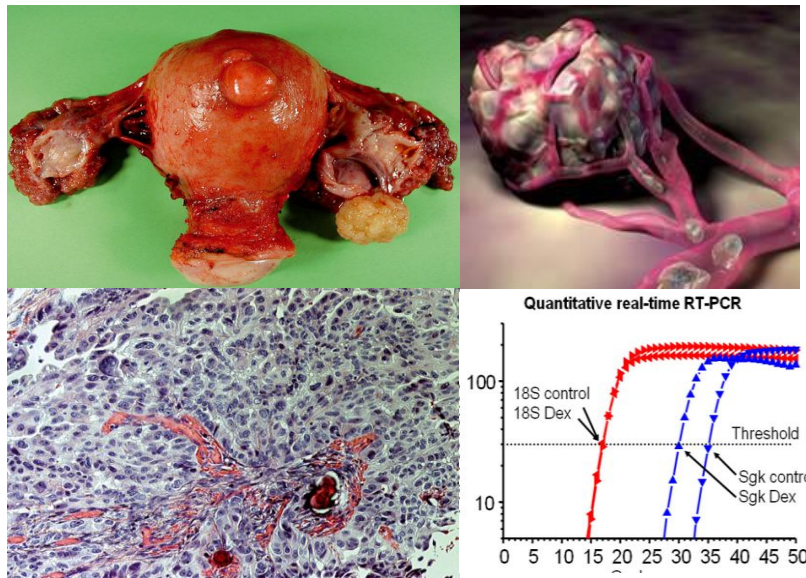


**DESARROLLO DE UN PERFIL DE GENES
IMPLICADOS EN LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL
CON VALOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A LA
QUIMIOTERAPIA EN EL CÁNCER DE OVARIO
AVANZADO**



TESIS DOCTORAL

CÉSAR GÓMEZ RAPOSO

2011



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía Patológica

**DESARROLLO DE UN PERFIL DE GENES
IMPLICADOS EN LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL
CON VALOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A LA
QUIMIOTERAPIA EN EL CÁNCER DE OVARIO
AVANZADO**

TESIS DOCTORAL

CÉSAR GÓMEZ RAPOSO

2011



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía Patológica

Don DAVID ALONSO HARDISSON HERNÁEZ, Profesor Titular de Anatomía Patológica y Director del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad Autónoma de Madrid,

Don ANDRÉS REDONDO SÁNCHEZ, Doctor en Medicina y médico adjunto del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz, y

Doña MARTA MENDIOLA, Doctora en Bioquímica e investigadora del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ

CERTIFICAN

Que Don CÉSAR GÓMEZ RAPOSO, Licenciado en Medicina, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado “**DESARROLLO DE UN PERFIL DE GENES IMPLICADOS EN LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL CON VALOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA EN EL CÁNCER DE OVARIO AVANZADO**” que cumple, a nuestro juicio, con los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Para que así conste donde proceda, firmamos el presente escrito en Madrid, a 21 de noviembre de 2011.

David Hardisson

Andrés Redondo

Marta Mendiola



A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Las bases de mi vida profesional como médico nacieron en las aulas de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Muy cerca, en el Hospital Universitario La Paz, recibiría mi formación como oncólogo médico. No puedo iniciar estos agradecimientos de otra manera que no sea recordando a mis profesores y maestros de esta Universidad, que tanta dedicación emplearon para que hoy llegase hasta aquí. Quisiera recordar y agradecer al Prof. Manuel González Barón, promotor de la oncología traslacional en España, su estímulo constante a los que siempre seremos sus residentes para buscar siempre lo mejor de nosotros.

Al Dr David Hardisson, quien antes de esta tesis era para mí un anatomopatólogo de amplio reconocimiento nacional e internacional, ha resultado ser no sólo un profesional con una dedicación ejemplar, sino un profesor en el sentido amplio del término, una persona capaz de transmitir una visión crítica, constructiva y siempre sabia, así como de generar ilusión. Gracias a él esta tesis es realidad.

Al Dr Andrés Redondo, quien fuera para mí un modelo en el que fijarme durante mi formación como médico residente y de quien no dejo de aprender. Sus conocimientos y su análisis crítico han sido fundamentales para elaborar esta tesis. Gracias por todo.

A la Dra Marta Mendiola, brillante como científico, no lo es menos como persona. Gracias por lo que me has enseñado, pero también por el ánimo en los momentos más complicados. Y gracias por confiar en mí para participar en este proyecto.

Al Dr Jorge Barriuso, quien fuera mi residente mayor y ejemplo a seguir, responsable en gran parte de esta “idea”, su ayuda y aportación ha sido fundamental en este trabajo. Gracias igualmente por confiar en mí.

Al Dr Enrique Casado, capitán de un proyecto que pronto cumplirá cuatro años y al que continúa transmitiendo la ilusión y ganas de trabajar del primer día.

La realización de esta tesis no hubiera sido posible sin el trabajo en equipo de un gran número de personas de diferentes unidades y servicios del Hospital La Paz. Gracias al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital La Paz, por su colaboración. Gracias a la Unidad de Bioestadística del Hospital La Paz, por su ayuda en los análisis estadísticos y sus consejos para interpretarlos. Gracias al personal del

laboratorio de Oncología Traslacional del Hospital La Paz, y en particular a Esther, Rocío y María, por su gran dedicación, habilidad y experiencia.

A mis compañeros del Servicio de Oncología Médica del Hospital Infanta Sofía y a todos mis antiguos compañeros del Servicio de Oncología Médica del Hospital La Paz: médicos adjuntos, residentes, secretarias, auxiliares y enfermeras, por la ayuda y el apoyo que me han transmitido a lo largo de estos años.

Por último, a mi familia, natural y política. Mis padres son las personas que más me han enseñado en la vida, y mis logros son fruto de su dedicación. A mi hermano, por su estímulo constante. A María e Inés, por la alegría que contagian. Gracias Carmen, por los momentos de felicidad, por tu apoyo y por ser tú.

Muchas gracias a todos.

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Cáncer de ovario.....	2
1.1. Epidemiología	2
1.2. Factores de riesgo.....	3
1.3. Etiopatogenia.....	4
1.4. Subtipos histológicos.....	5
1.5. Historia natural.....	7
1.6. Pruebas diagnósticas.....	8
1.7. Estadificación.....	9
1.8. Factores pronósticos.....	10
1.9. Tratamiento del cáncer de ovario.....	16
2. Angiogénesis y cáncer de ovario	23
2.1. Concepto de angiogénesis y “switch” angiogénico.....	23
2.2. Angiogénesis en el cáncer de ovario.....	24
2.3. Factores moleculares implicados en la angiogénesis con valor pronóstico en el cáncer de ovario.....	26
2.4. Terapia antiangiogénica en el cáncer de ovario.....	28
3. Técnicas de análisis de alto rendimiento de la expresión génica	29
3.1. Descripción de las técnicas de análisis de múltiples genes	30
3.2. Aplicaciones de las técnicas de análisis de múltiples genes en el cáncer de ovario.....	36

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	42
1. Hipótesis.....	44
2. Objetivos.....	44
III. MATERIAL Y MÉTODOS	45
1. Pacientes y variables clínico-patológicas estudiadas.....	46
2. Conceptos y definiciones.....	47
3. Selección de genes.....	48
4. Procesamiento de las muestras	51
5. Análisis estadístico	53
IV. RESULTADOS	55
1. Características clínico-patológicas	56
2. Generación de un perfil predictivo de respuesta	57
3. Clasificación de las enfermas según el perfil génico.....	61
4. Análisis univariante de factores pronósticos	65
V. DISCUSIÓN	67

1. Aspectos metodológicos	68
1.1. Elección de la qRT-PCR como técnica de análisis de la expresión génica.....	69
1.2. Empleo de muestras parafinadas para el análisis de la expresión génica.....	71
1.3. Controles realizados en el procesamiento y en el análisis de la expresión génica.....	72
2. Discusión de los resultados.....	73
2.1. Capacidad predictiva de respuesta y pronóstica del perfil génico.....	74
2.2. Factores predictivos de respuesta en el cáncer de ovario y biomarcadores de respuesta a la terapia antiangiogénica.	77
2.3. Relevancia biológica de los ocho genes que componen el perfil predictivo de respuesta	81
2.4. Comparación del perfil predictivo de nuestro estudio con otros análisis de múltiples genes realizados.....	83
3. El futuro de la predicción del pronóstico y la respuesta a fármacos en el carcinoma de ovario	89
VI. CONCLUSIONES.....	92
VII. BIBLIOGRAFÍA	94
VIII. RESUMEN.....	105

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Supervivencia en función de la enfermedad residual tras la cirugía.....	12
Figura 2. La angiogénesis es un proceso regulado por el balance entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos.....	24
Figura 3. Metodología del análisis de la expresión génica con <i>microarrays</i>	31
Figura 4. Emisión de fluorescencia en la reacción de qRT-PCR.....	34
Figura 5. Curvas patrón de qRT-PCR: relación inversa entre la cantidad de ADN de la muestra y el ciclo umbral (Ct).....	35
Figura 6. Curvas Kaplan Meier de SLP y SG para el global de las pacientes.....	57
Figura 7. Área Bajo la Curva ROC.	59
Figura 8. Perfil génico predictivo de respuesta a la quimioterapia: diferencias entre el grupo de pacientes respondedoras y no respondedoras.....	62
Figura 9. Probabilidad asociada a la respuesta al tratamiento en función de los valores obtenidos para el índice del perfil génico.....	63
Figura 10. Curvas Kaplan-Meier de SLP y SG para cada uno de los grupos predictivos definidos por el perfil génico.....	65
Figura 11. Ejemplo de cómo los análisis de múltiples genes y las técnicas de alto rendimiento se deben integrar en el manejo terapéutico de las pacientes con carcinoma de ovario.	90

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Mortalidad estimada de los distintos tipos de cáncer en la mujer en España el año 2006	2
Tabla 2. Características moleculares de los diferentes subtipos histológicos de cáncer de ovario epitelial	6
Tabla 3. Clasificación histológica de los tumores de ovario	7
Tabla 4. Clasificación por estadios del carcinoma de ovario según la FIGO (1998)	9
Tabla 5. Supervivencia global a 2 y a 5 años de enfermas con cáncer epitelial de ovario según los diferentes estadios de la FIGO	10
Tabla 6. Puntuación de la escala ECOG	13
Tabla 7. Factores moleculares con valor pronóstico o predictivo en cáncer de ovario	15
Tabla 8. Procedimiento recomendado por la FIGO y la EORTC para la estadificación quirúrgica del cáncer de ovario en estadios iniciales	17
Tabla 9. Principales ensayos clínicos de quimioterapia en cáncer de ovario localizado....	19
Tabla 10. Principales ensayos clínicos de quimioterapia intravenosa en primera línea en cáncer de ovario avanzado.....	20
Tabla 11. Ensayos clínicos con quimioterapia intraperitoneal en primera línea en cáncer de ovario estadio III con citorreducción óptima.....	21
Tabla 12. Principales factores proangiogénicos y antiangiogénicos	24
Tabla 13. Ensayos Fase II con principales agentes antiangiogénicos en investigación en el cáncer de ovario	29
Tabla 14. Estudios de <i>microarrays</i> en cáncer de ovario con valor pronóstico.....	37
Tabla 15. Estudios de <i>microarrays</i> en cancer de ovario que analizan perfiles de expresión predictivos de respuesta a la quimioterapia	40

Tabla 16. Relación de genes incluidos en este estudio.....	49
Tabla 17. Características clínico-patológicas de las pacientes	56
Tabla 18. Genes que integran el perfil predictivo de respuesta clínica a la quimioterapia	58
Tabla 19. Valor predictivo de respuesta a la quimioterapia del perfil génico. Validación cruzada LOOCV	59
Tabla 20. Sensibilidad y especificidad de las curvas ROC generadas para el perfil génico predictivo de respuesta clínica, y tras pasar la validación LOOCV	60
Tabla 21. Relación entre las variables clínico-patológicas y el perfil de expresión génica.....	64
Tabla 22. Análisis univariante del perfil génico predictivo de respuesta a la quimioterapia y la respuesta clínica de las pacientes	64
Tabla 23. Análisis univariante del perfil génico predictivo de respuesta a la quimioterapia y las variables clínicas para SLP y SG.....	66
Tabla 24. Análisis multivariante del perfil génico predictivo de respuesta a la quimioterapia y la citorreducción óptima para SLP y SG.....	66
Tabla 25. Diferencias metodológicas entre los tres estudios de perfiles génicos predictivos de respuesta más importantes del carcinoma de ovario	86

Abreviaturas

-
- ADN: ácido desoxirribonucleico
 - ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
 - AIC: *Akaike Information Criterion*
 - ARN: ácido ribonucleico
 - ARNc: ácido ribonucleico complementario
 - ARNm: ácido ribonucleico mensajero
 - Ang: angiopoietina
 - AJCC: *American Joint Committee on Cancer*
 - AUC: Área Bajo la Curva, *Area Under the Curve*
 - CCHNP: Cáncer de Colon Hereditario No Polipósico o Síndrome de Lynch
 - CTOP: *Stemness Cancer Therapy Outcome Predictor*
 - Ct: *threshold cycle* o ciclo umbral
 - DLP: doxorubicina liposomal pegilada
 - ECOG-PS: estado clínico según la escala *ECOG-Performance Status*
 - EDN: endotelina
 - EGF: *Epidermal Growth Factor*, Factor de Crecimiento Epidérmico
 - EORTC: *European Organization for Research and Treatment of Cancer*
 - ER: Enfermedad Residual tras cirugía citorrreductora de máximo esfuerzo
 - FGF: *Fibroblast Growth Factor*, Factor de Crecimiento de Fibroblastos
 - FIGO: *Federation International of Gynecologic Oncologist*
 - GNAS: GNAS complex locus
 - G1: tumor bien diferenciado
 - G2: tumor moderadamente diferenciado
 - G3: tumor pobremente diferenciado
 - HIF-1 α : *Hypoxia induced factor 1 α* , Factor Inducido por Hipoxia 1 α
 - HK: *housekeeping*, gen de referencia o control endógeno
 - HR: *Hazard Ratio*
 - ICAM-1: *Intercellular Adhesion Molecule 1*
 - IFN: interferon
 - Id: proteínas inhibidoras de diferenciación / unión a ADN-1
 - IGF: *Insulin Growth Factor*, Factor de Crecimiento Insulínico
 - IL: interleuquina
 - ILT: intervalo libre de tratamiento

-
- iNOS: Sintasa de Óxido Nítrico inducible
 - IP: administración de quimioterapia via intraperitoneal
 - LOOCV: *Leave-one out cross validation*
 - miARN: microARN
 - MDV: microdensidad vascular
 - MMP: metaloproteinasa de la matriz
 - mTOR: *mammalian target of rapamycin*
 - NGF: *Nerve Growth Factor*, Factor de crecimiento del nervio
 - NRP: neuropilina
 - OCPP: *Ovarian Cancer Prognostic Profile*
 - OMS: Organización Mundial de la Salud
 - PARP: polimerasa poli-ADP ribosa
 - PCR: *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de la Polimerasa
 - PDGF: *Platelet-derived Growth Factor*, Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
 - PDGFR: *Platelet-derived Growth Factor Receptor*, Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
 - PET: *Positron Emission Tomography*, Tomografía por Emisión de Positrones
 - PIGF: *Placental Growth Factor*, Factor de Crecimiento Placentario
 - ROC: *Receiver Operating Characteristics*
 - RT-PCR: *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de la Polimerasa tras Transcriptasa en Reverso
 - qRT-PCR: *quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de la Polimerasa tras Transcriptasa en Reverso cuantitativa
 - SAGE: *Serial Analysis of Gene Expresión*, Análisis en Serie de la Expresión Génica
 - SG: Supervivencia Global
 - SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad
 - SLP: Supervivencia Libre de Progresión
 - SLR: Supervivencia Libre de Recaída
 - TC: Tomografía Computerizada
 - TGF: *Transforming Growth Factor*, Factor de Crecimiento Transformante
 - TIMP-2: *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases 2*
 - TNF: *Tumoral Necrosis Factor*, Factor de Necrosis Tumoral
 - TSP: Trombospondina
 - UPA: urokinasa activadora del plasminógeno
 - VDA: *Vascular Disrupting Agents*, agentes de disrupción vascular

-
- VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*, Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
 - VEGFR: *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*, Receptor del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

Introducción

1. CÁNCER DE OVARIO

1.1 Epidemiología

El cáncer de ovario es el tercer tumor ginecológico más frecuente, después del cáncer de endometrio y de cérvix, y representa la quinta causa de muerte por cáncer entre las mujeres en el mundo, y la séptima en España (1,2) (Tabla 1). La incidencia del cáncer de ovario es de 13,5 por 100.000 mujeres y año, y una de cada 74 mujeres padecerá esta enfermedad a lo largo de su vida (3).

Mortalidad		
	N	%
Mama	5.939	16,1
Colon y recto	5.490	14,9
Pulmón	2.624	7,1
Páncreas	2.315	6,2
Estómago	2.170	5,8
Útero	1.931	5,2
Ovario	1.908	5,2
Leucemias	1.353	3,7
Sistema nervioso central	1.120	3,0
Linfoma no Hodgkin	1.092	2,9
TOTAL	36.862	100

Tabla 1. Mortalidad estimada de los distintos tipos de cáncer en la mujer en España el año 2006 (2).

La mayoría de los carcinomas de ovario se diagnostican en mujeres postmenopáusicas, con una mediana de edad de 60 años (3). Aproximadamente la mitad de las enfermas fallecen a consecuencia de la enfermedad, debido principalmente a que en un 70% de los casos el diagnóstico se realiza en fases avanzadas (3). No obstante, la mejora progresiva de los tratamientos médico-quirúrgicos en las últimas décadas se ha

traducido en un aumento de la supervivencia a 5 años del 36% en 1977 al 45% en 2002 (1,3,4).

1.2 Factores de riesgo

El riesgo de desarrollar cáncer de ovario durante la vida de una mujer oscila entre 1,4 y 1,8% (3,4). La incidencia del cáncer de ovario se incrementa con la edad, con un pico de incidencia entre los 70 y los 74 años (3,4).

La incidencia del cáncer de ovario es mayor en países occidentales y caucásicos (3). El factor de riesgo más importante es la nuliparidad (5). Otros factores de riesgo importantes son la menarquia precoz, la menopausia tardía, la terapia hormonal estrogénica sustitutiva (3) y la endometriosis (4). Entre los estilos de vida, la obesidad es un factor de riesgo mientras que el hábito tabáquico parece aumentar el riesgo de carcinoma de ovario mucinoso (3). La ligadura de trompas, la ooforectomía y, en menor grado, la histerectomía reducen un 33% el riesgo de cáncer de ovario (4). Además, se estima que aproximadamente un 10-15% de los cánceres de ovario son consecuencia de un síndrome hereditario (3). El síndrome de cáncer de ovario hereditario más frecuente se asocia a las mutaciones de los genes *BRCA1* o *BRCA2*. Los portadores de estas mutaciones tienen un riesgo elevado de desarrollar un cáncer de mama y de ovario. El riesgo de desarrollar un cáncer de ovario es variable, aproximadamente de un 39-46% para las portadoras de mutación en *BRCA1* y de un 12-20% para las portadoras de *BRCA2* (6). El síndrome de Lynch tipo II o cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCHNP) se desarrolla por mutaciones en los genes implicados en la reparación de bases de ácido desoxirribonucleico (ADN), generalmente *MSH2*, *MLH1* o *MSH6*. Este síndrome se caracteriza por un riesgo aumentando de desarrollar cáncer de colon o

endometrio, y de cáncer de ovario en un 9-12%. El CCHNP supone el 1% de los cánceres de ovario (3,4).

1.3 Etiopatogenia

La carcinogénesis ovárica está determinada predominantemente por factores hormonales asociados a la reproducción y a la ovulación (5). Tradicionalmente se ha considerado que el carcinoma de ovario surgía tras la malignización del epitelio celómico que recubre la superficie ovárica. En 1971 Fathalla postuló que la ovulación ocasiona una acumulación continua de anormalidades genómicas que generaría un microambiente caracterizado por la secreción anómala de hormonas y de diversos factores de crecimiento favorecedor de la carcinogénesis (7). En 1975 Stadel sugirió que la exposición mantenida a elevadas concentraciones de gonadotropinas y estradiol podría tener un efecto carcinogénico sobre el epitelio ovárico (8).

No obstante, el origen celómico del cáncer de ovario es un tema muy controvertido, y aún no se han identificado las potenciales células precursoras. Por contra, cada vez es mayor la evidencia de que los carcinomas de ovario, de trompa de Falopio y el carcinoma peritoneal primario podrían tener un origen común derivado de tejidos embrionariamente procedentes de los conductos Müllerianos, un origen embrionario diferente que el propio ovario (9). Estudios de investigación básica confirman que los carcinomas de ovario expresan los genes *HOX*, implicados en procesos embrionarios del aparato reproductor (10). En condiciones normales, los genes *HOX* se expresan en las células epiteliales de las trompas de Falopio, endometrio y endocérvix, pero no se expresan en el epitelio ovárico. Estos hallazgos apoyan la idea de que el carcinoma de ovario se podría originar a partir del epitelio Mülleriano en lugar de en el epitelio celómico.

De acuerdo a un modelo de carcinogénesis ovárica, el carcinoma de ovario puede dividirse en dos tipos (11):

- a) Tipo I: carcinomas procedentes de lesiones precursoras, como los tumores *borderline*. Este grupo incluye fundamentalmente los carcinomas serosos de bajo grado que presentan habitualmente mutaciones de los genes *BRAF* y *KRAS*.
- b) Tipo II: tumores *de novo*, entre los que se encuentran los carcinomas serosos de alto grado, los tumores müllerianos mixtos y los carcinomas indiferenciados. Estos tumores presentan con frecuencia mutaciones en *TP53* e inestabilidad genómica.

Entre los genes que presentan mutaciones inactivantes con más frecuencia se encuentran *TP53* y *PTEN*, mientras que entre aquellos con mutaciones activadoras se incluirían *KRAS*, *PI3KCA* y *AKT1* (4). El tipo de mutaciones difiere según el grado de diferenciación y el subtipo histológico (Tabla 2) (4).

1.4 Subtipos histológicos

Desde el punto de vista histopatológico los tumores primarios de ovario se clasifican en tres tipos: carcinomas, tumores de los cordones sexuales-estroma y tumores germinales. En la Tabla 3 se muestra la clasificación anatomopatológica de los tumores epiteliales ováricos según la Organización Mundial de la Salud (12).

El carcinoma de ovario representa aproximadamente el 90% de los cánceres de ovario. El tipo histológico más frecuente de carcinoma es el carcinoma seroso (75%). El 25% restante engloba los carcinomas endometrioides (10%), mucinosos (5%) y, con menor frecuencia, de células claras, células transicionales (tumor de Brenner) o

indiferenciados. También se han descrito tumores epiteliales mixtos que incluyen más de un subtipo histológico.

	Precursor	Características moleculares
Tumor seroso de bajo grado	Cistoadenoma Tumor <i>Borderline</i>	<i>KRAS</i> y/o <i>BRAF</i> mutados
Tumor seroso de alto grado	De novo	<i>TP53</i> mutado <i>BRCA-1</i> disfuncional <i>PI3KCA</i> amplificado
Carcinoma endometriode de bajo grado	Endometriosis. Hiperplasia endometrial	<i>CTNNB1</i> (gen β -catenina) mutado <i>PTEN</i> mutado Inestabilidad de microsatélites
Carcinoma endometriode de alto grado	Quistes de inclusión epitelial	<i>TP53</i> mutado <i>BRCA-1</i> disfuncional <i>PI3KCA</i> mutado
Tumor mucinoso	Cistoadenoma Tumor <i>Borderline</i>	<i>KRAS</i> mutado Probable <i>TP53</i> mutado
Tumor células claras	Endometriosis??	<i>PTEN</i> mutado / pérdida de heterocigosidad <i>PI3KCA</i> mutado

Tabla 2. Características moleculares de los diferentes subtipos histológicos de carcinoma de ovario.

El carcinoma seroso de ovario es una neoplasia que puede abarcar desde entidades con células que recuerdan al epitelio de las trompas de Falopio en tumores bien diferenciados, hasta células epiteliales anaplásicas con atipia en tumores pobremente diferenciados (13). El tamaño tumoral es variable y son bilaterales en 2/3 de los casos. Generalmente se emplea el sistema de clasificación del grado de diferenciación en tres grados por su valor pronóstico.

Seroso	benigno, <i>borderline</i> , maligno
Mucinoso	benigno, <i>borderline</i> , maligno
Endometriode	benigno, <i>borderline</i> , maligno
Células claras	benigno, <i>borderline</i> , maligno
Células transicionales (tumor de Brenner)	benigno, <i>borderline</i> , maligno
Células escamosas	
Mixto	benigno, <i>borderline</i> , maligno
Indiferenciado	

Tabla 3. Clasificación histológica de los tumores epiteliales de ovario.

