



Facultad de Medicina
Departamento de Medicina

TESIS DOCTORAL

**EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA
ANGIOGÉNESIS COMO PREDICTORES DE
RESPUESTA AL TRATAMIENTO COMBINADO
(CIRUGÍA Y QUIMIOTERAPIA) EN EL CARCINOMA
DE OVARIO SEROSO DE ALTO GRADO**

**Memoria presentada para la obtención del grado de
Doctor en Medicina por**

PATRICIA CRUZ CASTELLANOS

**Dirigida por el Dr. Andrés Redondo Sánchez
y la Dra. Marta Mendiola Sabio**

Madrid 2018



Facultad de Medicina
Departamento de Medicina

Don ANDRÉS REDONDO SÁNCHEZ, Doctor en Medicina, Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y Médico Adjunto del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz, y

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

CERTIFICAN

Que Doña PATRICIA CRUZ CASTELLANOS, Licenciada en Medicina, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado “**Expresión de genes relacionados con la angiogénesis como predictores de respuesta al tratamiento combinado (cirugía y quimioterapia) en el carcinoma de ovario seroso de alto grado**” que cumple, a nuestro juicio, con los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Este trabajo se ha llevado a cabo en el laboratorio de Oncología Traslacional del Hospital Universitario La Paz en colaboración con el Servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid y el IMDEA (Instituto Madrileño de Estudios Avanzados de Alimentación) y ha sido financiado por un proyecto FIS (PI10/630) y por una beca recibida de la Fundación Mutua Madrileña. Los resultados del mismo han sido presentados en el congreso de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) de 2014 y en el congreso de la European Society of Medical Oncology (ESMO) de 2014 así como en 1st PhD Research Symposium in Health Sciences and Biomedicine (School of Medicine UAM, 18 May 2018).

Madrid, a 29 de Octubre de 2018.

Dr. Andrés Redondo Sánchez

Dra. Marta Mendiola Sabio

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración y apoyo de muchas personas. En primer lugar, quisiera agradecer al Dr. Andrés Redondo, su apoyo y comprensión durante todo este proceso. Durante mi residencia fue un modelo a seguir que me enseñó y apoyó siempre. Posteriormente, no ha dejado de hacerlo en ningún momento, creyendo en mí y recordándome siempre que trabajando duro todo puede ser posible. Gracias a ello este proyecto ha salido adelante. Muchas gracias por todo.

A la Dra. Marta Mendiola, una gran persona y profesional, que nunca dejará de sorprendernos con sus ideas, constancia e ilusión por el trabajo que hace. Gracias a los dos confiar en mí para participar en este proyecto, por vuestros ánimos y colaboración en todo momento.

Gracias también al Dr. Javier de Castro, un gran maestro en mi vida profesional y del que siempre aprendo algo todos los días, gracias por las oportunidades y gracias por todo el apoyo en los buenos y malos momentos profesionales y personales.

Gracias a Loli, que siempre creyó en mi y a la que le debo tanto. Gracias por tu forma de ser, tu sonrisa y dulzura.

A todos mis compañeros del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz, todos me han ayudado a lo largo de estos años, me han enseñado y es un orgullo poder trabajar con ellos día a día. Sin duda elegir el Servicio de Oncología Médica del Hospital La Paz para formarme fue una de las decisiones más importantes y acertadas de mi vida.

Gracias también al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital La Paz, por su colaboración y 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.

Por último, gracias a mi familia. En parte este proyecto ha sido posible gracias a ellos, por su ayuda en todo momento. Gracias a mis padres por enseñarme todo, a mi hermano por ser como es y a David por entenderme y comprender aquello que es importante para mí, por sus ánimos y por creer siempre que este proyecto era posible. Gracias a Davichín por existir, por tu alegría y por enseñarnos cada día lo que es realmente importante.

Muchas gracias a todos.

INDICE DE CONTENIDOS

<i>GLOSARIO DE SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS UTILIZADAS</i>	5
<i>RESUMEN</i>	9
<i>INTRODUCCIÓN</i>	13
<i>1. Generalidades del cáncer de ovario</i>	14
1.1. Epidemiología	14
1.2. Etiopatogenia	15
<i>2. Subtipos, historia natural y estadificación</i>	16
2.1. Subtipos histológicos	16
2.2. Historia natural, diagnóstico y estadificación	19
<i>3. Tratamiento del cáncer de ovario avanzado</i>	22
3.1. Cirugía	22
3.2. Tratamiento sistémico de primera línea	24
3.3. Tratamiento de la recaída	27
<i>4. Factores pronósticos y predictivos de respuesta en la enfermedad avanzada</i>	31
4.1. Factores clínico-patológicos y biomarcadores consolidados	31
4.2. Perfiles de expresión génica	35
<i>5. Angiogénesis en cáncer de ovario</i>	42
5.1. Concepto de angiogénesis y su papel en el cáncer de ovario	42
5.2. Biomarcadores relacionados con la angiogénesis con posible valor pronóstico en cáncer de ovario	43
5.3. Biomarcadores relacionados con la angiogénesis con posible valor predictivo de respuesta en cáncer de ovario	44
<i>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</i>	47
1. Hipótesis	48
2. Objetivos	48
<i>PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS</i>	51
1. Pacientes y variables clínico-patológicas	52
2. Selección de genes	53
3. Procesamiento de las muestras	54
4. Análisis estadístico	56

RESULTADOS	59
1. Análisis descriptivo de las variables clínicas	60
2. Análisis univariante de las variables clínicas	61
2.1. Análisis de la respuesta al tratamiento	61
2.2. Análisis de la supervivencia	61
3. Análisis univariante de la expresión génica	62
3.1. Análisis de la respuesta al tratamiento	62
3.2. Análisis de la supervivencia	63
4. Identificación de un modelo multigénico predictor de respuesta y validación interna	64
5. Análisis exploratorio de la expresión génica en el subgrupo de pacientes con enfermedad residual postquirúrgica > 1 cm	66
5.1. Análisis de la respuesta al tratamiento.	66
5.2. Análisis de supervivencia	67
6. Análisis inmunohistoquímico de marcadores seleccionados	68
6.1. Análisis descriptivo y análisis de respuesta al tratamiento	68
DISCUSIÓN	71
1. Discusión de los métodos	72
1.1. Material y técnicas de biología molecular	72
1.2. Elección de la variable principal de eficacia	73
1.3. Análisis del método estadístico	75
2. Discusión de los resultados	76
2.1. Características de las pacientes	76
2.2. Influencia de las variables clínicas en la respuesta al tratamiento	77
2.3. Relevancia biológica de los genes asociados a la respuesta al tratamiento	79
2.4. Limitaciones del modelo génico y comparación con otros publicados	83
2.5. Inmunohistoquímica	85
CONCLUSIONES	87
BIBLIOGRAFÍA	89
ANEXOS	113
Anexo 1. Relación de genes incluidos en este estudio.	114
Anexo 2 . Análisis univariante de los 82 genes incluidos en el estudio en relación a la variable respuesta completa al tratamiento.	115
Anexo 3. Análisis univariante de genes relacionados con SLP y SG.	117
Anexo 4. Métodos testados para la elaboración del modelo multigénico	121

Anexo 5. Análisis univariante de los 82 genes incluidos en el estudio en subgrupo de ER >1 cm en relación a respuesta completa al tratamiento. _____	122
Anexo 6. Análisis univariante en el subgrupo de ER >1 cm en relación a SLP y SG _____	120

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Subtipos histológicos de cáncer de ovario, con las alteraciones moleculares _____	19
Tabla 2. Estadificación FIGO del carcinoma de ovario. _____	21
Tabla 3. Ensayos clínicos con quimioterapia intraperitoneal en primera línea en cáncer de ovario _____	25
Tabla 4. Resumen de los resultados de los ensayos fase III realizados con antiangiogénicos _____	27
Tabla 5. Estudios randomizados realizados con antiangiogénicos en la recaída del cáncer de ovario. _____	30
Tabla 6. Estudios publicados con perfiles génicos con un posible valor _____	37
Tabla 7. Clasificación molecular propuesta por TCGA para el carcinoma seroso de alto grado. _____	38
Tabla 8. Resumen de los estudios publicados hasta el momento de perfiles con valor predictivo de _____	40
Tabla 9. Variables clínicas analizadas. _____	60
Tabla 10. Análisis univariante de variables clínicas en relación a la respuesta _____	61
Tabla 11. Regresión de Cox con la única variable clínica significativa. _____	61
Tabla 12. Genes asociados con la respuesta al tratamiento en el _____	62
Tabla 13. Genes asociados a la SLP y SG en el análisis univariante. _____	64
Tabla 14. Genes incluidos en el modelo multigénico predictivo de respuesta _____	65
Tabla 15. Genes asociados con la respuesta al tratamiento en el análisis _____	67
Tabla 16. Análisis univariante de la expresión de genes asociados a SLP _____	68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curvas de SLP (A) y SG (B) en función de la enfermedad residual post-cirugía, en estadios III (derecha) y estadios IV (izquierda). Adaptada de Winter y cols _____	33
Figura 2. Supervivencia global de los subtipos moleculares del carcinoma seroso de alto grado. Adaptada de Konecny y cols _____	39
Figura 3. Modelo de regresión de Cox con las características clínicas, A) SLP y B) SG. En azul los pacientes con enfermedad residual 0 < 1 cm y en rojo con enfermedad residual > 1 cm _____	62
Figura 4. Curvas ROC donde se ilustra la asociación de los genes <i>ANGPT1</i> , <i>ARNT</i> , <i>CD34</i> , <i>EGF</i> , y <i>MMP3</i> con la respuesta completa _____	63
Figura 5. AUC del modelo multigénico _____	65

Figura 6. Curvas de Kaplan Meier para A) SLP y B) SG de los dos grupos diferenciados por el modelo multigénico. En azul se representa el grupo de buena respuesta, y en rojo el grupo de mala respuesta al tratamiento _____ 66
Figura 7. Tinciones de inmunohistoquímica A) CD34, B) EGF, C) MMP3 _____ 69

**GLOSARIO DE SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS
UTILIZADAS**

- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.
- AGT: *Angiotensinogen*.
- AGRT2: *Angiotensin II Receptor Type 2*.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.
- ANGPT1: *Angiopoyetin 1*.
- ARNT: *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*.
- AUC: *Area Under the Curve*, Área Bajo la Curva.
- AURKB: *Aurora Kinase B*.
- BRCA1 y 2: *Breast cancer 1 y 2*.
- BRAF: *B-Raf Proto-Oncogene*.
- C-KIT: *KIT Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase*.
- CK20: *Cytokeratin 20*.
- CDX2: *Caudal type homeobox 2*.
- CD31: *Cluster of differentiation 31*.
- CD34: *Cluster of differentiation 34*.
- CD44: *Cluster of differentiation 44*.
- CTNNB1: β *Catenin*.
- Ct: *threshold cycle* o ciclo umbral.
- CVPI: *cross validated pronostic index*.
- CXCR3: *C-X-C Motif Chemokine Receptor 3*.
- CXCL10 y 11: *C-X-C Motif Chemokine Ligand 10 y 11*.
- DLP: Doxorubicina liposomal pegilada.
- EGF: *Epidermal Growth Factor*.
- EMA: *European Medical Agency*, Agencia Europea del Medicamento.
- ER: Enfermedad Residual.
- EPHB2: *EPH Receptor B2*.
- EPOR: *Erythropoietin Receptor*.
- FAP : *Fibroblast Activation Protein Alpha*.
- FGF: *Fibroblast Growth Factor*.
- FGFR: *Fibroblast Growth Factor Receptor*.
- FIGO: *Fédération Internationale de Gynecologie et d'Obstrétrique*, Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia.

- FLT4: *Fms Related Tyrosine Kinase 4*.
- GCIG: *Gynecologic Cancer InterGroup*, Intergupo de Cáncer Ginecológico.
- HGSOC: *High Grade Serous Ovarian Carcinoma*, Carcinoma seroso de ovario de alto grado.
- HK: *Housekeeping*, gen de referencia o control endógeno.
- HMGA2: *High Mobility Group AT-Hook 2*.
- HOX: *Homeobox*.
- HR: *Hazard Ratio*.
- HRD: *Homologous Recombination Deficiency*, deficiencia de recombinación homóloga.
- IC: Intervalo de confianza.
- IHQ : Inmunohistoquímica.
- IL: Interleuquina.
- ILP: Intervalo libre de platino.
- IP: Intraperitoneal.
- KRAS: *Kirsten ras oncogene*.
- KM: Kaplan-Meier.
- LASSO: *Least absolute shrinkage and selection operator*.
- LGSOC: *Low Grade Serous Ovarian Carcinoma*.
- LOOCV: *Leave-one out cross validation*, método de validación cruzada.
- MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*.
- miARN: microARN .
- MCM2: Minichromosome Maintenance Complex Component.
- MMP: Metaloproteinasas de la matriz.
- MMR: *Mismatch repair*.
- MUC: *Mucin 1, Cell Surface Associated*.
- NCBI: *National Center for Biotechnology Information*.
- OR: *Odds Ratio*.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- PARP: Polimerasa poli-ADP ribosa.
- PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*.
- PCR: *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa.
- PDGF: *Platelet-derived Growth Factor*.
- PDGFB : *Platelet Derived Growth Factor Subunit B*.

- PDGFR: *Platelet-derived Growth Factor Receptor*.
- PI3KA: *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*.
- PIGF: *Placental Growth Factor*.
- PTEN: *Phosphatase And Tensin Homolog*.
- qRT-PCR: *Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*.
- RE: Receptor de estrógenos.
- ROC: *Receiver Operating Curves*.
- RP: Receptor de progesterona.
- SG: Supervivencia Global.
- SLP: Supervivencia Libre de Progresión.
- SOX11: *SRY-Box 11*.
- TC: Tomografía Computerizada.
- TGCA : *The Genome Cancer Atlas*.
- TGF: *Transforming Growth Factor*.
- TLDA : *Taqman Low Density Array*, tarjetas microfluídicas de baja densidad.
- TMA : *Tissue microarray*.
- TP53: *Tumor Protein 53*.
- VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*.
- VEGFR: *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*.
- WT-1: *Wilms Tumor 1*.
- WNT: *Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 1*.

RESUMEN

El tratamiento estándar para el cáncer de ovario seroso de alto grado (HGSOC) avanzado es la cirugía citorreductora, y una quimioterapia basada en platino y paclitaxel, con el objetivo de obtener respuesta completa de la enfermedad tras la finalización del mismo. La persistencia de enfermedad tras la cirugía y la quimioterapia indica un mal pronóstico para las enfermas.

La angiogénesis es un proceso ampliamente estudiado en el cáncer de ovario, habiéndose descrito diversas moléculas relacionadas que se han asociado al pronóstico, así como varios ensayos clínicos que han mostrado una actividad de los fármacos antiangiogénicos en esta neoplasia.

Nuestro estudio tiene como objetivo principal identificar un modelo predictivo de respuesta completa al tratamiento de primera línea del HGSOC, tras el análisis de expresión de genes involucrados en el proceso angiogénico.

Se incluyeron 39 pacientes con HGSOC avanzado que habían sido tratadas con cirugía citorreductora y quimioterapia con platino-paclitaxel. Se obtuvieron los RNAs de las muestras fijadas formol e incluidas en parafina, y se analizó la expresión de 82 genes relacionados con la angiogénesis mediante qRT-PCR. El análisis multivariante de las variables clínicas y de la expresión génica se realizó mediante regresión de Cox, y se generaron curvas ROC de cada variable. El modelo génico predictivo de respuesta se generó con la regresión penalizada de Lasso y fue validado mediante el método *Leave-One Out Cross Validation* (LOOCV). Posteriormente se analizó por inmunohistoquímica la expresión de algunas de las proteínas cuyos genes habían resultado significativos en el análisis univariante y habían sido incluidos en el modelo.

El 74% de las pacientes presentaron una respuesta completa al tratamiento, siendo la ausencia de tumor residual tras la cirugía la única variable clínica que se

asoció a la respuesta. De los genes analizados, sólo la expresión de *ANGPT1*, *ARNT*, *CD34*, *EGF* y *MMP3* se correlacionaron con la respuesta en el análisis univariante. Se generó un modelo multigénico integrado por 7 genes (*AGT*, *CD34*, *EGF*, *EPOR*, *IL8*, *MMP3* y *MMP7*), con un AUC de 0,67 (IC 95% 0,47-0,88), pero con el que no se llegó a alcanzar la significación estadística ($p=0.09$).

También se analizó la posible relación entre la expresión de los genes estudiados con la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG), identificándose cuatro genes (*ANGPT2*, *CD36*, *CD44* y *EPHB2*) asociados con la primera, y cinco (*CD44*, *ANGPT1*, *CD34*, *MMP7* y *PDGFB*) con la segunda, algunos de los cuales coincidieron con los integrantes del modelo predictivo de respuesta.

Ninguna de las proteínas estudiadas por inmunohistoquímica se asoció de forma estadísticamente significativa con la respuesta.

En conclusión, con la metodología empleada se consiguió generar un modelo génico predictivo de respuesta, aunque no se pudieron obtener diferencias estadísticamente significativas, probablemente por el pequeño tamaño de nuestra serie. Los resultados de nuestro estudio indican que algunos genes involucrados en el proceso angiogénico podrían jugar un papel en la respuesta al tratamiento multimodal de primera línea, algo que debería confirmarse en otros estudios con mayor tamaño muestral, y, a ser posible, prospectivos.

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades del cáncer de ovario

1.1. Epidemiología

El cáncer de ovario es el segundo tumor ginecológico más frecuente en los países desarrollados, con una incidencia de 9,4 por 100.000 habitantes y una mortalidad de 5,1 por 100.000 [1]. En España, esta neoplasia representa el cuarto tumor más frecuente en mujeres y la séptima causa de muerte por cáncer de forma global para ambos sexos [2]. El riesgo de desarrollar cáncer de ovario durante la vida de una mujer oscila entre el 1,4% y el 1,8%, aumentando progresivamente con la edad, y situándose la media de diagnóstico en torno a los 60 años [3, 4].

Se han descrito diversos factores de riesgo, muchos de ellos relacionados con un mayor número de ciclos ovulatorios, como la nuliparidad, la menarquia precoz, la menopausia tardía o la infertilidad; sin embargo, la inducción de la ovulación no parece aumentar el riesgo de cáncer de ovario [5]. Por otro lado, la terapia hormonal sustitutiva presenta datos controvertidos, aunque también parece incrementar mínimamente el riesgo de cáncer de ovario [6, 7]. Otro factor de riesgo importante es la endometriosis, que aumenta el riesgo de desarrollar esta neoplasia en un 2.5% [8]. Además, la endometriosis parece asociarse con subtipos histológicos específicos, como el carcinoma endometriode, el de células claras y el seroso de bajo grado [9].

Por otro lado, el riesgo de cáncer de ovario también puede estar influenciado por factores genéticos y familiares. Un antecedente personal de cáncer de mama o un antecedente familiar de cáncer de ovario se asocia con un mayor riesgo de desarrollar esta neoplasia. Se estima que aproximadamente un 15% de las neoplasias ováricas presentan un componente hereditario [3]. El síndrome más frecuente es el asociado a las mutaciones de *BRCA1* y *BRCA2*. Las portadoras de estas mutaciones tienen un

importante incremento del riesgo de desarrollar cáncer de ovario o de mama. El riesgo de cáncer de ovario es variable y depende de la mutación; así, las portadoras de *BRCA1* presentan un riesgo entre el 35% y el 46%, mientras que las portadoras de *BRCA2* entre el 13% y el 23% [10]. Recientemente, las mutaciones de los genes *BRCA* han cobrado una especial relevancia en este tumor debido a su influencia en el pronóstico y en la predicción de respuesta a platino y a inhibidores de la Poli ADP ribosa polimerasa (PARP), como se describirá posteriormente. El síndrome de Lynch tipo II o cáncer colorrectal hereditario no polipósico, se caracteriza por la mutación en los genes *MMR* (*mismatch repair*), situándose el riesgo de desarrollar cáncer de ovario entre el 3% y el 14% [3].

Por el contrario, existen otros factores que parecen disminuir el riesgo de cáncer de ovario, como los anticonceptivos orales [11] o algunas intervenciones quirúrgicas ginecológicas, como la ligadura de trompas, la histerectomía simple o la salpingo-ooforectomía bilateral (procedimiento que se plantea de manera profiláctica en portadoras de una mutación en los genes *BRCA*) [12, 13].

1.2. Etiopatogenia

Actualmente se considera que el cáncer de ovario es un conjunto de neoplasias con una gran variabilidad biológica, histológica y clínica. A este hecho se suma que aún hoy su etiopatogenia no está del todo clara. Durante muchos años, se ha mantenido la teoría de que el origen del cáncer de ovario se producía por la metaplasia y posterior malignización del epitelio celómico que recubre la superficie ovárica. Posteriormente, se estableció una hipótesis alternativa que contemplaba que el paso por el proceso metaplásico podría no ser necesario, al haberse identificado la presencia de un

remanente de epitelio mülleriano en la zona de transición entre la trompa y el ovario [14].

Sin embargo, en los últimos años, se ha planteado que quizás no exista un único origen para todos los tumores de ovario, pudiendo derivar cada subtipo de diferentes precursores (epitelio ovárico, trompa de Falopio o endometrio). Los últimos avances al respecto, realizados en base al estudio de las piezas quirúrgicas de cirugías profilácticas en pacientes portadoras de mutaciones de *BRCA*, orientan hacia la presencia de un nicho de células precursoras (*stem cells*) en la zona de transición trompa-ovario, que originarían estos tumores. Este hecho explicaría por qué el cáncer de ovario muestra una histología y un patrón secretor similar al carcinoma de trompa o al de endometrio [15].

2. Subtipos, historia natural y estadificación

2.1. Subtipos histológicos

La última actualización de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) tiene en cuenta la heterogeneidad de esta neoplasia y sugiere un posible origen del carcinoma seroso de alto grado en la trompa de Falopio [16].

En los últimos años, con el objetivo de unir la patogénesis del cáncer de ovario con la histología y las alteraciones moleculares, se ha propuesto el llamado modelo dual, que diferencia dos subtipos (denominados I y II) dentro de esta neoplasia, atendiendo a las características clínicas, moleculares y a las diferentes vías de carcinogénesis [17]:

- Tipo I: Incluye los tumores seroso y endometriode de bajo grado, células claras, y mucinoso. Para explicar su origen se ha postulado que derivan de lesiones precursoras, de evolución lenta, por lo que en el momento del

diagnóstico suelen estar confinados al ovario. Se consideran genéticamente estables, caracterizándose a nivel molecular por presentar una activación constitutiva en la vía de *MAPK* y, por lo tanto, son frecuentes las alteraciones en genes como *KRAS* o *BRAF*, entre otros.

- Tipo II: Incluye el carcinoma seroso y endometriode de alto grado, así como el indiferenciado. Se caracterizan por ser tumores *de novo*, sin una clara lesión precursora, y de rápido crecimiento. Se relacionan con alteraciones a nivel de *TP53* en más de un 90% de los casos, inestabilidad genómica y, con cierta frecuencia, mutaciones en los genes *BRCA*.

A continuación, se detallan las características más importantes de los principales subtipos histológicos, y en la Tabla 1 se concretan las alteraciones moleculares de los mismos.

Carcinoma seroso

Tradicionalmente era clasificado en tres grados, pero según la última clasificación de la OMS se ha simplificado en carcinoma seroso de alto grado (*High Grade Serous Ovarian Carcinoma*, HGSOC) y carcinoma seroso de bajo grado (*Low Grade Serous Ovarian Carcinoma*, LGSOC), considerándose que ambas entidades son dos neoplasias diferentes, con una base molecular distinta, y, por tanto, con claras implicaciones en el desarrollo actual de las terapias dirigidas para cada una de ellas [18].

- *Carcinoma seroso de alto grado*: Es la entidad más frecuente, representando del 70% al 80% de los casos de cáncer de ovario. La clave para su diagnóstico es la identificación de atipia celular y el alto índice mitótico de las células que lo componen. Desde el punto de vista inmunohistoquímico (IHQ) destaca la

expresión aberrante de p53, y la sobre-expresión de WT-1 y del receptor de estrógenos (RE) [19-21].

- *Carcinoma seroso de bajo grado*: Esta entidad representa menos del 5% de los carcinomas de ovario [22]. Comparte con el HGSOE la sobre-expresión de WT-1, pero no la expresión aberrante de p53 [23, 24].

Otros

- *Carcinoma endometriode*: Es la segunda entidad más frecuente, representando en torno a un 10% de los casos [25]. Se puede asociar con endometriosis y hasta en un 15-20% de las pacientes puede presentarse de forma sincrónica con un carcinoma de endometrio de subtipo endometriode. Mientras que el carcinoma endometriode de alto grado presenta un perfil inmunohistoquímico similar al HGSOE, el de bajo grado no suele sobre-expresar WT-1, pero sí RE y receptor de progesterona (RP) con frecuencia [26].
- *Carcinoma de células claras*: Representa menos del 10% de los casos de cáncer de ovario, y se correlaciona con un peor pronóstico debido a su menor sensibilidad al platino. Desde el punto de vista IHQ se diferencia de los demás por la expresión de Napsina A [27].
- *Carcinoma mucinoso*: Entidad poco frecuente (menos del 5% del total) que se caracteriza por permanecer más tiempo confinado en el ovario que el resto de los subtipos, siendo diagnosticados la gran mayoría en estadio I [28]. Estos tumores suelen ser negativos para RE, RP y WT-1, y en cambio expresan proteínas típicas de patología gastrointestinal como CK20 y CDX2 [29].

