VEGF; de fet, als melanomes en fase radial ni tant sols vàren trobar VEGF. També posteriorment Bayer-Garner i cols. (1999) troben una menor expressió de VEGF mesurat immunohistoquímicament als melanomes en fase radial respecte als melanomes amb fase vertical.

No és el VEGF l'únic factor angiogènic on es troben aquestes dades. Per exemple, Reed i cols. (1994) troben, mitjançant Hibridació *in situ*, una baixa expressió de bFGF als melanomes *in situ*, comparat amb una expressió alta als melanomes invasors. Uns i altres estudis recolzen així la importància d'aquests factors al pas de fase radial a vertical al melanoma. Cal recordar que el

DISCUSSIÓ

bFGF i el VEGF actuen de forma sinèrgica com a activadors del procés angiogènic (Asahara, 1995).

El VEGF així seria habitualment absent o expressat de forma mínima en aquells melanomes malignes cutanis en fase radial. Aquests melanomes són indolents, i la seva extirpació suposa una probabilitat de curació gairebé del 100%. Això és així per la seva incapacitat de produir metàstasis. En el moment en què les cèl.lules neoplàstiques aconseguixin expressar el factor, aquest proporcionarà un microambient favorable, incrementant la permeabilitat vascular subjacent al melanoma, pre-requisit indispensable per al desenvolupament tumoral; a més, s'estimula l'angiogènesi directament per part del factor, i l'arribada de múltiples macromolècules importants per a la cascada metastàtica gràcies a l'increment de la permeabilitat. Fins i tot hipotèticament el VEGF podria estimular encara més el creixement de les cèl.lules de melanoma de forma autocrina en el cas que aquestes expressessin el receptor kdr, fenomen que s'ha descrit alguna vegada a la literatura mèdica (en concret a la línia de melanoma humà A375P i la seva derivada A375MM, per part de Liu i cols, el 1995).

1.3.- Expressió del VEGF al melanoma maligne cutani primari invasor segons el nivell de Breslow en melanomes de < 1 mm.

Una vegada el melanoma cutani ja és invasor, expressant més VEGF que a la fase radial, no per tenir un nivell de Breslow major expressarà més VEGF. És el que observem al Gràfic 4 dels resultats, on veiem que no hi ha diferències en les mitjanes del nivell de Breslow entre els grups amb diferent grau d'immunotinció per al VEGF. Això ens fa reafirmar en destacar el paper del VEGF al pas de la fase radial a vertical, perdent significació encabat en estadis més avançats de la malaltia. Salven i cols. (1997-II) no troben tampoc diferències en l'expressió immunohistoquímica del VEGF entre melanomes primaris primis i gruixuts. De tota manera no tots els autors hi estan d'acord: Bayer-Garner i cols. (1999) i Redondo i cols. (2003) troben que conforme augmenta el nivell de Clark o de Breslow s'incrementa també el percentatge d'immunotinció positiva per al VEGF, correlacionant així amb l'estadiatge del tumor primari, tot i que no fan cap estudi pronòstic.

Malgrat tot, el nostre estudi no anava dirigit cap a l'examen d'aquest aspecte: cap dels nostres melanomes primaris superava el nivell de Breslow de 1 mm. Així, no podem saber què haguéssim trobat en examinar melanomes més gruixuts, i de fet el que hem fet és comparar

nivells de Breslow amb poca diferència real. Possiblement en examinar melanomes cutanis primaris amb nivells de Breslow majors hauriem trobat diferències, tal i com les descriuen Bayer-Garner i cols. (1999).

1.4.- Relació entre l'expressió del VEGF i l'angiogènesi en els melanomes malignes cutanis primaris humans.

Al ser el VEGF el principal factor angiogènic conegut, és coherent la idea que el seu grau d'expressió correlacioni amb un major grau d'angiogènesi. La tendència ha estat així amb els graus més baixos d'immunotinció per al VEGF, però aquesta tendència es trenca amb els graus més alts de VEGF. Així, no hi ha una correlació positiva entre grau d'immunotinció per al VEGF i angiogènesi mesurada amb el nombre de vasos a la base ni amb l'índex angiogènic (raó entre nombre de vasos a la base del tumor respecte al nombre de vasos a la pell normal adjacent) en el nostre estudi (Gràfics 5 i 6).

Podem trobar a la literatura mèdica diferents resultats en aquest aspecte. Salven i cols. (1997-I) treuen uns resultats similars als nostres: no troben relació entre la densitat microvascular mesurada mitjançant anticossos anti-CD 31 o anti-Factor VIII i l'expressió immunohistoquímica de VEGF al melanoma cutani primari. Vlaykova i cols. (1999), en canvi, troben que l'expressió de VEGF correlaciona amb l'angiogènesi i amb el pronòstic al melanoma, però en aquest cas metastàtic. No podem establir un paral·lelisme entre els estudis de Vlaykova i els nostres, doncs no és el mateix un melanoma primari que un melanoma metastàtic. L'únic estudi similar al nostre és el de Salven i cols., i els resultats són paral·lels.

Per a explicar-s'ho Salven i cols. pensen, com nosaltres, que probablement tingui a veure amb el complex equilibri entre diversos factors, pro i anti-angiogènics, que delimiten el balanç final; cada tumor particular tindria el seu "perfil angiogènic", en el que no sempre el VEGF serà el principal o l'únic protagonista. També hipotetiza un presumpte paper de la hipòxia, que ja sabem que estimula la síntesi de VEGF: en aquells melanomes més vascularitzats, el baix grau d'hipòxia inhibiria la síntesi del factor, i en els poc vascularitzats passaria el fenomen invers, de

DISCUSSIÓ

manera que es llimarien les diferències d'expressió del factor. Recordem que la hipòxia és el principal factor regulador *in vivo* de l'expressió de VEGF.

1.5.- Expressió del VEGF a d'altres lesions melanocítiques.

Paral·lelament, hem investigat l'expressió de VEGF a lesions melanocítiques en diferents estadis de progressió, des de nevi melanocítics fins a metastàsis de melanoma. La hipòtesi inicial era que trobaríem poc o gens VEGF a les lesions benignes, i molt a les metastàtiques, d'acord amb el fet que el VEGF és un pressumpte protagonista de la progressió tumoral al melanoma, i en consonància amb d'altres estudis (Bayer-Garner, 1999; Salven, 1997-II).

Hem observat, com ja es comenta anteriorment, que el VEGF s'expressa menys i en menor grau als melanomes en fase radial que a la resta de melanomes. Estudiada l'expressió de VEGF a metastàsis ganglionars i cutànies de melanoma, el grau d'expressió no difereix entre aquestes i el melanoma cutani primari invasor. Mitjançant la prova del test exacte de Fisher, no hi ha hagut mai diferències significatives. És a dir, una vegada el melanoma ha donat ja el pas cap el fenotip invasiu, l'expressió de VEGF ja no difereix entre fase vertical i metastàsis, tant ganglionars com cutànies, restant valor al factor individual, i reforçant la teoria del paper de múltiples factors, o bé podem assumir que a partir de certs estadis en la progressió tumoral el creixement del tumor ja no depèn de posteriors increments en la vascularització.