Los carcinomas mucinosos tienden a permanecer más tiempo confinados al ovario que los serosos y presentan un tamaño mayor. Los carcinomas endometrioides tienen unas características histológicas que recuerdan al carcinoma de endometrio, y en un 15-20% de los casos existe un carcinoma endometriode uterino asociado. Los carcinomas de células claras normalmente se encuentran confinados en el ovario al diagnóstico, pero se caracterizan por su alto riesgo de recaída.

1.5 Historia natural

El carcinoma de ovario se disemina fundamentalmente por extensión directa (siembra peritoneal) a las estructuras pélvicas adyacentes, por vía linfática y, menos frecuentemente, por vía sanguínea.

La siembra peritoneal es la vía de diseminación típica del cáncer de ovario: las células neoplásicas se desprenden del tumor primario y se implantan en el peritoneo, epiplon y superficies serosas viscerales. Las variaciones de presión intraabdominal debidas a la respiración generan una circulación del líquido peritoneal, desde la pelvis hasta el

diafragma, que facilita la dispersión de los implantes por toda la cavidad abdominal. Los implantes del peritoneo diafragmático obstruyen los vasos linfáticos a ese nivel, impiden la reabsorción del líquido peritoneal y favorecen su acumulación en la cavidad abdominal, generando la formación de ascitis (13).

La diseminación linfática es menos frecuente, con una vía principal de drenaje a los ganglios retroperitoneales. La diseminación hematógena es poco frecuente, pero en enfermedades muy evolucionadas pueden producirse metástasis hepáticas, pulmonares, óseas y cerebrales (13).

La sintomatología asociada al cáncer de ovario localizado es muy inespecífica. El dolor y la distensión abdominal, el estreñimiento, la astenia o la anorexia son los síntomas más frecuentes (3). El 70% de las enfermas se diagnostican en fases avanzadas, habitualmente tras una diseminación peritoneal, donde la presencia de ascitis es la norma (13). El derrame pleural también es frecuente y, en función de su cuantía, puede ocasionar disnea.

1.6 Pruebas diagnósticas

La primera prueba complementaria que se realiza a una mujer con sospecha de cáncer de ovario es la ecografía ginecológica transvaginal; la presencia de una masa anexial con componente sólido, septos gruesos, ascitis o nódulos peritoneales son sugestivos de malignidad (13).

El marcador Ca 125 se encuentra elevado en más del 80% de las pacientes con carcinoma de ovario aunque no tiene valor diagnóstico ya que no es específico del carcinoma de ovario, y se puede elevar en procesos benignos como la endometriosis o la salpingitis, en situaciones fisiológicas como la menstruación o el embarazo, así como en tumores de otro origen. La sensibilidad del Ca 125 aumenta en relación con el estadio

tumoral (50% en los estadios I, 90% en los estadios II) y del subtipo histológico (mayor en el carcinoma seroso y menor en el mucinoso) (13).

La tomografía computerizada (TC) abdomino-pélvica completa el estudio de extensión del cáncer de ovario antes del procedimiento quirúrgico, junto con una radiografía o TC de tórax para descartar la presencia de derrame pleural.

1.7 Estadificación

En la mayoría de los casos, la estadificación del cáncer de ovario se realiza tras el estudio anatomopatológico de los hallazgos quirúrgicos, según los criterios de la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* y la *Federation International of Gynecologic Oncologists (FIGO)*, que se indican en la Tabla 4 (14).

<p>Estadio I: limitado a ovario/s</p> <ul style="list-style-type: none"> - IA: limitado a un ovario, cápsula intacta, sin tumor en la superficie y sin ascitis - IB: afectación de ambos ovarios, cápsula intacta, sin tumor en la superficie y sin ascitis - IC: tumor que afecta a uno o ambos ovarios, pero que se encuentra en la superficie, se ha producido rotura capsular o existe ascitis o lavado peritoneal con citología positiva
<p>Estadio II: afectación de ovario/s y pelvis</p> <ul style="list-style-type: none"> - IIA: extensión o metástasis en útero y/o trompa/s de Falopio - IIB: extensión a otros órganos pélvicos - IIC: extensión a la pelvis, con presencia de tumor en superficie ovárica, rotura cápsula ovárica o citología positiva de ascitis o lavado peritoneal
<p>Estadio III: extensión al peritoneo extrapélvico, incluida la superficie hepática, epiplon, intestino delgado y/o ganglios retroperitoneales o inguinales</p> <ul style="list-style-type: none"> - IIIA: afectación peritoneal microscópica, ganglios negativos - IIIB: afectación peritoneal macroscópica con implantes ≤ 2 cm, ganglios negativos - IIIC: implantes peritoneales > 2 cm o afectación ganglionar retroperitoneal y/o inguinal
<p>Estadio IV: metástasis a distancia.</p>

Tabla 4. Clasificación por estadios del carcinoma de ovario según la FIGO (1998) (14).

Entre el 70-80% de las pacientes se diagnostican en estadios avanzados (III y IV). En los estadios aparentemente localizados (I-II) es fundamental realizar una estadificación quirúrgica reglada, pues un 30-40% de estas pacientes tendrá enfermedad microscópica a nivel peritoneal o ganglionar.

1.8 Factores pronósticos

Factores pronósticos clínico-patológicos

Los factores clínico-patológicos con valor pronóstico en el carcinoma de ovario son el estadio tumoral, el tamaño de la enfermedad residual (ER) después de una cirugía citorreductora, el tipo histológico, el grado de diferenciación, la edad y la presencia de ascitis tumoral (15). El factor pronóstico más importante es el estadio tumoral (Tabla 5).

Estadio	SG 2 años (%)	SG 5 años (%)
IA	96,2	89,6
IB	93,9	86,1
IC	91,4	83,4
IIA	87,2	70,7
IIB	84,5	65,5
IIC	85,6	71,4
IIIA	72,6	46,7
IIIB	70,6	41,5
IIIC	64,5	32,5
IV	48,4	18,6

Tabla 5. Supervivencia global a 2 y a 5 años de enfermas con carcinoma de ovario según los diferentes estadios de la FIGO (16).

Las pacientes con carcinoma de ovario de células claras o mucinoso en estadio precoz tienen peor pronóstico que el resto de subtipos histológicos debido a que responden peor a los regímenes de quimioterapia basados en platino (4,13). Por su parte, el subtipo

endometrioides se asocia a una mejor supervivencia en comparación con el carcinoma seroso (4,13).

El grado de diferenciación histológica es un factor pronóstico importante (17). La edad es otro factor importante, con un mejor pronóstico en las mujeres jóvenes. La supervivencia a 5 años en las mujeres menores de 40 años es de un 65%, frente a sólo un 20% para las mayores de esa edad (3).

Estadios iniciales

Las enfermas con carcinoma de ovario en estadio I bien (G1) o moderadamente diferenciado (G2), sin ruptura capsular ni ascitis tienen una supervivencia global (SG) a los 5 años superior al 90%, mientras que aquellas con estadio I pobremente diferenciado (G3), ruptura capsular o ascitis, o estadio II, tienen una SG del 80% (18). El significado pronóstico de la ruptura capsular como único criterio para clasificar la enfermedad como estadio IC se discute en la actualidad de modo que algunos autores sugieren que la ruptura intraoperatoria no empeora el pronóstico a diferencia de si la rotura es preoperatoria (3,13).

Estadios avanzados

La supervivencia a 5 años es del 35% para las pacientes con un cáncer de ovario estadio III, y menor del 10% para las que presentan un estadio IV. En estos casos, el principal factor pronóstico es el volumen de ER tras la cirugía citorreductora. La supervivencia a los 4 años de enfermas en estadio III desciende desde un 60% para las pacientes con ER microscópica, a un 35% con ER macroscópica menor de 1 cm, y hasta menos de un 20% cuando es mayor de 2 cm (19,20) (Figura 1). El subgrupo de pacientes con tumores

que son catalogados como estadio IIIc en base exclusivamente a la afectación ganglionar, sin carcinomatosis peritoneal, tiene un mejor pronóstico que las enfermas con estadios IIIc por afectación peritoneal (21).

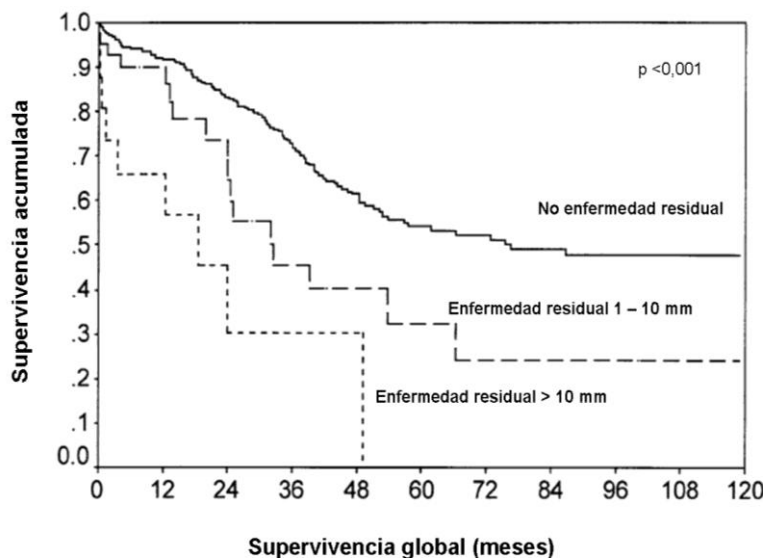


Figura 1. Supervivencia en función de la enfermedad residual tras la cirugía. Adaptado de Eisenkop y cols (20).

En las enfermas con cáncer de ovario estadio IV, el volumen de ER tras la cirugía también influye de forma significativa e independiente en el pronóstico, con una mediana de supervivencia de 64 meses si la ER era microscópica, de 30 meses si era menor de 5 cm y de 19 meses si era mayor de 5 cm (22). Otros factores que han demostrado un valor pronóstico independiente en los estadios III-IV son la edad, el estado general (determinado por la escala ECOG, Tabla 6), la histología y la localización visceral de las metástasis (13).

Grado	ECOG
1	Totalmente activo, capaz de llevar a cabo todas las actividades previas a la enfermedad sin restricción
2	Restringido en actividad física extenuante pero en ámbito ambulatorio y capaz de llevar a cabo trabajo de naturaleza liviana o sedentario
3	Capaz sólo de cuidados personales limitados, confinado a la cama o a una silla más del 50% de las horas de vigilia
4	Completamente discapacitado. No puede llevar a cabo ningún cuidado personal. Totalmente confinado a una cama o a una silla

Tabla 6. Puntuación de la escala ECOG.

Valor pronóstico del marcador Ca 125

Niveles elevados de Ca 125 prequirúrgicos se correlacionan con estadios avanzados del cáncer de ovario, tumores pobremente diferenciados, histología serosa y con la presencia de ascitis, pero no tienen valor pronóstico (4,13).

Sin embargo, los niveles postoperatorios de Ca 125 sí tienen un gran valor para monitorizar la respuesta al tratamiento y determinar el riesgo de recaída (3,13). La velocidad de disminución de Ca 125 durante la quimioterapia se correlaciona con el pronóstico. La normalización de los niveles de Ca 125 después de tres ciclos de quimioterapia indica una alta probabilidad de alcanzar una remisión completa al finalizar el tratamiento.

Igualmente, los niveles de Ca 125 obtenidos al finalizar la quimioterapia se han relacionado con el pronóstico. Las enfermas con un valor de Ca 125 al finalizar la quimioterapia menor o igual a 10 U/mL tienen una mediana de tiempo a la progresión de 24 meses, frente a 17 meses para las pacientes con un valor de 11 a 20 U/mL, y sólo de 7 meses en pacientes con niveles de 21 a 35 U/mL (23). La cifra de Ca 125 al finalizar la quimioterapia se ha asociado a la posibilidad de persistencia de enfermedad tumoral. Valores de Ca 125 comprendidos entre 20 y 35 U/mL se asocian a una

probabilidad de enfermedad residual del 92%, frente a un 49% en pacientes con Ca 125 inferior a 20 U/mL (24).

Factores moleculares pronósticos en estudio

En los últimos años se han investigado numerosos factores pronósticos y predictivos moleculares en el carcinoma de ovario. En la Tabla 7 se resume el valor pronóstico o predictivo de respuesta a la quimioterapia que podrían tener algunas de estas moléculas, si bien hay que tener en cuenta que en casi todos los casos los resultados proceden de series retrospectivas, con un limitado número de pacientes y sin validación independiente. Además, en algunas ocasiones los resultados de diferentes estudios con un mismo biomarcador son contradictorios. Por todo ello, el papel que desempeñan estos factores en el pronóstico o la predicción de respuesta está todavía por determinar.

Otros trabajos han estudiado el valor pronóstico de la expresión de moléculas implicadas en procesos carcinogénicos a nivel del ovario. Por ejemplo, la sobreexpresión de metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9 o metaloproteinasa de la matriz tipo I), del factor de crecimiento de la insulina tipo 2 (IGF-2, *Insulin Growth Factor-2*), de la clusterina, de EZH2 (*Enhancer of Zeste homolog-2*), de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), de la urokinasa activadora del plasminógeno (UPA), así como la amplificación de *GNAS* (*GNAS complex locus*) se asocian a un peor pronóstico (25). Igualmente se ha descrito un posible mecanismo paracrino de crecimiento asociado con la interacción de la eritropoyetina y su receptor que podría tener implicación pronóstica (26). Sin embargo, la expresión de las ribonucleasas Dicer y Drosha, las aurora quinasas A y B, o el receptor de andrógenos parecen correlacionarse con un pronóstico favorable (25,27,28).

Biomarcador	Expresión	Valor pronóstico	Valor predictivo de respuesta
Ciclina D1	Aumentada	Negativo	-
Ciclina E	Aumentada	Negativo	-
	Disminuida		Positivo
p15 y p16	Disminuida	Negativo	-
p21 y p27	Aumentada	Positivo	-
E2F1 y E2F2	Aumentada	Negativo	-
E2F4 y E2F7	Aumentada	Positivo	-
p53	Mutado	Negativo	Negativo
Bax	Aumentada	Positivo	Positivo
Her-2	Amplificado	Negativo	Negativo
EGFR	Aumentado	Negativo	-
Kit, Met	Aumentado	Negativo	-

Tabla 7. Factores moleculares con valor pronóstico o predictivo en cáncer de ovario

(25). EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, *Epidermal Growth Factor-Receptor*.

El cáncer de ovario asociado a mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* se asocia a un mejor pronóstico que el cáncer de ovario esporádico (29). Por otra parte, las mutaciones de los genes *BRCA* pueden actuar como marcadores predictivos de respuesta a esquemas basados en platino, al igual que las enzimas ERCC5 o hTERT (28,30).

Micro-ARNs

Los microARNs (miARNs) son formas de ácido ribonucleico (ARN) no codificantes implicadas en la regulación post-transcripcional de genes. Los miARNs desempeñan un papel fundamental en el proceso de desarrollo, diferenciación y maduración celular. Estudios recientes evalúan el valor pronóstico o predictivo de los miARNs en el carcinoma de ovario. La pérdida de funcionalidad del miARN-13 o del miR-200c se asocia a un peor pronóstico en el carcinoma seroso de ovario (31,32). La expresión del miARN-214 parece estar implicado en la resistencia a cisplatino en el cáncer de ovario

(33). Otro estudio describe una matriz de 5 miARNs asociados al pronóstico del cáncer de ovario y a la respuesta a quimioterapia basada en platinos (34). Finalmente, se ha demostrado que la familia de miARN-200 controla la expresión de β -tubulina III, implicada en mecanismos de resistencia a taxanos, de modo que niveles bajos de expresión de estos miARNs se asocian a una peor respuesta a tratamientos basados en paclitaxel y a una menor SLP en carcinomas de ovario en estadios avanzados (35).

1.9 Tratamiento del cáncer de ovario

La cirugía es fundamental para la estadificación y tratamiento del carcinoma de ovario, tanto en los estadios iniciales como en la enfermedad avanzada. La quimioterapia está indicada como terapia adyuvante en gran parte de los estadios iniciales, y en todos los casos con enfermedad avanzada o recaída tumoral.

Cirugía

La cirugía es el tratamiento inicial de la mayoría de las neoplasias de ovario, y debe ser realizada por un equipo experto, dado que el nivel de experiencia y especialización del cirujano influye significativamente en la supervivencia de las pacientes (36).

Estadios iniciales (I y II)

En la cirugía inicial, además de la extirpación del tumor, se realizará la estadificación quirúrgica, cuyo procedimiento, consensuado a nivel internacional por la FIGO y la EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*), se detalla en la Tabla 8 (37). En mujeres con un estadio IA se acepta la posibilidad de preservar el útero y el ovario contralateral si desean mantener la fertilidad (37).

1. Histerectomía total + salpingo-ooforectomía bilateral
2. Omentectomía infracólica
3. Citología de la ascitis, y si no la hubiera, citología del lavado peritoneal
4. Inspección cuidadosa de toda la superficie peritoneal
5. Biopsias de lesiones y adherencias sospechosas
6. Biopsias a ciegas de la superficie peritoneal, a nivel de hemidiafragma derecho, fondo de saco, repliegues paracólicos derecho e izdo, vejiga y pared pélvica
7. Linfadenectomía selectiva a nivel pélvico y paraaórtico
8. Apendicectomía en tumores mucinosos

Tabla 8. Procedimiento recomendado por la FIGO y la EORTC para la estadificación quirúrgica del cáncer de ovario en estadios iniciales (37).

Estadios avanzados (III y IV)

En los estadios avanzados, la recomendación actual de tratamiento es la cirugía inicial con intento de máxima citorreducción, seguida de un tratamiento con quimioterapia (37).

El pronóstico de las pacientes con cáncer de ovario avanzado depende de la enfermedad inicial, pero sobre todo, de la ER tras la cirugía. El objetivo de la cirugía en estos casos debe ser la resección de toda enfermedad visible (citorreducción total) y, si ésta no es posible, una citorreducción óptima. La definición actual más aceptada de citorreducción óptima es la ausencia de ER macroscópica (38). Realizar una segunda citorreducción (cirugía de intervalo) después de la administración de quimioterapia en aquellas enfermas en las que quedó ER mayor de 1 cm tras una primera cirugía de máximo esfuerzo llevada a cabo por un equipo experto no ha demostrado que mejore la SLE ni la SG (39).

La cirugía de *second-look* describe el procedimiento que se realiza a las pacientes que, tras la resección quirúrgica inicial y completar la quimioterapia, se encuentran en remisión completa radiológica y bioquímica (Ca 125). Consiste en la exploración de

toda la cavidad abdominal con toma de biopsias de las lesiones sospechosas, con el objetivo de identificar ER microscópica que se pudiera beneficiar de un tratamiento adicional. En la actualidad, este procedimiento no se realiza ya que no ha demostrado ningún beneficio en supervivencia (40).

Como alternativa a la citorreducción primaria, bien por el estado general de la enferma o por la presencia de una gran carga tumoral, la quimioterapia neoadyuvante ha demostrado ser una opción válida para facilitar la posterior realización de una cirugía de máximo esfuerzo en el cáncer de ovario estadio IIIc-IV (41,42).

Quimioterapia

Enfermedad localizada (estadios I y II)

Los estudios ICON-1 y ACTION demostraron que el tratamiento adyuvante con quimioterapia basada en platino en pacientes con cáncer de ovario en estadios iniciales de alto riesgo (estadios IA/IB G3, IA/IB con histología de células claras, IC y II) mejoraba tanto la SLE como la SG (43-45) (Tabla 9).

En las pacientes con cáncer de ovario estadios IA-IB G1 se recomienda observación, mientras que en los estadios IA-IB G2 la indicación de quimioterapia es controvertida (41). No existe unanimidad sobre el régimen de quimioterapia idóneo, aunque la recomendación general es administrar el esquema carboplatino-paclitaxel en base a los resultados de los estudios realizados en enfermedad avanzada que se comentarán a continuación (41).

Estudio	Estadio	N	Tratamiento	Supervivencia a 5 años
ACTION (44)	IA-IB G2-3	224	QT platino	SLE HR 0,62*
	IC, IIA	224	Observación	SG HR 0,69
ICON (43)	I	241	QT platino	SLE 73%*, SG 79%*
		236	Observación	SLE 62%, SG 70%
ICON-ACTION (45)	I-IIA	465	QT platino	SLE 76%*, SG 82%*
		460	Observación	SLE 65%, SG 74%

QT platino: platino en monoterapia o combinación; SLE: supervivencia libre de enfermedad; SG: supervivencia global. * diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 9. Principales ensayos clínicos de quimioterapia en cáncer de ovario localizado.

Enfermedad avanzada (estadios III y IV)

La combinación carboplatino-paclitaxel ha sido considerado como el mejor tratamiento de elección en la enfermedad avanzada durante muchos años. En el momento actual este esquema se continúa considerando como un tratamiento estándar para estas pacientes, si bien recientemente se han incorporado otras opciones como el régimen de carboplatino-paclitaxel a dosis densas o la combinación carboplatino-paclitaxel-bevacizumab, que son consideradas alternativas aceptables, y no se puede descartar que en un futuro se establezcan como tratamiento estándar por delante del esquema clásico. Por otra parte, los esquemas que incluyen la administración de cisplatino por vía intraperitoneal (IP) se consideran una opción recomendable para el subgrupo de pacientes caracterizado por edad joven, buen estado general y citorreducción óptima de un cáncer de ovario estadio III (Tabla 10).

La combinación cisplatino-paclitaxel fue superior a cisplatino-ciclofosfamida, que era el tratamiento estándar del carcinoma de ovario en los años 90, con una mediana de SG superior a los 35 meses (46,47). El esquema carboplatino-paclitaxel mostró una eficacia equivalente a cisplatino-paclitaxel, con un perfil de toxicidad más favorable (48,49). Recientemente, un estudio japonés ha demostrado una mejoría en SG a 3 años con un régimen de carboplatino-paclitaxel a dosis densas frente al esquema estándar, a

expensas de una mayor toxicidad (50). Hasta que no se publiquen los resultados de estudios confirmatorios que avalen su uso como tratamiento estándar, este esquema se considera como una alternativa válida en el tratamiento de primera línea. Por último, la adición de un tercer fármaco a la combinación carboplatino-paclitaxel, bien de forma secuencial o como triplete, no han demostrado beneficio alguno en SLP ni SG (51).

Estudio	Régimen	N	Estadios	SG (meses)	HR mortalidad
GOG-111 (46)	C-Cis ₇₅ vs	386	III-IV subóptimo	24 vs 38	0.6 (0.5-0.8)
INT OV-10 (47)	Pac-Cis ₇₅	680	IIB-IV óptimo o subóptimo	25,8 vs 35,6	0.73 (0.6-0.89)
GOG-158 (49)	P-Cis ₇₅ vs	798	III óptimo	48,7 vs 57,4	0.84 (0.7-1.02)
AGO (48)	P-Cb _{6-7.5}	792	IIB-IV óptimo y subóptimo	44,1 vs 43,3	1.045 (0.86-1.25)
Katsumata (50)	Pdd-Cb ₆ vs P-Cb ₆	637	II-IV óptimo y subóptimo	*	0.75 (0.57-0.98)

SG: mediana de supervivencia. HR: hazard ratio. CAP: ciclofosfamida-adriamicina-cisplatino. AC: adriamicina-ciclofosfamida. C: ciclofosfamida. P: paclitaxel. Pdd: paclitaxel dosis densas. Cis_{50, 75 o 100}: cisplatino 50, 75 o 100 mg/m². Cb_{5, 6 o 7.5}: carboplatino AUC 5, 6 o 7.5. D: docetaxel

Tabla 10. Principales ensayos clínicos de quimioterapia intravenosa en primera línea en cáncer de ovario avanzado.

Diferentes ensayos clínicos han demostrado la superioridad de los esquemas que administran cisplatino por vía IP frente a la vía intravenosa en las enfermas con cáncer de ovario estadio III y cirugía óptima (Tabla 11). Con la administración IP, el fármaco difunde desde la cavidad peritoneal a la superficie del tumor, lo que permite alcanzar concentraciones mayores en esta localización. Sin embargo, la profundidad de penetración del agente quimioterápico en el tejido tumoral es muy limitada (1-3 mm), por lo que esta estrategia es más activa si los nódulos tumorales son pequeños (< 1 cm) (52). La quimioterapia IP se asocia a una reducción del riesgo de muerte en torno a un 20-25% en enfermas con estadio III y citorreducción óptima (53-55). Sin embargo, la

toxicidad asociada a la terapia IP es importante, y menos de la mitad de las pacientes llegan a completar los seis ciclos de quimioterapia IP previstos.

Estudio	Comparación	N	SLP mediana (meses)	SG mediana (meses)
INT-0051 (53)	C ₆₀₀ IV - Cis ₁₀₀ IV	331	ND	41
	C ₆₀₀ IV - Cis ₁₀₀ IP	323		49 (p=0.02)
GOG-114 (54)	P ₁₃₅ IV - Cis ₇₅ IV C	227	22.2	52.2
	Cb _{AUC9} x 2 → P ₁₃₅ IV - Cis ₁₀₀ IP	235	27.9 (p=0.01)	63.2 (p=0.05)
GOG-172 (55)	P ₁₃₅ IV - Cis ₇₅ IV	215	18.3	49.7
	P ₁₃₅ IV - Cis ₁₀₀ IP - P ₆₀ IP	214	23.8 (p=0.05)	65.6 (p=0.03)

C: ciclofosfamida. Cis: cisplatino. P: paclitaxel. Cb: carboplatino. IP: intraperitoneal. ND (no disponible)

Tabla 11. Ensayos clínicos con quimioterapia intraperitoneal en primera línea en cáncer de ovario estadio III con citorreducción óptima.