Tabla 1. Subtipos histológicos de cáncer de ovario, con las alteraciones moleculares correspondientes.

Cáncer de ovario tipo I	Alteración molecular
Carcinoma seroso de bajo grado	Mutaciones en <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> o ambos (>60%)
Carcinoma endometriode de bajo grado	Mutación en <i>PTEN</i> (20%) Mutación en <i>CTNBI</i> (16-55%) Mutación en <i>PI3KA</i> (20%) Inestabilidad de microsatélites (>20%) Mutación en <i>KRAS</i> y <i>BRAF</i> (<7%)
Carcinoma de células claras	Mutación en <i>KRAS</i> (5-16%) Mutación en <i>PTEN</i> (30%) Inestabilidad de microsatélites (13-50%) Mutación en <i>PIK3CA</i> (33%)
Carcinoma mucinoso	Mutación en <i>KRAS</i> (>60%)
Cáncer de ovario tipo II	Alteración molecular
Carcinoma seroso de alto grado	Mutación en <i>TP53</i> (>95%) Alteraciones en <i>BRCA</i> (>20%) Mutación en <i>PI3KA</i> y <i>PTEN</i> (<10%) Inactivación de p16 (15%)
Carcinoma endometriode alto grado	Mutación en <i>TP53</i> (>90%)
Carcinoma indiferenciado	Mutación de <i>TP53</i> (90%)

2.2. Historia natural, diagnóstico y estadificación

Tras el periodo de crecimiento intraovárico, el cáncer de ovario se puede diseminar por tres vías diferentes: mediante extensión directa a través de una siembra peritoneal, por vía linfática y/o por vía hematogena. La siembra peritoneal es la más frecuente, y ocurre debido a que las células neoplásicas con frecuencia se desprenden

del tumor primario y se implantan en el peritoneo, epiplon y superficies serosas viscerales. La vía linfática es la segunda en frecuencia, con un drenaje principal a los ganglios pélvicos y retroperitoneales. Por último, a diferencia de otros tumores sólidos, la diseminación hematógena ocurre sólo excepcionalmente, observándose en algunos casos metástasis hepáticas, pulmonares, óseas e incluso cerebrales [3].

En las fases iniciales de su desarrollo, el cáncer de ovario puede no ocasionar ninguna sintomatología, o bien puede ser muy vaga e inespecífica, como anorexia, astenia o molestias abdominales intermitentes. Por ello, la mayoría de las pacientes se diagnostican con el tumor en fases avanzadas, una vez diseminado por vía linfática o peritoneal, siendo en estos casos muy frecuente la existencia de ascitis o derrame pleural.

En el estudio diagnóstico de un cáncer de ovario la primera prueba de imagen que suele realizarse es una ecografía transvaginal, y ante los hallazgos ecográficos de sospecha, se completa el estudio radiológico con una tomografía computerizada (TC) toraco-abdomino-pélvica. Desde el punto de vista analítico, se observa hasta en un 80% de los casos una elevación de los niveles séricos de la proteína Ca125, que si bien no es un marcador tumoral específico, ya que se puede elevar en otras patologías y procesos fisiológicos, sí se relaciona con el subtipo histológico (más elevado en serosos y menos en mucinosos), con el estadio, y con la evolución tumoral. La confirmación histológica se realiza mediante biopsia intraoperatoria (habitualmente anexectomía), tras la que se completa la cirugía de estadificación o citorreducción.

El sistema de estadificación más utilizado es el de la *Fédération Internationale de Gynecologie et d'Obstétrique* (FIGO) (Tabla 2) [30].

Tabla 2. Estadificación FIGO del carcinoma de ovario.

<p>Estadio I: Limitado al ovario.</p>
<ul style="list-style-type: none"> - IA: Tumor limitado a un ovario; cápsula intacta, ausencia de tumor en la superficie ovárica; ausencia de células malignas en la ascitis o en los lavados peritoneales. - IB: Tumor limitado a ambos ovarios; cápsulas intactas, ausencia de tumor en la superficie ovárica; ausencia de células malignas en la ascitis o en los lavados peritoneales. - IC: Tumor limitado a uno o ambos ovarios con una de las siguientes afectaciones: <ul style="list-style-type: none"> o IC1 : cápsula rota. o IC2: tumor en la superficie ovárica o IC3: presencia de células malignas en la ascitis o en los lavados peritoneales.
<p>Estadio II: Afectación de uno o ambos ovarios o de las trompas de Falopio con extensión pélvica.</p>
<ul style="list-style-type: none"> - IIA: Extensión y/o implantes en los ovarios, y/o útero y/o trompas de Falopio. - IIB: Extensión a otros tejidos pélvicos.
<p>Estadio III: Afectación de uno o ambos ovarios con metástasis peritoneales confirmadas microscópicamente fuera de la pelvis y/o metástasis ganglionares regionales.</p>
<ul style="list-style-type: none"> - IIIA: Ganglios retroperitoneales positivos y/o metástasis microscópica peritoneal fuera de la pelvis (no tumor macroscópico). <ul style="list-style-type: none"> o IIIA1: Ganglios retroperitoneales positivos (comprobado por citología o por biopsia positiva). <ul style="list-style-type: none"> ▪ IIIA1(i): Metástasis igual o menor de 10 mm en su diámetro mayor. ▪ IIIA1(ii): Metástasis mayor de 10 mm en su diámetro mayor o IIIA2: Metástasis microscópica extrapélvica con o sin afectación de los ganglios retroperitoneales . - IIIB: Metástasis macroscópica peritoneal fuera de la pelvis de un tamaño igual o menor a 2 cm, con o sin afectación de los retroperitoneales. - IIIC: Metástasis macroscópica peritoneal fuera de la pelvis de un tamaño mayor de 2 cm (incluye la afectación de la capsula hepática o del bazo, sin afectación del parénquima), con o sin afectación de los ganglios retroperitoneales
<p>Estadio IV: Afecta a uno o ambos ovarios con metástasis a distancia (excluidas las metástasis peritoneales). Si hay derrame pleural, se considerará estadio IV si hay citología positiva para células malignas.</p>
<ul style="list-style-type: none"> - IVA: Derrame pleural con citología positiva. - IVB: Extensión a otros órganos (hígado, bazo,...), adenopatías inguinales o supradiaphragmáticas

3. Tratamiento del cáncer de ovario avanzado

Desde hace años, el tratamiento inicial del cáncer de ovario avanzado se basa en dos pilares fundamentales: tratamiento quirúrgico citorreductor y tratamiento sistémico basado en sales de platino. En este apartado, se analizan los principales conceptos relacionados con la cirugía citorreductora, así como las diversas modalidades de tratamiento sistémico inicial. También se comentarán brevemente los aspectos más importantes del tratamiento de la recaída.

3.1. Cirugía

La cirugía del cáncer de ovario avanzado debe tener como objetivo conseguir la citorreducción completa del tumor, sinónimo actual de citorreducción óptima. Clásicamente, la citorreducción óptima había sido definida como la cirugía que conseguía eliminar todo el tumor o dejar enfermedad residual (ER) menor de 1 cm, mientras que se consideraba cirugía subóptima a aquella en la que persistía enfermedad residual mayor de 1 cm. Este concepto ha variado en los últimos años, desde que en la Conferencia de Consenso del *Gynecologic Cancer InterGroup* (GCIG) de 2010 se redefiniera la citorreducción óptima y subóptima como la ausencia o presencia, respectivamente, de ER macroscópica, independientemente del tamaño de la misma.

Como se explicará más adelante, la ER postquirúrgica tiene implicaciones pronósticas importantes para las pacientes. Debido a la complejidad de la cirugía del cáncer de ovario y a la importancia de conseguir una citorreducción completa, este tipo de procedimientos deberían ser siempre realizados por equipos expertos. De hecho, existen estudios que demuestran cómo la especialización del cirujano influye significativamente en la supervivencia de las enfermas [31].

Según el momento en el que se realiza la cirugía, el procedimiento quirúrgico se denomina citorreducción primaria, cuando se plantea como tratamiento inicial de la enfermedad, o cirugía de intervalo, cuando se realiza tras una quimioterapia neoadyuvante.

Citorreducción primaria

Es el procedimiento quirúrgico de elección recomendado por los principales expertos, salvo que la extensión de la enfermedad haga prever que la citorreducción completa no será posible, o que el mal estado general de la enferma contraindique una cirugía agresiva. En diversos ensayos clínicos sólo se incluyeron enfermas con citorreducción primaria, por lo que las opciones de tratamiento sistémico tras la misma están mejor estudiadas que cuando se realiza una quimioterapia neoadyuvante y posterior cirugía de intervalo.

Cirugía de intervalo

En las situaciones clínicas que contraindican una cirugía de inicio, se opta por iniciar un tratamiento sistémico con intención neoadyuvante y plantear el procedimiento quirúrgico tras tres ciclos, nuevamente con el objetivo de conseguir una citorreducción completa. Actualmente sigue siendo controvertido si los resultados a largo plazo de una cirugía de intervalo pueden considerarse similares a los de una cirugía de inicio. A pesar de que hay ensayos randomizados que han mostrado que la supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) de ambos procedimientos quirúrgicos podrían ser similares, diversas críticas a estos ensayos y los resultados de otros estudios ponen en duda esta cuestión e indican que la citorreducción completa tras una cirugía de inicio podría asociarse a una mejor SG que cuando se consigue tras una cirugía de intervalo [32]. Por ello, en la mayoría de centros expertos en cáncer de ovario sólo se

plantea una quimioterapia neoadyuvante en las siguientes circunstancias: metástasis viscerales extensas en hígado y pulmón, masas tumorales voluminosas en raíz de mesenterio, que afectan a la arteria mesentérica superior, gran afectación intestinal (que obligaría a una extensa resección, provocando un síndrome de intestino corto), la presencia de conglomerados adenopáticos retroperitoneales voluminosos por encima de los vasos renales, nódulos diafragmáticos voluminosos, con penetración en el tórax y por último, pacientes con mal estado general y/o con patología asociada severa.

3.2. Tratamiento sistémico de primera línea

Quimioterapia

Desde hace casi dos décadas, el tratamiento sistémico estándar de primera línea en el cáncer de ovario avanzado debe incluir una combinación de sales de platino y taxano. Inicialmente, se utilizó el esquema cisplatino-paclitaxel intravenoso, tras demostrarse su superioridad frente a la combinación cisplatino-ciclofosfamida [33]. Posteriormente, se observó que el esquema carboplatino-paclitaxel tenía una eficacia similar a cisplatino-paclitaxel, pero con una menor toxicidad, por lo que pasó a considerarse el tratamiento estándar [34]. Más recientemente, un estudio del grupo japonés de cáncer ginecológico mostró que la administración de paclitaxel en pauta semanal mejoraba la SLP y SG frente a la clásica administración trisemanal [35]. Sin embargo, otros estudios posteriores realizados en población caucásica no han podido confirmarlo, por lo que la administración trisemanal sigue siendo la más utilizada [36, 37].

Otra modalidad de tratamiento ampliamente estudiada ha sido la administración de quimioterapia por vía intraperitoneal, con la justificación de que el cisplatino y el paclitaxel difunden desde la cavidad peritoneal hasta el tumor, con una capacidad de

penetración baja (1-3 mm), pero consiguiéndose concentraciones del fármaco a nivel peritoneal muy superiores que tras una administración intravenosa. Los resultados de tres ensayos fase III y un meta-análisis han demostrado un claro beneficio en SLP y SG (Tabla 3), aunque a expensas de una mayor toxicidad. Por ello, podría ser una opción para pacientes seleccionadas, con buen estado general, sin comorbilidad importante, y con enfermedad en estadio III sin ER mayor de 1 cm [38-40].

Tabla 3. Ensayos clínicos con quimioterapia intraperitoneal en primera línea en cáncer de ovario estadio III con ausencia de ER > de 1 cm.

Estudio	Comparación	N	Mediana de SLP (meses)	Mediana de SG (meses)
INT-0051	C ₆₀₀ IV - Cis ₁₀₀ IV	331	ND	41
	C ₆₀₀ IV - Cis ₁₀₀ IP	323		49*
GOG-114	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 *	63,2*
GOG-172	P ₁₃₅ IV - Cis ₇₅ IV	215	18,3	49,7
	P ₁₃₅ IV - Cis ₁₀₀ IP - P ₆₀ IP	214	23,8 *	65,6*

C: ciclofosfamida. Cis: cisplatino. Cis_{50, 75 o 100}: cisplatino 50, 75 o 100 mg/m². P: paclitaxel. Cb: carboplatino. IP: intraperitoneal. ND (no disponible). * : p < 0,05.

Tratamiento antiangiogénico

En los últimos años se han desarrollado diferentes fármacos dirigidos a la inhibición de la angiogénesis, proceso que tiene un papel fundamental en el desarrollo del cáncer de ovario, como veremos en detalle en un apartado posterior [41, 42]. De todas las terapias estudiadas, la única aprobada en la actualidad es bevacizumab, anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que impide la unión a su receptor y con ello el inicio de la cascada pro-angiogénica.

La eficacia de bevacizumab como tratamiento en primera línea en combinación con la quimioterapia estándar fue analizada en dos estudios fase III, GOG 218 e ICON 7, que se resumen en la Tabla 4 [43-45]. El ensayo GOG 218 es un estudio de tres brazos que evaluó la adición de bevacizumab al régimen de quimioterapia estándar y su posterior mantenimiento en pacientes con cáncer de ovario avanzado con enfermedad residual tras la cirugía. Los resultados mostraron una mejoría en la SLP de forma estadísticamente significativa a favor del brazo que incorporaba bevacizumab en combinación con quimioterapia y como mantenimiento posterior. Sin embargo, no hubo diferencias en SG [45].

El ensayo ICON 7 presentó un diseño similar al anterior al evaluar el efecto de añadir bevacizumab a la quimioterapia con carboplatino más paclitaxel, incluyéndose en este caso pacientes tanto con estadios avanzados (III y IV) como iniciales (I y II). De nuevo, se observó un incremento de la SLP en la rama de combinación con bevacizumab, sin diferencias en la SG. En el subgrupo de pacientes de mal pronóstico (con estadio IV o ER > 1 cm) el beneficio en la SLP fue más importante y sí se observó un impacto estadísticamente significativo en la SG [44]. En base a estos dos estudios bevacizumab fue aprobado por la agencia europea del medicamento (EMA) para el tratamiento del cáncer de ovario avanzado, en combinación con la quimioterapia estándar de primera línea, y como mantenimiento posterior durante un total de 15 meses.

En esta misma línea, otro fármaco antiangiogénico estudiado ha sido pazopanib, un inhibidor de tirosina quinasas de los distintos isotipos del VEGFR-1,2,3, PDGFR A y B, y c-KIT. Se llevó a cabo un ensayo fase III, AGO-OVAR 16, que se centró únicamente en evaluar la estrategia de mantenimiento tras el tratamiento estándar,

observándose de nuevo un beneficio en la SLP. Sin embargo, debido a la ausencia de beneficio en SG y a que la toxicidad fue mayor que en los estudios de bevacizumab, el laboratorio promotor rechazó intentar registrar el fármaco [46].

Nintedanib es un triple inhibidor que bloquea VEGFR-1,2,3, PDGFR α y β , y FGFR-1,2,3. Ha sido también estudiado como terapia de mantenimiento tras el tratamiento estándar de primera línea, con una muy discreta mejoría de la SLP y sin diferencias en la SG [47].

Tabla 4. Resumen de los resultados de los ensayos fase III realizados con antiangiogénicos en primera línea.

Estudio	Comparación	Mediana de SLP (meses)	Mediana de SG (meses)
GOG 128	Cb-P	13,1	39,3
	Cb-P-Beva	13,2	38,7
	Cb-P→ Beva	19,1	39,7
ICON-7	Cb-P	17,4	49,7
	Cb-P→ Beva	19,8	48,4
AGOVAR 16	Placebo	12	ND
	Pazopanib	18*	ND
AGOVAR 12	Placebo	16,6	ND
	Nintedanib	17,2	ND

Cb : Carboplatino. P: Paclitaxel. Beva : Bevacizumab. ND : No disponible. *p<0,05

3.3. Tratamiento de la recaída

A pesar del tratamiento quirúrgico y sistémico, el 75% de las pacientes con tumores en estadio III y el 95% de las pacientes con tumores en estadio IV sufrirán una recaída, en la que habitualmente no será posible la curación. En esta situación, el principal factor pronóstico y predictivo de respuesta es el intervalo de tiempo

transcurrido desde la última dosis de platino hasta la recaída (intervalo libre de platino, ILP), y en función del mismo durante mucho tiempo se ha clasificado la recaída de la siguiente manera:

- ILP menor de 6 meses, tradicionalmente llamada recaída “platino-resistente”.
- ILP mayor de 6 meses, llamada recaída “platino-sensible”, dentro de la cual se ha considerado otro subgrupo con un ILP entre 6 y 12 meses (que ha sido llamado “parcialmente sensible a platino”).

En la actualidad, estas definiciones están siendo cuestionadas y, de hecho, en la reciente Conferencia de Consenso del GCIG de 2015 ya no se contemplan, aunque aún siguen vigentes en diversos ensayos clínicos y publicaciones recientes [48].

En la recaída del cáncer de ovario el tratamiento estándar es la administración de quimioterapia, seleccionándose el esquema de tratamiento en función del ILP, así como de las características de la enferma, del tumor y de los tratamientos previos recibidos. En la recaída “platino-resistente” no se suele contemplar la opción quirúrgica, pero en la recaída “platino-sensible” sí se valora la citorreducción secundaria en pacientes seleccionadas, habiendo demostrado en una reciente comunicación un incremento significativo de la SLP [49].

En la recaída “platino-sensible” la recomendación general es reutilizar esquemas basados en platino, aunque cuando el ILP se sitúa entre 6 y 12 meses se pueden contemplar opciones sin platino, como la combinación de trabectedina y doxorubicina liposomal pegilada (DLP) [50, 51]. En este escenario, la poliquimioterapia con platino (combinado con paclitaxel, gemcitabina o DLP) es más eficaz que el platino en monoterapia [52-54].

La recaída que ocurre en menos de 6 meses desde el fin del tratamiento de primera línea, se asocia a un pronóstico considerablemente peor. En este contexto, la enfermedad suele ser resistente al platino, y todas las opciones de quimioterapia estudiadas (DLP, topotecan, paclitaxel semanal, gemcitabina, etc) se han asociado a una tasa de respuestas inferior a un 20%, a una mediana de tiempo hasta la progresión inferior a los 4 meses, y a una mediana de SG de aproximadamente 9 meses.

En la recaída del cáncer de ovario también han sido estudiados los fármacos antiangiogénicos. Hay tres ensayos fase III que evalúan el efecto de añadir bevacizumab a la quimioterapia y su posterior mantenimiento, dos en la recaída “platino-sensible” y el otro en la recaída “platino-resistente”. Los resultados fueron positivos en los tres, de manera que la adición de bevacizumab consiguió aumentar la SLP, pero al igual que en los estudios en primera línea, sin beneficio estadísticamente significativo en la SG [45, 55, 56].

En cuanto a otros agentes antiangiogénicos, se han realizado ensayos fase III con trebananib y cediranib, el primero en recaídas con ILP menor de 12 meses y el segundo en recaídas “platino-sensibles”. Trebananib mostró resultados positivos para SLP, pero poco relevantes clínicamente, mientras que el estudio de cediranib impactó tanto en SLP como en SG [57-59]. A modo resumen, en la Tabla 5 se muestran los ensayos randomizados realizados con fármacos antiangiogénicos en la recaída del cáncer de ovario.

Actualmente, existe un nuevo grupo de fármacos que ha suscitado un gran interés, los inhibidores de PARP, puesto que son especialmente eficaces en pacientes con cáncer de ovario asociados a mutaciones en los genes *BRCA*. Olaparib es el primer inhibidor de *PARP* aprobado para HGSOE, como terapia de mantenimiento en

pacientes con recaída “platino-sensible” y con mutación somática o germinal de *BRCA*, tras demostrar un aumento muy significativo de la SLP en dos estudios randomizados [60-62]. Más recientemente, se han comunicado los resultados de otros dos estudios fase III, en el que la terapia de mantenimiento en la recaída “platino-sensible” del HGSOC con otros inhibidores de PARP, niraparib y rucaparib, consigue también incrementar la SLP, con datos muy relevantes no sólo en pacientes con mutación en genes *BRCA*, sino también en aquellos con tumores asociados a una deficiencia de recombinación homóloga (*Homologous Recombination Deficiency: HRD*), e incluso en pacientes con tumores sin HRD, aunque con diferencias de menor magnitud [63, 64].

Tabla 5. Estudios randomizados realizados con antiangiogénicos en la recaída del cáncer de ovario.

	Mediana de SLP (meses)	HR (IC 95%)
Platino sensible		
OCEANS (Cb –G +/- Beva)	8,4 vs 12,4	0,48*
GOG213 (Cb –P +/- Beva)	10,4 vs 13,8	0,61*
ICON 6 (QT basada en platino +/- Cediranib)	8,7 vs 11,1	0,57*
Platino resistente o parcialmente sensible		
TRINOVA-1 (P semanal +/- Trebananib)	7,2 vs 5,4	0,66*
Platino resistente		
AURELIA (P semanal/ Topotecan / PLD +/- Beva)	3,4 vs 6,7	0,48*
MITO-11 (P semanal +/- Pazopanib)	3,5 vs 6,4	0,42*

Cb: Carboplatino, G: Gemcitabina, P: Paclitaxel, Beva: Bevacizumab. *p<0,05.

4. Factores pronósticos y predictivos de respuesta en la enfermedad avanzada

En primer lugar, es preciso diferenciar los conceptos de factor pronóstico y factor predictivo de respuesta. El primero de ellos se define como aquella característica clínica o biológica que se correlaciona con la SG, proporcionando información sobre la evolución de la enfermedad. Sin embargo, el factor predictivo de respuesta se define como aquel que se correlaciona con la respuesta o el beneficio que se obtiene con un tratamiento determinado, proporcionando información sobre su eficacia.

4.1. Factores clínico-patológicos y biomarcadores consolidados

Se han descrito diversos factores clínico-patológicos con valor pronóstico en el carcinoma de ovario, relacionados con el tipo de tumor (el subtipo histológico, el grado de diferenciación, etc), con la situación oncológica (el estadio tumoral, el tamaño de la ER después de una cirugía citorreductora o el valor de Ca125), o con las características del paciente (presencia o no de determinadas mutaciones germinales como *BRCA*, edad, estado general, comorbilidad...) [65]. De todos ellos, el factor pronóstico más importante en el global de las enfermas es el estadio tumoral, con una clara influencia sobre la SG a 5 años, que desciende desde el 89% en el estadio I hasta el 18% en el estadio IV [66].

A continuación nos centraremos en los factores pronósticos y predictivos de respuesta descritos en la enfermedad avanzada.

Enfermedad residual post-cirugía

Como se comentó previamente, en los estadios avanzados el principal factor pronóstico es la presencia o no de ER tras la cirugía citorreductora. En las pacientes diagnosticadas

con un estadio III, la SG a los 4 años desciende desde un 60% para las pacientes sin ER macroscópica, a un 35% cuando la ER macroscópica es menor de 1 cm, y hasta menos de un 20% cuando es mayor de 1 cm, como se muestra en la Figura 1 [67, 68]. En el estadio IV, el volumen de ER tras la cirugía también influye de forma significativa e independiente en el pronóstico. De esta manera, en distintos estudios se ha observado que si no hay ER se alcanzan medianas de SG de 64 meses, mientras que disminuye a 30 meses cuando hay ER menor de 5 cm, y a 19 meses cuando la ER es mayor de 5 cm (Figura 1) [69]. Debido a estos hallazgos, la cirugía también se plantea con frecuencia en el estadio IV, cuando existe una buena respuesta a la quimioterapia neoadyuvante y si se considera posible la citorreducción completa.

Edad

La edad es otro factor pronóstico clínico, aunque de menor importancia que la ER. Las mujeres jóvenes presentan un mejor pronóstico, en posible relación a que en pacientes de mayor edad existe una menor probabilidad de recibir un tratamiento óptimo por la mayor fragilidad, posible comorbilidad y peor estado general [70].

Factores histológicos

Como se ha comentado anteriormente, cada subtipo de cáncer de ovario presenta unas características patológicas, clínicas y moleculares determinadas, lo que condiciona una distinta respuesta al tratamiento. De forma general, se considera que el carcinoma de ovario de células claras y el carcinoma mucinoso se asocian a un peor pronóstico, relacionándose con un mayor riesgo de muerte (HR 4.14 en el caso de células claras y de 1.74 en el caso de estirpe mucinosa) en comparación con el HGSOC y en endometrioides [67, 71].

Otro factor ampliamente estudiado es el grado de diferenciación. En estadios avanzados el grado parece presentar un papel como predictor de respuesta al tratamiento, de manera que los tumores de bajo grado, aún teniendo mejor pronóstico por su lenta evolución, presentan una peor respuesta al tratamiento quimioterápico [72].

