

## **RESULTATS**

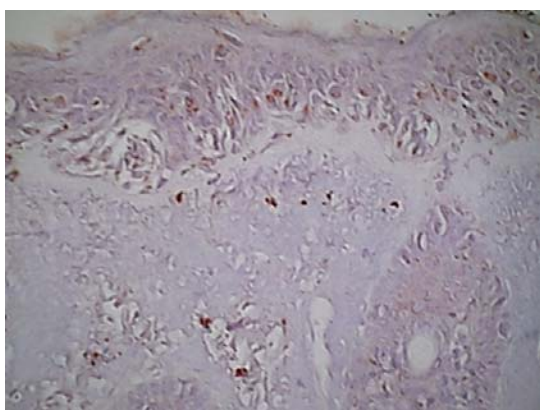
## RESULTATS

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

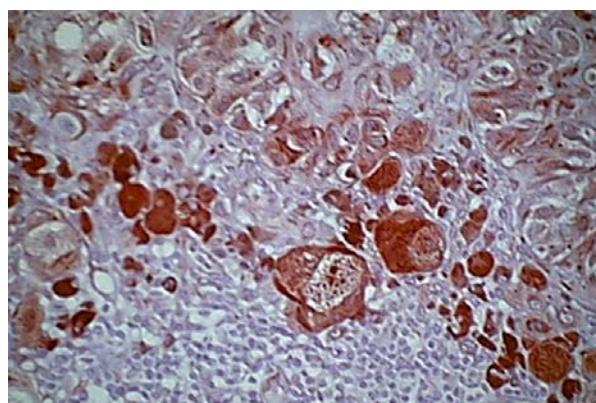
#### ***1.1.- Expressió del VEGF.***

A la Taula 3 es poden observar tots els valors de la immunotinció per al VEGF, angiogènesi i nivell de Breslow dels melanomes cutanis primaris estudiats amb immunotinció positiva per al factor. El nivell de Breslow no superava el valor de 1.00 mm en cap cas.

De 53 melanomes cutanis primaris examinats, 45 han presentat immunotinció positiva per al VEGF, i 8 estat rebutjats (84.9% de positivitat). La intensitat d'immunotinció mesurada tal i com es descriu a Material i Mètodes ha estat de grau 0 a 7 casos (15.5%), grau 1 a 18 casos (40%), grau 2 a 16 (35.5%) i grau 3 a 4 casos (8.88%). En veiem dos exemples:



Grau 1



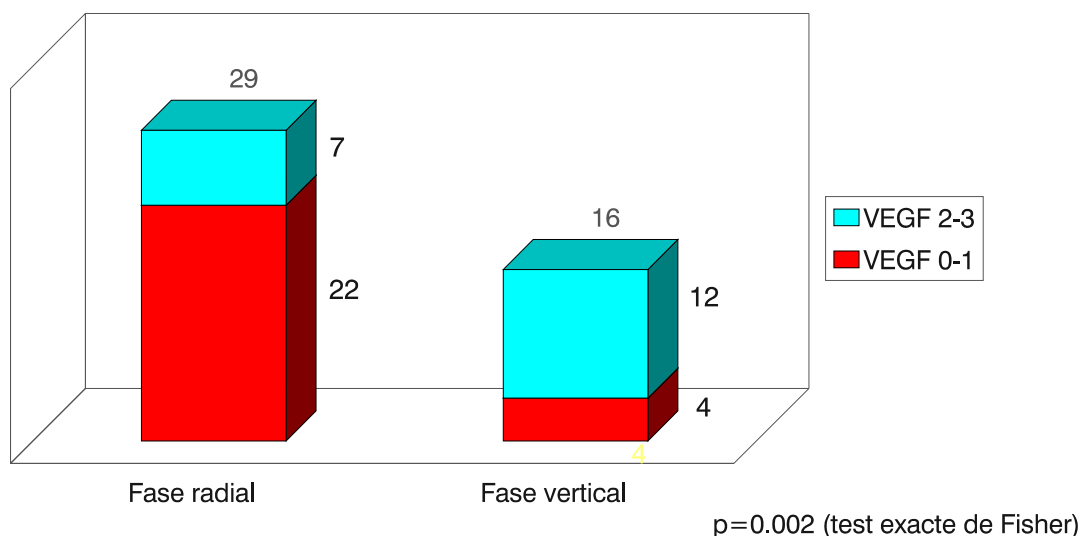
Grau 3

Immunotinció per al VEGF a melanomes malignes cutanis primaris.

**1.2.- Relació entre l'expressió del VEGF i fase radial / vertical.**

Vint-i-nou melanomes han estat melanomes en fase radial, i 16 melanomes amb fase vertical. S'han categoritzat dos grups segons el grau d'immunotinció per al VEGF, grau baix (grau 0-1) o grau alt (grau 2-3), i s'ha procedit a comparar-los. Com podem apreciar al Gràfic 3, dels 29 melanomes en fase radial, 22 (75.8%) tenien un grau d'immunotinció amb VEGF baix (0-1) i 7 (24.2%) grau alt, mentre que dels 16 melanomes amb fase vertical només 4 (25%) tenien aquest grau baix d'immunotinció i 12 (75%) grau alt. Aquestes diferències són significatives avaluades amb el test exacte de Fisher.

Relacio entre expressio de VEGF i fase de creixement



Gràfic 3: menor grau d'expressio de VEGF a aquells melanomes mes prims (fase radial)

## RESULTATS

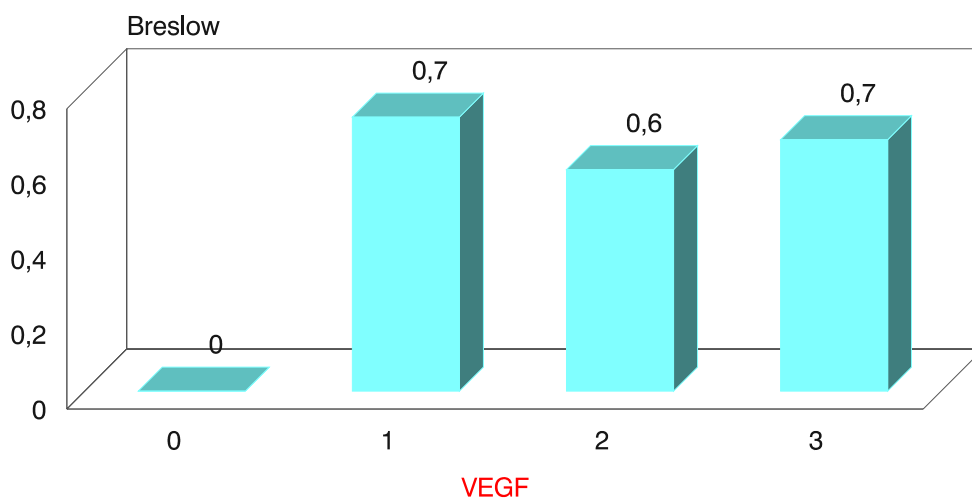
### 1.3.- Relació entre l'expressió del VEGF i el nivell de Breslow.

Tots els melanomes amb grau d'immunotinció per al VEGF de 0 eren en fase de creixement radial.

La mitjana del nivell de Breslow en els melanomes amb fase de creixement vertical amb grau d'immunotinció per al VEGF de 1 ha estat de 0.7 mm; en aquells amb VEGF de 2, 0.6 mm; finalment els melanomes invasors amb grau 3 tenien una mitjana de 0.7 mm. Així, el grau d'immunotinció per al VEGF no es relaciona amb el nivell de Breslow en tots aquells melanomes amb fase de creixement vertical amb immunotinció positiva per al factor.

En el Gràfic 4 en podem veure la representació.

### Relacio entre expressio de VEGF i nivell de Breslow

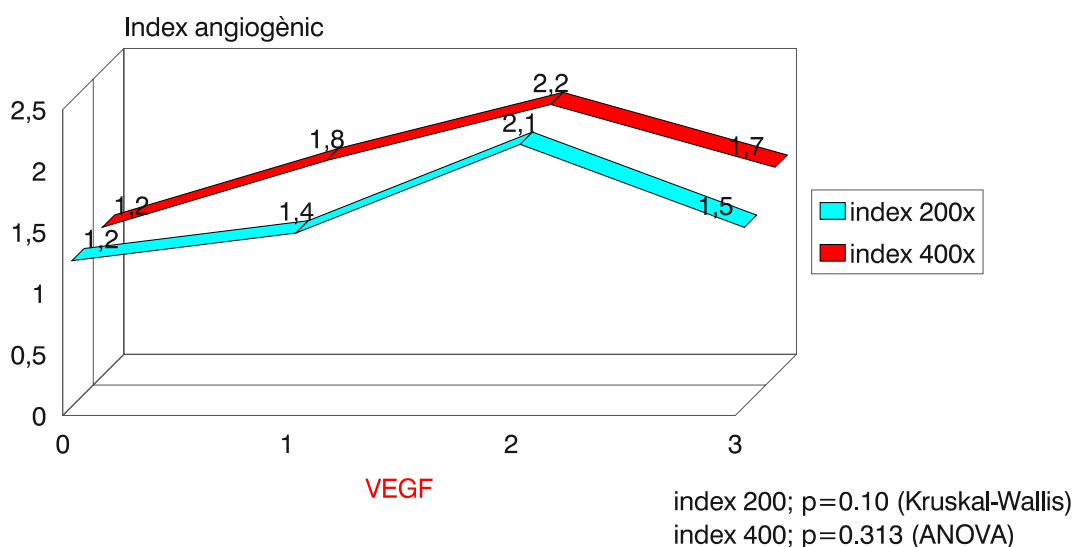


Gràfic 4: menor grau d'expressió de VEGF a melanomes en fase radial, i absència de diferències a melanomes amb fase vertical.

### 1.4.- Relació entre l'expressió del VEGF i l'angiogènesi.

La mesura de l'índex angiogènic a partir de la tinció amb *Ulex-europaeus*, calculat tal i com es descriu als mètodes, relacionat amb el grau d'immunotinció per al VEGF ha mostrat els següents resultats: a 200x, el valor de l'índex angiogènic per a VEGF=0 ha estat de 1.2, per a VEGF=1 de 1.4, per a VEGF=2 de 2.1, i finalment per a VEGF=3 de 1.5. A 400x, per a VEGF=0 l'índex angiogènic ha estat de 1.2, per a VEGF=1 de 1.8, per a VEGF=2 de 2.2 i per a VEGF=3 de 1.7. Ho veiem al següent gràfic (Gràfic 5).

### Relació entre expressio de VEGF i angiogènesi.

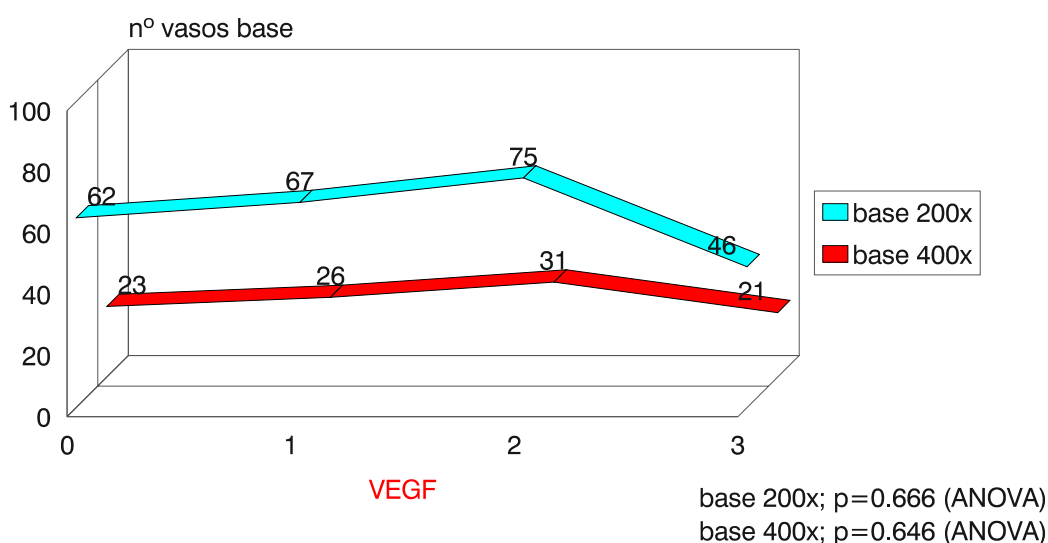


Gràfic 5: absència de relació entre grau d'expressió de VEGF i angiogènesi.

## RESULTATS

La mitjana del nombre de vasos per camp a la base del tumor en relació al grau d'immunotinció per al VEGF ha estat com segueix: a 200x, per a VEGF=0, 62 vasos, per a VEGF=1, 67 vasos, VEGF=2, 75 vasos i VEGF=3, 46 vasos. A 400x, per a VEGF=0, 23 vasos, VEGF=1, 26 vasos, VEGF=2, 31 vasos i VEGF=3, 21 vasos. Aquests resultats es reflexen al Gràfic 6:

### Relacio entre expressio de VEGF i angiogenesis - II



Gràfic 6: absència de relacio entre grau d'expressio de VEGF i angiogenesis.

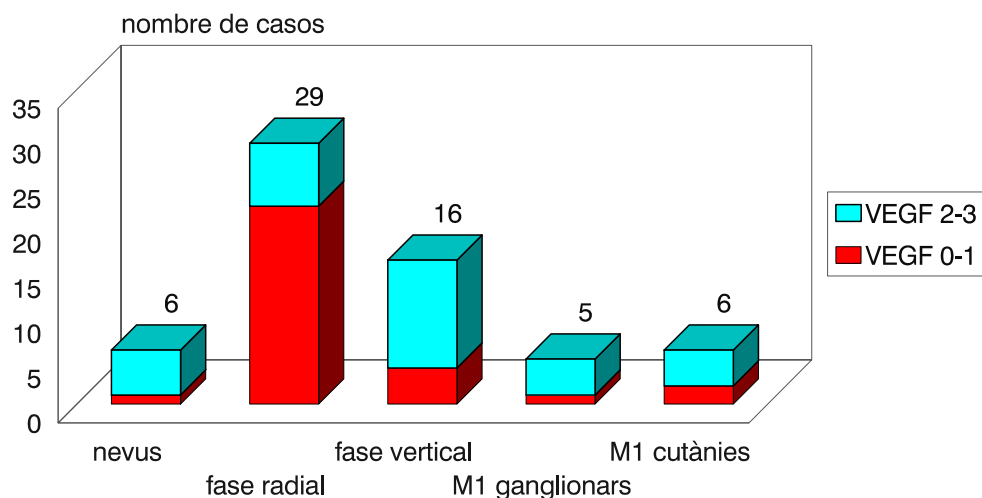
Practicada la prova d'Anàlisi de Variància, l'angiogenesis mesurada tant amb el nombre de vasos a la base del tumor com amb l'índex angiogenic no es relaciona amb el grau d'immunotinció per al VEGF: la p és de 0.666 per al nombre de vasos mesurats a la base del tumor a 200x, de 0.646 a la base del tumor a 400x, de 0.313 per a l'índex angiogenic a 400x, i de 0.100 per a l'índex angiogenic a 200x. No hi ha relació entre grau d'immunotinció per al VEGF i angiogenesis a melanomes amb nivell de Breslow  $\leq$  1mm.

