



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Facultad de Medicina

Programa de Doctorado: Medicina

MICROAMBIENTE TUMORAL
EN EL CÁNCER DE OVARIO SEROSO DE ALTO GRADO:
IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNES
Y ANÁLISIS DE SU VALOR PRONÓSTICO

TESIS DOCTORAL presentada por:

Franklin Antonio Herrera Cañizares

Dirigida por:

Dr. Carlos Camps Herrero

Dra. Silvia Calabuig Fariñas

Valencia, septiembre del 2018



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



CARLOS CAMPS HERRERO, Dr. por la Universidad de Valencia, Profesor Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia y Jefe del Servicio de Oncología del Hospital General Universitario de Valencia.

CERTIFICA:

Que Don. Franklin Antonio Herrera Cañizares, Licenciado en Medicina especialista en Ginecología y Obstetricia, ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral que lleva por título “Microambiente Tumoral en el Cáncer de Ovario Seroso de Alto Grado: Identificación de biomarcadores inmunes y análisis de su valor pronóstico”. Dicha tesis reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

En Valencia, el 14 de septiembre de 2018.



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA



FUNDACIÓ
INVESTIGACIÓ
HOSPITAL GENERAL
UNIVERSITARI
VALÈNCIA

SILVIA CALABUIG FARIÑAS, Dra. por la Universidad de Valencia, Investigadora Postdoctoral de Oncología Molecular de la Fundación del Hospital General Universitario de Valencia y Profesora Asociada del Departamento de Patología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que Don. Franklin Antonio Herrera Cañizares, Licenciado en Medicina especialista en Ginecología y Obstetricia, ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral que lleva por título “Microambiente Tumoral en el Cáncer de Ovario Seroso de Alto Grado: Identificación de biomarcadores inmunes y análisis de su valor pronóstico”. Dicha tesis reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

En Valencia, el día 14 de septiembre de 2018.

*“Comienza haciendo lo que es necesario,
después lo que es posible y de repente estarás haciendo lo
imposible”*

SAN FRANCISCO DE ASÍS

Agradecimientos

Este es el pequeño espacio que dedico a todas aquellas personas que colaboraron para que esta meta llegue a su final, un sueño profesional.

En primer lugar, agradezco a DIOS por ser el pilar fundamental en mi vida, mi guía en todo este largo trayecto. Sin la presencia de ÉL en mi vida nada es posible, primeramente, todo se lo debo a ÉL.

A mis padres promotores de mis éxitos. Responsables de mi formación y todos los éxitos que he logrado en mi vida.

Al Dr. Carlos Camps; mi padre académico en España, ser humano excepcional por su apoyo incondicional en todo este recorrido, sus sabios consejos me hicieron crecer y fortalecerme profesionalmente. Son muchas las oportunidades que me brindó en estos años que fortalecieron mis conocimientos en el campo de la oncología.

A la Dra. Silvia Calabuig; por ser la persona que nunca me dejó decaer, quien siempre tuvo tiempo para apoyarme y levantarme los ánimos. Siempre estuvo a dedicación exclusiva para que todo se diera a los tiempos. Mil gracias Silvia por toda la paciencia que me tuviste, definitivamente fuiste un ángel para mí en todo este recorrido.

A la Dra. Eloísa Jantus; por sus sabios consejos, toda la enseñanza que me aportó en el campo de la biología molecular y su apoyo incondicional para que este proyecto llegara a desarrollarse.

A todo el personal humano que conforma el laboratorio de biología molecular. En primer lugar, a Marais, siempre apoyándome en todo momento y no dejándome decaer. Andrea por siempre ayudarme en todo lo que necesité y tener tiempo para explicarme. Héctor, Bruno, Clara y Elena mis amigos de investigación, siempre apoyándome y colaborándome en todo momento. Sandra, Alejandro y Eva mis instructores en las técnicas de biología molecular, por compartir sus conocimientos conmigo.

Agradecer a los profesionales que forman parte del servicio de Oncología Médica, Anatomía Patológica y Ginecología del Hospital General Universitario de Valencia. Así mismo al personal de la Fundación para la Investigación del Hospital General

Universitario de Valencia.

A la Fundación Carolina / Fundación BBVA por brindarme la oportunidad de venir a España a formarme en investigación en cáncer.

A toda mi familia, especialmente a mis hermanos Gregory y Héctor por hacerme sentir un modelo a seguir, siempre a mi lado.

Finalmente, agradecer en mención especial a las pacientes, ya que su desinteresada colaboración ha permitido tanto la realización de esta tesis como el continuo avance en la investigación contra el cáncer.

Resumen

El cáncer de ovario representa el 30% de los tumores malignos del aparato genital femenino, constituyendo el segundo tipo de cáncer más frecuente tras el cáncer de endometrio; siendo a su vez el tumor ginecológico con mayor índice de mortalidad. El cáncer de ovario seroso de alto grado representa el tipo histológico con mayor frecuencia y mayor agresividad, y a pesar de los estudios realizados hasta el momento son necesarios nuevos biomarcadores pronósticos y predictivos para esta patología. Por tal motivo y dado los grandes avances que se han producido recientemente en la inmuno-oncología, conocer el papel del sistema inmune en el cáncer de ovario seroso de alto grado se convierte en un gran desafío.

El objetivo principal de la presente tesis es la caracterización exhaustiva del microambiente tumoral a nivel tisular en el cáncer de ovario seroso de alto grado, mediante el análisis de marcadores moleculares, de las células tumorales, así como de las células inmunorreguladoras, que nos permitirán adquirir una mayor comprensión de la enfermedad, prever su progresión y poder desarrollar mejores estrategias terapéuticas frente a esta entidad patológica.

Los resultados de esta investigación han revelado que los infiltrados linfocitarios con un patrón difuso intratumoral se asoció a un mejor pronóstico. El análisis mediante amplificación génica de los biomarcadores inmunológicos aportó datos que hasta el momento se desconocían en el Cáncer de Ovario Seroso de Alto Grado; destacando que *FOXP3*, *ICOSL*, *PD-L2*, *CD25*, *PD-L1*, *CXCR4*, *TNFRSF4*, *CD137* se expresan con niveles elevados respecto al cDNA de referencia en nuestra cohorte retrospectiva, y en la cohorte prospectiva encontramos *FOXP3*, *ICOSL*, *IDO1*, *PD-1*, *CD137* sobreexpresados en relación con el tejido normal adyacente. Así mismo, niveles elevados de expresión de *CD137* se correlacionó con un mayor tiempo de supervivencia en la cohorte retrospectiva.

En conclusión, el Cáncer de Ovario Seroso de Alto Grado se presenta como un tumor inmunogénico, con biomarcadores pronósticos como es el *CD137* (estimulante de los linfocitos T citotóxicos); el cual permite avanzar con nuevas aproximaciones inmunoterapéuticas para conseguir en un futuro no lejano la erradicación de esta neoplasia.

ABREVIATURAS

APC: *Célula presentadora de antígeno* **ACTB:** *Beta-Actina*

ADN: *Acido desoxirribonucleico*

ADNc: *ADN complementario*

ARN: *Ácido ribonucleico*

CCL2: *Quimiocina ligando 2*

CCL22: *Quimiocina ligando 22*

CTL: *Linfocitos T citotóxico*

CTLA4: *Linfocito T citotóxico ligado a la proteína 4*

CXCR4: *Quimiocina receptor 4*

CITS: *Carcinoma Intraepitelial Tubo ovárico Seroso*

CD4: *Linfocito T CD4*

CD8: *Linfocito T CD8*

Cq: *Ciclo de cuantificación*

CD25: *interleuquina2 receptor, alpha*

CD137: *receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 9*

CPS: *Cuerpos de Psamoma*

CTL4: *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (linfocito T asociado a proteina4)*

COSAG: *Cáncer de ovario seroso de alto grado*

CXCR4: *chemokine (C-X-C motif) receptor 4*

DC: *Célula Dendrítica*

FIGO: *Federación internacional de Ginecología y Obstetricia*

FOXP3: *Factor regulador de Transcripción*

GITR: *TNF inducido por glucocorticoide*

GUSB: *Glucoronidase beta. Beta-glucuronidasa*

HE: *Hematoxilina y Eosina*

HER2: *Receptor 2 de factor de crecimiento humano*

IDO: *Indoleamina 2, 3-dioxigenasa*

IFN γ : *Interferon γ*

IL10: *Interleuquina 10*

IL12B: *Interleuquina 12B*

IL13: *Interleuquina 13*

IL23A: *Interleuquina 23A*

IL2RA: *Interleuquina 2 receptor alpha*

IL4: *Interleuquina 4*

IL4RA: *Interleuquina 4 receptor alpha*

IL7RA: *Interleuquina 7 receptor alpha*

IL8: *Interleuquina 8*

ICOSL: *inducible T-cell co-stimulator ligand*

ICOS: *inducible T-cell co-stimulator*

IO: *Inmuno-oncología*

LGALS1: *Lectin, galactoside-binding, soluble, 1*

LGALS2: *Lectin, galactoside-binding, soluble, 2*

LGAL9: *lectin, galactoside-binding, soluble, 9*

MDSC: *Célula supresora derivada de mieloides*

MHC: *Complejo mayor de histocompatibilidad*

NK: *Natural killer*

NL: *Nódulo Linfático*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

PD1: Muerte celular programada

PDL1: Ligando muerte celular programada

PGE2: Prostaglandina E2

RB: Retinoblastoma

RT: Retotranscripción

RTqPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

SG: Supervivencia global

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

TC: Tomografía computarizada

TGFB-1: Factor de crecimiento transformante

TLP: Tiempo libre de progresión

TAM: Macrófagos asociados a tumores

TCR: T cell antigen-specific receptor

TGF β : Factor de Transformación β

TIL: Linfocito infiltrante de tumor

TILS: linfocitos infiltrantes de tumores

TKI: Inhibidores de la Tirosin-kinasa

TNM: Tumor/Nódulos/Metástasis

Treg: Células T regulatorias

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Concepto de cáncer	3
2. Cáncer de Ovario	7
2.1 Definición y datos demográficos	7
2.2 Histogénesis.....	9
2.3 Clasificación histológica.....	12
2.4 Tumores serosos.....	14
2.4.1 Tumores serosos benignos.....	14
2.4.2 Tumores serosos borderline	14
2.4.3 Carcinomas serosos	16
2.4.3.1 Carcinoma seroso de bajo grado	16
2.4.3.2 Carcinoma seroso de alto grado	17
2.5 Factores pronósticos del cáncer de ovario seroso de alto grado.....	19
2.5.1 Factores Clínicos.....	19
2.5.2 Factores anatomopatológicos.....	20
3. Perfiles Moleculares en el Cáncer de Ovario.....	21
4. Bases Inmunes en Cáncer	24
4.1 Sistema inmune y el cáncer.....	24
4.2 Inmunoregulación del cáncer.....	28
4.2.1 Factores inmunosupresores.....	28
4.2.2 Puntos de control inmunológico.....	31
4.3 Células T reguladoras	34
4.3.1 Control transcripcional de las células Tregs: FOXP3	34
4.3.2 Mecanismos moleculares de la supresión reguladora de células T	36
4.3.3 Células T regulatorias en cáncer	37
5. Sistema Inmune en el Cáncer de Ovario	39

II. OBJETIVOS	41
OBJETIVOS.....	43
III. MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Pacientes y Muestras	46
1.1 Pacientes	47
1.2 Muestras.....	47
2. Análisis de los patrones de infiltración tumoral.....	48
2.1 Grado de infiltración	48
2.2 Patrón de infiltración.....	49
2.3 Localización de la infiltración	50
3. Técnicas de Biología Molecular.....	50
3.1 Obtención de muestras y aislamiento de ARN en la cohorte retrospectiva...	50
3.2 Obtención de muestras y aislamiento de ARN en la cohorte prospectiva .	52
3.3 Cuantificación del ARN extraído en ambas cohortes.....	53
3.4 Transcripción Reversa.....	53
3.5 PCR Cuantitativa a tiempo real (RTqPCR).....	53
4. Cálculo de eficiencias de los genes analizados.....	58
5. Cuantificación relativa de la expresión génica.	59
6. Análisis estadísticos.	60
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
Capítulo I.	65
1. Características Clinicopatológicas de la Cohorte Retrospectiva	65
1.1 Características de la cohorte retrospectiva.....	65
2. Características de la infiltración linfocitaria	66
2.1 Características de la infiltración en la cohorte retrospectiva	66
3. Análisis de Expresión Génica	71

3.1 Cuantificación y valoración de la calidad del RNA de la cohorte	71
retrospectiva	71
3.2 Análisis de expresión génica relativa de la cohorte retrospectiva	72
3.3 Correlación de los genes de la cohorte retrospectiva entre ellos	79
3.4 Correlaciones de los biomarcadores con las variables clinicopatológicas ..	79
4. Análisis de Supervivencia de los Biomarcadores.....	84
4.1 Variables clinicopatológicas de la cohorte	84
2.2 Valor pronóstico del infiltrado linfocitario	88
4.3 Valor pronóstico de los genes inmunoreguladores.....	91
4.8 Análisis de supervivencia multivariante.....	94
Capítulo II	95
1. Características Clinicopatológicas de la Cohorte Prospectiva	95
1.1 Características de la cohorte prospectiva	95
2. Análisis de Expresión Génica	97
2.1 Cuantificación y valoración de la calidad del RNA de la cohorte prospectiva	97
2.2 Análisis de expresión génica relativa de la cohorte prospectiva	98
2.3 Correlaciones de los biomarcadores con las variables clinicopatológicas	102
V. CONCLUSIONES	105
VII. BIBLIOGRAFIA	109
VII. ANEXOS	131
1. Gráficas de Kaplan-Meier de la cohorte retrospectiva.....	133
2. Comunicaciones a congresos nacionales e internacionales.....	138

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. LAS DIEZ CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER	4
FIGURA 2. INCIDENCIA Y MORTALIDAD POR CÁNCER EN MUJERES EN ESPAÑA EN EL 2012.....	8
FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN EN PORCENTAJES DE LOS TUMORES EPITELIALES DE OVARIO.....	8
FIGURA 4. POSIBLE ORIGEN CÁNCER DE OVARIO EPITELIAL.....	11
FIGURA 5. VÍAS DE LA PATOGÉNESIS PROPUESTAS POR KURMAN EN EL CÁNCER DE OVARIO	12
FIGURA 6. TUMOR SEROSO BORDERLINE.....	15
FIGURA 7. IMAGEN MACROSCÓPICA TUMOR SEROSO DE ALTO GRADO.....	18
FIGURA 8. HISTOLOGÍA SEROSO DE ALTO GRADO	18
FIGURA 9. FIRMAS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN COSAG	23
FIGURA 10. MICROAMBIENTE TUMORAL	24
FIGURA 11. REPRESENTACIÓN DE LA ACUMULACIÓN INMUNE INNATA Y ADAPTATIVA EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL.....	27
FIGURA 12. INTERACCIÓN ENTRE LOS TREGS Y OTRAS CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE.....	28
FIGURA 13. MECANISMOS DE CONTROL INMUNE.....	33
FIGURA 14. DIFERENCIACIÓN DE TREGS TÍMICA E INDUCIDA.....	36
FIGURA 15. PORCENTAJE DE INFILTRACIÓN LINFOCITARIA	49
FIGURA 16. PATRÓN DE INFILTRACIÓN FOCAL Y DIFUSO.....	49
FIGURA 17. LOCALIZACIÓN DE LA INFILTRACIÓN PERITUMORAL E INTRATUMORAL	50
FIGURA 18. MECANISMO DE FLUORESCENCIA DE LAS SONDAS DE HIDRÓLISIS	54
FIGURA 19. ESQUEMA DE AMPLIFICACIÓN RT-QPCR.....	55
FIGURA 20. PATRÓN DE IN INFILTRACIÓN PERI-INTRATUMORAL	68
FIGURA 21. PATRÓN DE INFILTRACIÓN LINFOCITARIA INTRATUMORAL	68
FIGURA 22. GRADO DE DÉBIL DE INFILTRACIÓN LINFOCITARIA PERITUMORAL.....	69
FIGURA 23. GRADO INTERMEDIO DE INFILTRACIÓN LINFOCITARIA PERITUMORAL.....	69
FIGURA 24. GRADO FUERTE DE INFILTRACIÓN LINFOCITARIA PERITUMORAL.....	69
FIGURA 25. REPRESENTACIÓN DEL PATRÓN DE INFILTRACIÓN LINFOCITARIA.....	70
FIGURA 26. IMÁGEN EN LA QUE SE APRECIAN LOS CUERPOS DE PSAMOMA	70
FIGURA 27. PROGRAMA GENORM QUE EVALÚA LA ESTABILIDAD DE LOS GENES ENDÓGENOS ..	73
FIGURA 28. GRÁFICA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DE LA COHORTE RETROSPECTIVA.....	74
FIGURA 29. CORRELACIÓN ENTRE VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS Y MARCADORES DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	81
FIGURA 30. CORRELACIÓN ENTRE VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS Y MARCADORES DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	82
FIGURA 31. GRAFICA DE EXPRESIÓN DE IDO1 EN RELACIÓN CON LA RECAÍDA.....	83
FIGURA 32. GRAFICA DE EXPRESIÓN DE CD8 EN RELACIÓN CON EL GRADO HISTOLÓGICO.....	83
FIGURA 33. GRÁFICA DE KAPLAN-MEIER PARA SG CON LA EDAD.....	85
FIGURA 34. GRÁFICA DE KAPLAN-MEIER PARA SG CON LOS ESTADIOS FIGO.	86
FIGURA 35. GRÁFICA DE KAPLAN-MEIER PARA SG RESPECTO AL TRATAMIENTO..	87
FIGURA 36. GRÁFICA DE KAPLAN-MEIER PARA SG CIRUGIA	87