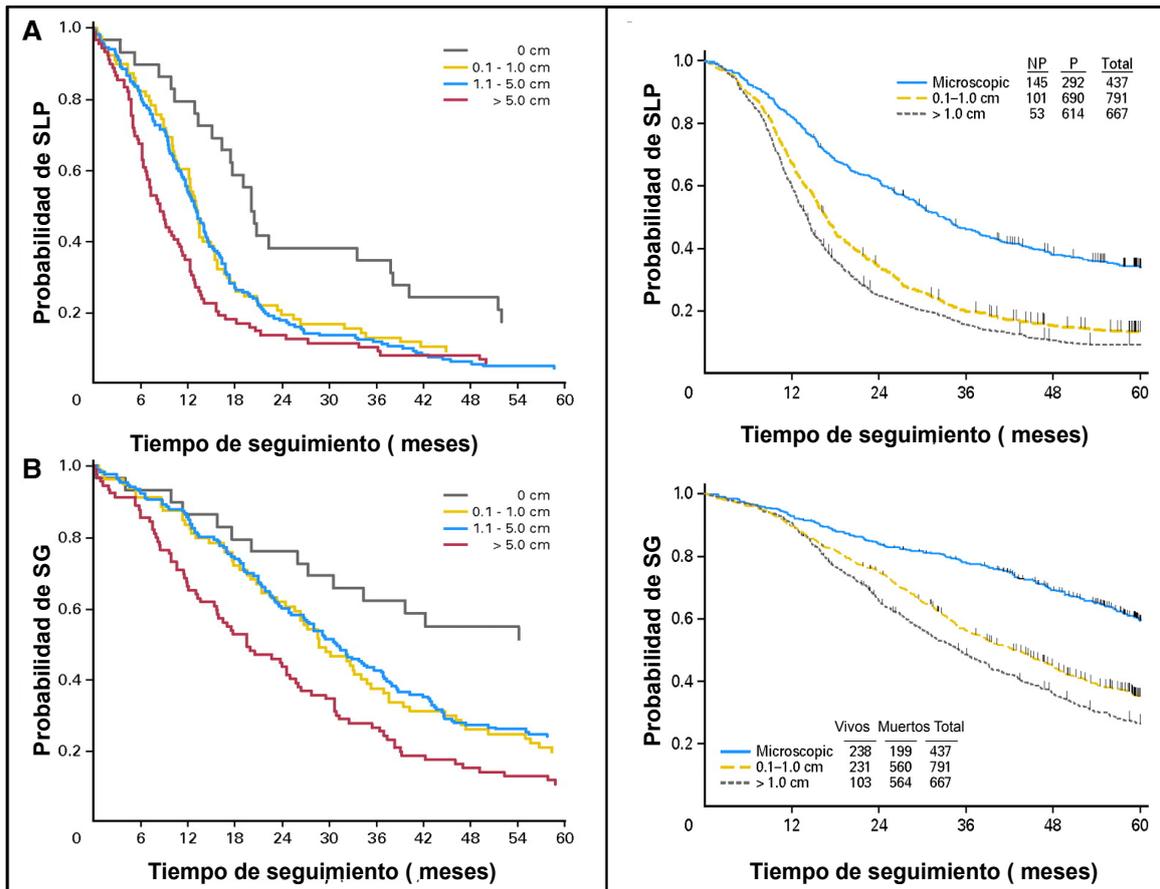


Figura 1. Curvas de SLP (A) y SG (B) en función de la enfermedad residual post-cirugía, en estadios III (derecha) y estadios IV (izquierda). Adaptado de Winter WE y cols [69].

Ca125

La determinación de Ca125 se utiliza para el diagnóstico y seguimiento del cáncer de ovario. En el momento del diagnóstico, se encuentra elevado en el 50% de los pacientes con estadio I y en más del 90% de los pacientes con enfermedad avanzada [73]. Sus niveles prequirúrgicos parecen relacionarse con la existencia de tumores

pobremente diferenciados, subtipo histológico seroso y la presencia de ascitis, aunque su valor pronóstico en esta situación no ha podido ser confirmado.

Además, la determinación de Ca125 tiene un gran valor para monitorizar la respuesta al tratamiento y determinar el riesgo de recaída. 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. Por otro lado, la normalización de los niveles de Ca125 tras finalizar la quimioterapia se relaciona con un mejor pronóstico, mientras que si permanece elevado suele indicar persistencia de enfermedad tumoral [74, 75].

Mutaciones en *BRCA*

Aproximadamente el 20% de los HGSOC se asocia a una mutación germinal o somática en uno de los genes *BRCA*. Adicionalmente, se puede producir también un silenciamiento o disfunción de estos genes por cambios epigenéticos. Todas estas alteraciones dan lugar a un fenotipo de cáncer de ovario llamado *BRCAness*, que condiciona un defecto en el sistema de reparación del ADN de recombinación homóloga (HRD). Por otro lado, actualmente se han descrito mutaciones y alteraciones moleculares en otros genes que también ocasionan HRD, de manera que según el estudio de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) aproximadamente el 50% de los HGSOC se asociarían a HRD [76].

En 1996 se publicó el primer estudio en el que se concluía que el cáncer de ovario asociado a mutaciones germinales en el gen *BRCA1* tenía un mejor pronóstico que el cáncer de ovario esporádico [77]. En un meta-análisis de 35 publicaciones sobre mutaciones en *BRCA* y pronóstico en cáncer de ovario se confirmó que las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* se asociaban a una mayor SG [78]. El mejor pronóstico de estos

tumores parece relacionado con la mayor sensibilidad al platino que confieren estas mutaciones. En el estudio de Tan y cols, la tasa de respuestas completas a la primera línea con platino casi se duplicaba en las pacientes con mutación en *BRCA* con respecto a las no mutadas (81.8% vs 43.2%) [79]. Además, recientemente se ha observado que las mutaciones en *BRCA* también podrían predecir una mayor sensibilidad a DLP y a trabectedina, además de aportar la base racional de una mayor eficacia de los inhibidores de PARP [80, 81]. Como se ha comentado previamente, la determinación de HRD ha sido también estudiada como posible biomarcador predictivo de beneficio de los inhibidores de PARP. La intención era que la determinación de HRD permitiera ampliar la selección de pacientes que pudieran beneficiarse de estos fármacos. Aunque esto fue así, la magnitud del incremento de SLP fue menor que en las pacientes con mutación en *BRCA*, y la sensibilidad de este predictor fue baja, ya que las pacientes sin HRD también se beneficiaron del inhibidor de PARP [63, 64].

En la actualidad, las mutaciones de los genes *BRCA* son el único biomarcador validado en cáncer de ovario, asociado tanto con el pronóstico como con la respuesta a platino, a inhibidores de PARP, y posiblemente a otros fármacos.

4.2. Perfiles de expresión génica

Como ya se ha explicado, el cáncer de ovario es una enfermedad muy heterogénea, con una gran variabilidad génica de un subtipo histológico a otro. Por ello, es difícil que un único biomarcador pueda ser útil en todos los subtipos, y encontrar biomarcadores específicos para cada uno de ellos, que permita el desarrollo de una medicina de precisión, es una de las prioridades en la investigación de esta neoplasia.

En este sentido, se han realizado diversos estudios de perfiles de expresión en los últimos años, con el fin de analizar los genes implicados en la carcinogénesis, caracterizar molecularmente los tumores, predecir el pronóstico y/o la respuesta a la quimioterapia, o identificar nuevas dianas terapéuticas.

En este apartado serán revisados los estudios de perfiles génicos con valor pronóstico o predictivo de respuesta en cáncer de ovario, sin olvidar que, a día de hoy, ninguno de ellos ha conseguido la suficiente validez como para ser utilizado en la toma de decisiones clínicas.

Perfiles con valor pronóstico

En los últimos años, existe un interés creciente por identificar perfiles con valor pronóstico en el cáncer de ovario, con el objetivo de poder estratificar a las pacientes en función de su SG. Sin embargo, a pesar del gran esfuerzo realizado, la mayoría de los perfiles obtenidos carecen aún de relevancia clínica, debido a la variabilidad que presentan (diferentes técnicas usadas en cada uno, falta de reproducibilidad en los modelos, falta de evaluaciones comparativas, etc). En la Tabla 6 se resumen los perfiles con valor pronóstico publicados hasta la actualidad, detallándose a continuación las tres aproximaciones más relevantes [82-93].

En 2008, se publicó el trabajo de Tothill y cols., en el que se analizaron los tumores de 285 pacientes con carcinoma de ovario, y definieron seis subtipos moleculares (C1-C6) en función de la expresión génica [87]. Los tumores de bajo potencial maligno, los carcinomas serosos de bajo grado y los tumores endometrioides se encuadraron dentro de los subtipos C3 y C6, mientras que el resto de los subtipos moleculares (C1, C2, C4 y C5) se correspondían histológicamente con el HGSOC. Los subtipos C3 y C6 compartían la baja expresión de marcadores de proliferación celular;

el subtipo C3 se caracterizaba por una sobreexpresión de los genes implicados en la vía de *KRAS* y *BRAF*, mientras que en el subtipo C6 existía una sobreexpresión de los genes relacionados con la vía de *WNT*. Los tumores C1 tenían un perfil estromal con altos niveles de desmoplasia, los tumores C2 y C4 estaban asociados con la activación de la respuesta inmune, y los tumores C5 tenían un perfil de expresión mesenquimal.

Tabla 6. Estudios publicados con perfiles génicos con un posible valor pronóstico en el cáncer de ovario.

Autor y año	Nº de pacientes	Muestra	Nº de genes
Lancaster, 2004	31	Fresco	43
Spentzos, 2004*	60	Fresco	115
Hartmann, 2005*	79	Fresco	14
Berchuck, 2005*	65	Fresco	7
Bonome, 2008*	185	Fresco	572
Tothill, 2008*	285	Fresco	4373
Yoshiara, 2009*	61	Fresco	178
Crjns, 2009*	157	Fresco	86
Jochumsen, 2009*	43	Fresco	14
Denkert, 2009	80	ND	300
Sabatier, 2011	35	Parafina	94
Verhaar, 2013*	489	Parafina	100

* perfiles con validación en una serie independiente. ND: no disponible

Posteriormente, en 2011, se publicó el estudio *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*, que llevó a cabo la más importante caracterización molecular del HGSOC realizada hasta la fecha [76]. Se analizaron casi 500 muestras, aplicando diversas técnicas de alto rendimiento, que permitieron analizar mutaciones, alteración en el

número de copias de genes somáticos, expresión de ARNm y miARN, y alteraciones epigenéticas. Se confirmó que la mutación de *TP53* es la más frecuente (presente hasta en un 96% de los casos), seguida de la mutación de *BRCA1* y *BRCA2*, tanto germinal (en un 8% y 6% respectivamente), como somática (3% cada gen). Del análisis de expresión génica se propuso una clasificación molecular en la que se diferenciaron 4 subtipos: inmunorreactivo, diferenciado, proliferativo y mesenquimal. Dichos subtipos se correlacionaron con los descritos previamente por Tothill en el HGSOC (C1, C2, C4 y C5), lo que otorga a esta clasificación molecular una mayor robustez. En la Tabla 7 se resumen las principales características de cada subtipo molecular.

Tabla 7. Clasificación molecular propuesta por TCGA para el carcinoma seroso de alto grado.

Subtipos moleculares	Características principales
Inmunorreactivo	Expresión del receptor CXCR3. Expresión de citoquinas (CXCL10 y CXCL11).
Diferenciado	Aumento de expresión de MUC16 y MUC1. Expresión de SLP1 (marcador de la trompa de Falopio).
Proliferativo	Aumento de expresión de factores de transcripción como HMGA2 y SOX11 y marcadores de proliferación como MCM2 y PCNA. Disminución de la expresión de marcadores de cáncer de ovario (MUC1 Y MUC16).
Mesenquimal	Aumento de expresión de los genes HOX. Marcadores característicos del estroma como FAP, ANGPTL2 y ANGPTL1.

En 2014 Konecny y cols. publicaron un estudio en el que analizaron la expresión génica de 174 muestras de HGSOC, mostrando la implicación pronóstica de los subtipos moleculares descritos en el TCGA. De esta manera, el subtipo inmunorreactivo

se asoció a la mejor SG, mientras que la SG más pobre correspondió a los subtipos proliferativo y el mesenquimal, como se muestra en la Figura 2 [94].

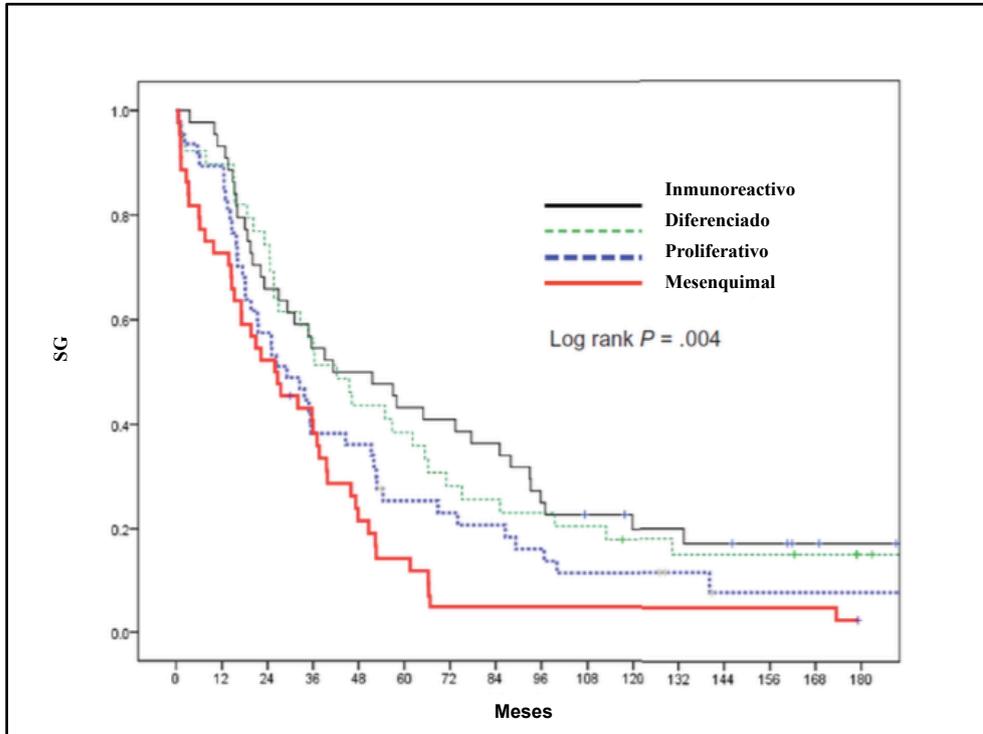


Figura 2. Supervivencia global de los subtipos moleculares del carcinoma seroso de alto grado (adaptada de Konecny y cols.) [94].

Perfiles con valor predictivo de respuesta

Los estudios publicados de perfiles moleculares asociados a la predicción de respuesta al tratamiento quimioterápico presentan una serie de problemas. Por un lado, existe una gran heterogeneidad en las series analizadas, compuestas de pacientes que no siempre han sido tratadas con el mismo esquema. Además, no en todos los estudios se utiliza el mismo método para valorar la respuesta al tratamiento: unos usan criterios radiológicos exclusivamente, mientras que otros añaden el valor del marcador Ca125. Por otro lado, la mayoría de ellos no han sido validados prospectivamente en series

independientes. En la siguiente tabla (Tabla 8) se expone un resumen de los principales estudios publicados hasta la actualidad [95-106].

Tabla 8. Resumen de los estudios publicados hasta el momento de perfiles con valor predictivo de respuesta.

Autor y año	Nº de pacientes	Criterios de respuesta	Tratamiento	Nº de genes
Selvanayagam, 2004	8	Recaída < 6 vs 6 ms	CP/CDDP-CL/CDDP-P	300
Jazaeri, 2005	60	Recaída < 6 vs >13 ms + RCP	CP/CL	9
Spentzos, 2005	24	RCP en second look	CP	93
Bernardini, 2005	79	Ca125	CP y CL	22
Bachavarov, 2006	25	Recaída < 6 vs >30 ms	CP/C-CL	43
Helleman, 2006	96	Radiológico	CP/A/CL	9
Jazaeri, 2005	45	Radiológico	CP	85
Dressman, 2007	85	Radiológico y Ca125	P/P-CL/CP	1727
Ju, 2009	13	Radiológico	CP	320
Konstantinopoulos, 2010	6	Radiológico	CP/iPARP	60
Han, 2012	322	Radiológico	CP	349
Lisowowska, 2014	72	Radiológico	CP y CL	196
Jeong, 2014	267	Ca125	CP	612

CP (Carboplatino-paclitaxel), CDDP: Cisplatino, P (Paclitaxel), CL (ciclofosfamida), A (Adriamicina), iPARP: inhibidores de PARP, RC: Respuesta completa, RCP: Respuesta completa patológica, ND : no disponible.

A continuación, se detallan aquellos estudios con una mayor relevancia en la actualidad, dado que constan de una validación.

En el año 2005, se publicó el estudio de Spentzos y cols. donde se identificó un perfil de 93 genes predictivo de respuesta patológica en pacientes tratadas con sales de platino y taxano, y que eran sometidas a una laparotomía de *second look*. En el análisis multivariante, la correlación entre el perfil predictivo y la SG fue independiente de los factores pronósticos clínicos clásicos. Este estudio tiene la peculiaridad de evaluar la respuesta desde el punto de vista patológico en la laparotomía de *second look*, lo que permite definir 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 [97].

En el año 2007, se publicó el estudio de Dressman y cols. donde se desarrolló un perfil de expresión a partir del análisis de 85 pacientes con cáncer de ovario avanzado tratadas con carboplatino y paclitaxel. 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 [101]. Sin embargo, en 2012 estos mismos autores publicaron una corrección de estos datos donde el valor predictivo se situaba en un 72.2%, lo que resta fortaleza al estudio [107].

En 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%. 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 [103].

Han y cols. utilizaron los datos de 322 pacientes incluidos en el TCGA, para obtener una firma génica de 349 genes con la finalidad de discriminar la respuesta a una primera línea de tratamiento con carboplatino-paclitaxel. Además, en este estudio

también se identificaron seis vías de señalización intracelular que regulan procesos como la proliferación y la adhesión celular y que se relacionaron de forma estadísticamente significativa con la respuesta al tratamiento quimioterápico en estos pacientes.

En el siguiente apartado se detallarán los estudios realizados con el objetivo de determinar factores predictivos de respuesta a los tratamientos antiangiogénicos.

5. Angiogénesis en cáncer de ovario

5.1. Concepto de angiogénesis y su papel en el cáncer de ovario

La angiogénesis fue inicialmente descrita por Judah Folkman en 1989, definiéndose como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir del lecho vascular preexistente [108]. 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. A través de la angiogénesis los tumores consiguen el aporte necesario de metabolitos y oxígeno, y eliminan los productos de degradación [109]. De hecho, 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, estando estrictamente regulado mediante el balance de factores proangiogénicos e inhibidores del proceso, que son secretados tanto por el tumor como por el huésped. En el grupo de activadores se incluyen ligandos de receptores tirosina quinasa, siendo el VEGF el mediador más importante, pero entre los que también destacan FGF, PDGF y EGF. Entre los

inhibidores, la mayoría son fragmentos del colágeno, como angiostatina o endostatina [110, 111]. 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 ligandos miembros en la familia VEGF y tres receptores. VEGFR-1 y VEGFR-2 son promotores de la angiogénesis mientras que la activación de VEGFR-3 promueve la linfangiogénesis [112].

En el cáncer de ovario la angiogénesis tiene un papel especialmente importante en el desarrollo tumoral, ya que se trata de un tumor altamente vascularizado. Existen diversos estudios que han mostrado la implicación de factores angiogénicos en la carcinogénesis ovárica [112-115]. El VEGF presenta una mayor expresión en lesiones ováricas malignas que en lesiones benignas, se ha asociado con la estimulación de la angiogénesis en el cáncer de ovario precoz, y varios trabajos han puesto de manifiesto que juega un papel importante en el desarrollo de la ascitis tumoral [116, 117].

5.2. Biomarcadores relacionados con la angiogénesis con posible valor pronóstico en cáncer de ovario

Debido a la importancia de la angiogénesis en el cáncer de ovario se han estudiado múltiples biomarcadores que podrían tener un valor pronóstico [117]. Los primeros estudios mostraron una correlación entre la alta densidad microvascular y la malignidad del tumor, pero mostraron resultados contradictorios en su asociación con la SLP y SG [118, 119].

El VEGF ha sido el biomarcador angiogénico más estudiado y del que disponemos en la actualidad de más datos. Los estudios de Paley y cols. publicados en 1997 mostraron que la sobre-expresión de VEGF se relacionaba con una peor SLP, hallazgo que posteriormente ha sido confirmado en más estudios [120-122]. Los niveles elevados de VEGF y la expresión de VEGFR-2 son factores pronósticos independientes

en el cáncer de ovario [123]. Por otro lado, la expresión de VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D y VEGFR-2 son también factores de mal pronóstico, asociándose a una menor supervivencia y al desarrollo de metástasis [124].

La sobre-expresión de los factores PDGF y FGF también se asocia a un peor pronóstico. A este respecto, un estudio de perfil de expresión génica desarrollado por Birrer y cols. señala que *FGF2* desempeña un papel central durante todo el proceso de carcinogénesis ovárica [125]. Otros factores relacionados con la angiogénesis como la osteopontina, mesotelina o IL-6 también se han asociado a un peor pronóstico [126-128].

En 2008 nuestro grupo publicó 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. El perfil de 34 genes fue capaz de discriminar dos grupos con diferente SLP y SG, manteniendo su valor pronóstico independiente en el análisis multivariante [129].

5.3. Biomarcadores relacionados con la angiogénesis con posible valor predictivo de respuesta en cáncer de ovario

Actualmente, a raíz de la aprobación de bevacizumab existe un interés creciente en identificar factores de predictivos de respuesta al mismo que puedan ayudar a seleccionar las pacientes candidatas a recibirlo. El primer estudio publicado al respecto se realizó sobre los datos del ensayo GOG 218, donde se analizó de forma retrospectiva la relación entre los niveles plasmáticos de CD31, VEGF-A, VEGF-R, neuropolina-1 y MET con la SG y SLP en las dos brazos del ensayo (placebo y bevacizumab). Los altos niveles de CD31 se relacionaron con un aumento de la SLP (19.9 vs 9.8 meses) y de la SG (45.6 vs 34.1 meses) dentro del brazo que recibió bevacizumab. En este mismo

grupo, la alta expresión de VEGF-A también se relacionó con un aumento de la SLP y la SG [130].

Posteriormente, se comunicaron dos estudios de biomarcadores sobre las pacientes incluidas en el ensayo ICON 7. En el primero, realizado por Winterhoff y cols., se analizaron los subtipos moleculares descritos por el TCGA, identificándose que en los subtipos “proliferativo” y “mesenquimal” se mantenía el incremento de la SLP con la adición de bevacizumab, mientras que no se observaban diferencias en los otros dos subtipos [131]. De manera similar, en el estudio realizado por Gourley y cols. se analizaron inicialmente muestras de 265 pacientes con HGSOE, identificándose un perfil que permitía dividir las muestras en tres subtipos tumorales diferentes en función de la expresión génica: angiogénico, inmune y angioinmune. Al aplicar este perfil a una cohorte de pacientes incluidas en el ensayo ICON7, encontraron que la SLP y SG de las pacientes con tumores del subtipo inmune empeoraba con la adición de bevacizumab. Sin embargo, en las enfermas con tumores del subtipo proangiogénico (incluyendo los otros dos subtipos moleculares: angiogenico y angioinmune) se mantenía el beneficio de bevacizumab en SLP[132]. Con estos resultados surge la hipótesis de que el uso de bevacizumab podría no ser beneficioso para todas las pacientes, e incluso podría ser perjudicial para algunas de ellas. No obstante, antes de poder extrapolar estos resultados a la práctica clínica deberán ser validados en series independientes.

Por tanto, se han descrito diversos perfiles génicos asociados al pronóstico o a la respuesta a quimioterapia (con o sin bevacizumab), pero ninguno de ellos es aún utilizado en la clínica. Algunos han sido validados en pequeñas series independientes, pero ninguno lo ha hecho en ensayos clínicos o en grandes series prospectivas. Hasta la fecha los más prometedores son los subtipos moleculares definidos en el TCGA, que

han sido correlacionados con el pronóstico y más recientemente con una posible predicción de respuesta a bevacizumab.

Debido a las grandes diferencias moleculares que existen entre los diferentes subtipos histológicos de cáncer de ovario, lo más razonable sería realizar estudios específicos en cada uno de ellos, como se hizo con el HGSOC en el trabajo del TCGA. En ese contexto se encuadra este trabajo, ya que postula la posibilidad de identificar biomarcadores relacionados con la angiogénesis que tengan una capacidad predictiva de una respuesta completa a la quimioterapia convencional en una serie homogénea de pacientes con HGSOC.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

El objetivo del tratamiento inicial del cáncer de ovario avanzado es la obtención de una respuesta completa tras la finalización del mismo, con la intención de conseguir la curación o, en su defecto, la supervivencia más prolongada posible. La persistencia de enfermedad tras la cirugía y la quimioterapia inicial indica una resistencia al tratamiento, y augura un mal pronóstico a las enfermas.