Als nevi melanocítics sense displàsia melanocítica hem trobat també, de forma inesperada, una major expressió de VEGF, comparable amb la trobada a les metastàsis cutànies i ganglionars de melanoma. Mitjançant el test exacte de Fisher no s'han demostrat diferències en l'expressió de VEGF entre els nevi melanocítics i les lesions metastàtiques ni els melanomes invasors. És més, al sotmetre a comparació estadística el grau d'expressió de VEGF entre els melanomes cutanis primaris en fase radial i els nevi melanocítics, l'expressió ha estat superior als nevi ($p=0.012$, test exacte de Fisher).

Altres grups de treball també s'han adreçat a l'estudi de la diferent expressió immunohistoquímica del VEGF en les proliferacions melanocítiques en diferents estadis de

progressió (Barksdale, 1996; Salven, 1997-II; Bayer-Garner, 1999; Vlaykova, 1999), coincidint tots ells en defensar una major expressió del factor conforme es progressa en el fenotip maligne, de manera que al melanoma metastàtic troben una expressió de VEGF intensa i gairebé universal, i en canvi als nevi melanocítics l'expressió de VEGF seria absent. Això contrasta amb els nostres resultats: no trobem més VEGF a les metàstasis de melanoma, i tampoc trobem menys VEGF a les lesions melanocítiques benignes.

Sobta el resultat d'una gran expressió de VEGF en els nevi melanocítics doncs seria previsible, com a d'altres estudis, que el VEGF ni tan sols s'expressés. Potser en aquest cas el factor jugaria un paper en el manteniment del trofisme dels melanocits. O potser una hipòxia relativa provocada pel creixement del nevus melanocític, tot i ser benigne, estimularia la síntesi del factor. Inclús podem argumentar la hipòtesi de l'eventual presència d'algun factor inhibidor de l'angiogènesi que, en equilibri amb el VEGF, domini a aquest, impedit així l'estímul angiogènic i una possible progressió.

Probablement la major o menor expressió de VEGF no podrà explicar per sí sola el diferent estadi tumoral, intervenint-hi altres múltiples factors, angiogènics, anti-angiogènics, o simplement no angiogènics al desenvolupament tumoral del melanoma maligne. Dintre el "perfil angiogènic" de les proliferacions melanocítiques, benignes i malignes, el VEGF potser no deixa de ser una citocina més. Podem fer referència, per exemple, a Lázár-Molnár i cols. (2002), que descriuen en una revisió de melanoma la presència de 6 factors autocrins i 8 paracrins (entre els quals el VEGF) coneguts.

En resum, i d'acord amb els nostres resultats, el VEGF juga un paper al melanoma maligne cutani primari al pas de la fase radial a vertical, essent això suggestiu del paper del factor a l'eclipsi maligne. No és al melanoma a l'única neoplàsia on es demostra el probable paper del VEGF al pas de la fase pre-invasiva a invasiva: Obermair i cols. (1997) ho demostren a la neoplàsia cervical intraepitelial; Ferrer i cols. (1997), al comparar hiperplàsies benignes de pròstata amb càncer de pròstata; Denhart i cols. (1997), al comparar carcinoma escatós oral i laringi amb displàsies severes i amb mucosa normal o reactiva; Hanrahan i cols. (2003) en l'evolució d'adenoma a carcinoma de còlon. Més tard, el balanç entre factors pro i anti-angiogènics faria perdre la importància del VEGF com a únic factor en els diferents estadis de la cascada metastàtica.

2.- Valoració del creixement tumoral, angiogènesi i expressió de VEGF als tumors desenvolupats als ratolins atímics inoculats amb les línies de melanoma humà A375P i A375MM no modificades genèticament, coinjectades o no amb Matrigel.

La línia A375P (ATCC CRL 1619) va ser establerta el 1973 cultivant *in vitro* extractes cel·lulars a partir de melanomes humans (Giard, 1973). La línia A375MM la varem obtenir Kozlowski i cols (1984-I) a partir de la A375P, en concret a partir de la mescla d'extractes de les metàstasis pulmonars produïdes per la injecció endovenosa de la A375P a ratolins atímics (Kozlowski l'anomenarà A375MM: A375 Met-Mix); la línia A375MM obtinguda així té un comportament més agressiu que la seva predecessora, ja no per una major capacitat de creixement del tumor primari, sinó per la major capacitat de generar metàstasis, tant espontànies (inoculant prèviament les línies de forma intradèrmica o subcutània) com induïdes (per la injecció endovenosa) a ratolins atímics; tal i com descriu el mateix Kozlowski, en aquestes línies tumorals existeix una certa heterogeneïtat cel·lular. En el nostre cas les varem obtenir cedides per gentilesa del Professor Ian Hart (London).

S'ha descrit l'expressió de VEGF per part d'aquestes línies, i inclús s'hi ha descrit la presència del receptor per al VEGF VEGFR-2 o kdr (Liu, 1995), podent pressuposar així un probable paper autocrí del factor en elles.

2.1.- Valoració del creixement dels tumors desenvolupats.

El Matrigel és un complex proteic constituït per elements propis de les membranes basals, del que es coneix que afavoreix el creixement i supervivència tumorals. Està constituït per laminina, col·lagen IV, proteoglicans i entactina. És líquid a 4°C i forma un gel sòlid a 37°C (Fridman, 1991). Va ser ideat inicialment per resoldre un problema freqüent: la manca de creixement de tumors humans xenoempeltats a ratolins, tot i ésser aquests immunodeprimits. La coinjecció de Matrigel amb diverses línies tumorals promou el creixement tumoral, multiplicant el volum dels tumors fins a un factor de 5 a 10 respecte als controls quan és inoculat a ratolins atímics (Fridman, 1991).

En el nostre estudi el Matrigel, com era previsible, ha estimulat el creixement tumoral quan ha

estat coinjectat amb les línies de melanoma humà A375P i A375MM, amb un factor de multiplicació del diàmetre tumoral de 2 a 4 segons el moment. A la línia A375MM, i mitjançant la prova t de Student, aquest efecte estimulador del Matrigel ha assolit diferències significatives ($p=0.002$); no ha estat així a la línia A375P ($p=0.242$), tot i que la tendència sembla clara. La taxa de creixement tumoral ha estat paral·lela a la dels tumors inoculats sense Matrigel, però sempre per damunt, com es pot observar als Gràfics corresponents dels resultats (Gràfics 8 i 9). Malgrat tot, la injecció de les línies tumorals A375P i A375MM soles també genera tumors a la majoria de casos, motiu pel que no necessitem de l'estímul afavoridor del creixement tumoral per part del Matrigel en els nostres experiments posteriors amb aquestes línies.

2.2.- Valoració de l'angiogènesi als tumors desenvolupats.

Ens ha interessat comptabilitzar si hi ha una diferent angiogènesi entre ambdues línies, que pogués justificar el seu diferent potencial metastàtic. Una major capacitat angiogènica per part de la línia A375MM justificaria el seu major potencial metastàtic.