### ***1.5.- Expressió del VEGF a d'altres lesions melanocítiques, benignes i malignes.***

S'ha practicat immunotinció per al VEGF a 6 metàstasis cutànies de melanoma, 6 metàstasis ganglionars i 6 nevi melanocítics sense atípia melanocítica. La immunotinció ha estat positiva a tots els casos excepte una metàstasi ganglionar, que ha estat rebutjada. Les dades són a la Taula 3. Al gràfic (Gràfic 7) observem els diferents graus d'immunotinció per al VEGF en les diferents lesions, seguint el mateix criteri de valoració d'intensitat per graus: als nevi melanocítics, 5 han resultat en grau alt d'immunotinció per al VEGF (2-3) front 1 amb grau baix (0-1); 4 metàstasis ganglionars de melanoma han estat de grau alt front 1 de grau baix; finalment, 2 metàstasis cutànies han resultat de grau baix front 4 metàstasis cutànies que han donat un grau alt d'immunotinció per al VEGF.

Practicat el test exacte de Fisher per comparar el grau d'immunotinció per al VEGF en les diferents proliferacions melanocítiques, al comparar els melanomes en fase radial amb la resta de lesions les diferències han estat significatives quasi a tots els casos: respecte als melanomes en fase vertical,  $p=0.002$  (com ja hem vist abans); respecte als nevi melanocítics,  $p=0.012$ ; respecte a les metàstasis ganglionars,  $p=0.029$ ; respecte a les metàstasis cutànies,  $p=0.063$ . Al comparar els melanomes en fase vertical amb la resta de proliferacions melanocítiques, i al comparar aquestes entre elles, les diferències no són mai significatives: fase vertical versus nevi melanocítics,  $p=1.000$ ; fase vertical respecte a metàstasis ganglionars,  $p=1.000$ ; fase vertical respecte a metàstasis cutànies,  $p=1.000$ ; nevi melanocítics respecte a metàstasis ganglionars,  $p=1.000$ ; nevi melanocítics respecte a metàstasis cutànies,  $p=1.000$ ; metàstasis ganglionars respecte a metàstasis cutànies,  $p=1.000$ .

## Expressio de VEGF a d'altres lesions melanocitiques



Gràfic 7: Absència de diferències en el grau d'expressió de VEGF en les diferents proliferacions melanocítiques, excepte a melanomes en fase radial, on hi ha una major proporció de casos amb grau baix d'immunotinció.

Així, el grau d'immunotinció per al VEGF ha estat similar a totes les proliferacions melanocítiques, benignes i malignes, excepte als melanomes cutanis primaris en fase radial, on ha estat menor.

Nº Biòpsia	Tipus de proliferació melanocítica	VEGF
95-7978	nevus melanocític	2
95-7627	nevus melanocític	2
95-7730	nevus melanocític	2
95-7619	nevus melanocític	2
95-7994	nevus melanocític	2
95-7514	nevus melanocític	1
94-12727A4	metàstasi ganglionar	1
93-5188F	metàstasi ganglionar	2
92-7910A	metàstasi ganglionar	2
94-2390A	metàstasi ganglionar	2
93-5188	metàstasi ganglionar	2
93-5435	metàstasi cutània	2
94-10695B	metàstasi cutània	3
93-3399	metàstasi cutània	3
94-2703A	metàstasi cutània	2
94-5599	metàstasi cutània	1
93-8871D	metàstasi cutània	1

Taula 3: Dades immunotinció VEGF altres proliferacions melanocítiques.



Nº Biòpsia	Fase Creixement	Nivell Breslow	Nº vasos Base 200x	Nº vasos Base 400x	Index 200x	Index 400x	VEGF
91-11372	R	0,00	180	67	2,77	3,35	0
91-13872	R	0,00	36	16	1,13	1,60	0
92-9835	R	0,00	22	8	0,45	0,62	0
93-6067	R	0,00	27	10	0,96	0,56	0
93-6826	R	0,00	76	32	0,00	0,00	0
93-11382	R	0,00	40	9	1,08	0,90	0
93-12048	R	0,00	27	11	0,77	0,61	0
91-5673	V	0,93	79	48	3,43	4,00	1
91-5819	R	0,00	42	14	0,00	0,00	1
91-7252	R	0,00	80	18	0,91	0,51	1
91-7461	R	0,00	100	23	1,49	1,53	1
F92-524	R	0,00	33	9	1,14	0,69	1
92-686	R	0,00	134	31	1,33	0,74	1
92-1096	R	0,00	45	14	0,70	0,67	1
92-1740	R	0,00	49	14	1,20	0,93	1
92-7984	R	0,00	66	21	0,99	0,75	1
92-12203	R	0,00	38	16	0,00	0,00	1
93-2602	R	0,00	46	18	1,15	2,00	1
93-2837	R	0,00	35	14	1,40	1,56	1
93-5206	V	0,76	37	13	1,12	1,44	1
93-7767	R	0,00	265	123	2,98	4,24	1
93-10372	V	0,78	56	21	0,88	0,78	1
F93-3736	R	0,00	31	18	1,63	1,50	1
93-6669	R	0,00	28	17	1,27	1,42	1
92-7789	V	0,48	41	27	1,07	5,40	1
91-12339	R	0,00	58	16	0,94	1,07	1
91-2613	V	0,84	117	38	2,66	2,71	2
91-5529	V	0,59	123	66	3,51	3,67	2
91-6114	V	0,61	111	28	2,78	1,65	2
91-9326	V	0,31	61	23	1,30	1,92	2
91-9749	V	0,56	110	49	3,24	2,33	2
92-4714	R	0,00	107	39	4,86	3,55	2
92-7109	R	0,00	37	15	0,34	0,29	2
92-7922	V	0,49	39	15	1,11	1,00	2
92-10057	R	0,00	113	41	0,88	1,00	2
93-3615	V	1,00	64	35	3,20	5,83	2
93-7131	V	0,26	83	48	4,61	6,00	2
93-7881	R	0,00	21	8	1,11	0,62	2
93-9225	R	0,00	59	31	0,78	0,86	2
F93-2128	R	0,00	65	24	1,14	1,09	2
93-11831	V	0,62	31	17	1,82	1,89	2
91-13174	V	0,67	54	25	0,71	1,14	3
93-8207	V	0,62	33	13	1,22	0,76	3
93-9003	R	0,00	47	24	2,14	3,00	3
F93-1419	V	0,73	50	23	1,79	1,92	3

R: Radial; V: Vertical.

Taula 3: Dades immunotinció VEGF melanomes cutanis

**2.- 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.**

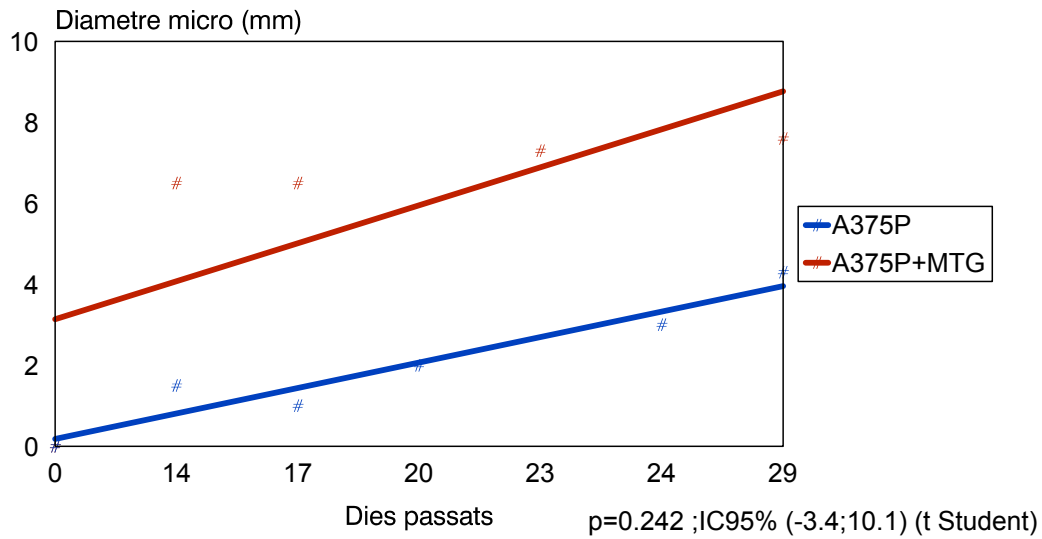
***2.1.- Efecte de la co-injecció amb Matrigel sobre el creixement tumoral.***

Sobre 52 inòculs practicats, 7 no han pogut ser valorats, restant un total de 45. Els valors els podem trobar a la Taula 4.

A la línia A375P, les mitjanes dels diàmetres tumorals han estat: el dia 14 post-inoculació, 1.5 mm; el dia 17, 1 mm; el dia 20, 2 mm; el dia 24, 3 mm, i finalment el dia 29, 4.3 mm. Al cas de la línia A375P co-injectada amb Matrigel, els diàmetres han donat els següents valors: el dia 14 post-inoculació, 6.5 mm; el dia 17, 6.5 mm; el dia 23, 7.3 mm; i el dia 29, 7.6 mm. Practicada la prova t de Student per comparar les mitjanes dels diàmetres tumorals assolits el dia 29 post-inoculació entre els dos grups, amb i sense Matrigel, tot i haver-hi una tendència les diferències no són significatives:  $p=0.242$ , IC 95% (-3.4; 10.1), com ho reflexa el Gràfic 8.

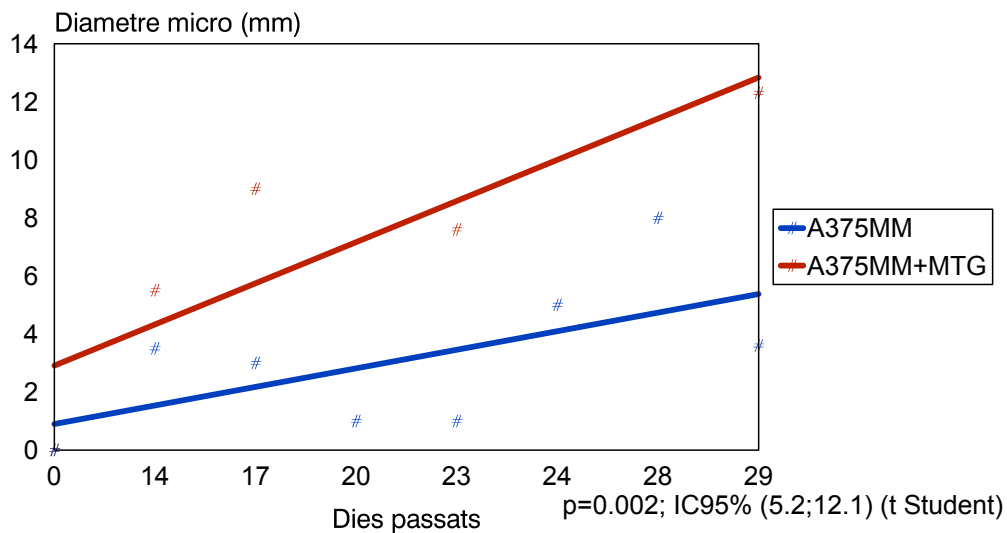
A la línia A375MM hem trobat els següents resultats: el dia 14 post-inoculació, 3.5 mm; el dia 17, 3 mm; el dia 20, 1 mm; el dia 23, 1 mm; el dia 24, 5 mm; el dia 28, 8 mm; finalment, el dia 29, 3.6 mm. A la línia A375MM co-injectada amb Matrigel, les mitjanes han estat: el dia 14, 5.5 mm; el dia 17, 9 mm; el dia 23, 7.6 mm; i el dia 29, 12.3 mm. Aquí sí hi ha hagut diferències significatives en la comparació dels diàmetres tumorals mitjançant la prova t de Student el dia 29 post-inoculació, en forma de major creixement a la línia coinjectada amb Matrigel:  $p=0.002$ , IC 95% (5.20; 12.1). Ho veiem al Gràfic 9.

## Relacio entre coinjeccio amb Matrigel i Creixement tumoral a la linia A375P



Grafic 8: ausencia de diferencias en la taxa de creixement a la linia A375P

## Relacio entre coinjeccio amb Matrigel i Creixement tumoral a la linia A375MM

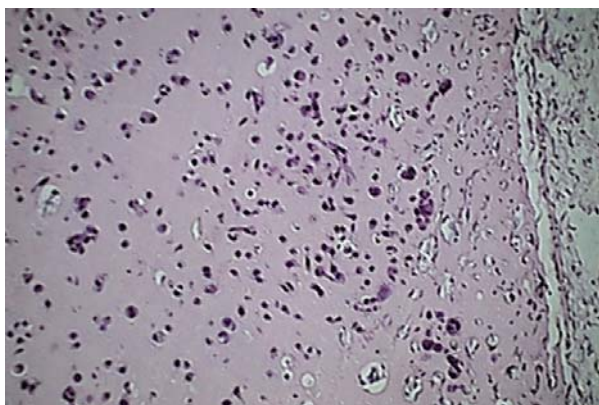


Grafic 9: major taxa de creixement amb la coinjeccio amb matrigel a la linia A375MM

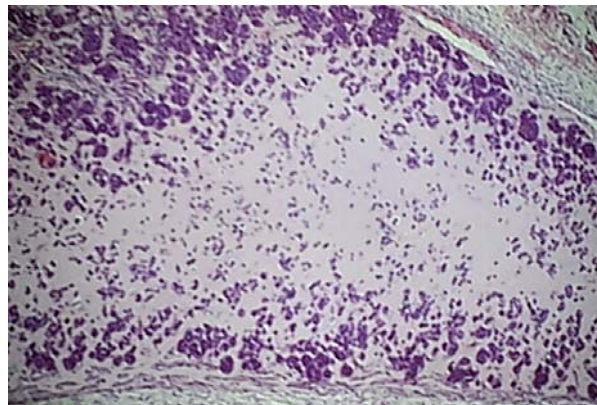
## RESULTATS

### ***2.2.- Valoració de l'angiogènesi.***

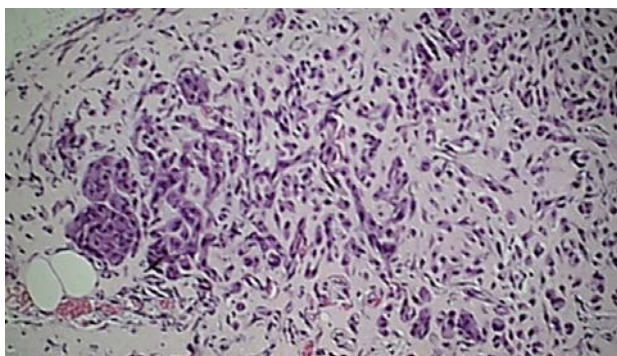
L'angiogènesi ha estat massiva a tots els tumors. El gran nombre de vasos i llurs freqüents interconnexions han impedit el comptatge morfològic del nombre de vasos amb la tinció per al factor VIII. A la següent seqüència fotogràfica veiem com evolucionen la neovascularització i el creixement tumorals dintre el Matrigel, i com el nombre de vasos es fa incomptable: a la imatge 1, cèl.lules de melanoma soltes dintre un material amorf (Matrigel), amb presència de vasos en neoformació incipients, que predominen a la perifèria del Matrigel; 2, on es distingeixen ja nius cel.lulars i alguns vasos sanguinis majors; 3, proliferació cel.lular i vascular massives.