Existen evidencias experimentales suficientes que indican que el crecimiento y diseminación de un tumor es en gran medida dependiente de la angiogénesis. En el caso del carcinoma de ovario la promoción de la angiogénesis se asocia a una rápida recidiva y a un peor pronóstico. La posibilidad de profundizar en el conocimiento de los mecanismos de resistencia y sensibilidad al tratamiento quirúrgico y quimioterápico mediante genes relacionados con la angiogénesis podría ayudar a seleccionar las pacientes que más se beneficiarían de otros fármacos adicionales o alternativos al esquema de tratamiento más utilizado (carboplatino-paclitaxel).

La hipótesis de este trabajo es que la identificación de genes implicados en la angiogénesis puede predecir la respuesta que se consigue tras finalizar el tratamiento quirúrgico y quimioterápico con carboplatino-paclitaxel, en una serie de pacientes con HGSO. Además, el estudio simultáneo en estos tumores de la expresión de proteínas implicadas en la angiogénesis mediante inmunohistoquímica puede permitir establecer una correlación con el perfil transcripcional obtenido previamente.

2. Objetivos

Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Correlación de las variables clínicas con la respuesta radiológica completa al tratamiento multimodal (cirugía y quimioterapia con carboplatino-paclitaxel), así como

con la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global, en pacientes con HGSOC avanzado.

2. Correlación de la expresión de genes relacionados con la angiogénesis con la respuesta radiológica completa al tratamiento multimodal (cirugía y quimioterapia con carboplatino-paclitaxel), así como con la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global, en pacientes con HGOSC avanzado.

3. Identificación de un modelo génico con capacidad predictiva de respuesta completa al tratamiento descrito, y validación interna del mismo.

4. Análisis de la expresión proteica mediante inmunohistoquímica de las principales moléculas que previamente se han identificado asociadas a la respuesta al tratamiento.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

1. Pacientes y variables clínico-patológicas

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

El estudio se realizó de manera retrospectiva, identificándose 39 pacientes con el diagnóstico anatomopatológico de HGSOC avanzado que habían sido tratadas en el Hospital Universitario La Paz entre febrero de 1996 y diciembre de 2003, y que cumplían los siguientes criterios de inclusión:

- Confirmación anatomopatológica de carcinoma seroso de alto grado 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.
- Tratamiento con cirugía citorreductora y quimioterapia con carboplatino y paclitaxel durante un mínimo de 6 ciclos.
- Seguimiento clínico durante al menos 5 años desde la finalización del tratamiento.

Se recogieron las siguientes variables clínicas y anatomopatológicas:

- Edad al diagnóstico.
- Fecha de diagnóstico.
- Estadio: III vs IV
- Enfermedad residual post-cirugía: nula o menor de 1 cm vs mayor de 1 cm (siguiendo la definición de cirugía óptima/subóptima que estaba vigente cuando se recogieron los datos clínicos).

- Fecha de finalización del tratamiento con quimioterapia.
- Respuesta radiológica: la respuesta fue evaluada tras la cirugía y finalización de la quimioterapia, definiéndose “respuesta completa” y “respuesta incompleta” como la ausencia o presencia de enfermedad visible en la tomografía computerizada (TC), respectivamente. No se consideraron los criterios de respuesta bioquímica (mediante la medición del Ca125), debido a que no todas las pacientes disponían de esta determinación.
- Supervivencia libre de progresión: definida como el periodo de tiempo transcurrido entre la fecha de inicio del primer tratamiento recibido hasta la fecha de la recaída o del fallecimiento.
- Supervivencia global: definida como el periodo de tiempo transcurrido entre el inicio de la primera terapia hasta la fecha del fallecimiento.

2. Selección de genes

Se realizó una búsqueda de genes, bien que estuvieran relacionados con el proceso angiogénico y con datos que los vinculasen a la carcinogénesis ovárica, o bien que hubieran sido descritos como moduladores de la angiogénesis en distintos tipos tumorales. De esta forma, tras una extensa revisión de la literatura, se seleccionaron 82 genes que se muestran en la Tabla del Anexo 1.

Se buscó la secuencia de referencia de los genes seleccionados en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), para posteriormente buscar las sondas correspondientes mediante el software de *Applied Biosystems* (*Taqman Gene Expression Assays*). Con ellas se diseñaron tarjetas microfluídicas de

baja densidad (TLDA, *Taqman Low Density Array*) para realizar el análisis de la expresión génica.

Para la normalización de la expresión se emplearon genes de referencia (HK, *housekeeping genes*), entendidos como aquellos que *a priori* no varían su expresión de una muestra a otra, por lo que garantizan la existencia de una misma cantidad de ARNm en las distintas muestras estudiadas. Cuando se emplean muestras parafinadas, es aconsejable utilizar más de un gen de referencia, para evitar artefactos por eventos como la degradación del material. En nuestro estudio, se analizó mediante el algoritmo *Genorm versión 3.4* la expresión de 14 genes HK empleados con frecuencia en los análisis de expresión génica (*ACTB, B2M, GAPDH, GUSB, 18S, HMBS, HPRT1, IPO8, PGK1, PPIA, RPLP0, TBP, TFRC* y *UBC*). Mediante este programa podemos evaluar, por un lado, la estabilidad en la expresión de los genes seleccionados y, por otro, el número idóneo de ellos que debemos utilizar [133]. Con este método se identificaron cinco genes (*18S, ACTB, B2M, GAPDH* y *GUSB*) cuya combinación resultó la más apropiada para normalizar los resultados. Los nueve genes HK restantes fueron excluidos del estudio. A partir de los cinco genes HK seleccionados se calculó un factor de normalización basado en su media geométrica, que se aplicó sobre los valores crudos de expresión de los genes analizados. Este valor de expresión normalizado fue el que se empleó para los estudios posteriores.

3. Procesamiento de las muestras

En todas las muestras se confirmó el diagnóstico de HGSOC por un patólogo experto. Las muestras tisulares debieron cumplir además una serie de criterios de calidad: debían estar fijadas en formol al 10%, incluidas en parafina y con más de un 80% de células tumorales. Se realizaron secciones histológicas de 4 μm de espesor que

posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina. Para el estudio molecular se obtuvieron de cuatro a ocho secciones de 4 µm de espesor. A continuación, se detalla el procesamiento de las muestras paso por paso: aislamiento de ARN total, conversión a ADNc, reacción de amplificación mediante qRT-PCR y medida de la expresión génica.

Extracción de ARN y estudio de la expresión génica

Se aisló el ARN total siguiendo el protocolo del *Masterpure RNA Purification kit* (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI, USA), específicamente diseñado para muestras parafinadas. La concentración y pureza del ARN total aislado se determinó en un *Nanodrop 1000A espectometro* (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA)(Fisher) y el material se almacenó a -80°C hasta su utilización.

Síntesis del ADNc

Posteriormente, se realizó una transcripción reversa de 1 µg de ARN total a ADNc con el sistema *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La reacción se llevó a cabo en un termociclador modelo *GeneAmp PCR System 2700* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), siguiendo el protocolo del kit 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

La expresión de los genes seleccionados en cada muestra tumoral se midió mediante qRT-PCR, en una plataforma *ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Las reacciones se llevaron a cabo utilizando el formato TLDA o *arrays* de baja densidad desarrolladas por Applied Biosystems (*TaqMan Low*

Density Arrays). Cada tarjeta fue configurada con dos muestras, con el fin de poder analizar los 14 genes de control y los 82 genes involucrados en la angiogénesis y/o cáncer de ovario. Cada uno de los puertos de la tarjeta contenía 50 μ L de *Taqman Universal PCR Master Mix* y 50 μ L del ADNc correspondiente (cantidad equivalente a 1 μ g del ARN total). 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*).

Estudio inmunohistoquímico de las muestras

Para llevar a cabo el estudio inmunohistoquímico se construyó una matriz de tejidos o *tissue microarray* (TMA), siguiendo los pasos que se detallan a continuación. En un primer momento, mediante la tinción con hematoxilina en corte completo se seleccionaron dos zonas en cada bloque de tejido. Posteriormente, por medio del *tissue arrayer* se extrajeron cilindros de tejido tumoral de 0,6mm de diámetro de cada zona marcada, que se fueron disponiendo ordenadamente en un bloque de parafina. Con este bloque, se obtuvieron secciones tisulares de 5 μ M, mediante la aplicación de un micrótopo semiautomático HM3508 (Microm). Posteriormente, dichas secciones fueron incubadas durante 60 minutos con los siguientes anticuerpos: CD34 (#ab8158), EGF (#ab10409) y MMP3 (#ab52915), seleccionados mediante el kit *Envision Plus Detection System* (Dako, Aligent technologies, Glostrup, Dinamarca). Para su lectura, se definieron dos estados para CD34 (alto y bajo) y para focal o difuso EGF y MMP3.

4. Análisis estadístico

Se diseñó una base de datos con las variables clínicas. Como variable dependiente se analizó la respuesta radiológica y como variables independientes la edad, estadio, enfermedad residual post-quirúrgica y los valores de expresión de los genes incluidos. Los datos cuantitativos se describieron como mediana (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 pruebas estadísticas se consideraron bilaterales y, como valores significativos, aquellos con $p < 0,05$.

El “modelo génico” predictor de respuesta se definió como un índice pronóstico basado en un modelo de regresión de Cox, donde se cumple que a mayor valor en el índice pronóstico, mayor riesgo de que se produzca el evento en estudio. Un modelo tiene un poder predictivo “perfecto” si se acerca a 1 y ningún poder predictivo si toma valores cercanos a 0.5. Se añadió el *Hazard Ratio* (HR) (con su IC95% y su p-valor) de cada gen como variable continua. Se definieron como “genes protectores” aquellos que se asociaban con un HR menor de uno, mientras que se consideraron “genes de riesgo” aquellos que se asociaron con un HR mayor de uno. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Para el análisis multivariante del modelo génico se probaron diferentes métodos estadísticos, eligiéndose finalmente el método de regresión penalizada de LASSO (*Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*) o también llamado regresión con L1-penalización [134-136], que era el método que obtenía un modelo asociado a una mayor precisión.

Con este método se consigue evitar la sobreestimación de los coeficientes de regresión al añadir una penalización o factor de disminución sobre la suma de los coeficientes. Este método añade una penalización Lambda o “factor de disminución” sobre la suma de los coeficientes, acercándolos a cero. De esta manera, se consigue que los coeficientes sean más estables, se reducen las varianzas, y se realiza una selección de las variables génicas que evita su colinealidad y aumenta el poder de predicción del modelo.

Considerando que todas las muestras se emplearon para generar el modelo, la precisión estimada del perfil podría estar sobreestimada. Con la intención de evitar este sesgo, se aplicó el sistema de validación interna con validación cruzada denominado *Leave-One-Out Cross Validation* (LOOCV). Este método de validación interna está basado en la generación de un *Cross Validated Pronostic Index* (CVPI) [135]. Este sistema deja fuera una observación, es decir a una paciente, y se ajusta un modelo de regresión al resto de observaciones o pacientes (es lo que se denomina “*training set*”). De esta forma, se va evaluando el modelo en cada paciente que se deja fuera y que no participa en el ajuste del mismo, repitiéndose el proceso para todas las pacientes.

La precisión del “modelo génico” fue determinada mediante las curvas tiempo-dependientes ROC (*Receiver Operating Curves*) para calcular la sensibilidad y la especificidad [137], evaluándose a diferentes tiempos de interés: 6, 12, 18 y 24 meses.

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.

Por otro lado, en un segundo tiempo se generaron curvas de *Kaplan-Meier* (KM) de SLP y SG de las variables clínicas y genes que habían mostrado una asociación significativa con la respuesta al tratamiento en los modelos multivariantes.

RESULTADOS

1. Análisis descriptivo de las variables clínicas

La Tabla 9 incluye el resumen de las características clínico-patológicas de las 39 pacientes incluidas en el estudio. La mediana de edad al diagnóstico fue de 55 años, con un rango entre 35 y 82 años. La gran mayoría de ellas debutaron con enfermedad en estadio III (82%), y aproximadamente la mitad (54%) presentaron enfermedad residual mayor de 1 cm tras la cirugía citorreductora. La respuesta completa tras el tratamiento sistémico inicial se observó en el 74% de los casos. En el momento de la recogida de datos, el 62% de las pacientes se encontraban libres de enfermedad. Con una mediana de seguimiento de 58 meses, la mediana de SLP fue de 16,9 meses (IC95%, 15-18 meses) y la mediana de SG fue de 40.5 meses (IC95%: 24-56 meses).

Tabla 9. Variables clínicas analizadas.

Características clínicas	Pacientes (%)
Estadio tumoral	
III	31 (82%)
IV	8 (18%)
Enfermedad residual post-cirugía	
Nula o ≤ 1 cm	12 (31%)
> 1 cm	21 (54%)
Desconocida	6 (15%)
Respuesta radiológica	
Respuesta completa	29 (74 %)
Ausencia de respuesta completa	10 (26%)
Recidiva	
Si	15 (38 %)
No	24 (62 %)
Exitus	
Si	25 (68%)
No	12 (32%)

2. Análisis univariante de las variables clínicas

2.1. Análisis de la respuesta al tratamiento

La enfermedad residual postquirúrgica fue la única variable clínica que mostró una asociación significativa con la respuesta completa al tratamiento (HR 18.99, IC95% (2.0-2.4, $p < 0.01$), como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Análisis univariante de variables clínicas en relación a la respuesta al tratamiento.

	HR	IC 95%	P
Enfermedad residual (<1 cm vs > 1cm)	18,99	2,01-2548,5	0,01
Estadio Estadio (IV vs III)	0,83	0,13-5,17	0,84

2.2. Análisis de la supervivencia

Se realizó un modelo de regresión de Cox con las variables clínicas y la SLP y SG de las pacientes. La enfermedad residual postquirúrgica fue la única variable que demostró significación estadística con la SG, aunque no con la SLP (Tabla 11, Figura 3).

Tabla 11. Regresión de Cox con la única variable clínica significativa.

	Mediana de SLP	HR	IC 95%	P	Mediana de SG	HR	IC 95%	P
Enfermedad residual post-Cx								
> 1 cm	15,4	1,67	13,34-17,59	0,19	30,6	5,69	25,6-35,6	0,01
≤ 1 cm	20		9,57-30,42		56		ND	

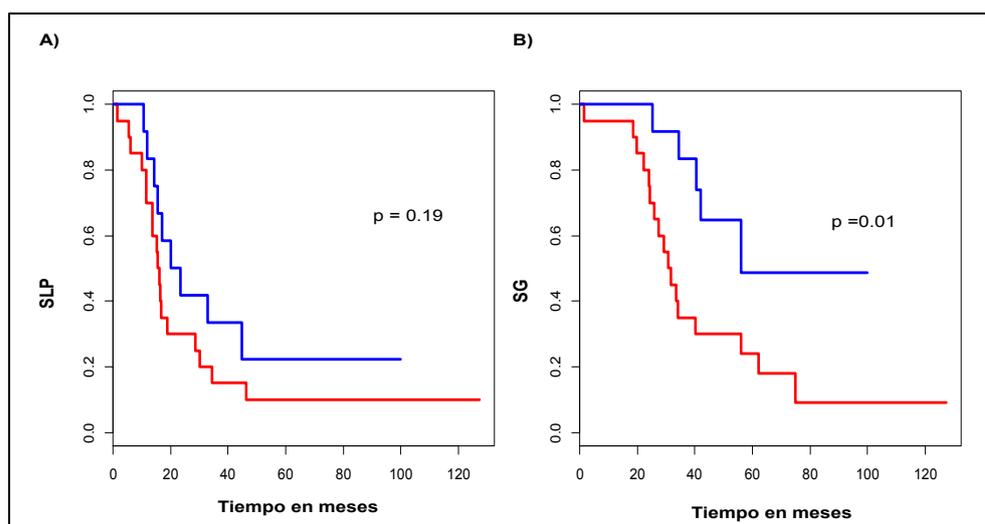


Figura 3. Modelo de regresión de Cox con las características clínicas, A) SLP y B) SG. En azul los pacientes con enfermedad residual $0 < 1$ cm y en rojo con enfermedad residual > 1 cm.

3. Análisis univariante de la expresión génica

3.1. Análisis de la respuesta al tratamiento

Se realizó un análisis univariante de la posible relación de los 82 genes incluidos en el estudio con la respuesta al tratamiento, que se recoge en el Anexo 2. La expresión de cinco de los genes analizados (*ANGPT1*, *ARNT*, *CD34*, *EGF* y *MMP3*) se asoció de forma estadísticamente significativa con la respuesta completa como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Genes asociados con la respuesta al tratamiento en el análisis univariante.

Gen	OR	IC 95%	P
<i>ANGPT1</i>	0,52	0,25-1,1	0,03
<i>ARNT</i>	0,15	0,03-0,86	0,01
<i>CD34</i>	0,64	0,33-1,27	0,02
<i>EGF</i>	0,68	0,5-0,93	0,01
<i>MMP3</i>	0,59	0,34-0,94	$<0,01$

En las curvas ROC correspondientes a este análisis, se observa un $AUC > 0.5$

(Figura 4).

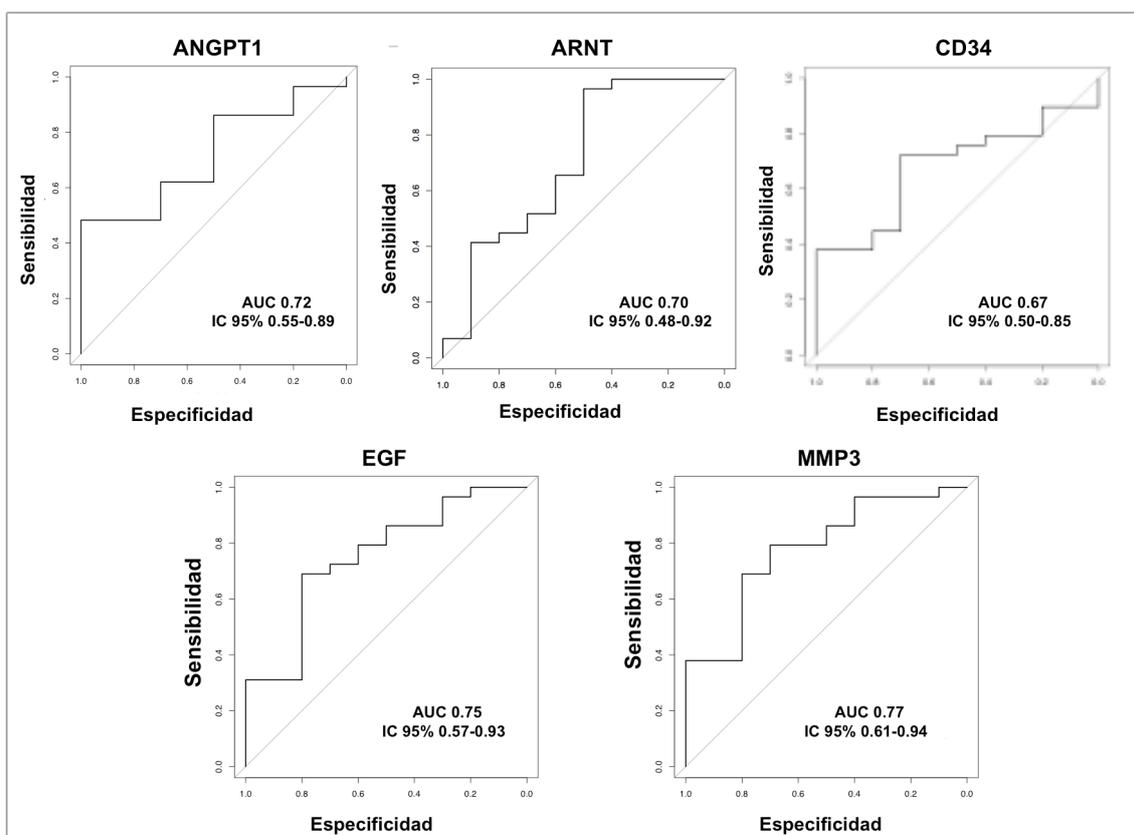


Figura 4. Curvas ROC donde se ilustra la asociación de los genes ANGPT1, ARNT, CD34, EGF, y MMP3 con la respuesta completa.

3.2. Análisis de la supervivencia

En el modelo de Cox univariante se observó una asociación entre la expresión de *ANGPT2*, *CD36*, *CD44* y *EPHB2* y la SLP. Asimismo, la expresión de *CD44*, *ANGPT1*, *CD34*, *MMP7* y *PDGFB* se asoció de manera estadísticamente significativa con la SG. En el Anexo 3 se incluye la información completa del análisis, y en la Tabla 13 los genes identificados en el modelo de Cox univariante.

Tabla 13. Genes asociados a la SLP y SG en el análisis univariante.

Supervivencia libre de progresión			
GEN	OR	IC 95%	P.Val
<i>ANGPT2</i>	0,59	0,36-0,97	0,02
<i>CD36</i>	0,66	0,45-0,97	0,03
<i>CD44</i>	0,54	0,34-0,86	<0,01
<i>EPHB2</i>	1,7	1,1-2,63	0,01
Supervivencia global			
GEN	OR	IC 95%	P.Val
<i>ANGPT1</i>	1,3	0,99-1,71	0,02
<i>MMP7</i>	1,15	0,98-1,37	0,04
<i>CD44</i>	0,51	0,3-0,85	<0,01
<i>PDGFB</i>	1,35	0,67-1,82	0,03

4. Identificación de un modelo multigénico predictor de respuesta y validación interna

Tras realizar el análisis univariante, el siguiente objetivo era obtener un modelo multigénico con capacidad predictiva de respuesta completa al tratamiento. Se testaron diversos métodos estadísticos para generar el método multigénico, descritos en el Anexo 4, optándose finalmente por el método de regresión logística con la penalización de LASSO (*least absolute shrinkage and selection operator*), ya que parecía generar el modelo de mayor precisión. Aplicando este método estadístico se estableció un modelo predictivo de respuesta con 7 genes (*AGT*, *CD34*, *EGF*, *EPOR*, *IL8*, *MMP3* y *MMP7*) (Tabla 14). De los 7 genes incluidos, 3 de ellos (*CD34*, *EGF* y *MMP3*) habían resultado también significativos en el análisis univariante previo.

Tabla 14. Genes incluidos en el modelo multigénico predictivo de respuesta al tratamiento, con su correspondiente coeficiente beta.

	AGT	CD34	EGF	EPOR	IL8	MMP3	MMP7
Coefficiente Beta	0,08	-0,24	-0,13	-0,16	0,16	-0,34	-0,008

Para intentar validar la capacidad predictiva del modelo se utilizó el AUC calculado mediante el método LOOCV. El intervalo de confianza del AUC se obtuvo mediante el análisis de permutaciones. El AUC de este modelo fue de 0,67 (IC 95% 0,47-0,88), sin alcanzar la significación estadística ($p = 0.09$, Figura 5).

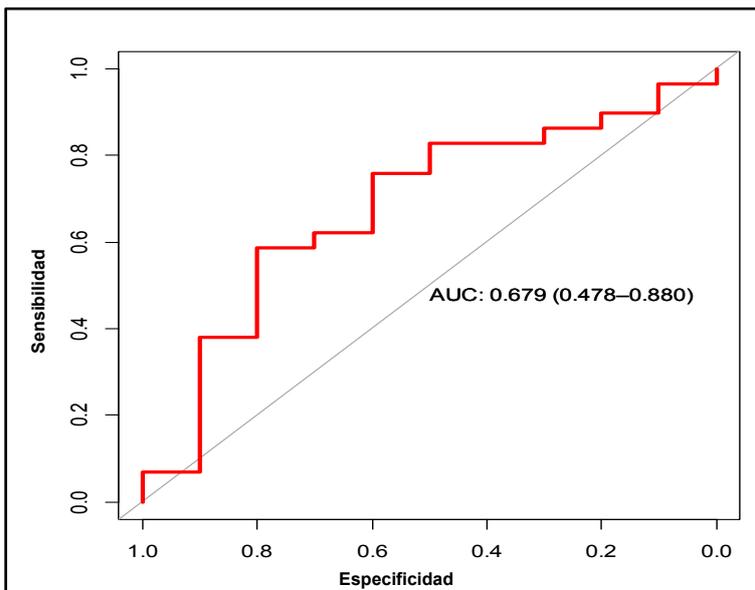


Figura 5. AUC del modelo multigénico.

Por otro lado, se realizaron las curvas KM para SLP y SG de los dos grupos identificados en el modelo multigénico (grupo de buena respuesta *versus* grupo de mala respuesta), sin encontrarse diferencias entre ambos (Figura 6).

