

Universitat de Barcelona
Facultat de Medicina
Departament de Medicina
Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge

Angiogènesi al Melanoma Maligne.

Anàlisi de l'efecte de l'estimulació amb Matrigel, de la relació amb l'expressió del Factor de Creixement de l'Endoteli Vascular (VEGF) i de l'efecte de la transfecció del cDNA del VEGF en sentit i antisentit sobre l'angiogènesi i el comportament tumorals.

Estudi en melanomes humans i en línies de melanoma humà xenoempeltades a ratolins immunodeprimits.

Dirigida per:

Dr Abelardo Moreno Carazo

Dr Jordi Peyrí i Rey

Tesi presentada per en **Jordi Graells i Estrada** per optar al títol de Doctor en
Medicina i Cirurgia
Barcelona, juliol del 2004

En Abelardo Moreno Carazo, Doctor en Medicina, metge adjunt del Servei d'Anatomia Patològica de la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge (CSUB), i en Jordi Peyrí i Rey, Doctor en Medicina, cap del Servei de Dermatologia de la CSUB,

Fem constar que en **Jordi Graells i Estrada**, llicenciat en Medicina i Cirurgia, ha realitzat sota la nostra direcció el treball titulat: *"Angiogènesi al Melanoma Maligne. Anàlisi de l'efecte de l'estimulació amb Matrigel, de la relació amb l'expressió del Factor de Creixement de l'Endoteli Vascular (VEGF) i de l'efecte de la transfecció del cDNA del VEGF en sentit i antisentit sobre l'angiogènesi i el comportament tumorals. Estudi en melanomes humans i en línies de melanoma humà xenoempeltades a ratolins immunodeprimits"*, per a optar al grau de Doctor en Medicina.

Dr Abelardo Moreno Carazo

Dr Jordi Peyrí i Rey

L'Hospitalet de Llobregat, 6 de Juliol del 2004.

a la Júlia, als meus pares i als meus germans.

Agraïments

Voldria expressar el meu agraïment en primer lloc a les institucions - els Serveis de Dermatologia i Anatomia Patològica de la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge, i el Departament de Càncer i Metàstasi de l'Institut de Recerca Oncològica - per saber entendre's i proporcionar la infraestructura sense la qual aquest projecte no hauria estat possible. També l'agraïment per a la Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (CIRIT) de la Generalitat de Catalunya, que ha proporcionat el finançament per al projecte (1995 FI 09202), i al Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FISS), que igualment ha finançat en part el treball (Nº 94 / 1158).

Passant de les institucions a les persones, el meu reconeixement més especial és per a l'Agnès Figueras i per a l'Antònia Vinyals; sense el seu recolzament i la seva paciència aquesta tesi no hauria reeixit.

Vull agrair també a tot el personal en general de l'Institut de Recerca Oncològica i del Servei de Dermatologia per fer-me costat en tots aquells moments en què els he necessitat. Especialment a l'Àngels Torras i L'Evelyn Baumann, de la secció de melanomes del Servei de Dermatologia, i al Toni Coll, la Mila i la Blanca de l'Institut de Recerca Oncològica.

Als Doctors Àngels Fabra i Joaquim Marcoval els haig d'agrair profundament les moltes idees, correccions, puntualitzacions i assessorament des del primer fins al darrer dia del projecte. I als Doctors Jordi Peyrí i Abelardo Moreno la seva sàvia direcció i gestió del projecte.

Al Dr Francisco Jesús González, del Departament d'Oncologia Mèdica del Hospital Clínico Universitario de Málaga, per la seva amable col.laboració en la realització de la tècnica d'ELISA.

Finalment, l'agraïment més especial a la meva família i a la Júlia.

INDEX.