De tota manera, com es comenta als resultats, l'angiogènesi era tan massiva que no era possible fer un comptatge morfològic fiable mitjançant la immunotinció per al Factor VIII: al valorar els camps al microscopi el gran nombre de vasos i llurs interconnexions impossibilitaven el comptatge fiable, tornant-se la valoració excessivament subjectiva inter i inclús intra-observador. Altres estudis resolen aquest problema mitjançant diversos programes informàtics dels que no disposem (Westphal, 1997). Previsiblement, el moment ideal per operar els tumors xenoempeltats per detectar diferències en l'angiogènesi seria en una fase molt temprana, aquella on el tumor es comença tot just a vascularitzar, on la mínima hipòxia encara no ens ha modificat l'expressió de VEGF per part de les línies i on l'estímul angiogènic encara depèn en gran mesura de les capacitats estimuladores intrínseques de les pròpies línies. Segurament arribem massa tard, tot i tractar d'intervenir el tumor de seguida que es detecta clínicament, i el fenomen angiogènic s'ha disparat en tots els casos fent-se massiu i no mesurable amb la nostra metodologia.

2.3.- Valoració de la presència de VEGF als tumors desenvolupats.

Abans de manipular-les genèticament, cal comprovar que efectivament les nostres línies

DISCUSSIÓ

expressen VEGF, tot i estar ja descrit prèviament a la literatura mèdica (Liu, 1995). Donada l'heterogeneïtat en aquestes línies descrita per Kozlowski i cols. (1984-I), cal considerar abans de començar la possibilitat d'una eventual pèrdua d'expressió del factor, tot i que això és molt poc probable (quasi tots els tumors allà on es busca es troba, el VEGF).

Com ja hem vist als resultats, efectivament les línies A375P i A375MM expressen VEGF, i aquest és detectable mitjançant tècniques immunohistoquímiques. L'expressió és present a tots els casos sense excepció, amb un grau d'immunotinció d'entre 1 i 3 a tots els espècimens examinats.

El grau d'expressió *in vivo* de VEGF és alt i constant en ambdues línies. Això ens demostra homogeneïtat en elles, almenys en aquest aspecte. No hem trobat dades a la literatura mèdica sobre expressió immunohistoquímica de VEGF en aquestes línies *in vivo* xenoempeltades a ratolins atímics. El seu grau alt d'immunotinció ens pot assenyalar una major capacitat de creixement i metastàtica, a l'igual que el grau alt d'immunotinció per al VEGF als melanomes cutanis invasors i als melanomes humans metastàtics, i de forma diferent al grau baix d'immunotinció i baixa capacitat metastàtica dels melanomes malignes cutanis primaris en fase de creixement radial. L'homogeneïtat d'immunotinció en tots els tumors desenvolupats als ratolins ens donen la seguretat que la línia produeix VEGF de forma constant i que és adequada per a les posteriors fases de l'estudi.

2.3.1.- Relació entre la coinjecció amb Matrigel i l'expressió de VEGF als tumors desenvolupats.

El Matrigel és un complex proteic que afavoreix el creixement i supervivència tumoral; coinjectat amb diferents línies tumorals a ratolins atímics, aconseguix que creixin tumors que no haurien reeixit si haguéssin estat inoculats aïlladament, o bé que multipliquin la seva taxa de creixement per un factor de 5 a 10 (Fridman, 1991). No queda clar el mecanisme d'acció mitjançant el qual el Matrigel afavoreix el creixement tumoral. Per a alguns, potencia el creixement al crear un microambient adequat i al protegir físicament el tumor de la immunitat de l'hoste, a més de proporcionar una major concentració de factors de creixement, que no poden difondre amb facilitat fora del tumor. Bonfil i cols. (1994) defensen que el Matrigel pot potenciar el creixement tumoral mitjançant l'estimulació de l'angiogènesi, al demostrar una major presència de vasos al coinjectar diferents línies tumorals amb Matrigel sobre ratolins atímics i

SCID, i l'estímul generador de vasos sanguinis a l'inocular Matrigel sol. La injecció del Matrigel als ratolins, coinjectat o no amb cèl.lules tumorals, provoca una invasió paulatina del complex proteic a partir de la seva perifèria, els primers dies per part de cèl.lules inflamatòries mononuclears, seguit encabat per una barreja entre cèl.lules inflamatòries i fibroblàstiques, a continuació es van generant cordes fibroblàstiques, amb o sense llum, radiant des de la perifèria fins al centre del Matrigel, i apareixent finalment llums vasculars i hematies dintre el complex proteic.

No hem pogut demostrar una major angiogènesi en els tumors coinjectats amb Matrigel, doncs el nombre de vasos era incomptable, com s'ha comentat abans. També hem tractat de correlacionar l'efecte estimulador del creixement tumoral per part del Matrigel amb l'expressió del VEGF, no trobant-hi una relació ($p=1.0$) (Gràfic 10 dels resultats).

Així, podem concloure que el VEGF no és el mediador molecular mitjançant el qual el Matrigel procedeix a estimular l'angiogènesi i creixement tumorals al melanoma maligne xenoempeltat a ratolins atímics. El fet que el VEGF no sigui el mediador molecular mitjançant el qual el Matrigel estimula l'angiogènesi, ens recorda que probablement mai un sol factor justificarà tots els fenòmens angiogènics: aquest és un procés multifactorial, i el VEGF en pot ser un protagonista principal, però no l'únic ni l'exclusiu.

2.3.2.- Valoració de la diferent expressió de VEGF entre ambdues línies tumorals de melanoma, A375P i A375MM, als tumors desenvolupats.

A més de demostrar la presència de VEGF a les nostres línies, calia plantejar-se si el diferent comportament biològic entre ambdues (major agressivitat per part de la A375MM) (Kozlowski 1984-I; Kozlowski, 1984-II) podria justificar-se per una major capacitat angiogènica, i si aquesta podria venir mitjançada pel VEGF.

Al quantificar immunohistoquímicament la presència de VEGF en ambdues línies, comprovem que no hi ha diferències en l'expressió del factor ($p=0.433$, Gràfic 11 dels resultats). Així, tot i que a d'altres línies tumorals, alguna d'elles de melanoma, una major agressivitat és associable a una major expressió de VEGF (Westphal, 1997; Pötgens, 1995-II), la major capacitat metastàtica de la línia A375MM no ve mitjançada pel VEGF.

Ja hi ha d'altres estudis que reflexen diferències entre les dues línies, que justifiquen una major agressivitat de la A375MM respecte a la A375P. Hendrix i cols. (1987) demostren una major capacitat de la MM respecte a la P de degradar materials similars a membrana basal reconstituïda,

DISCUSSIÓ

fenomen aquest que ve associat a una major capacitat d'invasió local i metastàtica per part d'una neoplàsia; Gehlsen i cols. (1992), per la seva part, associen la major capacitat metastàtica de la línia A375MM a una diferent expressió de certes integrines.

2.3.3.- Relació entre l'expressió de VEGF i el moment del desenvolupament tumoral.

Allà on l'angiogènesi és fonamental i determinant és a les fases inicials de la progressió tumoral, sobretot al moment de l'eclipsi invasor (Hanahan, 1996). En aquest experiment hem tractat d'investigar això.

No ens era possible crear un model experimental imitant al melanoma *in situ* i microinvasor. La millor manera d'aproximar-nos era extraient alguns tumors xenoempeltats de seguida que fossin detectables, per tractar d'arribar a les fases més incipients del desenvolupament tumoral, i quantificar l'expressió de VEGF en aquests. Cal fer el comentari que inclús en aquests tumors tan petits i operats de manera tan incipient, l'angiogènesi era ja massiva.