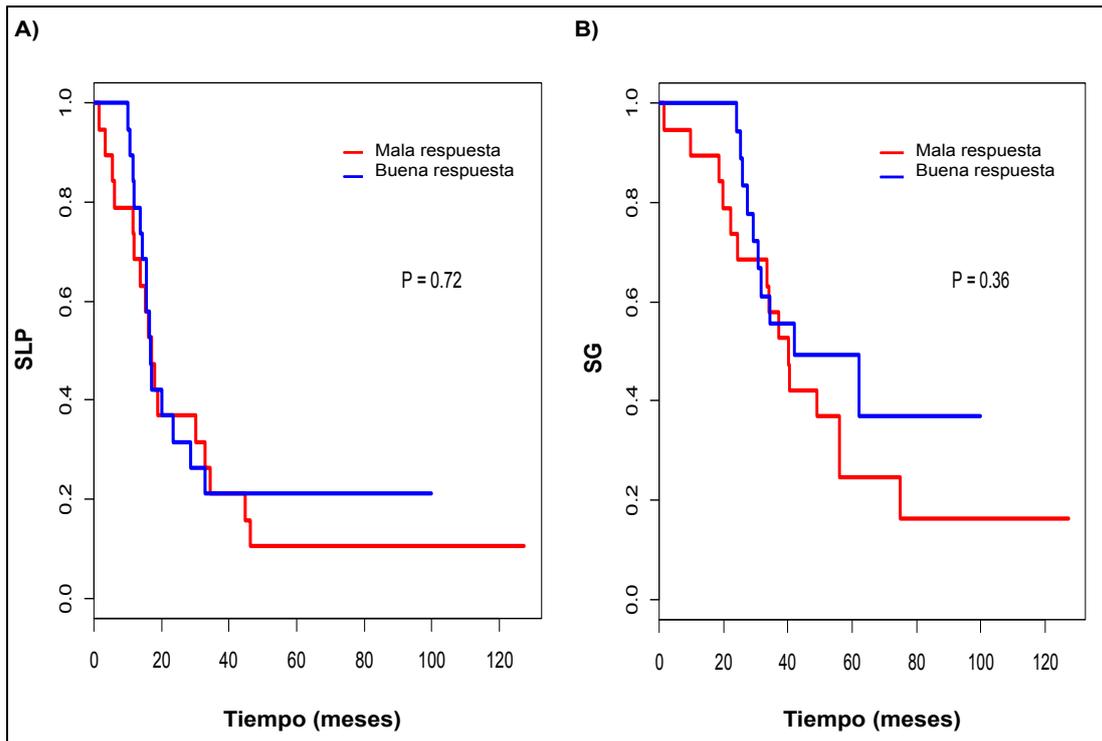


Figura 6. Curvas de Kaplan Meier para A) SLP y B) SG de los dos grupos diferenciados por el modelo multigénico. En azul se representa el grupo de buena respuesta, y en rojo el grupo de mala respuesta al tratamiento.

5. Análisis exploratorio de la expresión génica en el subgrupo de pacientes con enfermedad residual postquirúrgica > 1 cm

Debido a que todas las pacientes con enfermedad residual postquirúrgica ≤ 1 cm tuvieron una respuesta completa al tratamiento, se decidió realizar un análisis exploratorio sobre el subgrupo de pacientes con enfermedad residual > 1 cm, para evaluar si la expresión de ciertos genes podría ayudar a identificar las pacientes de este subgrupo que no iban a conseguir una respuesta completa.

5.1. Análisis de la respuesta al tratamiento.

Se realizó un análisis univariante de los 82 genes mediante regresión de Cox en relación a la respuesta completa al tratamiento, mostrándose los resultados en la tabla del Anexo 5. Los genes *AGRT2*, *ANGPT1*, *ARNT*, *AURKB*, *FLT4*, *IL8*, *KIT* y *MMP3* se

correlacionaron con la respuesta de manera estadísticamente significativa (Tabla 15 y Figura 7). De éstos, los genes *ANGPT1* y *MMP3* habían mostrado una asociación con la respuesta también en el grupo global.

Debido al número reducido de pacientes de este subgrupo no fue posible generar un modelo multigénico como se hizo en el global de los pacientes.

Tabla 15. Genes asociados con la respuesta al tratamiento en el análisis

univariante en el subgrupo de pacientes con ER >1 cm.

Gen	OR	IC 95%	P	AUC	IC 95%
AGRT2	0,40	0,16-0,99	<0,01	0,78	0,58-0,98
ANGPT1	0,31	0,10-1	0,02	0,76	0,55-0,97
ARNT	0,12	0,01-1,04	0,02	0,75	0,50-0,99
AURKB	1,94	0,82-4,58	0,03	0,70	0,45-0,93
FLT4	0,26	0,06-1,17	0,03	0,75	0,50-1
IL8	1,34	0,94-1,91	0,04	0,70	0,42-0,98
KIT	0,62	0,34-1,10	0,04	0,77	0,55-1
MMP3	0,42	0,18-0,99	0,01	0,77	0,57-0,98

5.2. Análisis de supervivencia

La expresión de los genes *AURKB*, *CD44* e *IL8* se relacionaron con un incremento de la SLP de forma estadísticamente significativa. Por otro lado, la expresión de los genes *ANGPT1*, *MMP7*, *CD44*, *PDGFB* y *CD34* se asoció a un incremento de la SG. Destacar que *CD44* se correlacionó de manera estadísticamente significativa tanto con la SLP como con la SG, al igual que ocurría en el análisis de la serie completa. Los resultados globales se adjuntan en el Anexo 6 y en la Tabla 16 se muestran los resultados que alcanzaron la significación estadística.

Tabla 16. Análisis univariante de la expresión de genes asociados a SLP y SG en el subgrupo ER>1cm.

Supervivencia libre de progresión			
GEN	OR	IC 95%	P
AURKB	0,55	0,37-0,81	<0,01
CD44	0,57	0,35-0,92	0,01
IL-8	0,87	0,74-0,98	0,04
Supervivencia global			
GEN	OR	IC 95%	P
ANGPT1	1,30	0,99-1,71	0,02
MMP7	1,15	0,98-1,37	0,04
CD44	0,51	0,30-0,85	<0,01
PDGFB	1,35	1-1,82	0,03
CD34	1,15	0,99-1,34	0,03

6. Análisis inmunohistoquímico de marcadores seleccionados

6.1. Análisis descriptivo y análisis de respuesta al tratamiento

Por último, se construyeron TMA con los casos del estudio y se realizó un análisis de inmunohistoquímica para evaluar la expresión proteica de algunos de los genes que habían resultado relevantes en los análisis de expresión génica. Se seleccionaron los que habían resultado estadísticamente significativos en el análisis univariante y que además habían formado parte del predictor multivariante: *CD34*, *EGF* y *MMP3*. La mayoría de los pacientes presentaron baja expresión de *CD34* (89%) y una expresión focal de *EGF* (79%). En el caso de *MMP3*, el 58% de los casos mostró expresión focal y el 42% expresión difusa (Figura 7).

A pesar de las diferencias de expresión, ninguno de estos marcadores proteicos se asoció de forma significativa con la respuesta al tratamiento.

Además, se realizó un análisis de supervivencia log-Rank test. En cuanto a la SLP, se identificó que la expresión difusa de *EGF* se asociaba a un peor pronóstico ($p < 0.01$), sin encontrarse un impacto sobre la SG. La expresión de las otras dos proteínas no se asoció a la SLP ni a la SG.

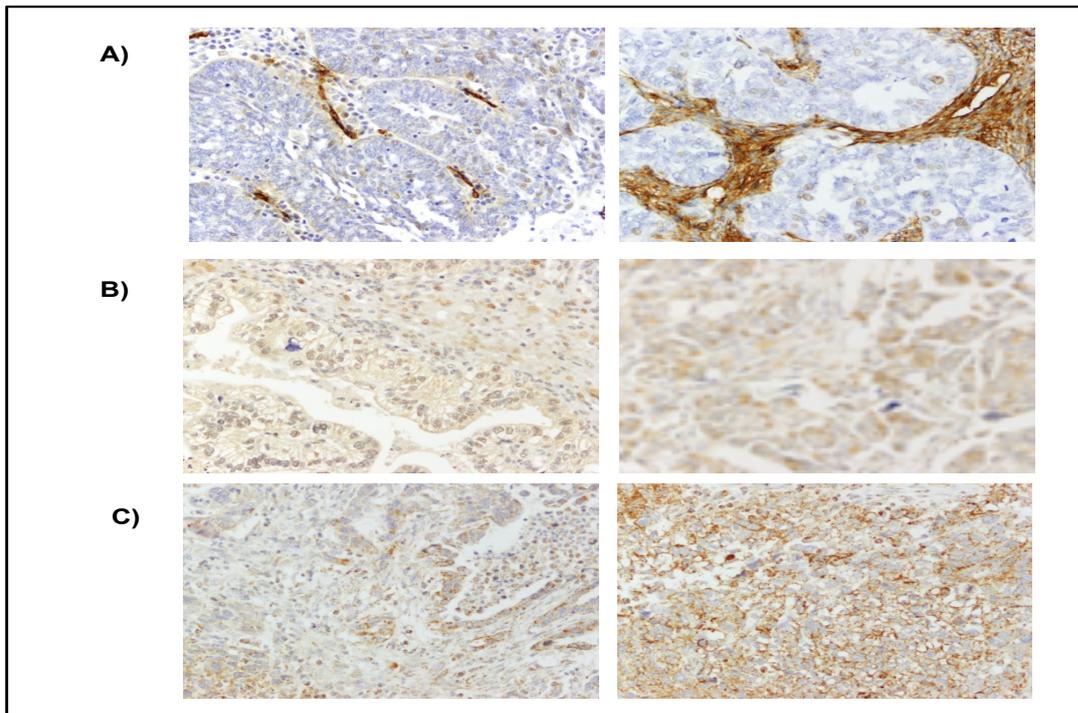


Figura 7. Tinciones de inmunohistoquímica A) CD34, B) EGF, C) MMP3.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo ha sido analizar la posible relación entre la expresión de genes relacionados con la angiogénesis, mediante la utilización de un panel de 82 genes, y la respuesta completa al tratamiento estándar en una serie de 39 pacientes con HGSO. Para ello, se realizó tanto un análisis univariante y multivariante identificándose diferentes variables (génicas y clínicas) asociadas con la respuesta al tratamiento, así como con la SLP y SG. Finalmente, se generó un perfil de expresión génica formado por 8 genes predictor de respuesta completa al tratamiento multimodal, aunque no llegó a alcanzar la significación estadística.

A lo largo de esta discusión se comentarán los aspectos metodológicos fundamentales del estudio y se analizarán algunas de sus limitaciones, para después interpretar detalladamente los resultados obtenidos. Por último, se discutirá sobre el futuro de la predicción 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. Discusión de los métodos

Los estudios de perfiles génicos precisan de un diseño riguroso y un análisis bioestadístico complejo, debido a la gran cantidad de datos que generan. La selección de la población a estudiar, el procesamiento de las muestras y la metodología empleada influyen significativamente en los resultados y en su validez. Por ello, en este tipo de estudios resulta imprescindible que exista una estrecha colaboración multidisciplinar entre clínicos, patólogos, biólogos moleculares y bioestadísticos.

1.1. Material y técnicas de biología molecular

Para la realización del análisis génico se decidió utilizar muestras parafinadas, que constituyen el estándar de conservación de tejido en centros hospitalarios, al ser

más fáciles de almacenar y permanecer estables a temperatura ambiente. Las muestras de tejido tumoral en fresco pueden tener algunas ventajas para el análisis génico, pero hace unos años, en el periodo elegido para la inclusión de pacientes, era excepcional que se almacenaran de esta manera en los hospitales por el laborioso procesamiento que precisan y el alto coste económico. Incluso hoy en día, en la mayoría de hospitales sigue sin recogerse muestras en fresco de manera rutinaria. Por ello, cualquier test molecular orientado a la práctica clínica sería deseable que se pudiera realizar en muestras parafinadas.

A pesar de ello, la mayor limitación que presentan los estudios moleculares con este tipo de muestras, es que el material aislado a partir de las mismas, suele presentar un elevado grado de degradación, intrínsecamente asociado al proceso de fijación con el formol. No obstante, el avance técnico en las últimas décadas ha supuesto la adaptación de las técnicas disponibles a su uso, y a día de hoy, salvo excepciones, no supone un gran escollo, como ejemplifican la cantidad de kits comerciales que se utilizan no sólo en la investigación, sino en la rutina diagnóstica para la determinación de biomarcadores [138-140].

La técnica empleada en este trabajo ha sido la qRT-PCR, que permite el diseño de fragmentos de amplificación con un tamaño discreto, cuya amplificación no debería verse afectada por la degradación del material de partida. Esta técnica presenta otra serie de ventajas adicionales, como son la necesidad de poca cantidad de material tumoral, y que proporciona resultados cuantitativos, precisos y fácilmente reproducibles [141, 142].

1.2. Elección de la variable principal de eficacia

En la mayoría de los estudios de biomarcadores o perfiles génicos asociados al pronóstico suele elegirse como objetivo principal las variables SG o SLP. En nuestro

estudio el objetivo era identificar un perfil predictivo de respuesta a un tratamiento, por lo que en estos casos la variable de elección como objetivo principal debe ser la “respuesta al tratamiento”. Tras concluir la primera de línea de quimioterapia, la mayoría de las pacientes consiguen una respuesta completa, siendo este parámetro un factor clave asociado a la evolución de la enferma. Por tanto, nos pareció más adecuado escoger la variable “respuesta completa” para estudiar la posible asociación de los diferentes genes y para generar el perfil génico. De esta manera, un perfil génico predictivo de respuesta, nos permitiría identificar de manera precoz las pacientes que no van a alcanzar una respuesta completa al finalizar el tratamiento, y, por tanto, aquellas que no van a tener ninguna opción de curación, y que probablemente sufrirán una progresión tumoral precoz.

La variable “respuesta al tratamiento” se utiliza como objetivo primario desde hace relativamente poco tiempo en estudios de Oncología. Los estudios de neoadyuvancia en cáncer de mama demostraron que la respuesta completa al tratamiento, medida como una respuesta completa patológica, se asociaba con mejor SG en esta clase de tumor, planteando su uso como variable subrogada de supervivencia. Sin embargo, este tema es controvertido por varias razones: no todos los tumores presentan la misma evolución y, además, con la introducción de nuevos tratamientos el patrón de respuesta puede variar. Por ejemplo, las terapias antiangiogénicas inducen estabilización de la enfermedad y no regresión como los citotóxicos clásicos, por lo que su beneficio puede ser difícil de cuantificar con este parámetro [143].

El perfil génico más importante hasta la fecha evaluado en relación a la respuesta a la quimioterapia en cáncer de ovario fue publicado por Spentzos y cols en 2005. En este estudio se identificaba la relación de la expresión de 93 genes con la

respuesta, pero también con capacidad pronóstica sobre la SG, indicando que la RC puede ser a veces un marcador subrogado de la supervivencia [97].

1.3. Análisis del método estadístico

Este trabajo parte de la expresión de 82 genes, un número moderadamente elevado para el discreto número de pacientes analizadas (39). Una de las dificultades metodológicas más importantes a la que se enfrentan los estudios de expresión génica múltiple es la desproporción que suele haber entre el tamaño muestral, habitualmente no muy grande, y las variables analizadas que, con frecuencia, sobrepasan el número de casos analizados. Esto se traduce en un problema estadístico que se conoce como sobredimensionalidad, y que puede repercutir en los resultados.

Para nuestro estudio se barajaron varios métodos estadísticos de regresión lineal múltiple, optándose finalmente por el método de regresión penalizada de LASSO, que consigue evitar la sobreestimación y aumenta el poder de predicción del modelo [134, 136, 144]. Al no ser posible realizar una validación externa prospectiva en un tiempo razonable, se decidió realizar una validación interna a través del método de validación cruzada LOOCV, como se explicó anteriormente. Este tipo de validación interna otorga una mayor robustez a un estudio de estas características, pero no se considera suficiente como para que una firma génica sea utilizada en la clínica. Para ello, es fundamental que se realice una validación externa, en una muestra independientemente, y a ser un posible dentro de un ensayo clínico, o en su defecto, al menos en un estudio prospectivo.

2. Discusión de los resultados

2.1. Características de las pacientes

Nuestra serie de pacientes presenta las características habituales del HGSOC avanzado. La mediana de edad al diagnóstico en nuestro caso es de 55 años, algo inferior a la descrita en otras series, que se sitúa alrededor de los 60 años. En cuanto al estadio tumoral, la gran mayoría de las pacientes debutaron con enfermedad en estadio III (82% de la muestra), dato que concuerda con otros estudios publicados, en los que lo más frecuente es que al diagnóstico el HGSOC presente diseminación a nivel peritoneal y/o ganglionar, mientras que el porcentaje de pacientes con estadio IV suele ser bajo [3].

En nuestra serie todas las pacientes fueron sometidas a una cirugía citorreductora, pero tras la misma hasta el 54% presentó ER mayor de 1 cm, factor claramente asociado a un peor pronóstico, como ha sido comentado. En este aspecto existe una gran variabilidad en los diferentes estudios publicados, ya que la ER es una variable totalmente ligada a la experiencia del equipo quirúrgico. Aunque la mayoría de series más modernas muestran un porcentaje de pacientes con ER mayor de 1cm inferior a la nuestra, otros grandes estudios recientes mostraron cifras similares, como el ensayo de la EORTC de Vergote y cols [32]. Hay que tener en cuenta que las pacientes incluidas en nuestro trabajo corresponden a una época en la que en España había una menor especialización de los ginecólogos dedicados a la ginecología oncológica de la que existe en la actualidad.

Un aspecto a resaltar de nuestra serie que confiere fortaleza al trabajo es la homogeneidad del tratamiento recibido, punto que fue establecido como un criterio de inclusión del mismo. Todas las pacientes habían recibido un tratamiento multimodal: cirugía citorreductora y por lo menos 6 ciclos de quimioterapia con la combinación de carboplatino-paclitaxel. Este hecho es un aspecto diferencial con otros trabajos similares

publicados en los que existe una disparidad de tratamientos empleados, incluyendo pacientes tratadas con platino en monoterapia o en combinación con ciclofosfamida. El tener una muestra homogénea con respecto al tratamiento recibido es fundamental cuando se pretende identificar un perfil génico predictivo de respuesta. El porcentaje de pacientes que presentaron una respuesta completa tras el tratamiento quirúrgico y quimioterápico (74%) fue similar al descrito en otros trabajos.

2.2. Influencia de las variables clínicas en la respuesta al tratamiento

En nuestro análisis univariante se exploró la posible relación de la RC al tratamiento, la SLP y la SG con las variables clínicas más relevantes: la presencia o no de ER y el estadio tumoral. Finalmente, la ausencia de ER se relacionó de forma estadísticamente significativa con la RC al tratamiento y con una mejor SG. Este hallazgo está en consonancia con los datos publicados de diversos estudios, donde parece claro que la presencia de tumor residual post-quirúrgico es el factor pronóstico más importante para la SG. En 1994 Hoskins y cols realizaron un estudio retrospectivo con los datos incluidos en los ensayos clínicos del *Gynecologic Oncology Group* (GOG) 52 y 97, en el que analizaron cómo influía la presencia o no de ER sobre la SLP y SG. La presencia de ER se correlacionó con una peor SLP y SG, siendo un factor pronóstico independiente [145]. En esta misma línea, Bristow y cols publicaron un meta-análisis realizado sobre 53 estudios y con una total de 6.885 pacientes, donde se demostró que existía un relación estadísticamente significativa entre la citorreducción completa y la SG. De hecho, cada incremento del 10 % en la cuantía de la citorreducción, se asoció con un aumento de la mediana de SG de un 5.5%. De esta manera, la cohorte de pacientes con un porcentaje de citorreducción igual o menor del 25% presentaba una mediana de supervivencia de 22,7 meses, mientras que la cohorte con una citorreducción máxima mayor o igual al 75% tenía una mediana de SG en torno a 33,9

meses. Estos datos reflejan la importancia del volumen tumoral post-quirúrgico y su relación con la supervivencia [31]. En los últimos años, se han publicado diversos estudios que apoyan los resultados de este meta-análisis y que en la actualidad permiten estimar la supervivencia de las pacientes según el volumen de ER. De esta manera, cuando la citorreducción ha sido macroscópicamente completa, la SG se situaría entre 46,5 y 106 meses, mientras que cuando existe ER mayor de 1 cm se estima una SG entre 12 y 28,6 meses. Si la ER es menor de 1 cm la SG mejora discretamente con respecto a si la ER es mayor de 1 cm, pero las diferencias significativas se observan cuando se compara la ausencia con la presencia de ER, independientemente del tamaño de ésta [67, 69, 146-151]. Los resultados de nuestro estudio son más favorables que los descritos en la literatura, ya que a pesar de que más de la mitad de las pacientes presentaron ER mayor de 1 cm, la mediana de SG fue de 40,5 meses, cercana a los datos descritos en otros trabajos para pacientes sin ER. En esta discrepancia podría haber influido el bajo tamaño muestral de nuestro estudio, pero también el hecho de que se trata de una cohorte con un único subtipo histológico, HGSOC, que es el más quimiosensible de todos. En la mayoría de las series descritas se incluyen otros subtipos histológicos (como el carcinoma de células claras o el carcinoma mucinoso) que se asocian a un peor pronóstico.

Por todo ello, debido a la importancia del residuo tumoral post-quirúrgico, actualmente se plantea la necesidad de que esta cirugía se lleve a cabo por un equipo experimentado, ya que de esta manera, como indican algunos estudios, se consigue una mayor tasa de resección completa (64 % vs 35%), y, por tanto, una mejor SG [31, 151-155].

En cuanto a la relación entre la citorreducción óptima y la supervivencia, existen dos teorías que indican un posible efecto beneficioso de la resección quirúrgica añadido

a la ausencia de enfermedad macroscópica residual. La primera de ellas se centra en el posible efecto quimiosensibilizante de la cirugía. Diferentes estudios han propuesto que la citorreducción inicial en el HGSOC podría mejorar la eficacia de la quimioterapia, al researse algunos posibles clones resistentes al tratamiento así como zonas que pueden ser quimiosensibles pero poco vascularizadas y que, por lo tanto, serían áreas donde no llegaría adecuadamente la quimioterapia [154, 156, 157]. La segunda teoría plantea que la citorreducción podría tener un papel sobre la regulación del sistema inmunológico, promoviendo una gran reacción inflamatoria que contribuiría a la respuesta en el cáncer de ovario. Este hecho podría explicar en parte por qué la citorreducción óptima es un parámetro independiente de supervivencia en subtipos histológicos resistentes al tratamiento sistémico [156].

En nuestro estudio no se encontró una relación estadísticamente significativa entre el estadio tumoral y la supervivencia, ni entre el estadio y la respuesta al tratamiento. Aunque el estadio tumoral es una variable relevante, existen estudios que demuestran que en la SG influye más la enfermedad residual post-cirugía que el volumen tumoral prequirúrgico [158]. De entre todos ellos, destacamos el publicado por Eisenkop y cols, donde se evaluó una serie de 408 pacientes, demostrándose que la SG no se relacionaba con el estadio tumoral pero sí con la ausencia de ER [68]. Estos datos, al igual que los de nuestro estudio, apoyarían la necesidad de realizar una cirugía de citorreducción completa en el cáncer de ovario avanzado independientemente de si se trata de un estadio III o IV.

2.3. Relevancia biológica de los genes asociados a la respuesta al tratamiento

Los 7 genes que en nuestro estudio componen el modelo predictor de respuesta completa al tratamiento son: *AGT*, *CD34*, *EGF*, *EPOR*, *IL8*, *MMP3* y *MMP7*. Tres de estos genes (*EGF*, *MMP3* y *CD34*) mostraron además relación estadísticamente

significativa con la respuesta completa en el análisis univariante. Adicionalmente, otros 2 genes (*ANGPT1* y *ARNT*) también se asociaron de manera significativa con la respuesta al tratamiento en el análisis univariante, pero no entraron a formar parte del modelo génico.

A continuación, se exponen brevemente algunas características de estos 9 genes, explicando el papel que pueden jugar bien en la progresión tumoral o bien en la respuesta o resistencia a fármacos, así como si hay estudios realizados con los mismos en el cáncer de ovario.

AGT es el precursor de la angiotensina I y se considera un inhibidor de la angiogénesis. *In vitro* ha demostrado inhibir la proliferación, la migración endotelial, y la neovascularización. Su papel antiangiogénico ha sido comprobado también en estudios *in vivo*. Al ser producido por las células gliales se ha planteado que podría intervenir en la estabilización de la barrera hematoencefálica [159, 160]. Su papel en el cáncer de ovario es desconocido.

CD34 se ha utilizado en muchos trabajos para determinar la densidad microvascular, pero su expresión no es específica de células endoteliales, ya que también se expresa en células precursoras hematopoyéticas. En el cáncer de ovario, CD34 se ha analizado en diversas publicaciones y, en algunas de ellas, se ha relacionado con una peor SLP y SG [161].

EGF es un factor de crecimiento que se une al receptor de tirosina quinasa EGFR, siendo una vía que desempeña un importante papel en la diferenciación, invasión y angiogénesis tumoral. *EGFR* se encuentra mutado en múltiples neoplasias, y cuando esto ocurre, se asocia con un fenotipo más agresivo y peor pronóstico [162]. De hecho, la activación de esta vía celular se relaciona con una mayor expresión de factores pro-angiogénicos. En el caso del cáncer de ovario, la sobreexpresión de EGFR se ha

relacionado con una resistencia a la quimioterapia y una mayor agresividad, favoreciendo la diseminación metastásica [163, 164]. A diferencia de otras neoplasias, en el HGSOC el bloqueo de esta diana no ha demostrado beneficio clínico [165].