Imatge 1: cèl.lules soltes, vasos perifèrics i aïllats.



Imatge 2: nius cel.lulars i vasos prominents.

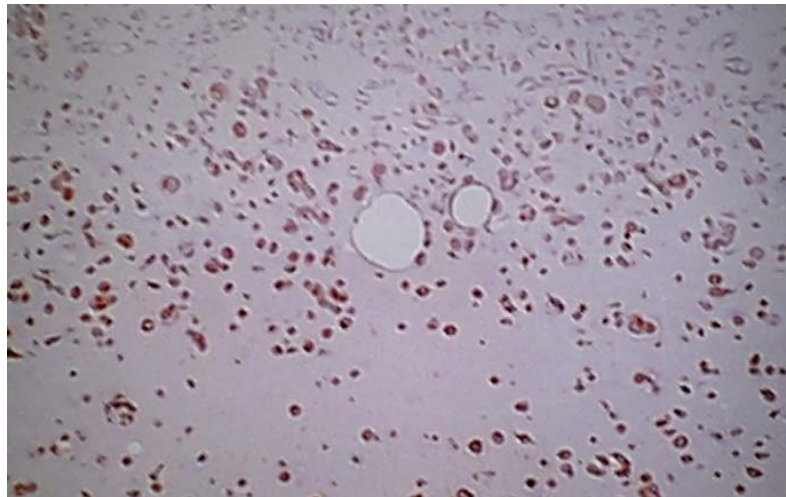


Imatge 3: proliferació cel.lular i vascular massives.

### ***2.3.- Valoració de l'expressió del VEGF.***

Tots els melanomes inoculats han presentat immunotinció positiva per al VEGF, oscil.lant la gradació entre 1 i 3. En concret, en 9 de 31 tumors el valor del VEGF ha estat de 1 (29%), en 18 el VEGF ha estat de 2 (58%) i en 4 ha estat de 3 (13%). Totes les dades es veuen reflexades a la Taula 5 annexa.

Podem veure a continuació un exemple iconogràfic.



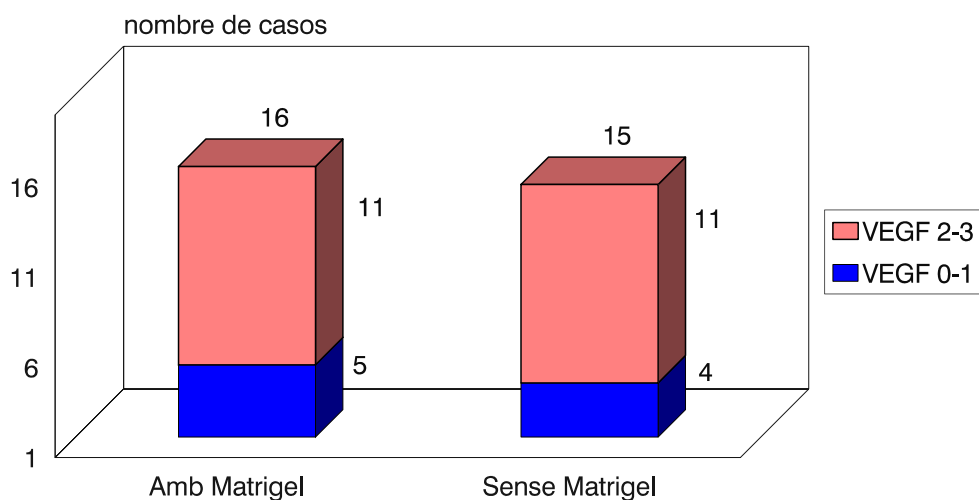
Immunotinció per al VEGF en un melanoma co-injectat amb Matrigel.

## RESULTATS

### 2.3.1.- Relació entre l'expressió del VEGF i la co-injecció amb Matrigel.

16 tumors en total han estat co-injectats amb Matrigel, i 15 tumors sense Matrigel. Dels 16 tumors co-injectats amb Matrigel, 5 han resultat amb un grau baix d'immunotinció per al VEGF (0-1) front 11 amb grau alt (VEGF 2-3). Als tumors inoculats sols, a 4 el VEGF ha estat de grau baix (0-1), i a 11 ha estat de grau alt (2-3). Les diferències, és clar, no són significatives (test exacte de Fisher,  $p=1.000$ ). Ho podem veure reflexat al Gràfic 10.

### Relació entre expressió de VEGF i coinjecció amb Matrigel



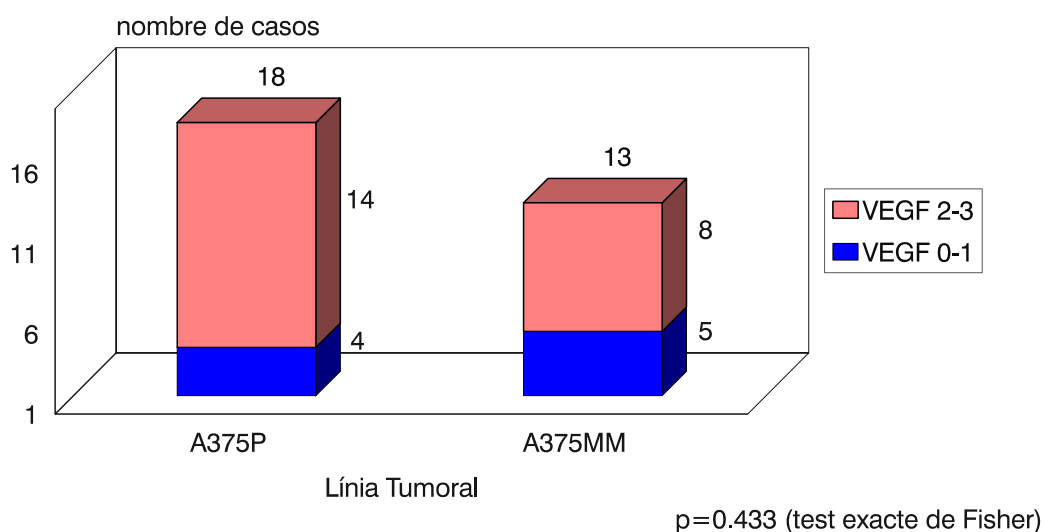
$p=1.000$  (test exacte de Fisher)

Gràfic 10: Absència d'associació entre coinjecció amb Matrigel i expressió de VEGF.

**2.3.2.- Relació entre l'expressió del VEGF i la línia tumoral.**

18 ratolins han estat inoculats amb la línia de melanoma humà A375P, i la resta (13) amb la línia A375MM. Per a la línia A375P, el grau d'immunotinció per al VEGF ha estat baix (0-1) a 4 casos, i ha resultat alt (2-3) a 14. Per a la línia A375MM, el grau ha estat baix (0-1) a 5 casos, i alt (2-3) a 8 casos. Les diferències no són significatives (test exacte de Fisher,  $p=0.433$ ). Ens ho mostra el Gràfic 11.

**Relacio entre expressio de VEGF i linia tumoral inoculada**



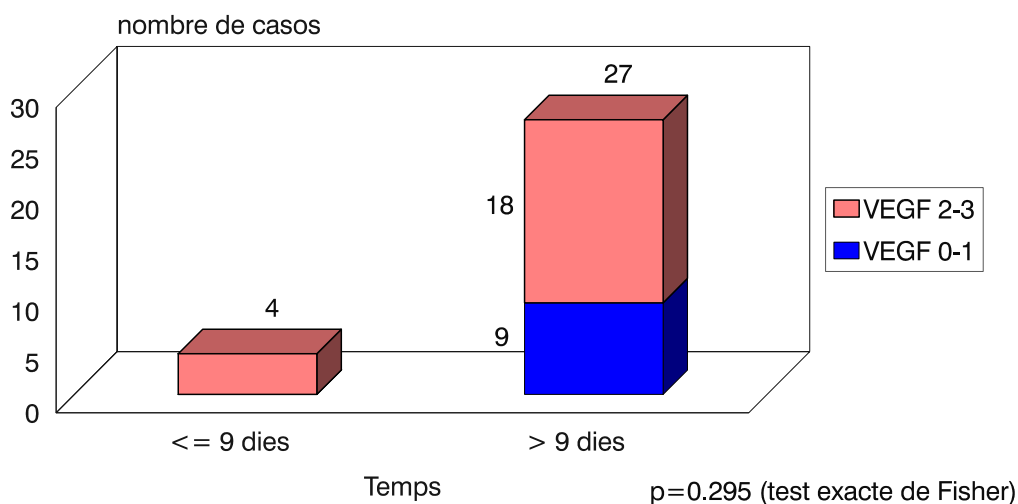
Gràfic 11: Manca d'associació entre linia inoculada i expressio de VEGF.

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

**2.3.3.1.- Relació entre l'expressió del VEGF i temps d'evolució del tumor.**

4 dels tumors desenvolupats han estat operats en un lapse de temps molt curt (dies 3,5,7 i 9 post-inoculació), i la resta posteriorment de forma seqüencial fins a 38 dies després de la inoculació. A tots els 4 tumors operats aviat (fins a 9 dies post-inoculació), el grau d'immunotinció per al VEGF ha estat sempre alt (2-3). En canvi, dels tumors operats més tard, 18 han resultat amb el grau d'immunotinció alt per al VEGF (2-3) front 9 amb grau baix (0-1) (Gràfic 12). Les diferències tampoc són significatives (test exacte de Fisher,  $p=0.295$ ), tot i que amb una mostra més gran n'haurien estat.

**Relacio entre expressio de VEGF i temps d'evolucio del tumor inoculat**



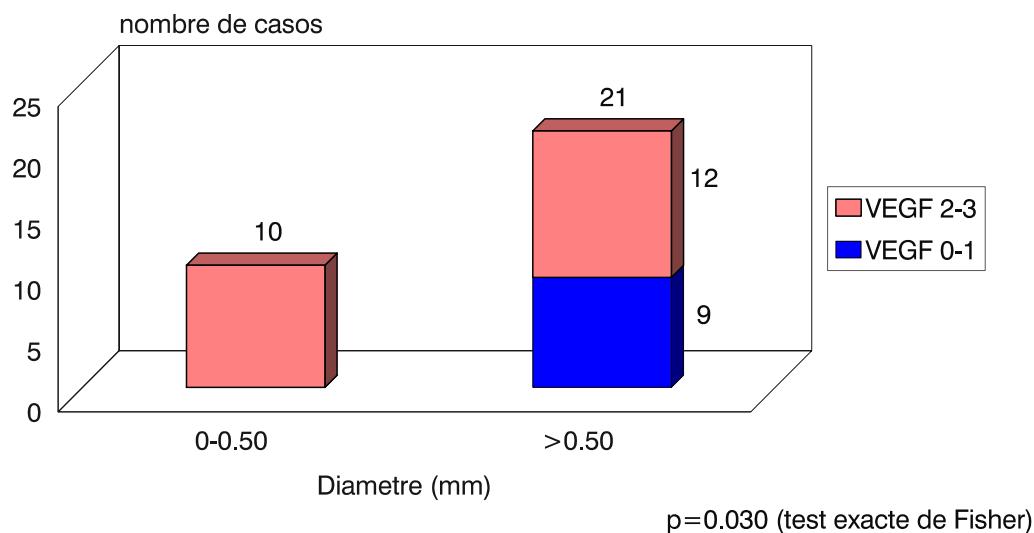
Gràfic 12: Major proporció de casos amb immunotincio intensa per al VEGF als tumors mes incipients. Estadística no significativa pel baix nombre de casos.



**2.3.3.2.- Relació VEGF i diàmetre tumoral.**

En el moment de ser intervinguts els tumors, un total de 10 tenien un diàmetre menor o igual a 0.50 mm; a la resta, el diàmetre era major. Tots els 10 tumors de diàmetre inferior o igual a 0.50 mm han resultat amb un grau d'immunotinció alt per al VEGF (2-3). Dels 21 tumors operats amb un diàmetre major, a 9 s'ha trobat un grau baix d'immunotinció per al VEGF (0-1) front 12 amb un grau alt (2-3). Aquí les diferències sí han estat significatives (test exacte de Fisher,  $p=0.030$ ) (Gràfic 13).

**Relacio entre expressio de VEGF i diametre tumoral**



Gràfic 13: Major expressio de VEGF als tumors mes petits.

RESULTATS

Ratolí	Línia inoculada	Matrigel	Dies passats per biòpsia	Diàmetre mm
1	A375MM	no	14	4
2	A375MM	no	14	3
3	A375MM	sí	14	8
4	A375MM	sí	14	3
5	A375P	no	14	2
6	A375P	no	14	1
7	A375P	no	14	2
8	A375P	no	14	1
9	A375P	sí	14	7
10	A375P	sí	14	6
11	A375MM	no	17	3
12	A375MM	sí	17	10
13	A375MM	sí	17	8
14	A375P	no	17	1
15	A375P	sí	17	6
16	A375P	sí	17	7
17	A375MM	no	20	1
18	A375MM	no	20	1
19	A375P	no	20	3
20	A375P	no	20	1
21	A375MM	no	23	1
22	A375MM	sí	23	7
23	A375MM	sí	23	6
24	A375MM	sí	23	10
25	A375P	sí	23	8
26	A375P	sí	23	3
27	A375P	sí	23	11
28	A375MM	no	24	5
29	A375P	no	24	2
30	A375P	no	24	4
31	A375MM	no	28	7
32	A375MM	no	28	9
33	A375P	no	28	6
34	A375MM	no	29	4
35	A375MM	no	29	5
36	A375MM	no	29	2
37	A375MM	sí	29	11
38	A375MM	sí	29	14
39	A375MM	sí	29	12
40	A375P	no	29	1
41	A375P	no	29	4
42	A375P	no	29	8
43	A375P	sí	29	5
44	A375P	sí	29	9
45	A375P	sí	29	9