Segunda línea de quimioterapia y sucesivas

El intervalo de tiempo transcurrido desde la última dosis de quimioterapia con carboplatino-paclitaxel (intervalo libre de tratamiento, ILT) define el tipo de recaída en dos tipos, según la probabilidad de respuesta a la segunda línea de quimioterapia: i) recaída platino-resistente, cuando el ILT es menor de 6 meses, y ii), recaída platino-sensible, si el ILT es mayor de 6 meses.

En pacientes con una recaída platino-sensible, la recomendación general es reutilizar un esquema con platino. En casos seleccionados (ILT mayor de 12 meses, ausencia de ascitis, recaída localizada, buen estado general) se debe considerar la realización de una cirugía citorreductora de la recaída (56). En la recaída platino-sensible la combinación carboplatino-paclitaxel demostró un beneficio significativo en la SG con respecto a carboplatino en monoterapia (57). Otras opciones a considerar en la recaída platino-

sensible son las combinaciones carboplatino-gemcitabina o carboplatino-doxorrubicina liposomal pegilada (DLP) (58,59).

Dentro del grupo platino-sensible, se denomina recaída parcialmente sensible a platino a la que se produce con un ILT entre 6 y 12 meses. En este subgrupo, además de una combinación de carboplatino, se acepta la utilización de una quimioterapia no platino, con el objetivo de incrementar el intervalo libre de platino e incrementar las posibilidades de respuesta a un posterior tratamiento con carboplatino (3). En esta situación, la combinación DLP-trabectedina es actualmente el tratamiento sin platino más utilizado, ya que ha demostrado aumentar la SLP y SG frente a la DLP en monoterapia (60).

La eficacia de los tratamientos actuales en el cáncer de ovario platino-resistente es muy limitada, con una tasa de respuestas sólo del 10-20%, una mediana de tiempo hasta la progresión de 3 meses y una mediana de SG de 9 meses. El beneficio de la quimioterapia en esta situación es exclusivamente paliativo, y los fármacos más utilizados son topotecan y DLP (61). Otras opciones terapéuticas activas son paclitaxel semanal, etopósido oral, gemcitabina, ifosfamida, vinorelbina y tamoxifeno (13).

Entre los fármacos antineoplásicos de nueva generación activos en el cáncer de ovario hay que destacar dos: los antiangiogénicos y los inhibidores de la polimerasa poli-ADP ribosa (PARP). Los antiangiogénicos se comentarán con más detalle a continuación. Los inhibidores de PARP (una enzima con un papel crítico en la reparación del ADN) han demostrado una eficacia prometedora en pacientes con cáncer de ovario con mutaciones germinales en los genes *BRCA1/2* (62).

2. ANGIOGÉNESIS Y CÁNCER DE OVARIO

2.1 Concepto de angiogénesis y “*switch*” angiogénico

La angiogénesis consiste en la formación y desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente en áreas de crecimiento tisular. Este fenómeno sucede de forma fisiológica durante la cicatrización de heridas o la embriogénesis, pero también en situaciones patológicas como el cáncer, donde la angiogénesis es un proceso fundamental para la invasión tumoral y el desarrollo de metástasis (63).

El crecimiento tumoral es completamente dependiente del suministro de oxígeno y nutrientes por parte de la vasculatura circundante (64). La progresión tumoral se acompaña de la transición de un estado avascular, en el cual existe un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis, hacia un estado angiogénico, caracterizado por el reclutamiento activo de vasos sanguíneos, el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. Este proceso se denomina “*switch* angiogénico”, y sucede de forma temprana en la tumorigénesis (Figura 2) (65).

La angiogénesis es un proceso complejo, regulado por el balance entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos (66). Estos factores son sintetizados por diferentes tipos celulares, incluyendo macrófagos, mastocitos, fibroblastos, células tumorales y endoteliales. En la Tabla 12 se enumeran algunos de los factores proangiogénicos y los inhibidores angiogénicos más importantes (67).

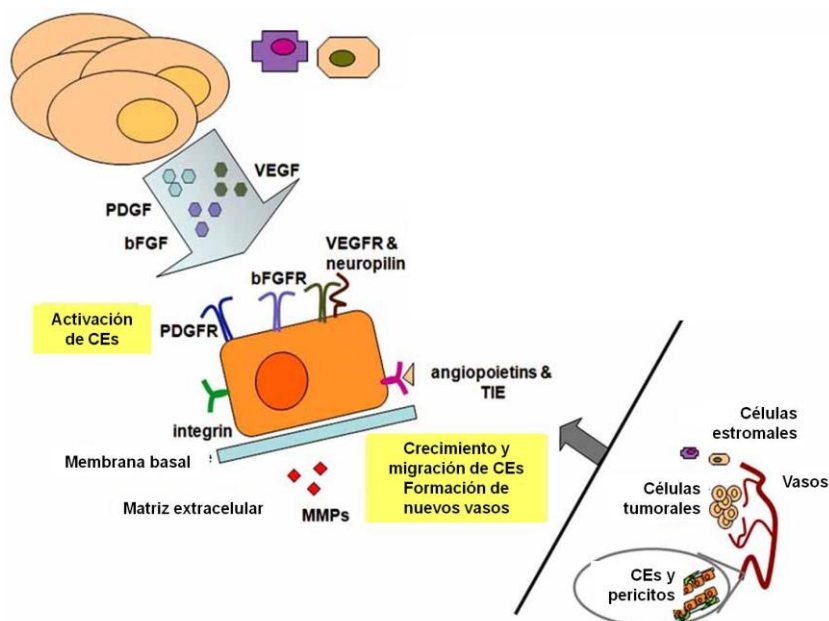


Figura 2. La angiogénesis es un proceso regulado por el balance entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos (66).

Factores proangiogénicos	Factores antiangiogénicos
VEGF	TSP-1
FGF-2	Ang-1 y Ang-2
TGF-α y -β	Endostatina
PDGF	IFN-α,β,γ
TNF-α	IL-4, 12 y 18
IL-8	
Integrinas, cadherinas	

FGF-2: Factor de Crecimiento de Fibroblastos-2. IL: interleuquina. IFN: interferón. TGF- α - β : Factor de Crecimiento Transformante –alfa–beta. VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular. PDGF: Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas. TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral –alfa. TSP-1: Trombospondina 1. Ang-1 y -2: angiopoyetinas 1 y 2.

Tabla 12. Principales factores proangiogénicos y antiangiogénicos (67).

2.2 Angiogénesis en el cáncer de ovario

El carcinoma de ovario es un tumor altamente vascularizado y existen multitud de estudios básicos y clínicos que sugieren que la angiogénesis es un mecanismo clave en el desarrollo del mismo (66,67).

La familia de los factores de crecimiento VEGF y sus receptores constituyen la vía de señalización molecular más importante implicada en la angiogénesis. Se han identificado siete miembros en la familia VEGF: VEGF-A, -B, -C, -D, -E y el Factor de Crecimiento Placentario 1 y 2 (*Placental Growth Factor*, PlGF-1 y -2). Estos factores de crecimiento se unen a tres receptores tirosina quinasa, el VEGFR-1, -2 y -3, induciendo la dimerización del receptor y la activación de la cascada de señalización intracelular. VEGFR-1 y VEGFR-2 son promotores de la angiogénesis mientras que la activación de VEGFR-3 promueve la linfangiogénesis (66,67). La unión de los diferentes factores de crecimiento a los receptores es específica: VEGF-B y PlGF-1 y -2 se unen a VEGFR-1, mientras que VEGF-A interactúa con VEGFR-1 y -2. VEGF-C y VEGF-D se unen específicamente a VEGFR-3. VEGFR-2 es el receptor dominante que media en las funciones pro-angiogénicas de VEGF-A.

La liberación de VEGF en el cáncer se produce como respuesta a situaciones de hipoxia o medios ácidos. El VEGFR se expresa mayoritariamente en células endoteliales. La angiogénesis desempeña un papel crucial en la formación de nuevos vasos en tumores, facilitando el aporte de nutrientes a células tumorales así como acondicionando el acceso a la vasculatura “huésped” (67).

El VEGF se asocia con la estimulación de la angiogénesis en el cáncer de ovario precoz (68). A su vez, estudios celulares han identificado la presencia de VEGFR-2 en células de cáncer de ovario y en las células del endotelio asociado (69). Los niveles séricos de VEGF son mayores en mujeres con cáncer de ovario que en aquellas que tienen tumores benignos.

La expresión de Neuropilina -1 y -2 está aumentada en el cáncer de ovario (70). Este factor es un co-receptor del VEGF-A que potencia la vía de señalización del VEGFR-1. Otros factores pro-angiogénicos destacados en la carcinogénesis del cáncer de ovario

son el Factor de Crecimiento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor*, EGF), FGF-2, PDGF, Factor de Crecimiento del Nervio (*Nerve Growth Factor*, NGF), IL-8, ET-1 y EST-1 (67).

2.3 Factores moleculares implicados en la angiogénesis con valor pronóstico en el cáncer de ovario

Diferentes marcadores y factores angiogénicos han demostrado valor pronóstico de recaída y supervivencia. A continuación, se detallan los más importantes.

Microdensidad vascular y CD105 (endoglina)

Los vasos sanguíneos tumorales se caracterizan por su fenotipo inmaduro; generalmente son unos vasos dilatados y tortuosos, carentes de membrana basal y con escasos pericitos. Estos vasos forman un sistema aberrante de alta permeabilidad y presión intersticial, que realiza el aporte de una forma errática (71,72). La microdensidad vascular (MDV), medida tanto por marcadores pan-endoteliales como CD31 o CD34 como por específicos de células endoteliales de vasos neoformados como CD105 se correlaciona con una peor supervivencia en el cáncer de ovario avanzado (73).

VEGF

La expresión de VEGF en el cáncer de ovario ha demostrado tener un significado pronóstico. Niveles elevados de VEGF y la expresión de VEGFR-2 son factores pronósticos independientes en cáncer de ovario (74). Otros trabajos demuestran que la expresión de VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D y VEGFR-2 son factores de mal pronóstico que se asocian con una menor supervivencia y el desarrollo de metástasis (75).

HIF-1 α e i-NOS

La Sintasa de Óxido Nítrico inducible (i-NOS) puede promover la proliferación de las células tumorales y de las células endoteliales, y activa los mecanismos de proangiogénesis (76). i-NOS se sobreexpresa en un número importante de tumores, asociándose a un peor pronóstico.

La relación entre VEGF-A y HIF1- α (Factor Inducible por Hypoxia-1 α , *hypoxia-inducible factor 1-alpha*) ha sido igualmente objeto de estudio. Osada y col. (77) demostraron una asociación significativa entre ambas proteínas en el cáncer de ovario. Niveles elevados del ARN mensajero (ARNm) de HIF1- α se asociaron con una peor SG. Por el contrario, en otros estudios no se han encontrado una relación significativa entre ambos factores (78). Estos datos contradictorios sugieren que, además de HIF1- α , otros factores deben regular positivamente la secreción de VEGF-A.

Otros factores proangiogénicos

PDGF y PDGFR

La expresión de PDGFR α en el cáncer de ovario se asocia con un peor pronóstico y tumores pobremente diferenciados (25).

FGF-2

FGF2 es una citoquina angiogénica muy potente implicada en la progresión tumoral (67). Un estudio de perfil de expresión génica señala que *FGF2* desempeña un papel central durante todo el proceso de carcinogénesis ovárica (79).

Proteína Id-1

Las proteínas Id (inhibidoras de diferenciación/unión a ADN-1) actúan como oncogenes inhibiendo la diferenciación, a la vez que desempeñan un papel esencial en la

angiogénesis tumoral. La expresión de la proteína Id-1 en cáncer de ovario se asocia a tumores pobremente o moderadamente diferenciados, más agresivos y con una peor respuesta a la quimioterapia (80).

Receptores Eph

Los receptores Eph desempeñan un papel importante en el desarrollo tumoral, probablemente promoviendo la invasión celular y estimulando la angiogénesis. La expresión de EphB2 se asocia a un peor pronóstico en el cáncer de ovario, mientras que la expresión de EphB4 se correlaciona con una peor respuesta a la quimioterapia (81).

2.4 Terapia antiangiogénica en el cáncer de ovario

Dada la importancia de la angiogénesis en el desarrollo del carcinoma ovárico resulta de especial interés el desarrollo de terapias antiangiogénicas en esta neoplasia.

Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido a VEGF, ha demostrado su eficacia en el tratamiento del cáncer colorrectal, cáncer no microcítico de pulmón y carcinoma renal (82-84).

Dos estudios fase III han comparado carboplatino-paclitaxel-bevacizumab frente a quimioterapia sola en primera línea (GOG-218 e ICON7) (85,86). Los resultados de eficacia de estos estudios demuestran un aumento significativo de la SLP en el brazo de bevacizumab de mantenimiento, con un aumento de SG en el subgrupo de pacientes con citorreducción subóptima en el estudio ICON7. En la recaída platino-sensible, la combinación carboplatino-gemcitabina-bevacizumab ha demostrado un aumento en la SLP en comparación con carboplatino-gemcitabina (87). En el cáncer de ovario recidivante se dispone de estudios fase II que muestran una tasa de respuestas y una

SLP (4,4-4,7 meses) con bevacizumab en monoterapia significativamente superiores a los de otros agentes en esta situación (88,89).

Diferentes terapias en investigación dirigidas frente al VEGF que han demostrado resultados iniciales prometedores son los receptores solubles, como el VEGF-Trap, y los inhibidores tirosin-kinasa multidiana, como cediranib o pazopanib. Nuevos agentes antiangiogénicos no específicos del VEGF también han demostrado eficacia en este contexto (62). Entre ellos destacan los agentes de disrupción vascular (VDA, *vascular disrupting agents*), como la combretastatina A4, y los antagonistas de las angiopoyetinas, como el AMG386. La Tabla 13 detalla los resultados más importantes de estos nuevos agentes antiangiogénicos.

	N	% Platino-resistente	Eficacia
Cediranib (91)	60	57	41% platino-sensible 29% platino-resistente
Pazopanib (92)	17	26	TR: 47%
Combretastarina (94)	44	100	TR: 13.5%
AMG 386 (93)	53	ND	SLP 7.2 meses
VEGF-Trap (90)	162	100	TR: 11%

TR: tasa de respuestas. SLP: supervivencia libre de progresión. ND: no disponible.

Tabla 13. Ensayos Fase II con principales agentes antiangiogénicos en investigación en el cáncer de ovario.

3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE ALTO RENDIMIENTO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La expresión génica en una célula está estrictamente regulada en base al crecimiento y al estado de diferenciación. La pérdida de esta regulación lleva a situaciones anormales que alteran el comportamiento celular, como sucede en el cáncer. La identificación de

genes expresados de manera anormal en condiciones patológicas puede ser importante para la mejor caracterización de factores pronósticos y/o predictivos de respuesta al tratamiento oncológico, así como en la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

En los últimos años se han perfeccionado las técnicas que permiten el estudio simultáneo de la expresión de un número elevado de genes en un tejido determinado, generando lo que se conoce como perfil de expresión génica o “huella molecular”. Diferentes trabajos han mostrado la utilidad de los perfiles de expresión génica en la evaluación del pronóstico y la predicción de respuesta al tratamiento de tumores como el cáncer de mama o el linfoma difuso B de célula grande (95,96).

En el siguiente apartado, inicialmente se describirán las principales técnicas disponibles en la actualidad para el análisis simultáneo de múltiples genes, y después se analizarán los estudios publicados relacionados con la evaluación del pronóstico y la predicción de respuesta a quimioterapia en el cáncer de ovario.

3.1 Descripción de las técnicas de análisis de múltiples genes

Las técnicas principales de análisis de expresión génica que se utilizan son los *microarrays* o matrices de ADN y las plataformas basadas en RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de la Polimerasa tras Transcriptasa en Reverso).

Microarrays

El *Northern blot* ha sido durante mucho tiempo el método tradicional de análisis de la expresión génica y constituye la base para ulteriores técnicas que permiten el análisis simultáneo de la expresión de múltiples genes. Esta técnica consistente en la

transferencia del ARN a una membrana y la hibridación con una sonda específica para el gen de interés. Un *microarray* consiste en la disposición ordenada de sondas para secuencias específicas en un soporte plástico o de cristal. Las sondas pueden ser de ADN complementario (ADNc) u oligonucleótidos (97).

La metodología de la técnica comienza con la extracción del ARN total de las muestras a analizar. Posteriormente, el ARN se convierte en ADNc o en ARN complementario (ARNc), se amplifica y se marca con un fluoróforo. Estas moléculas de ADNc o ARNc marcadas hibridarán con las secuencias situadas en el *microarray* según el principio de complementariedad de bases de los ácidos nucleicos. Finalmente, un escáner analiza el nivel de expresión de cada uno de los genes de la muestra de forma proporcional a la fluorescencia emitida por las secuencias que han hibridado (Figura 3) (98).

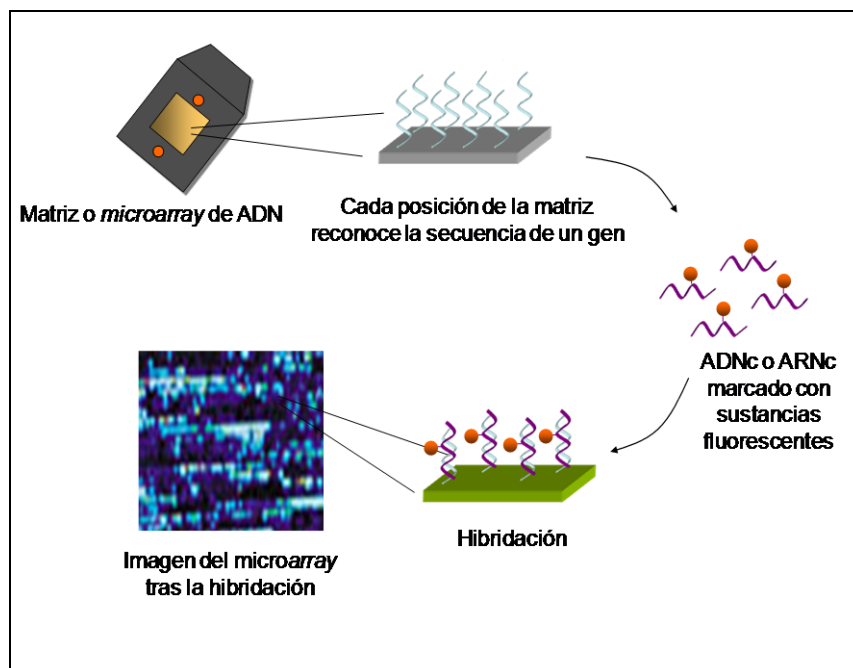


Figura 3. Metodología del análisis de la expresión génica con *microarrays*.

Los datos generados por el *microrarray* se analizan mediante sistemas bioinformáticos y como resultado final se obtienen los perfiles de expresión génica de las muestras. Los tipos de análisis que habitualmente se emplean son dos (97,98):

- Análisis no supervisado: su objetivo es identificar las posibles relaciones entre las muestras a estudio en base a la similitud en la expresión génica, sin tener en cuenta ninguna referencia previa sobre las características clínicas de los enfermos. El método empleado más frecuentemente es el agrupamiento jerárquico, que consiste en crear grupos o *clusters* de muestras que tienen un perfil de expresión génica similar. Los resultados se muestran gráficamente en un dendrograma. El principal inconveniente de este análisis es la posible identificación de subtipos tumorales sin relevancia clínica.
- Análisis supervisado: el objetivo de este análisis es la identificación de perfiles de expresión de genes que puedan clasificar las muestras en dos grupos diferenciados en base a características clínicas conocidas (recaída tumoral, respuesta a quimioterapia, etc). Este tipo de análisis es el más indicado para identificar grupos de genes asociados al pronóstico o a la respuesta a la quimioterapia.

Los *microarrays* analizan la expresión de miles de genes en unas pocas muestras, con el potencial riesgo de que el azar establezca asociaciones sin significado biológico. Este sesgo se potencia por el hecho de que normalmente el número de variables a estudio suele ser superior al número de casos analizados. Por estos motivos, los análisis de expresión de múltiples genes precisan de ser validados en una serie independiente (99).

Golub y cols. distinguen tres tipos de estudios de análisis de múltiples genes aplicables en oncología en función de los objetivos planteados (100):

- Estudios de descubrimiento de clase (*class discovery*): Determinan agrupaciones de muestras con un patrón de expresión génica homogéneo y diferenciado de otras. En estos estudios, las clases no están predefinidas ni se aporta ninguna información clínica sobre las muestras, por lo que se realizan con análisis no supervisados.
- Estudios de comparación de clase (*class comparison*): Investigan las diferencias en los perfiles de expresión de genes entre distintos tipos de muestras predeterminadas. En estos casos, las clases que se comparan están previamente definidas, independientemente de la expresión génica, por lo que se utilizan análisis supervisados.
- Estudios de predicción de clase (*class prediction*): A partir de clases previamente predefinidas y empleando análisis supervisados, su objetivo principal es desarrollar una función de clasificación que permita predecir con precisión el grupo biológico, la categoría diagnóstica o el pronóstico de un paciente a partir del perfil de expresión de genes de una muestra tumoral.

RT-PCR

La PCR es una técnica de biología molecular fundamental para el estudio del ADN. La reacción se lleva a cabo en un termociclador y consiste en la amplificación de una secuencia de ADN mediante la enzima Taq polimerasa. La enzima comienza a copiar la secuencia molde de ADN una vez que una pareja de oligonucleótidos, llamados cebadores o *primers*, hibridan específicamente con dicha secuencia. Cada ciclo de la reacción consta de los siguientes pasos: i) desnaturalización de la doble cadena de ADN

por calentamiento a 95°C; ii) hibridación de los oligonucleótidos a las cadenas sencillas; y iii) copia de la cadena molde por la enzima Taq polimerasa a 72°C.

Al duplicarse la cantidad de ADN amplificado en cada ciclo se producirá un aumento exponencial del número de copias del ADN problema, lo que facilitará el estudio posterior del mismo.

La RT-PCR es un tipo de PCR que permite el análisis del ARNm mediante su conversión a ADNc por una enzima ADN polimerasa llamada transcriptasa reversa. La RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR o PCR en tiempo real) permite medir el producto de la PCR directamente a medida que se va acumulando (98). La qRT-PCR, además de los cebadores directo y reverso de la reacción de PCR, puede utilizar una sonda, que consiste en un oligonucleótido complementario a la secuencia que se va a amplificar marcado con una sustancia fluorescente (F) y una sustancia (Q) que suprime esa fluorescencia. Durante la fase de extensión de la PCR no existe fluorescencia mientras la sonda esté intacta, ya que es suprimida por la proximidad de la sustancia Q. Una vez que la amplificación se produce, la sonda se degrada por la actividad 5'-3' exonucleasa de la Taq polimerasa, y la sustancia fluorescente deja de ser suprimida por la sustancia Q (Figura 4).

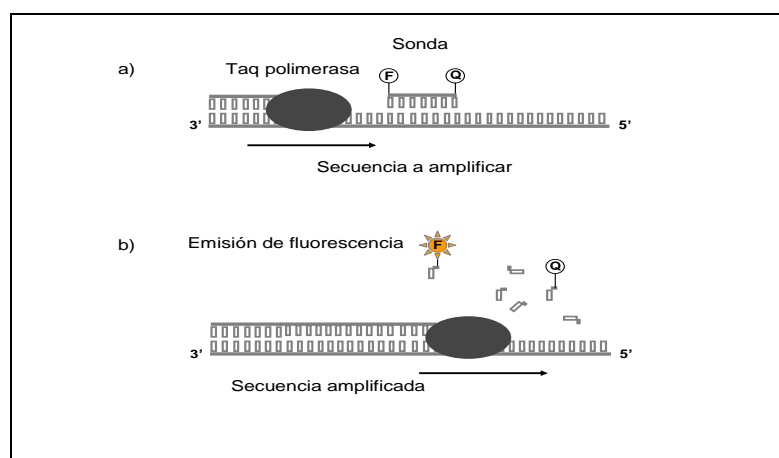


Figura 4. Emisión de fluorescencia en la reacción de qRT-PCR.

La señal de fluorescencia aumenta en cada ciclo de amplificación de la PCR. A medida que se acumula el producto, se genera una señal que aumenta exponencialmente hasta llegar a una fase de saturación (*plateau*) (98). El ciclo de PCR en el que la fluorescencia alcanza un valor umbral de 10 veces la desviación estándar de la fluorescencia basal es el que se toma como referencia para la medida cuantitativa. Este ciclo se denomina ciclo umbral o *threshold cycle* (Ct) y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de secuencia a amplificar (Figura 5) (101).