FIGURA 37. GRÁFICOS DE KAPLAN-MEIER PARA TLP Y SG DE ACUERDO CON LA LOCALIZACIÓN DE LA INFILTRACIÓN.....	90
FIGURA 38. GRÁFICA DE KAPLAN-MEIER PARA SG SEGÚN CON EL PATRÓN DE INFILTRACIÓN ..	91
FIGURA 39. GRÁFICA DE KAPLAN-MEIER PARA SG CD137	94
FIGURA 40. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DE LA COHORTE PROSPECTIVA.....	100
FIGURA 41. MECANISMO DE ACCIÓN DE CD137.....	101
FIGURA 42. CORRELACIÓN ENTRE VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS Y MARCADORES DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	103
FIGURA 43. MECANISMO DE ESTIMULACIÓN DEL CD137.	104
FIGURA 44. KAPLAN-MEIER PARA SG CON PD-L2, TGFB1, CD8, CD25.	133
FIGURA 45. KAPLAN-MEIER PARA SG CON IL7R, CD4, FOXP3, PD-L1	134
FIGURA 46. KAPLAN-MEIER PARA SG LGAL9, ICOS, CTLA4, ICOSL	135
FIGURA 47. KAPLAN-MEIER PARA SG Y TLP EN CXCR4, IDO1, PD-1, TNFRSF4.....	136
FIGURA 48. KAPLAN-MEIER PARA SG Y TLP EN OX40 Y CD137	137

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES EPITELIALES DE OVARIO	13
TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE ESTADIFICACIÓN PARA EL CÁNCER DE OVARIO, TROMPA DE FALOPIO Y PERITONEO TNM DE LA FIGO 2014.....	20
TABLA 3. CONCENTRACIONES MÁSTER MIX PARA EL AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	51
TABLA 4. CONCENTRACIONES PARA DIGESTIÓN CON DNASA	51
TABLA 5. PROGRAMA DE TIEMPOS Y TEMPERATURAS UTILIZADOS POR LA TRANSCRIPCIÓN REVERSA.....	53
TABLA 6. GENES DE REFERENCIA UTILIZADOS COMO CONTROLES ENDÓGENOS.....	56
TABLA 7. SONDAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO.....	56
TABLA 8. COMPONENTES DE LA MÁSTER MIX PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA RT-QPCR POR CADA CASO A ANALIZAR.....	57
TABLA 9. PROGRAMA DE CICLOS EMPLEADOS PARA LA RTQPCR	58
TABLA 10. CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LA COHORTE RETROSPECTIVA	66
TABLA 11. CARACTERÍSTICAS DE LA INFILTRACIÓN COHORTE RETROSPECTIVA	67
TABLA 12. CUANTIFICACIÓN DEL RNA COHORTE RETROSPECTIVA.....	72
TABLA 13. CORRELACIÓN DE BIOMARCADORES CON VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS	80
TABLA 14. ESTUDIO UNIVARIANTE DE REGRESIÓN DE COX.....	84
TABLA 15. ANÁLISIS DEL INFILTRADO LINFOCITARIO	88
TABLA 16. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA BASADO EN BIOMARCADORES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN CÁNCER DE OVARIO SEROSO DE ALTO GRADO	92
TABLA 17. ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE COX MULTIVARIANTE PARA TLP	95
TABLA 18. ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE COX MULTIVARIANTE PARA SG	95
TABLA 19. CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LA COHORTE PROSPECTIVA	96
TABLA 20. CUANTIFICACIÓN DEL RNA COHORTE RETROSPECTIVA.....	98
TABLA 21. CORRELACIÓN DE BIOMARCADORES CON VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS	102

I. INTRODUCCIÓN

1. Concepto de cáncer

El término cáncer engloba a un gran número de patologías que tienen en común un crecimiento celular descontrolado y una diseminación no jerarquizada de células anormales (Hanahan y Weinberg, 2000). El proceso de la carcinogénesis implica cambios dinámicos en el genoma que llevan a la transformación de células, de manera que escapan a los mecanismos homeostáticos que controlan la proliferación y pierden la interacción normal con el microambiente que las rodea (Hanahan y Weinberg, 2011).

Este proceso se caracteriza por una elevada inestabilidad genómica, así como por un crecimiento desordenado de las células neoplásicas en el tejido, que da lugar a la formación de una masa, conocida como tumor, que ha perdido la arquitectura tisular. Además, estas células pueden adquirir la capacidad de migrar a otros tejidos con el fin de establecerse en nuevos nichos y proliferar, dando lugar a la metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000, 2011).

La acumulación de mutaciones, debido a la inestabilidad genómica a la que están sometidas las células tumorales, supone una ventaja adaptativa para estas células y permite la adquisición de nuevas propiedades. En la actualidad, existe un consenso sobre las características distintivas que deben de presentarse en un tejido para que sea considerado tumoral. En el año 2000, Hanahan and Weinberg propusieron seis características esenciales para la transformación de un tejido normal a tumoral, conocidas como los “*hallmarks*” del cáncer: potencial replicativo ilimitado, independencia de las señales de crecimiento, insensibilidad a inhibidores de crecimiento, evasión de la apoptosis, angiogénesis mantenida y capacidad de invasión o metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000).

Algunos años más tarde, los mismos autores propusieron cuatro nuevas propiedades: la inestabilidad genómica, la alteración del metabolismo energético, capacidad proinflamatoria y evasión del sistema inmunitario ([figura 1](#)) (Hanahan y Weinberg, 2011).

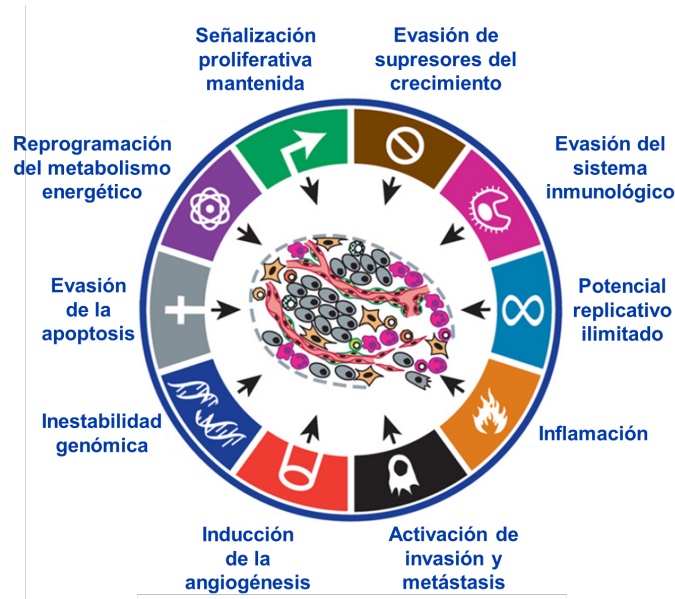


Figura 1. Las diez características del cáncer. Esta ilustración representa las capacidades de las células cancerosas que es propuesto por Hanahan y Weinberg. Un ejemplo es la capacidad de las células cancerosas para evadir la destrucción inmunológica, en particular por linfocitos T y B, macrófagos y células asesinas naturales. También de gran importancia es la inflamación producida por las células inmunes innatas. Reproducido de Hanahan y Weinberg, 2011 (Hanahan y Weinberg, 2011).

1. Señalización Proliferativa Mantenido. Las células normales requieren señales mito-génicas para pasar de un estado quiescente a un estado proliferativo. Estas señales son transmitidas al interior celular (transducción) mediante receptores transmembrana a los que se unen diferentes tipos de moléculas de señalización o comunicación intercelular como factores de crecimiento solubles y componentes de la matriz celular, entre otros. En ausencia de estas señales estimuladoras, las células normales no pueden crecer. Por el contrario, las células tumorales pueden crecer sin necesidad de que se produzcan dichas interacciones, ya que o bien generan muchas de sus propias señales de crecimiento o bien activan intrínsecamente a los receptores transmembrana en ausencia de ligando, reduciendo así su dependencia de la estimulación desde el microambiente del tejido normal.
2. Evasión de supresores de crecimiento. Múltiples señales antiproliferativas funcionan en las células normales para mantener la quiescencia celular y la homeostasis tisular. Por ejemplo, las señales inhibitorias del crecimiento son finalmente canalizadas a través de la proteína retinoblastoma (*RB1*). A nivel molecular el gen *RB1* juega un

papel muy importante, por eso en muchos tumores aparece mutado. En las células neoplásicas la disrupción de la vía de *RB1* permite la liberación de factores de transcripción que controlan la expresión de genes esenciales para la progresión desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Esto permite la proliferación celular y hace a las células insensibles frente a los factores que evitan el crecimiento y que normalmente actúan a lo largo de esta vía.

3. Evasión de la apoptosis. La capacidad de las poblaciones de células tumorales para expandirse en número está determinada por una ratio entre mitosis y muerte celular por necrosis o apoptosis (muerte celular programada). La resistencia a la apoptosis por parte de las células tumorales puede darse según diferentes estrategias, siendo la más común la pérdida de función del regulador proapoptótico TP53, debido a mutaciones en dicho gen. De esta manera se consigue eliminar un componente clave que induce la apoptosis cuando se detecta daño en el ADN.
4. Potencial replicativo ilimitado. Las células de mamíferos poseen un programa intrínseco que limita el número de divisiones celulares que puedan ocurrir (60-70 duplicaciones), el límite de Hayflick, pasado el cual, dichas células detienen su crecimiento e inician un proceso denominado senescencia (Hayflick, 2000). La senescencia en las células normales es producida debido a la pérdida de la función protectora de los telómeros. En cambio, en las células neoplásicas se ha evidenciado el mantenimiento de la longitud de los telómeros en la mayoría de tipos de cáncer (Shay y Bacchetti, 1997) debido a una mayor actividad de la enzima telomerasa.
5. Angiogénesis sostenida. La angiogénesis forma parte también de las principales características de las células tumorales, descritas ya en el año 2000 por Hanahan y Weinberg. El aporte de oxígeno y nutrientes es esencial para la función y supervivencia celular. Por ello, la generación de nuevos vasos sanguíneos es imprescindible para que el tumor pueda crecer más allá de 1-2 mm³ (Folkman, 2003). La angiogénesis está regulada por el equilibrio entre factores inductores y factores inhibidores. Los tumores tienen la capacidad de activar la angiogénesis inclinando la balanza a favor de los inductores de este proceso.

6. Invasión tisular y metástasis. La capacidad de invasión permite a las células neoplásicas escapar de la masa tumoral primaria y colonizar otras partes del cuerpo (metástasis). Al igual que en el tumor primario, el éxito en estos procesos depende de la adquisición de las cinco características anteriores. Los procesos de invasión y metástasis son extremadamente complejos, implicando cambios en las relaciones físicas entre las células y su microambiente y la activación de las proteasas extracelulares.
7. Inestabilidad genómica y mutación. La adquisición de las múltiples alteraciones mencionadas anteriormente depende en gran medida de una sucesión de alteraciones en el genoma de las células neoplásicas. Los sucesivos pasos de la progresión tumoral pueden ser entendidos como una secuencia de expansiones clonales, cada una de las cuales es provocada por la adquisición de un genotipo mutante favorable que resulta en una ventaja selectiva.
8. Inflamación. Está demostrado que la generación de sustancias químicas muy reactivas que acompañan a la inflamación tiene un marcado papel genotóxico en las células. Además, se ha constatado que tejidos crónicamente inflamados son más susceptibles a desarrollar tumores. La inflamación es evidente en muchos casos en estadios tempranos del cáncer y por ello, se ha incluido como otro de los puntos esenciales del proceso neoplásico. Sustentan esta inclusión, estudios que demuestran que ciertos mecanismos relacionados con la inflamación producen inestabilidad genética permitiendo la acumulación de alteraciones moleculares.
9. Reprogramación del metabolismo energético. La enfermedad neoplásica no solo implica la desregulación del control de la proliferación celular, sino también los ajustes correspondientes en el metabolismo energético con el fin de estimular el crecimiento y la división celular. Otto Warburg fue el primero en observar una característica anómala en el metabolismo energético de las células cancerosas que denominó “glicólisis aerobia” (Koppenol, Bounds y Dang, 2011). Este tipo de metabolismo parece estar presente también en tejidos embrionarios, lo que apoya su importancia en los programas de gran escala biosintética que se requieren para la proliferación celular activa.

10. Evasión del sistema inmunológico. La aparición de tumores parece reflejar, de alguna manera, que las células cancerosas han logrado evitar la detección por parte del sistema inmune o han sido capaces de limitar el alcance de la destrucción inmunológica y por tanto de evadir su erradicación. De manera simplificada se podría decir que las células cancerosas altamente inmunogénicas pueden evadir la destrucción inmunológica mediante la desactivación de componentes del sistema inmune que han sido enviados para eliminarlas.

2. Cáncer de ovario

2.1 Definición y datos demográficos

Los carcinomas de ovario representan cerca del 30% de los tumores malignos del aparato genital femenino, representando el segundo tipo de cáncer más frecuente tras los tumores de endometrio (Travis y Brambilla, 2014). En Europa, constituye la séptima neoplasia maligna más frecuente y la quinta con mayor mortalidad (SEOM, 2017). La supervivencia global a los 5 años es cerca del 50%, dependiendo de diversos factores que se discutirán más adelante; entre los que cabe destacar el estadio de la enfermedad, el tipo histológico o el grado de diferenciación, entre otros. Las estadísticas son similares en otros países desarrollados: en los Estados Unidos se documentó que, en el 2018, habrá aproximadamente 22.240 nuevos casos de cáncer de ovario diagnosticado y 14.070 muertes por esta causa (Ligament, 2018). El cáncer de ovario representa solo el 2.5% de todos los casos de cáncer en la mujer representando esto el 5% de muertes debido a la baja tasa de supervivencia (van Nagell *et al.*, 2013; Ligament, 2018). Los tumores de ovario representan en España el octavo cáncer en frecuencia en las mujeres mientras que supone la sexta causa de muerte por cáncer, siendo el tumor ginecológico con mayor índice de mortalidad (Ferlay *et al.*, 2015). En 2012 se diagnosticaron 3236 nuevos cánceres de ovario en España, representando el 3.7% de los tumores malignos en las mujeres (figura 2) (SEOM, 2017). Respecto a la mortalidad, supone un 4.8% de las muertes por cáncer en mujeres, produciendo 1878 fallecimientos anual (SEOM, 2017) (figura 2).