Tot i que el nombre de ratolins emprats en aquest experiment ha estat molt petit, hem trobat ja una tendència a una major expressió de VEGF en aquells tumors més petits i operats més aviat. Mitjançant el test exacte de Fisher, hem trobat significació en aquells tumors més petits ($p=0.03$), i una tendència, tot i que no significativa, en aquells tumors operats més tempranament ($p=0.295$) (Gràfics 12 i 13 dels resultats). En podem fer la lectura que el VEGF és més important en aquest moment, a les "fases inicials" del desenvolupament tumoral, entenent que aquests tumors més petits estan en fases més inicials de la progressió (tot i que això es podria considerar discutible: són tumors petits, amb menor nombre de cèl.lules, però probablement ténen ja tota la maquinària molecular per a créixer i desenvolupar les metàstasis). Quan el tumor és més gran, deixa ja de dependre d'un sol factor, i per això trobem menor expressió de VEGF. La hipòxia no pot explicar per què trobem més VEGF en aquests estadis més temprans, doncs sempre hi ha un cert grau d'hipòxia *in vivo*, que persisteix o inclús s'incrementa als tumors més grans. Probablement, per tractar d'explicar-nos-ho, haurem altra vegada d'accedir a la hipòtesi del paper de múltiples altres factors coneguts i no coneguts, que guanyen terreny al VEGF en els estadis més avançats de la progressió tumoral.

De fet, i subjectivament, sempre tenim la impressió que arribem "massa tard" a l'hora d'investigar el tumor; si encara fos operat més aviat, probablement trobaríem més diferències en

l'expressió del VEGF, d'acord amb la hipòtesi del paper principal d'aquest a l'inici del desenvolupament del tumor.

En resum, els nostres experiments amb la injecció de línies de melanoma no modificades a ratolins atímics recolzen novament el paper del VEGF a les fases precoces del desenvolupament tumoral, per la seva major expressió en aquests moments, de la mateixa manera que ens passava en els melanomes malignes cutanis primaris humans al pas de la fase radial a fase vertical. Posteriorment, el paper jugat per altres factors restarà importància al paper del VEGF a la cascada metastàtica.

3.- Anàlisi de l'efecte de la modificació genètica de l'expressió de VEGF mitjançant transfecció del cDNA del factor en sentit i antisentit sobre les dues línies de melanoma humà A375P i A375MM xenoempeltades a ratolins atímics.

3.1.- Avaluació de la influència del tractament genètic sobre el volum tumoral als primers estadis de desenvolupament tumoral.

Tots els tumors petits van ser inoculats i posteriorment intervinguts simultàniament (6 dies després de ser inoculats a la línia A375P, 5 dies post-inoculació a la A375MM), i es van observar diferències en la seva mida.

A la línia A375P, el creixement dels tumors desenvolupats amb la transfecció amb el cDNA del VEGF en sentit era clarament superior respecte als controls, assolint diferències significatives amb la prova U de Mann-Whitney, tant mesurant els diàmetres dels tumors externament (pre-operatori) com internament (post-operatori) (control versus A375P S-4 A, $p=0.018$; control versus A375P S-7 A, $p=0.005$) (Gràfics 18 i 19). A la mateixa línia A375P, els tumors amb la transfecció amb el factor en antisentit manifestaven la tendència a un menor creixement respecte al control, tot i no assolir diferències significatives (control versus A375P AS-7 B, $p=0.053$; control versus A375P AS-15 A, $p=1.000$) (Gràfics 20 i 21).

A la línia A375MM, tornava a passar quelcom similar a les línies transfectades en sentit, en forma d'un major creixement respecte al control, amb diferències significatives (control versus

DISCUSSIÓ

A375MM S-3, $p=0.005$; control versus A375MM S-8 A, $p=0.040$) (Gràfics 22 i 23). Novament també, el tractament amb la transfecció en antisentit no assolía aquestes diferències, i inclús la tendència aquí era a un major creixement en aquells clons transfectats en antisentit respecte al control (control versus A375MM AS-2, $p=0.072$; control versus A375MM AS-4, $p=0.122$) (Gràfics 24 i 25).

Així, l'angiogènesi té influència en el que podem considerar primers estadis de desenvolupament tumoral, doncs la major expressió de VEGF induïda per la transfecció del factor en sentit dóna una major capacitat de creixement del tumor primari xenoempeltat.

A banda de la demostració patogènica de l'angiogènesi a la potenciació del creixement tumoral als primers estadis, pretenem també aconseguir un benefici terapèutic si és possible de la inhibició d'aquesta. Això no és així a cap de les dues línies: la transfecció del cDNA del VEGF en antisentit en ambdues línies tumorals no aconsegueix inhibir el creixement dels tumors desenvolupats a les fases inicials del creixement tumoral, tot i haver-hi una tendència a la A375P. Aquest efecte estimulador del creixement tumoral mitjançant la transfecció del VEGF en sentit ve d'acord amb les àmplies descripcions a la literatura mèdica que ja hem anat comentat sobre el paper de l'angiogènesi en general al pas de la fase pre-invasiva a invasiva, i la importància del VEGF en particular en aquest moment de desenvolupament tumoral.

El VEGF és el principal factor angiogènic conegut actualment. De fet, molts altres factors descrits com a angiogènics en són de forma indirecta, i el que fan és augmentar la síntesi de VEGF. El VEGF estimula el creixement dels endotelis, afavorint una major arribada de nutrients al tumor, i té a més un efecte incrementador de la permeabilitat vascular, necessari per a l'angiogènesi tumoral, a l'afavorir l'arribada d'altres mediadors que no podrien travessar en condicions normals l'endoteli. L'estímul productori de VEGF provocat per la nostra transfecció del cDNA del factor en sentit produiria una major activació de tots aquests fenòmens, afavorint així el creixement tumoral. Inclús la presència del receptor per al VEGF kdr en aquestes línies demostrada per part de Liu i cols. (1995) podria generar a més un estímul autocrí afegit. També podem fer notar l'efecte antiapoptòtic que té el VEGF sobre alguns tipus cel.lulars tumorals (Harmey, 2002).

El tractament amb la transfecció del cDNA del VEGF en antisentit no aconsegueix inhibir significativament el creixement dels tumors xenoempeltats a les fases inicials del desenvolupament tumoral respecte a la transfecció control. La transfecció de material genètic estrany a una cèl.lula podria eventualment limitar la seva capacitat proliferativa, i justificar diferències al creixement trobades *in vivo*; de tota manera, aquest no sembla ser el cas doncs es va valorar al laboratori la corba de creixement *in vitro* de totes les línies, no trobant-hi diferències.