La eritropoyetina es una glicoproteína que al unirse a su receptor, EPOR, activa una vía que promueve la diferenciación y proliferación del eritroblasto [166]. Además, inhibe la apoptosis incrementando la expresión de factores anti-apoptóticos como la proteína Bcl-2 y Bcl-x. Por ello, la activación de esta vía podría desempeñar un papel importante en el crecimiento, angiogénesis y proliferación tumoral, y ha sido estudiada principalmente en cáncer de cérvix y cáncer de cabeza y cuello [167, 168]. En el cáncer de ovario la expresión de EPOR está aumentada de forma constitutiva, relacionándose *in vitro* con una mayor agresividad tumoral y resistencia a quimioterapia [169].

IL-8 es el gen de una citoquina pro-inflamatoria sintetizada en fibroblastos, células endoteliales, células inflamatorias y células tumorales. Es un potente factor quimiotáctico de neutrófilos, regula la producción de proteínas de adhesión, amplifica la respuesta inflamatoria local y es un potente pro-angiogénico. Tras unirse a sus receptores, activa múltiples cascadas de señalización promoviendo la supervivencia celular, migración e invasión tumoral [170]. Su expresión se encuentra elevada en el cáncer de ovario y se relaciona con un peor pronóstico y supervivencia [171].

MMP3 y MMP7 forman parte de las metaloproteasas de la matriz extracelular, frecuentemente sobreexpresadas en distintas neoplasias avanzadas [172]. Estas proteínas son producidas por las células tumorales y la matriz extracelular con el objetivo de facilitar el crecimiento, la invasión y diseminación tumoral. De hecho, su sobreexpresión se relaciona con un peor pronóstico y supervivencia [173]. *MMP3* es responsable de la degradación de fibronectina, laminina, diferentes tipos de colágeno y proteoglicanos; su sobreexpresión se ha descrito en cáncer de ovario [174, 175], y se ha

relacionado con resistencia a platino [176]. En cuanto a *MMP7* distintos estudios han mostrado una expresión selectiva en neoplasias digestivas, próstata o mama, ejerciendo un papel regulador sobre la vía de VEGF [177]. En el caso de cáncer de ovario existen pocos datos, su expresión *in vitro* se ha relacionado con la vía de la leptina, promoviendo una mayor capacidad de invasión y metástasis [178].

ANGPT1 es el mediador más importante de la vía angiogénica independiente de VEGF. La sobreexpresión de *ANGPT1* ha sido investigada en varios tumores y los datos son controvertidos. Algunos estudios apuntan su relación con un mayor potencial de malignidad, y otros sugieren que *ANGPT1* podría tener un efecto antiangiogénico, al inhibir la expansión vascular en determinadas neoplasias sólidas. Este hecho parece apoyar la teoría de que un alto ratio *ANGPT2/ANGPT1* podría asociarse a un peor pronóstico [179, 180].

ARNT forma parte de una familia de factores de transcripción, intrínsecamente ligados a la angiogénesis en situación de hipoxia. Su función ha sido descrita en estudios de líneas celulares tumorales y parece centrada en la regulación de VEGF, pero no hay estudios específicos en cáncer de ovario [181, 182].

Por otro lado, encontramos una relación estadísticamente significativa de 4 genes con la SLP (*ANGPT2*, *CD36*, *CD44* y *EPHB2*) y de 5 genes (*CD44*, *ANGPT1*, *CD34*, *MMP7* y *PDGFB*) con la SG. Como puede observarse, el gen *CD34* y las familias de genes *ANGPT* y *MMP* aparecen asociados en nuestro estudio tanto a la respuesta al tratamiento como a la supervivencia, lo que podría indicar el gran peso biológico que podrían tener estos genes en el proceso angiogénico del cáncer de ovario.

Adicionalmente se decidió hacer un análisis para intentar identificar genes asociados con la respuesta completa específicamente en el subgrupo de ER mayor de 1 cm, ya que todas las pacientes que no conseguían una respuesta completa pertenecían a

este subgrupo. En el análisis univariante, los genes *AGTR2*, *ANGPT1*, *ARNT*, *AURKB*, *FLT4*, *IL-8*, *KIT* y *MMP3* se asociaron con la respuesta. Sólo dos de ellos, *ANGPT1* y *MMP3* alcanzaron la significación estadística tanto en este subgrupo como en el global de las pacientes. Este dato podría indicar la relevancia de estos dos genes en la predicción de respuesta, aunque a día de hoy desconozcamos el papel específico que pudieran desempeñar en la misma.

2.4. Limitaciones del modelo génico y comparación con otros publicados

Como se ha comentado, el objetivo final de la generación de un modelo génico era disponer de una herramienta predictiva de respuesta completa al tratamiento multimodal del HGSOE. Esto permitiría identificar las pacientes que no van a alcanzar una respuesta completa y, por tanto, asociadas a un mal pronóstico y a ninguna posibilidad de curación. Un modelo predictivo de respuesta con alta sensibilidad permitiría identificar adecuadamente a éstas pacientes, en las que sería necesario investigar tratamientos alternativos al estándar para tratar de mejorar sus resultados.

Dicho modelo no alcanzó la significación estadística, probablemente por el pequeño tamaño muestral de nuestra serie. Ésta es la principal debilidad del estudio, principalmente debido a la selección de una población muy homogénea en cuanto al subtipo histológico y al tratamiento recibido, procedente de un único centro, que limitó el tamaño muestral, y, por tanto, condicionó que fuera muy difícil generar un modelo que se correlacionara con la respuesta de manera significativa.

El problema del tamaño muestral y la sobredimensionalidad, al analizarse un gran número de genes, suele ser común a muchos de los estudios similares. De los 13 estudios de perfiles génicos predictivos de respuesta publicados, que fueron resumidos en la introducción, 5 de ellos tenían un tamaño muestral inferior al nuestro, y tan sólo 2 de ellos sobrepasaban los 100 pacientes. En la mayoría de estos estudios, al igual que en

el nuestro, se analizaron un número de genes significativamente mayor al número de pacientes incluidas, y en la mayoría de ellos la sobredimensionalidad fue muy superior a la existente en este trabajo.

Otra limitación importante de estos trabajos es que han de ser adecuadamente validados para que puedan tener una aplicación clínica. En nuestro trabajo, como se ha descrito, se realizó una validación interna, pero no fue posible llevar a cabo una validación externa en otra serie independiente. Ésta ha sido llevada a cabo en un pequeño número de los estudios descritos, y en ninguno de ellos fue realizada en series prospectivas o ensayos clínicos. Esto ha hecho que ninguno de los perfiles génicos haya conseguido implementarse en la clínica.

Cada perfil se realiza sobre una batería diferente de genes, siendo esto una posible fuente de variabilidad. Sin embargo, al revisar la composición génica de los diferentes estudios, si bien los genes difieren de un perfil a otro, las principales vías de señalización celular están representadas en muchos de ellos. En nuestro caso, centramos el perfil en una batería de genes relacionados con el proceso angiogénico debido a la importancia de esta vía en el HGSOC.

El número de genes que constituye cada perfil es otro aspecto a valorar. Un perfil que quiera aplicarse en la clínica debería estar compuesto por el menor número de genes posible, para que su determinación en un elevado número de pacientes sea lo menos costosa y más factible posible. En nuestro caso, establecimos un modelo de tan solo 7 genes, un número inferior al resto de perfiles publicados, en los a excepción de dos de ellos formados por 9 genes, todos los demás tenía un número considerablemente mayor, situándose en 6 de ellos por encima de los 100 genes.

Otra limitación ya discutida parcialmente es la selección de la variable de eficacia más adecuada para identificar perfiles predictivos de respuesta. En nuestro

estudio decidimos utilizar la respuesta completa radiológica, de la misma manera que se hizo en otros 6 de los trabajos publicados; en otros 2 la respuesta se evaluó sólo por Ca125 (según los criterios del GCIG); mientras que un solo estudio se tuvo en cuenta tanto la respuesta radiológica como la bioquímica. En uno de los estudios en los que se realizó validación externa (de Spentzos y cols) la variable fue la respuesta completa patológica identificada en la cirugía llamada de “second look”, que se realizaba hace años tras completar la quimioterapia, pero que actualmente no se contempla. Por otro lado, la consecución de una respuesta completa patológica en el cáncer de ovario, a diferencia de otras neoplasias, es excepcional. En el resto de trabajos, para la generación de los perfiles se tuvo en cuenta el intervalo de tiempo transcurrido desde la finalización de la quimioterapia y la recaída, por lo que en estos casos, más que perfiles predictivos de respuesta deberían considerarse perfiles predictivos de beneficio clínico o de recaídas precoces/tardías. El hecho de que se hayan elegido diversas variables para la generación de los perfiles hace difícil que sean comparables entre sí.

Por último, otra limitación presente en varios estudios publicados es la inclusión de pacientes tratadas con diversos esquemas de quimioterapia. Aunque en todos los casos las pacientes habían recibido algún esquema con platino, sólo algunos de los trabajos publicados se basan en series en las que todas las pacientes recibieron la misma quimioterapia (con el esquema carboplatino-paclitaxel), al igual que en el nuestro estudio.

2.5. Inmunohistoquímica

Como parte final de nuestro trabajo se evaluó la expresión de EGF, CD34 y MMP3 mediante inmunohistoquímica. Se eligieron estos candidatos para estudiar la correlación entre expresión génica y proteica y su relación con la respuesta al

tratamiento debido a que alcanzaron la significación estadística en el análisis univariante y, adicionalmente, los tres formaban parte del perfil génico generado.

En nuestra serie, no encontramos relación de la expresión de estas tres proteínas con la respuesta. Diferentes estudios indican que la correlación entre expresión génica y proteica se va a ver influida por los múltiples eventos que ocurren entre los procesos de transcripción génica y de traducción a proteína [183].

Centrándonos en los datos de la literatura en cuanto a la expresión proteica de estos marcadores, no hay prácticamente estudios sobre la expresión de EGF, si bien algún trabajo reciente apunta que no es un buen biomarcador en cáncer de ovario [164].

Ya se ha comentado el uso de CD31 y CD34 para la evaluación de la densidad microvascular, si bien el marcador más empleado, debido a su mayor especificidad, es CD31. La densidad microvascular ha sido ampliamente correlacionado con el pronóstico, incluso en respuesta a tratamiento antiangiogénico, en el ensayo GOG-0218, si bien en otro estudio reciente, no se observó correlación significativa entre la expresión de genes relacionados con el proceso angiogénico y la densidad de vasos medida con CD31 o alternativamente con CD105 [174, 184].

Por último, algunos trabajos apuntan a que niveles elevados de MMP3 en suero, correlacionan con un peor pronóstico de las pacientes [185].

Sin embargo, la expresión de las proteínas codificadas por estos genes no se ha relacionado con la respuesta al tratamiento ni con la supervivencia en otras series publicadas.

CONCLUSIONES

1. La presencia o no de tumor residual tras la cirugía es el único factor clínico que se relacionó de forma estadísticamente significativa con la respuesta completa al tratamiento multimodal en el carcinoma de ovario seroso de alto grado avanzado.
2. Tras realizar un análisis univariante de 82 genes implicados en la angiogénesis, la expresión de los genes *ANGPT1*, *ARNT*, *CD34*, *EGF* y *MMP3* se relacionó de forma estadísticamente significativa con la respuesta completa al tratamiento multimodal del carcinoma de ovario seroso de alto grado avanzado.
3. Se generó un modelo multigénico predictivo de respuesta completa al tratamiento, compuesto por 7 genes (*AGT*, *CD34*, *EGF*, *EPOR*, *IL8*, *MMP3* y *MMP7*), pero que no llegó a alcanzar la significación estadística.
4. La expresión de los genes *ANGPT2*, *CD36*, *CD44* y *EPHB2*, y de los genes *CD44*, *ANGPT1*, *CD34*, *MMP7* y *PDGFB*, se asoció con la supervivencia libre de progresión y con la supervivencia global, respectivamente, de forma estadísticamente significativa.
5. Tras el análisis de inmunohistoquímica no se consiguió identificar una asociación entre la expresión de algunas proteínas seleccionadas y la respuesta al tratamiento.
6. La posible implicación que podrían tener algunos genes involucrados en el proceso angiogénico en la respuesta al tratamiento de primera línea del carcinoma de ovario seroso de alto grado debería confirmarse en otros estudios prospectivos y con mayor tamaño muestral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin, 2013. 63(1): p. 11-30.
2. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. 136(5): p. E359-86.
3. Cannistra, S.A., *Cancer of the ovary*. N Engl J Med, 2004. 351(24): p. 2519-29.
4. Hennessy, B.T., R.L. Coleman, and M. Markman, *Ovarian cancer*. Lancet, 2009. 374(9698): p. 1371-82.
5. Ness, R.B., et al., *Infertility, fertility drugs, and ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies*. Am J Epidemiol, 2002. 155(3): p. 217-24.
6. Anderson, G.L., et al., *Effects of estrogen plus progestin on gynecologic cancers and associated diagnostic procedures: the Women's Health Initiative randomized trial*. JAMA, 2003. 290(13): p. 1739-48.
7. Zhou, B., et al., *Hormone replacement therapy and ovarian cancer risk: a meta-analysis*. Gynecol Oncol, 2008. 108(3): p. 641-51.
8. Van Gorp, T., et al., *Endometriosis and the development of malignant tumours of the pelvis. A review of literature*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004. 18(2): p. 349-71.
9. Pearce, C.L., et al., *Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies*. Lancet Oncol, 2012. 13(4): p. 385-94.
10. Chen, S. and G. Parmigiani, *Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance*. J Clin Oncol, 2007. 25(11): p. 1329-33.

11. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian, C., et al., *Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls*. Lancet, 2008. 371(9609): p. 303-14.
12. Chiaffarino, F., et al., *Hysterectomy with or without unilateral oophorectomy and risk of ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2005. 97(2): p. 318-22.
13. Harmsen, M.G., et al., *Early salpingectomy (TUbectomy) with delayed oophorectomy to improve quality of life as alternative for risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1/2 mutation carriers (TUBA study): a prospective non-randomised multicentre study*. BMC Cancer, 2015. 15: p. 593.
14. Lim, D. and E. Oliva, *Precursors and pathogenesis of ovarian carcinoma*. Pathology, 2013. 45(3): p. 229-42.
15. Dietl, J., *Revisiting the pathogenesis of ovarian cancer: the central role of the fallopian tube*. Arch Gynecol Obstet, 2014. 289(2): p. 241-6.
16. Meinhold-Heerlein, I., et al., *The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications*. Arch Gynecol Obstet, 2016. 293(4): p. 695-700.
17. Shih Ie, M. and R.J. Kurman, *Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis*. Am J Pathol, 2004. 164(5): p. 1511-8.
18. Li, J., et al., *Ovarian serous carcinoma: recent concepts on its origin and carcinogenesis*. J Hematol Oncol, 2012. 5: p. 8.
19. Kurman RJ, H.E., Ronnett B. , *Blaustein's Pathology of the female genital tract*. 6th ed. 2011, New York Springer

20. Nakayama, K., et al., *Sequence mutations and amplification of PIK3CA and AKT2 genes in purified ovarian serous neoplasms*. *Cancer Biol Ther*, 2006. 5(7): p. 779-85.
21. Hennessy, B.T., et al., *Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer*. *J Clin Oncol*, 2010. 28(22): p. 3570-6.
22. Gershenson, D.M., et al., *Clinical behavior of stage II-IV low-grade serous carcinoma of the ovary*. *Obstet Gynecol*, 2006. 108(2): p. 361-8.
23. Singer, G., et al., *Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation*. *Am J Surg Pathol*, 2005. 29(2): p. 218-24.
24. Bodurka, D.C., et al., *Reclassification of serous ovarian carcinoma by a 2-tier system: a Gynecologic Oncology Group Study*. *Cancer*, 2012. 118(12): p. 3087-94.
25. Seidman, J.D. and R.J. Kurman, *Pathology of ovarian carcinoma*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2003. 17(4): p. 909-25, vii.
26. Catusus, L., et al., *Molecular genetic alterations in endometrioid carcinomas of the ovary: similar frequency of beta-catenin abnormalities but lower rate of microsatellite instability and PTEN alterations than in uterine endometrioid carcinomas*. *Hum Pathol*, 2004. 35(11): p. 1360-8.
27. Rekhi, B., et al., *Napsin A and WT 1 are useful immunohistochemical markers for differentiating clear cell carcinoma ovary from high-grade serous carcinoma*. *APMIS*, 2018. 126(1): p. 45-55.

28. Lee, K.R. and R.E. Scully, *Mucinous tumors of the ovary: a clinicopathologic study of 196 borderline tumors (of intestinal type) and carcinomas, including an evaluation of 11 cases with 'pseudomyxoma peritonei'*. Am J Surg Pathol, 2000. 24(11): p. 1447-64.
29. Mackenzie, R., et al., *Targeted deep sequencing of mucinous ovarian tumors reveals multiple overlapping RAS-pathway activating mutations in borderline and cancerous neoplasms*. BMC Cancer, 2015. 15: p. 415.
30. Prat, J. and F.C.o.G. Oncology, *Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum*. Int J Gynaecol Obstet, 2014. 124(1): p. 1-5.
31. Bristow, R.E., et al., *Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis*. J Clin Oncol, 2002. 20(5): p. 1248-59.
32. Vergote, I., et al., *Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIc or IV ovarian cancer*. N Engl J Med, 2010. 363(10): p. 943-53.
33. McGuire, W.P., et al., *Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer*. N Engl J Med, 1996. 334(1): p. 1-6.
34. Ozols, R.F., 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(17): p. 3194-200.
35. Katsumata, N., 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 controlled trial*. Lancet, 2009. 374(9698): p. 1331-8.

36. Chan, J.K., et al., *Weekly vs. Every-3-Week Paclitaxel and Carboplatin for Ovarian Cancer*. N Engl J Med, 2016. 374(8): p. 738-48.
37. Pignata, S., et al., *Carboplatin plus paclitaxel once a week versus every 3 weeks in patients with advanced ovarian cancer (MITO-7): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2014. 15(4): p. 396-405.
38. Jaaback, K. and N. Johnson, *Intraperitoneal chemotherapy for the initial management of primary epithelial ovarian cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2006(1): p. CD005340.
39. Hess, L.M., et al., *A meta-analysis of the efficacy of intraperitoneal cisplatin for the front-line treatment of ovarian cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2007. 17(3): p. 561-70.
40. Armstrong, D.K., et al., *Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer*. N Engl J Med, 2006. 354(1): p. 34-43.
41. Markman, M., *Antiangiogenic drugs in ovarian cancer*. Expert Opin Pharmacother, 2009. 10(14): p. 2269-77.
42. Monk, B.J., L.E. Minion, and R.L. Coleman, *Anti-angiogenic agents in ovarian cancer: past, present, and future*. Ann Oncol, 2016. 27 Suppl 1: p. i33-i39.
43. Burger, R.A., et al., *Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer*. N Engl J Med, 2011. 365(26): p. 2473-83.
44. Oza, A.M., et al., *Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial*. Lancet Oncol, 2015. 16(8): p. 928-36.
45. Perren, T.J., et al., *A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer*. N Engl J Med, 2011. 365(26): p. 2484-96.

46. du Bois, A., et al., *Incorporation of pazopanib in maintenance therapy of ovarian cancer*. J Clin Oncol, 2014. 32(30): p. 3374-82.
47. du Bois, A., et al., *Standard first-line chemotherapy with or without nintedanib for advanced ovarian cancer (AGO-OVAR 12): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2016. 17(1): p. 78-89.
48. Leary, A.F., et al., *Fifth Ovarian Cancer Consensus Conference of the Gynecologic Cancer InterGroup (GCIG): clinical trial design for rare ovarian tumours*. Ann Oncol, 2017. 28(4): p. 718-726.
49. du Bois A, V.I., Ferron G, Reuss A, Meier W, Gregg S, *Randomized controlled phase III study evaluating the impact of secondary cytoreductive surgery in recurrent ovarian cancer: AGO DESKTOP III/ENGOT ov20*. Journal of Clinical Oncology, 2017. 35(15_suppl): p. 5501.
50. Poveda, A., et al., *Trabectedin plus pegylated liposomal doxorubicin in relapsed ovarian cancer: outcomes in the partially platinum-sensitive (platinum-free interval 6-12 months) subpopulation of OVA-301 phase III randomized trial*. Ann Oncol, 2011. 22(1): p. 39-48.
51. Monk, B.J., et al., *Trabectedin plus pegylated liposomal Doxorubicin in recurrent ovarian cancer*. J Clin Oncol, 2010. 28(19): p. 3107-14.
52. Pfisterer, J., 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(29): p. 4699-707.
53. Pujade-Lauraine, 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(20): p. 3323-9.

54. Raja, F.A., et al., *Platinum versus platinum-combination chemotherapy in platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: a meta-analysis using individual patient data*. *Ann Oncol*, 2013. 24(12): p. 3028-34.
55. Aghajanian, C., et al., *OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer*. *J Clin Oncol*, 2012. 30(17): p. 2039-45.
56. Pujade-Lauraine, E., et al., *Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial*. *J Clin Oncol*, 2014. 32(13): p. 1302-8.
57. Monk, B.J., et al., *Anti-angiopoietin therapy with trebananib for recurrent ovarian cancer (TRINOVA-1): a randomised, multicentre, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2014. 15(8): p. 799-808.
58. Monk, B.J., et al., *Final results of a phase 3 study of trebananib plus weekly paclitaxel in recurrent ovarian cancer (TRINOVA-1): Long-term survival, impact of ascites, and progression-free survival-2*. *Gynecol Oncol*, 2016. 143(1): p. 27-34.
59. Ledermann, J.A., et al., *Cediranib in patients with relapsed platinum-sensitive ovarian cancer (ICON6): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial*. *Lancet*, 2016. 387(10023): p. 1066-1074.
60. Ledermann, J., et al., *Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer*. *N Engl J Med*, 2012. 366(15): p. 1382-92.
61. Matulonis, U.A., et al., *Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed serous ovarian cancer and a BRCA mutation: Overall*

- survival adjusted for postprogression poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase inhibitor therapy. Cancer, 2016. 122(12): p. 1844-52.*
62. Pujade-Lauraine, E., et al., *Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet Oncol, 2017. 18(9): p. 1274-1284.*
 63. Mirza, M.R., et al., *Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. N Engl J Med, 2016. 375(22): p. 2154-2164.*
 64. Coleman, R.L., et al., *Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet, 2017. 390(10106): p. 1949-1961.*
 65. Omura, G.A., et al., *Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. J Clin Oncol, 1991. 9(7): p. 1138-50.*
 66. Heintz, A.P., et al., *Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. Int J Gynaecol Obstet, 2006. 95 Suppl 1: p. S161-92.*
 67. Winter, W.E., 3rd, et al., *Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. J Clin Oncol, 2007. 25(24): p. 3621-7.*
 68. Eisenkop, S.M., 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(2): p. 390-6.*

69. Winter, W.E., 3rd, 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(1): p. 83-9.
70. Makary, M.A., et al., *Frailty as a predictor of surgical outcomes in older patients*. J Am Coll Surg, 2010. 210(6): p. 901-8.
71. Landrum, L.M., et al., *Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer treated with intraperitoneal chemotherapy: a Gynecologic Oncology Group study*. Gynecol Oncol, 2013. 130(1): p. 12-8.
72. Gershenson, D.M., et al., *Recurrent low-grade serous ovarian carcinoma is relatively chemoresistant*. Gynecol Oncol, 2009. 114(1): p. 48-52.
73. Carlson, K.J., S.J. Skates, and D.E. Singer, *Screening for ovarian cancer*. Ann Intern Med, 1994. 121(2): p. 124-32.
74. Rustin, G.J., *Follow-up with CA125 after primary therapy of advanced ovarian cancer has major implications for treatment outcome and trial performances and should not be routinely performed*. Ann Oncol, 2011. 22 Suppl 8: p. viii45-viii48.
75. Pignata, S., et al., *Follow-up with CA125 after primary therapy of advanced ovarian cancer: in favor of continuing to prescribe CA125 during follow-up*. Ann Oncol, 2011. 22 Suppl 8: p. viii40-viii44.
76. Cancer Genome Atlas Research, N., *Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma*. Nature, 2011. 474(7353): p. 609-15.
77. Rubin, S.C., et al., *Clinical and pathological features of ovarian cancer in women with germ-line mutations of BRCA1*. N Engl J Med, 1996. 335(19): p. 1413-6.

78. Sun, C., et al., *The role of BRCA status on the prognosis of patients with epithelial ovarian cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis*. PLoS One, 2014. 9(5): p. e95285.
79. Tan, D.S., et al., *"BRCAness" syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations*. J Clin Oncol, 2008. 26(34): p. 5530-6.
80. Adams, S.F., et al., *A high response rate to liposomal doxorubicin is seen among women with BRCA mutations treated for recurrent epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2011. 123(3): p. 486-91.
81. Lorusso, D., et al., *Prospective phase II trial of trabectedin in BRCA-mutated and/or BRCAness phenotype recurrent ovarian cancer patients: the MITO 15 trial*. Ann Oncol, 2016. 27(3): p. 487-93.
82. Lancaster, J.M., et al., *Gene expression patterns that characterize advanced stage serous ovarian cancers*. J Soc Gynecol Investig, 2004. 11(1): p. 51-9.
83. Spentzos, D., et al., *Gene expression signature with independent prognostic significance in epithelial ovarian cancer*. J Clin Oncol, 2004. 22(23): p. 4700-10.
84. Hartmann, L.C., et al., *Gene expression profiles predict early relapse in ovarian cancer after platinum-paclitaxel chemotherapy*. Clin Cancer Res, 2005. 11(6): p. 2149-55.
85. Berchuck, A., et al., *Microarray analysis of early stage serous ovarian cancers shows profiles predictive of favorable outcome*. Clin Cancer Res, 2009. 15(7): p. 2448-55.