**Taula 4:** Creixement tumoral i Matrigel.

Identif mostra	Línia inoculada	Matrigel	Data Inocul.	Data Intervenció	Dies passats	VEGF	Diàmetre mm
p-1-0	A375P	no	14/3/95	24/3/95	10	3	0,00
p-3-0	A375P	no	14/3/95	24/3/95	10	2	0,00
p-4-0	A375P	no	14/3/95	18/4/95	35	1	1,50
p-5-0	A375P	no	14/3/95	4/4/95	21	2	0,57
p-6-0	A375P	no	14/3/95	18/4/95	35	2	1,50
p-8-0	A375P	no	14/3/95	18/4/95	35	1	1,22
p-9-0	A375P	no	14/3/95	4/4/95	21	2	0,62
p-1-m	A375P	si	14/3/95	24/3/95	10	3	0,00
p-2-m	A375P	si	14/3/95	24/3/95	10	2	0,00
p-3-m	A375P	si	14/3/95	24/3/95	10	2	0,00
p-4-m	A375P	si	14/3/95	24/3/95	10	2	0,00
p-7-m	A375P	si	14/3/95	18/4/95	35	1	0,51
p-8-m	A375P	si	14/3/95	18/4/95	35	2	1,50
p-10-m	A375P	si	14/3/95	28/3/95	14	1	0,85
m-1-0	A375MM	no	14/3/95	28/3/95	14	2	0,55
m-2-0	A375MM	no	14/3/95	28/3/95	14	1	0,62
m-3-0	A375MM	no	14/3/95	18/4/95	35	2	1,02
m-5-0	A375MM	no	14/3/95	21/4/95	38	2	1,05
m-7-0	A375MM	no	14/3/95	21/4/95	38	2	1,03
m-8-0	A375MM	no	14/3/95	4/4/95	21	2	0,90
m-9-0	A375MM	no	14/3/95	18/4/95	35	2	1,55
m-10-0	A375MM	no	14/3/95	4/4/95	21	1	0,82
m-1-m	A375MM	si	14/3/95	24/3/95	10	2	0,00
m-4-m	A375MM	si	14/3/95	28/3/95	14	2	0,56
m-5-m	A375MM	si	14/3/95	18/4/95	35	1	1,15
m-7-m	A375MM	si	14/3/95	21/4/95	38	1	0,72
m-9-m	A375MM	si	14/3/95	18/4/95	35	1	0,92
r-1-b	A375P	si	24/5/95	27/5/95	3	2	0,50
r-2-b	A375P	si	24/5/95	29/5/95	5	3	0,50
r-3-b	A375P	si	24/5/95	31/5/95	7	2	0,70
r-4-b	A375P	si	24/5/95	2/6/95	9	3	0,50

**Taula 5:** Immunotinció VEGF melanomes inoculats.

**3.- Anàlisi de l'efecte de la modificació genètica de l'expressió de VEGF sobre les dues línies de melanoma humà A375P i A375MM xenoempeltades a ratolins atímics.**

***3.1.- Avaluació de la influència de la modificació genètica de l'expressió de VEGF sobre el volum tumoral als primers estadis de desenvolupament tumoral.***

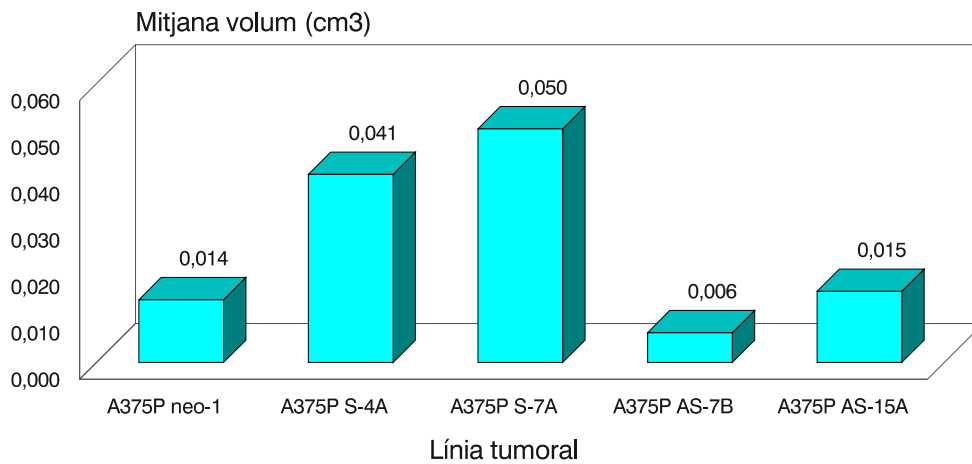
Dels dos inòculs practicats a cada ratolí, el primer (tumors petits) ha estat intervingut el mateix dia a tots (6 dies post-inoculació a la línia A375P, i 5 dies a la A375MM). A cada tumor se li ha mesurat el diàmetre extern o pre-operatori i intern o post-operatori, i a partir d'aquests s'ha calculat el volum individual i la mitjana de volum per a cada gàbia (Taules 6, 7, 8 i 9, corresponents a les 2 línies).

Les mitjanes dels volums dels tumors petits a la línia A375P han estat com segueix (Taula 7): al clon A375P neo-1, 0.0398 cm<sup>3</sup> per al volum extern, 0.0135 cm<sup>3</sup> per al volum intern; pel clon A375P S-4 A, 0.1538 cm<sup>3</sup> de volum extern, 0.0405 cm<sup>3</sup> de volum intern; al clon A375P S-7 A, 0.1285 cm<sup>3</sup> volum extern, 0.0503 cm<sup>3</sup> volum intern; al clon A375P AS-7 B, 0.0134 cm<sup>3</sup> volum extern, 0.0064 cm<sup>3</sup> volum intern; i finalment, al clon A375P AS-15 A, 0.0344 cm<sup>3</sup> volum extern, 0.0153 cm<sup>3</sup> volum intern.

A la línia A375MM, les mitjanes dels volums dels tumors petits han resultat (Taula 9): al clon A375MM neo-3, 0.036 cm<sup>3</sup> per al volum extern, 0.0205 cm<sup>3</sup> per al volum intern; pel clon A375MM S-3, 0.2312 cm<sup>3</sup> de volum extern, 0.1581 cm<sup>3</sup> de volum intern; al clon A375MM S-8 A, 0.1218 cm<sup>3</sup> volum extern, 0.0927 cm<sup>3</sup> volum intern; clon A375MM AS-2, 0.1218 cm<sup>3</sup> volum extern, 0.0648 cm<sup>3</sup> volum intern; finalment, clon A375MM AS-4, 0.0873 cm<sup>3</sup> volum extern, 0.0496 cm<sup>3</sup> volum intern.

En podem veure una representació gràfica d'aquests resultats als Gràfics 14, 15, 16 i 17.

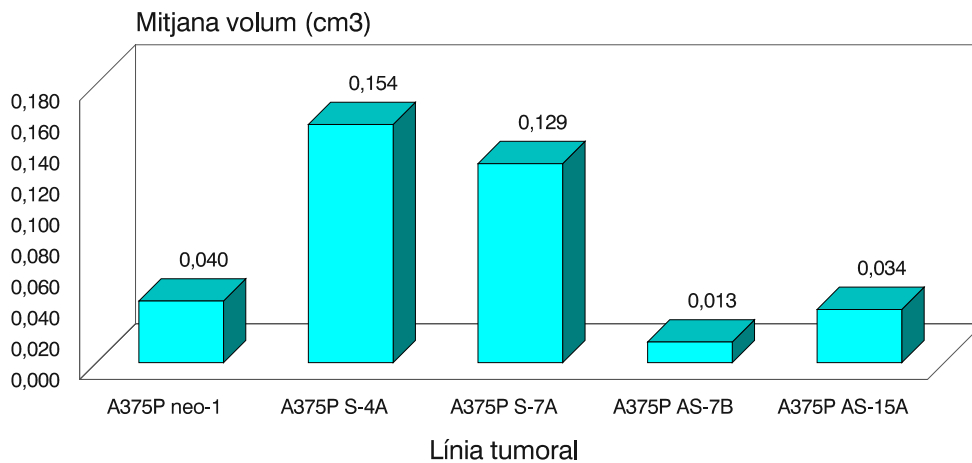
## Mitjana dels volums als tumors incipients A375P



Mesura interna

Gràfic 14: Major creixement a les fases incipients del desenvolupament als tumors amb la transfecció en sentit.

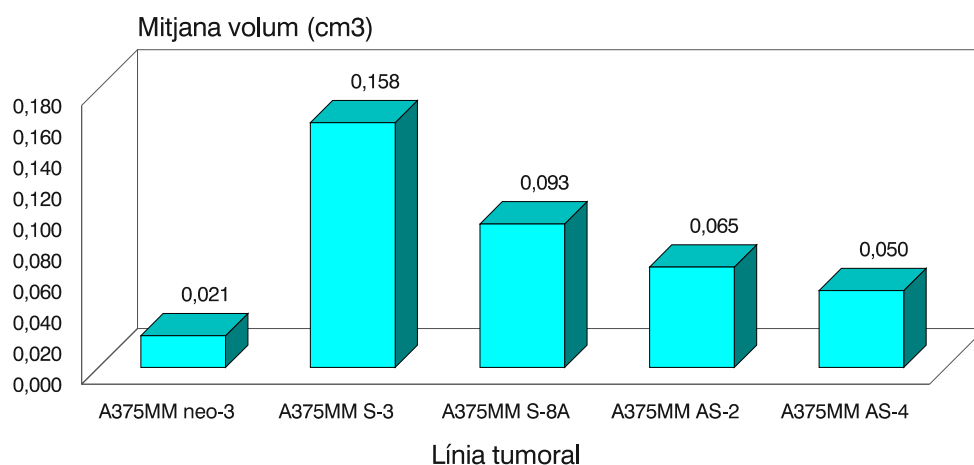
## Mitjana dels volums als tumors incipients A375P



Mesura externa

Gràfic 15: Major creixement a les fases incipients del desenvolupament als tumors amb la transfecció en sentit.

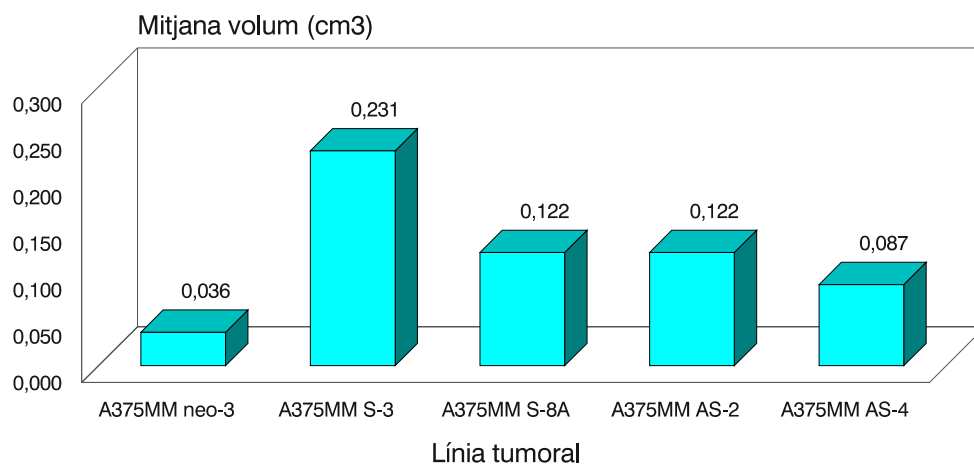
## Mitjana dels volums als tumors incipients A375MM



Mesura interna

Gràfic 16: Tendència a major creixement a les fases inicials del desenvolupament als tumors amb la transfecció en sentit.

## Mitjana dels volums als tumors inicials A375MM



Mesura externa

Gràfic 17: Tendència a major creixement a les fases inicials del desenvolupament als tumors amb la transfecció en sentit.

**3.1.1.- Avaluació de la influència de la transfecció del cDNA del VEGF en sentit sobre el volum tumoral als primers estadis de desenvolupament tumoral a la línia A375P.**

Les mitjanes dels volums dels tumors petits a la línia A375P han estat com segueix: per al clon control (A375P neo-1), la mitjana del volum extern  $0.0398 \text{ cm}^3$ , i la mitjana del volum intern  $0.0135 \text{ cm}^3$ . Als dos clons en sentit, al cas del clon A375P S-4 A,  $0.1538 \text{ cm}^3$  per al volum extern,  $0.0405 \text{ cm}^3$  per al volum intern; al clon A375P S-7 A,  $0.1285 \text{ cm}^3$  de volum extern,  $0.0503 \text{ cm}^3$  de volum intern (Taula 7).

A l'aplicar la prova de U de Mann-Whitney s'assoleixen diferències significatives en tots els casos:

- A375P neo-1 (control) versus A375P S-4A (sentit):

- al comparar el volum extern,  $p=0.0269$

- al comparar el volum intern,  $p=0.0177$

- A375P neo-1 (control) versus A375P S-7A (sentit):

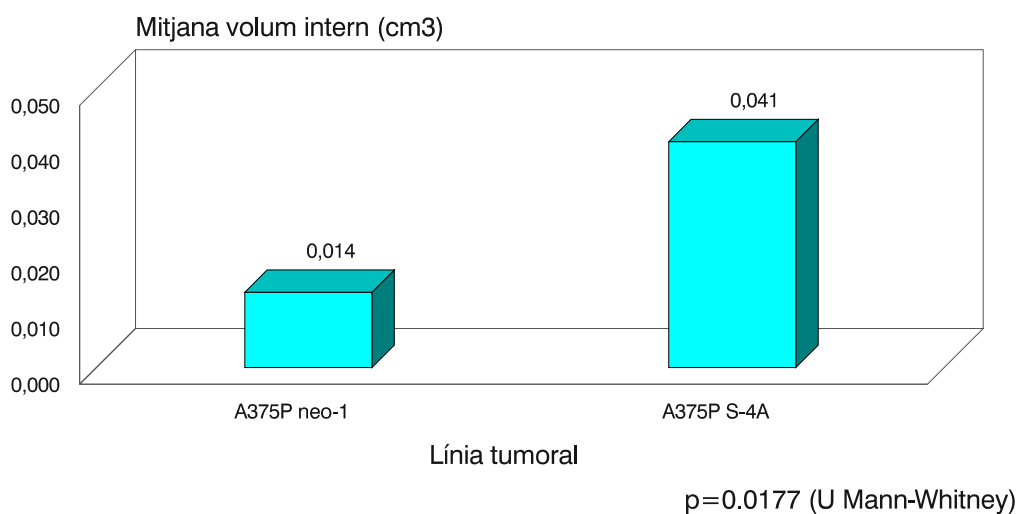
- al comparar el volum extern,  $p=0.0144$

- al comparar el volum intern,  $p=0.0046$

Ho veiem reflexat en els Gràfics 18 i 19 que segueixen.

## Mitjana dels volums als tumors inicials

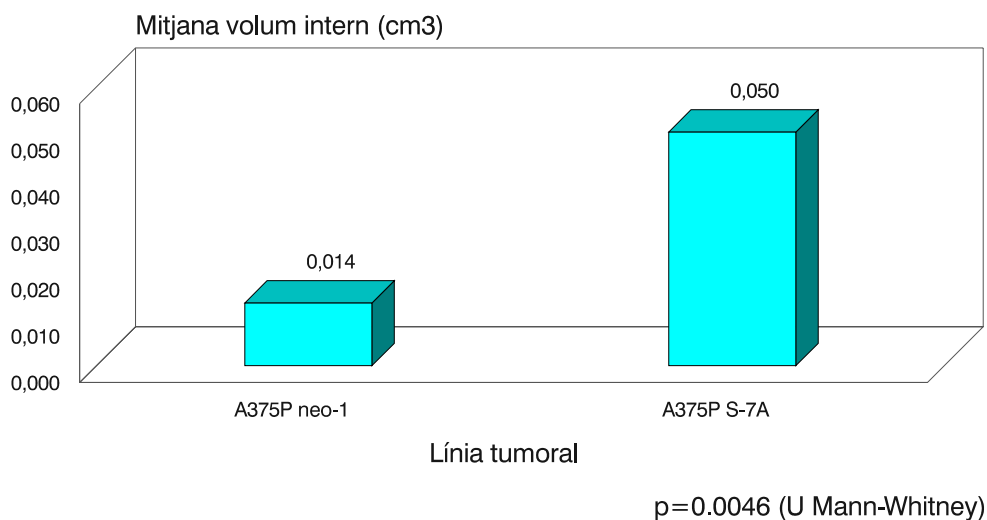
A375P - control versus S-4A



Gràfic 18: Major creixement tumoral amb la transfecció en sentit.