Li i cols (2000) demostren, en un model murí amb finestra en plec cutani de l'esquena, la presència d'angiogènesi quan hi ha només de 60 a 80 cèl.lules tumorals; 100-300 cèl.lules tumorals són ja capaces de generar vasos sanguinis funcionals. Nosaltres sempre hem recolzat el paper de l'angiogènesi a les fases incipients de la malaltia; amb el nostre model, intentem imitar el desenvolupament tumoral en fases precoces d'aquest; probablement, quan operem aquests tumors, tot i ser petits, arribem ja massa tard, estant en una fase on ja no depenen d'un sol factor de creixement, i on la cascada de citocines i factors de creixement ja s'ha disparat. Possiblement inoculant un menor nombre de cèl.lules aconseguiríem trobar les diferències que aquí no hem assolit amb el tractament en antisentit: en aquestes fases més incipients, encara el VEGF tindria prou protagonisme respecte a d'altres factors; més endavant, l'equilibri de tots ells li farà perdre aquest protagonisme.

3.2.- Avaluació de la influència del tractament genètic sobre la vascularització als primers estadis de desenvolupament tumoral.

Un tumor avascular no pot créixer més enllà de 2 mm. A partir d'aquest moment, li cal vascularitzar-se. Per a cada unitat de volum que afegixi el tumor, necessitarà una determinada superfície d'endoteli per nodrir-se. Hi ha tumors vascularitzats de forma diferent, de manera que el valor de la superfície d'endoteli per a cada tumor és particular per a ell.

Ens interessava valorar si el nostre tractament genètic modificava la densitat vascular, amb la hipòtesi que presumptament el tractament en sentit la incrementaria, i l'antisentit la minvaria. Ho varem examinar a les fases precoces del desenvolupament tumoral perquè previsiblement en fases més tardanes influeixen molts altres factors afegits i perquè és a les fases precoces on l'angiogènesi és més important.

No varem trobar diferències en la densitat vascular tumoral (practicant el comptatge del nombre d'interseccions entre els vasos tenyits amb la tinció per al Factor VIII i una gradeta), ni tan sols al triar els tumors de mida més petita, en un intent de veure estadis el màxim precoços possible (Gràfics 26, 27 i 28). Altres estudis sí troben diferències: Oku i cols. (1998), estudiant xenoempèlts heterotòpics de melanoma implantats al cervell per fer un model de metàstasis cerebrals, troben diferències subjectivament en la densitat vascular segons el tractament amb el cDNA del VEGF en sentit o antisentit, però no ho quantifiquen; probablement la impressió subjectiva no sigui defensable a l'hora d'avaluar la densitat vascular, tot i tenyir les mostres amb

DISCUSSIÓ

tincions vasculars específiques; Saleh i cols. (1996), a glioma humà prèviament tractat amb el cDNA del VEGF en sentit o antisentit i implantat subcutani, sí troben diferències i les quantifiquen, mitjançant la pràctica d'immunotinció amb un Ac monoclonal anti-PECAM i posterior comptatge en diversos camps (5 camps per tumor), de forma que aquells tumors amb la transfecció del factor en sentit ténen una major densitat vascular, i a l'inrevés en aquells transfectats en antisentit. De fet, no queda clar encara quina és la millor tinció vascular; les diferències trobades entre els diferents estudis poden ser moltes vegades per diferent metodologia (Hasan, 2002).

Tampoc vàrem evidenciar que morfològicament els vasos tumorals tinguéssin trets anormals. Pötgens i cols. (1995-II), transfectant cDNA del VEGF 121 a línies de melanoma diferents de les nostres i xenoempeltant ortotòpicament encabat aquestes línies a ratolins atímics, troben un patró vascular morfològicament diferent qualitativament de manera que, mentre que al grup control els vasos són habitualment aïllats, al grup amb la transfecció amb el cDNA del VEGF 121 en sentit els vasos es constitueixen en xarxes vasculars complexes; de tota manera, refereixen en la seva discussió no trobar diferències quantitativament. Malgrat tot, no efectuen un comptatge, i potser aquestes diferències que aquests autors noten (vasos aïllats front xarxa vascular) són més quantitatives que qualitatives en realitat.

Es considera discutible que el recompte vascular en biòpsies sigui un mètode fiable per a indicar la resposta al tractament (Ferrara, 1999; Sledge, 2002-I). La densitat microvascular és el mètode emprat habitualment per a mesurar l'eficàcia del tractament anti-angiogènic; de tota manera, això no és del tot correcte, com ens comenten en la seva excel.lent revisió Hlatky i cols (2002): la densitat microvascular no sempre canvia amb els tractaments antiangiogènics, ni té per què canviar d'acord amb els nivells en sang o tissulars d'un factor pro-angiogènic únic. A més, una mínima densitat vascular ve determinada per la demanda metabòlica cel.lular tumoral, però la densitat vascular pot excedir perfectament els requeriments metabòlics d'un tumor. Aquesta problemàtica afecta no solament l'experimentació bàsica en models animals, sinó la mesura fiable de l'eficàcia real dels assaigs clínics anti-angiogènics; de fet, i a l'espera d'un mètode més fiable, s'ha intentat arribar mitjançant una conferència de consens a establir uns criteris per a quantificar l'angiogènesi en els tumors sòlids humans (Vermeulen, 1996).

La manca de modificació de la densitat vascular tumoral tampoc ens sorprèn sobremanera ja que, tot i que algun altre estudi sí troba diferències en aquesta (Saleh, 1996), estem treballant amb línies tumorals genotípica i fenotípicament semblants, excepte per la presència del gen del VEGF que hem insertat (apart de les diferències tant genotípiques com fenotípiques entre ambdues línies

que justifiquin que una sigui més agressiva que l'altra: diferent expressió d'integrines, diferent capacitat d'envair materials similars a la membrana basal...). Pensem que probablement el nostre tractament genètic influencia més en la funcionalitat vascular i en la seva capacitat proliferativa que no pròpiament en la densitat mesurada morfològicament. Previsiblement la transfecció del cDNA del VEGF en sentit suposa un avantatge per al creixement tumoral gràcies a l'increment de la permeabilitat vascular i el pas de macromolècules a l'espai extravascular, gràcies a una facilitació del "turnover" o recanvi cel.lular endotelial i gràcies a una disminució de l'apoptosi. El VEGF pot alterar la morfologia dels vasos, augmentant les fenestracions, i fent que l'aspecte vascular sigui més anàrquic i complex. Tot això no ho hem objectivat amb la immunotinció per al Factor VIII. No hem practicat estudis de permeabilitat vascular, com per exemple mesurant la capacitat difusòria de macromolècules, que potser sí que haurien mostrat alteracions. Tampoc no disposem de les tècniques de ressonància nuclear magnètica dinàmica millorada amb contrast descrites els darrers anys per a mesurar *in vivo* el grau d'angiogènesi. Estudis recents demostren que alguns factors angiogènics, entre ells el VEGF, actuen no només induïnt l'angiogènesi, sinó també com a factors de supervivència de les cèl.lules endotelials (Liu, 2002).

També podem justificar el major creixement dels tumors resultants dels xenoempèlts en sentit per l'efecte autocrí descrit per Liu i cols el 1995, més que per l'efecte angiogènic. Intuïm un efecte estimulador del creixement possiblement independent de l'angiogènesi.

Alternativament, i a favor de la hipòtesi de la modificació de la densitat vascular, podríem pensar que potser la detectariem en fases encara més precoces del desenvolupament tumoral. Més endavant, la hipòxia produïda *in vivo* compensaria la baixa densitat vascular, bé a través del re-estímul de la producció de VEGF, bé a través d'altres mecanismes.