INTRODUCCIÓN

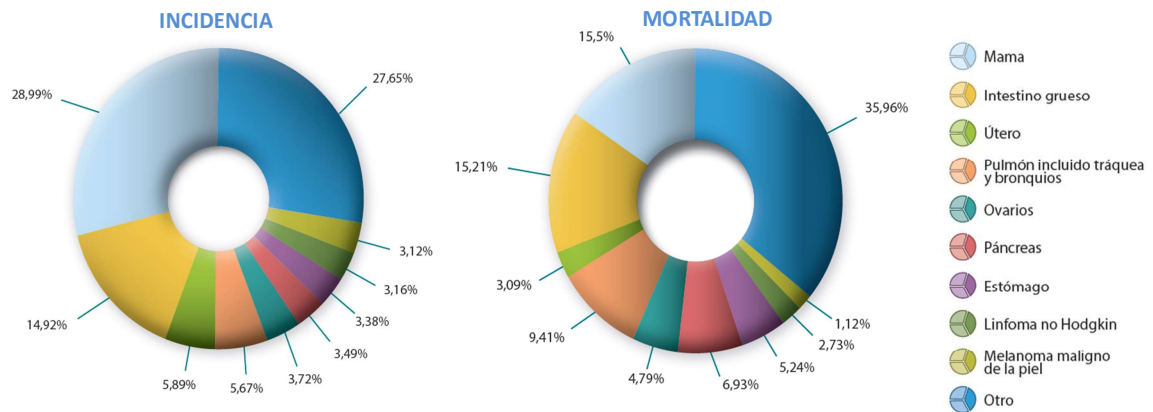


Figura 2. Incidencia y Mortalidad por cáncer en mujeres en España en el 2012 (SEOM, 2017).

El cáncer de ovario puede ser clasificado en 3 tipos de acuerdo al origen del mismo: germinales, estromales y epiteliales, este último representa el 90% y se origina en el epitelio superficial o cortical que recubre el ovario, también llamado epitelio cúbico simple. Este cáncer representa la quinta causa de muertes relacionadas por cáncer en todo el mundo, con aproximadamente 225.500 nuevos diagnósticos por año y una mortalidad que supera el 30% (Mignogna *et al.*, 2016). Dentro del tipo epitelial encontramos los subtipos: seroso de alto grado, seroso de bajo grado, mucinoso, endometroide y el de células claras. El cáncer de ovario seroso de alto grado (COSAG) es el histotipo más agresivo, y representa el 70% de todos los carcinomas de ovario (figura 3) (Seidman *et al.*, 2004; Köbel *et al.*, 2010).

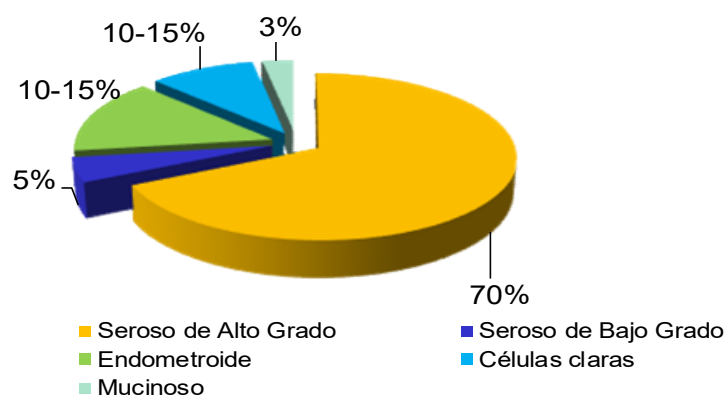


Figura 3. Distribución en porcentajes de los tumores epiteliales de ovario; destacando que más del 70% de los tumores son serosos de alto grado.

2.2 Histogénesis

La hipótesis más aceptada hasta hace poco sobre el origen de los tumores epiteliales de ovario, es que se originan del epitelio de superficie ovárica o germinal, es decir; el mesotelio especializado que recubre el ovario (Auersperg *et al.*, 2001). Esto debido a que el ovario no posee otro elemento epitelial de forma fisiológica del que se puedan originar estos tumores. En su mayor parte, los tumores epiteliales de ovario no se originan directamente del epitelio de superficie, sino de quistes y glándulas producidas por la invaginación de este en el estroma ovárico, que se producen tras la ovulación o pequeñas adherencias inflamatorias o tras procesos reparadores. Estos quistes de inclusión sufrirían un proceso de metaplasia de tipo mulleriano, el epitelio incluido queda expuesto de forma directa a la acción hormonal del estroma ovárico, hecho que no se produce en el epitelio de superficie ya que está separado del mismo por la túnica albugínea. Es así que se sabe que la ovulación puede jugar un papel crítico en la carcinogénesis ovárica (Berchuck y Carney, 1997). Es por esta razón que a nivel experimental se ha conseguido generar tumores a partir de las células epiteliales de la superficie del ovario igualmente, se podría explicar la existencia de los diversos tipos histológicos dado que en el epitelio de superficie se pueden observar focos de metaplasia mulleriana. Asimismo, la observación de lesiones displásicas en el epitelio de superficie adyacente a los tumores apoyaba que pudiera tratarse del lugar de donde se originaban los mismos. Sin embargo, en contra de esta teoría, estaba el hecho de que, dado que el epitelio de superficie del ovario es un mesotelio modificado, los tumores que se originaban en el mismo no se parecían ni morfológicamente ni inmunofenotípicamente a los originados en el mesotelio (Dubeau, 1999; Auersperg, Woo y Gilks, 2008).

La carcinogénesis ovárica está determinada predominantemente por factores hormonales asociados a la reproducción y a la ovulación. Tradicionalmente se ha considerado que el carcinoma de ovario surgía tras la malignización del epitelio celómico que recubre la superficie ovárica (Auersperg, Woo y Gilks, 2008). En 1971 Fathalla postuló que la ovulación ocasiona una acumulación continua de

INTRODUCCIÓN

anormalidades genómicas que generaría un microambiente caracterizado por la secreción anómala de hormonas y de diversos factores de crecimiento favorecedor de la carcinogénesis (Fathalla, 1971).

No obstante, el origen celómico del cáncer de ovario es un tema muy controvertido, y aún no se han identificado las potenciales células precursoras. Por contra, cada vez es mayor la evidencia de que los carcinomas de ovario, de trompa de Falopio y el carcinoma peritoneal primario podrían tener un origen común derivado de tejidos embrionariamente procedentes de los conductos mullerianos, un origen embrionario diferente que el propio ovario. Estudios de investigación básica confirman que los carcinomas de ovario expresan los genes HOX, implicados en procesos embrionarios del aparato reproductor (Cheng *et al.*, 2005). En condiciones normales, los genes HOX se expresan en las células epiteliales de las trompas de Falopio, endometrio y endocérvix, pero no se expresan en el epitelio ovárico. Estos hallazgos apoyan la idea de que el carcinoma de ovario se podría originar a partir del epitelio mulleriano en lugar del epitelio celómico (figura 4). Actualmente se sabe que el puntaje de riesgo basado en la expresión génica *HOXA4 / HOXB3* puede ser útil para la estratificación del riesgo pronóstico en los cáncer de ovario específicamente serosos de alto grado (Miller *et al.*, 2018).

Se cree que muchos COSAG de la pelvis se originan en el parte distal de la trompa de Falopio. Las lesiones del carcinoma intraepitelial tubárico seroso (CITS) son el precursor de COSAG e identificable en >50% de los casos avanzados. Los datos sugieren que las características moleculares de COSAG con y sin lesiones CITS asociadas, son mayormente compartidas, lo que indica un origen biológico común, probablemente de la trompa de Falopio distal entre todos los casos (Ducie *et al.*, 2017)

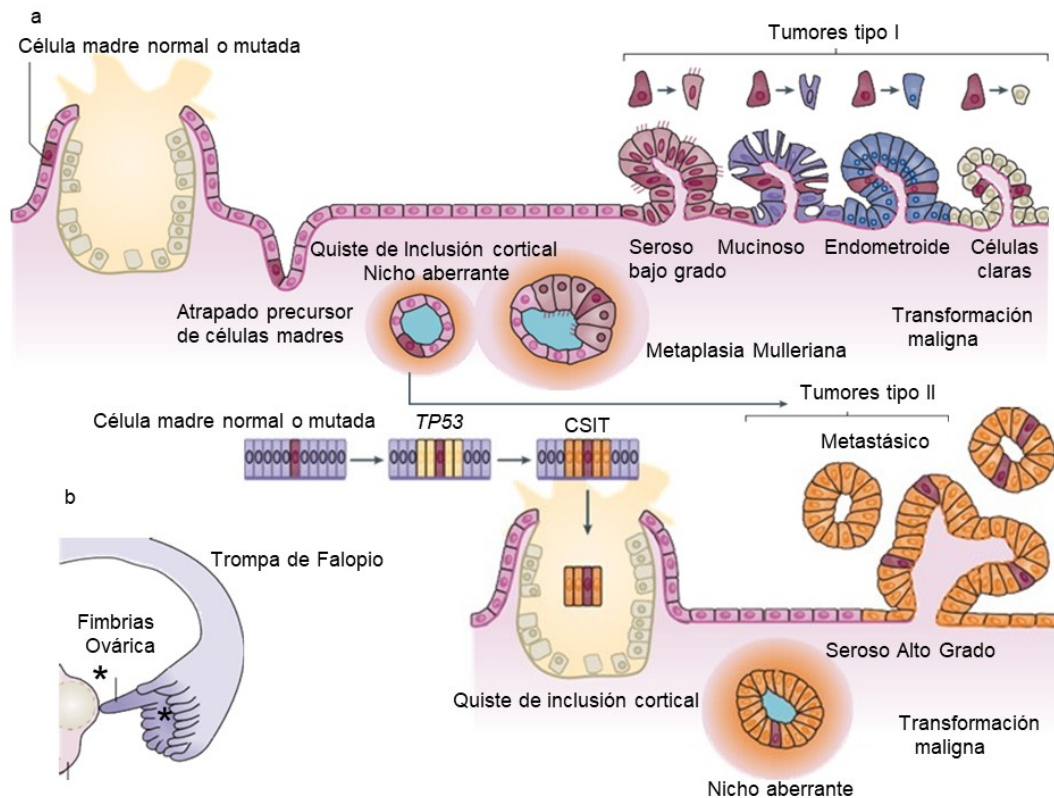


Figura 4. Posible Origen Cáncer de Ovario Epitelial: (a) Se muestra una supuesta célula madre del epitelio de superficie ovárica (CMO) como célula de origen del cáncer de ovario (CO). Durante la ovulación incesante, una célula madre de CMO normal o mutada (rosa oscuro) queda atrapada dentro de la corteza del ovario para formar un quiste de inclusión cortical. La célula madre atrapada se expone a señales paracrinas aberrantes desde el nicho estromal activado (área naranja) y/o señales autocrinas dentro de la luz quística (área gris). Así mismo con el tiempo, la célula madre atrapada se somete a metaplasia mulleriana, seguida de transformación maligna. Dependiendo de la naturaleza de las señales del nicho y la adquisición de mutaciones críticas, la CMO transformada se diferencia a lo largo de diferentes linajes mullerianos para generar los diferentes tipos de células en CO tipo I. Los tumores de tipo II, a la inversa, surgen de novo de los quistes de inclusión corticales (o de las fimbrias, ver parte b). Se muestra una célula madre fimbrial putativa como una célula de origen de carcinoma seroso de alto grado (HGSC). Una célula madre (rosa oscuro) en la fimbria o fimbrias ováricas (marcada con *) desarrolla una mutación TP53, seguido del desarrollo del carcinoma intraepitelial seroso de trompa (CSIT). Durante la ovulación, la célula (o células) CSIT se desprende y queda atrapada dentro de la corteza del ovario para formar un quiste de inclusión cortical. La exposición al nicho estromal activado (área naranja) y/o señales autocrinas dentro de la luz quística (área gris) inducen a la carcinogénesis y metástasis en el seroso de alto grado.

Los tipos de tumores que se originan a partir de este epitelio son los de tipo seroso que incluye diversas tipologías con vías patogénicas diferentes. Kurman propone 2 vías: el tipo I que originaría los carcinomas de bajo grado y el tipo II que origina los carcinomas

de alto grado a partir de la mutación del gen *TP53*. En ambas vías estarían implicados mecanismos moleculares diferentes como se tratará más adelante (Kurman y Shih, 2010, 2016) (figura 5).

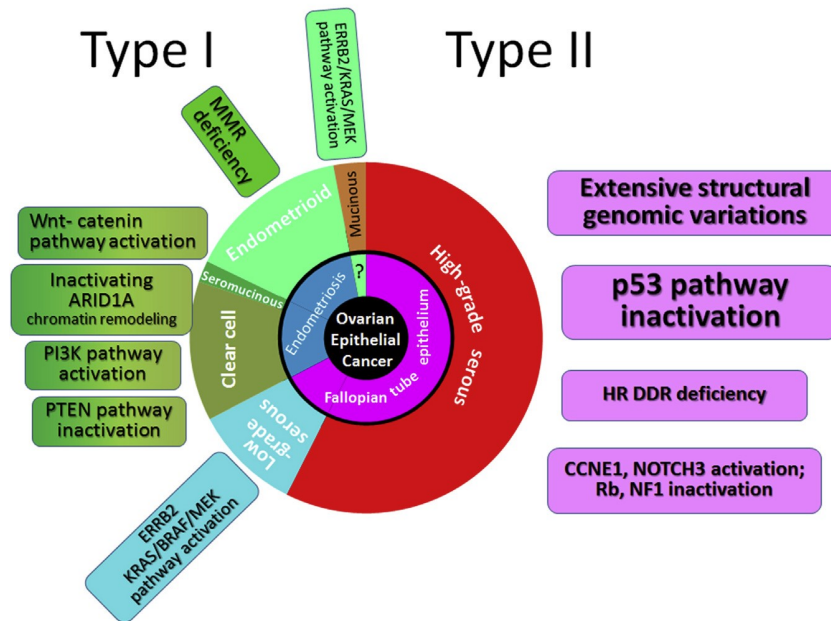
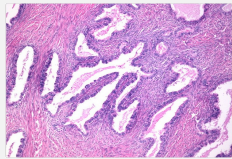
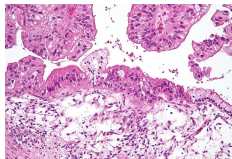
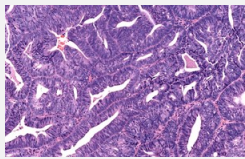
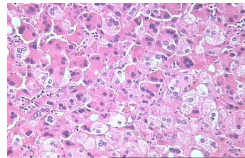
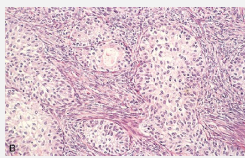
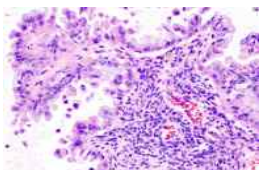


Figura 5. Vías de la patogénesis propuestas por Kurman en el cáncer de ovario (Kurman y Shih, 2016).

2.3 Clasificación histológica

La clasificación de los tumores de ovario es fundamentalmente morfológica con aspectos relacionados por su origen e histogénesis como ha sido mencionado anteriormente (Bast, Hennessy y Mills, 2009). La clasificación actual está basada por 3 tipos principales en consonancia a los tejidos que conforman el ovario; dando origen a las distintas neoplasias: epiteliales, células germinales y estroma ovárico especializado. La clasificación actualmente aceptada es la establecida por la OMS (Organización Mundial de la Salud) en 2014 (Travis y Brambilla, 2014; Kurman y Shih, 2016), limitada a los tumores epiteliales (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los tumores epiteliales de ovario (OMS 2014)(Travis y Brambilla, 2014)

Tumores del epitelio de superficie-estroma	
Benignos <ul style="list-style-type: none"> • Cistoadenoma seroso • Adenofibroma seroso • Papiloma seroso de superficie Tumores Borderline <ul style="list-style-type: none"> • Tumor seroso borderline / tumor seroso proliferante atípico • Tumor seroso borderline variante micropapilar / C. seroso de bajo grado no invasivo Malignos <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma seroso de bajo grado • Carcinoma seroso de alto grado 	
Tumores Mucinosos	
Benignos <ul style="list-style-type: none"> • Cistoadenoma mucinoso • Adenofibroma mucinoso Tumores Borderline <ul style="list-style-type: none"> • Tumor mucinoso borderline / Tumor mucinoso proliferante atípico Malignos <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma mucinoso 	
Tumores Endometrioides	
Benignos <ul style="list-style-type: none"> • Quiste endometriósico • Cistoadenoma endometriode • Adenofibroma endometriode Tumores Borderline <ul style="list-style-type: none"> • Tumor endometriode borderline / endometriode proliferante atípico Malignos <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma endometriode 	
Tumores de Células Claras	
Benignos <ul style="list-style-type: none"> • Cistoadenoma de células claras • Adenofibroma de células claras Tumores Borderline <ul style="list-style-type: none"> • Tumor de células claras borderline / células claras proliferante atípico Malignos <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma de células claras 	
Tumores de Brenner	
Benigno <ul style="list-style-type: none"> • Tumor de Brenner Tumores Borderline <ul style="list-style-type: none"> • Tumor de Brenner borderline / Tumor de brenner proliferante atípico Malignos <ul style="list-style-type: none"> • Tumor de Brenner maligno 	
Tumores Seromucinosos	
Benigno <ul style="list-style-type: none"> • Cistoadenoma mucinoso • Adenofibroma seromucinoso Borderline <ul style="list-style-type: none"> • Tumor seromucinoso borderline / seromucinoso proliferante atípico Malignos <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma seromucinoso 	
Carcinoma Indiferenciado	

2.4 Tumores serosos

Los tumores serosos son los tumores epiteliales más frecuentes (representando un 90% de todos los casos de cáncer epitelial de ovario), el 5% de ellos son benignos y el 85% malignos (Kurman y Shih, 2016).