## Mitjana dels volums als tumors inicials

A375P - control versus S-7A



Gràfic 19: Major creixement tumoral amb la transfecció en sentit.



**3.1.2.- Avaluació de la influència de la transfecció del cDNA del VEGF en antisentit sobre el volum tumoral als primers estadis de desenvolupament tumoral a la línia A375P.**

Les mitjanes dels volums dels tumors petits a la línia A375P en aquest cas han estat com segueix: per al clon control (A375P neo-1), la mitjana del volum extern  $0.0398 \text{ cm}^3$ , i la mitjana del volum intern  $0.0135 \text{ cm}^3$ . Als dos clons en antisentit, al clon A375P AS-7 B,  $0.0134 \text{ cm}^3$  per al volum extern,  $0.0064 \text{ cm}^3$  per al volum intern; al clon A375P AS-15 A,  $0.0344 \text{ cm}^3$  de volum extern,  $0.0153 \text{ cm}^3$  de volum intern (Taula 7).

Tot i haver-hi una tendència (control versus AS-7B), les diferències no són significatives a l'aplicar la prova U de Mann-Whitney:

- A375P neo-1 (control) versus A375P AS-7B (antisentit):

- al comparar el volum extern,  $p=0.0678$

- al comparar el volum intern,  $p=0.0528$

- A375P neo-1 (control) versus A375P AS-15A (antisentit):

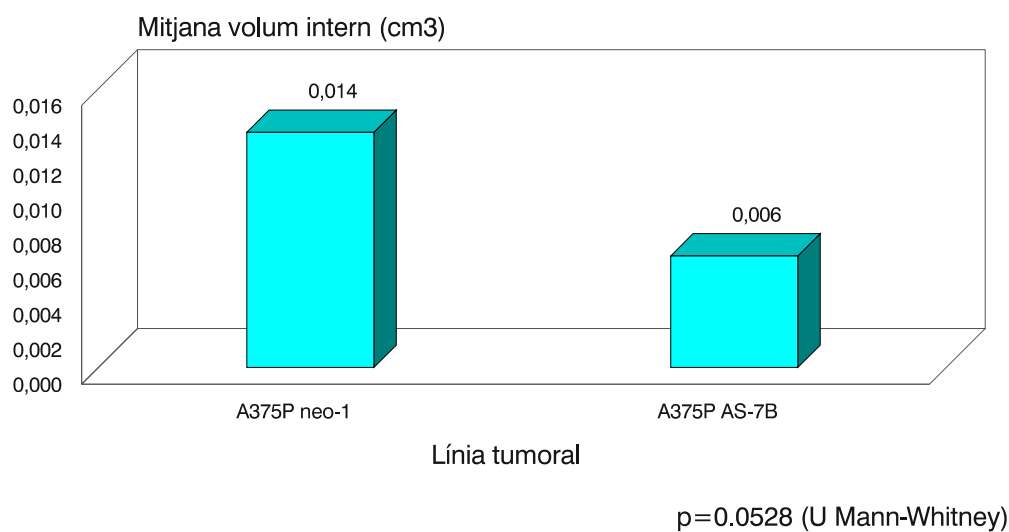
- al comparar el volum extern,  $p=0.7346$

- al comparar el volum intern,  $p=1.000$

Ho veiem en els Gràfics 20 i 21.

## Mitjana dels volums als tumors inicials

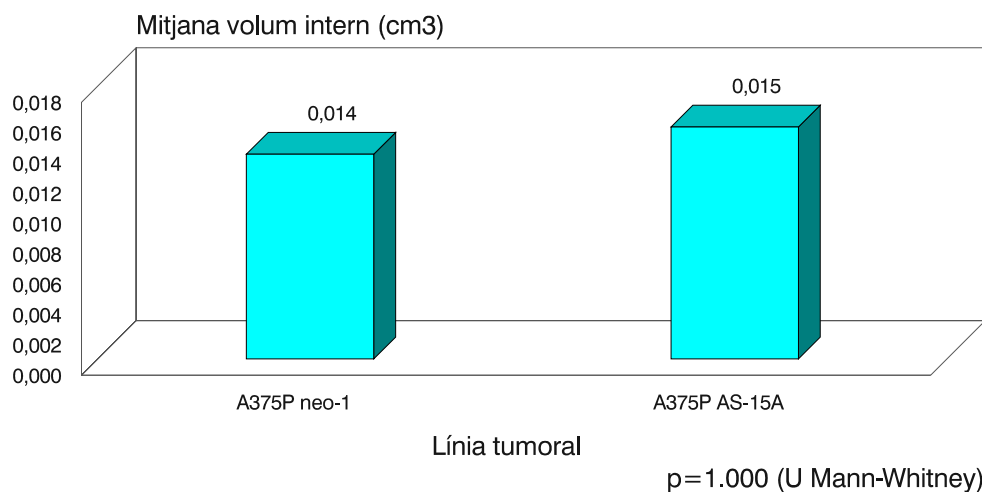
A375P - control versus AS-7B



Gràfic 20: Tendència al menor creixement tumoral amb la transfecció en antisentit.

## Mitjana dels volums als tumora inicials

A375P - control versus AS-15A



Gràfic 21: No efectes de la transfecció en antisentit sobre el creixement tumoral respecte al control.

**3.1.3.- Avaluació de la influència de la transfecció del cDNA del VEGF en sentit sobre el volum tumoral als primers estadis de desenvolupament tumoral a la línia A375MM.**

Les mitjanes dels volums dels tumors petits a la línia A375MM han estat com segueix: per al clon control (A375MM neo-3), la mitjana del volum extern  $0.036 \text{ cm}^3$ , i la mitjana del volum intern  $0.0205 \text{ cm}^3$ . Als dos clons en sentit, al cas del clon A375MM S-3,  $0.2312 \text{ cm}^3$  per al volum extern,  $0.1581 \text{ cm}^3$  per al volum intern; al clon A375MM S-8 A,  $0.1218 \text{ cm}^3$  de volum extern,  $0.0927 \text{ cm}^3$  de volum intern (Taula 9).

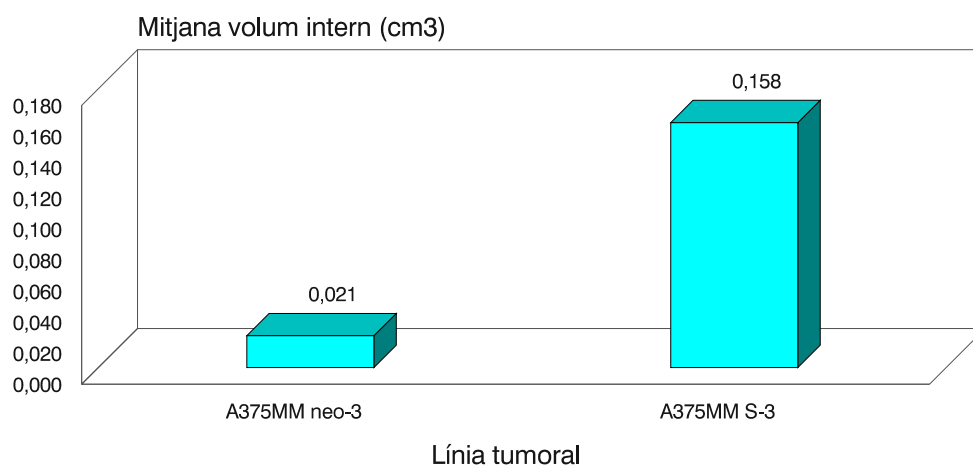
A l'aplicar el test estadístic (U de Mann-Whitney), les diferències són significatives a totes les mesures:

- A375MM neo-3 (control) versus A375MM S-3 (sentit):
  - al comparar el volum extern,  $p=0.0057$
  - al comparar el volum intern,  $p=0.0054$
  
- A375MM neo-3 (control) versus A375MM S-8A (sentit):
  - al comparar el volum extern,  $p=0.0384$
  - al comparar el volum intern,  $p=0.0403$

Resta reflectit als Gràfics 22 i 23.

## Mitjana dels volums als tumors inicials

A375MM - control versus S-3

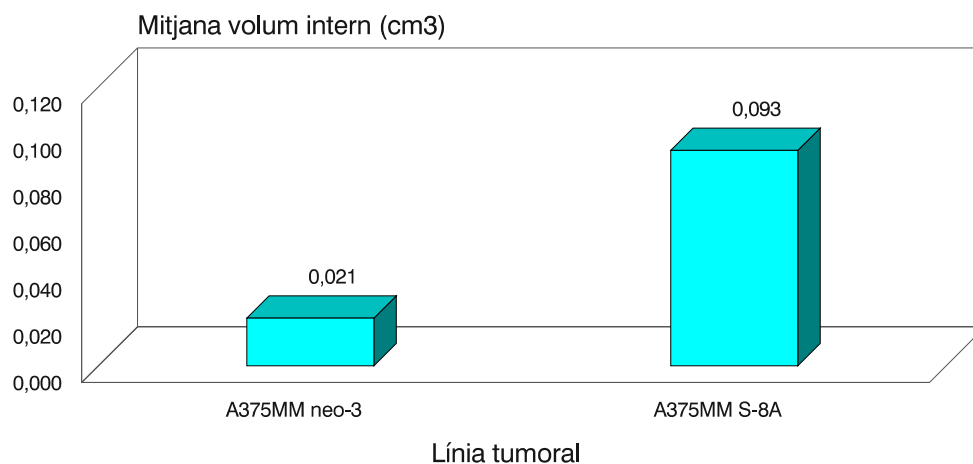


$p=0.0054$  (U Mann-Whitney)

Gràfic 22: Major creixement tumoral amb la transfecció en sentit.

## Mitjana dels volums als tumors inicials

A375MM - control versus S-8A



$p=0.0403$  (U Mann-Whitney)

Gràfic 23: Major creixement tumoral amb la transfecció en sentit.

**3.1.4.- Avaluació de la influència de la transfecció del cDNA del VEGF en antisentit sobre el volum tumoral als primers estadis de desenvolupament tumoral a la línia A375MM.**

Les mitjanes dels volums dels tumors petits a la línia A375MM han estat com segueix: per al clon control (A375MM neo-3), la mitjana del volum extern  $0.036 \text{ cm}^3$ , i la mitjana del volum intern  $0.0205 \text{ cm}^3$ . Als dos clons en antisentit, al cas del clon A375MM AS-2,  $0.1218 \text{ cm}^3$  per al volum extern,  $0.0648 \text{ cm}^3$  per al volum intern; al clon A375MM AS-4,  $0.0873 \text{ cm}^3$  de volum extern,  $0.0496 \text{ cm}^3$  de volum intern (Taula 9).

L'estadística (U de Mann-Whitney) no arriba a la significació (excepte en un cas), i la tendència és a l'inrevés del que buscàvem:

- A375MM neo-3 (control) versus A375MM AS-2 (antisentit):

- al comparar el volum extern,  $p=0.0384$

- al comparar el volum intern,  $p=0.0724$

- A375MM neo-3 (control) versus A375MM AS-4 (antisentit):

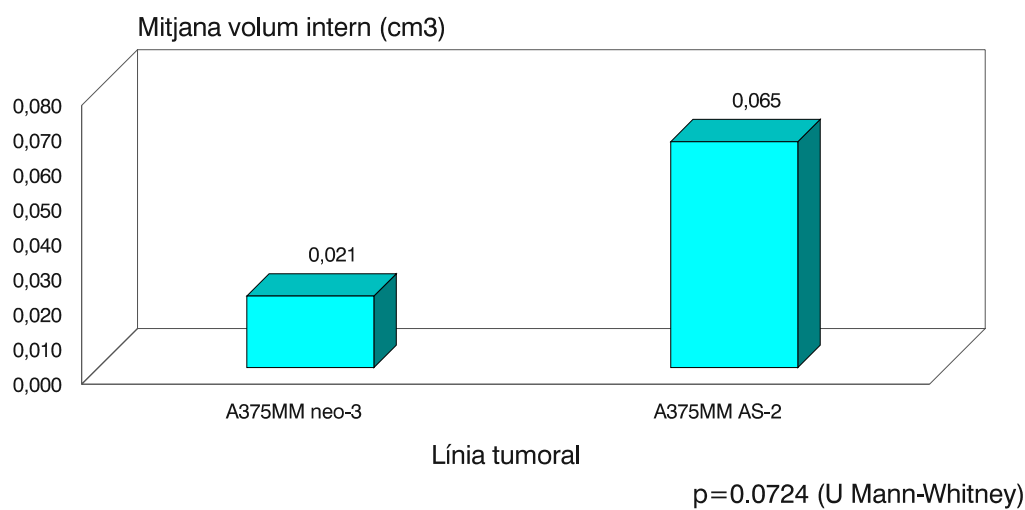
- al comparar el volum extern,  $p=0.0586$

- al comparar el volum intern,  $p=0.1218$

Als següents Gràfics (24 i 25) ho veiem.

## Mitjana dels volums als tumors inicials

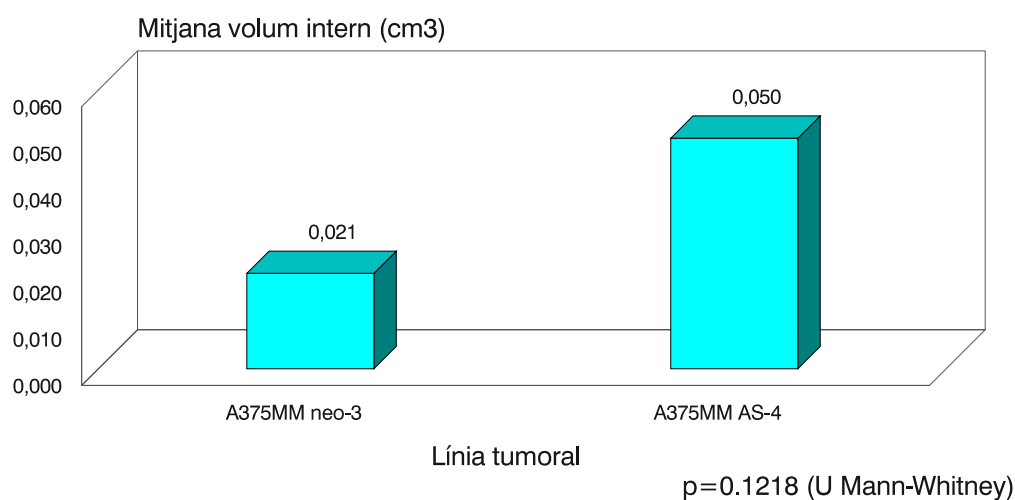
A375MM - control versus AS-2



Gràfic 24: No diferències respecte al control en el creixement tumoral, amb la transfecció en antisentit.

## Mitjana dels volums als tumors inicials

A375MM - control versus AS-4



Gràfic 25: No diferències en el creixement tumoral respecte al control, amb la transfecció en antisentit.