3.3.- Anàlisi de la influència del tractament genètic sobre la corba de creixement tumoral.

El control més adequat a emprar en el nostre estudi sempre serà la mateixa línia tumoral amb la transfecció del plàsmid sense l'insert, ja que si aquest plàsmid modifica la biologia de les línies, en teoria ho farà igual a totes; no ens seria tan fiable emprar com a control les línies "salvatges" A375P i A375MM. A més, tampoc hem trobat a la literatura mèdica una descripció de la corba de creixement d'aquestes dues línies quan són xenoempeltades ortotòpicament a la pell de ratolins atímics, motiu pel qual no en tenim una referència prèvia de la seva taxa de creixement.

DISCUSSIÓ

Com ja hem pogut veure als resultats, i tal i com esperàvem, tres de les quatre línies transfectades amb el cDNA del VEGF en sentit han desenvolupat tumors molt més ràpidament que la resta, les dues provinents de la línia A375P, i una de la línia A375MM. Estadísticament només han agafat significació les dues línies generades a partir de la transfecció del cDNA del VEGF en sentit a la línia A375P (t de Student; control versus A375P S-4 A, $p=0.010$; control versus A375P S-7 A, $p=0.000$; a la A375 MM, al control versus A375MM S-3 la p ha estat de 0.302, i al control versus A375MM S-8 A, $p=0.299$) (Gràfics 29 i 30 dels resultats).

De tota manera, la transfecció del cDNA del VEGF en antisentit no ha suposat un menor creixement dels tumors en cap cas, no havent-hi diferències respecte a la corba de creixement dels controls (Gràfics 29 i 30).

De vegades, l'inòcul de les cèl.lules tumorals pot no ser exacte (per extravasació accidental de part de l'inòcul a l'injectar els animals), o pot ser més profund (fet que farà detectar els tumors en creixement més tard); també podria passar que la dissolució de les cèl.lules en el medi no fos la correcta (de tota manera, això ja s'havia corregit amb el recompte de la densitat cel.lular abans i després de la inoculació mitjançant la cambra de Neubauer). Per corregir el biaix en els resultats que tot això produiria, paral·lelament hem calculat també la taxa de creixement dels tumors a partir d'un volum inicial triat arbitràriament, mesurant el temps per doblar el volum cada vegada. Així mesurem la capacitat proliferativa del tumor prescindint de l'inòcul inicial, per si aquest havia estat accidentalment inexacte. Ho hem fet per a dos volums inicials diferents, 0.0135 i 0.04 cm³. Els resultats són superposables a la corba de creixement primera, eliminant així aquesta possibilitat d'error (Gràfics 31, 32, 33 i 34).

Així, l'estímul angiogènic generat per la transfecció del cDNA del VEGF en sentit ha condicionat un major creixement tumoral, estant aquests resultats d'acord amb altres estudis similars (Claffey, 1996, a la línia de melanoma SK-MEL 2).

El tractament genètic de les línies de melanoma humà A375P i A375MM amb la transfecció del cDNA del VEGF en antisentit no suposa una inhibició *in vivo* del creixement dels tumors xenoempeltats ortotòpicament a ratolins atímics. Això està en desacord amb el que podríem esperar, i amb algun estudi que ha fet un plantejament semblant (Claffey, 1996). No és el resultat que esperàvem, i de fet desanima a l'hora d'assajar un tractament antitumoral basat només en estratègies antiangiogèniques anti-VEGF. No ho aconseguim a les fases incipients del desenvolupament, tampoc no ho aconseguim a fases més avançades del creixement del tumor inoculat.

Que el tractament amb el factor en sentit estimuli l'angiogènesi i el creixement tumorals ja era

previsible, tant teòrica com atenent als resultats vistos prèviament amb els tumors petits. Com ja ha estat comentat abans, el VEGF és el principal factor angiogènic, estimulant el creixement dels endotelis, afavorint una major arribada de nutrients al tumor, creant un microambient molecular favorable i incrementant la permeabilitat vascular. S'hi pot afegir a més el probable paper autocrí del factor donada la presència del seu principal receptor, el kdr, en aquestes línies tumorals (Liu, 1995).

Podem emetre nombroses hipòtesis de perquè la transfecció del factor en antisentit no inhibeix el creixement tumoral. Esbrinar el paper concret de cadascuna d'elles en particular pot ser extremament difícil:

Potser el que pot tenir-hi més influència és el paper d'altres factors de creixement al desenvolupament tumoral, coneguts i no coneguts, de forma que dintre una complexa cascada de citocines i factors el VEGF no deixa de ser un contribuent més. Ja d'altres autors emeten aquesta hipòtesi quan, malgrat efectuar un tractament anti-VEGF, no aconsegueixen una inhibició completa de l'angiogènesi. Així, per exemple, Kim i cols. (1993) ja ens parlen del paper d'altres factors angiogènics, com per exemple el del bFGF. Nakashima i cols., en un model de carcinoma escatós de cap i coll modificat genèticament amb la transfecció del cDNA del VEGF en antisentit i xenoemplantat a ratolins atímics, tampoc no aconsegueixen inhibir el creixement tumoral *in vivo*, tot i demostrar una inhibició efectiva de la producció de VEGF *in vitro*; teoritzen també a la seva discussió sobre el probable paper d'altres factors angiogènics. Lázár-Molnár i cols (2000), en una revisió sobre factors de creixement al melanoma maligne, enumeren com a autocrins el bFGF, MGSA/GRO, IL-8, IL-6, PDGF-A, IL-10, i com a paracrins el PDGF, EGF, TGF β , IL-1, GM-CSF, IGF-I, NGF i VEGF, demostrant la complexitat inherent a aquests processos i al seu control.

També podem atribuir molt raonablement part dels nostres resultats al paper compensador de la hipòxia: a l'inocular el tumor, l'estímul hipòxic *in vivo* podria compensar per d'altres mecanismes la inhibició que hem provocat de la producció de VEGF; de fet, Pötgens i cols. (1995-II) demostren que, *in vivo*, diferents línies de melanoma hipo-productores de VEGF *in vitro* equilibren la seva producció arribant als nivells d'altres línies hiper-productores. Molt probablement a l'inocular aquestes línies *in vivo* escapen ràpidament a la nostra inhibició mitjançant aquests mecanismes, reestimulant la producció de VEGF. Potser hauriem d'haver emprat una línia poc productora intrínsecament de VEGF inclús en condicions hipòxiques, com fan Claffey i cols. amb la línia de melanoma SK-MEL 2 (Claffey, 1996), per tal d'estalviar-nos aquest efecte compensador de la hipòxia; així, el "dèficit" de VEGF provocat per nosaltres amb el

DISCUSSIÓ

nostre tractament genètic no es podria veure compensat per la hipòxia *in vivo*; probablement per aquest motiu Claffey i cols. obtinguin millors resultats, tot i que cal recordar que, en realitat, la situació que aquests autors examinen és més fictícia, doncs a la gran majoria de tumors on s'ha estudiat la hipòxia estimula la producció de VEGF, juntament amb el fet que a la majoria de línies tumorals descrites on s'ha investigat la presència de VEGF s'ha trobat que aquest s'expressa de forma important. El nostre plantejament de fet s'aproxima més a la realitat que el realitzat per Claffey i cols. en el seu article.