2.4.1 Tumores serosos benignos

Los tumores benignos son más frecuentes en mujeres con una edad comprendida entre los 20 y 50 años, siendo 20% de dichos tumores bilaterales. Los tumores serosos benignos suelen diagnosticarse en la 3ª-5ª década de la vida pudiendo ser bilaterales en 20% de los casos ya sea quísticos, papilares y adenofibromatosos (Guleria, Jensen y Kjær, 2018). Los tumores serosos benignos pueden presentar un tamaño grande y ser uni o multilobulados, presentan un epitelio similar al que encontramos en la trompa de falopio, observándose cilios en la mayoría de los casos. Cuando tienen abundante estroma fibroso, se denominan adenofibromas que les concierne una característica más sólida. Contrariamente, cuando crecen de forma papilar y típicamente de forma exofítica se denominan papilomas serosos de superficie (Guleria, Jensen y Kjær, 2018) que son lesiones totalmente benignas, pudiendo reaparecer después de la extirpación quirúrgica. Aunque estos tumores se comportan como benigno, pueden confundirse con los serosos de alto grado clínica y/o radiológicamente debido a su morfología macroscópica, así como a su presentación clínica y progresión de manera indolente con un comportamiento metacrónico durante años (Shukla *et al.*, 2018).

2.4.2 Tumores serosos *borderline*

Este tipo de tumores vienen caracterizados por ser no invasivos y con una tasa de proliferación epitelial con atipias mayor a la que se encuentran en los tumores benignos (Malpica y Longacre, 2018). Se presentan en mujeres jóvenes siendo la edad media de aparición los 40 años (Mink, Sherman y Devesa, 2002). Generalmente son

lesiones quísticas en un 50% bilaterales y caracterizadas por tener un gran tamaño mayor que los serosos benignos (Tumors *et al.*, 2005). Habitualmente muestran un patrón de evolución papilar intraquístico y en ocasiones se presentan en la superficie del ovario asociado a implantes peritoneales (figura 6).

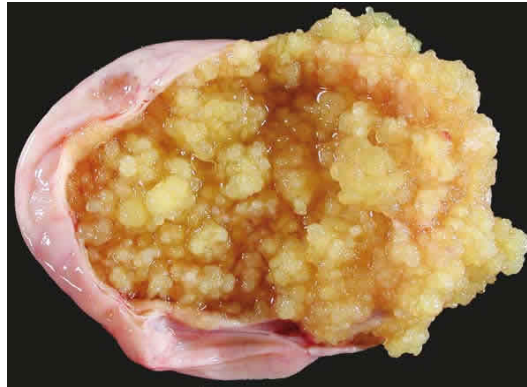


Figura 6. Tumor seroso borderline. Crecimiento intraquístico de papilas finas, edematosas y cohesivas (Prat Díaz de Losada, 2007).

En la clasificación de la OMS de 2014 (Hauptmann *et al.*, 2014), describen 2 tipos de tumores *borderline* por su patrón de crecimiento: el patrón clásico y el patrón micropapilar. En el patrón de crecimiento clásico se evidencian papilas de crecimiento de mayor a menor, es decir; papilas que se van subdividiendo en papilas de menor tamaño de forma progresiva. Histológicamente, las papilas están revestidas por un epitelio de tipo cilíndrico o cúbico, en el que se pueden ver cilios. También pueden identificarse focos de microinvasión del estroma. En ellos se observan células con mayor citoplasma, de aspecto eosinófilo y con un frecuente artefacto de retracción y que pueden ocupar como máximo un área de 5mm. Estas áreas pueden encontrarse en hasta el 10% de tumores borderline sin tener impacto en el curso clínico de la enfermedad (Hauptmann *et al.*, 2017). Otras veces, puede detectarse reacción desmoplásica del estroma, pasando a denominarse carcinomas microinvasivos, aunque no se sabe cuál es el impacto pronóstico de este grupo.

En estos tipos tumorales se pueden encontrar implantes peritoneales que pueden ser de 2 tipos: no invasivos y los invasivos. Los no invasivos se han subclasificado en implantes de tipo epitelial cuando forman estructuras papilares y de tipo desmoplásico cuando son grupos de células en un estroma reactivo; este tipo de tumores en los

estadios I se comportan de una manera similar a los tumores benignos (Shiraki *et al.*, 1992). Los implantes invasivos presentan infiltración destructiva de la zona donde se asientan y es importante diferenciarlos de los no invasivos, dado que se asocian a recidivas en un 65% de los casos respecto a los no invasivos que lo hacen en un 14% de los casos (Bell, Smith Sehdev y Kurman, 2001), y a un mayor índice de recurrencia con una supervivencia de 95% (Qian *et al.*, 2018). Solo un 5% de los tumores borderline evolucionan a carcinomas serosos de bajo grado teniendo un comportamiento más agresivo disminuyendo así la supervivencia (Tumors *et al.*, 2005; Hauptmann *et al.*, 2017).

En referencia a los tumores borderline con patrón micropapilar o carcinoma no invasivo de bajo grado que se especifican en la clasificación de la OMS 2014, estos se caracterizan por un patrón de crecimiento en el cual se visualizan unas papilas de mayor calibre que en el patrón clásico, de la que se originan múltiples crecimientos papilares de pequeño tamaño, y se comparan con la “cabeza de medusa” los cuales pueden tener también un patrón cribiforme y atipia moderada (Cisterna y Orellana, 2007). Para hacer este diagnóstico se requiere que uno de estos patrones sea observado en >5mm o en el 10% del tumor. La importancia de este diagnóstico radica en que estos tumores se asocian con más frecuencia a implantes invasivos y tienen peor pronóstico que las formas típicas (Gershenson *et al.*, 1998; Cisterna y Orellana, 2007).

2.4.3 Carcinomas serosos

2.4.3.1 Carcinoma seroso de bajo grado

El cáncer seroso de bajo grado generalmente se presenta a una edad más temprana que el seroso de alto grado, sin embargo; es un precursor de los de alto grado (Gershenson, 2011). La edad media en el momento del diagnóstico para las pacientes con este tipo de cáncer es de 55 años, que es de aproximadamente 7-10 años más joven que las pacientes con cáncer seroso de alto grado (Romero *et al.*, 2013; Press,

2014) y generalmente este tipo de tumores tiene una presentación clínica bilateral (Hauptmann *et al.*, 2010).

Es un carcinoma invasivo que muestra atipia citológica baja y que representa la progresión de un tumor borderline de tipo micropapilar (Alli y Ali, 2002). Son poco frecuentes y representan el 5% de los carcinomas serosos (Parker *et al.*, 2004). La edad de aparición es similar a los tumores borderline y unos 10 años menor que los carcinomas de alto grado (Dehari *et al.*, 2007). En bastantes casos es posible encontrar áreas de tumor *borderline*, aunque el tumor puede presentar patrones diversos, siendo habitual encontrar células aisladas o pequeños nidos de células tumorales infiltrando un estroma reactivo. Con frecuencia se observan cuerpos de “Psamoma” lo cual son microcalcificaciones caracterizadas en el microscopio como anillos concéntricos endurecidos, signos de inflamación crónica (Hauptmann *et al.*, 2010). No se encuentran características que se asocien a agresividad tumoral como necrosis, atipias marcadas o elevado número de mitosis. Estos tumores si están limitados al ovario presentan buen pronóstico, con supervivencias del 95% a los 5 años. Si afectan otras localizaciones el pronóstico es malo dado que no responden a la quimioterapia (Dehari *et al.*, 2007).

2.4.3.2 Carcinoma Seroso de Alto Grado (COSAG)

Es el carcinoma de ovario más frecuente representando el 70% de los mismos, la edad media de presentación es de 60 años siendo más frecuente en países occidentales (Ferlay *et al.*, 2015). Suelen presentarse como masas ováricas de tamaños variables, sólido-quísticas y que suelen mostrar áreas de necrosis y hemorragia (figura 7). En la mayoría de los casos la enfermedad ya se extiende fuera del ovario en el momento del diagnóstico (Peres *et al.*, 2018).

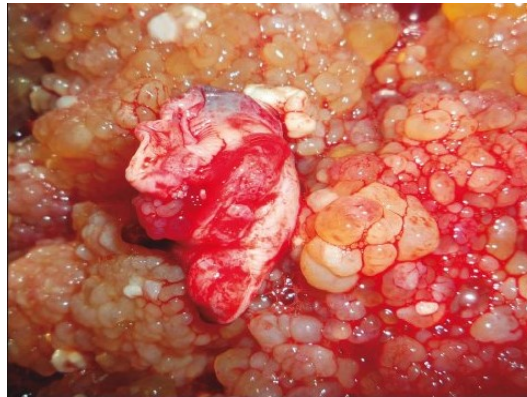


Figura 7. Imagen macroscópica Tumor Seroso de Alto Grado caracterizado por áreas de calcificación y hemorragias (Torrico Aponte William, 2011)

Son tumores que pueden mostrar diversos patrones de crecimiento, siendo el papilar el más característico, pero puede ser sólido o glandular, formando hendiduras que típicamente se ramifican, con estroma escaso a desmoplásico; ocasionalmente áreas mixoides (Auersperg, 2013). Las células presentan marcada atipia con presencia de núcleos pleomórficos y multinucleados de forma aislada (figura 8) (Karst y Drapkin, 2010; Kroeger y Drapkin, 2017).

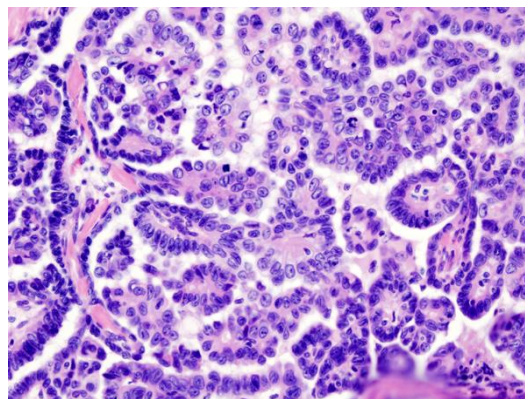


Figura 8. Histología Seroso de Alto Grado (40x) se describe patrón papilar, estroma escaso y núcleos pleomórficos

Con frecuencia estos tumores causan afectación de los espacios linfáticos, conllevando a metástasis en etapas tempranas de la enfermedad. Un elemento típico de los carcinomas serosos son unas microcalcificaciones intratumorales denominadas cuerpos de “Psamoma”, presentes hasta en un 60% en las formas tumorales bien diferenciadas, un 10% en los de grado 2-3, asociándose, por tanto, a buen pronóstico (Alli y Ali, 2002).

2.5 Factores pronósticos del cáncer de ovario seroso de alto grado

En el cáncer de ovario seroso de alto grado se describen 3 grupos de factores pronósticos (clínicos, anatomopatológicos y moleculares) aunque el estadio y la cantidad de tumor residual están reconocidos como factores con capacidad pronóstica independiente al momento del tratamiento adyuvante (Cannistra y Cannistra, 2011).

2.5.1 Factores Clínicos

2.5.1.1 Edad

La mayoría de los casos de COSAG ocurren después de la menopausia, y especialmente en mujeres mayores de 63 años. Siendo infrecuente antes de los 40 años. Se ha determinado que pacientes mayores de 63 años tienen peor pronóstico (Önal, 2017). Es así que en las mujeres jóvenes a las que se les diagnostican en estadios más precoces, grados histológicos más bajos y con menor enfermedad residual tras la cirugía se asocia a mejor pronóstico (Bhoola y Hoskins, 2006).

2.5.1.2 Estadio clínico (FIGO)

En el COSAG a medida que las etapas iniciales progresa, la supervivencia a 5 años disminuye (Satoshi y Ochiai, 2007). El estadio clínico es el principal factor pronóstico que determina la supervivencia (Prat y FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2015). El estadio clínico se basa en el resultado de las exploraciones clínicas, de la laparotomía y del estudio anatomopatológico reglado (Bois *et al.*, 2009; Prat y FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2015) (tabla 2). El parámetro usado para determinar el estadio es el de la Federación Internacional de Obstetricia y Ginecología (FIGO) y el sistema TNM [La T se refiere al tamaño y extensión del tumor principal, la N se refiere a los ganglios (o nódulos) linfáticos cercanos, la M metástasis] de la UICC Unión Internacional para el control del cáncer (Prat y FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2015). Representa uno de los parámetros más importantes para establecer el pronóstico de estos carcinomas y condiciona el tratamiento que va a recibir la paciente (Heintz *et al.*, 2003).

Tabla 2. Clasificación de estadificación para el cáncer de ovario, trompa de falopio y peritoneo TNM de la FIGO 2014 (Prat y FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2015)

Estadio	Descripción
IA	Tumor limitado a 1 ovario/trompa con cápsula intacta, no tumor en la superficie ni células malignas en LA ó LP
IB	Igual a IA, pero limitado a los dos ovarios/trompa
IC	Tumor limitado a 1 o los 2 ovarios/trompas de Falopio: IC1: rotura de la capsula durante la cirugía IC2: rotura de la capsula antes de la cirugía o tumor en la superficie del ovario/trompa IC3: células tumorales en el LA o lavado peritoneal
IIA	Extensión y/o implantes en útero y/o trompas de falopio y/o ovarios
IIB	Extensión a otros tejidos pélvicos intraperitoneales
IIIA1	Sólo ganglios retroperitoneales positivos (citológica or histológicamente confirmado): IIIA1(i) Metástasis hasta 10mm IIIA1(ii) Metástasis > 10mm
IIIA2	Afectación peritoneal microscópica extrapélvica +/- ganglios retroperitoneales positivos
IIIB	Afectación peritoneal macroscópica extrapélvica ≤ 2cm, +/- ganglios retroperitoneales positivos
IIIC	Afectación peritoneal macroscópica extrapélvica > 2cm, +/- ganglios retroperitoneales positivos (cápsula hepática y esplénica)
IVA	Derrame pleural con citología +
IVB	M1 hepáticas/esplénicas Parenquimatosas M1 en órganos extra-abdominales (incluidos ganglios inguinales y ganglios fuera de la cavidad abdominal)

2.5.1.3 Tumor residual

Representa el volumen de tumor que queda tras el tratamiento quirúrgico citorreductor, que se realiza sin fines curativos, en casos en estadios avanzados. La citorreducción óptima se define como resección completa sin enfermedad residual macroscópica (Randall y Rubin, 2010; Stuart *et al.*, 2011). La citorreducción óptima mejora el estado general de las pacientes e incrementa la respuesta a los tratamientos complementarios, mejorando la supervivencia global (Bois *et al.*, 2009).

2.6.2 Factores anatomopatológicos

2.6.2.1 Tipo Histológico

El carcinoma de ovario seroso de alto grado y los indiferenciados son el grupo más agresivo y ello es debido a que la mayoría se diagnostican en estadios avanzados,

(Odicino *et al.*, 2007). Los carcinomas serosos junto con los carcinomas indiferenciados tienen una supervivencia del 20-35% a los 5 años (Llueca *et al.*, 2018).