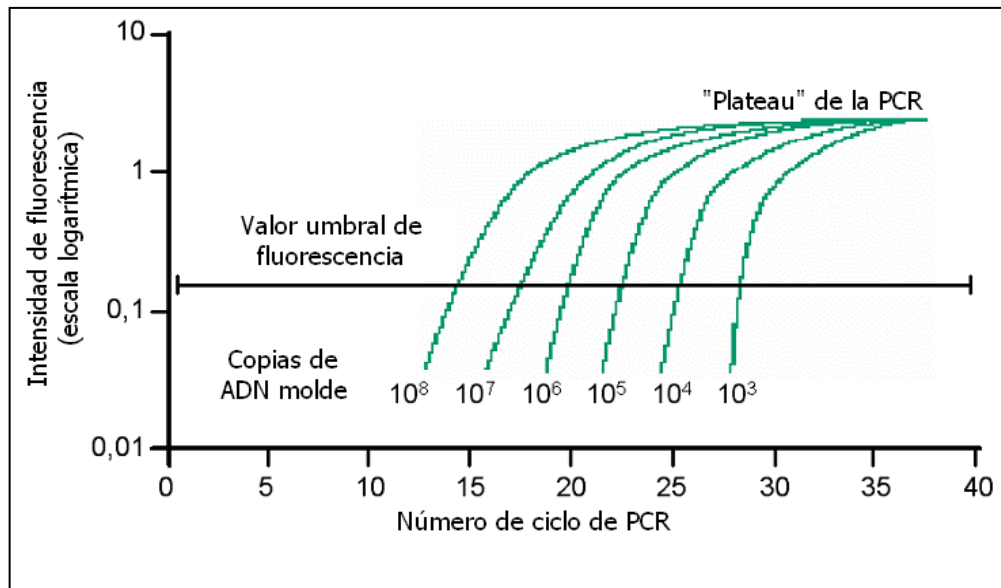


Figura 5. Curvas patrón de qRT-PCR: relación inversa entre la cantidad de ADN de la muestra y el ciclo umbral (Ct).

El análisis de expresión génica mediante la qRT-PCR se puede realizar por medio de la cuantificación relativa, en la que se comparan los niveles de expresión de un determinado gen entre dos o más muestras, para identificar el número de veces que se expresa un gen en una muestra en proporción a la otra (98).

Los *Taqman Gene Expression Assays* son productos comerciales constituidos por una colección de cebadores y sondas prediseñados que permiten la cuantificación específica de cualquier gen descrito en las bases de datos mediante el análisis de qRT-PCR (102). Una vez elegidas las sondas para los genes de interés, se cargan en los pocillos de la plataforma en la disposición elegida. Esta plataforma es la tarjeta microfluídica o array de baja densidad (*Taqman Low Density Array*). Sobre esta tarjeta se cargan posteriormente los ADNc sintetizados junto con el resto de reactivos necesarios para la reacción de PCR (98).

3.2 Aplicaciones de las técnicas de análisis de múltiples genes en el cáncer de ovario

El análisis de perfiles de expresión génica en cáncer de ovario ha sido objeto de investigación en los últimos años, con el fin de conocer los genes implicados en la carcinogénesis y caracterizar molecularmente los tumores, predecir el pronóstico y/o la respuesta a la quimioterapia, o identificar nuevas dianas terapéuticas. Sin embargo, los perfiles genómicos en cáncer de ovario se encuentran en las primeras etapas de su desarrollo y la mayoría, o bien no se han confirmado, o no han sido validados en series independientes.

Los primeros trabajos que analizaron perfiles de expresión génica en cáncer de ovario fueron análisis no supervisados que demostraron que dentro del cáncer de ovario se engloban tumores con características genéticas y biológicas diferentes (103). Entre ellos destaca un perfil de 110 genes que diferencia entre el cáncer de ovario asociado al gen BRCA-1 y el asociado al gen BRCA-2, pero que además es capaz de segregar en dos grupos los casos de cáncer esporádico de ovario (104). Otros estudios de *microarrays* han demostrado que los tumores *borderline* presentan perfiles de expresión génica

comunes a los tumores serosos de ovario de bajo grado, y diferentes al perfil del cáncer de ovario de alto grado (105-107).

Perfiles de expresión génica con valor pronóstico en el cáncer de ovario

En la Tabla 14 se resumen los perfiles de expresión génica con valor pronóstico más importantes hasta la fecha.

Estudios	Población	Muestras	Características	Nº genes
Hartmann (108)	79 Estadios III-IV	F	Análisis supervisado (comparación de clase) Recaída <21 vs >21 meses	14*
Spentzos (109)	57 Estadios III-IV 3 Estadios I-II	F	Análisis supervisado (predicción de clase) SG variable continua	115*
Berchuck (110,111)	54 Estadios III-IV 11 Estadios I-II	F	Análisis supervisado (predicción de clase)	7*
Tothill (112)	18 TBPM 30 Estadios I-II 237 Estadios III-IV	F	Análisis supervisado (predicción de clase)	-*
Crijns (113)	157 Estadios III-IV	F	Análisis supervisado SG variable continua	86*
Mendiola (116)	61 Estadios III-IV	P	Análisis supervisado (predicción de clase)	34
Jochumsen (114)	11 Estadios I-II 32 Estadios III-IV	F	Análisis supervisado (predicción de clase)	14*
Kostantinopoulos (115)	6 BRCA1/2	F	Análisis supervisado (predicción de clase)	60*

TBPM: Tumores de bajo potencial maligno o borderline. F: muestras en fresco. P: muestras en parafina. * resultados validados en muestras independientes.

Tabla 14. Estudios de *microarrays* en cáncer de ovario con valor pronóstico.

En el año 2004 Spentzos y cols. presentaron el Perfil Pronóstico de Cáncer de Ovario (OCP, *Ovarian Cancer Prognostic Profile*) basado en la expresión de 115 genes y validado en una muestra independiente (109). El OCP fue capaz de diferenciar un

subgrupo de pacientes de pronóstico favorable, con una mediana de SLP de 33 meses y de SG no alcanzada, y un subgrupo desfavorable, con una mediana de SLP de 10 meses y de SG de 30 meses.

En el año 2008, Tothill y cols. publicaron el mayor estudio realizado hasta la fecha de análisis de expresión génica en cáncer de ovario con implicaciones pronósticas (112). Estos autores identificaron seis subtipos moleculares distintos con diferente pronóstico.

Crijns y cols. desarrollaron un perfil de expresión basado en 86 genes con valor pronóstico en el cáncer de ovario avanzado (113). El perfil discriminaba entre pacientes con pronóstico desfavorable (SG 19 meses) y favorable (SG 41 meses), y, junto con la cirugía citorreductora, mantenía el valor pronóstico independiente en el análisis multivariante. Este modelo fue validado con los datos publicados en una muestra externa que aplicaba una plataforma de *microarrays* diferente, por lo que ha sido objeto de crítica y no se puede considerar que la validación realizada sea correcta.

En el año 2010, Cannistra y cols. publicaron un perfil de 60 genes que definen un grupo de pacientes con cáncer de ovario *BRCAness*, es decir, con disfunción en los genes BRCA y, por tanto, una menor capacidad para reparar lesiones en la doble cadena del ADN mediante el proceso de recombinación homóloga (115). Este perfil ha demostrado tener valor pronóstico en el cáncer de ovario familiar y esporádico. El grupo de pacientes con un perfil génico *BRCAness* presentaba una SG de 72 meses, frente a 41 meses para el grupo no-*BRCAness*. Sin embargo, este perfil define un grupo de enfermas con una enfermedad sensible a platinos, y no es posible diferenciar si el mejor pronóstico de estas enfermas se debe a que se trata de una enfermedad menos agresiva, o de una mayor sensibilidad a la quimioterapia.

Nuestro grupo publicó en 2008 el primer trabajo que identificó un perfil de expresión de genes exclusivamente relacionados con la angiogénesis con valor pronóstico en el cáncer de ovario avanzado (116). El perfil de 34 genes fue capaz de discriminar dos grupos con diferente pronóstico, tanto en SLP como en SG, manteniendo su valor pronóstico independiente en el análisis multivariante.

Perfiles de expresión génica con valor predictivo de respuesta a la quimioterapia en el cáncer de ovario

En la Tabla 15 se detallan los análisis de expresión génica que han identificado perfiles moleculares de respuesta a la quimioterapia basada en platinos en pacientes con cáncer de ovario (115,117-121). Estos trabajos presentan importantes limitaciones, como la variabilidad en la selección de pacientes y los diferentes criterios de respuesta. A continuación, se analizarán tres de ellos con más detalle por ser los más relevantes.

En el año 2005, Spentzos y cols. identificaron un perfil compuesto por 93 genes predictivo de respuesta patológica en una serie de pacientes intervenidas mediante laparotomía de *second look* después de ser tratadas con quimioterapia basada en platinos y taxanos (118). Este perfil se validó en una muestra independiente de 36 pacientes, y se identificaron dos subgrupos con diferencias significativas en SG (mediana de 41 meses *versus* “no alcanzada”). En el análisis multivariante, la correlación entre el perfil predictivo y la SG fue independiente de los factores pronósticos clínicos clásicos. Este estudio tiene una especial relevancia al evaluar respuesta completa patológica o enfermedad residual en la laparotomía de *second look*, definiéndose así de forma óptima los conceptos de quimio-sensibilidad y quimio-resistencia. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en la serie de pacientes en que se validó el perfil no se había realizado la

laparotomía de *second look*, por lo que se emplearon SLP y SG como marcadores subrogados de la respuesta patológica.

Estudios	N	Muestras	Criterios de respuesta	Régimen quimioterapia	Nº genes
Bachvarov (121)	25	F	Recaída < 6 vs > 30 meses	P/taxano Cb/Cp	43
Jazaeri (117)	60	F	Recaída < 6 vs > 13 meses + RC	Cb/paclitaxel Cb/Cp Cb	9
Spentzos (118)	65	F	RCp second-look	P/taxano	93
Helleman (119)	185	F	OMS	P/Cb P/paclitaxel P/adriamicina/H P/Cp/adriamicina P	9
Dressman (120)	85	F	OMS	P/Cp P/paclitaxel P	1727
Kostantinopoulos (115)	6	F	OMS	P/taxano Inhibidores PARP	60

P: platino. Cb: Carboplatino. Cp: Ciclofosfamida. H: hexametilmelanina. RC: Respuesta completa. RCp: Respuesta completa patológica. PARP: Polimerasa poli-ADP ribosa.

Tabla 15. Estudios de *microarrays* en cáncer de ovario que analizan perfiles de expresión predictivos de respuesta a la quimioterapia.

Dressman y cols. desarrollaron un perfil de expresión a partir del análisis de 85 pacientes con cáncer de ovario avanzado tratadas con carboplatino y paclitaxel (120). La evaluación de la respuesta se realizó empleando los criterios de la OMS. Este perfil alcanzó un valor predictivo del 78% en una muestra independiente conformada por 36 pacientes.

Como se ha comentado en el apartado anterior, en el año 2010 se publicó un perfil de 60 genes capaz de diferenciar el cáncer de ovario *BRCAness* de aquellos no-*BRCAness* con

una precisión del 94% (115). El perfil *BRCAness* se asociaba a una mayor sensibilidad a la administración de platino en pacientes con cáncer de ovario y mutación germinal en *BRCA1/2* conocida, y al uso de inhibidores PARP en líneas celulares con *BRCA2* mutado.

Como se puede deducir después de todo lo expuesto, se han descrito pocos perfiles génicos asociados al pronóstico, y menos aún con valor predictivo de respuesta a la quimioterapia en cáncer de ovario, la mayoría sin ninguna validación. Aunque estos primeros resultados obtenidos auguran un futuro prometedor para los perfiles génicos en cáncer de ovario, todavía es pronto para considerarlos útiles para su utilización en la clínica diaria hasta que se demuestre su eficacia y validez en otros estudios realizados por investigadores independientes.

Hipótesis y objetivos

Una de las principales causa de muerte de las pacientes con cáncer de ovario avanzado es la resistencia a la quimioterapia. Ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la resistencia y sensibilidad a los tratamientos permitirá avanzar en este campo a través de una estrategia que combinase los agentes quimioterápicos con otras terapias que abordasen los mecanismos determinantes de la resistencia.

Existen evidencias experimentales suficientes que indican que el crecimiento y diseminación de un tumor es en gran medida dependiente de la angiogénesis. En el carcinoma de ovario la promoción de la angiogénesis se asocia a una rápida recidiva y un peor pronóstico. Sin embargo, todavía no se conocen con precisión los mecanismos que desencadenan el proceso de angiogénesis en las neoplasias humanas, incluyendo al carcinoma de ovario. Además, hasta ahora no se ha analizado globalmente el papel de los factores implicados en la angiogénesis tumoral en la resistencia o sensibilidad al tratamiento con quimioterapia. El estudio de la expresión de múltiples genes implicados en los mecanismos de angiogénesis en una serie de carcinomas de ovario con un seguimiento clínico apropiado permitirá determinar con mayor precisión el papel jugado por la angiogénesis en la evolución de estos tumores para intentar identificar un predictor de respuesta a la quimioterapia. Además, el mejor conocimiento de los genes reguladores de la angiogénesis en el cáncer de ovario permitirá el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

1. HIPÓTESIS

Las hipótesis estadísticas se definieron de la siguiente manera:

- Hipótesis nula: Los grupos de enfermas definidos por el perfil de expresión de genes analizado por qRT-PCR no difieren en la tasa de respuesta a la quimioterapia con carboplatino y paclitaxel.

- Hipótesis alternativa: El perfil de expresión de genes analizado por qRT-PCR establece dos grupos de enfermas que presentan diferencias significativas en la tasa de respuesta a la quimioterapia con carboplatino y paclitaxel.

2. OBJETIVOS

- 1) Identificar un perfil de expresión de genes relacionados con la angiogénesis con capacidad de predecir la respuesta clínica según criterios RECIST a la quimioterapia basada en la combinación de carboplatino y paclitaxel en el cáncer de ovario avanzado.

- 2) Realizar un análisis univariante y multivariante de los posibles factores predictivos de respuesta a la quimioterapia y su valor pronóstico.

- 3) Relacionar este perfil con el tiempo hasta la progresión, la supervivencia global y el patrón de respuesta al tratamiento estándar de primera línea en el cáncer de ovario avanzado.

- 4) Identificar genes relacionados con la angiogénesis que puedan desempeñar un papel importante en el desarrollo del cáncer de ovario y que pudieran actuar como potenciales dianas terapéuticas.

Materiales y métodos

1. PACIENTES Y VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS ESTUDIADAS

El presente estudio se realizó en 61 pacientes diagnosticadas de carcinoma de ovario en estadio avanzado en el Hospital Universitario La Paz entre febrero de 1996 y diciembre de 2003. Se aplicaron los siguientes criterios para la inclusión de las pacientes en el estudio:

- Diagnóstico anatomopatológico de carcinoma de ovario.
- Estadio III o IV según la clasificación FIGO.
- Disponibilidad de muestra incluida en parafina con al menos un 80% de celularidad tumoral sin zonas necróticas.
- Disponibilidad de una TC tóraco-abdominal al diagnóstico.
- Tratamiento realizado, definido como:
 - Cirugía citorreductora.
 - Administración de quimioterapia con carboplatino-paclitaxel durante un mínimo de seis ciclos.
 - Seguimiento clínico durante al menos 36 meses desde la finalización del tratamiento.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz.

A continuación se enumeran las variables clínicas y anatomopatológicas recogidas de forma retrospectiva para realizar el estudio:

- Edad al diagnóstico.

- Fecha de diagnóstico.
- Tipo histológico.
- Grado de diferenciación.
- Cirugía realizada: citorreducción (óptima o subóptima).
- Fecha de finalización del tratamiento con quimioterapia.
- Respuesta clínica obtenida según criterios RECIST.
- Supervivencia libre de progresión.
- Supervivencia global.

La estratificación de los datos se realizó según los siguientes parámetros: edad (menor o igual a 40 años *versus* mayor de 40 años); cirugía citorreductora (óptima frente a subóptima); estadio (III *versus* IV); tipo histológico (seroso frente no seroso); grado de diferenciación (1 *versus* 2-3); y respuesta al tratamiento (completa o parcial *versus* progresión).

2. CONCEPTOS Y DEFINICIONES

Se consideró cirugía citorreductora óptima aquella en que la enfermedad residual (ER) fue menor o igual a 1 cm, y subóptima en la que quedó ER mayor de 1 cm.

La respuesta a la quimioterapia en el cáncer de ovario puede evaluarse de forma radiológica o bioquímica (mediante medición del Ca125). En este estudio la respuesta se valoró sólo desde el punto de vista radiológico, al no disponer en todas las pacientes de las determinaciones de Ca125. Para la evaluación radiológica se emplearon los criterios RECIST 1.0. En ellos se considera “respuesta parcial” a la disminución de al

menos un 30% de la suma de los diámetros mayores de las lesiones tumorales, y “respuesta completa” a la desaparición de todas las lesiones visibles.

La Supervivencia Libre de Progresión se definió como el tiempo transcurrido desde la fecha de inicio del primer tratamiento hasta la recaída o hasta la última visita (si no se hubiera producido la recaída). La Supervivencia Global se definió como el intervalo de tiempo comprendido entre el inicio de la terapia y la fecha del fallecimiento o de la última revisión.

3. SELECCIÓN DE GENES

El objetivo principal del estudio fue identificar un perfil de genes implicados en la angiogénesis con valor predictivo de respuesta a la quimioterapia en el cáncer de ovario.

Inicialmente se seleccionaron genes relacionados con el proceso angiogénico en los que se había descrito previamente algún tipo de implicación en el proceso de carcinogénesis ovárica y, por otro lado, se incluyeron genes que habían sido descritos como moduladores de la angiogénesis en distintos tipos tumorales (no necesariamente asociados con el carcinoma de ovario). De esta forma, tras una extensa revisión de la literatura, se seleccionaron 82 genes (Tabla 16).

Una vez seleccionados los genes de interés, se hizo la búsqueda de las secuencias de referencia para cada uno de ellos, en la base de datos del NCBI *National Center for Biotechnology Information*), mediante el código *Unigene*.

Símbolo	Unigene	Símbolo	Unigene	Símbolo	Unigene
AGT	Hs01586213	EPBH4	Hs01119118	NRP2	Hs00187290
AGTR1	Hs00258938	EPO	Hs00171267	PDGFB	Hs00234042
AGTR2	Hs00169126	EPOR	Hs00181092	PDGFC	Hs00211916
ANGPT1	Hs00181613	ERBB2	Hs00170433	PDGFRA	Hs00183486
ANGPT2	Hs00169867	ETS1	Hs00428287	PDGFRB	Hs00182163
ARNT	Hs00231048	ETV4	Hs00385910	PECAM1	Hs00169777
AURKB	Hs00177782	FGF2	Hs00266645	PLAU	Hs00170182
AURKC	Hs00152930	FGFR1	Hs00241111	PLAUR	Hs00182181
BRCA1	Hs00173233	FIGF	Hs00189521	PTGS2	Hs00153133
BRCA2	Hs00609060	FLT1	Hs01052936	ROBO1	Hs00268049
CAV1	Hs00184697	FLT4	Hs00176607	SERPINB5	Hs00184728
CD34	Hs00156373	HIF1A	Hs00153153	SPARC	Hs00234160
CD36	Hs00169627	ID1	Hs00357821	STK6	Hs00269212
CD44	Hs00174139	ID2	Hs00747379	TEK	Hs00176096
CTSB	Hs00157194	ID3	Hs00171409	TGFB1	Hs00171257
CXCL1	Hs00236937	IL6	Hs00174131	TGFBR2	Hs00234253
CXCL12	Hs00171022	IL8	Hs00174103	THBS1	Hs00170236
EDN1	Hs00174961	KDR	Hs00176676	THBS2	Hs00170248
EDN2	Hs00266516	KIT	Hs00174029	TIE1	Hs00178500
EDN3	Hs00171177	KITLG	Hs00241497	TIMP1	Hs00171558
EDNRA	Hs00609865	KLK6	Hs00160519	TIMP2	Hs00234278
EDNRB	Hs00240747	MMP1	Hs00233958	TP53	Hs00153349
EFNB1	Hs00270004	MMP2	Hs00234422	VEGF	Hs00900054
EFNB2	Hs00187950	MMP3	Hs00968305	VEGFB	Hs00173634
EGF	Hs00153181	MMP7	Hs00159163	VEGFC	Hs00153458
EGFR	Hs00193306	NOS2A	Hs00167257	VHL	Hs00184451
EPHB2	Hs00362096	NOS3	Hs00167166		
EPHB3	Hs00177903	NRP1	Hs00826129		

Tabla 16. Relación de genes incluidos en este estudio. Se incluyen tanto el símbolo oficial como la secuencia de acceso al GenBank.

Una vez identificada la secuencia de cada uno de los genes, se realizó la búsqueda de sondas mediante el software de la empresa *Applied Biosystems (Taqman Gene Expression Assays)* con los que se configuraron las tarjetas microfluídicas (*Taqman Low Density Array*) para realizar el análisis de expresión génica. Estas tarjetas permiten el análisis simultáneo de hasta 384 genes; en cada pocillo se depositan los reactivos específicos para cada gen (la sonda con dos cebadores, un directo y otro reverso) y en los puertos se carga la reacción del ADNc de cada muestra y los reactivos de PCR.

Genes de referencia o *housekeeping*. Algoritmo geNorm.

El gen de referencia, también llamado control endógeno o *housekeeping* (HK), es aquel cuya expresión, *a priori*, no varía de una muestra a otra, por lo que garantiza la existencia de una misma cantidad de ARNm en las distintas muestras estudiadas. Al analizar muestras conservadas en parafina es preciso emplear más de un control endógeno para evitar artefactos por eventos como la degradación del material. En este estudio la expresión de los genes HK seleccionados fue analizada mediante el algoritmo geNorm versión 3.4. Este programa, accesible en la red, realiza básicamente dos análisis: uno de evaluación de la estabilidad en la expresión de los genes seleccionados y otro que valora el número idóneo de ellos que debemos utilizar (122,123). Para cuantificar la estabilidad de cada gen, el cociente de expresión de dos genes internos debe ser por definición idéntico en todas las muestras, independientemente de las condiciones ambientales o del tipo celular. Por otra parte, es preciso emplear múltiples genes normalizadores a fin de realizar una valoración reproducible de la expresión relativa de uno o más genes. A este efecto, este algoritmo incluye la media geométrica de los valores de estabilidad de los distintos genes control empleados como factor de normalización. Se recomienda emplear un número mínimo de tres genes normalizadores (los más estables) y añadir otros nuevos hasta que la inclusión de éstos no contribuya significativamente a la modificación del factor de normalización.

En nuestro estudio, analizamos la expresión de 14 genes controles endógenos empleados con frecuencia en los análisis de expresión génica (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *18S*, *HMBS*, *HPRT1*, *IPO8*, *PGK1*, *PPIA*, *RPLP0*, *TBP*, *TFRC* y *UBC*). En todos ellos se observó un adecuado comportamiento con mínimas variaciones de expresión entre las diferentes muestras tumorales. Con este método se identificaron cinco genes (*18S*, *ACTB*, *B2M*, *GAPDH* y *GUSB*) cuya combinación resultaba la más

apropiada para normalizar los resultados. Los nueve genes HK restantes fueron excluidos. A partir de los cinco genes seleccionados se calculó un factor de normalización basado en su media geométrica, que se aplicó en los valores crudos de Ct de los genes a estudio.

4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras tisulares se fijaron en formol al 10% y se incluyeron en parafina siguiendo los métodos convencionales. De los bloques de parafina se obtuvieron secciones histológicas de 4 µm de espesor que posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina. Todos los casos fueron revisados para confirmar el diagnóstico. Para el estudio molecular se obtuvieron de cuatro a ocho secciones de 4 µm de espesor de los bloques de parafina.

El procesamiento de las muestras se realizó siguiendo una serie de pasos que se describen a continuación: aislamiento del ARN total, síntesis del ADNc, reacción de amplificación mediante qRT-PCR y medida de la expresión génica.

Aislamiento de ARN total

El ARN total fue aislado mediante la utilización del kit *Masterpure RNA Purification* (EPICENTRE *Biotechnologies*, Madison, WI, USA), específicamente diseñado para muestras parafinadas, siguiendo el protocolo de la casa comercial con mínimas modificaciones. La concentración y pureza del ARN total aislado se determinó mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. La calidad del ARN fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ARN total aislado se almacenó a -70°C hasta su utilización.

Síntesis del ADNc

Para la síntesis de ADNc se utilizó el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), que permite convertir cuantitativamente desde 0,1 µg hasta 10 µg de ARN en ADNc, en un volumen de 50 µL. En nuestro estudio decidimos abordar la síntesis de ADNc a partir 1 µg de ARN total de cada una de las muestras.

La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo en un termociclador modelo *GeneAmp PCR System 2700* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), siguiendo el protocolo del kit. Se realizó en dos pasos, con las siguientes condiciones:

1º: 10 minutos a temperatura de 25°C

2º: 120 minutos a temperatura de 37°C

Los ADNc se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización.