A banda del paper de la hipòxia *in vivo* i del joc d'altres factors de creixement i citocines, també podem trobar d'altres possibles explicacions per justificar la manca d'efecte terapèutic del tractament amb el cDNA del VEGF en antisentit, cadascuna de les quals pot tenir el seu propi pes específic:

Sempre que es transfecta material genètic a una cèl.lula, aquest pot modificar-la limitant la seva capacitat proliferativa; de tota manera, no sembla ser el cas, doncs tots els clons amb la transfecció en sentit, antisentit i control, van créixer equilibradament *in vitro*; malgrat tot, que no hi hagi diferències entre les corbes de creixement dels diferents clons *in vitro* no implica que tampoc hi hagi d'haver diferències de creixement *in vivo*, tal i com indica Pötgens (1996), ja que les condicions són diferents.

Tampoc podem pensar que la transfecció hagi produït mutacions que donin avantatge o desavantatge relatiu d'unes línies respecte les altres. No vàrem detectar heterogeneïtat morfològica de les cèl.lules tumorals ni del patró vascular per pensar això. També hauria estat casualitat que precisament els clons amb la transfecció en sentit haguessin sortit beneficiats quant a la seva capacitat de creixement respecte als clons amb la transfecció control i en antisentit.

Una pèrdua *in vivo* de l'expressió del gen transfectat en antisentit també podria justificar la manca de diferències amb el grup control (és el fenomen de la reversió, del que ens parlen Cheng i cols, 1996), però no és lògic que es perdin totes les transfeccions en antisentit, i no es perdin les fetes en sentit, i més quan prèviament i mitjançant Southern blot havíem comprovat que la nostra transfecció era estable i no episòmica, garantint així la seva supervivència en les següents generacions cel.lulars tumorals.

Un grup de treball (Maniotis, 1999; Folberg, 2000) descriuen un interessant fenomen al melanoma maligne cutani que podria justificar aquesta independència del tumor respecte al control de l'angiogènesi convencional: sembla que el melanoma seria capaç de generar canals vasculars sense la necessitat d'endotelis, que aconseguirien perfondre adequadament el tumor de forma independent a l'angiogènesi tumoral; els autors ho anomenen "vascular mimicry" o

mimetisme vascular. Justificaria els nostres resultats i auguraria un destí incert per als tractaments antiangiogènics en el melanoma maligne. Posteriorment aquest fenomen del mimetisme vascular s'ha descrit també al càncer de pròstata, mamella i ovari (Bagnato, 2002). Igualment, Leenders i cols (2002) descriuen la co-opció vascular o “vessel co-option” com la capacitat dels tumors d’aprofitar els vasos sanguinis pre-existents, en un model *in vivo* de metastasis cerebrals de melanoma. S'han descrit també altres mecanismes de creixement tumoral angiogènesi - independents, com la vasculogènesi a l'adult i el creixement per intosuscepció (Miller, 2003).

Finalment, també hem de pensar que amb el nostre tractament en antisentit hem inhibit l’angiogènesi, però el tractament antisentit anti-VEGF no és capaç d’inhibir la limfangiogènesi (Jeltsch, 1997; Streit, 2003), pel que el tumor pot escapar de la nostra influència inhibidora del desenvolupament tumoral mitjançant mecanismes limfangiogènics. De tota manera, Shibuya (1995) en la seva revisió defensa que les cèl.lules endotelials dels vasos limfàtics també responen al VEGF. No hem d’oblidar tampoc l’existència d’altres VEGF, B, C i D, que poden jugar el seu paper. De fet, Uthoff i cols (2002) demostren la presència de diverses mutacions al mRNA del VEGF, corresponents a l’heterogeneïtat de la població tumoral, i que poden dificultar el nostre tractament genètic.

Per tant, el tractament amb el VEGF en antisentit no afecta la corba de creixement dels tumors desenvolupats. Així, com a “monoteràpia” no ha estat útil. El paper del VEGF i de l’angiogènesi segons els nostres estudis és a les fases precoces del desenvolupament tumoral. Encabat, els tumors aconsegueixen escapar de la seva influència. Tal i com explica Hayes (1999), hi ha molts factors estimuladors, i cada tumor n’expressa diversos. És probable que terapèuticament sigui més viable treballar amb combinacions de factors de creixement (Ferrara, 1999). Arribar a entendre i a conèixer el “perfil angiogènic” particular de cada tumor pot ser una feina inabastable. Potser cal trobar un inhibidor universal, que encara no coneixem, que ens permetés manipular l’angiogènesi d’una manera simplificada. Segons Hayes, podria arribar a ser l’angiostatina. Patton i cols. (2003) especulen sobre les possibilitats del calci com a diana desitjada, donat el seu paper a múltiples dels mecanismes de l’angiogènesi. El VEGF no sembla ser el candidat ideal segons els nostres resultats.

3.4.- Anàlisi de l’efecte del tractament genètic sobre la supervivència dels ratolins inoculats.

Els ratolins no han mort de malaltia neoplàstica secundària als tumors inoculats, excepte en un

DISCUSSIÓ

dels clons transfectats amb el cDNA del VEGF en sentit (A375P S-4 A), que ha acomplert les nostres expectatives, amb un creixement ràpid del tumor inoculat i de les metàstasis, i d'acord amb els resultats d'altres estudis (Pötgens, 1996). Cap dels altres clons amb la transfecció del factor en sentit ha mort abans que els controls. De fet, passat el plaç de gairebé un any després de la inoculació, al trobar-se els ratolins lliures de malaltia clínicament detectable, s'ha considerat que ja no desenvoluparien malaltia metastàtica.

Així, tot i que l'estímul angiogènic amb la transfecció del factor en sentit ha suposat en general un major creixement del tumor inoculat ortotòpicament, no ha esdevingut una menor supervivència dels ratolins. Hi ha una excepció notòria, la del clon A375P S-4 A, amb la transfecció del cDNA del VEGF en sentit. El tractament en antisentit no ha millorat la supervivència respecte al control, tot i que per afirmar-ho definitivament hauriem hagut d'esperar a la mort natural.