2.6.2.2 Grado histológico

El grado histológico se basa fundamentalmente en los cambios estructurales, siendo los mejor diferenciados aquellos que conservan la capacidad de producir glándulas o papilas. Los carcinomas de alto grado presentan cambios citológicos de actividad proliferativa elevada, incluyendo elevado índice mitótico, atipia nuclear y relación núcleo/citoplasma disminuida. Se han realizado múltiples trabajos para intentar establecer criterios que permitan unificar todos estos parámetros para crear un sistema de graduación de los carcinomas que sea reproducible y sensible para predecir la agresividad del tumor. En la práctica diaria y siguiendo las recomendaciones de la OMS (Hauptmann *et al.*, 2017), la mayor parte de carcinomas serosos son grado 3 debido a la escasa diferenciación celular. En general, cuanto mayor es el grado del tumor, es decir, menos diferenciado, más agresivo va a ser su comportamiento y la supervivencia será menor.

3. Perfiles moleculares en el cáncer de ovario

En el año 2011 el proyecto Atlas del Genoma del Cáncer (*The Cancer Genome Atlas, TCGA*) realizó una importante caracterización molecular en el cáncer de ovario estableciéndose a partir de este trabajo dos subtipos de acuerdo al origen del mismo y a la presencia de determinadas mutaciones (Network, 2011). En este trabajo se analizaron 500 carcinomas serosos de alto grado de ovario aplicando diversas técnicas de análisis masivo en las que analizan mutaciones, alteraciones en el número de copias de genes somáticos, expresión de ARNm y alteraciones epigenéticas. De este análisis mutacional se confirma que la alteración más frecuente es la del gen supresor *TP53*, que está presente en el 96% de casos los COSAG, seguida de *BRCA1* y *BRCA2* que lo están en el 22% de las muestras. Además, describen 6 alteraciones recurrentes en otros genes, presentes de forma menos frecuente *RB1*, *NF1*, *FAT3*, *CSMD3*, *GABRA6* y *CDK12*. A continuación, se mencionarán en mayor detalle las principales alteraciones moleculares:

INTRODUCCIÓN

En los COSAG, las mutaciones de *TP53* se han correlacionado con el potencial metastásico (Havrilesky *et al.*, 2015) y también con resistencia a tratamientos como los basados en platinos (Graeff *et al.*, 2006). Clínicamente se ha realizado algún ensayo para restaurar la función de p53 en pacientes con cáncer de ovario avanzado y multirresistente a quimioterapia, mediante adenovirus, con ligera mejora de los niveles de CA125 pero con menor respuesta a la que ofrece la terapia convencional basada en carboplatino y paclitaxel (Li *et al.*, 2002). Otra molécula implicada en la regulación de *p53* es MDM2 que también se ha ensayado de forma terapéutica en leucemias (Kojima *et al.*, 2016). MDM2 es una ubiquitina-ligasa cuya función es facilitar la degradación de p53 por el proteosoma. Se encuentra sobreexpresada en aproximadamente una tercera parte de los carcinomas de ovario y se describe en la mitad de los tumores serosos borderline, hecho que explicaría la menor expresión inmunohistoquímica de p53 en los mismos (Palazzo *et al.*, 2000). También se ha visto asociación de MDM2 con el pronóstico de los carcinomas serosos, así como con la respuesta a tratamiento quimioterápico (Dogan y Saygili, 2005).

Como en otros tumores también esta molécula ofrece oportunidades para la terapia, ya que en líneas celulares se ha comprobado que algunos antagonistas de MDM2 actúan de forma sinérgica con tratamientos basados en platinos (Mir *et al.*, 2014). Los oncogenes *KRAS* y *BRAF* también se han implicado en el pronóstico, aunque con resultados desiguales. *KRAS* se ha relacionado con mayor tendencia a la recidiva en tumores borderline serosos y carcinomas serosos de bajo grado, hecho que no ocurre con *BRAF* (Tsang, 2014). La única relación de *BRAF* con el comportamiento de estos tumores, es que se suele observar mutado en tumores en estadios iniciales y con mayor supervivencia (Grisham *et al.*, 2014).

Los receptores de factores de crecimiento se han implicado en el pronóstico de los carcinomas de ovario en múltiples estudios. Especialmente en relación a *HER2* (receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano), se han encontrado resultados contradictorios con estudios en los que tenía valor pronóstico y otros en los que no (Heublein *et al.*, 2013). Otros receptores como *HER3* se han implicado en el

pronóstico de los carcinomas de ovario (Tanner *et al.*, 2018) aunque este resultado no se ha confirmado en otras series grandes.

Del análisis de expresión se desprende una clasificación molecular en la que se definen 4 subtipos tumorales: el inmunorreactivo, el diferenciado, el proliferativo y el mesenquimal. (Konecny *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015) (figura 9).

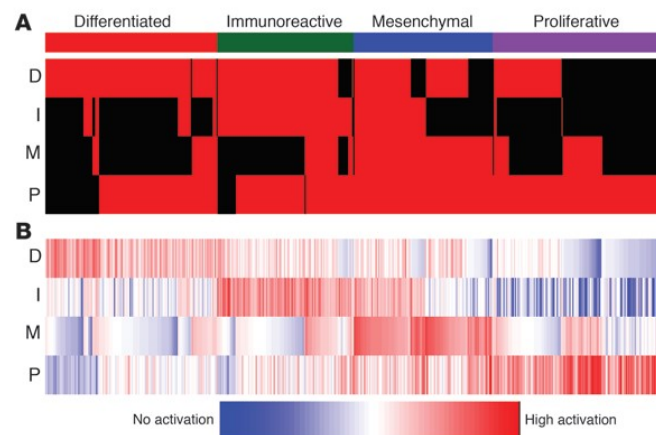


Figura 9. Firmas de Expresión Génica en COSAG: diferenciado (D), inmunorreactivo (I), mesenquimal (M) y proliferativo (P). (A) puntajes binarios que indican si una muestra tumoral activa la firma del gen. Cada columna representa 1 muestra; cada fila representa 1 firma genética Rojo, activado; negro, no activado. (B) Puntajes de activación del conjunto de genes en bruto. Cada columna representa 1 muestra; cada fila representa 1 firma genética (Verhaak y Tamayo, 2013).

Sin embargo, más análisis son necesarios para elucidar los mecanismos implicados en el COSAG.

4. Bases inmunes en Cáncer

4.1 Sistema Inmune y el Cáncer

Las principales funciones del sistema inmune de los mamíferos son controlar la homeostasis tisular, proteger contra agentes patógenos invasores o infecciosos y eliminar las células dañadas. Se divide en dos componentes principales, inmunidad innata y adaptativa, que producen una respuesta inmune efectiva a través de una variedad de células y mediadores solubles. El sistema inmune innato, que representa la primera línea de resistencia, está compuesto de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (DC), mastocitos, eosinófilos, basófilos, células asesinas naturales (NK) y células T (figura 10) (Cui y Guo, 2016). Los macrófagos y los mastocitos liberan mediadores solubles tales como citoquinas, quimiocinas, metaloproteinasas de matriz y especies de oxígeno reactivo (ROS), y también atraen leucocitos adicionales (De Visser, Eichten y Coussens, 2006).

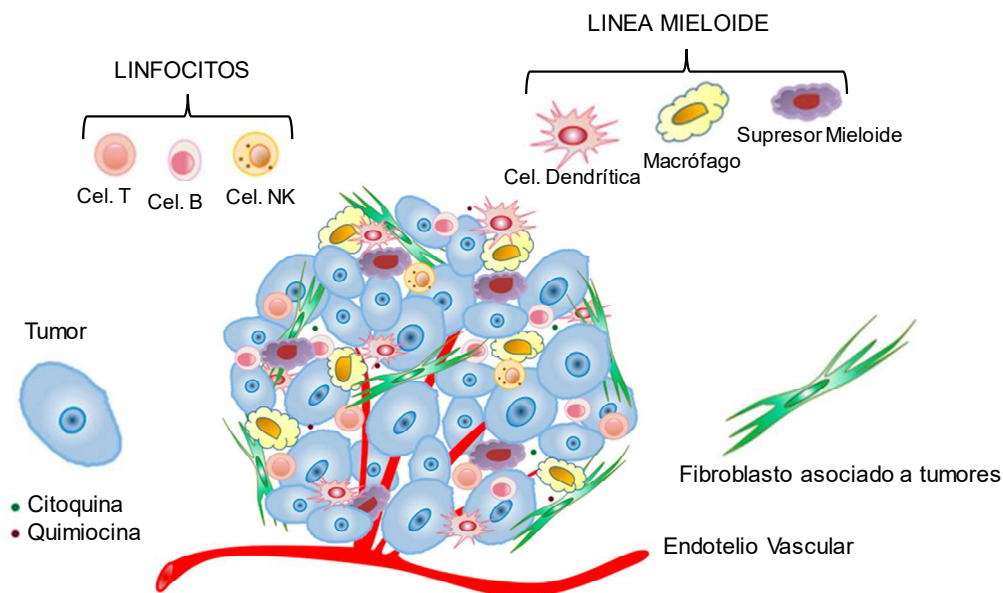


Figura 10. Microambiente tumoral el cual está conformado por un conjunto de elementos celulares y moleculares. Los elementos celulares consisten en las células inmunes de origen hematopoyético y células estromales. Las células inmunes comprenden los linfocitos infiltrantes de tumores T, B, células asesinas naturales NK y la población de origen mieloide asociada a tumores encontramos células dendríticas, macrófagos y células supresoras. El compartimento del estroma lo conforma los fibroblastos asociados a tumores y las vasculatura linfática y sanguínea. También encontramos citoquinas y quimiocinas (Cui y Guo, 2016).

Las células NK desempeñan un papel importante en el rechazo de células tumorales o células infectadas por virus, pueden detectar la presencia de patógenos e inducir la maduración DC (células dendríticas), la activación funcional, la migración y la presentación de antígenos (Vivier y Anfossi, 2004). El sistema inmune adaptativo comprende células B y T que promueven aún más la activación de la inmunidad innata y apoyan la expansión y producción de células T y anticuerpos específicos de tumores. Hay dos subtipos principales de células T: células T cooperadoras (Th o *CD4*) y células T citotóxicas (CTL o *CD8*). Estas células expresan receptores específicos de antígeno que permiten un número amplio y flexible de respuestas (Bremnes *et al.*, 2011).

El sistema inmunitario juega tres papeles importantes en la prevención de tumores: protege al huésped de los tumores inducidos por virus al eliminar las infecciones por virus; resuelve la eliminación de patógenos de manera rápida evitando el establecimiento de un ambiente inflamatorio y finalmente el sistema inmune elimina las células tumorales que expresan antígenos específicos de tumores en un proceso conocido como inmunovigilancia (Vesely *et al.*, 2011). De hecho, las primeras investigaciones demostraron que la presencia de células T intratumorales se correlaciona con mejores resultados clínicos en carcinomas ováricos avanzados (Zhang y Conejo-Garcia, 2003), que también se observó en otros tipos de tumores como en el carcinoma de pulmón (Al-Shibli *et al.*, 2008). Entre estas células T intratumorales, las células *CD8+* son la fuente más importante de actividad antitumoral in vivo. El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y B7 son dos señales indispensables para activar las células T *CD8+*. Después de estimular e interactuar con las células T *CD4+*, las células T *CD8+* se convierten en linfocitos citotóxicos (Russell y Ley, 2002). Sin embargo, cuando el sistema inmune no puede eliminar por completo las células cancerosas, se desarrolla un estado de equilibrio mediante el cual el tumor no progresa o metastatiza más. En este caso, se seleccionan las células cancerosas que pueden resistir, evitar o suprimir la respuesta inmune antitumoral, lo que provoca el escape del tumor y el crecimiento progresivo del tumor (Finn, 2012).

Tomando todas estas pruebas en conjunto, se ha vuelto cada vez más claro que las células cancerosas no solo pueden evitar la vigilancia inmunológica sino también

INTRODUCCIÓN

explotar los mecanismos inmunes nativos para su propio beneficio. De hecho, se han definido tres capacidades o características esenciales del cáncer: la capacidad de prosperar en un microambiente crónicamente inflamado, la capacidad de evadir el reconocimiento inmunológico y la capacidad de regular y suprimir la actividad inmune. La fuerza relativa de cada una de estas habilidades puede variar de un tipo de tumor a otro (Cavallo *et al.*, 2011).

Incluso en ausencia de estímulos inflamatorios externos, las señales impulsadas por los oncogenes pueden activar las vías intrínsecas proinflamatorias que aceleran el proceso de carcinogénesis (Mantovani *et al.*, 2008). Las vías inflamatorias más importantes que participan en la carcinogénesis inducida por la inflamación convergen a nivel de transductores de señal del factor de transcripción. Algunos ejemplos son el activador de la transcripción 3 (STAT3) y el factor nuclear- κ B (NF κ B). Al usar estas vías, los tumores modulan el entorno inflamatorio secretando factores de crecimiento solubles y quimioatrayentes que estimulan las células supresoras de la inflamación para contrarrestar las respuestas de las células T anticancerígenas (Elinav *et al.*, 2013). Como resultado de esta inflamación, varios tipos de células inmunitarias se acumulan en el microambiente tumoral (De Visser, Eichten y Coussens, 2006) además de las células cancerosas y su estroma circundante (este último compuesto por fibroblastos, células endoteliales, pericitos y células mesenquimales) que se muestran en la [figura 11](#). Es la expresión de mediadores y moduladores inmunes, así como la abundancia y el estado de activación de diferentes tipos de células en el microambiente tumoral que definen en qué dirección se inclina la balanza y por lo tanto el tumor promover inflamación o inmunidad antitumoral (Lin y Karin, 2007).

Otra característica de las células cancerosas es que pueden evitar el reconocimiento inmunológico. Debido a la creciente inestabilidad de sus genomas, los tumores pueden producir diferentes clones inmunogénicos y los poco inmunogénicos escapan de la inmunosupervisión (Thibodeau, 2012). Uno de los mecanismos por el cual escapan las células tumorales es la pérdida o alteración de las glucoproteínas MHC en su membrana celular. El escape también puede verse facilitado por la subversión de la fisiología celular como consecuencia de la sobreexpresión de oncogenes y/o alteraciones de la maquinaria de procesamiento de péptidos antigénicos (Norell *et al.*,

2006). Estos procesos alteran el reconocimiento directo del antígeno tumoral de las células T y evitan el cebado directo de una respuesta inmune contra el tumor (Cavallo *et al.*, 2011). Finalmente, las células tumorales pueden regular la actividad del sistema inmune para suprimir su respuesta contra ellas y modular los diferentes mecanismos del sistema inmune para su propio beneficio.