Reacción de qRT-PCR

Para el análisis de la expresión génica por qRT-PCR se utilizó el sistema *Taqman Gene Expression Assays*. Una vez seleccionadas las sondas para los genes de interés, se utilizó como soporte las tarjetas microfluídicas o arrays de baja densidad (*Taqman Low Density Array*). En este estudio cada tarjeta fue configurada con dos muestras, lo que permitía analizar los 96 genes (los 82 genes implicados en angiogénesis seleccionados previamente, y los 14 genes HK) de cada muestra por duplicado. Cada uno de los puertos de la tarjeta contenía 50 µL de *Taqman Universal PCR Master Mix* y 50 µL del ADNc correspondiente (cantidad equivalente a 1 µg del ARN total).

Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en un termociclador *ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las amplificaciones se realizaron por duplicado, con los ensayos específicos prediseñados para cada gen.

Medición de la expresión génica

El Ct (número de ciclo de PCR en el cual la fluorescencia alcanza un valor umbral) se calculó con el software SDS versión 2.2 (*Applied Biosystems*).

Los valores crudos de Ct fueron sometidos a un proceso de normalización que asegura que las variaciones en los niveles de expresión no se deben a cambios en las cantidades del material de partida. Una vez obtenidos los valores crudos de Ct para cada gen se realizó la normalización frente a los genes de referencia seleccionados. Todos los valores de Ct fueron transformados de esta manera a valores normalizados y relativos de expresión.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos cuantitativos se describieron como medias (mínimo-máximo), mientras que las variables cualitativas se recogieron como frecuencias absolutas y porcentajes. Las asociaciones entre variables categóricas fueron calculadas con el test χ^2 y el test exacto de Fischer. Todas las muertes observadas en la recogida de datos estaban relacionadas con el tumor y, por tanto, la SG fue equivalente a la supervivencia específica por cáncer para la realización del análisis. Las curvas de SG y SLP fueron generadas por el método de Kaplan-Meier. Las diferencias entre las curvas de supervivencia se analizaron para determinar significado estadístico mediante el log-rank test.

El análisis de regresión de Cox se empleó para generar múltiples modelos en base a la combinación de los genes más significativos. Se definieron como “genes protectores” aquellos que se asociaban con un *Hazard Ratio* (HR) menor de uno, mientras que se consideraron “genes de riesgo” aquellos que se asociaron con un HR mayor de uno. Se crearon dos grupos de riesgo (bajo y alto riesgo) de acuerdo con el nivel de expresión de los genes incluidos en el perfil. Para seleccionar el modelo más preciso se utilizó el criterio de información de Akaike (*Akaike Information Criterion*, AIC) (124). El AIC es una herramienta que mide la capacidad de estimación de un modelo estadístico. Para un conjunto de datos, los diferentes modelos estimativos se pueden ordenar según el índice de AIC, considerándose mejor aquel modelo con menor valor de AIC.

Considerando que todas las muestras se emplearon para generar el modelo, la precisión estimada del perfil podía estar sobreestimada. Con la intención de evitar este sesgo, se aplicó el sistema de validación LOOCV (*Leave-One-Out Cross Validation*) (125). La precisión del modelo fue determinada mediante las curvas ROC (*Receiver Operating Curves*) para calcular la sensibilidad y la especificidad. El análisis multivariante para factores de confusión fue realizado en base a modelos de regresión proporcional de Cox, con variables categóricas o continuas, según estuviese indicado. Para este análisis, el perfil de expresión génica se consideró como una categoría binaria (bajo riesgo o alto riesgo). Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Los cálculos estadísticos se realizaron con los programas SAS 9.1, *Enterprise Guide* 3.0 y SPSS (versión 9.0; SPSS Inc Chicago, IL, USA). La validación mediante el LOOCV se realizó empleando el *R language* versión 2.2 con el *Design Software* versión 2.0.

Resultados

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Las características clínicas y anatomopatológicas de las 61 pacientes incluidas en el estudio se describen en la Tabla 17. La mediana de edad al diagnóstico fue de 53 años (rango 21-82). Según se estableció en los criterios de inclusión, todas las pacientes habían sido diagnosticadas de un carcinoma de ovario avanzado, presentando la mayoría de ellas un estadio III, tumores pobremente diferenciados e histología serosa.

Características	Pacientes (n = 61)	
	No.	%
Edad	53 (21-82)	
Histología		
Seroso	42	68,8
Otros	19	31,2
Grado		
1	5	8,2
2	20	32,8
3	35	57,4
Desconocido	1	1,6
FIGO		
III	51	83,6
IV	10	16,4
Cirugía citorreductora		
Óptima (≤ 1 cm)	19	31,1
Subóptima (> 1 cm)	28	45,9
Desconocida	14	23,0
Primera línea de quimioterapia		
Platinos	61	100
Taxanos	61	100
Respuesta RECIST inicial a la quimioterapia		
Si	52	85,2
No	9	14,8
Estatus final		
Libre de progresión	12	19,7
Éxito	48	78,7

Tabla 17. Características clínico-patológicas de las pacientes.

Todas las pacientes habían sido tratadas con una cirugía citorreductora, y en el 31% de los casos se consiguió una citorreducción óptima ($ER \leq 1\text{cm}$). Todas las pacientes recibieron al menos seis ciclos de quimioterapia basada en la combinación de carboplatino y paclitaxel. Cincuenta y dos pacientes (85,2% del total) alcanzaron una respuesta radiológica (respuesta completa o parcial según los criterios RECIST) tras el tratamiento citotóxico.

Durante el periodo de seguimiento las pacientes fueron revisadas cada 3 meses durante los dos primeros años, cada 6 meses desde el tercero hasta el quinto año, y posteriormente una vez al año. La mediana de seguimiento fue de 44 meses (rango 1-127). En el global de enfermas la mediana de SG fue de 40 meses (IC 95%: 25,4-54,8), y la mediana de SLP de 17 meses (IC 95%: 13,7-20,6) (Figura 6).

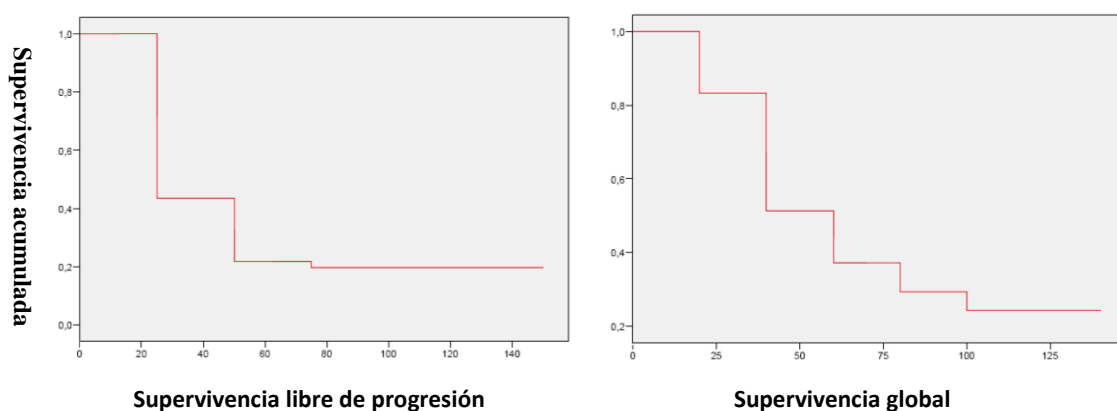


Figura 6. Curvas Kaplan Meier de SLP y SG para el global de las pacientes.

2. GENERACIÓN DE UN PERFIL PREDICTIVO DE RESPUESTA

Los HR obtenidos mediante el análisis univariante del modelo de regresión de Cox se emplearon para determinar los genes cuya expresión se asociaba a la respuesta a la quimioterapia. Tras aplicar el criterio de información de Akaike, el perfil quedó

compuesto por ocho genes, ya que el valor mínimo AIC, antes de llegar al modelo saturado, se alcanzaba en el paso ocho, es decir, tras la inclusión de un octavo gen. De las potenciales combinaciones de ocho genes, la mejor “subserie” se determinó calculando de nuevo el estadístico AIC, corregido según el número de casos y variables. Entre los modelos que tenían un valor parecido se tomó aquel perfil que tenía el valor mínimo AIC y que resultó poseer la mayor plausabilidad biológica. Los ocho genes seleccionados que integran el modelo de respuesta clínica fueron *CAVI*, *CXCL1*, *EDN3*, *EGF*, *EPOR*, *FGF2*, *NRP1* y *TIMP2* (Tabla 18).

Gen	Peso específico	Error estándar	X²
CAV1	-1,4832	1,1373	0,1922
CXCL1	-4,1109	1,6393	0,0122
EDN3	-7,2016	3,1215	0,0211
EGF	-2,3034	0,9656	0,0171
EPOR	-1,6929	0,7291	0,0202
FGF2	3,1892	1,9852	0,1082
NRP1	3,1649	1,8527	0,0876
TIMP2	2,6203	1,4387	0,686
Término independiente	3,6728	1,6869	0,0295

Tabla 18. Genes que integran el perfil predictivo de respuesta clínica a la quimioterapia.

De los ocho genes que se correlacionaban con la respuesta, cinco se consideraron genes protectores ($HR < 1$), y los otros tres genes de riesgo ($HR > 1$). En la Tabla 19 se muestran los datos de significación del modelo predictivo.

La capacidad discriminante del modelo fue valorada mediante el índice ROC (*Receiving Operating Curves*). El perfil de ocho genes tenía un valor predictivo de respuesta con una capacidad de un AUC de 0,955 ($p < 0,001$). Tras aplicar el método LOOCV para evitar sesgos por sobreestimación del modelo se obtuvo una capacidad de predecir la

respuesta a la quimioterapia de un AUC corregido de 0,880 (IC 95%, 0,776-0,985) (Figura 7 y Tabla 19).

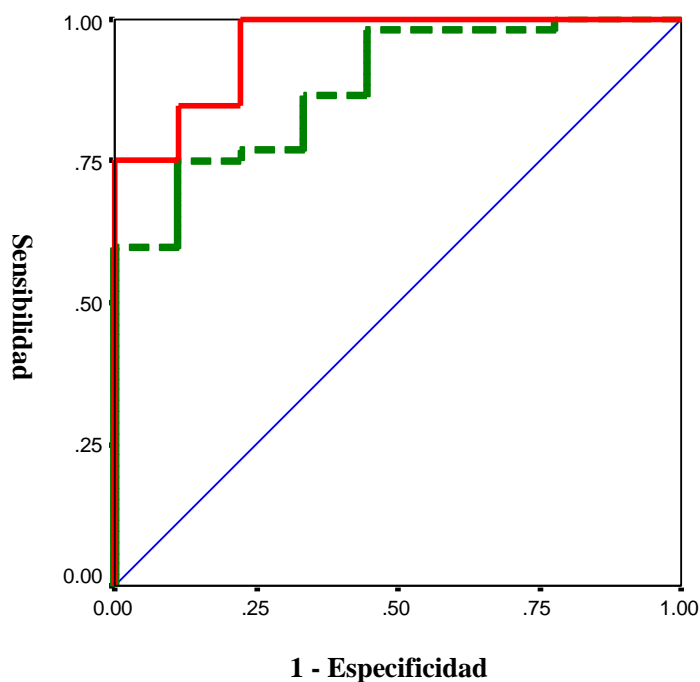


Figura 7. Área Bajo la Curva ROC. En rojo se señala la curva ROC correspondiente al modelo y en verde la curva ROC tras validación mediante LOOCV.

	AUC	Error estándar	p	IC del 95%
Probabilidad del perfil	0,955	0,032	<0,001	0,892-1,018
Probabilidad del perfil tras validación LOOCV	0,880	0,053	<0,001	0,776-0,985

Tabla 19. Valor predictivo de respuesta a la quimioterapia del perfil génico. Validación cruzada LOOCV.

Este valor predictivo de respuesta clínica a la quimioterapia puede analizarse de manera continua, o bien estableciendo puntos de corte de acuerdo al análisis estadístico realizado (Tabla 20). Si aplicamos el punto de corte en 0,75, la sensibilidad del perfil es

del 96,2%, y la especificidad del 78%. Es decir, que para este valor, el perfil de genes identifica correctamente a siete de las nueve enfermas no respondedoras a la quimioterapia.

Modelo de respuesta clínica				Modelo tras la validación LOOCV			
Puntos de corte	S	E	S+E	Puntos de corte	S	E	S+E
-1,00	1	0	1	-1,00	1	0	1
0,01	1	0,11	1,11	0,01	1	0,11	1,11
0,03	1	0,22	1,22	0,02	1	0,22	1,22
0,06	1	0,33	1,33	0,07	0,98	0,22	1,20
0,10	1	0,44	1,44	0,15	0,98	0,33	1,31
0,18	1	0,56	1,56	0,30	0,98	0,44	1,43
0,24	1	0,67	1,67	0,47	0,98	0,56	1,54
0,36	1	0,78	1,78	0,55	0,96	0,56	1,52
0,61	0,98	0,78	1,76	0,57	0,94	0,56	1,50
0,75	0,96	0,78	1,74	0,60	0,92	0,56	1,48
0,77	0,94	0,78	1,72	0,64	0,90	0,56	1,46
0,78	0,92	0,78	1,70	0,65	0,88	0,56	1,44
0,81	0,90	0,78	1,68	0,73	0,87	0,56	1,42
0,84	0,88	0,78	1,66	0,80	0,87	0,67	1,53
0,84	0,87	0,78	1,64	0,81	0,85	0,67	1,51
0,87	0,85	0,78	1,62	0,81	0,83	0,67	1,49
0,89	0,85	0,89	1,74	0,82	0,81	0,67	1,47
0,89	0,83	0,89	1,72	0,83	0,79	0,67	1,47
0,90	0,81	0,89	1,70	0,86	0,77	0,67	1,44
0,91	0,79	0,89	1,68	0,89	0,77	0,78	1,55
0,92	0,77	0,89	1,66	0,93	0,75	0,78	1,53
0,94	0,75	0,89	1,64	0,97	0,75	0,89	1,64
0,97	0,75	1	1,75	0,98	0,73	0,89	1,62
0,98	0,73	1	1,73	0,98	0,71	0,89	1,60
0,98	0,71	1	1,71	0,98	0,69	0,89	1,58
0,98	0,69	1	1,69	0,98	0,67	0,89	1,56
0,98	0,67	1	1,67	0,98	0,65	0,89	1,54
0,98	0,65	1	1,65	0,99	0,63	0,89	1,52
0,99	0,63	1	1,63	0,99	0,62	0,89	1,50
0,99	0,62	1	1,62	0,99	0,60	0,89	1,49
0,99	0,60	1	1,60	0,99	0,60	1	1,60
0,99	0,58	1	1,58	0,99	0,58	1	1,58

Tabla 20. Sensibilidad y especificidad de las curvas ROC generadas para el perfil génico predictivo de respuesta clínica, y tras pasar la validación LOOCV.

Modelo de respuesta clínica				Modelo tras la validación LOOCV			
Puntos de corte	S	E	S+E	Puntos de corte	S	E	S+E
0,99	0,56	1	1,56	0,99	0,56	1	1,56
0,99	0,54	1	1,54	0,99	0,54	1	1,54
0,99	0,52	1	1,52	0,99	0,52	1	1,52
1	0,50	1	1,50	1,00	0,50	1	1,50
1	0,48	1	1,48	1,00	0,48	1	1,48
1	0,46	1	1,46	1,00	0,46	1	1,46
1	0,44	1	1,44	1,00	0,44	1	1,44
1	0,42	1	1,42	1,00	0,42	1	1,42
1	0,40	1	1,40	1,00	0,40	1	1,40
1	0,38	1	1,38	1,00	0,38	1	1,38
1	0,37	1	1,37	1,00	0,37	1	1,37
1	0,35	1	1,35	1,00	0,35	1	1,35
1	0,33	1	1,33	1,00	0,33	1	1,33
1	0,31	1	1,31	1,00	0,31	1	1,31
1	0,29	1	1,29	1,00	0,29	1	1,29
1	0,27	1	1,27	1,00	0,27	1	1,27
1	0,25	1	1,25	1,00	0,25	1	1,25
1	0,23	1	1,23	1,00	0,23	1	1,23
1	0,21	1	1,21	1,00	0,21	1	1,21
1	0,19	1	1,19	1,00	0,19	1	1,19
1	0,17	1	1,17	1,00	0,17	1	1,17
1	0,15	1	1,15	1,00	0,15	1	1,15
1	0,13	1	1,13	1,00	0,13	1	1,13
1	0,12	1	1,12	1,00	0,12	1	1,12
1	0,10	1	1,10	1,00	0,10	1	1,10
1	0,08	1	1,08	1,00	0,08	1	1,08
1	0,06	1	1,06	1,00	0,06	1	1,06
1	0,04	1	1,04	1,00	0,04	1	1,04
1	0,02	1	1,02	1,00	0,02	1	1,02
2	0,00	1	1	2	0	1	1

Tabla 20 (continuación). Sensibilidad y especificidad de las curvas ROC generadas para el perfil génico predictivo de respuesta clínica, y tras pasar la validación LOOCV.

3. CLASIFICACIÓN DE LAS ENFERMAS SEGÚN EL PERFIL GÉNICO

El perfil de expresión de los ocho genes discriminó dos grupos de enfermas con diferente probabilidad de respuesta a la quimioterapia; un grupo de enfermas con un perfil respondedor formado por 52 pacientes con mayor probabilidad de respuesta a la quimioterapia, y otro grupo de 9 enfermas con un perfil no respondedor y, por tanto, con

menor probabilidad de respuesta a la quimioterapia. De modo que el perfil de respuesta se asoció de forma estadísticamente significativa a la respuesta a la quimioterapia con carboplatino y paclitaxel ($p= 0,003$, HR 2,72, IC del 95% 1,39-5,29).

En la Figura 8 se presenta mediante un diagrama de cajas la diferencia existente en cuanto a los valores del índice del perfil génico entre las pacientes respondedoras y no respondedoras a la quimioterapia, diferenciándose de manera significativa los dos grupos de respuesta en base al predictor.

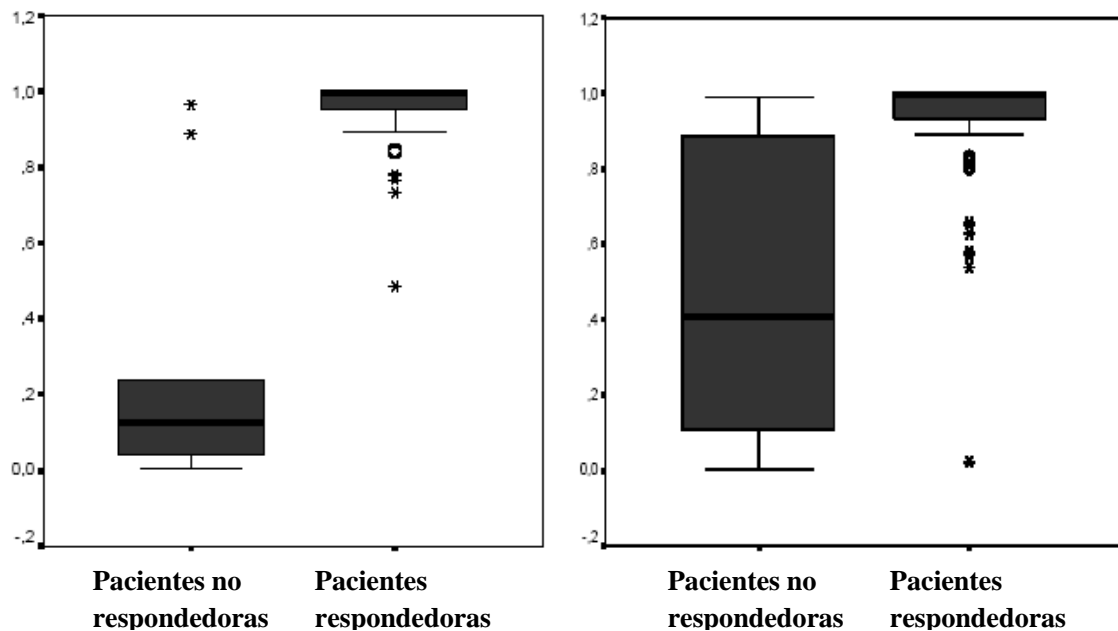


Figura 8. Perfil génico predictivo de respuesta a la quimioterapia: diferencias entre el grupo de pacientes respondedoras y no respondedoras. A la derecha se presentan los resultados del modelo tras la validación mediante LOOCV.

La Figura 9 muestra la probabilidad asociada a la respuesta al tratamiento en función de los valores obtenidos para el índice de riesgo, comprendidos entre 0 y 1, de modo que valores de este índice próximos a 1 se asocian con una mayor probabilidad de respuesta.

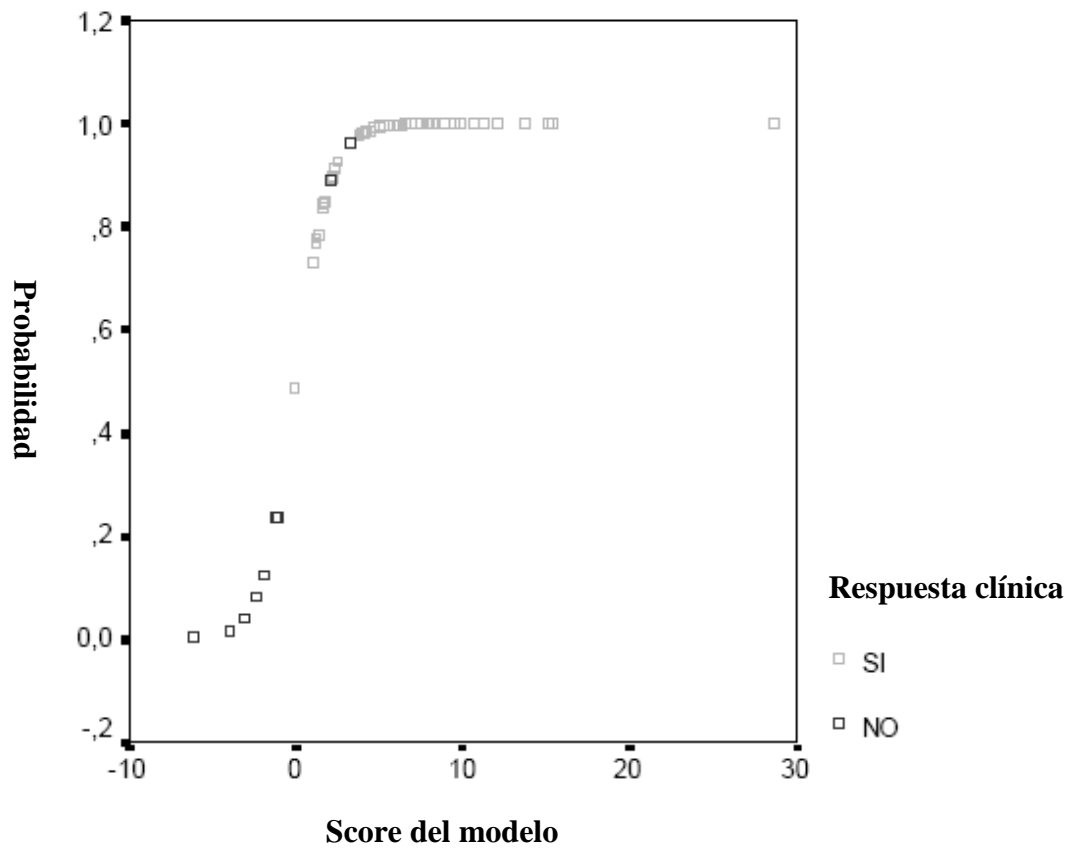


Figura 9. Probabilidad asociada a la respuesta al tratamiento en función de los valores obtenidos para el índice del perfil génico.

En la Tabla 21 se muestra la relación entre la expresión del perfil génico en pacientes respondedoras y no respondedoras, y las características clínico-patológicas más importantes de cada grupo. Al comparar las características clínicas y patológicas entre los dos grupos no se encuentran diferencias significativas en edad, grado de diferenciación del tumor o estadio tumoral. Por el contrario, existe una relación estadísticamente significativa entre la histología no serosa y la clasificación por el perfil génico como paciente no respondedora, y una tendencia hacia la significación en la asociación entre la cirugía subóptima y la clasificación por el perfil como no respondedora.

	Respondedoras		No respondedoras		p
	N	%	N	%	
Edad					0.975
≤ 40 años	6	11,54	1	11,11	
> 40 años	46	88,46	8	88,89	
Grado					>0.900
1	4	7,69	1	11,11	
2-3	47	90,38	8	88,89	
Estadio					>0.950
III	44	84,62	7	77,78	
IV	8	15,38	2	22,22	
Histología					0.05
Serosa	38	73,08	4	44,44	
Otra	14	26,92	5	55,56	
Enfermedad residual tras cirugía					<0.100
< 1cm	18	34,62	1	11,11	
≥ 1 cm	22	42,31	6	66,67	

Tabla 21. Relación entre las variables clínico-patológicas y el perfil de expresión génica.