Rat	Gàbia	Id ratolí	Línia inoculada	Dies passats	mida mm externa	mida mm interna	vol extern cm3	vol intern cm3
1	A	-	A375P-neo1	6	3	3	0.0135	0.0135
2	A	* -	A375P-neo1	6	3	3	0.0135	0.0135
3	A	- *	A375P-neo1	6	4	3	0.032	0.0135
4	A	* - *	A375P-neo1	6	4	3	0.032	0.0135
5	A	** -	A375P-neo1	6	6	3	0.108	0.0135
6	B	-	A375P S-4A	6	5	4	0.0625	0.032
7	B	* -	A375P S-4A	6	7	5	0.1715	0.0625
8	B	- *	A375P S-4A	6	6	4	0.108	0.032
9	B	* - *	A375P S-4A	6	9	5	0.3645	0.0625
10	B	** -	A375P S-4A	6	5	3.5	0.0625	0.0135
11	C	-	A375P S-7A	6	5	4	0.0625	0.032
12	C	* -	A375P S-7A	6	6	4	0.108	0.032
13	C	- *	A375P S-7A	6	6	5	0.108	0.0625
14	C	* - *	A375P S-7A	6	6	5	0.108	0.0625
15	C	** -	A375P S-7A	6	8	5.5	0.256	0.0625
16	D	-	A375P AS-7B	6	4	3	0.032	0.0135
17	D	* -	A375P AS-7B	6	2	1	0.004	0.0005
18	D	- *	A375P AS-7B	6	-	1	-	0.0005
19	D	* - *	A375P AS-7B	6	2	2.5	0.004	0.004
20	D	** -	A375P AS-7B	6	3	3	0.0135	0.0135
21	E	-	A375P AS-15A	6	4	3	0.032	0.0135
22	E	* -	A375P AS-15A	6	5	4	0.0625	0.032
23	E	- *	A375P AS-15A	6	4	3	0.032	0.0135
24	E	* - *	A375P AS-15A	6	4	2.5	0.032	0.004
25	E	** -	A375P AS-15A	6	3	3	0.0135	0.0135

Data inòcul: 1/03/99

Data extirpació: 7/03/99

**Taula 6:** A375P - Volums tumors petits.

Gàbia	Línia inoculada	mitjana volum tumoral extern	mitjana volum tumoral operat	n
A	A375P neo-1	0.0398	0.0135	5
B	A375P S-4A	0.1538	0.0405	5
C	A375P S-7A	0.1285	0.0503	5
D	A375P AS-7B	0.0134	0.0064	5
E	A375P AS-15A	0.0344	0.0153	5

**Taula 7:** A375P - Mitjana volums tumors petits.

RESULTATS

Rat	Gàbia	Identificació ratolí	Línia inoculada	Dies passats	mida mm externa	mida mm tm. operat	vol extern cm3	vol intern cm3
26	F	-	A375MM-neo3	5	3	1	0.0135	0.0005
27	F	* -	A375MM-neo3	5	4	3	0.032	0.0135
28	F	- *	A375MM-neo3	5	3	4	0.0135	0.032
29	F	* - *	A375MM-neo3	5	4	3	0.032	0.0135
30	F	** -	A375MM-neo3	5	5	4	0.0625	0.032
31	F	- **	A375MM-neo3	5	5	4	0.0625	0.032
32	G	-	A375MM S-3	5	8	6	0.256	0.108
33	G	* -	A375MM S-3	5	8	5	0.256	0.0625
34	G	- *	A375MM S-3	5	9	8	0.3645	0.256
35	G	* - *	A375MM S-3	5	7	8	0.1715	0.256
36	G	** -	A375MM S-3	5	6	6	0.108	0.108
37	H	-	A375MM S-8A	5	7	5	0.1715	0.0625
38	H	* -	A375MM S-8A	5	7	7	0.1715	0.1715
39	H	- *	A375MM S-8A	5	7	6	0.1715	0.108
40	H	* - *	A375MM S-8A	5	5	6	0.0625	0.108
41	H	** -	A375MM S-8A	5	4	3	0.032	0.0135
42	I	-	A375MM AS-2	5	7	6	0.1715	0.108
43	I	* -	A375MM AS-2	5	7	4	0.1715	0.032
44	I	- *	A375MM AS-2	5	5	6	0.0625	0.108
45	I	* - *	A375MM AS-2	5	7	5	0.1715	0.0625
46	I	** -	A375MM AS-2	5	4	3	0.032	0.0135
47	J	-	A375MM AS-4	5	4	4	0.032	0.032
48	J	* -	A375MM AS-4	5	5	3	0.0625	0.0135
49	J	- *	A375MM AS-4	5	5	5	0.0625	0.0625
50	J	* - *	A375MM AS-4	5	7	6	0.1715	0.108
51	J	** -	A375MM AS-4	5	6	4	0.108	0.032

Data inòcul: 7/03/99

Data extirpació: 12/03/99

**Taula 8:** A375MM - Volums tumors petits.

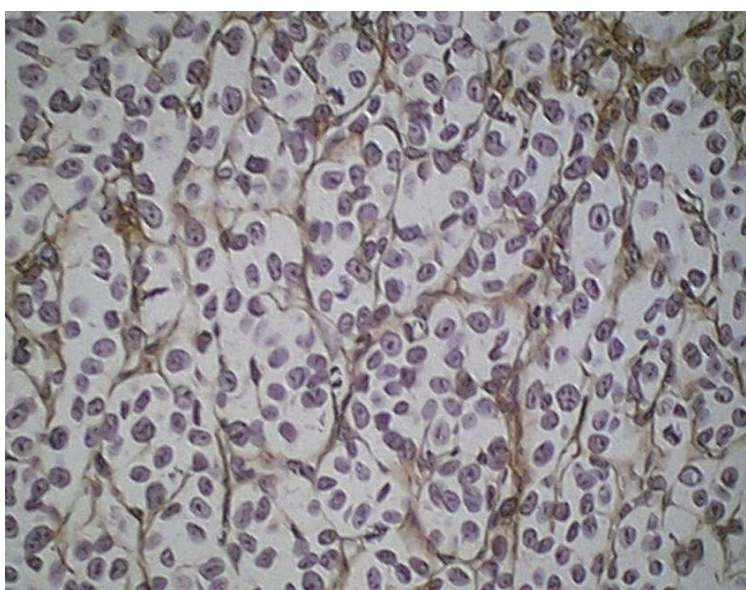
Gàbia	Línia inoculada	Mitjana volum tumoral extern	Mitjana volum tumoral operat	n
F	A375MM neo-3	0.036	0.02058	6
G	A375MM S-3	0.2312	0.1581	5
H	A375MM S-8A	0.1218	0.0927	5
I	A375MM AS-2	0.1218	0.0648	5
J	A375MM AS-4	0.0873	0.0496	5

**Taula 9:** A375MM - Mitjana volums tumors petits.



### ***3.2.- Avaluació de la influència de la modificació genètica de l'expressió de VEGF sobre la vascularització als primers estadis del desenvolupament tumoral.***

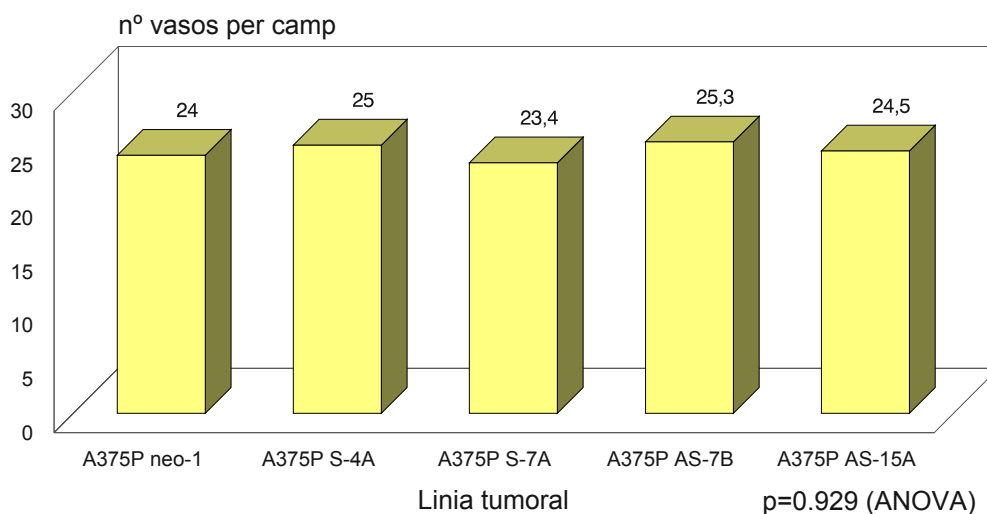
El patró i aspecte vascular han estat morfològicament normals amb la tinció efectuada amb Ac contra el Factor VIII. Ho veiem exemplificat a la següent microfotografia:



Immunotinció Factor VIII: nius cel·lulars tumorals i patró vascular morfològicament normal.

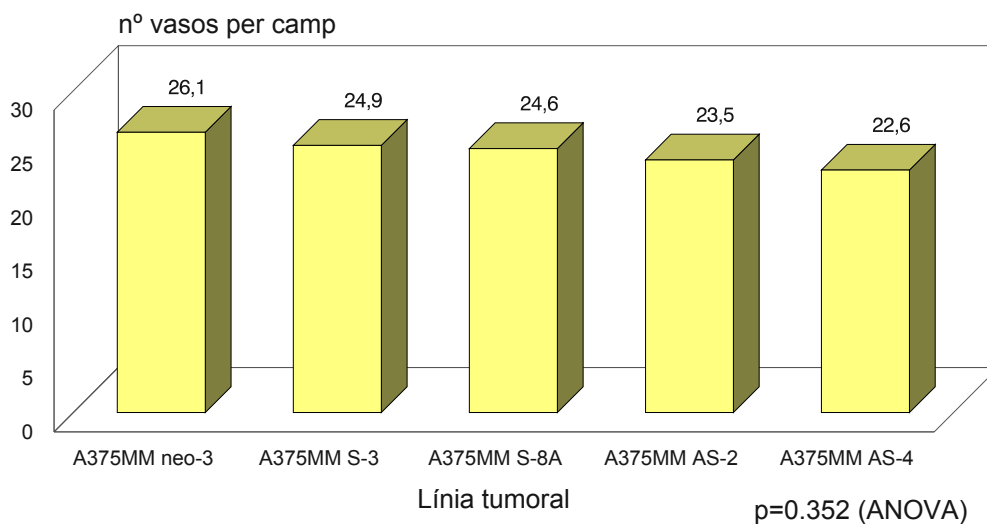
Els valors de la mitjana del comptatge vascular per a cada clon, amb la tinció per al Factor VIII segons el mètode descrit, són com segueix (Taula 10): Al A375P neo-1, el Factor VIII és de 24.05; al A375P S-4 A, 25; al A375P S-7 A, 23.35; al A375P AS-7B, 25.3; A375P AS-15 A, 24.45; A375MM neo-3, 26.12; A375MM S-3, 24.9; A375MM S-8 A, 24.6; A375MM AS-2, 23.55; i finalment A375MM AS-4, 22.6. Ho podem veure als Gràfics 26 i 27, on queda clar que no hi ha diferències entre els diferents clons (mitjançant la prova d'Anàlisi de Variància, la  $p=0.929$  a la línia A375P, i  $p=0.352$  a la A375MM).

## Quantificacio de la densitat vascular A375P



Grafic 26: No diferencies en la densitat vascular (Factor VIII) entre els grups.

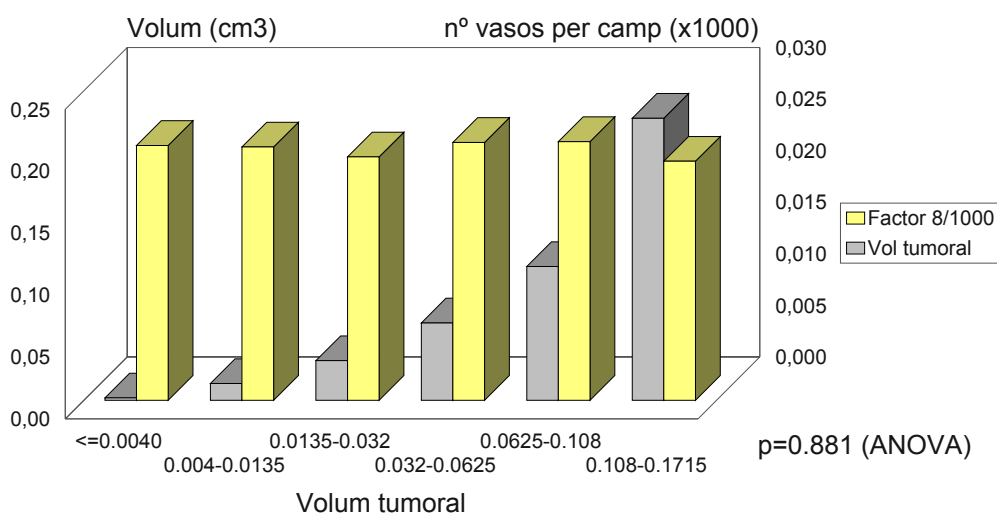
## Quantificacio de la densitat vascular A375MM



Grafic 27: No diferencies en la densitat vascular (Factor VIII) entre els grups.

Per veure si la vascularització hagués pogut ser diferent en estadis encara més temprans, hem repartit els tumors en diferents grups segons la seva mida, calculant la mitjana del valor de la immunotinció pel Factor VIII a cada grup. El resultat és (Taula 10): als tumors amb volum  $\leq 0.004 \text{ cm}^3$ , la mitjana del Factor VIII ha estat de 24.7; volum =  $0.0135 \text{ cm}^3$ , Factor VIII de 24.55; volum =  $0.032 \text{ cm}^3$ , Factor VIII de 23.59; volum =  $0.0625 \text{ cm}^3$ , Factor VIII de 25; volum =  $0.108 \text{ cm}^3$ , Factor VIII de 25.07; i finalment, volum  $\geq 0.1715 \text{ cm}^3$ , Factor VIII de 23.17. El Gràfic 28 ens reflexa que no hi ha diferències ni en els tumors més petits (ANOVA;  $p=0.881$ ).

## Relacio densitat vascular / volum tumoral A375P i A375MM



Gràfic 28: El volum tumoral no influencia en la densitat vascular dels tumors (Factor VIII).