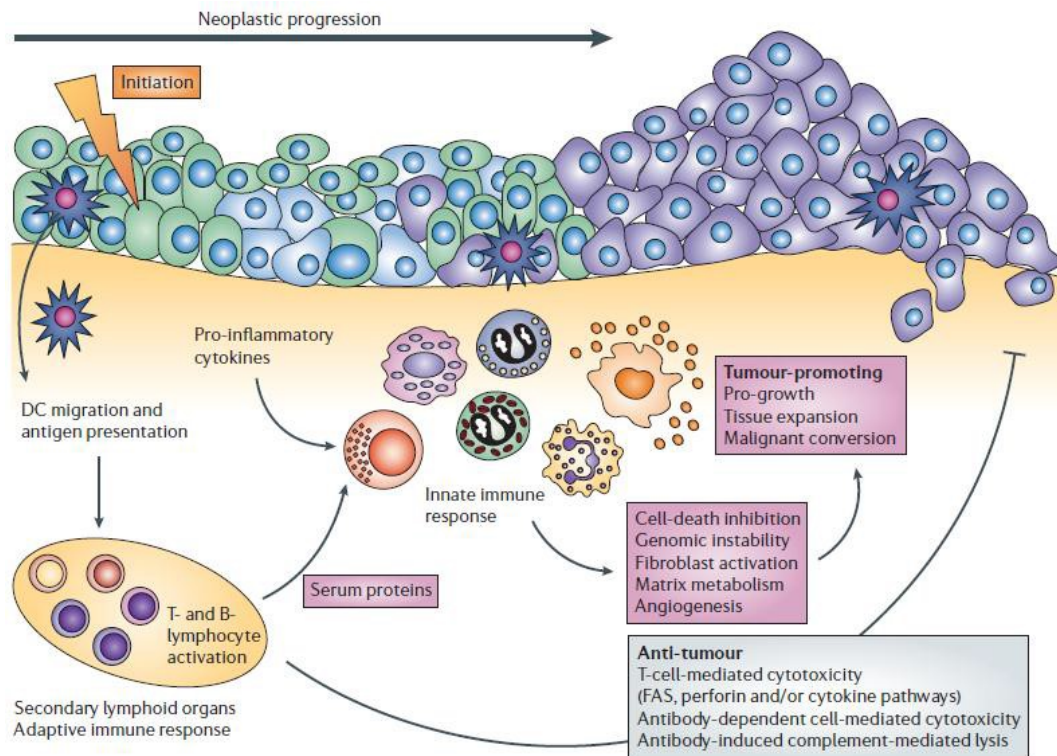


Figura 11. Representación de la acumulación inmune innata y adaptativa en el microambiente tumoral. Los antígenos que están presentes en los tejidos neoplásicos tempranos son transportados a los órganos linfoides por las células dendríticas (DC) que activan las respuestas inmunes adaptativas que resultan en efectos antitumorales y promotores de tumores. La activación de las células B y las respuestas inmunes humoral da como resultado la activación crónica de las células inmunes innatas en los tejidos neoplásicos. Las células inmunitarias innatas activadas, como los mastocitos, los granulocitos y los macrófagos promueven el desarrollo tumoral mediante la liberación de potentes moléculas solubles pro-supervivencia. Las células inflamatorias influyen positivamente en la remodelación tisular y el desarrollo de la vasculatura angiogénica mediante la producción de mediadores proangiogénicos y proteasas extracelulares. Por el contrario, la activación de la inmunidad adaptativa también mejora las respuestas antitumorales a través de la toxicidad mediada por células T (inducción del miembro 6 de la superfamilia del receptor TNF, vías de perforina y / o citocinas) además de la citotoxicidad mediada por anticuerpos y anticuerpo lisis mediada por complemento inducido. Reproducido de Visser y colaboradores, 2006.

4.2. Inmunoregulación del cáncer

Los tumores adquieren mecanismos para regular su microambiente inmunitario que incluyen: la liberación de una serie de factores para alterar los mecanismos normales de reacción, la modulación de las vías coestimuladoras (también conocidas como puntos de control inmunológicos), la inducción y atracción de células supresoras como MDSC, macrófagos asociados a tumores (TAM), DC y Tregs.

4.2.1. Factores inmunosupresores

Los mediadores inmunosupresores (como las citoquinas) liberados por las células tumorales pueden inhibir las DC, inhibir indirectamente la penetración de células T en el lecho tumoral o suprimir directamente la activación de células T efectoras a la vez que mejora la función de las células Treg que son un componente central de la evasión inmune mediada por tumores. Ellos suprimen la inmunidad inhibiendo las células T *CD4*, *CD8* y DC a través del contacto directo célula-célula o mediante secreción de *IL-10* y *TGFβ*. Este último también juega un papel en la conversión de células T efectoras en células T reguladoras (Melichar *et al.*, 2000) (figura 12).

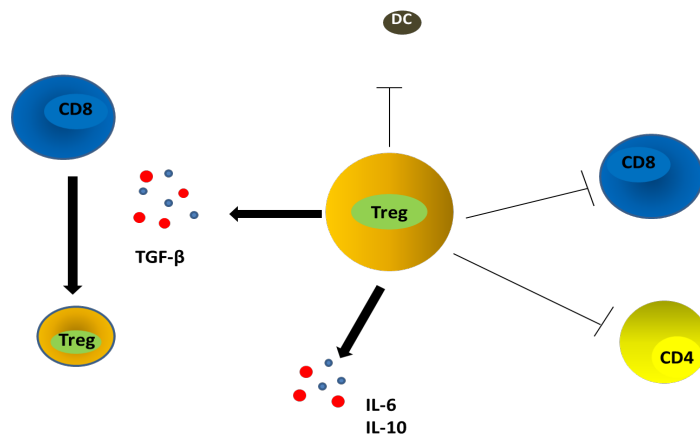


Figura 12. Interacción entre los Tregs y otras células del sistema inmune. *IL-10* y *TGF-β* inhiben la activación de células T y suprimen la función de APC inhibiendo la expresión de moléculas de MHC *CD80*, *CD86*. Tregs producen *IL-6* e *IL-10*, que eventualmente pueden conducir a la detención del ciclo de las células T.

El **TGF β** (factor de crecimiento transformante β) es una de las citocinas inmunosupresoras más importantes producidas por las células tumorales y los leucocitos infiltrantes en el microambiente tumoral. Se ha demostrado que **TGF β** puede promover la metástasis del cáncer al aumentar la invasión de células tumorales e inhibir la función de las células inmunes (Massagué, 2008). **TGF β** puede suprimir o alterar la activación, maduración y diferenciación de las células inmunitarias innatas y adaptativas, incluido NK células, CD, macrófagos, neutrófilos y células T **CD4+** y **CD8+**. Además, **TGF β** tiene un papel importante en la diferenciación e inducción de las Tregs naturales e inducidas, lo que contribuye a crear un entorno inmuno tolerante (Li *et al.*, 2006). Sin embargo, es importante tener en cuenta que **TGF β** juega un doble papel en el cáncer; esto se demostró por primera vez en un conjunto de experimentos de cáncer de piel realizados en ratones que demostraron que la expresión de **TGF β** ataca los queratinocitos para inhibir el crecimiento de tumores benignos, mientras que posteriormente mejora la progresión de la malignidad y promueve papilomas benignos hacia la malignidad (Cui *et al.*, 1996). Posteriormente se demostró que el **TGF β** suprime la iniciación tumoral y el desarrollo temprano inhibiendo la progresión del ciclo celular, induciendo la apoptosis y suprimiendo la expresión de factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas (Yang *et al.*, 2010).

Otra función de **TGF β** es la regulación positiva de IL10 (interleucina 10), que a su vez potencia la expresión de **TGF β** en un circuito de retroalimentación positiva. La IL10 inhibe la presentación del antígeno, la expresión del MHC de clase II y la regulación al alza de las moléculas coestimuladoras **CD80** y **CD86** (Noppen y Morisset, 2008). IL10 suprime las citocinas inflamatorias IL1, IL6, IL12 y el factor de necrosis tumoral alfa (**TNF α**). IL10 parece actuar sobre DC y macrófagos y protege las células tumorales de la citotoxicidad mediada por CTL (Linfocito T citotóxico) (Kurte *et al.*, 2004); sin embargo, algunas pruebas indican que IL10 también puede poseer propiedades inmunoestimulantes. De hecho, la sobreexpresión de IL10 en el microambiente tumoral se sinergiza con otras citoquinas para promover el rechazo tumoral en lugar de inducir la inmunosupresión (Adris *et al.*, 2005).

INTRODUCCIÓN

Los tumores también son capaces de expresar factores inmunosupresores distintos de las citoquinas. Las **Galectinas** son moléculas inmunosupresoras importantes liberadas en el microambiente tumoral. La investigación actual indica que las galectinas tienen un papel importante en el cáncer, contribuyen a la transformación neoplásica, la supervivencia de las células tumorales, la angiogénesis y la metástasis tumoral. Además, pueden modular las respuestas inmunitarias e inflamatorias y pueden tener un papel clave para ayudar a los tumores a escapar de la vigilancia inmunológica. La galectina estudiada más ampliamente en el contexto de la regulación de la respuesta inmune es la *galectina-1*, codificada por el gen *LGALS1* (soluble en la unión de galactósido de lectina 1). Galectina-9 inhibe la activación de células T completas, induce la detención del crecimiento y la apoptosis de las células T activadas, y suprime la secreción de citoquinas proinflamatorias (Liu y Rabinovich, 2005). Las galectinas-2 y -9 también parecen desempeñar un papel en la inmunoregulación induciendo a la apoptosis de células T (Ito *et al.*, 2012). De hecho, Galectina-2 puede inducir la apoptosis de las células T y controlar la secreción de linfotoxina- α por los macrófagos (Liu y Rabinovich, 2005).

Indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), la enzima metabólica clave implicada en el catabolismo del triptófano también afecta la supresión de la respuesta inmune. Produce una disminución en la disponibilidad de triptófano y genera metabolitos de triptófano que tienen efectos negativos sobre los linfocitos T. La actividad de *IDO* parece favorecer un fenotipo regulador en las células T *CD4+*; por otro lado, el catabolismo de triptófano por *IDO* puede actuar como un modulador negativo del crecimiento tumoral debido al efecto inhibitorio del interferón gamma (*IFN γ*) sobre la proliferación de células cancerígenas mediada por la privación de triptófano (Godin-Ethier *et al.*, 2011). Sin embargo, el papel de los *IDO* y el mecanismo de acción en la evasión inmune y el crecimiento tumoral aún son poco conocidos en el cáncer humano. Otros factores liberados por las células tumorales que pueden afectar la respuesta inmune son la prostaglandina E2 (*PGE2*), los gangliósidos, el factor 1 derivado de las células del estroma (*SDF1* o *CXCL12*) y el *VEGF* (Banerjee, Vasanthakumar y Grigoriadis, 2013).

4.2.2. Puntos de control inmunológico

La activación de células T requiere al menos de dos señales para activarse por completo. La primera ocurre después del acoplamiento del receptor específico de antígenos de células T (TCR) por MHC, y el segundo por el posterior acoplamiento de moléculas coestimuladoras, siendo el coestimulador de células T *CD28* el más potente. Se ha demostrado que las células tumorales pueden regular al alza los ligandos de superficie que actúan como señales coestimuladoras negativas para las células T. Sin lugar a duda, una de las señales reguladoras mejor estudiadas es ***CTLA4*** que se induce en las células T en el momento de su respuesta antigénica inicial. Las células T ingenuas y de memoria expresan altos niveles de *CD28* en la superficie celular pero no expresan *CTLA4*, se secuestra en vesículas intracelulares y se transporta a la superficie celular después de que se desencadena el TCR al encontrar el antígeno (figura 13). Cuanto más fuerte es la estimulación a través del TCR y *CD28*, mayor es la cantidad de *CTLA4* depositada en la superficie de las células T (Drew M. Pardoll, 2012). *CTLA4* contrarresta la actividad del receptor coestimulador de células T *CD28* y se une a dos ligandos idénticos: *CD80* (también conocido como B7.1) y *CD86* (también conocido como B7.2) (Carreno *et al.*, 2000) Además, *CTLA4* se expresa constitutivamente en la superficie de Tregs (Jain *et al.*, 2010). Por lo tanto, *CTLA4* funciona como un amortiguador de señal para mantener niveles consistentes de activación de células T. Las células tumorales y las células presentadoras de antígeno (APC) se unen a *CTLA4*, lo que evita actividad de células T anticancerígenas. Allison y colaboradores fueron pioneros en demostrar que el bloqueo de la señalización de *CTLA4* puede mejorar las respuestas antitumorales (Leach, 1996). Los estudios iniciales demostraron respuestas antitumorales significativas sin toxicidades inmunológicas manifiestas cuando los ratones que tenían tumores parcialmente inmunogénicos se trataron con anticuerpos de *CTLA4* como agentes únicos. El bloqueo del funcionamiento fisiológico de *CTLA4* en células T se usa actualmente como un enfoque terapéutico en una variedad de tumores humanos, particularmente en melanoma avanzado, con el objetivo de promover la activación y expansión de células inmunes antitumorales (Drew M. Pardoll, 2012).

INTRODUCCIÓN

Otro receptor de punto de control inmune, **PD1** está emergiendo como un objetivo adicional prometedor; la función principal de **PD1** es la regulación de las respuestas inflamatorias en los tejidos periféricos causadas por el reconocimiento de antígenos de células T efectoras. Las señales inflamatorias en los tejidos inducen la expresión de ligandos **PD1**, que regulan negativamente la actividad de las células T y, por lo tanto, limitan el daño del tejido colateral ([figura 13](#)). Las células tumorales pueden expresar **PDL1** y, al hacerlo, detienen la actividad de las células T anticancerígenas (Jain *et al.*, 2010). Este receptor se expresa en una gran proporción de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), incluido Tregs, mientras que **PDL1** comúnmente se regula positivamente en la superficie celular de diferentes tumores humanos (Zou y Chen, 2008). Además de las células tumorales, **PDL1** se expresa comúnmente en células mieloides en el microambiente tumoral. Alentadoramente, se ha demostrado que los anticuerpos bloqueadores contra **PD1** o **PDL1** tienen un efecto clínico sustancial en pacientes con melanoma metastásico, carcinoma de células renales y otros tumores. Además, los hallazgos preliminares plantean la posibilidad de que el bloqueo de **PD1** sea menos tóxico que el anti-**CTLA4** ipilimumab, aunque aún se requieren pruebas más detalladas (Versluys *et al.*, 2012).

Otros puntos de control inmunológico que se están explorando actualmente son el gen de activación de linfocitos 3 (**LAG3**, también conocido como **CD223**), **2B4** (también conocido como **CD244**), atenuador de linfocitos B y T (**BTLA**, también conocido como **CD272**), proteína de la membrana de células T3 (**TIM3**, también conocido como **HAVcr2**), receptor de adenosina A2a (**A2aR**) y la familia de receptores inhibidores asesinos. Todas estas moléculas se han asociado con la inhibición de la actividad de los linfocitos y, en algunos casos, con la inducción de la anergia de los linfocitos (Drew M Pardoll, 2012) ver [figura 13](#).

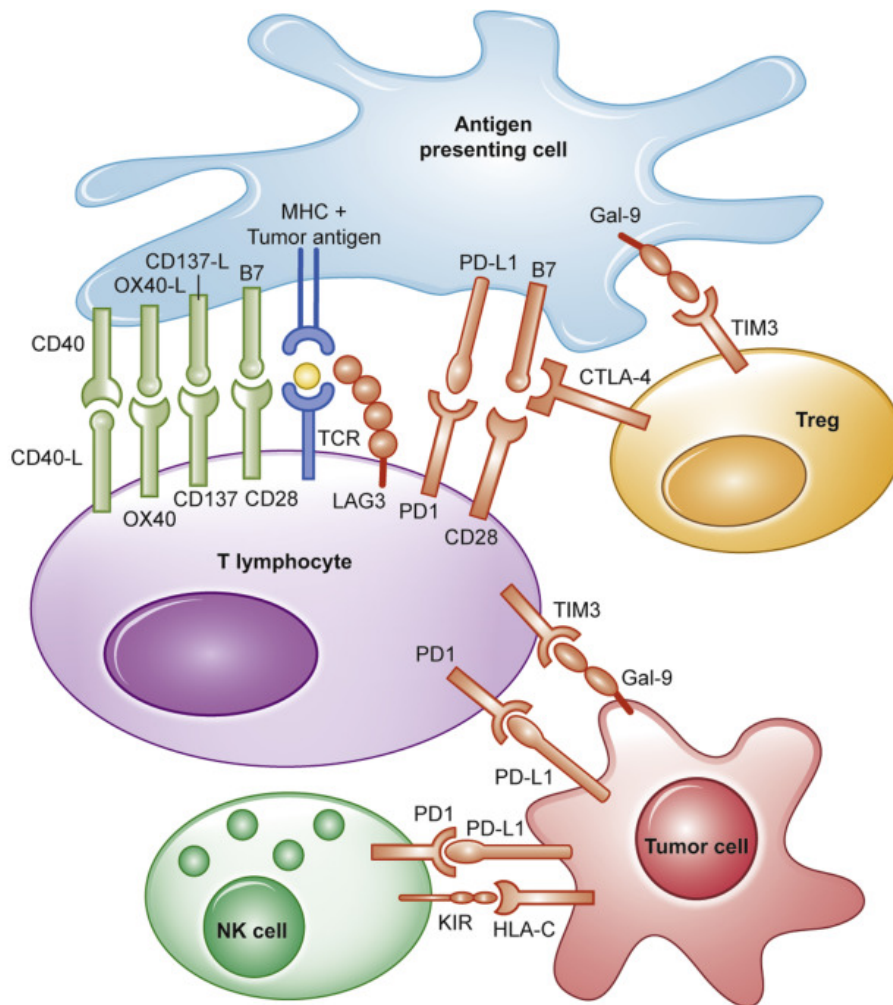


Figura 13. Mecanismos de control inmune: Existen múltiples vías que cuando se suman pueden desencadenar el reconocimiento y la muerte inmune del tumor o la tolerancia inmunológica y la evasión. El sistema inmune se caracteriza por dos señales, una señal inmunoestimulante (CD40-OX40-CD137) que active los efectores T y las células NK, mientras que inhibe los Treg y una señal inhibitoria (PD1-CTLA4-LGAL3). Rojo = señales cohinibitorias. Verde = señales coestimuladoras (Moy, Moskovitz y Ferris, 2017).