Concepte i epidemiologia del melanoma maligne cutani.....	1
Introducció.....	9
* Angiogènesi.....	11
* Angiogènesi i Càncer.....	13
* Angiogènesi i Melanoma.....	21
* Les Bases Moleculares de l'Angiogènesi.....	24
* El Factor de Creixement de l'Endoteli Vascular (VEGF)	38
Hipòtesi de treball.....	65
Objectius concrets.....	69
Material i Mètodes.....	73
Resultats.....	101
* Valoració de l'angiogènesi i expressió del VEGF als melanomes cutanis humans..	103
* Valoració del creixement, angiogènesi i expressió de VEGF als tumors desenvolupats als ratolins inoculats amb les línies de melanoma humà A375P i A375MM, co-injectades o no amb Matrigel.....	111
* Anàlisi de l'efecte de la modificació genètica de l'expressió del VEGF sobre les dues línies de melanoma humà A375P i A375MM xenoempeltades a ratolins atímics.....	121
* Sobre el volum tumoral als primers estadis de desenvolupament tumoral....	121
* Sobre la vascularització als primers estadis de desenvolupament tumoral...	134
* Sobre la corba de creixement dels tumors desenvolupats.....	138
* Sobre la supervivència dels ratolins inoculats.....	147
Discussió.....	151
* Valoració de l'angiogènesi i expressió del VEGF als melanomes cutanis humans..	155
* Valoració del creixement, angiogènesi i expressió de VEGF als tumors desenvolupats als ratolins inoculats amb les línies de melanoma humà A375P i A375MM, co-injectades o no amb Matrigel.....	160
* Anàlisi de l'efecte de la modificació genètica de l'expressió del VEGF sobre les dues línies de melanoma humà A375P i A375MM xenoempeltades a ratolins atímics.....	165

* Sobre el volum tumoral als primers estadis de desenvolupament tumoral....	165
* Sobre la vascularització als primers estadis de desenvolupament tumoral...	167
* Sobre la corba de creixement dels tumors desenvolupats.....	170
* Sobre la supervivència dels ratolins inoculats.....	174
Conclusions.....	179
Conclusió final.....	183
Addendum: Teràpia antiangiogènica al càncer: passat, present i futur.....	187
Annexes Material i Mètodes.....	189
Bibliografia.....	219

ABREVIATURES

ADAMTS1	A Disintegrin-like And Metalloprotease domain with Thrombospondin type I motifs
aFGF	Acidic Fibroblast Growth Factor
ATCC	American Type Culture Collection
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
c-Fms	Receptor del Colony Stimulating Factor
CIN	Neoplàsia Cervical Intraepitelial
Del-1	Proteïna angiogènica de la matriu
EGF	Epidermal Growth Factor
ESAF	Endothelial Cell Stimulating Angiogenesis Factor
ET	Endotelina
Flk-1/kdr	Fetal liver kinase-1 / kinase insert domain containing receptor
Flt	FMS-like tirosin kinase
GADPH	Gliceralhid 3 fosfat deshidrogenasa
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulomonocytic Colony Stimulating Factor
Gro- β	Quimiocina proteica (<i>Oryctolagus cuniculus</i> gro)
hCG	Gonadotropina Coriònica Humana
HGF/SF	Hepatocyte Growth Factor / Scatter Factor
HIF	Hypoxia Inducible Factor
IGF	Insulin Growth Factor
IL	Interleukina
IP-10	Proteïna Induïble per l'interferó 10
KGF	Keratinocyte Growth Factor
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MMP	Matrix Metalloproteinase
NGF	Nerve Growth Factor
NK	Natural Killer
p.b.	Parells de bases
PDECGF	Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor
PDEGFR	Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor Receptor
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PIGF	Placenta Growth Factor

PSA	Antigen Prostàtic Específic
PUVA	Psoralen + UVA
SAPK	Stress Activated Protein Kinase
SRB	Sulforodamina B
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
tPA-tP	Sistema Activador tissular del plasminògen - plasminògen
UFT	Tegafur + Uracil
UVA	Radiació Ultraviolada A
UVB	Radiació Ultraviolada B
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VPF	Vascular Permeability Factor