RESULTATS

<b>Mitjana factor VIII segons la línia</b>		
<b>Línia</b>	<b>Gàbia</b>	<b>Nº vasos per camp</b>
A375P neo-1	1	24.05
A375P S-4A	2	25
A375P S-7A	3	23.35
A375P AS-7B	4	25.3
A375P AS-15A	5	24.45
A375MM neo-3	6	26.12
A375MM S-3	7	24.9
A375MM S-8A	8	24.6
A375MM AS-2	9	23.55
A375MM AS-4	10	22.6

<b>Mitjana volum del tumor petit segons la línia</b>		
<b>Línia</b>	<b>Gàbia</b>	<b>Mitjana vol cm3</b>
A375P neo-1	1	0.0135
A375P S-4A	2	0.0405
A375P S-7A	3	0.0503
A375P AS-7B	4	0.0064
A375P AS-15A	5	0.0153
A375MM neo-3	6	0.0206
A375MM S-3	7	0.1581
A375MM S-8A	8	0.0927
A375MM AS-2	9	0.0648
A375MM AS-4	10	0.0496

<b>Mitjana factor VIII segons el volum del tumor petit</b>	
<b>Volum tumor petit</b>	<b>Nº vasos per camp</b>
volum <= 0.0040 cm3	24.7
volum = 0.0135 cm3	24.55
volum = 0.0320 cm3	23.59
volum = 0.0625 cm3	25.00
volum = 0.108 cm3	25.07
volum >= 0.1715 cm3	23.17

<b>Mitjana del volum segons els grups de vol del Tm petit</b>	
<b>Grups de volum del Tm petit</b>	<b>Mitjana vol cm3</b>
volum <= 0.0040 cm3	0.0019
volum = 0.0135 cm3	0.0135
volum = 0.0320 cm3	0.0320
volum = 0.0625 cm3	0.0625
volum = 0.108 cm3	0.108
volum >= 0.1715 cm3	0.2278

**Taula 10:** Immunotinció Factor VIII.

### ***3.3.- Avaluació de la influència de la modificació genètica de l'expressió de VEGF sobre la corba de creixement dels tumors desenvolupats.***

Les Taules i Gràfics corresponents reflecteixen l'evolució de les mides i volums dels tumors en els diferents clons emprats, i la seva traducció gràfica (Taules 11 i 12, corresponents a la mitjana de corba de volums segons els dies passats, una taula per a cada línia tumoral), (Gràfics 29 i 30, corresponents a la corba de creixement per a  $n \geq 2$ , en ambdues línies tumorals).

La transfecció del cDNA del VEGF en sentit ha condicionat, tant a la línia A375P com a la A375MM, un creixement molt més ràpid en totes les transfeccions realitzades excepte al clon A375MM S-8 A. En canvi, no s'han apreciat diferències entre les corbes de creixement dels clons control i els clons amb el tractament en antisentit en cap cas, ni a la línia A375P ni a la A375MM, excepte al clon A375MM AS-2 a partir del dia 19 després de l'inòcul.

Per a avaluar-ho estadísticament, s'ha aplicat la prova t de Student comparant la mitjana dels dies que triga cada clon en assolir un volum tumoral predeterminat, en concret el volum de  $0.32 \text{ cm}^3$ . S'han trobat els següents resultats:

- A375P neo-1 (control) versus A375P S-4 A (sentit):  $p=0.010$ ; IC 95% (5.65; 23.95)
- A375P neo-1 (control) versus A375P S-7 A (sentit):  $p=0.000$ ; IC 95% (20.46; 39.14)
- A375P neo-1 (control) versus A375P AS-7 B (antisentit):  $p=0.132$ ; IC 95% (-2.71; 15.51)
- A375P neo-1 (control) versus A375P AS-15 A (antisentit):  $p=0.162$ ; IC 95% (-8.27; 37.87)
- A375MM neo-3 (control) versus A375MM S-3 (sentit):  $p=0.302$ ; IC 95% (-7.96; 22.90)
- A375MM neo-3 (control) versus A375MM S-8 A (sentit):  $p=0.299$ ; IC 95% (-24.81; 8.54)
- A375MM neo-3 (control) versus A375MM AS-2 (antisentit):  $p=0.910$ ; IC 95% (-16.97; 17.8)

## RESULTATS

- A375MM neo-3 (control) versus A375MM AS-4 (antisentit):  $p=0.214$ ; IC 95% (-32.12; 8.25)

Així, les úniques corbes la diferència de les quals pren significació estadística respecte al control són les dels clons amb la transfecció en sentit a la línia A375P. A la resta, no hi ha diferències significatives. Al cas del clon en sentit A375MM S-3, tot i que el gràfic ens mostra una clara diferència en el creixement, la  $p$  no és significativa.

Podem veure com a exemple les dues següents imatges, corresponents als tumors desenvolupats en dos ratolins diferents. Les diferències són ostensibles entre la transfecció en sentit i control. Els dos ratolins van ser inoculats simultàniament (9 dies abans).

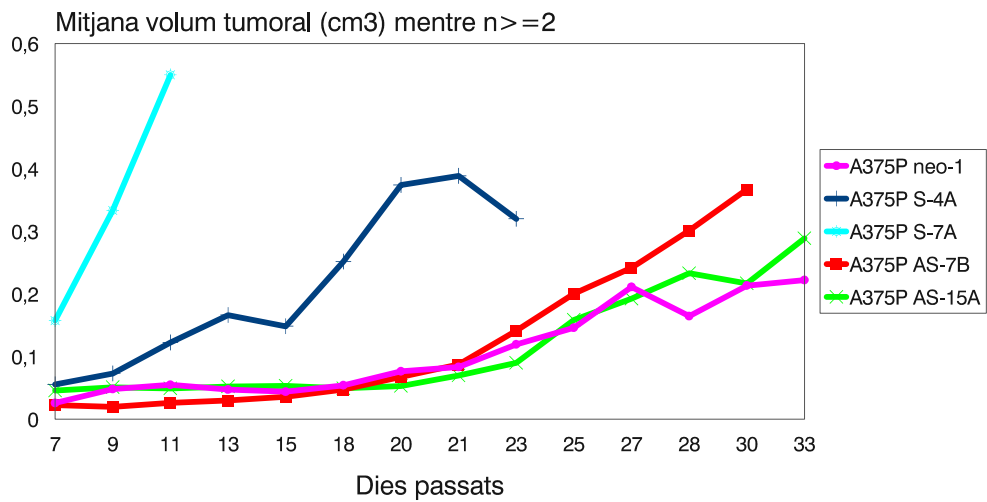


Tumor als 9 dies amb la transfecció en sentit



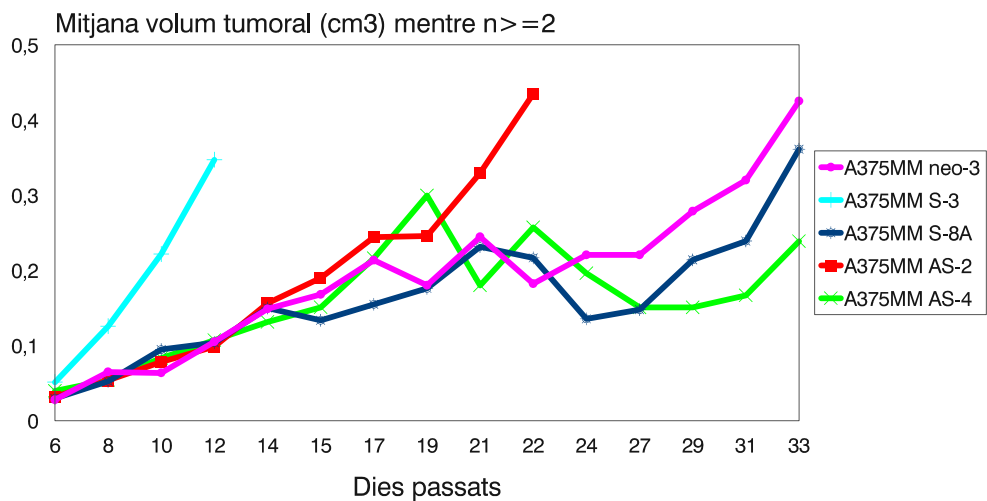
Tumor als 9 dies amb la transfecció control

## Corba de creixement dels tumors inoculats A375P



Grafic 29: Els tumors amb la transfecció en sentit creixen més ràpid que el control. No diferències en el creixement entre control i antisentit.

## Corba de creixement dels tumors inoculats A375MM



Grafic 30: No hi ha diferències en el creixement, excepte a una de les línies amb la transfecció en sentit, que creix més ràpid.

## RESULTATS

Per tal d'evitar el biaix d'inoculacions menors o més profundes (que conduirien a una detecció més tardana dels tumors i per tant a resultats incorrectes), s'ha calculat el temps mitjà per doblar el volum tumoral per a cada clon partint d'un volum inicial concret triat de forma arbitrària (s'ha mesurat per a dos volums inicials, de 0.0135 i de 0.04 cm<sup>3</sup>). Els resultats han estat paral·lels als de les corbes de creixement, tal i com s'aprecia als gràfics corresponents que segueixen (Taules 13, 14, 15 i 16, corresponents a les Taules per doblar el volum pels dos Volums inicials - Vi i per a les dues línies) (Gràfics 31, 32, 33 i 34, corresponents als 4 gràfics per doblar el volum, 2 per a cada línia)

Per a l'avaluació estadística, s'ha aplicat la prova t de Student, comparant entre els diferents clons la mitjana de dies que ha trigat cadascun d'ells en assolir un múltiple del volum inicial triat. En concret, s'han comparat les mitjanes dels dies en assolir el volum de 0.0135 cm<sup>3</sup> per 16 (0.216 cm<sup>3</sup>), i les mitjanes dels dies en assolir el volum de 0.04 cm<sup>3</sup> per 4 (0.16 cm<sup>3</sup>). Els resultats han estat com segueix:

1.- Comparació dels dies en assolir el volum de 0.216 cm<sup>3</sup> (0.0135 x 16):

- A375P neo-1 (control) versus A375P S-4 A (sentit): p=0.170; IC 95% (-4.25; 20.25)
- A375P neo-1 (control) versus A375P S-7 A (sentit): p=0.013; IC 95% (4.46; 28.34)
- A375P neo-1 (control) versus A375P AS-7 B (antisentit): p=0.942; IC 95% (-12.70; 11.90)
- A375P neo-1 (control) versus A375P AS-15 A (antisentit): p=0.572; IC 95% (-16.70; 9.90)
  
- A375MM neo-3 (control) versus A375MM S-3 (sentit): p=0.018; IC 95% (1.69; 13.91)
- A375MM neo-3 (control) versus A375MM S-8 A (sentit): p=0.756; IC 95% (-9.68; 7.28)
- A375MM neo-3 (control) versus A375MM AS-2 (antisentit): p=0.637; IC 95% (-5.08; 7.88)
- A375MM neo-3 (control) versus A375MM AS-4 (antisentit): p=0.735; IC 95% (-10.45; 7.65)

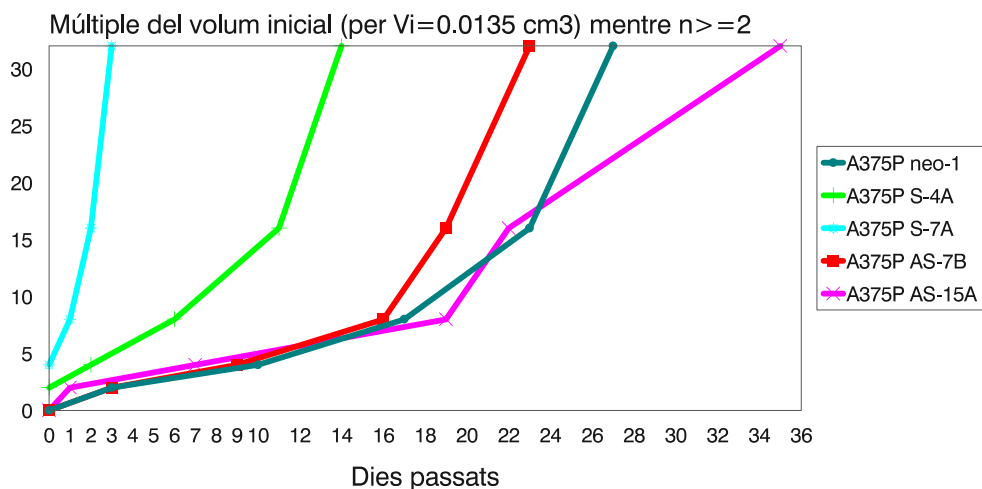


2.- Comparació dels dies en assolir el volum de  $0.16 \text{ cm}^3$  ( $0.04 \times 4$ ):

- A375P neo-1 (control) versus A375P S-4 A (sentit):  $p=0.042$ ; IC 95% (0.52; 20.48)
- A375P neo-1 (control) versus A375P S-7 A (sentit):  $p=0.029$ ; IC 95% (3.33; 30.47)
- A375P neo-1 (control) versus A375P AS-7 B (antisentit):  $p=0.065$ ; IC 95% (-0.83; 20.63)
- A375P neo-1 (control) versus A375P AS-15 A (antisentit):  $p=0.802$ ; IC 95% (-11.10; 8.90)
  
- A375MM neo-3 (control) versus A375MM S-3 (sentit):  $p=0.052$ ; IC 95% (-0.038; 9.24)
- A375MM neo-3 (control) versus A375MM S-8 A (sentit):  $p=0.703$ ; IC 95% (-4.74; 6.74)
- A375MM neo-3 (control) versus A375MM AS-2 (antisentit):  $p=0.725$ ; IC 95% (-4.18; 5.78)
- A375MM neo-3 (control) versus A375MM AS-4 (antisentit):  $p=1.000$ ; IC 95% (-5.63; 5.63)

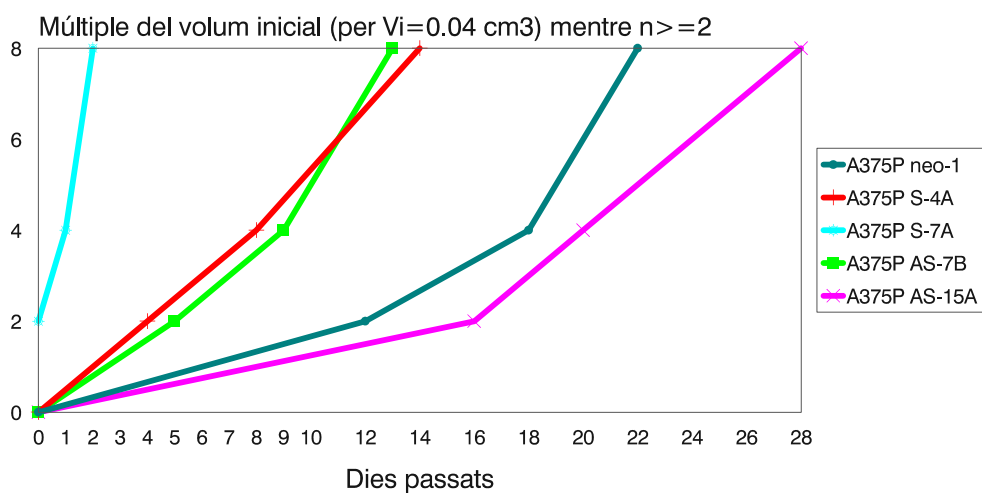
Veiem així significació estadística a la línia A375P al comparar el clon control amb els clons amb la transfecció en sentit a 3 de 4 casos, i a la línia A375MM a 1 de 4 casos. No veiem significació estadística a cap de les comparacions entre clon control i clon amb transfecció en antisentit, ni a la línia A375P ni a la A375MM. Els resultats són doncs paral·lels als obtinguts de la corba de creixement prèvia.