CD137 (*TNFRS9*) es un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (*TNF*) cuya función es estimulante de las respuestas inmunitarias (Michel *et al.*, 1999). La actividad mejor caracterizada de *CD137* es su actividad coestimuladora para las células T activadas. La reticulación de *CD137* potencia la proliferación de células T, la secreción de *IL-2*, la supervivencia y la actividad citolítica. Además de su capacidad de coestimular a las células T, las señales vuelven a las células presentadoras de antígenos promoviendo su activación y diferenciación (Zhao *et al.*, 2009). Recientemente, *CD137* ha sido propuesto como un objetivo terapéutico para mejorar y sostener la respuesta

inmune contra varios tipos de cáncer. los datos sugieren que el sistema *CD137 / CD137L* que estas moléculas estimulantes podrían conferir una ventaja a los tumores hematológicos en términos de supervivencia (Makkouk, Chester y Kohrt, 2016). *CD137* es un nuevo marcador de diagnóstico de tumores con resultados muy prometedores en cáncer (Anderson *et al.*, 2012).

4.3. Células T reguladoras

Las Tregs son vitales para mantener el sistema inmune bajo control, lo que ayuda a evitar patologías inmunes y expansión irrestricta de poblaciones de células T efectoras. Tregs han sido el foco de una extensa investigación en los últimos años, que han revelado diversos roles para estas células en numerosas patologías, que incluyen autoinmunidad, alergia, infección microbiana y cáncer. Los defectos en la función de las células Treg son un factor importante en el desarrollo de la autoinmunidad o en el fracaso para controlar la inmunopatología, mientras que la función de las células Treg hiperactivas puede contribuir a la supresión de la inmunidad tumoral. En 1995, se identificó un subconjunto de células T *CD4+* que expresan constitutivamente altas cantidades de la cadena α del receptor de *IL2* (*CD25*), y que estaban altamente enriquecidas en actividad supresora, y se denominaron células T reguladoras (Sakaguchi *et al.*, 1995). *CD25* estaba destinado a ser utilizado como un marcador Treg porque permitía su identificación para el análisis funcional después de su aislamiento de animales no inmunes; sin embargo, pronto quedó claro que su utilidad era limitada debido a que todas las células T activadas presentan una regulación positiva de *CD25*.

4.3.1. Control Transcripcional de las células Tregs: *FOXP3*

La biología de Tregs se entendió mejor después de la identificación y el estudio de mutaciones en el factor de transcripción codificado para el cromosoma X-*FOXP3* en ratones y en pacientes con IPEX (desregulación inmune, poliendocrinopatía, enteropatía, ligada a X). Los ratones y los seres humanos con una mutación con pérdida de función en el gen *FOXP3* padecen un trastorno linfoproliferativo inmune fatal, de inicio temprano, dependiente de células T. Curiosamente, la enfermedad solo afecta a

los varones homocigóticos mutados, porque en las mujeres la inactivación aleatoria del cromosoma X garantiza que algunas células T expresen un alelo de *FOXP3* de tipo salvaje (Bennett *et al.*, 2001). Después de este descubrimiento, diferentes laboratorios evaluaron la expresión estable de *FOXP3* en ratones *CD25+ CD4+* Tregs, pero no en células *CD25- CD4+* vírgenes o células T *CD4+* inactivadas (Hori, Nomura y Sakaguchi, 2003).

Inicialmente, se pensó que las Tregs eran una entidad única que se originaba en el timo, pero esta suposición cambió con la revelación de que las células T *CD4+* vírgenes pueden diferenciarse para convertirse en células T *FOXP3+*. Ahora se acepta que la población Treg comprende varios subconjuntos (figura 14), los derivados del timo (o Tregs naturales) y los producidos en la periferia (Tregs inducidos). Curiosamente, la señalización de *TGFβ* parece ser necesaria para la mayoría, si no para todos, de la inducción de *FOXP3* en células T *CD4+* periféricas (Date *et al.*, 2008).

Otro biomarcador ligado a los Treg es la *IL-7* (*CD127*) es una citoquina necesaria tanto para la proliferación de células B como para la de células T, y la falta de *IL-7* causa la detención de las células inmunes. Curiosamente, en los últimos años, ciertos estudios han sugerido firmemente que el papel de la *IL-7* está más allá del campo de la inmunología, ya que podría tener un efecto directo o indirecto sobre el cáncer (Moines, 2017). Posibles efectos antitumorales de *IL-7* presenta efectos antitumorales en tumores como el glioma, melanoma, linfoma, leucemia, cáncer de próstata y glioblastoma. La administración in vivo de *IL-7* dio como resultado una disminución del crecimiento de células cancerosas en modelos murinos. Adicionalmente, el mismo estudio demostró que la acción del injerto contra el tumor fue promovido en modelos animales, si el injerto es un injerto alogénico es la primera repleta de células T (Ye y Agata, 2001). Esta información respalda el concepto que *IL-7* tiene propiedades antitumorales.

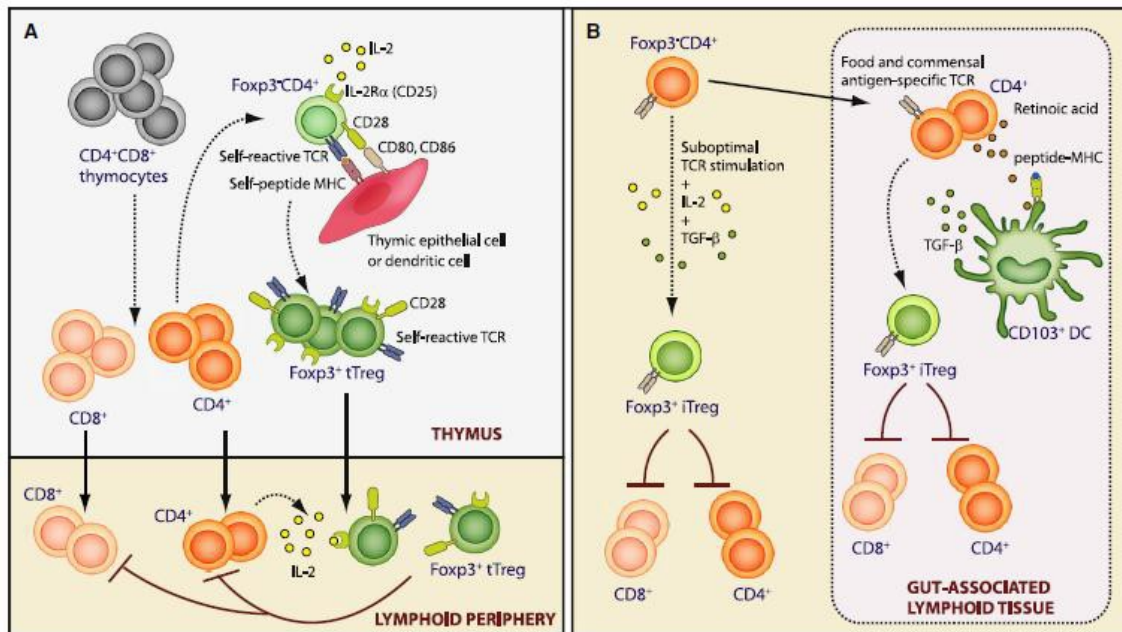


Figura 14. Diferenciación de Tregs tímica e inducida. La mayoría de los Tregs timo de FOXP3 + (Tregs) se diferencian de los timocitos FOXP3-CD4 +. El proceso de diferenciación de células Treg requiere una fuerte estimulación del receptor de células T (TCR) por los complejos de péptido-MHC propios presentados por células epiteliales tímicas (TEC) o células dendríticas (DC); Señalización de CD28 inducida por los ligandos CD80 y CD86 expresados en células presentadoras de antígeno; y receptor de IL2 de alta afinidad, y otra señalización del receptor de citoquinas y Foxp3+. Tregs también pueden inducirse a partir de células T CD4 + periféricas (Tregs). En este caso, las condiciones que favorecen la inducción periférica de FOXP3 incluyen: estimulación crónica con antígeno de baja dosis en condiciones de tolerancia, coestimulación subóptima y la presencia de la citoquina inmunomoduladora TGFβ, que desempeña un papel muy importante en este proceso. Además, IL2 y el ácido retinoico del metabolito de la vitamina A (RA) facilitan la inducción de FOXP3 en células T CD4+ periféricas. Reproducido por Josefowicz y Rudensky, 2009.

4.3.2. Mecanismos moleculares de la supresión reguladora de células T

Definir los mecanismos de la función Treg es claramente de crucial importancia para comprender su papel fundamental en el sistema inmune. Desde una perspectiva funcional, los diversos mecanismos de supresión potencial de las células Treg se pueden agrupar en cuatro modos básicos de acción (Vignali, 2008). 1) supresión mediante la liberación de citocinas inhibitorias tales como *IL10*, *TGFβ* e *IL35*; 2) inducción de citólisis a través de la expresión de las granzimas A y B, que puede matar las células T respondedoras o APC; 3) supresión por disrupción metabólica producida

por los altos niveles de expresión de *IL2R* en células Treg que privan a los linfocitos T efectores de *IL2* e inhiben su proliferación; 4) supresión dirigiendo las DC, a través de la expresión de *CTLA4* que se une a *CD80* y / o *CD86* en las DC, inhibiendo así su maduración y función apropiada. Tregs también podría condicionar DC para expresar *IDO*, que induce el catabolismo de triptófano en metabolitos pro-apoptóticos, lo que resulta en la supresión de células T efectoras. Finalmente, Tregs también puede expresar *LAG3* que se une a moléculas MHC de clase II, suprimiendo la maduración de DC así como su capacidad inmunoestimuladora.

4.2.3. Células T regulatorias en cáncer

Poco después de la publicación de la existencia de Tregs *CD4+ CD25(alto)* en sangre periférica de individuos sanos (Baecher-Allan *et al.*, 2001), el grupo de Carl June informó de la presencia de estas células en pacientes con neoplasias epiteliales, en particular ovario y en cáncer de pulmón. Observando niveles elevados de Tregs: *CD4+ CD25 (alto)* en la circulación y en los linfocitos infiltrantes de tumores. Tras la identificación de *FOXP3* como un marcador Treg se demostró que Tregs: *CD4+ CD25 (alto) FOXP3 (alto)* estaban presentes en la sangre periférica, ascitis maligna, tejido tumoral y ganglios linfáticos (GL) de drenaje de pacientes con cáncer de ovario. Propusieron que la acumulación de estas células se debía a la presencia de la quimioquina *CCL22*, que es secretada por células de cáncer de ovario y TAM que se une al *CCR4* expresado en Tregs (Curiel *et al.*, 2004). Se han descrito diferentes mecanismos que impulsan la acumulación de células Treg dentro de los tumores. En primer lugar, se sugirió que las Tregs tienen una capacidad mejorada para infiltrarse en el tumor por migración de órganos linfoides y no linfoides, mediadas por la acción coordinada de las quimiocinas secretadas por el tumor y sus receptores afines expresados en las células T, como *CCL22/CCR4*, *CXCL12/CXCR4* y *CCL5/CCR5* (Oleinika *et al.*, 2013). Un segundo mecanismo podría ser a través de la expansión de Tregs dentro del tumor debido a la presencia de *IL2* liberada por las células T efectoras (Oleinika *et al.*, 2013). Un tercer mecanismo es la conversión de *novo* de células T *FOXP3* en Tregs debido a *TGFβ* derivado de células tumorales (Chen *et al.*, 2003).

INTRODUCCIÓN

La presencia de linfocitos *FOXP3+* se ha asociado con un mal pronóstico en cohortes de pacientes afectados por diferentes tipos de tumores, incluyendo ovario (Hendry *et al.*, 2017), cáncer de mama (Bates *et al.*, 2006), cáncer de pulmón (Petersen *et al.*, 2006), hepatocelular (Gao *et al.*, 2007), renal (Griffiths *et al.*, 2007), pancreático (Hiraoka *et al.*, 2006) y cáncer gástrico (Perrone *et al.*, 2008). De acuerdo con estos resultados, se ha demostrado que la respuesta clínica a las quimioterapias a menudo se asocia con una reducción en las células T y el reclutamiento de células T *CD8+* intratumorales en el cáncer de mama (Ladoire *et al.*, 2008). Por el contrario, se ha informado que la infiltración intratumoral de Treg en tumores de cáncer de cabeza y cuello se correlacionó con un mejor control locoregional y un buen pronóstico (Bron *et al.*, 2013); esto último también se observó en el carcinoma colorrectal (Salama *et al.*, 2009) y el cáncer de vejiga (Winerdal *et al.*, 2011). Varios factores podrían explicar estas discrepancias: 1) el hecho de que aunque los Tregs pueden suprimir potencialmente la inmunidad antitumoral y promover la progresión del cáncer, también tienen la capacidad de atenuar la inflamación reduciendo así la progresión del cáncer (Banerjee, Vasanthakumar y Grigoriadis, 2013); 2) la heterogeneidad funcional exhibida por las Treg intratumorales depende de los factores que liberan y sus marcadores de activación (Kryczek *et al.*, 2011); 3) la acumulación de Tregs puede reflejar el nivel general de infiltración tumoral por las células inmunes, incluidas las células T efectoras; 4) los marcadores imperfectos usados para fenotipar células supresoras o diferencias técnicas; y 5) el hecho de que los tumores tienen diferentes fenotipos, crecen en diferentes órganos y están asociados con factores únicos del huésped y por lo tanto, tienen microambientes únicos (Fridman *et al.*, 2012). Dado que la contribución relativa de diferentes poblaciones de Treg en la inmunidad tumoral y en el bloqueo de la inflamación asociada a tumores todavía no está clara, una cuestión clave que surge del trabajo reciente es si las Tregs influyen directamente en el desarrollo y la progresión del cáncer o si simplemente son una característica pronóstica de malignidad (Banerjee, Vasanthakumar y Grigoriadis, 2013).

5. Sistema Inmune en el Cáncer de Ovario

En el cáncer de ovario seroso de alto grado nuevos análisis basados en los niveles de expresión de marcadores génicos describieron cuatro subtipos diferentes, mencionados previamente, denominados: I) diferenciado, II) inmunorreactivo, III) mesenquimal y IV) proliferativo (figura 9) que además de aportar importante información sobre las bases de la tumorigénesis, también proporcionan información pronóstica (Verhaak y Tamayo, 2013). A pesar de estos datos prometedores, en los tumores ginecológicos y en concreto en el cáncer de ovario son escasos los estudios realizados en el campo del microambiente tumoral y de la inmuno-oncología; por lo que es de sumo interés caracterizar e identificar la presencia de nuevos biomarcadores vinculados al sistema inmune. Estos datos nos permitirán conocer en mayor profundidad el comportamiento de estos tumores, así como el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas que disminuyan las elevadas tasas de mortalidad de esta neoplasia.

Las células T infiltrantes de tumor se han documentado en cáncer de ovario avanzado; la presencia de estas células está asociada a un mejor resultado clínico en comparación a los que presentan ausencia de las mismas donde se asocian a mayores niveles de factor de crecimiento endotelial vascular repercutiendo de esta manera en el pronóstico clínico (Zhang *et al.*, 2003).

La presencia de *CD8* y células NK en el tumor se ha visto vinculada a una mejor tasa de supervivencia por lo que los convierten en biomarcadores prometedores para la inmunoterapia en cáncer de ovario avanzado seroso de alto grado (Webb *et al.*, 2014).