86. Bonome, T., et al., *Expression profiling of serous low malignant potential, low-grade, and high-grade tumors of the ovary*. *Cancer Res*, 2005. 65(22): p. 10602-12.
87. Tothill, R.W., et al., *Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome*. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(16): p. 5198-208.
88. Yoshihara, K., et al., *Gene expression profiling of advanced-stage serous ovarian cancers distinguishes novel subclasses and implicates ZEB2 in tumor progression and prognosis*. *Cancer Sci*, 2009. 100(8): p. 1421-8.
89. Crijs, A.P., et al., *Survival-related profile, pathways, and transcription factors in ovarian cancer*. *PLoS Med*, 2009. 6(2): p. e24.
90. Jochumsen, K.M., et al., *Gene expression profiles as prognostic markers in women with ovarian cancer*. *Int J Gynecol Cancer*, 2009. 19(7): p. 1205-13.
91. Denkert, C., et al., *A prognostic gene expression index in ovarian cancer - validation across different independent data sets*. *J Pathol*, 2009. 218(2): p. 273-80.
92. Sabatier, R., et al., *A seven-gene prognostic model for platinum-treated ovarian carcinomas*. *Br J Cancer*, 2011. 105(2): p. 304-11.
93. Verhaak, R.G., et al., *Prognostically relevant gene signatures of high-grade serous ovarian carcinoma*. *J Clin Invest*, 2013. 123(1): p. 517-25.
94. Konecny, G.E., et al., *Prognostic and therapeutic relevance of molecular subtypes in high-grade serous ovarian cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2014. 106(10).

95. Selvanayagam, Z.E., et al., *Prediction of chemotherapeutic response in ovarian cancer with DNA microarray expression profiling*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004. 154(1): p. 63-6.
96. Jazaeri, A.A., et al., *Gene expression profiles associated with response to chemotherapy in epithelial ovarian cancers*. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(17): p. 6300-10.
97. Spentzos, D., et al., *Unique gene expression profile based on pathologic response in epithelial ovarian cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. 23(31): p. 7911-8.
98. Bernardini, M., et al., *High-resolution mapping of genomic imbalance and identification of gene expression profiles associated with differential chemotherapy response in serous epithelial ovarian cancer*. *Neoplasia*, 2005. 7(6): p. 603-13.
99. Bachvarov, D., 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(4): p. 919-33.
100. Helleman, J., et al., *Molecular profiling of platinum resistant ovarian cancer*. *Int J Cancer*, 2006. 118(8): p. 1963-71.
101. Dressman, H.K., et al., *An integrated genomic-based approach to individualized treatment of patients with advanced-stage ovarian cancer*. *J Clin Oncol*, 2007. 25(5): p. 517-25.
102. Ju, W., et al., *Identification of genes with differential expression in chemoresistant epithelial ovarian cancer using high-density oligonucleotide microarrays*. *Oncol Res*, 2009. 18(2-3): p. 47-56.

103. Konstantinopoulos, P.A., 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(22): p. 3555-61.
104. Han, Y., et al., *Integrated analysis of gene expression profiles associated with response of platinum/paclitaxel-based treatment in epithelial ovarian cancer*. PLoS One, 2012. 7(12): p. e52745.
105. Lisowska, K.M., et al., *Gene expression analysis in ovarian cancer - faults and hints from DNA microarray study*. Front Oncol, 2014. 4: p. 6.
106. Jeong, W., et al., *Activation of YAP1 is associated with poor prognosis and response to taxanes in ovarian cancer*. Anticancer Res, 2014. 34(2): p. 811-817.
107. *Retraction. An integrated genomic-based approach to individualized treatment of patients with advanced-stage ovarian cancer*. J Clin Oncol, 2012. 30(6): p. 678.
108. Folkman, J., et al., *Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia*. Nature, 1989. 339(6219): p. 58-61.
109. Kerbel, R.S., *Tumor angiogenesis*. N Engl J Med, 2008. 358(19): p. 2039-49.
110. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. 86(3): p. 353-64.
111. Liotta, L.A., P.S. Steeg, and W.G. Stetler-Stevenson, *Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation*. Cell, 1991. 64(2): p. 327-36.
112. Gomez-Raposo, C., et al., *Angiogenesis and ovarian cancer*. Clin Transl Oncol, 2009. 11(9): p. 564-71.
113. Brown, M.R., J.O. Blanchette, and E.C. Kohn, *Angiogenesis in ovarian cancer*. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2000. 14(6): p. 901-18.

114. Gonzalez-Villasana, V., et al., *Rac1/Pak1/p38/MMP-2 Axis Regulates Angiogenesis in Ovarian Cancer*. Clin Cancer Res, 2015. 21(9): p. 2127-37.
115. Becker, M.A., et al., *Dual HER/VEGF receptor targeting inhibits in vivo ovarian cancer tumor growth*. Mol Cancer Ther, 2013. 12(12): p. 2909-16.
116. Nakanishi, Y., et al., *The expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta associates with angiogenesis in epithelial ovarian cancer*. Int J Gynecol Pathol, 1997. 16(3): p. 256-62.
117. Sonmezer, M., et al., *Prognostic significance of tumor angiogenesis in epithelial ovarian cancer: in association with transforming growth factor beta and vascular endothelial growth factor*. Int J Gynecol Cancer, 2004. 14(1): p. 82-8.
118. Hollingsworth, H.C., et al., *Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma*. Am J Pathol, 1995. 147(1): p. 33-41.
119. Abulafia, O., et al., *Angiogenesis in early-invasive and low-malignant-potential epithelial ovarian carcinoma*. Obstet Gynecol, 2000. 95(4): p. 548-52.
120. Paley, P.J., et al., *Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma*. Cancer, 1997. 80(1): p. 98-106.
121. Li, L., et al., *Correlation of serum VEGF levels with clinical stage, therapy efficacy, tumor metastasis and patient survival in ovarian cancer*. Anticancer Res, 2004. 24(3b): p. 1973-9.
122. Kassim, S.K., et al., *Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients*. Clin Biochem, 2004. 37(5): p. 363-9.
123. Shen, G.H., et al., *Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian carcinoma*. Br J Cancer, 2000. 83(2): p. 196-203.

124. Nishida, N., 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(6): p. 1364-74.
125. Birrer, M.J., et al., *Whole genome oligonucleotide-based array comparative genomic hybridization analysis identified fibroblast growth factor 1 as a prognostic marker for advanced-stage serous ovarian adenocarcinomas*. *J Clin Oncol*, 2007. 25(16): p. 2281-7.
126. Apte, S.M., et al., *Expression of platelet-derived growth factor and activated receptor in clinical specimens of epithelial ovarian cancer and ovarian carcinoma cell lines*. *Gynecol Oncol*, 2004. 93(1): p. 78-86.
127. Matei, D., et al., *Autocrine activation of PDGFRalpha promotes the progression of ovarian cancer*. *Oncogene*, 2006. 25(14): p. 2060-9.
128. Wilczynski, S.P., et al., *Expression and mutational analysis of tyrosine kinase receptors c-kit, PDGFRalpha, and PDGFRbeta in ovarian cancers*. *Hum Pathol*, 2005. 36(3): p. 242-9.
129. Mendiola, M., et al., *Angiogenesis-related gene expression profile with independent prognostic value in advanced ovarian carcinoma*. *PLoS One*, 2008. 3(12): p. e4051.
130. Birrer MJ, C.Y., Brady MF, Mannel RS, Burger RA, Husain A, Bais C, and NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group, *Retrospective analysis of candidate predictive tumor biomarkers (BMs) for efficacy in the GOG-0218 trial evaluating front-line carboplatin–paclitaxel (CP) with or without bevacizumab (BEV) for epithelial ovarian cancer (EOC)*. *Journal of Clinical Oncology*, 2015. 33(15_suppl): p. 5505.

131. Kommoss, S., et al., *Bevacizumab May Differentially Improve Ovarian Cancer Outcome in Patients with Proliferative and Mesenchymal Molecular Subtypes*. Clin Cancer Res, 2017. 23(14): p. 3794-3801.
132. Gourley C, M.A., Perren T, Paul J, Michie CO, Churchman M, et al., *Molecular subgroup of high grade serous ovarian cancer (HGSOC) as a predictor of outcome following bevacizumab*. Journal of Clinical Oncology, 2014. 32 suppl(15): p. 5502.
133. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. 3(7): p. RESEARCH0034.
134. Bovelstad, H.M., S. Nygard, and O. Borgan, *Survival prediction from clinico-genomic models--a comparative study*. BMC Bioinformatics, 2009. 10: p. 413.
135. Simon, R.M., et al., *Using cross-validation to evaluate predictive accuracy of survival risk classifiers based on high-dimensional data*. Brief Bioinform, 2011. 12(3): p. 203-14.
136. Tibshirani, R., *Regression Shrinkage and Selection via the Lasso*. Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological), 1996. 58(1): p. 267-88.
137. Heagerty, P.J., T. Lumley, and M.S. Pepe, *Time-dependent ROC curves for censored survival data and a diagnostic marker*. Biometrics, 2000. 56(2): p. 337-44.
138. April, C., et al., *Whole-genome gene expression profiling of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples*. PLoS One, 2009. 4(12): p. e8162.
139. Tricarico, C., 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(2): p. 293-300.*
140. Espinosa, E., et al., *Breast cancer prognosis determined by gene expression profiling: a quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction study. J Clin Oncol, 2005. 23(29): p. 7278-85.*
141. Endoh, H., 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(5): p. 811-9.*
142. Espinosa, E., et al., *High-throughput techniques in breast cancer: a clinical perspective. Eur J Cancer, 2006. 42(5): p. 598-607.*
143. Sherrill, B., et al., *Review of meta-analyses evaluating surrogate endpoints for overall survival in oncology. Onco Targets Ther, 2012. 5: p. 287-96.*
144. Bovelstad, H.M., et al., *Predicting survival from microarray data--a comparative study. Bioinformatics, 2007. 23(16): p. 2080-7.*
145. Hoskins, W.J., et al., *The effect of diameter of largest residual disease on survival after primary cytoreductive surgery in patients with suboptimal residual epithelial ovarian carcinoma. Am J Obstet Gynecol, 1994. 170(4): p. 974-9; discussion 979-80.*
146. *Efficacy and safety of intravenous nicardipine in the control of postoperative hypertension. IV Nicardipine Study Group. Chest, 1991. 99(2): p. 393-8.*
147. Peiretti, M., et al., *Role of maximal primary cytoreductive surgery in patients with advanced epithelial ovarian and tubal cancer: Surgical and oncological outcomes. Single institution experience. Gynecol Oncol, 2010. 119(2): p. 259-64.*

148. Eisenkop, S.M., R.L. Friedman, and H.J. Wang, *Complete cytoreductive surgery is feasible and maximizes survival in patients with advanced epithelial ovarian cancer: a prospective study*. *Gynecol Oncol*, 1998. 69(2): p. 103-8.
149. Chi, D.S., et al., *What is the optimal goal of primary cytoreductive surgery for bulky stage IIIC epithelial ovarian carcinoma (EOC)?* *Gynecol Oncol*, 2006. 103(2): p. 559-64.
150. Aletti, G.D., et al., *Aggressive surgical effort and improved survival in advanced-stage ovarian cancer*. *Obstet Gynecol*, 2006. 107(1): p. 77-85.
151. du Bois, A., et al., *Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO)*. *Cancer*, 2009. 115(6): p. 1234-44.
152. Crawford, S.C., et al., *Does aggressive surgery only benefit patients with less advanced ovarian cancer? Results from an international comparison within the SCOTROC-1 Trial*. *J Clin Oncol*, 2005. 23(34): p. 8802-11.
153. Wimberger, P., et al., *Prognostic factors for complete debulking in advanced ovarian cancer and its impact on survival. An exploratory analysis of a prospectively randomized phase III study of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group (AGO-OVAR)*. *Gynecol Oncol*, 2007. 106(1): p. 69-74.
154. Melamed, A., et al., *Associations between residual disease and survival in epithelial ovarian cancer by histologic type*. *Gynecol Oncol*, 2017. 147(2): p. 250-256.

155. Curtin, J.P., et al., *Stage IV ovarian cancer: impact of surgical debulking*. Gynecol Oncol, 1997. 64(1): p. 9-12.
156. MacArthur, K.M. and M.B. Nicholl, *Principles and Innovations in Peritoneal Surface Malignancy Treatment*. World J Oncol, 2013. 4(3): p. 129-136.
157. Brand, A.H., et al., *Cytoreductive surgery for ovarian cancer: quality assessment*. Ann Oncol, 2017. 28(suppl_8): p. viii25-viii29.
158. Pomel, C., et al., *Cytoreductive surgery in ovarian cancer*. Cancer Imaging, 2007. 7: p. 210-5.
159. Corvol, P., et al., *Inhibition of angiogenesis: a new function for angiotensinogen and des(angiotensin I)angiotensinogen*. Curr Hypertens Rep, 2003. 5(2): p. 149-54.
160. Bouquet, C., et al., *Suppression of angiogenesis, tumor growth, and metastasis by adenovirus-mediated gene transfer of human angiotensinogen*. Mol Ther, 2006. 14(2): p. 175-82.
161. Karavasilis, V., et al., *Clinicopathologic study of vascular endothelial growth factor, thrombospondin-1, and microvessel density assessed by CD34 in patients with stage III ovarian carcinoma*. Int J Gynecol Cancer, 2006. 16 Suppl 1: p. 241-6.
162. Sasaki, T., K. Hiroki, and Y. Yamashita, *The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment*. Biomed Res Int, 2013. 2013: p. 546318.
163. Hudson, L.G., et al., *Activated epidermal growth factor receptor in ovarian cancer*. Cancer Treat Res, 2009. 149: p. 203-26.

164. Mehner, C., et al., *EGFR as a prognostic biomarker and therapeutic target in ovarian cancer: evaluation of patient cohort and literature review*. *Genes Cancer*, 2017. 8(5-6): p. 589-599.
165. Vergote, I.B., et al., *Randomized phase III study of erlotinib versus observation in patients with no evidence of disease progression after first-line platin-based chemotherapy for ovarian carcinoma: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Gynaecological Cancer Group, and Gynecologic Cancer Intergroup study*. *J Clin Oncol*, 2014. 32(4): p. 320-6.
166. Acs, G., et al., *Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer*. *Cancer Res*, 2001. 61(9): p. 3561-5.
167. Leo, C., et al., *Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in cervical cancer and relationship to survival, hypoxia, and apoptosis*. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(23): p. 6894-900.
168. Lin, Y.T., et al., *Clinical significance of erythropoietin receptor expression in oral squamous cell carcinoma*. *BMC Cancer*, 2012. 12: p. 194.
169. McBroom, J.W., et al., *Erythropoietin receptor function and expression in epithelial ovarian carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 2005. 99(3): p. 571-7.
170. Li, A., et al., *IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis*. *J Immunol*, 2003. 170(6): p. 3369-76.
171. Wang, Y., et al., *Interleukin-8 secretion by ovarian cancer cells increases anchorage-independent growth, proliferation, angiogenic potential, adhesion and invasion*. *Cytokine*, 2012. 59(1): p. 145-55.
172. Westermarck, J., et al., *Activation of fibroblast collagenase-1 expression by tumor cells of squamous cell carcinomas is mediated by p38 mitogen-activated*

- protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase-2*. *Cancer Res*, 2000. 60(24): p. 7156-62.
173. Loizzi, V., et al., *Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis and Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2017. 18(9).
174. Siamakpour-Reihani, S., et al., *Prognostic significance of differential expression of angiogenic genes in women with high-grade serous ovarian carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 2015. 139(1): p. 23-9.
175. He, L., Q. Wang, and X. Zhao, *Microvessel density as a prognostic factor in ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015. 16(3): p. 869-74.
176. Januchowski, R., et al., *Extracellular matrix proteins expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line*. *Biomed Res Int*, 2014. 2014: p. 365867.
177. Ito, T.K., et al., *The VEGF angiogenic switch of fibroblasts is regulated by MMP-7 from cancer cells*. *Oncogene*, 2007. 26(51): p. 7194-203.
178. Ghasemi, A., et al., *Leptin induces matrix metalloproteinase 7 expression to promote ovarian cancer cell invasion by activating ERK and JNK pathways*. *J Cell Biochem*, 2018. 119(2): p. 2333-2344.
179. Dai, J., et al., *Genetic polymorphism in a VEGF-independent angiogenesis gene ANGPT1 and overall survival of colorectal cancer patients after surgical resection*. *PLoS One*, 2012. 7(4): p. e34758.
180. Brunckhorst, M.K., et al., *Angiopoietins promote ovarian cancer progression by establishing a procancer microenvironment*. *Am J Pathol*, 2014. 184(8): p. 2285-96.

181. Maltepe, E., et al., *The role of ARNT2 in tumor angiogenesis and the neural response to hypoxia*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 273(1): p. 231-8.
182. Terashima, J., et al., *VEGF expression is regulated by HIF-1alpha and ARNT in 3D KYSE-70, esophageal cancer cell spheroids*. *Cell Biol Int*, 2016. 40(11): p. 1187-1194.
183. Vogel, C. and E.M. Marcotte, *Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses*. *Nat Rev Genet*, 2012. 13(4): p. 227-32.
184. Bais, C., et al., *Tumor Microvessel Density as a Potential Predictive Marker for Bevacizumab Benefit: GOG-0218 Biomarker Analyses*. *J Natl Cancer Inst*, 2017. 109(11).
185. Cymbaluk-Ploska, A., et al., *Suitability assessment of baseline concentration of MMP3, TIMP3, HE4 and CA125 in the serum of patients with ovarian cancer*. *J Ovarian Res*, 2018. 11(1): p. 1.

ANEXOS

Anexo 1. Relación de genes incluidos en este estudio.

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		

Se incluyen tanto el símbolo oficial como la secuencia de acceso al GenBank.

Anexo 2 . Análisis univariante de los 82 genes incluidos en el estudio en relación a la variable respuesta completa al tratamiento.

GEN	OR	IC 95%	P.Val	AUC	IC 95%	GEN	OR	IC 95%	P.Val	AUC	IC 95%
AGT	1,09	0,86-1,38	0,44	0,51	0,31-0,71	ID1	0,84	0,49-1,43	0,51	0,61	0,42-0,79
AGTR1	0,75	0,52-1,07	0,10	0,63	0,44-0,81	ID2	0,63	0,26-1,5	0,27	0,66	0,45-0,87
AGTR2	0,75	0,52-1,07	0,10	0,67	0,46-0,88	ID3	1,14	0,71-1,84	0,59	0,54	0,32-0,76
ANGPT1	0,52	0,25-1,10	0,03	0,72	0,55-0,89	IL6	0,95	0,7-1,3	0,77	0,52	0,28-0,76
ANGPT2	1,08	0,45-2,58	0,86	0,52	0,28-0,75	IL8	1,13	0,96-1,34	0,14	0,62	0,37-0,87
ARNT	0,15	0,03-0,86	0,01	0,70	0,48-0,92	KDR	0,73	0,32-1,64	0,41	0,55	0,34-0,76
AURKB	1,1	0,86-1,4	0,46	0,63	0,43-0,83	KIT	0,78	0,54-1,11	0,10	0,65	0,48-0,83
AURKC	0,94	0,74-1,18	0,57	0,56	0,37-0,76	KITLG	0,94	0,74-1,19	0,60	0,58	0,37-0,79
BRCA1	0,79	0,46-1,38	0,35	0,57	0,34-0,80	KLK6	1,03	0,76-1,39	0,87	0,66	0,47-0,85
BRCA2	0,92	0,75-1,12	0,38	0,57	0,39-0,76	MMP1	0,94	0,75-1,17	0,55	0,55	0,35-0,75
CAV1	0,74	0,35-1,56	0,39	0,59	0,37-0,80	MMP2	1,30	0,62-2,74	0,49	0,60	0,41-0,79
CD34	0,64	0,33-1,27	0,02	0,67	0,50-0,85	MMP3	0,59	0,38-0,94	<0,01	0,77	0,61-0,94
CD36	0,98	0,5-93	0,95	0,50	0,28-0,73	MMP7	0,89	0,68-1,15	0,30	0,52	0,30-0,75
CD44	1,36	0,58-3,18	0,46	0,57	0,36-0,77	NOS2A	0,89	0,64-1,23	0,48	0,59	0,39-0,79
CTSB	0,57	0,21-1,53	0,26	0,60	0,35-0,84	NOS3	1,51	0,5-4,54	0,45	0,55	0,35-0,74
CXCL12	1,48	0,55-3,94	0,41	0,60	0,39-0,81	NRP1	0,78	0,40-1,53	0,40	0,54	0,35-0,73
CXCL1	0,95	0,78-1,15	0,56	0,54	0,34-0,74	NRP2	0,72	0,30-1,71	0,45	0,61	0,39-0,82
EDN1	0,81	0,48-1,37	0,43	0,59	0,40-0,79	PDGFB	0,57	0,30-1,08	0,05	0,68	0,49-0,87
EDN2	0,96	0,75-1,21	0,70	0,55	0,32-0,77	PDGFC	1,37	0,54-3,43	0,50	0,57	0,34-0,81
EDN3	1,02	0,87-1,18	0,82	0,53	0,30-0,76	PDGFRA	0,74	0,36-1,54	0,41	0,57	0,35-0,80
EDNRA	0,9	0,76-1,06	0,18	0,68	0,49-0,88	PDGFRB	0,71	0,26-1,92	0,49	0,58	0,36-0,79

GEN	OR	IC 95%	P.Val	AUC	IC 95%	GEN	OR	IC 95%	P.Val	AUC	IC 95%
EDNRB	1,03	0,82-1,31	0,78	0,56	0,38-0,75	PECAM1	1,36	0,38-4,82	0,63	0,52	0,30-0,73
EFNB1	0,83	0,36-1,92	0,66	0,50	0,28-0,72	PLAU	1,26	0,76-2,09	0,38	0,55	0,32-0,79
EFNB2	1,42	0,73-2,77	0,29	0,60	0,41-0,80	PLAUR	0,99	0,44-2,24	0,98	0,52	0,29-0,75
EGF	0,68	0,5-0,93	0,01	0,75	0,57-0,93	PTGS2	1,12	0,77-1,62	0,55	0,51	0,29-0,72
EGFR	0,51	0,17-1,54	0,18	0,63	0,44-0,82	ROBO1	0,51	0,21-1,21	0,09	0,69	0,52-0,87
EPHB2	0,77	0,32-1,84	0,55	0,56	0,32-0,80	SERPINB5	1,06	0,85-1,31	0,60	0,51	0,32-0,70
EPHB3	1,21	0,53-2,74	0,64	0,58	0,36-0,79	SPARC	1	0,39-2,56	0,99	0,50	0,29-0,70
EPHB4	1,14	0,49-2,67	0,75	0,54	0,31-0,76	TEK	1,39	0,81-2,39	0,22	0,51	0,26-0,76
EPO	0,97	0,68-1,37	0,84	0,58	0,38-0,78	TGFB1	1,07	0,30-3,83	0,91	0,50	0,28-0,72
EPOR	0,67	0,4-1,11	0,09	0,66	0,46-0,87	TGFBR2	1,07	0,31-3,74	0,91	0,53	0,33-0,74
ERBB2	0,79	0,42-1,48	0,43	0,52	0,27-0,77	THBS1	0,93	0,31-2,76	0,89	0,54	0,29-0,78
ETS1	0,67	0,24-1,85	0,36	0,56	0,33-0,79	THBS2	1,05	0,80-1,39	0,71	0,63	0,42-0,84
ETV4	1	0,84-1,19	0,98	0,65	0,48-0,83	TIE1	1,78	0,69-4,62	0,21	0,63	0,43-0,84
FGF2	0,76	0,44-1,34	0,31	0,62	0,42-0,83	TIMP1	1,30	0,55-3,08	0,54	0,55	0,36-0,75
FGFR1	0,72	0,38-1,38	0,32	0,54	0,33-0,76	TIMP2	1,50	0,5-4,52	0,47	0,56	0,35-0,77
FIGF	0,89	0,63-1,25	0,50	0,59	0,38-0,79	TP53	1,75	0,92-3,35	0,07	0,69	0,49-0,88
FLT1	0,79	0,27-2,3	0,67	0,50	0,30-0,71	VEGFB	0,88	0,27-2,87	0,83	0,51	0,30-0,71
FLT4	0,62	0,28-1,4	0,24	0,63	0,39-0,87	VEGFC	1,03	0,77-1,38	0,83	0,53	0,32-0,73
HIF1A	1,01	0,24-4,27	0,99	0,54	0,34-0,75	VHL	0,78	0,26-2,32	0,65	0,51	0,25-0,77

Anexo 3. Análisis univariante de genes relacionados con SLP y SG.