No se evaluó el efecto del perfil en la respuesta al tratamiento ajustado a otros factores clínicos puesto que ninguno de ellos (ER, grado, edad, estadio o subtipo histológico) se asoció a la respuesta clínica en el modelo de regresión logística univariante (Tabla 22).

	Respuesta clínica a la quimioterapia	
	p	HR (IC 95%)
Cirugía óptima (<1cm vs ≥1cm)	0,108	
Edad (≤40 vs > 40)	0,970	
Estadio (III vs IV)	0,611	
Histología (serosa vs otra)	0,357	
Grado de diferenciación (1 vs 2-3)	0,999	
Perfil génico (respondedora vs no-respondedora)	0,006	2,72 (1,34-5,51)

Tabla 22. Análisis univariante del perfil génico predictivo de respuesta a la quimioterapia y la respuesta clínica de las pacientes.

En las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se observó que la SLP y SG de los dos grupos establecidos en función del perfil génico diferían de forma estadísticamente significativa (Figura 10). El grupo de enfermas clasificadas como respondedoras por el perfil génico tenían una mediana de SLP de 20 meses y de SG de 66,3 meses, mientras que las enfermas clasificadas como no respondedoras por el perfil tenían una mediana de SLP de 11,6 meses y de SG de 16,3 meses.

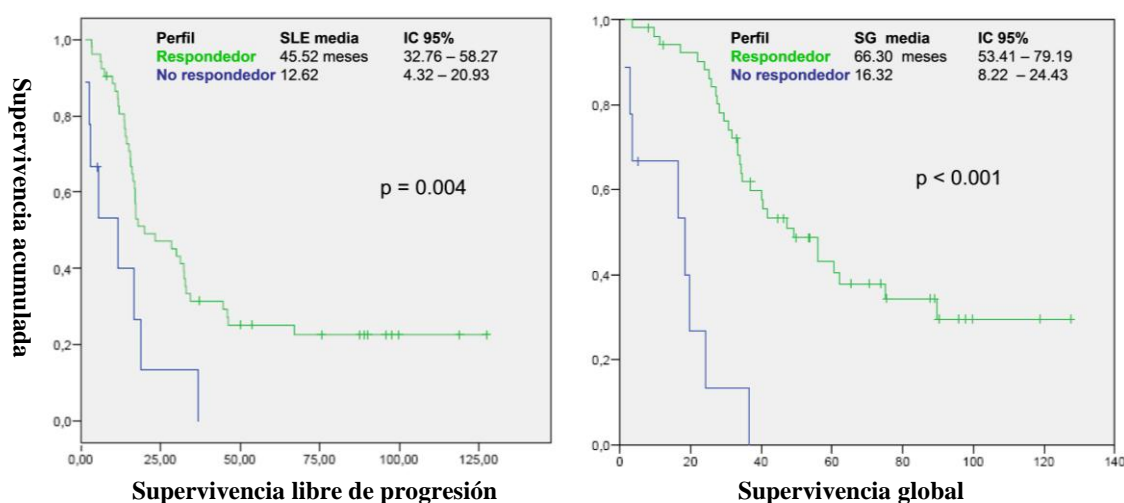


Figura 10. Curvas Kaplan-Meier de SLP y SG para cada uno de los grupos predictivos definidos por el perfil génico.

4. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE FACTORES PRONÓSTICOS

Se analizó la posible influencia en la SLP y en la SG de las diferentes variables clínico-patológicas estudiadas. En la Tabla 23 se resumen los datos obtenidos en estos análisis para cada una de las variables, incluyendo las analizadas en el apartado anterior (perfil génico y ER). Las únicas variables que se correlacionaron con la SLP y la SG fueron el perfil génico y la cirugía óptima.

	SLP		SG	
	p	HR (IC 95%)	p	HR (IC 95%)
Cirugía óptima (<1cm vs ≥1cm)	0,023	0,45 (0,23-0,91)	0,003	0,27 (0,12-0,63)
Edad (≤40 vs > 40)	0,395		0,556	
Estadio (III vs IV)	0,985		0,867	
Histología (seroso vs otro)	0,339		0,807	
Grado de diferenciación (1 vs 2-3)	0,148		0,338	
Perfil génico (respondedora vs no-respondedora)	0,002	0,89 (0,83-0,96)	0,004	0,88 (0,81-0,96)

Tabla 23. Análisis univariante del perfil génico predictivo de respuesta a la quimioterapia y las variables clínicas para SLP y SG.

5. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE FACTORES PRONÓSTICOS

El análisis multivariante mediante el modelo de riesgos proporcionales de Cox mostró que las únicas variables que mostraron una asociación independiente con el pronóstico fueron el perfil génico y la citorreducción óptima (Tabla 24).

	SLP		SG	
	p	HR (IC 95%)	p	HR (IC 95%)
Cirugía óptima (<1cm vs ≥1cm)	0,067	0,517 (0,26-1,05)	0,005	0,29 (0,12-0,69)
Perfil génico (respondedora vs no-respondedora)	0,026	0,91 (0,84-0,99)	0,026	0,89 (0,80-0,99)

Tabla 24. Análisis multivariante del perfil génico predictivo de respuesta a la quimioterapia y la citorreducción óptima para SLP y SG.

Discusión

Este trabajo analiza el valor predictivo de respuesta de un perfil de expresión génica formado por ocho genes implicados en el proceso de angiogénesis en una serie de 61 enfermas con carcinoma de ovario avanzado. Este perfil de expresión génica es capaz de discriminar dos grupos de pacientes en función de su probabilidad de responder al tratamiento de quimioterapia estándar con carboplatino y paclitaxel tras la cirugía citorreductora. La capacidad del perfil génica de predecir la respuesta clínica a la quimioterapia a su vez se asocia a una mayor SLP y SG en el grupo de enfermas clasificadas como respondedoras. Estos resultados suponen un avance en la investigación de perfiles génicos con valor predictivo y pronóstico en el carcinoma de ovario, si bien todavía no es posible trasladar su aplicación a las enfermas con carcinoma de ovario en la práctica clínica.

A lo largo de esta discusión se comentarán los aspectos fundamentales de los métodos empleados en el estudio y se analizarán las limitaciones que presentan los análisis de múltiples genes en la actualidad, para después interpretar detalladamente los resultados obtenidos. Por último, se discutirá sobre el futuro de la predicción del pronóstico y de la respuesta a fármacos en el cáncer de ovario, analizando los requerimientos necesarios para que los análisis de perfiles génicos puedan aplicarse en la clínica.

1. ASPECTOS METODOLÓGICOS

Los estudios de perfiles génicos en oncología precisan de un diseño riguroso y un análisis bioestadístico detallado de la gran cantidad de datos que generan las técnicas de alto rendimiento. La selección de la población a estudiar, el procesamiento de las muestras y la metodología empleada influyen significativamente en los resultados y en

la validez del estudio. Por ello, en este tipo de estudios resulta imprescindible que exista una estrecha colaboración multidisciplinar entre clínicos, patólogos, biólogos moleculares y bioestadísticos.

En nuestro estudio se define un perfil de expresión de genes a partir de muestras tumorales fijadas en formol e incluidas en parafina, mediante la técnica qRT-PCR. Este perfil es capaz de diferenciar dos grupos de pacientes con carcinoma de ovario que muestran diferencias significativas en la respuesta a la quimioterapia estándar.

Elección de la qRT-PCR como técnica de análisis de la expresión génica

La mayoría de los estudios de análisis de expresión génica en patología tumoral se han realizado con *microarrays* (126,127). Los *microarrays* representan una excelente herramienta para el estudio simultáneo de la expresión de un gran número de genes. Sin embargo, esta técnica no está exenta de inconvenientes, principalmente derivados de la variabilidad en los resultados que se pueden obtener. Esta variabilidad depende de diversos factores, como el protocolo de procesamiento de las muestras, la plataforma utilizada, o simplemente el laboratorio donde se realice el análisis (128). No obstante, el factor más importante que determina los resultados finales es el empleo de un tratamiento estadístico apropiado. Los *microarrays* proporcionan una enorme cantidad de datos, que deben ser procesados por sistemas bioinformáticos dirigidos por estadísticos experimentados. En los estudios publicados hasta la fecha se han utilizado diversos métodos estadísticos para clasificar a los enfermos en función de los perfiles génicos, sin que exista actualmente un consenso sobre cuál es el método más adecuado. En general, los trabajos con *microarrays* evalúan un número elevado de variables a

partir de una serie de casos reducida y limitada, lo que condiciona que la mayoría de los resultados de estos estudios no sean reproducibles.

Otra técnica útil para el estudio de expresión de múltiples genes es la qRT-PCR. En general, los *microarrays* desempeñan un papel fundamental en el análisis inicial de miles de genes para seleccionar los implicados en el pronóstico o la respuesta a fármacos. La qRT-PCR es considerada como la técnica más adecuada para los estudios de validación de un número limitado de genes. Por tanto, si una firma molecular compuesta por un número limitado de genes demuestra su utilidad clínica, la qRT-PCR es considerada como la técnica de elección para su validación clínica (129). Pero además, la qRT-PCR aporta importantes ventajas en comparación con los *microarrays*, por lo que se considera una técnica alternativa de gran interés. En primer lugar, la qRT-PCR proporciona resultados cuantitativos, precisos y fácilmente reproducibles (130). A su vez, esta técnica precisa menor cantidad de tejido tumoral para realizar el análisis, resolviendo así el mayor inconveniente de los estudios de análisis de múltiples genes, que es la limitación del material biológico disponible (129). La qRT-PCR es la técnica de elección para el análisis de muestras conservadas en parafina porque amplifica fragmentos cortos, lo que limita el problema de la degradación de este tipo de muestras, como se comentará a continuación. Por último, el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos con esta técnica es más fiable al reducirse en número de variables a estudio que con los *microarrays*. Por todo ello, la qRT-PCR es considerada una técnica precisa y reproducible, y que actualmente se emplea de forma rutinaria en diversas aplicaciones clínicas, ya que ofrece una serie de ventajas prácticas como son su mayor disponibilidad en el ámbito hospitalario y la obtención más rápida de resultados, siempre que exista el equipo y el personal apropiado.

Para la realización de este trabajo hemos considerado que la qRT-PCR era la técnica más apropiada teniendo en cuenta que nuestro principal objetivo se centraba en la caracterización de un perfil génico basado en genes implicados en la angiogénesis como moduladores clave de este proceso (tanto en el carcinoma de ovario como en otros tipos tumorales) o que desempeñan un papel relevante en la carcinogénesis ovárica.

Empleo de muestras parafinadas para el análisis de la expresión génica

Inicialmente los estudios con *microarrays* y qRT-PCR únicamente podía realizarse a partir de tejido tumoral obtenido en fresco. Sin embargo, la disponibilidad de este tipo de tejido es limitada por el laborioso procesamiento que precisa y el alto coste económico asociado a su conservación. Esto, sumado a la complejidad metodológica de esta técnica y a su elevado coste económico, ha supuesto una limitación importante en la implementación del uso de *microarrays* en la práctica rutinaria.

Las muestras fijadas en formol e incluidas en parafina son fáciles de almacenar y permanecen estables a temperatura ambiente. Constituyen el estándar de conservación de tejido en los centros hospitalarios, de modo que cualquier test molecular orientado a la práctica clínica debería basarse en este tipo de material. A pesar de todas estas ventajas, el ARN aislado de este tipo de muestras tradicionalmente se ha considerado como un material limitado para los estudios de expresión génica debido a la degradación del mismo. La fijación en formol predispone a que los residuos de adenosina sufran modificaciones químicas como la dimerización de metileno y la monometilación que generan fragmentos de ARN degradados (131). La optimización de los métodos de extracción del material génico durante la última década ha resuelto en gran medida este problema. En el año 2004 se publicaron los primeros trabajos de

expresión génica mediante qRT-PCR a partir de muestras parafinadas (132,133). Nuestro grupo demostró en el año 2005 que el análisis de expresión génica mediante qRT-PCR en muestras parafinadas de cáncer de mama reproducía los resultados obtenidos mediante *microarrays* en muestras en fresco con el perfil de 70 genes que configura el test MammaPrint[®], plataforma aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*) con demostrado valor pronóstico independiente sobre el riesgo de recidiva en pacientes con cáncer de mama en estadio precoz (134). Actualmente disponemos de algunos perfiles de expresión génica comerciales que se realizan sobre muestras parafinadas y son analizados mediante qRT-PCR, como el Oncotype DX[®] en cáncer de mama, que aportan información pronóstica independiente a la evaluación clínico-patológica tradicional (133).

Controles realizados en el procesamiento y en el análisis de la expresión génica

Los controles de calidad son fundamentales en cualquier estudio molecular. En nuestro trabajo se llevaron a cabo dos controles de calidad, uno para evaluar la determinación de la concentración y pureza del ARN por espectrofotometría, y otro mediante electroforesis nativa en geles de agarosa, para garantizar la integridad del ARN obtenido.

Un cuidadoso proceso de normalización es fundamental para poder comparar los distintos niveles de expresión de cada ARNm, ya que la variabilidad en los protocolos utilizados para el aislamiento del ARN y el paso a ADNc puede producir falsas diferencias de expresión (135). Habitualmente, se selecciona un gen (o varios) de referencia, cuya expresión se mantiene constante en todas las muestras, para garantizar que las diferencias de expresión entre las distintas muestras no se deben a diferencias en

el material de partida, como la cantidad, la conservación de la muestra por el método de purificación, o por el método de extracción. Al analizar muestras conservadas en parafina es preciso emplear más de un control endógeno.

Se han descrito distintos genes de referencia, pero no existe un consenso sobre cuál es el más adecuado, ya que las características de cada técnica y de cada tipo de muestra pueden condicionar la fiabilidad de los mismos. Por otro lado, ningún ARNm mantiene un nivel de expresión constante, y se ha observado que los niveles de expresión de los ARNm de algunos genes considerados de referencia, como *GAPDH*, pueden variar en ciertas condiciones experimentales y en relación a su activación para sus diversas funciones celulares (135). En este estudio analizamos la expresión de 14 genes controles endógenos empleados con frecuencia en los análisis de expresión génica (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *18S*, *HMBS*, *HPRT1*, *IPO8*, *PGK1*, *PPIA*, *RPLP0*, *TBP*, *TFRC* y *UBC*).

2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Nuestra serie de pacientes presenta las características habituales del cáncer de ovario avanzado. La mediana de edad es de 53 años (rango 21-82 años), es decir, menos de los 60 años que es la mediana de la edad en la población general diagnosticada de cáncer de ovario. La mayoría de las pacientes presentaban un carcinoma seroso, similar a lo descrito en la población general, mientras que en el 57,4% de las enfermas, presentaban un tumor pobremente diferenciado. Si analizamos los estudios más importantes de perfiles predictivos de respuestas realizados con *microarrays*, se encuentran importantes diferencias en la población seleccionada, con trabajos que incluyen un 90-100% de enfermas con carcinomas serosos frente a otros en que esta histología se presenta en

menos del 60% de las pacientes. El porcentaje de pacientes con tumores grado 3 incluido en estos estudios oscila entre el 50 y el 78% (104,118,120).

Un aspecto muy importante en nuestra serie es la homogeneidad del tratamiento utilizado, ya que el objetivo primario del trabajo era definir un perfil predictivo de respuesta clínica. Todas las pacientes fueron tratadas con cirugía citorreductora y recibieron al menos seis ciclos de quimioterapia complementaria con carboplatino y paclitaxel. La principal limitación de otros trabajos en este campo es la disparidad de tratamientos empleados, incluyendo pacientes tratadas con platinos en monoterapia o en combinación con ciclofosfamida, representado una causa de variabilidad en los resultados, y también un condicionante de su aplicabilidad y relevancia clínica. Cerca del 70% de las enfermas de nuestra serie fueron sometidas a una cirugía citorreductora subóptima, prácticamente el doble en comparación con los trabajos más importantes de perfiles génicos (118,120). Finalmente, y como es habitual, la gran mayoría de las pacientes (85.2%) respondieron al tratamiento con quimioterapia.

Capacidad predictiva de respuesta y pronóstica del perfil génico

El perfil de expresión compuesto por ocho genes implicados en el proceso de angiogénesis discrimina dos grupos de enfermas con carcinoma de ovario avanzado con diferente respuesta al tratamiento con carboplatino y paclitaxel, con una sensibilidad del 96,2% y una especificidad del 78%. Si bien es difícil establecer comparaciones con otros perfiles ya que los objetivos planteados y las metodologías utilizadas son diferentes, la capacidad predictiva de nuestro perfil está en consonancia con la que presenta el perfil predictivo de 93 genes desarrollado por Spentzos y col. (91%) (118),

el perfil *BRCAness* de Konstantinopoulos y cols. (94%) (115) y el de Dressman y cols. (84,3%) (120).

Esta respuesta al tratamiento predicha por el perfil se asoció a un diferente pronóstico en los dos grupos de pacientes, tanto en SLE como en SG. No obstante, los análisis de supervivencia por subgrupos en este estudio deben ser considerados con precaución debido al limitado tamaño muestral.

El perfil de ocho genes se asocia significativamente a la respuesta a la quimioterapia con carboplatino y paclitaxel en el carcinoma de ovario avanzado [p= 0,003, HR (IC 95%) 2,72 (1,39-5,29)] de manera independiente de otros factores clínico-patológicos (ER, grado de diferenciación tumoral, edad, estadio III-IV o tipo histológico). No se evaluó el valor predictivo de respuesta del perfil génico ajustado por otros factores clínico-patológicos porque ninguno de ellos se asoció a la respuesta clínica en el análisis de regresión logística. En el análisis multivariante se incluyeron todas las variables con posible influencia en la predicción de respuesta a la quimioterapia.

Como es lógico, la respuesta al tratamiento con quimioterapia es un factor importante en la supervivencia del cáncer de ovario, tanto en SLE como en SG. Por este motivo, se analizaron las variables clínico-patológicas para evaluar si la inclusión del perfil génico predictivo de respuesta aumentaba la capacidad de predicción de la supervivencia. En el análisis multivariante, el único factor con significación estadística, junto con el perfil génico, fue la ER. Es decir, nuestro trabajo confirma que el factor pronóstico clínico-patológico más importante en el cáncer de ovario avanzado es la realización de una cirugía óptima lo que aporta solidez a nuestros resultados y al valor del perfil. No obstante, otros factores como el tipo histológico y el grado de diferenciación pudieron no mostrar una asociación estadísticamente significativa con el pronóstico debido al

tamaño muestral que, como se ha comentado previamente, supone una limitación importante para analizar el número de variables incluidas en este estudio.

El mejor pronóstico del grupo de enfermas caracterizadas por el perfil como respondedoras podría ser el resultado de la combinación de la sensibilidad al tratamiento quimioterápico y la caracterización de una enfermedad biológicamente menos agresiva. Como se comentó en la introducción, dentro del carcinoma de ovario actualmente se reconocen dos categorías, cada una asociada con alteraciones moleculares y pronóstico diferentes; las neoplasias de bajo grado, de crecimiento lento y una mayor resistencia al tratamiento, frente a los tumores de alto grado, con un curso más agresivo y una mayor sensibilidad inicialmente al tratamiento (11). En nuestro estudio no se han analizado las mutaciones de *TP53*, *PI3KC*, *KRAS* o *BRAF*, cada una de ellas asociada a uno de los subtipos moleculares de cáncer de ovario, para poder conocer la distribución y su relación con el perfil.

En el estudio de Spentzos y cols. (118), el perfil predictivo presentaba una asociación significativa con SLE y SG en la validación independiente, lo que sugiere que esta firma genética tiene relevancia clínica. Este mismo grupo previamente había definido un perfil con valor pronóstico en el cáncer de ovario (109). Es llamativo que entre el perfil pronóstico y el predictivo de respuesta al tratamiento, ambos determinados por el mismo grupo investigador, no exista prácticamente solapamiento entre los genes incluidos. Estas diferencias se pueden explicar porque cada perfil se generó con diferentes objetivos que representan distintos procesos biológicos; por una parte, la historia natural, determinada por la capacidad proliferativa y el potencial metastático del tumor, y, por otra, la resistencia o sensibilidad a la quimioterapia, condicionada por otros factores como la capacidad de reparación del ADN. Probablemente esta sea la justificación por la cual la combinación del perfil pronóstico y predictivo desarrollado

por estos autores aporte mayor valor pronóstico que cada perfil de forma individual (118). Por tanto, la interpretación de los resultados de *microarrays* de estos autores, y por extrapolación los nuestros, deben realizarse en el contexto del proceso de selección empleado para definir cada perfil. En nuestro trabajo hemos caracterizado dos grupos de pacientes con carcinoma de ovario avanzado en base a un proceso fundamental en la carcinogénesis de esta neoplasia, como es la angiogénesis, en el que estaba probado previamente el valor pronóstico (116), y ahora se demuestra el valor predictivo de respuesta a la quimioterapia.

Factores predictivos de respuesta en el cáncer de ovario y biomarcadores de respuesta a la terapia antiangiogénica

Actualmente la mayoría de pacientes con un carcinoma de ovario avanzado reciben el mismo tratamiento de quimioterapia, la combinación carboplatino-paclitaxel administrada de forma trisemanal, aunque en casos seleccionados puede optarse por un esquema de administración intraperitoneal en base principalmente al estadio tumoral y la ER tras la cirugía. Hoy en día no se dispone de factores predictivos aplicables en la clínica que permitan seleccionar el esquema de quimioterapia más adecuado para cada enferma. A la hora de decidir el tratamiento, hay datos que sugieren que el carcinoma de células claras o el mucinoso responden peor a la quimioterapia estándar, aunque actualmente no está demostrado que se deba modificar el esquema de quimioterapia en función del subtipo histológico (13).

En las últimas dos décadas apenas se han producido avances en el tratamiento del carcinoma de ovario avanzado, si exceptuamos la quimioterapia intraperitoneal, y más recientemente el paclitaxel en pauta semanal y la adición de bevacizumab a

carboplatino-paclitaxel. El régimen de quimioterapia basada en platinos y taxanos es eficaz en estas pacientes en términos de respuesta y supervivencia pero, como se ha expuesto, la recidiva es la norma en la gran mayoría de las pacientes, y no está exento de toxicidades limitantes, como puede ser la neuropatía. La necesidad de mejorar los tratamientos para el carcinoma de ovario es obvia, y actualmente están en marcha ensayos con nuevas moléculas, entre los que cabe destacar los antiangiogénicos. Bevacizumab ya ha demostrado su eficacia en dos ensayos randomizados en primera línea de cáncer de ovario y en un ensayo en la recaída platino-sensible, por lo que se espera su próxima aprobación para uso clínico. Con el fin de optimizar la eficacia de los tratamientos en un futuro, y minimizar las toxicidades y costes asociados, resulta fundamental acompañar el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos frente a dianas específicas de una metodología que permita definir biomarcadores predictivos de respuesta.

En los últimos años se han realizado importantes esfuerzos para identificar genes o factores moleculares que pudieran ser útiles para seleccionar de forma individualizada estos tratamientos en las enfermas con cáncer de ovario. La sobreexpresión de *BAX* o *ERCC5*, las mutaciones de los genes *BRCA* o las deficiencias en los genes *MMR* parecen tener un valor predictivo de respuesta a la quimioterapia basada en platinos (25,29,30). Sin embargo, ninguno de estos resultados ha sido validado ni tiene aplicación actual en la práctica clínica.

Nuestro trabajo demuestra que es posible generar un perfil génico predictivo de respuesta clínica en el carcinoma de ovario avanzado a partir de genes implicados en la angiogénesis ovárica, que está siendo objeto de una extensa investigación clínica como diana terapéutica. Sin embargo, en la actualidad no disponemos de marcadores biológicos validados con capacidad de identificar o seleccionar adecuadamente a las

pacientes con carcinoma de ovario que se beneficiarían del empleo de terapias antiangiogénicas. El primer reto al que se enfrentan las terapias antiangiogénicas a la hora de validar factores predictivos de respuesta se fundamenta en que los criterios clásicos de evaluación de la respuesta al tratamiento basados en el tamaño de la lesión tumoral (como los criterios RECIST) son manifiestamente subóptimos, como se ha comprobado en otras patologías. Las terapias antiangiogénicas, que actúan a nivel estromal, tienen un papel principalmente citostático, normalizador de la vasculatura y modulador de factores proangiogénicos y proinflamatorios, que puede traducirse en estabilizaciones y no necesariamente en forma de reducción del volumen tumoral. A partir de los resultados de múltiples ensayos clínicos fase I-III con antiangiogénicos, se ha sugerido el potencial valor predictivo de respuesta y/o pronóstico de diversos biomarcadores de muy diferente naturaleza aunque, como ya se ha comentado, ninguno de ellos ha sido validado todavía para su uso clínico (136).