Les úniques dades que tenim a la literatura mèdica sobre la supervivència dels ratolins atòmics xenoempeltats ortotòpicament amb les línies A375P i A375MM "salvatges" ens les ofereixen Kozlowski i cols. (1984-I). Segons els autors, tots els casos generen tumor cutani; no valoren diferències de creixement del tumor cutani entre les línies A375P i A375MM (de fet, nosaltres tampoc hem trobat diferències en aquest sentit). En el seu estudi, tots els ratolins són sacrificats a les 8 setmanes després de la inoculació. Al cas de la línia A375P, a cap cas troben metàstasis pulmonars. A la A375MM, tots els ratolins presentaven algunes metàstasis pulmonars espontànies. Comparant els nostres resultats amb els de Kozlowski i cols., el que ens crida més l'atenció és el que ha ocorregut amb el clon transfectat amb el VEGF en sentit A375P S-4 A: hem creat una línia d'agressivitat extrema, ja no perquè el tumor primari xenoempeltat creixi ràpidament, característica que comparteix amb els altres clons transfectats amb el cDNA del VEGF en sentit, sinó per la seva gran capacitat metastàtica en una línia que habitualment no hagués produït ni una sola metàstasi pulmonar. Tenint en compte aquests resultats, podríem implicar al VEGF de forma evident amb la cascada metastàtica del tumor, i previsiblement a l'angiogènesi (per mecanismes angiogènics, o bé per mecanismes d'estimulació autocrina sobre les mateixes cèl.lules tumorals, sabent que està descrita la presència del seu receptor, el kdr, en aquestes línies). De tota manera, cap dels altres clons transfectats amb el factor en sentit desenvolupa metàstasis pulmonars. Això es podria explicar, per exemple, per la presència del receptor kdr a les cèl.lules de melanoma del clon A375P S-4 A, i absència d'aquest als altres clons, atenent a l'heterogeneïtat de les línies de melanoma A375P i A375MM segons Kozlowski i cols. (1984-I). De tota manera, el que pensem que ha passat en aquest clon en concret és que la

transfecció practicada per nosaltres ha anat a parar en algun lloc del genoma de la cèl.lula receptora on, per l'acció probable del promotor del CMV que hem introduït (anava inclòs en el plàsmid pRC/CMV) s'ha sobreexpressat algun oncogen metastàtic de la línia en qüestió pròxim al punt d'inserció del plàsmid. Així, la línia tumoral s'ha tornat fenotípicament molt agressiva i metastàtica. Aquest extrem es podria investigar localitzant la posició exacta del VEGF transfectat i identificant els gens més pròxims.

No deixa de sorprendre que Kozlowski i cols. trobin metàstasis pulmonars a tots els casos de la línia A375MM a les 8 setmanes post-inoculació del tumor, mentre que els nostres ratolins xenoempeltats amb la mateixa línia hagin sobreviscut tots un any, essent indiferent si la transfecció ha estat amb el cDNA del VEGF en sentit, en antisentit, o amb el plàsmid control i prou. Els mateixos autors descriuen en el seu article (1984-I) que la població cel.lular d'un tumor és heterogènia; ells mateixos, que són qui obténen la A375MM, ho fan a través d'una barreja de metàstasis pulmonars aparegudes després de la injecció endovenosa de la línia A375P a diferents ratolins; és possible que la nostra línia A375MM no sigui estrictament igual a la de Kozlowski, bé per l'heterogeneïtat coneguda de les poblacions cel.lulars dels tumors, bé per una hipotètica reversió cap a un fenotip menys metastàtic en els diferents passatges als cultius cel.lulars; alternativament, podríem pensar que la nostra transfecció hagi lesionat la capacitat metastàtica de les cèl.lules tumorals. No podem considerar que el nostre tractament amb el vector en antisentit hagi estat un èxit a la línia A375MM pel fet que aquesta no hagi metastatitzat, ja que tampoc ho ha fet la línia control amb la transfecció del vector sol que, naturalment, és la de referència. Al cas de la transfecció del cDNA del VEGF en antisentit a la línia A375P, i atenent als resultats de Kozlowski i cols., previsiblement aquesta no és una bona línia per avaluar l'efecte del tractament amb el vector en antisentit sobre les metàstasis pulmonars espontànies, ja que és una línia que en la seva forma "salvatge" no metastatitza. De tota manera, Kozlowski i cols. sacrifiquen els ratolins a les 8 setmanes, i no sabem què hauria passat en els seus ratolins si els haguessin deixat viure més temps, possiblement haurien acabat fent metàstasis pulmonars, tardanes per la menor agressivitat de la línia, però presents.

Per intentar explicar-nos els resultats sobre la supervivència, podem emetre les mateixes hipòtesis comentades abans. Recordem com a més destacables el paper d'altres factors i citocines, coneguts i no coneguts, que farien perdre significació al VEGF com a factor controlador únic, i l'efecte compensador *in vivo* de la hipòxia, que re-estimula la producció de VEGF en aquelles línies que nosaltres havíem transformat en hipoproductores intrínsecament mitjançant la transfecció del factor en antisentit. També cal fer l'esment que els ratolins que nosaltres hem emprat tenien unes

DISCUSSIÓ

6 setmanes de vida quan varen ser inoculats. Segons Kozlowski (1984-II) els ratolins atímics de 3 setmanes d'edat són els ideals, donat que quan ténen entre 6 i 8 setmanes d'edat la seva activitat NK (Natural Killer) intrínseca augmenta notòriament, havent-se demostrat que la capacitat metastàtica dels tumors xenoempeltats en ells baixa molt; potser aquesta podria ser l'explicació de perquè els nostres clons amb la línia A375MM no facin metàstasis, i hauriem hagut de treballar amb ratolins més joves.

Potser hauriem pogut trobar vies diferents per estudiar millor la modificació de la capacitat metastàtica amb la transfecció del factor en antisentit. A imitació d'altres estudis (Claffey, 1996; Pötgens, 1996), l'inòcul de les cèl.lules per via intravenosa ens asseguraria la presència de metàstasis; de fet, no hem trobat cap estudi en melanoma (transfectat amb cDNA de VEGF) xenoempeltat ortotòpicament que esperi l'aparició de metàstasis espontànies, tots estudien les metàstasis "induïdes", és a dir, amb inòcul directe endovenós, fet que no reproduceix amb exactitud la realitat de la cascada metastàtica *in vivo*. Aquest plantejament dels estudis és explicable, ja que la majoria de tumors humans xenoempeltats a ratolins atímics adults, de forma independent a la seva agressivitat prèvia en el malalt, no metastatitzen en els ratolins de forma espontània. El nostre model imita més la realitat, però és probablement menys practicable, o alternativament necessita d'un major nombre de ratolins.

També es podria plantejar en un futur treballar amb un experiment similar però amb una línia de melanoma de major agressivitat intrínseca, per assegurar la presència de metàstasis espontànies del clon control i així una comparació més clara entre tots els grups quant a la supervivència; hi ha estudis que descriuen línies d'aquestes característiques (Welch i cols., el 1991, comparen i demostren una major agressivitat de la línia de melanoma C8161 respecte a la A375, de manera que, inoculada ortotòpicament a ratolins atímics, en el moment d'extirpar-los els tumors quan aquests fan 1 · 1 cm, com en el nostre estudi, els ratolins ja han desenvolupat múltiples metàstasis i a diferents òrgans, és a dir, constitueix un bon model per a l'estudi de metàstasis espontànies).

Finalment, emprar una línia de melanoma hipo-productora de VEGF de manera intrínseca *in vitro*, i que mantingués aquesta baixa producció de VEGF *in vitro* i *in vivo* en condicions hipòxiques (com fan Claffey i cols., 1996), ens hauria pogut permetre evitar l'efecte compensador que suposa la hipòxia *in vivo*, a l'estimular la síntesi del VEGF. Novament, però, el model s'allunyaria de la realitat, que ens diu que a gairebé tots els tumors la hipòxia estimula *in vivo* la producció de VEGF.

Per tant, el tractament amb el VEGF en antisentit no afecta la corba de creixement dels tumors

desenvolupats ni la supervivència dels ratolins xenoempeltats. No podem defensar que sigui aplicable com a tractament antitumoral en forma de “monoteràpia”.