## Mitjana dies per doblar el volum tumoral A375P



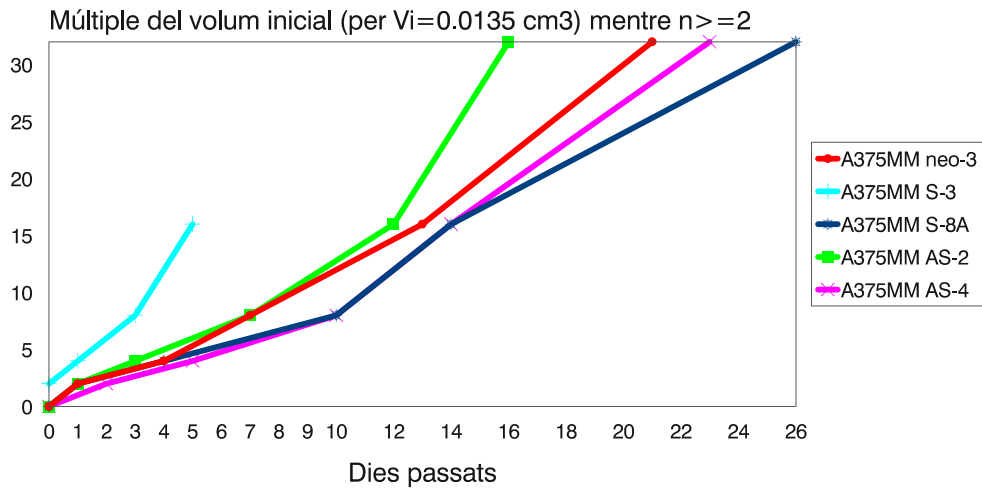
Grafic 31: Els tumors amb la transfecció en sentit doblen el seu volum amb major rapidesa. No diferències entre el control i la transfecció en antisentit.

## Mitjana dies per doblar el volum tumoral A375P



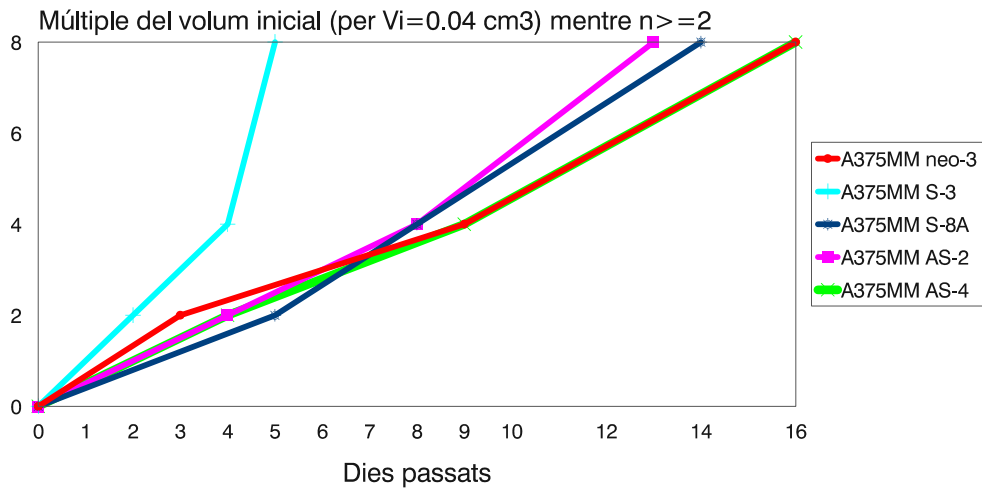
Grafic 32: Creixement més ràpid amb la transfecció en sentit.

## Mitjana dies per doblar el volum tumoral A375MM



Grafic 33: Només una línia (S-3, transfecció en sentit) dobla el volum més ràpidament.

## Mitjana dies per doblar el volum tumoral A375MM



Grafic 34: No diferències significatives en la taxa de creixement tumoral entre les diferents línies transfectades.

RESULTATS

Gàbia	Línia	Mitjana volums tumorals en cm <sup>3</sup> / dies passats									
		7	9	11	13	15	18	20	21	23	25
A	neo-1	0.0259	0.0482	0.055	0.0475	0.044	0.0542	0.0765	0.0835	0.1195	0.1461
B	S-4A	0.0556	0.073	0.1225	0.1663	0.1484	0.2516	0.374	0.3886	0.32	
C	S-7A	0.1575	0.3337	0.55							
D	AS-7B	0.0226	0.0198	0.0263	0.03	0.036	0.0475	0.0677	0.0875	0.1416	0.2007
E	AS-15A	0.0458	0.0512	0.0493	0.0524	0.0534	0.0494	0.0531	0.0699	0.09	0.1588

Data inòcul: 1/03/99

Gàbia	Mitjana volums tumorals en cm <sup>3</sup> / dies passats									
	27	28	30	33	35	37	39	42	44	
A	0.2113	0.1646	0.2135	0.2222	0.144	0.2205	0.2205	0.3452	0.4455	
B										
C										
D	0.2419	0.3016	0.367	0.343						
E	0.1925	0.2331	0.217	0.289	0.162	0.198	0.352	0.65		

Taula 11: A375P - Mitjana corba de volums.

Gàbia	Línia	Mitjana volums tumorals en cm <sup>3</sup> / dies passats									
		6	8	10	12	14	15	17	19	21	22
F	neo-3	0.0278	0.0649	0.0636	0.1050	0.1487	0.1679	0.2136	0.1801	0.2445	0.1822
G	S-3	0.0512	0.1255	0.2215	0.347						
H	S-8A	0.0297	0.0525	0.0947	0.1037	0.15	0.1336	0.1548	0.176	0.2315	0.2166
I	AS-2	0.032	0.0537	0.0781	0.0985	0.1564	0.1899	0.2442	0.2456	0.3296	0.435
J	AS-4	0.0397	0.0542	0.0833	0.1072	0.1313	0.1508	0.216	0.2996	0.18	0.2572

Data inòcul: 7/03/99

Gàbia	Mitjana volums tumorals en cm <sup>3</sup> / dies passats									
	24	27	29	31	33	36	38	40	43	45
F	0.2205	0.2205	0.2787	0.32	0.4252	0.5				
G										
H	0.1355	0.1477	0.214	0.239	0.3612	0.288	0.3645	0.5		
I										
J	0.196	0.1507	0.1507	0.1667	0.2387	0.04	0.04	0.075	0.144	0.144

Gàbia	Mitjana volums tumorals en cm <sup>3</sup> / dies passats									
	47	50	52	54	57					
F										
G										
H										
I										
J	0.144	0.245	0.245	0.32	0.486					

Taula 12: A375MM - Mitjana corba de volums.

Gàbia	Línia inoculada	Data inoculació	Mitjana de dies en doblar el volum				
			Vi x 2	Vi x 4	Vi x 8	Vi x 16	Vi x 32
A	A375P neo-1	01/03/1999	2.5	10	17.2	23.2	27.5
B	A375P S-4A	01/03/1999	0	1.6	5.8	10.6	13.6
C	A375P S-7A	01/03/1999	0	0	0.8	2	3
D	A375P AS-7B	01/03/1999	3	8.8	16.4	19	23
E	A375P AS-15A	01/03/1999	0.4	7.4	18.8	22	35

**Taula 13:** Mitjana de dies en doblar el volum, línia A375P, per Vi = 0.0135 cm<sup>3</sup>

Gàbia	Línia inoculada	Data inoculació	Mitjana de dies en doblar el volum			
			Vi x 2	Vi x 4	Vi x 8	Vi x 16
A	A375P neo-1	01/03/1999	11.25	18.5	22	
B	A375P S-4A	01/03/1999	4	8	14	13
C	A375P S-7A	01/03/1999	0	1.2	2	
D	A375P AS-7B	01/03/1999	5.2	8.6	13	
E	A375P AS-15A	01/03/1999	16	19.6	28	35

**Taula 14:** Mitjana de dies en doblar el volum, línia A375P, per Vi = 0.04 cm<sup>3</sup>

Gàbia	Línia inoculada	Data inoculació	Mitjana de dies en doblar el volum				
			Vi x 2	Vi x 4	Vi x 8	Vi x 16	Vi x 32
F	A375MM neo-3	07/03/1999	1.33	3.66	7.33	13	21
G	A375MM S-3	07/03/1999	0	0.8	3.2	5.2	4
H	A375MM S-8A	07/03/1999	1.2	4	10	14.2	26
I	A375MM AS-2	07/03/1999	0.8	3.2	7.4	11.6	16
J	A375MM AS-4	07/03/1999	2.4	5.4	10	14.4	23.33

**Taula 15:** Mitjana de dies en doblar el volum, línia A375MM, per Vi = 0.0135 cm<sup>3</sup>

Gàbia	Línia inoculada	Data inoculació	Mitjana de dies en doblar el volum		
			Vi x 2	Vi x 4	Vi x 8
F	A375MM neo-3	07/03/1999	3.16	9	16.5
G	A375MM S-3	07/03/1999	2.4	4.4	5.33
H	A375MM S-8A	07/03/1999	5.2	8	14
I	A375MM AS-2	07/03/1999	4.4	8.2	12.75
J	A375MM AS-4	07/03/1999	4	9	15.75

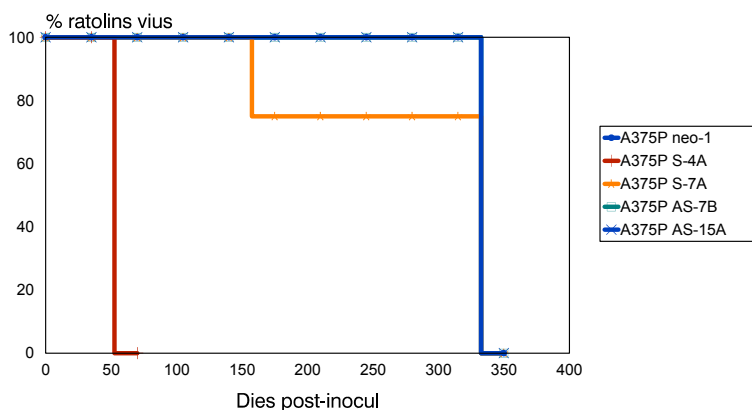
**Taula 16:** Mitjana de dies en doblar el volum, línia A375MM, per Vi = 0.04 cm<sup>3</sup>

## RESULTATS

### 3.4.- Avaluació de la influència de la modificació genètica de l'expressió de VEGF sobre la supervivència dels ratolins inoculats.

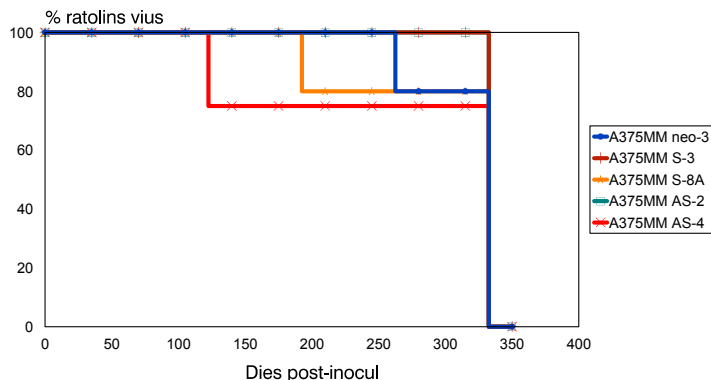
Els ratolins han estat seguits pràcticament fins a un any post-inòcul, moment en el que es considera ja que no moriran per la seva neoplàsia. Tal i com es reflexa als Gràfics 35 i 36 i a les Taules 17 i 18, es pot veure que la majoria de ratolins han sobreviscut tot l'any, essent finalment sacrificats sense malaltia neoplàstica. Només els ratolins inoculats amb un clon, el A375P S-4 A, van morir als 70-80 dies després de l'inòcul. Eventualment algun ratolí d'alguna altra gàbia va morir en el decurs de l'any de seguiment per causes diverses.

#### Mortalitat dels ratolins inoculats A375P



Gràfic 35: Mortalitat temprana només al grup corresponent al clon S-4A (transfeció en sentit).

#### Mortalitat dels ratolins inoculats A375MM



Gràfic 36: Absència de diferències en la mortalitat entre els diferents grups.

Ratolí	Gàbia	Identificació	línia inoculada	Data necròpsia	Dies passats post-inoculació	Comentari
1	A	-	A375P neo-1	14/02/2000	351	
2	A	* -	A375P neo-1	14/02/2000	351	
3	A	- *	A375P neo-1	14/02/2000	351	
4	A	* - *	A375P neo-1	14/02/2000	351	
5	A	** -	A375P neo-1	14/02/2000	351	M1 melsa
6	B	-	A375P S-4A	17/05/1999	77	per gàbia
7	B	* -	A375P S-4A	17/05/1999	77	per gàbia
8	B	- *	A375P S-4A	17/05/1999	77	caquèxia
9	B	* - *	A375P S-4A	10/05/1999	70	caquèxia
10	B	** -	A375P S-4A	17/05/1999	77	exitus sol
11	C	-	A375P S-7A	14/02/2000	351	
12	C	* -	A375P S-7A	14/02/2000	351	
13	C	- *	A375P S-7A	14/10/1999	173	
14	C	* - *	A375P S-7A	Perdut per mort immediata post-operatòria		
15	C	** -	A375P S-7A	14/02/2000	351	
16	D	-	A375P AS-7B	14/02/2000	351	
17	D	* -	A375P AS-7B	14/02/2000	351	
18	D	- *	A375P AS-7B	14/02/2000	351	
19	D	* - *	A375P AS-7B	14/02/2000	351	
20	D	** -	A375P AS-7B	14/02/2000	351	
21	E	-	A375P AS-15A	14/02/2000	351	
22	E	* -	A375P AS-15A	14/02/2000	351	
23	E	- *	A375P AS-15A	14/02/2000	351	
24	E	* - *	A375P AS-15A	14/02/2000	351	
25	E	** -	A375P AS-15A	14/02/2000	351	

M1: Metàstasis

Data inòcul: 1/03/99

**Taula 17:** Supervivència - A375P

RESULTATS

Ratolí	Gàbia	Identificació	Línia inoculada	Data necròpsia	Dies passats post-inoculació	Comentari
26	F	-	A375MM neo-3	14/02/2000	345	
27	F	* -	A375MM neo-3	14/02/2000	345	
28	F	- *	A375MM neo-3	14/02/2000	345	
29	F	* - *	A375MM neo-3	14/02/2000	345	
30	F	** -	A375MM neo-3	17/12/1999	286	caquèxia
31	F	- **	A375MM neo-3	14/02/2000	345	
32	G	-	A375MM S-3	14/02/2000	345	melsa/estom
33	G	* -	A375MM S-3	14/02/2000	345	
34	G	- *	A375MM S-3	14/02/2000	345	
35	G	* - *	A375MM S-3	14/02/2000	345	
36	G	** -	A375MM S-3	14/02/2000	345	
37	H	-	A375MM S-8A	14/02/2000	345	
38	H	* -	A375MM S-8A	14/02/2000	345	
39	H	- *	A375MM S-8A	14/02/2000	345	
40	H	* - *	A375MM S-8A	30/09/1999	207	caquèxia
41	H	** -	A375MM S-8A	14/02/2000	345	
42	I	-	A375MM AS-2	14/02/2000	345	
43	I	* -	A375MM AS-2	14/02/2000	345	
44	I	- *	A375MM AS-2	14/02/2000	345	
45	I	* - *	A375MM AS-2	14/02/2000	345	melsa
46	I	** -	A375MM AS-2	14/02/2000	345	
47	J	-	A375MM AS-4	14/02/2000	345	
48	J	* -	A375MM AS-4	09/08/1999	155	caquèxia
49	J	- *	A375MM AS-4	14/02/2000	345	
50	J	* - *	A375MM AS-4	Perdut per mort immediata post-operatòria		
51	J	** -	A375MM AS-4	14/02/2000	345	

**Taula 18:** Supervivència - A375MM