Entre los biomarcadores de eficacia de las terapias antiangiogénicas estudiados se encuentran polimorfismos genéticos, factores tisulares o circulantes en plasma, nuevas técnicas de imagen, o marcadores subrogados como la hipertensión arterial. Hay técnicas de imagen como la TC con criterios de imagen morfológicos, la resonancia magnética dinámica (con parámetros que miden la perfusión y permeabilidad tumoral como el K^{trans}), o la PET que han demostrado ser eficaces en la evaluación de la actividad antitumoral de las terapias antiangiogénicas en estudios preliminares, pero su uso en la práctica clínica no está validado y todavía no están aceptados como marcadores dinámicos de respuesta a la terapia antiangiogénica (137). Determinados polimorfismos en los componentes de la vía de señalización del VEGF pueden predecir la eficacia de bevacizumab en los tumores sólidos. Entre ellos cabe destacar, la correlación entre el VEGF-2578AA y el VEGF-1154AA y una mejor SG en pacientes

con cáncer de mama metastático tratadas con quimioterapia y bevacizumab, y la asociación entre los polimorfismos en el VEGF-936 y la SLP en pacientes con carcinoma de ovario tratadas con bevacizumab, si bien estos datos no se han confirmado en otros tumores (137). Debido a que no se disponen de ensayos prospectivos, son necesarios nuevos trabajos que definan mejor el papel de los polimorfismos de VEGF como posibles factores predictivos de respuesta a la terapia antiangiogénica. Finalmente, los niveles séricos de VEGF tampoco han demostrado tener un valor predictivo de respuesta a las terapias antiangiogénicas (138). Otras proteínas séricas que han sido analizadas como potenciales biomarcadores dinámicos de los tratamientos antiangiogénicos son el PIGF, ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) o VEGFR2 y VEGFR3 (136).

Nuestro trabajo describe un perfil génico predictivo de respuesta clínica capaz de discriminar, con una sensibilidad del 96% y especificidad del 78%, aquellas pacientes con carcinoma de ovario avanzado de alto riesgo que no se benefician del tratamiento con quimioterapia estándar y que, por tanto, serían candidatas a participar en proyectos de investigación de nuevas alternativas terapéuticas por medio de su inclusión en ensayos clínicos. El perfil está formado por ocho genes que desempeñan un papel crítico en la angiogénesis ovárica. El estudio tiene valor tanto por presentar un marcador predictivo de respuesta a la quimioterapia estándar en el carcinoma de ovario, como por definir una diana terapéutica en el subgrupo de enfermas de mal pronóstico. Nuestros datos no evalúan la capacidad del perfil para determinar la actividad de las terapias antiangiogénicas en el tratamiento del carcinoma de ovario, pero sí demuestran que la angiogénesis es un proceso crucial en la carcinogénesis de esta neoplasia, que es indicativo de un peor pronóstico, y aumenta la evidencia para el uso de terapias dirigidas frente a este mecanismo en este subgrupo de pacientes.

Los resultados de nuestro trabajo pueden conducir a la hipótesis de tratar con fármacos antiangiogénicos al grupo de enfermas con cáncer de ovario de alto riesgo definidas por el perfil en base a una marcada angiogénesis tumoral. Es decir, el perfil se podría emplear para seleccionar a las enfermas que precisarían la combinación de la quimioterapia estándar con antiangiogénicos, si bien, esto sólo sería una hipótesis que habría que contrastar necesariamente en series de pacientes tratadas con antiangiogénicos. Además, los resultados de nuestro trabajo deben ser previamente validados en series independientes y prospectivas.

Relevancia biológica de los ocho genes que componen el perfil predictivo de respuesta

Los ocho genes implicados en la angiogénesis tumoral que componen el perfil predictivo de respuesta a la quimioterapia con platinos y taxanos en el carcinoma de ovario avanzado son *CAVI*, *CXCL1*, *EDN3*, *EGF*, *EPOR*, *FGF2*, *NRP1* y *TIMP2*.

CAVI (Caveolin-1) codifica una proteína de membrana responsable de la formación de las caveolas, que está también implicada en la regulación de señales de transducción y en la endocitosis. *CAVI* está implicada en la migración, la invasión, y la formación de metástasis, y su expresión se asocia a un peor pronóstico en tumores sólidos, como el cáncer de mama y cáncer de colon (139), sin que hasta la fecha previamente se haya descrito su valor pronóstico o predictivo en el carcinoma de ovario.

CXCL1 es una citoquina que ha demostrado tener valor como marcador de activación de la vía de señalización de la fosfatidil-inositol 3-kinasa en el carcinoma de ovario, vía de señalización frecuentemente sobreexpresada en las neoplasias ováricas. Estudios en cultivos celulares de carcinoma de ovario muestran que esta citoquina induce la

proliferación de las células tumorales a partir de su unión con el receptor CXCR2, lo que conlleva la transactivación del EGFR, y la activación subsecuente de la vía de señalización de MAPK (140). Hasta la fecha, no se dispone de estudios que analicen el potencial valor pronóstico o predictivo de CXCL1 en el cáncer de ovario ni en otros tumores sólidos.

La vía de señalización de la endotelina (*EDN*) desempeña un papel crucial en la diferenciación celular, la proliferación y el proceso de migración. Las alteraciones en esta vía se asocian a la carcinogénesis e invasión tumoral. Recientemente se ha descrito que *EDN3* puede actuar como gen supresor de tumores para el cáncer de mama (141).

EGF es un factor de crecimiento que se une al receptor tirosina quinasa EGFR, que desempeña un importante papel en la diferenciación, invasión y angiogénesis tumoral. Como se señaló en la introducción, la expresión de EGFR en el carcinoma de ovario se asocia con un peor pronóstico (25). La inhibición de la vía del EGFR, por ejemplo con anticuerpos monoclonales o pequeñas moléculas, supuso un importante avance en el tratamiento de diversos tumores sólidos, como el cáncer de colon, pulmón, o de cabeza y cuello, disponiendo en la actualidad con marcadores predictivos de respuesta. Sin embargo, el tratamiento con fármacos dirigidos frente a esta diana apenas han demostrado un beneficio marginal en el carcinoma de ovario (13).

La expresión de EPOR está aumentada en el carcinoma de ovario en una forma constitutivamente activa (es decir, en ausencia de EPO), por lo que esta vía podría desempeñar un papel relevante en el crecimiento, la angiogénesis y la proliferación tumoral (142).

FGF2 tiene una potente actividad angiogénica en la progresión tumoral, por lo que es una potencial diana terapéutica en el cáncer de ovario. Algunos estudios sugieren un

posible valor predictivo respuesta al tratamiento con radioterapia en el cáncer de cérvix o de pulmón, aunque, su papel en el tratamiento cáncer de ovario no ha sido estudiado (143).

NRP1 (neuropilina 1) es una glicoproteína transmembrana que se expresa en neuronas y células endoteliales, pero cuya expresión también es frecuente en las células tumorales, contribuyendo a la progresión tumoral por mecanismos aún no bien conocidos. Recientemente estudios celulares han demostrado la elevada expresión de *NRPI* en células de adenocarcinoma de próstata, manifestando una asociación con la capacidad de invasión, lo que sugiere que NRP1 pudiera ser el receptor primario responsable del efecto de la secreción autocrina de VEGF (144).

Por último, TIMP2 (*tissue inhibitors of metalloproteinases-2*) actúa regulando la actividad de las MMP durante la remodelación proteolítica de la matriz extracelular, evento fundamental en la generación microambiente tumoral durante la carcinogénesis y que favorece la generación de nuevos vasos. La sobreexpresión de MMP se asocia a un peor pronóstico en el carcinoma de ovario (25). Estudios recientes en líneas celulares han demostrado que en el adenocarcinoma gástrico difuso la inducción de TIMP2 estimula la proliferación al favorecer la angiogénesis tumoral (145). Hasta la fecha, previamente no se ha descrito un posible valor pronóstico de TIMP2 en el carcinoma de ovario.

Comparación del perfil predictivo de nuestro estudio con otros análisis de múltiples genes realizados

Diferentes estudios de análisis de expresión génica han identificado perfiles moleculares de respuesta a la quimioterapia basada en platinos en pacientes con cáncer de ovario.

Sin embargo, estos trabajos presentan importantes limitaciones. Como se ha comentado previamente, las variaciones en la metodología y en el diseño pueden influir en los resultados obtenidos. En la Tabla 25 se resumen las diferencias metodológicas entre los tres estudios de perfiles génicos predictivos de respuesta del carcinoma de ovario más importantes publicados hasta la fecha, además del nuestro (115,118,120).

Los trabajos realizados con técnicas de alto rendimiento para el análisis de múltiples genes con la finalidad de predecir la respuesta al tratamiento presentan grandes diferencias en los criterios de selección de pacientes. Mientras variables como la edad, el tipo histológico, o el grado de diferenciación se podrían considerar secundarias en este aspecto, la heterogeneidad en los tratamientos quimioterápicos empleados representa el sesgo más importante en estos trabajos, pues lógicamente el régimen de quimioterapia utilizado es la variable fundamental al tratar de definir un perfil predictivo de respuesta. Otra causa importante de variabilidad entre los estudios realizados es la aplicación de diferentes criterios de respuesta, entre los que se incluyen respuestas patológicas en cirugías de *second-look* hasta criterios de respuesta en líneas celulares. En nuestro trabajo, el criterio de respuesta seleccionado fue la respuesta según criterios RECIST, parcial o completa. Este puede ser un aspecto sujeto a discusión, pues algunos autores sugieren que la respuesta completa debería ser el criterio de respuesta para evaluar la sensibilidad a los tratamientos quimioterápicos (118), ya que este grupo está formado por las paciente con mejor pronóstico, algunas de las cuales pueden llegar a curarse. En este sentido, teóricamente la mejor evaluación de la respuesta podría ser la respuesta patológica completa en una cirugía de *second-look*, que ha demostrado tener un valor predictivo de la evolución de las pacientes. Sin embargo, esta intervención es un procedimiento que no se realiza en la práctica rutinaria porque no ha demostrado

mejorar por sí misma el pronóstico de las pacientes (40), lo que imposibilita la realización de estudios con un adecuado tamaño muestras y su posterior validación.

	Spentzos y cols (2005)	Dressman y cols (2007)	Kostantinopoulos y cols (2010)	Perfil genes angiogénesis
Plataforma	<i>Microarrays</i> ¹	<i>Microarrays</i> ¹	<i>Microarrays</i> ¹	qRT-PCR ²
Muestras	Fresco	Fresco	Fresco	Parafina
N	24	83	61	61
Características clínicas	Estadios III-IV ³ 92% serosos 67% cirugía óptima	Estadios III-IV Histología ¿? 60% cirugía óptima	Mutaciones germinales BRCA1/2	Estadios III-IV 68,8% serosos 31% cirugía óptima
Criterios de respuesta	Respuesta patológica	RECIST	Platino-sensible vs Platino-resistente ⁴ Cultivos celulares ⁵	RECIST
Tratamiento	Platino + taxano	Platino + taxano ⁶ Platino ± ciclofosfamida	Platino ⁴ Inhibidores PARP ⁵	Platino + taxano
Validación (N)	No externa (<i>validation set</i> 36)	No externa (<i>validation set</i> 36)	Independiente (6)	No

1: Affymetrix GeneChip *hybridization*. 2: Taqman Low Density Array. 3: 95% estadios III-IV. 4: 70% platino + taxano. 5: Platino sensible: respuesta completa al tratamiento mantenida sin progresión durante al menos 6 meses tras el último ciclo de quimioterapia basada en platino. Platino resistente: progresión durante el tratamiento con quimioterapia basada en platinos, o respuesta menor que completa a la terapia con platinos, o progresión en menos de 6 meses tras el último ciclo de quimioterapia basada en platino. 6: En este estudio se determinó la sensibilidad de fármacos inhibidores de PARP en líneas celulares pancreáticas Capan-1 con *BRCA2* mutado. N: tamaño muestral.

Tabla 25. Diferencias metodológicas entre los tres estudios de perfiles génicos predictivos de respuesta más importantes del carcinoma de ovario.

Por otro lado, la mayoría de los trabajos realizados con técnicas de alto rendimiento para el análisis de múltiples genes tienen diferencias en el material empleado (tipo de

plataforma y genes representados en los *arrays*), y en el diseño de la validación realizada.

Las diferencias existentes en cuanto a los genes incluidos en cada plataforma es otra fuente de variabilidad entre los diversos estudios publicados, pero a diferencia de las anteriores este sesgo no puede ser controlado por el equipo investigador cuando se usan plataformas prediseñadas, a no ser que sean de genoma completo. Por otra parte, cada vez es mayor la evidencia y son más numerosos los autores que consideran que estas diferencias metodológicas no justifican la variabilidad existente entre estos perfiles de expresión génica (146). Además, hay que resaltar que, aunque aparentemente existe una gran variabilidad entre los perfiles mencionados, en todos los casos están representadas diferentes vías de señalización intracelular con posible implicación en el comportamiento tumoral. Por tanto, es posible que existan distintos perfiles génicos igualmente válidos, siempre que tengan genes pertenecientes a las principales vías implicadas en los mecanismos de diseminación o resistencia a fármacos.

En ese aspecto, nuestro estudio y el trabajo de Kostantinopoulos y cols. (115) tienen la singularidad de generar un perfil génico que se correlaciona con la respuesta a la quimioterapia y el pronóstico de las enfermas con carcinoma de ovario en base a unos mecanismos moleculares definidos, en nuestro caso la angiogénesis, y en el otro estudio el fenotipo *BRCAness*. El trabajo de Kostantinopoulos y cols. asocia el perfil génico a la respuesta a la quimioterapia basada en platinos y a los nuevos agentes inhibidores de PARP. Este precedente de un perfil generado en base a un mecanismo molecular implícito, como es la vía de reparación de bases por recombinación homóloga, da soporte a la hipótesis por la cual nuestro perfil molecular, conformado por genes implicados en la angiogénesis tumoral, podría ser una herramienta con capacidad predictiva de respuesta a la combinación de quimioterapia y antiangiogénicos en el

carcinoma de ovario. De hecho, otro grupo ha identificado de forma independiente un perfil molecular de la vasculatura tumoral en el carcinoma de ovario, que demuestra que determinadas proteínas vasculares tumorales podrían servir como potenciales biomarcadores y dianas terapéuticas en esta neoplasia (147). No obstante, son necesarios estudios futuros que confirmen esta hipótesis.

Una de las dificultades metodológicas más importantes a la que se enfrentan los estudios de análisis de múltiples genes en el carcinoma de ovario es la derivada por el tamaño muestral y el riesgo de *overfitting*, es decir, la probabilidad de generar perfiles de expresión diferenciales por casualidad cuando se analiza un gran número de potenciales factores predictivos o pronósticos entre un número limitado de eventos (148). En los estudios realizados hasta la fecha existe un gran desequilibrio entre el número de genes estudiados y el tamaño muestral, lo cual supone una importante limitación desde el punto de vista estadístico. La mayoría de ellos correlacionan la expresión de más de 20.000 genes con los datos clínicos de un número reducido de pacientes (entre seis y 185, Tabla 25). Además, debido al limitado tamaño muestral, los datos clínico-patológicos y genéticos incluidos para generar un modelo predictivo pueden no representar adecuadamente a los de la población general.

Otro aspecto a tener en cuenta en los análisis de múltiples genes es el hecho de que la intensidad con la que se manifiesta un gen en estos estudios no necesariamente tiene que ser representativo del nivel de expresión génica. La intensidad que reproduce el estudio es el resultado del nivel de expresión del gen así como de otros factores externos derivados de las diferentes etapas del procedimiento técnico (extracción de la muestra, marcaje, hibridación, análisis de expresión, entre otros), lo que se conoce como “ruido experimental” (148). Probablemente el número de genes con una expresión diferencial en dos muestras diferentes sea pequeño, y no necesariamente mayor a estas diferencias

de expresión resultantes a la metodología aplicada, lo que añadido a que en el carcinoma de ovario la mayoría de los tumores son de tipo seroso, haga aún más difícil identificar los genes relevantes de aquellos genes procedentes del “ruido experimental”.

Por todos estos motivos es imprescindible realizar una validación externa de los resultados obtenidos con cada perfil génico. La finalidad de la validación externa es demostrar que los resultados se reproducen en una serie de enfermas diferente a la que se utilizó para generar el modelo (149). La validación en series independientes y la confirmación mediante otras técnicas (como estudios funcionales o inmunohistoquímica, entre otras) se consideran pasos críticos para la confirmación del valor de las técnicas de alto rendimiento en el carcinoma de ovario.

En los estudios de perfiles génicos publicados, la validación habitualmente es realizada por el mismo equipo de investigación que generó el modelo original, por lo que se pueden producir sesgos de selección (149). Uno de estos sesgos potenciales se produce cuando se incluyen muestras de pacientes en la serie validación que previamente se han empleado para desarrollar el modelo predictivo. En nuestro trabajo, se han validado los resultados del perfil génico mediante *LOOCV*. Sin embargo, lo ideal sería realizar una validación externa que confirmase la capacidad predictiva de respuesta a la quimioterapia del perfil génico, en una muestra diferente a la empleada para generar el modelo y con un número de enfermas lo suficientemente amplio para obtener resultados fiables y aplicables a la clínica (150).

Nuestro perfil génico tiene un potencial valor práctico para discriminar las pacientes con cáncer de ovario avanzado que se beneficiarán del tratamiento estándar con carboplatino y paclitaxel de aquellas en las que este tratamiento no es tan eficaz y serían subsidiarias de participar en ensayos clínicos con nuevas terapias.

3. EL FUTURO DE LA PREDICCIÓN DEL PRONÓSTICO Y LA RESPUESTA A FÁRMACOS EN EL CARCINOMA DE OVARIO

Como hemos visto en el apartado anterior, actualmente disponemos de pocos perfiles génicos asociados al pronóstico y menos aún con valor predictivo de respuesta a quimioterapia en el carcinoma de ovario. Recientemente se han publicado estudios que combinan el desarrollo de perfiles de expresión génica mediante *microarrays* con estudios *in vitro* de sensibilidad a diferentes agentes citotóxicos, como docetaxel, paclitaxel, topotecan, o doxorubicina entre otros (146) que definen una serie firmas génicas, validadas en estudios independientes con cultivos celulares, capaces de predecir la respuesta al tratamiento con una capacidad del 81%. Sin duda, los resultados tan prometedores de estos primeros estudios que integran la investigación de perfiles génicos con la sensibilidad a fármacos representan un paso previo más hacia la futura aplicación de las técnicas de alto rendimiento con el objeto de lograr individualizar el tratamiento de las pacientes con carcinoma de ovario avanzado (Figura 11).

En el caso del carcinoma de ovario, la determinación del perfil de expresión génica del tumor de una paciente en el momento del diagnóstico permitirá al médico conocer la probabilidad de que una paciente responda al régimen estándar de quimioterapia basada en platinos y taxanos para la primera línea. Pacientes con una baja probabilidad de responder al tratamiento podrían recibir un esquema de quimioterapia diferente de acuerdo al perfil génico expresado, o la combinación de la quimioterapia con un agente con una diana específica para la vía molecular sobreexpresada por el tumor. El éxito de este manejo individualizado dependerá de varios factores; por un lado, de la capacidad del perfil para discriminar la resistencia al tratamiento, y, por otro, del desarrollo de nuevas moléculas con la suficiente actividad y especificidad sobre la vía de señalización a tratar. Con respecto a la angiogénesis tumoral, existen fármacos muy activos y

específicos ya disponibles, a los que se unirán nuevas moléculas actualmente en desarrollo, por lo que promover, desarrollar y validar perfiles génicos implicados en este proceso se postula como un paso esencial para lograr el éxito terapéutico en estas pacientes.

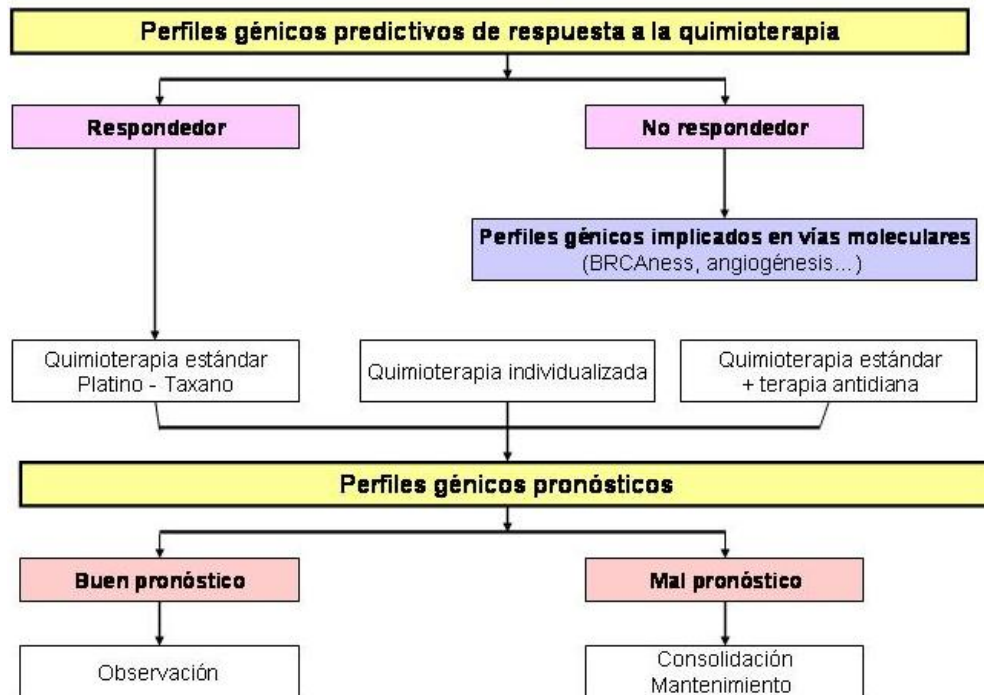


Figura 11 Ejemplo de cómo los análisis de múltiples genes y las técnicas de alto rendimiento se deben integrar en el manejo terapéutico de las pacientes con carcinoma de ovario (Adaptado de Kostantinopoulos PA y cols. Nat Clin Pract 2008;5:577-587).

En los últimos años, la Oncología ha iniciado un camino hacia la individualización y personalización de los tratamientos antineoplásicos. Cada vez son más los trabajos que tratan de caracterizar mejor las enfermedades neoplásicas e identificar vías moleculares como potenciales dianas terapéuticas. Esta es una necesidad patente en el caso del carcinoma de ovario, cuyas enfermas en las últimas dos décadas apenas se han beneficiado de mejoras sustanciales en el tratamiento. Nuestro estudio presenta un perfil

de genes implicados en la angiogénesis con valor predictivo de respuesta a la quimioterapia que, en caso de confirmarse, supondría un avance clave en la identificación del mejor tratamiento para cada paciente con cáncer de ovario avanzado.

Conclusiones

1. El perfil de expresión de 8 genes implicados en la angiogénesis identificado en este estudio distingue dos grupos de enfermas con cáncer de ovario avanzado que presentan diferencias estadísticamente significativas en la tasa de respuestas al tratamiento con carboplatino y paclitaxel.
2. El perfil de expresión de 8 genes es un factor pronóstico independiente de los factores clínico-patológicos y, además, se muestra como un factor pronóstico importante de recaída, asociándose de manera independiente, junto con la enfermedad residual en la cirugía citorreductora, con la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global.
3. Antes de que los análisis de perfiles de expresión génica con valor pronóstico o predictivo de respuesta sean incorporados en la práctica clínica deben ser validados en estudios prospectivos con un gran tamaño muestral.

Bibliografía

1. Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59:225-249.
2. Cabanes A, Pérez-Gómez B, Aragonés N et al. La situación del cáncer en España, 1975-2006. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2009
3. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 2004;351:2519-29.
4. Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. *Lancet* 2009;374:1371-82.
5. Purdie DM, Siskind V, Bain CJ et al. Reproduction-related risk factors for mucinous and nonmucinous epithelial ovarian cancer. *Am J Epidemiol* 2001;153:860-4.
6. Finch A, Beiner M, Lubinski J et al. Salpingo-oophorectomy and the risk of ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancers in women with a BRCA1 or BRCA2 Mutation. *JAMA* 2006;296:185-92.
7. Fathalla MF. Incessant ovulation: a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971;2:163.
8. Stadel BV. Letter: The etiology and prevention of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1975;123:772-4.
9. Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *Lancet* 2008;9:1191-97.
10. Cheng W, Liu J, Yoshida H et al. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. *Nat Med* 2005;11:531-537.
11. Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004;164:1511-18.
12. Chen VW, Ruiz B, Killeen JL et al. Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer* 2003;97:2631-42.
13. Cannistra SA, Gershenson DM, Recht A. Ovarian cancer, Fallopian tube carcinoma and Peritoneal Carcinoma. En: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 2008. pp1568-1594.
14. *AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition*. New York, Springer;2010.
15. Omura GA, Brady MF, Homesley HD et al. Long-term follow-up and prognosis factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 1991;9:1138.
16. Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P et al. Carcinoma of the ovary. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;95:S161.
17. Young RC, Walton LA, Ellenberg SS et al. Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer. Results of two prospective randomized trials. *N Engl J Med* 1990;322:1021-7.
18. Vergote I, De Brabanter J, Fyles A et al. Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian cancer. *Lancet* 2002;357:176-182.
19. Winter WE III, Maxwell GL, Tian C et al. Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2007;25:3621-7.

