

Título: DETECCIÓN PRECOZ DE PACIENTES CON ALTO RIESGO DE METÁSTASIS. LA EXPRESIÓN DE GENES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS COMO MARCADOR PRONÓSTICO EN EL CÁNCER DE PIEL

Nombre: García Pérez, Omar

Universidad: Universidad de La Laguna

Departamento: Medicina interna, dermatología y psiquiatría

Fecha de lectura: 23/05/2023

Programa de doctorado: Programa de Doctorado en Ciencias Médicas y Farmacéuticas, Desarrollo y Calidad de Vida por la Universidad de La Laguna

Dirección:

- > **Director:** RICARDO FERNÁNDEZ DE MISA CABRERA
- > **Codirector:** AÍDA ELIZABETH CÓRDOBA LANÚS

Tribunal:

- > **presidente:** Marta Carmen García Bustinduy
- > **secretario:** Félix Claverie Martín
- > **vocal:** Olfa Chiboub

Descriptor:

- > DERMATOLOGIA
- > MARCADORES TUMORALES
- > GENETICA HUMANA
- > GENETICA MOLECULAR

El fichero de tesis ya ha sido incorporado al sistema

Localización: DETECCIÓN PRECOZ DE PACIENTES CON ALTO RIESGO DE METÁSTASIS. LA EXPRESIÓN DE GENES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS COMO MARCADOR PRONÓSTICO EN EL CÁNCER DE PIEL

Resumen: Esta Tesis Doctoral, incluida en el programa de Doctorado Ciencias Médicas y Farmacéuticas, Desarrollo y Calidad de Vida de la Universidad de la Laguna, ha sido realizada en el laboratorio de Dermatología Oncológica de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria y en el laboratorio de Biomarcadores del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias.

El cáncer de piel es el resultado del crecimiento incontrolado de células que conforman la piel. Es el tipo de cáncer más frecuente en todo el mundo y con predominio sobre la población caucásica en áreas expuestas a la luz solar. Enfermedades como el melanoma maligno (MM) y el carcinoma epidermoide cutáneo (CEC) crecen

en incidencia cada año y ambos pueden causar metástasis y la muerte del paciente. Dos vías importantes en el crecimiento y desarrollo tumoral son la angiogénesis y la linfangiogénesis. Ambas rutas a través de la invasión angiolinfática pueden favorecer la diseminación tumoral y un pronóstico negativo para el paciente.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es comprobar si la expresión de los principales genes implicados en la angiogénesis y la linfangiogénesis pueden predecir la existencia de IAL en el MM y el CEC, así como caracterizar la relación existente entre dicha expresión y el pronóstico de los pacientes diagnosticados de las mencionadas enfermedades.

Para poder lograr estos objetivos, identificamos los genes de referencia (fundamentales para la realización de cualquier estudio de expresión génica) en muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFIP) de MM y CEC. ACTB, TFRC, HPRT1 y TBP fueron cuantificados en 123 muestras FFIP (74 MM y 49 CEC) usando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (del inglés qPCR, quantitative polymerase chain reaction). Una vez analizados mediante los softwares NormFinder, BestKeeper y la comparación directa de las medias y desvíos estándar (DE), se encontró que la combinación de los genes HPRT1/ACTB era la mejor opción para estudiar las muestras de MM FFIP y HPRT1/TFRC para estudiar las de CEC FFIP.

Una vez seleccionados los genes de referencia, evaluamos la expresión génica mediante qPCR de genes implicados en la angiogénesis y la linfangiogénesis (VEGFA, VEGFR2, IL8, KI67, UPAR, FVIII, VEGFC, VEGFR3, LYVE1, PDPN) en 80 muestras de MM FFIP con el fin de determinar perfiles moleculares que se correlacionaran con la IAL y el pronóstico de los pacientes. Además, se genotiparon mediante qPCR usando sondas TaqMan, tres polimorfismos de nucleótido único (SNPs, del inglés, single nucleotide polymorphisms) del gen VEGFR2 en muestras de ADN extraído de sangre de 237 pacientes con MM. Se identificó una correlación significativa entre la expresión de LYVE1 y la existencia de IAL en el estudio morfológico de las muestras de MM, tanto cualitativa ($p=0.017$) como cuantitativa ($p=0.005$). La edad, el índice de Breslow, la presencia de ulceración y la expresión positiva de LYVE1 determinaron que la expresión de LYVE1 es un factor independiente para la IAL (OR = 4,28; IC 95%: 1,21 - 14,96; $p=0,024$). Por otro lado, la expresión de VEGFR2 fue menor en los pacientes que mostraron progresión de la enfermedad (OR = 0,256; IC 95%: 0,098 - 0,672; $p = 0,005$). La supervivencia libre de enfermedad (SLE) mostró diferencias significativas ($p=0,023$) para la expresión de VEGFR2 detectada (126,856 meses; IC 95%: 99,166 - 154,146) frente a la ausencia de expresión de VEGFR2 (73,286 meses; IC 95%: 45,249 - 101,323). Asimismo, el análisis de regresión de Cox constató que la expresión de VEGFR2 tiene un papel protector (HR = 0,728; IC del 95 % = 0,552 - 0,962; $p=0,025$) sobre la progresión de la enfermedad. Estos resultados se vieron confirmados por un análisis postranscripcional de la expresión proteica de LYVE1 y VEGFR2 mediante ensayos de inmunofluorescencia. Como era de esperar, el índice de Breslow, la APU y el estadio clínico inicial fueron también marcadores independientes de progresión de la enfermedad.

Por otro lado, analizamos la expresión génica de algunos de los genes más relevantes de la angiogénesis (VEGFA, VEGFR2) y la linfangiogénesis (VEGFC, VEGFR3, LYVE1, PROX1) en 49 muestras FFIP de CEC (33 sin progresión y 16 con progresión de la enfermedad) para determinar un perfil molecular que se correlacionara con la progresión en CEC. La expresión del gen VEGFC fue significativamente mayor en tumores de pacientes con progresión de la enfermedad que en aquellos sin progresión del CEC ($p=0,022$). El análisis de regresión de Cox confirmó que la expresión de VEGFC es un factor de riesgo para la progresión de la enfermedad (HR =

2,63; IC 95%: 1,32 -5,25; $p = 0,006$). No obstante, no se identificó diferencia significativa en la SLE entre los pacientes con o sin expresión de VEGFC. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los niveles de expresión de VEGFA, VEGFR2, VEGFR3, LYVE1 y PROX1 y la tasa de progresión de la enfermedad o la SLE.

En conclusión, en base a las recomendaciones MIQE (de inglés, minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments), la utilización de genes de referencia es fundamental en los estudios de expresión génica. Además, la combinación de dos genes proporciona una mejor capacidad de normalización de nuestros datos. Para el estudio de muestras de MM, la mejor combinación fue HPRT1/ACTB; mientras que HPRT1/TFRC lo fue para tumores de CEC. Por otro lado, referente a la angiogénesis y la linfangiogénesis en el MM, nuestros principales resultados sugieren que: 1) la expresión del gen LYVE1 está estrechamente relacionada con la IAL; la relación de este hallazgo con el desarrollo de metástasis requiere estudios adicionales. 2) Una menor expresión de VEGFR2 se asoció con la progresión de la enfermedad y la expresión génica detectada de VEGFR2 se correlacionó con un aumento de la SLE. En referencia al CEC, la expresión del gen VEGFC en el tumor primario está relacionada con la presencia de progresión de la enfermedad. Un estudio más amplio nos permitiría confirmar su papel como marcador de mal pronóstico en pacientes con CEC.