Supervivencia libre de progresión				Supervivencia global			
Gen	OR	IC 95%	P.Val	Gen	OR	IC 95%	P.Val
AGT	0,92	0,83-1,02	0,11	AGT	0,89	0,78-1,01	0,06
AGTR1	0,97	0,87-1,09	0,64	AGTR1	0,94	0,81-1,08	0,35
AGTR2	1	0,85-1,18	0,99	AGTR2	1,01	0,81-1,27	0,91
ANGPT1	1,17	0,96-1,44	0,08	ANGPT1*	1,3	0,99-1,71	0,02
ANGPT2*	0,59	0,36-0,97	0,02	ANGPT2	0,6	0,34-1,04	0,06
ARNT	1,71	0,8-3,69	0,16	ARNT	1,1	0,44-2,72	0,84
AURKB	1,01	0,89-1,13	0,91	AURKB	1,03	0,89-1,18	0,72
AURKC	1	0,89-1,12	0,99	AURKC	1,03	0,91-1,17	0,64
BRCA1	0,98	0,83-1,14	0,76	BRCA1	1,04	0,85-1,28	0,68
BRCA2	0,99	0,9-1,08	0,83	BRCA2	1,03	0,93-1,15	0,52
CAV1	1,18	0,89-1,57	0,21	CAV1	1,12	0,82-1,52	0,45
CD34	1,06	0,96-1,16	0,22	CD34*	1,15	0,99-1,34	0,03
CD36*	0,66	0,45-0,97	0,03	CD36	0,81	0,54-1,23	0,31
CD44*	0,54	0,34-0,86	<0,01	CD44*	0,51	0,3-0,85	<0,01
CTSB	1,04	0,62-1,72	0,88	CTSB	0,84	0,47-1,51	0,56
CXCL12	0,78	0,49-1,25	0,28	CXCL12	0,76	0,44-1,3	0,29
CXCL1	0,98	0,9-1,06	0,55	CXCL1	1,05	0,95-1,16	0,32
EDN1	1,09	0,87-1,36	0,47	EDN1	1,2	0,91-1,57	0,19
EDN2	1	0,89-1,13	0,99	EDN2	1,08	0,94-1,24	0,25
EDN3	0,99	0,91-1,07	0,70	EDN3	0,97	0,88-1,06	0,49
EDNRA	0,98	0,91-1,06	0,58	EDNRA	1,01	0,93-1,11	0,73
EDNRB	0,97	0,86-1,09	0,62	EDNRB	1,03	0,9-1,17	0,67
EFNB1	0,91	0,62-1,33	0,62	EFNB1	0,96	0,62-1,48	0,84

Supervivencia libre de progresión				Supervivencia global			
Gen	OR	IC 95%	P.Val	Gen	OR	IC 95%	P.Val
EFNB2	1,06	0,78-1,43	0,72	EFNB2	1,05	0,74-1,51	0,78
EGF	1,01	0,87-1,18	0,85	EGF	1,07	0,91-1,26	0,43
EGFR	1,29	0,83-2,02	0,23	EGFR	1,34	0,79-2,27	0,25
EPHB2*	1,7	1,1-2,63	0,01	EPHB2	1,52	0,93-2,48	0,09
EPHB3	0,98	0,71-1,36	0,90	EPHB3	0,97	0,66-1,43	0,89
EPHB4	0,92	0,65-1,31	0,63	EPHB4	0,79	0,49-1,28	0,33
EPO	0,98	0,84-1,16	0,85	EPO	1,01	0,84-1,21	0,93
EPOR	1,19	0,96-1,49	0,09	EPOR	1,13	0,9-1,43	0,27
ERBB2	1,33	0,95-1,87	0,06	ERBB2	1,21	0,85-1,72	0,25
ETSI	1,23	0,85-1,8	0,20	ETSI	1,16	0,8-1,68	0,39
ETV4	0,99	0,91-1,07	0,77	ETV4	1	0,92-1,1	0,93
FGF2	1,04	0,82-1,32	0,72	FGF2	1,1	0,85-1,41	0,45
FGFR1	1,23	0,87-1,73	0,24	FGFR1	1,01	0,67-1,51	0,97
FIGF	0,87	0,73-1,04	0,12	FIGF	0,89	0,73-1,09	0,26
FLT1	0,74	0,45-1,22	0,23	FLT1	0,81	0,45-1,48	0,49
FLT4	1,11	0,78-1,57	0,56	FLT4	0,93	0,61-1,41	0,71
HIF1A	0,4	0,39-1,41	0,35	HIF1A	0,59	0,27-1,27	0,15
ID1	1,16	0,93-1,45	0,19	ID1	1,27	0,96-1,69	0,10
ID2	1,12	0,77-1,63	0,54	ID2	1,16	0,77-1,76	0,48
ID3	0,98	0,8-1,2	0,85	ID3	0,97	0,77-1,23	0,80
IL6	0,92	0,8-1,07	0,28	IL6	1,01	0,85-1,19	0,94
IL8	0,93	0,86-1,01	0,08	IL8	0,98	0,89-1,08	0,66
KDR	1,11	0,81-1,53	0,49	KDR	0,97	0,7-1,34	0,86
KIT	1,05	0,93-1,18	0,41	KIT	1,1	0,95-1,27	0,19
KITLG	0,96	0,86-1,07	0,47	KITLG	0,99	0,88-1,12	0,87

Supervivencia libre de progresión				Supervivencia global			
Gen	OR	IC 95%	P.Val	Gen	OR	IC 95%	P.Val
KLK6	1	0,88-1,13	0,95	KLK6	1,03	0,87-1,21	0,76
MMP1	0,95	0,85-1,08	0,43	MMP1	0,94	0,81-1,08	0,35
MMP2	1,04	0,75-1,43	0,81	MMP2	0,98	0,67-1,44	0,93
MMP3	1,06	0,89-1,26	0,53	MMP3	1,09	0,9-1,33	0,40
MMP7	1,01	0,93-1,11	0,76	MMP7*	1,15	0,98-1,37	0,04
NOS2A	0,96	0,81-1,14	0,64	NOS2A	0,97	0,81-1,16	0,72
NOS3	0,66	0,4-1,08	0,08	NOS3	0,58	0,33-1,03	0,05
NRP1	1,08	0,86-1,37	0,46	NRP1	1,02	0,8-1,29	0,88
NRP2	1,12	0,76-1,64	0,57	NRP2	1,19	0,78-1,8	0,42
PDGFB	1,04	0,83-1,31	0,73	PDGFB	1,35	1-1,82	0,03
PDGFC	1,24	0,82-1,88	0,31	PDGFC	0,99	0,6-1,64	0,98
PDGFRA	1,29	0,93-1,79	0,12	PDGFRA	1,17	0,8-1,7	0,41
PDGFRB	1,09	0,69-1,7	0,72	PDGFRB*	1,11	0,67-1,84	0,68
PECAMI	0,69	0,38-1,27	0,23	PECAMI	0,62	0,29-1,33	0,20
PLAU	0,79	0,62-1,02	0,08	PLAU	0,95	0,72-1,24	0,69
PLAUR	0,67	0,43-1,03	0,06	PLAUR	0,89	0,58-1,37	0,59
PTGS2	0,87	0,73-1,05	0,14	PTGS2	0,96	0,81-1,14	0,65
ROBO1	1,19	0,88-1,62	0,25	ROBO1	1,26	0,88-1,81	0,21
SERPINB5	1	0,91-1,1	0,93	SERPINB5	0,99	0,89-1,11	0,90
SPARC	1,17	0,77-1,79	0,45	SPARC	1,03	0,63-1,68	0,92
TEK	0,92	0,67-1,26	0,61	TEK	0,76	0,55-1,05	0,11
TGFB1	0,72	0,39-1,33	0,29	TGFB1	0,78	0,38-1,62	0,51
TGFBR2	1,23	0,73-2,09	0,42	TGFBR2	0,96	0,52-1,78	0,90
THBS1	1,19	0,69-2,05	0,52	THBS1	1,45	0,73-2,89	0,29
THBS2	0,96	0,84-1,09	0,56	THBS2	1,1	0,9-1,34	0,29

Supervivencia libre de progresión				Supervivencia global			
Gen	OR	IC 95%	P.Val	Gen	OR	IC 95%	P.Val
TIE1	1,05	0,72-1,51	0,81	TIE1	0,9	0,56-1,45	0,66
TIMP1	0,87	0,6-1,26	0,46	TIMP1	0,7	0,46-1,08	0,10
TIMP2	1,29	0,77-2,15	0,32	TIMP2	1,15	0,65-2,04	0,63
TP53	1,06	0,8-1,4	0,67	TP53	0,93	0,67-1,29	0,65
VEGFB	0,95	0,57-1,6	0,85	VEGFB	0,82	0,45-1,51	0,53
VEGFC	1,04	0,9-1,19	0,59	VEGFC	1,04	0,89-1,2	0,62
VHL	1,2	0,71-2,02	0,49	VHL	0,8	0,44-1,47	0,47

*Correlación estadísticamente significativa.

Anexo 4. Métodos testados para la elaboración del modelo multigénico

Método	Min.Var	Var.Stand	Otros	Tot.Perm	AUC	Permuted P	ACCURACY	Permuted P
LASSO	1	FALSE	x	1000	0,67	0,09	0,74	0,09
Elastic Net	1	FALSE	x	100	0,63	0,19	0,69	0,2
Stepwise-AIC		FALSE	Steps=2	100	0,61	0,28	0,69	0,35

Anexo 5. Análisis univariante de los 82 genes incluidos en el estudio en subgrupo de ER >1 cm en relación a respuesta completa al tratamiento.

GEN	OR	IC 95%	P.Val	AUC	IC 95%	GEN	OR	IC 95%	P.Val	AUC	IC 95%
AGT	1,05	0,81-1,36	0,69	0,56	0,3-0,82	ID1	0,94	0,48-1,86	0,86	0,58	0,32-0,84
AGTR1	0,82	0,56-1,2	0,29	0,7	0,46-0,93	ID2	0,64	0,21-1,99	0,42	0,63	0,36-0,89
AGTR2	0,4	0,16-0,99	<0,01	0,78	0,58-0,98	ID3	1,25	0,62-2,52	0,52	0,52	0,25-0,8
ANGPT1	0,31	0,1-1	0,02	0,76	0,55-0,97	IL6	0,96	0,64-1,43	0,82	0,51	0,23-0,8
ANGPT2	1,15	0,32-4,06	0,83	0,55	0,27-0,83	IL8	1,34	0,94-1,91	0,04	0,7	0,42-0,98
ARNT	0,12	0,01-1,04	0,02	0,75	0,5-0,99	KDR	0,88	0,25-3,11	0,84	0,5	0,22-0,77
AURKB	1,94	0,82-4,58	0,03	0,7	0,45-0,93	KIT	0,62	0,34-1,1	0,04	0,77	0,5-1
AURKC	0,95	0,72-1,25	0,72	0,57	0,31-0,83	KITLG	1,01	0,77-1,33	0,93	0,52	0,25-0,79
BRCA1	0,64	0,26-1,56	0,3	0,61	0,33-0,88	KLK6	1,63	0,45-5,86	0,44	0,53	0,32-0,84
BRCA2	0,89	0,7-1,15	0,37	0,61	0,35-0,86	MMP1	0,99	0,74-1,32	0,93	0,54	0,28-0,8
CAVI	0,48	0,14-1,65	0,23	0,63	0,37-0,9	MMP2	1,33	0,53-3,33	0,54	0,63	0,38-0,89
CD34	0,67	0,27-1,68	0,2	0,61	0,35-0,86	MMP3	0,42	0,18-0,99	0,01	0,77	0,57-0,9
CD36	0,77	0,36-1,67	0,5	0,6	0,34-0,86	MMP7	1,15	0,67-1,97	0,61	0,56	0,28-0,84
CD44	1,49	0,62-3,55	0,35	0,6	0,34-0,85	NOS2A	0,84	0,54-1,3	0,42	0,62	0,37-0,86
CTSB	0,82	0,29-2,31	0,7	0,53	0,25-0,81	NOS3	0,94	0,26-3,47	0,92	0,51	0,24-0,78
CXCL12	1,06	0,26-4,28	0,93	0,54	0,27-0,81	NRP1	1,23	0,39-3,85	0,72	0,55	0,29-0,82
CXCL1	1,06	0,8-1,39	0,7	0,63	0,39-0,88	NRP2	0,76	0,25-2,31	0,62	0,61	0,32-0,89
EDN1	0,69	0,32-1,47	0,32	0,63	0,39-0,88	PDGFB	0,56	0,25-1,22	0,11	0,69	0,45-0,93
EDN2	0,93	0,67-1,29	0,67	0,61	0,33-0,88	PDGFC	1,12	0,41-3,07	0,81	0,53	0,26-0,81

GEN	OR	IC 95%	P.Val	AUC	IC 95%	GEN	OR	IC 95%	P.Val	AUC	IC 95%
EDN3	1,01	0,84-1,22	0,9	0,56	0,28-0,84	PDGFRA	0,57	0,24-1,37	0,19	0,63	0,38-0,89
EDNRA	0,95	0,95	0,58	0,61	0,35-0,86	PDGFRB	0,9	0,24-3,29	0,86	0,5	0,23-0,76
EDNRB	1,29	0,87-1,91	0,16	0,75	0,53-0,96	PECAM1	0,65	0,14-3,01	0,57	0,63	0,36-0,89
EFNB1	0,71	0,24-2,05	0,51	0,54	0,27-0,81	PLAU	1,53	0,72-3,26	0,24	0,6	0,33-0,87
EFNB2	0,92	0,39-2,17	0,85	0,51	0,25-0,78	PLAUR	0,98	0,39-2,46	0,95	0,54	0,27-0,82
EGF	0,76	0,53-1,09	0,11	0,7	0,47-0,93	PTGS2	1,13	0,74-1,73	0,56	0,5	0,23-0,78
EGFR	0,88	0,22-3,53	0,85	0,5	0,24-0,77	ROBO1	0,27	0,06-1,25	0,06	0,73	0,50-0,95
EPHB2	0,78	0,28-2,18	0,63	0,57	0,28-0,86	SERPINB5	1,04	0,79-1,36	0,79	0,53	0,27-0,79
EPHB3	1,37	0,48-3,9	0,54	0,56	0,3-0,83	SPARC	1,09	0,3-3,9	0,89	0,54	0,28-0,81
EPHB4	1,12	0,4-3,09	0,82	0,5	0,23-0,78	TEK	1,1	0,61-2,01	0,74	0,62	0,33-0,9
EPO	0,95	0,6-1,51	0,84	0,58	0,32-0,84	TGFB1	1,27	0,32-5,01	0,72	0,54	0,28-0,8
EPOR	0,54	0,27-1,1	0,05	0,76	0,54-0,99	TGFBR2	1,16	0,28-4,88	0,83	0,58	0,32-0,83
ERBB2	0,95	0,4-2,23	0,89	0,5	0,22-0,77	THBS1	0,66	0,18-2,39	0,52	0,62	0,34-0,89
ETS1	0,73	0,19-2,79	0,64	0,55	0,27-0,83	THBS2	1,67	0,79-3,55	0,15	0,69	0,45-0,93
ETV4	0,94	0,76-1,15	0,51	0,57	0,31-0,83	TIE1	2,91	0,63-13,5	0,11	0,73	0,47-0,98
FGF2	0,69	0,26-1,85	0,44	0,63	0,36-0,89	TIMPI	0,95	0,28-3,22	0,94	0,51	0,25-0,77
FGFR1	0,74	0,33-1,65	0,45	0,5	0,22-0,77	TIMP2	1,98	0,54-7,27	0,29	0,61	0,35-0,86
FIGF	0,87	0,57-1,31	0,49	0,6	0,34-0,85	TP53	2,07	0,84-5,13	0,08	0,73	0,49-0,97
FLT1	0,43	0,09-2,04	0,25	0,61	0,35-0,86	VEGFB	1,06	0,31-3,6	0,92	0,55	0,29-0,81
FLT4	0,26	0,06-1,17	0,03	0,75	0,5-1	VEGFC	0,94	0,65-1,36	0,75	0,53	0,27-0,8
HIF1A	0,94	0,2-4,38	0,93	0,57	0,30-0,83	VHL	0,74	0,22-2,47	0,62	0,54	0,24-0,85

Anexo 6. Análisis univariante en el subgrupo de ER >1 cm en relación a SLP y SG.

Supervivencia libre de progresión				Supervivencia global			
Gen	OR	IC 95%	P.Val	Gen	OR	IC 95%	P.Val
AGT	0,89	0,77-1,03	0,08	AGT	0,89	0,78-1,01	0,06
AGTR1	1,11	0,92-1,34	0,30	AGTR1	0,94	0,81-1,08	0,35
AGTR2	1,07	0,88-1,3	0,50	AGTR2	1,01	0,81-1,27	0,91
ANGPT1	1,31	0,82-2,09	0,25	ANGPT1*	1,3	0,99-1,71	0,02
ANGPT2	0,54	0,23-1,27	0,13	ANGPT2	0,6	0,34-1,04	0,06
ARNT	1,82	0,69-4,8	0,23	ARNT	1,1	0,44-2,72	0,84
AURKB*	0,55	0,37-0,81	<0,01	AURKB	1,03	0,89-1,18	0,72
AURKC	0,92	0,79-1,07	0,29	AURKC	1,03	0,91-1,17	0,64
BRCA1	1,04	0,63-1,72	0,88	BRCA1	1,04	0,85-1,28	0,68
BRCA2	0,89	0,78-1,01	0,09	BRCA2	1,03	0,93-1,15	0,52
CAV1	1,24	0,68-2,24	0,48	CAV1	1,12	0,82-1,52	0,45
CD34	0,73	0,42-1,26	0,25	CD34*	1,15	0,99-1,34	0,03
CD36	0,74	0,48-1,14	0,16	CD36	0,81	0,54-1,23	0,31
CD44*	0,57	0,35-0,92	0,01	CD44*	0,51	0,3-0,85	<0,01
CTSB	0,85	0,47-1,55	0,58	CTSB	0,84	0,47-1,51	0,56
CXCL12	0,87	0,38-1,98	0,73	CXCL12	0,76	0,44-1,3	0,29
CXCL1	0,93	0,82-1,05	0,25	CXCL1	1,05	0,95-1,16	0,32
EDN1	0,96	0,65-1,41	0,81	EDN1	1,2	0,91-1,57	0,19
EDN2	1,08	0,86-1,36	0,51	EDN2	1,08	0,94-1,24	0,25
EDN3	0,92	0,81-1,03	0,14	EDN3	0,97	0,88-1,06	0,49

Supervivencia libre de progresión					Supervivencia global				
Gen	OR	IC 95%	P.Val		Gen	OR	IC 95%	P.Val	
EDNRA	0,94	0,85-1,04	0,21		EDNRA	1,01	0,93-1,11	0,73	
EDNRB	0,88	0,74-1,05	0,17		EDNRB	1,03	0,9-1,17	0,67	
EFNB1	0,86	0,46-1,6	0,63		EFNB1	0,96	0,62-1,48	0,84	
EFNB2	1,38	0,86-2,2	0,16		EFNB2	1,05	0,74-1,51	0,78	
EGF	1,01	0,82-1,25	0,89		EGF	1,07	0,91-1,26	0,43	
EGFR	2,03	0,87-4,73	0,07		EGFR	1,34	0,79-2,27	0,25	
EPHB2	1,31	0,75-2,31	0,34		EPHB2	1,52	0,93-2,48	0,09	
EPHB3	0,93	0,6-1,44	0,72		EPHB3	0,97	0,66-1,43	0,89	
EPHB4	0,79	0,48-1,3	0,33		EPHB4	0,79	0,49-1,28	0,33	
EPO	1,05	0,86-1,29	0,62		EPO	1,01	0,84-1,21	0,93	
EPOR	1,07	0,72-1,59	0,73		EPOR	1,13	0,9-1,43	0,27	
ERBB2	1,22	0,7-2,14	0,48		ERBB2	1,21	0,85-1,72	0,25	
ETS1	0,74	0,3-1,82	0,50		ETS1	1,16	0,8-1,68	0,39	
ETV4	1	0,91-1,11	0,94		ETV4	1	0,92-1,1	0,93	
FGF2	0,97	0,48-1,95	0,92		FGF2	1,1	0,85-1,41	0,45	
FGFR1	0,74	0,39-1,38	0,33		FGFR1	1,01	0,67-1,51	0,97	
FIGF	0,79	0,61-1,02	0,05		FIGF	0,89	0,73-1,09	0,26	
FLT1	1,72	0,76-3,91	0,19		FLT1	0,81	0,45-1,48	0,49	
FLT4	1,14	0,68-1,93	0,62		FLT4	0,93	0,61-1,41	0,71	
HIF1A	0,5	0,22-1,14	0,07		HIF1A	0,59	0,27-1,27	0,15	
ID1	1,07	0,8-1,45	0,64		ID1	1,27	0,96-1,69	0,10	
ID2	1,22	0,73-2,04	0,44		ID2	1,16	0,77-1,76	0,48	

Supervivencia libre de progresión					Supervivencia global				
Gen	OR	IC 95%	P.Val		Gen	OR	IC 95%	P.Val	
ID3	0,76	0,52-1,12	0,16		ID3	0,97	0,77-1,23	0,80	
IL6	0,98	0,79-1,21	0,84		IL6	1,01	0,85-1,19	0,94	
KDR	0,58	0,24-1,42	0,22		KDR	0,97	0,7-1,34	0,86	
KIT	1,09	0,85-1,4	0,51		KIT	1,1	0,95-1,27	0,19	
KITLG	0,99	0,86-1,14	0,87		KITLG	0,99	0,88-1,12	0,87	
KLK6	0,9	0,48-1,68	0,73		KLK6	1,03	0,87-1,21	0,76	
MMP1	1,05	0,89-1,24	0,53		MMP1	0,94	0,81-1,08	0,35	
MMP2	1,12	0,74-1,71	0,58		MMP2	0,98	0,67-1,44	0,93	
MMP3	1,27	0,95-1,7	0,11		MMP3	1,09	0,9-1,33	0,40	
MMP7	0,94	0,72-1,24	0,67		MMP7*	1,15	0,98-1,37	0,04	
NOS2A	0,95	0,76-1,2	0,67		NOS2A	0,97	0,81-1,16	0,72	
NOS3	0,8	0,42-1,52	0,48		NOS3	0,58	0,33-1,03	0,05	
NRP1	0,92	0,55-1,55	0,75		NRP1	1,02	0,8-1,29	0,88	
NRP2	0,88	0,47-1,64	0,68		NRP2	1,19	0,78-1,8	0,42	
PDGFB	1,16	0,79-1,69	0,44		PDGFB	1,35	1-1,82	0,03	
PDGFC	1,51	0,87-2,62	0,13		PDGFC	0,99	0,6-1,64	0,98	
PDGFRA	1,39	0,93-2,09	0,10		PDGFRA	1,17	0,8-1,7	0,41	
PDGFRB	0,97	0,51-1,86	0,92		PDGFRB*	1,11	0,67-1,84	0,68	
PECAMI	0,73	0,34-1,57	0,41		PECAMI	0,62	0,29-1,33	0,20	
PLAU	0,77	0,52-1,12	0,19		PLAU	0,95	0,72-1,24	0,69	
PLAUR	0,9	0,52-1,55	0,69		PLAUR	0,89	0,58-1,37	0,59	

Supervivencia libre de progresión				Supervivencia global			
Gen	OR	IC 95%	P.Val	Gen	OR	IC 95%	P.Val
PTGS2	0,82	0,66-1,02	0,07	PTGS2	0,96	0,81-1,14	0,65
ROBO1	1,1	0,57-2,1	0,77	ROBO1	1,26	0,88-1,81	0,21
SERPINB5	0,97	0,84-1,11	0,61	SERPINB5	0,99	0,89-1,11	0,90
SPARC	1,17	0,61-2,22	0,64	SPARC	1,03	0,63-1,68	0,92
TEK	0,89	0,61-1,28	0,53	TEK	0,76	0,55-1,05	0,11
TGFB1	0,6	0,29-1,26	0,16	TGFB1	0,78	0,38-1,62	0,51
TGFBR2	1,1	0,59-2,04	0,77	TGFBR2	0,96	0,52-1,78	0,90
THBS1	1,23	0,65-2,3	0,52	THBS1	1,45	0,73-2,89	0,29
THBS2	1,08	0,69-1,67	0,74	THBS2	1,1	0,9-1,34	0,29
TIE1	1,04	0,6-1,81	0,88	TIE1	0,9	0,56-1,45	0,66
TIMP1	0,54	0,27-1,06	0,06	TIMP1	0,7	0,46-1,08	0,10
TIMP2	0,86	0,49-1,52	0,60	TIMP2	1,15	0,65-2,04	0,63
TP53	0,75	0,46-1,22	0,23	TP53	0,93	0,67-1,29	0,65
VEGFB	0,88	0,5-1,54	0,64	VEGFB	0,82	0,45-1,51	0,53
VEGFC	1,14	0,91-1,43	0,22	VEGFC	1,04	0,89-1,2	0,62
VHL	1,1	0,58-2,09	0,76	VHL	0,8	0,44-1,47	0,47

*Correlación estadísticamente significativa.