20. Eisenkop SM, Spirtos NM, Friedman RL et al. Relative influences of tumor volume before surgery and the cytoreductive outcome on survival for patients with advanced ovarian cancer: a prospective study. *Gynecol Oncol* 2003;90:390–396.
21. Ferrandina G, Scambia G, Legge F et al. Ovarian cancer patients with “node-positive only” stage IIIc disease have a more favorable outcome than stage IIIa/b. *Gynecol Oncol* 2007;107:154-6.
22. Winter WE, III, Maxwell GL, Tian C et al. Tumor residual after surgical cytoreduction in prediction of clinical outcome in stage IV epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2008;26:83-9.
23. Markman M, Liu PY, Rothenberg ML et al. Pretreatment CA125 and risk of relapse in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2006;16:47-58.
24. Gallion HH, Hunter JE, Van Nagell JR et al. The prognostic implications of low serum CA125 levels prior to the second look operation for stage III and IV epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1992;46:29-32.
25. Redondo A, Gómez Raposo C, Castelo B. Factores pronósticos en el cáncer de ovario. En: *Cáncer de Ovario 2011. Manual práctico*. Poveda Velasco ed. P. Permanyer. Barcelona, 2011. Pp 27-44.
26. Jeong JY, Feldman L, Solar P et al. Characterization of erythropoietin receptor and erythropoietin expression and function in human ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 2008;122: 274–280.
27. Mendiola M, Barriuso J, Mariño-Enríquez A, Redondo A et al. Aurora kinases as prognostic biomarkers in ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 2009; 40:631-638
28. Merritt WM, Lin YG, Han LY et al. Dicer, Drosha and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med* 2008;359:2541-2650.
29. Chetrit A, Hirsh-Yechezkel G, Ben-David Y et al. Effect of BRCA1/2 mutations on long-term survival of invasive ovarian cancer. *J Clin Oncol* 200;26:20-25.
30. Walsh CS, Ogawa S, Karahashi H et al. ERCC5 is a novel biomarker of ovarian cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2008;26:2952-2958
31. Creighton CJ, Fountain MD, Yu Z et al. Molecular Profiling Uncovers a p53-Associated Role for MicroRNA-31 in Inhibiting the Proliferation of Serous Ovarian Carcinomas and Other Cancers. *Cancer Res* 2010;70:1906-1915.
32. Marchini S, Cavalieri D, Fruscio R et al. Association between miR-200c and the survival of patients with stage I epithelial ovarian cancer: a retrospective study of two independent tumour tissue collections. *Lancet* 2011;12: 273-85.
33. Yang H, Kong W, He L et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res* 2008;68:425-433.
34. Eitam R, Kushnir M, Lithwick-Yana G et al. Tumor microRNA expression patterns associated with resistance to platinum based chemotherapy and survival in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* 2009;114:253-259.
35. Leskelä S, Leandro-García LJ, Mendiola M et al. The miR-200 family controls beta-tubulin III expression and is associated with paclitaxel-based treatment response and progression-free survival in ovarian cancer patients. *Endocr Relat Cancer* 2011;18:85-95.

36. Earle CC, Schrag D, Neville BA et al. Effect of surgeon specialty on processes of care and outcomes for ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:172-80.
37. Du Bois A, Quinn M, Thigpen T et al. 2004 consensus statements on the management of ovarian cancer: final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GCIIG OCCC 2004). *Ann Oncol* 2005;16 Suppl 8:viii7-viii12.
38. Thigpen T, duBois A, McAlpine J et al. First-line therapy in ovarian cancer trials. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21:756-62.
39. Rose PG, Nerenstone S, Brady MF et al. Gynecologic Oncology Group: Secondary surgical cytoreduction for advanced ovarian carcinoma. *N Engl J Med* 2004;351:2489-2497.
40. Greer BE, Bundy BN, Ozols RF et al. Implications of second-look laparotomy in the context of optimally resected stage III ovarian cancer: a non-randomized comparison using an explanatory analysis: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2005;99:71-9.
41. Ovarian cancer. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. www.nccn.org. 2011.
42. Vergote I, Trope CG, Amant F et al. Neoadjuvant Chemotherapy or Primary Surgery in Stage IIIC or IV Ovarian Cancer. *N Eng J Med* 2010;363:943-953.
43. Colombo N, Guthrie D, Chiari S et al. International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1: a randomized trial of adjuvant chemotherapy in women with early-stage ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:125-32.
44. Trimbos JB, Vergote I, Bolis G et al. Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:113-25.
45. Trimbos JB, Parmar M, Vergote I et al. International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1 and Adjuvant ChemoTherapy In Ovarian Neoplasm trial: two parallel randomized phase III trials of adjuvant chemotherapy in patients with early-stage ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:105-12.
46. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF et al. Cyclophosphamide and Cisplatin Compared with Paclitaxel and Cisplatin in Patients with Stage III and Stage IV Ovarian Cancer. *N Eng J Med* 1996;334:1-6.
47. Piccart MJ, Bertelsen K, James K et al. Randomized Intergroup Trial of Cisplatin–Paclitaxel Versus Cisplatin–Cyclophosphamide in Women With Advanced Epithelial Ovarian Cancer: Three-Year Results. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:699-708.
48. du Bois A, Luck HJ, Meier W et al. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1320-9.
49. Ozols RF, Bundy BN, Greer BE et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2003;21:3194-3200.

50. Katsumata N, Yasuda M, Takahashi F et al. Dose-dense paclitaxel once a week in combination with carboplatin every 3 weeks for advanced ovarian cancer: a phase 3, open-label, randomised trial. *Lancet* 2009;374:1331-38.
51. Bookman, M. A. GOG0182-ICON5: 5-arm phase III randomized trial of paclitaxel (P) and carboplatin (C) vs combinations with gemcitabine (G), PEG-liposomal doxorubicin (D), or topotecan (T) in patients (pts) with advanced-stage epithelial ovarian (EOC) or primary peritoneal (PPC) carcinoma. 42nd ASCO meeting, Atlanta 2006, abs 5002.
52. Markman M, Reichman B, Hakes T et al. Responses to second-line cisplatin based intraperitoneal therapy in ovarian cancer: influence of a prior response to intravenous cisplatin. *J Clin Oncol* 1991;9:1801-05
53. Alberts DS, Liu PY, Hannigan EV et al. Intraperitoneal cisplatin plus intravenous cyclophosphamide versus intravenous cisplatin plus intravenous cyclophosphamide for stage III ovarian cancer. *N Engl J Med* 1996;335:1950-1955.
54. Markman M, Bundy BN, Alberts DS et al. Phase III trial of standard-dose intravenous cisplatin plus paclitaxel versus moderately high-dose carboplatin followed by intravenous paclitaxel and intraperitoneal cisplatin in small-volume stage III ovarian carcinoma: An intergroup study of the Gynecologic Oncology Group, Southwestern Oncology Group, and Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2001;19:1001-1007.
55. Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L et al. Phase III randomized trial of intravenous cisplatin and paclitaxel versus an intensive regimen of intravenous paclitaxel, intraperitoneal cisplatin and intraperitoneal paclitaxel in stage III ovarian cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *N Engl J Med* 2006;354:34-43.
56. Harter P, Bois A, Hahmann M et al. Surgery in recurrent ovarian cancer: the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) DESKTOP OVAR trial. *Ann Surg Oncol* 2006;13:1702-10.
57. The ICON and AGO Collaborators. Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. *Lancet* 2003;361:2099-2106.
58. Pfisterer J, Plante M, Vergote I et al. Gemcitabine plus carboplatin compared with carboplatin in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: an intergroup trial of the AGO-OVAR, the NCIC CTG, and the EORTC GCG. *J Clin Oncol* 2006;24:4699-707.
59. Pujade-Lauraine E, Wagner U, Aavall-Lundqvist E et al. Pegylated liposomal Doxorubicin and Carboplatin compared with Paclitaxel and Carboplatin for patients with platinum-sensitive ovarian cancer in late relapse. *J Clin Oncol* 2010;28:3323-9.
60. Monk BJ, Herzog T, Kaye S et al. Trabectedin Plus Pegylated Liposomal Doxorubicin in Recurrent Ovarian Cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:3107-3114.
61. Gordon AN, Tonda M, Sun S et al. Long-term survival advantage for women treated with pegylated liposomal doxorubicin compared with topotecan in a phase 3 randomized study of recurrent and refractory epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004;95:1-8.

62. Gómez-Raposo C, Mendiola M, Barriuso J et al From targeted therapy in ovarian cancer to personalizing therapy for ovarian cancer. *Expert Opin Invest Drug* 2011;20:591-4.
63. Kerbel R. Tumor Angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;358:2039-49.
64. Folkman J, Watson K, Ingber D et al. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989;339:58–61.
65. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353–364.
66. Mendiola M, Barriuso J, Hardisson D. Targeting angiogenesis in ovarian cancer. *Curr Cancer Ther Rev* 2009;5:188-202.
67. Gómez-Raposo C, Mendiola M, Barriuso J et al. Angiogenesis and ovarian cancer. *Clin Trans Oncol* 2009;11:564-571.
68. Nakanishi Y, Kodama J, Yoshinouchi M et al. The expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β associates with angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Pathol* 1997;16:256–262.
69. Inan S, Vatansever S, Celik-Ozenci C et al. Immunolocalizations of VEGF, its receptors fl t-1, KDR and TGF-beta's in epithelial ovarian tumors. *Histol Histopathol* 2006;21:1055-1064.
70. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005; 438:967–974.
71. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005;307:58-62.
72. Seaman S, Stevens J, Yang MY et al. Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell* 2007;11:539-554.
73. Rubatt JM, Darcy KM, Hutson A et al. Independent prognostic relevance of microvessel density in advanced epithelial ovarian cancer and associations between CD31, CD105, p53 status, and angiogenic marker expression: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2009;112:469-474.
74. Shen GH, Ghazizadeh M, Kawanami O et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2000;83:196-203.
75. Nishida N, Yano H, Komai K et al. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 2004;101:1364-1374.
76. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2006;6:521-534.
77. Osada R, Horiuchi A, Kikuchi N et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha, hypoxia-inducible factor 2alpha, and von Hippel-Lindau protein in epithelial ovarian neoplasms and allelic loss of von Hippel-Lindau gene: nuclear expression of hypoxia inducible factor 1alpha is an independent prognostic factor in ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 2007;38:1310-1320.

78. Engels K, du Bois A, Harter P et al. VEGF-A and i-NOS expression are prognostic factors in serous epithelial ovarian carcinomas after complete surgical resection. *J Clin Pathol* 2009;62:448-454.
79. Birrer MJ, Johnson ME, Hao K et al. Whole genome oligonucleotide-based array comparative genomic hybridization analysis indentified fibroblast growth factor 1 as a prognostic marker for advanced-stage serous ovarian adenocarcinomas. *J Clin Oncol* 2007;25:2281-7
80. Schindl M, Schoppmann SF, Ströbel T et al. Level of Id-1 protein expression correlates with poor differentiation, enhanced malignant potential and more aggressive clinical behaviour of epithelial ovarian tumors. *Clin Cancer Res* 2003;9:779-785.
81. Wu Q, Suo Z, Kristensen GB et al. The prognostic impact of EphB2/B4 expression on patients with advanced ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2006;102:15-21.
82. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-2342.
83. Sandler A, Gray R, Perry MC et al. Paclitaxel–carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2542-2550.
84. Rini BI, Halabi S, Rosenberg JE et al. Bevacizumab plus interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206. *J Clin Oncol* 2008;26:5422-8.
85. Burger RA. Phase III trial of bevacizumab (BEV) in the primary treatment of advanced epithelial ovarian cancer (EOC), primary peritoneal cancer (PPC), or fallopian tube cancer (FTC): A Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 28:18s, 2010 (suppl; abstr LBA1).
86. ICON7: A Phase III Randomised Gynaecologic Cancer Intergroup Trial Of Concurrent Bevacizumab And Chemotherapy Followed By Maintenance Bevacizumab, Versus Chemotherapy Alone In Women With Newly Diagnosed Epithelial Ovarian (Eoc), Primary Peritoneal (Ppc) Or Fallopian Tube Cancer (Ftc). *Ann Oncol* 2010;21 (Supplement 8): viii1–viii12, LBA4.
87. Aghajanian C. OCEANS: A randomized, double-blinded, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab (BEV) in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian (EOC), primary peritoneal (PPC), or fallopian tube cancer (FTC)., *J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr LBA5007)
88. Burger RA, Sill MW, Monk BJ et al. Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2007;25:5165–5171.
89. Cannistra SA, Matulonis UA, Penson RT et al. Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:5180-5186.
90. Tew WP. VEGF-Trap for patients (pts) with recurrent platinum-resistant epithelial ovarian cancer (EOC): Preliminary results of a randomized, multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 2007;25:5508.
91. Hirte HW. A phase II study of cediranib (AZD2171) in recurrent or persistent ovarian, peritoneal or fallopian tube cancer: Final results of a PMH, Chicago and California consortia trial. *J Clin Oncol* 2008;26:5521.

92. Friedlander M. Pazopanib (GW786034) is active in women with advanced epithelial ovarian, fallopian tube and peritoneal cancers: Initial results of a phase II study. *J Clin Oncol* 2007;25:5561.
93. Karlan Y. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study of AMG 386 combined with weekly paclitaxel in patients (pts) with recurrent ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 28:15s, 2010 (suppl; abstr 5000)
94. Zweifel M, Jayson GC, Reed NS et al. Phase II trial of combretastatin A4 phosphate, carboplatin, and paclitaxel in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *Ann Oncol* 2011 [en prensa]
95. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-52.
96. Rosenwald A, Wright G, Chan WC et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:1937-47.
97. Butte A. The use and analysis of microarray data. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:951-60.
98. Fresno JA, Cejas P, Domínguez-Cáceres A. Biología molecular aplicada al estudio de los factores pronósticos. En: González Barón M, ed. *Factores Pronósticos en Oncología*. Interamericana McGraw-Hill; Madrid 2005. pp. 17-28.
99. Bair E, Tibshirani R. Semi-supervised methods to predict patient survival from gene expression data. *PLoS Biol* 2004;2(4):E108.
100. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-7.
101. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
102. www.appliedbiosystems.com. Taqman Based Assays.
103. Gómez-Raposo C, Mendiola M, Barriuso J et al. Molecular characterization of ovarian cancer by gene-expression profiling. *Gynecol Oncol* 2010;118:88-92.
104. Jazaeri AA, Yee CJ, Sotiriou C et al. Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA2-linked, and sporadic ovarian cancers. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:990-1000.
105. Bonome T, Lee JY, Park DC et al. Expression profiling of serous low malignant potential, low-grade, and high-grade tumors of the ovary. *Cancer Res* 2005;65:10602–10612
106. Shridhar V, Lee J, Pandita A et al. Genetic analysis of early- versus late-stage ovarian tumors. *Cancer Res* 2008;61:5895-5904.
107. Berchuck A, Iversen ES, Luo J et al. Microarray Analysis of Early Stage Serous Ovarian Cancers Shows Profiles Predictive of Favourable Outcome. *Clin Cancer Res* 2009;15:24448-2455.
108. Hartmann LC, Lu KH, Linette GP et al. Gene expression profiles predict early relapse in ovarian cancer after platinum-paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11:2149-2155.

109. Spentzos D, Levine DA, Ramoni MF et al. Gene expression signature with independent prognostic significance in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:4700-4710.
110. Berchuck A, Iversen ES, Lancaster JM et al. Patterns of gene expression that characterize long-term survival in advanced stage serous ovarian cancers. *Clin Cancer Res* 2005;11:3686-3696.
111. Berchuck A, Iversen ES, Luo J et al. Microarray Analysis of Early Stage Serous Ovarian Cancers Shows Profiles Predictive of Favourable Outcome. *Clin Cancer Res* 2009;15:24448-2455.
112. Tothill RX, Tinker AV, George J et al. Novel Molecular Subtypes of Serous and Endometrioid Ovarian Cancer Linked to Clinical Outcome. *Clin Cancer Res* 2008;14:5198-5208.
113. Crijns APG, Fehrmann RSN, de Jong S et al. Survival-Related Profile, Pathways, and Transcription Factors in Ovarian Cancer. *PLoS Med* 2009;6:e1000024. doi:10.1371/journal.pmed.1000024
114. Jochumsen KM, Tan Q, Hodgall EV et al. Gene expression profiles as prognostic markers in women with ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2009;19:1205-1213.
115. Kostantinopoulos PA, Spentzos D, Karlan BY et al. Gene expression profile of BRCAness that correlates with responsiveness to chemotherapy and with outcome in patients with epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:3555-3561.
116. Mendiola M, Barriuso J, Redondo A et al. Angiogenesis-related gene expression profile with independent prognostic value in advanced ovarian carcinoma. *PLoS One* 2008;3:e4051
117. Jazaeri AA, Awtrey CS, Chandramouli GV et al.: Gene expression profiles associated with response to chemotherapy in epithelial ovarian cancers. *Clin Cancer Res* 2005;11:6300-6310.
118. Spentzos D, Levine DA, Kolia S et al. Unique gene expression profile based on pathologic response in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7911-8.
119. Helleman J, Jansen MP, Span PN et al. Molecular profiling of platinum resistant ovarian cancer. *Int J Cancer* 2006;118:1963-1971.
120. Dressman HK, Berchuck A, Chan G et al. An integrated genomic based approach to individualized treatment of patients with advanced-stage ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 517-525.
121. Bachvaro D, L'Esperance S, Popa I et al. Gene expression patterns of chemoresistant and chemosensitive serous epithelial ovarian tumors with possible predictive value in response to initial chemotherapy. *Int J Oncol* 2006;29:919-933.
122. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.
123. <http://medgen.ugent.be/genorm/>
124. You B, Perrin P, Freyer G et al. Advantages of prostate-specific antigen (PSA) clearance model over simple PSA half-life computation to describe PSA decrease after prostate adenomectomy. *Clin Biochem* 2008; 41:785-795.

125. Simon R, Wang SJ. Use of genomic signatures in therapeutics development in oncology and other diseases. *Pharmacogenomics J* 2006;6:166-173.
126. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-6.
127. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869-74.
128. Miller LD, Long PM, Wong L et al. Optimal gene expression analysis by microarrays. *Cancer Cell* 2002;2:353-61.
129. Espinosa E, Redondo A, Fresno Vara JA et al. High-throughput techniques in breast cancer: A clinical perspective. *Eur J Cancer* 2006;42:598-607.
130. Endoh H, Tomida S, Yatabe Y et al. Prognostic model of pulmonary adenocarcinoma by expression profiling of eight genes as determined by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 2004;22:811-9.
131. April C, Klotzle B, Royce T et al. Whole-Genome Gene Expression Profiling of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Samples. *PLoS ONE* 2009;4:e8162. doi:10.1371/journal.pone.0008162
132. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* 2004;5:607-16.
133. Paik S, Shak S, Tang G et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2817-26.
134. Espinosa E, Fresno Vara JA, Redondo A et al. Breast cancer prognosis determined by gene expression profiling: a quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction study. *J Clin Oncol* 2005;23:7278-7285.
135. Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S et al. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* 2002;309:293-300.
136. Jain RK, Duda DG, Willet CG et al. Biomarkers of response and resistance to angiogenic therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6:327-338.
137. Jubb AM, Harris AL. Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer. *Lancet* 2010;11:1172-83.
138. Bernaards C. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) as biomarker for bevacizumab based therapy in metastatic colorectal, non-small cell lung and renal cell cancers: Analysis of phase III studies. *J Clin Oncol* 2010;18(suppl): abstr 10519.
139. Joshi B, Strugnelli SS, Goetz JG et al. Phosphorylated Caveolin-1 Regulates Rho/ROCK-Dependent Focal Adhesion Dynamics and Tumor Cell Migration and Invasion *Cancer Res* 2008;68:8219-20.
140. Bolitho C, Hahn MA, Baxter RC et al. The chemokine CXCL1 induces proliferation in epithelial ovarian cancer cells by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Endocr Relat Cancer* 2010;17:929-40.
141. Wiesmann F, Veeck J, Galm O et al. Frequent loss of endothelin-3 (EDN3) expression due to epigenetic inactivation in human breast cancer. *Breast Cancer Research* 2009;11:R34 doi:10.1186/bcr2319

142. Paragh G, Kumar SM, Rakosy Z et al. RNA Interference-Mediated Inhibition of Erythropoietin Receptor Expression Suppresses Tumor Growth and Invasiveness in A2780 Human Ovarian Carcinoma Cells. *Am J Pathol* 2009;174:1504-1514.
143. Nakawatari M, Iwakawa M, Ohno T et al. Change in fibroblast growth factor 2 expression as an early phase radiotherapy-responsive marker in sequential biopsy samples from patients with cervical cancer during fractionated radiotherapy. *Cancer* 2010; 116:5082-92.
144. Zhang S, Zhau HE, Osunkoya AO et al. Vascular endothelial growth factor regulates myeloid cell leukemia-1 expression through neuropilin-1-dependent activation of c-MET signaling in human prostate cancer cells. *Molecular Cancer* 2010;9:9
145. Johansson E, Komuro A, Iwata C et al. Exogenous introduction of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 reduces accelerated growth of TGF- β -disrupted diffuse-type gastric carcinoma. *Cancer Sci* 2010;101:2398-403.
146. Konstantinopoulos PA, Spentzos D, Cannistra SA. Gene-expression profiling in epithelial ovarian cancer. *Nat Clin Pract* 2008;10:577-587.
147. Buckanovich RJ, Sasaroli D, O'Brien A et al. Tumor Vascular Proteins as Biomarkers in Ovarian Cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:852-861.
148. Fehrmann RN, Li XY, Van der Zee AGJ et al. Profiling Studies in Ovarian Cancer: A Review. *The Oncologist* 2007;12:960–966.
149. Michiels S, Koscielny S, Hill C. Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. *Lancet* 2005;365:488-92.
150. Simon R, Radmacher MD, Dobbin K et al. Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:14-8.

Resumen

INTRODUCCIÓN

El tratamiento de las enfermas con cáncer de ovario avanzado se basa en la cirugía citorreductora de máximo esfuerzo y el tratamiento con quimioterapia. La combinación de carboplatino y paclitaxel es el régimen de tratamiento estándar en esta situación. A pesar de la alta tasa de respuestas, la gran mayoría de las enfermas recaen. Variables clásicas como la edad, la enfermedad residual o el tipo histológico tienen escaso valor predictivo de respuesta para el tratamiento.

La angiogénesis es un proceso fundamental en la carcinogénesis ovárica, y tratamientos específicos antiangiogénicos, como el bevacizumab, han demostrado eficacia en el carcinoma de ovario avanzado.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un perfil de expresión génica con capacidad de predecir la respuesta clínica a la quimioterapia en el cáncer de ovario avanzado.

MATERIAL Y MÉTODO

Se incluyeron 61 pacientes diagnosticadas de un carcinoma de ovario estadio III/IV según la clasificación de la FIGO tras una cirugía citorreductora inicial, y que posteriormente recibieron tratamiento con carboplatino y paclitaxel. Se extrajo el ARN de las muestras de las pacientes conservadas en parafina y fijadas en formalina. El nivel de expresión de 82 genes implicados en la angiogénesis fue analizado mediante la técnica de la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real.

La respuesta clínica se evaluó mediante la TAC una vez finalizado el tratamiento multimodal. Un método de regresión se empleó como análisis estadístico para generar múltiples perfiles en base a los genes significativos. Para seleccionar el modelo con

mayor capacidad discriminativo se utilizó el *Akaike Information Criterion*. La capacidad de cada perfil se valoraba mediante las curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*).

RESULTADOS

La edad media al diagnóstico de las pacientes era de 53 años (rango, 21-82 años). La mayoría de las enfermas tenían un cáncer de ovario estadio III (51 83,6%), tumores pobremente diferenciados (35, 57,4%), e histología serosa (42, 68,9%). 52 pacientes (85,2%) respondieron inicialmente a la quimioterapia con carboplatino y paclitaxel (respuesta completa o parcial según criterios RECIST).

Se desarrolló un perfil de ocho genes con capacidad para predecir la respuesta clínica al tratamiento con un Área Bajo la Curva (AUC) de 0,955 ($p < 0.001$). Se realizó una validación de los resultados del modelo mediante el método *Leave-one-out cross*, obteniendo una AUC de 0,880, 95% IC: 0,776-0,985. En el análisis de regresión logístico, el perfil de ocho genes fue independiente de los factores clínico-patológicos [$p = 0,003$, HR (IC 95%) 2,72 (1,39-5,29)]. Ninguna otra variable se asoció a la respuesta clínica. La respuesta al tratamiento predicha por el perfil se asocia a un diferente pronóstico en cada grupo de pacientes.

CONCLUSIONES

Mediante la técnica qRT-PCR, y a partir de muestras conservadas en parafina, se ha generado un perfil de ocho genes implicados en la angiogénesis con valor predictivo de respuesta al tratamiento en el carcinoma de ovario avanzado. Aunque estos resultados deben ser validados en series independientes de forma prospectivas, este modelo podría

identificar las pacientes que responden al tratamiento estándar con carboplatino y paclitaxel de aquellas en las que este tratamiento no es beneficioso y serían subsidiarias de participar en ensayos clínicos con nuevas terapias