Los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) tienen un impacto establecido en el pronóstico del COSAG, sin embargo, su papel en el cáncer de ovario recurrente es en gran parte desconocido. Mandy y colaboradores realizaron el primer estudio en el que se analizó el desarrollo de la densidad de TIL y la expresión de MHC en COSAG primario y recurrente, encontrando que *CD3+*, *CD4+*, *CD8+* TIL y expresión de MHC1 y MHC2 han mostrado correlaciones significativas entre los niveles tumorales primarios y recurrentes. La respuesta inmune antitumoral en los tumores recurrentes fue claramente dependiente del que está en el tumor primario, datos que han contribuido a la comprensión de la heterogeneidad del microambiente inmune en COSAG (Stanske

y Wienert, 2018).

El sistema inmunitario juega un papel crítico en la progresión y supervivencia global del COSAG. Aun así, no están claras las diferencias en la respuesta inmune que están asociadas con diferentes patrones de diseminación tumoral. En el estudio de Auer y colaboradores el objetivo fue evaluar el papel del sistema inmune en la diseminación tumoral en miliar (diseminación extendida, lesiones de tamaño de mijo) y no-miliar (implante de crecimiento exófito más grande). Para lograr esto analizaron exhaustivamente los tejidos tumorales, la sangre y la ascitis de 41 pacientes mediante inmunofluorescencia, citometría de flujo, secuenciación de ARN, inmunoensayos multiplexados e inmunohistoquímica. Los resultados mostraron que los marcadores de inflamación fueron sistemáticamente más altos en la miliar. Por el contrario, en la no miliar se encontró en la ascitis que los linfocitos, infiltración de monocitos / macrófagos, los niveles de expresión de PD-1 en los linfocitos T citotóxicos asociados a tumores y la expresión de PD-L1 en las células tumorales fue mayor. Además, en la ascitis de pacientes miliares, estaban presentes más células tumorales epiteliales en comparación con las no miliares, posiblemente debido a la regulación negativa activa de las respuestas antitumorales por las células B y las células T reguladoras. Resumiendo, prevaleció la respuesta inmune adaptativa en pacientes con diseminación no miliar cuyas respuestas fueron contrarrestadas por factores y células inmunosupresoras, mientras que en pacientes con diseminación miliar se evidenció una mayor participación del sistema inmune innato (Auer *et al.*, 2016).

En conjunto, los datos obtenidos hasta ahora indican que los biomarcadores relacionados con el sistema inmune, y más específicamente aquellos involucrados en la inmunoregulación, pueden ser útiles en el desarrollo de biomarcadores pronósticos y predictivos en COSAG. Por lo tanto, es importante continuar la búsqueda, el estudio y la validación de nuevos biomarcadores de inmunoregulación utilizando técnicas factibles como RTqPCR, ya que estos biomarcadores pueden convertirse en útiles herramientas clínicas oncológicas.

II. OBJETIVOS

La presente tesis doctoral consiste en la búsqueda e identificación de biomarcadores implicados en la inmunoregulación en muestras de pacientes con cáncer de ovario seroso de alto grado en diferentes estadios de la enfermedad y la correlación existente entre los marcadores analizados con las variables clinicopatológicas

OBJETIVOS:

1. Determinar, en una cohorte retrospectiva de muestras de cáncer de ovario seroso de alto grado incluidas en parafina, la expresión mediante técnicas de PCR a tiempo real de genes asociados a la presencia de infiltrados inflamatorios (*CD4*, *CD8*), población Treg (*TGFβ1*, *CTLA-4*, *IL-10*, *FOXP3*, *CD25*, *CD127*, *CXCR4*, *IDO*) y mediadores involucrados en el control de los checkpoints inmunológicos (como: *PD-1*, *PDL-1*, *PDL-2* ; *OX40* , *OX40L*; *ICOS*, *ICOS-L*; *galectina 9*; *CD137*, *CD137L*) .
2. Analizar mediante técnicas histopatológicas la presencia de infiltrados inflamatorios y subpoblaciones de células T analizando su localización y frecuencia dentro del microambiente tumoral.
3. Correlacionar las variables analizadas con las variables clinicopatológicas de la enfermedad: edad, estadio, histología, tipo de cirugía, tamaño tumoral, metástasis.
4. Validar los hallazgos obtenidos en el estudio retrospectivo en una segunda cohorte de muestras recogidas de manera prospectiva en pacientes con cáncer de ovario seroso de alto grado.
5. Valorar el posible papel como biomarcadores de las variables analizadas en el estudio (de manera individual o en combinaciones) que nos permitan distinguir subgrupos de pacientes con diferente pronóstico.
6. Integrar todos los resultados obtenidos y analizar de la aplicabilidad clínica de los biomarcadores más significativos en el cáncer de ovario seroso de alto grado.

OBJETIVOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes y Muestras

1.1 Pacientes

En este estudio se emplearon dos cohortes independientes de pacientes, una cohorte retrospectiva conformada por 50 pacientes con diagnóstico histológico de cáncer de ovario seroso papilar de alto grado procedentes del Hospital General Universitario de Valencia entre los años 2004 y 2015 los criterios de selección seguidos fueron pacientes con diagnóstico histológico de cáncer de ovario seroso papilar de alto grado estadios I-IV según la clasificación de la FIGO. Así mismo se incluyó una cohorte prospectiva conformada por 20 pacientes con diagnóstico de cáncer de ovario seroso papilar de alto grado también provenientes del Servicio de Ginecología del Hospital General de Valencia en el año 2016-2017 con los mismos criterios de inclusión de la cohorte retrospectiva. En todos los casos, fue el patólogo el responsable de la recepción de las muestras y selección de la muestra empleada con fines de investigación. Todas las pacientes aceptaron participar voluntariamente en este estudio firmando el correspondiente consentimiento informado. El estudio se llevó a cabo siguiendo lo establecido en la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Ético del Hospital General Universitario de Valencia.

1.2 Muestras

Las muestras de tejido de cáncer de ovario seroso de alto grado de la cohorte retrospectiva consistieron en tejidos incluidos en parafina (procedente de los excedentes del diagnóstico que están disponibles en el banco de tumores del Servicio de Anatomía Patológica procedentes del Hospital General Universitario de Valencia y la obtención de las muestras de tejido de ovario de la cohorte prospectiva tuvo lugar inmediatamente después de la resección quirúrgica de los pacientes, donde un patólogo experto seleccionó dos muestras para realizar los análisis moleculares: una correspondiente al tejido tumoral y otra al tejido normal adyacente lo más alejada posible de la localización del tumor. Ambas muestras se preservaron en *RNAlater*[®]

(Applied Biosystems) para evitar la degradación del ARN y se conservaron a -80° C hasta su uso.

2. Análisis de los patrones de infiltración tumoral

2.1 Grado de infiltración

Los infiltrados linfocitarios fueron analizados en las muestras incluidas en parafina a partir de la tinción de hematoxilina y eosina del diagnóstico histopatológico. En primer lugar, se realiza una confirmación del área seleccionada de las muestras tumorales en la cohorte retrospectiva. Para la evaluación de los patrones de infiltración tumoral el doctorando evaluó las preparaciones y de manera independiente un experto en anatomía patológica del Hospital General de Valencia también realizó las valoraciones. Para la evaluación de estas se procedió a detallarse las mismas visualizadas en un microscopio con una óptica de visualización de 10x, 20x, 40x tomando las siguientes fórmulas para las mismas: el tejido tumoral se dividió en cuatro cuadrantes y en base a este se tomaron las siguientes medidas ([figura 15](#)):

1. **Leve:** representado por solo el 10% de infiltración linfocitaria ocupando solo el 50% de un cuadrante del tumor
2. **Moderado:** representado entre el 10-33% y se basa en la infiltración que ocupa todo el cuadrante tumoral.
3. **Severo:** representa +33% y esté dado por la infiltración mayor a un cuadrante tumoral.

Todas las láminas fueron visualizadas por dos observadores al mismo tiempo con microscopio multicabezal.

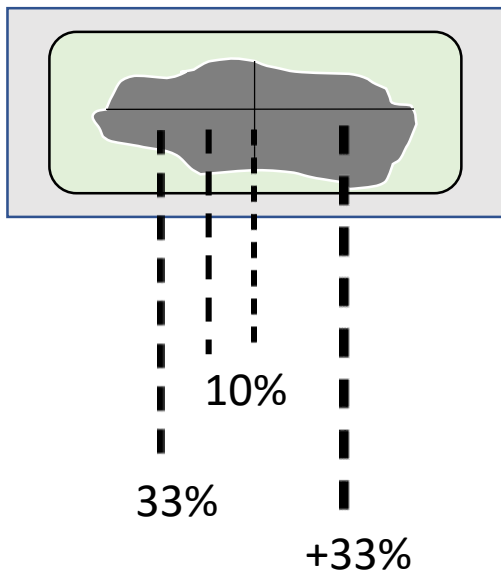


Figura 15. Porcentaje de infiltración linfocitaria el 10% representa la infiltración leve, 10-33% moderada y +33% severa.

2.2 Patrón de infiltración

Así mismo se procedió a valorar cuantitativamente la infiltración inflamatoria linfocitaria tumoral, teniendo en cuenta la distribución y localización específicas. En primer lugar, para determinar la distribución de la celularidad inflamatoria se tuvieron en cuenta dos tipos de patrones fundamentales de distribución: patrón focal y el patrón difuso. El patrón focal, descrito como aquel infiltrado linfocitario cuyos elementos celulares, los linfocitos, se concentran en un foco determinado de la muestra o tejido. Por el contrario, el patrón difuso, se caracteriza por estar constituido por una población celular dispersa por todo el tejido, donde las células se hallan distanciadas entre ellas y las cuales no llegan a confluir en ningún punto en concreto del área sometida a estudio (*figura 16*)

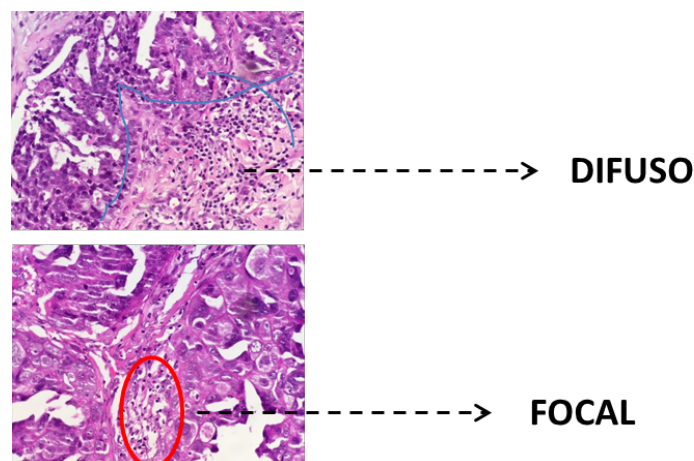


Figura 16. Patrón de Infiltración Focal y Difuso

2.3 Localización de la infiltración

Por otro lado, se llevó a cabo la descripción de la localización del infiltrado siendo peritumoral o intratumoral, en función de si las células inflamatorias rodeaban el estroma tumoral, o, por el contrario, se encontraban en el seno del carcinoma (figura 17).

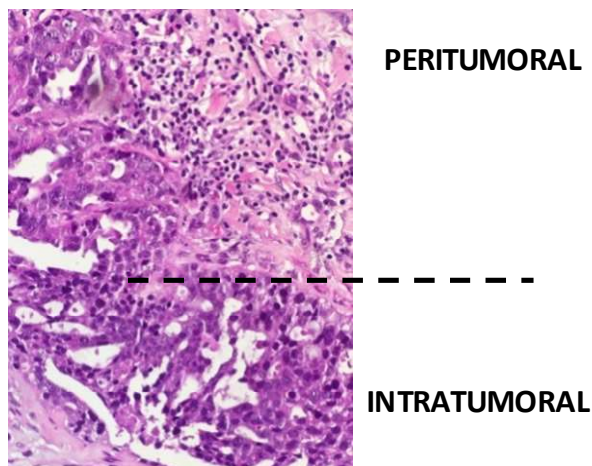


Figura 17. Localización de la Infiltración Peritumoral e Intratumoral

3. Técnicas de Biología Molecular

3.1 Obtención de muestras y aislamiento de ARN en la cohorte retrospectiva.

La serie retrospectiva está formada por 50 muestras incluidas en parafina de cáncer de ovario seroso de alto grado (procedente de los excedentes del diagnóstico que están disponibles en el banco de tumores del Servicio de Anatomía Patológica). Para la extracción del RNA se utilizó el Kit de **All Total Nucleic Acid Isolation** casa comercial *Ambion by Life Technologies*.

Se utilizaron 4 cortes de parafina de 20 mm con un mínimo de tejido tumoral del 80% y a continuación se procedió a la

- ✓ **Desparafinación:** se añade 1ml de xileno a cada muestra y se calienta 3 min a 50 °C para fundir la parafina, seguidamente se procede a retirar el xileno y

realizar 2 lavados con etanol 75% para eliminar los restos del xileno del tejido y seguidamente, se deja evaporar el EtOH.

- ✓ **Digestión de Proteasa:** para este proceso se añadió el buffer de digestión 200ml y 4 µl de proteasa por muestra y se incubó 4 horas a 50 °C y 15 min a 80 °C.
- ✓ **Aislamiento de Ácidos nucleicos:** se procede a la elusión de la muestra y para ello se prepara la máster mix con las siguientes concentraciones (tabla 3):

Tabla 3. Concentraciones máster mix para el aislamiento de ácidos nucleicos

Isolation additive	240 µl
Etanol al 100%	550 µl
Total	790 µl

Posteriormente se pasa por el sistema de columna y se centrifuga descartándose el volumen residual. Se procedió a lavados con Wash 1 y Wash 2/3 y así continuamos al siguiente paso

- ✓ **Digestión con DNasa y Purificación final:** para este paso se precede a preparar la DNasa mix (tabla 4):

Tabla 4. Concentraciones para digestión con DNasa

Cantidad de reacción	Componente
6 µl	10x DNasa buffer
4 µl	DNasa
50 µl	Agua libre de nucleasas

Se añadió 60 µl de DNasa mix en cada muestra dejando encubar 30 minutos a temperatura ambiente. Se procede a los lavados con Wash 1 y Wash 2/3. Finalmente se realiza la elusión con 60 µl de agua libre de nucleasas calentada a 50°C.

3.2 Obtención de muestras y aislamiento de ARN en la cohorte prospectiva

Para la extracción de las muestras de tejido de ovario tumoral y sano adyacente almacenadas con RNAlater[®], se procedió a utilizar TriReagent[®] (Life Technologies), que combina tiocianato de guanidinio y fenol en una solución monofásica para la rápida inhibición de la actividad RNasa. En primer lugar, se disecciona una alícuota de 10-20 mg representativa del tejido con la ayuda de un bisturí estéril y se vuelve a congelar el tejido restante para estudios posteriores. El tejido diseccionado se transfiere a un tubo estéril y se añade 1 ml de TriReagent[®] y se homogeniza en un agitador de alta velocidad, TissueLyser[®] (Qiagen) a 25°C durante 5 minutos. A continuación, se añade cloroformo (en una proporción 1:5, que ayudará a solubilizar la fracción lipídica del tejido) tras 5 minutos de incubación a 25°C en agitación se realiza una centrifugación (12000 g, 15 minutos, 4°C) para separar las diferentes fases: la fase superior acuosa e incolora que contiene el ARN, la interfase y la fase orgánica roja contienen el ADN y la fracción proteica respectivamente.

Se transfiere a un nuevo tubo la fase superior que contiene el ARN, preservándose la fase orgánica (que contiene ADN y proteínas) en 300 µl de etanol absoluto a -20°C para su posterior extracción. Para aislar el ARN presente en la fase acuosa superior se lleva a cabo una precipitación con isopropanol (relación isopropanol-TriReagent 1:2), seguida de un paso de centrifugación (12000 g, 10 minutos, a 4°C), es descartado el sobrenadante y el pellet que contiene el ARN es lavado 2 veces con etanol 75%. Tras lavar el pellet, con un posterior secado para eliminar totalmente cualquier resto de etanol. Finalmente, se resuspende en 50 µl de H₂O libre de RNasa y se incuba a 55°C durante 5 minutos para lograr la resuspensión del ARN y para finalizar se aplica 0,1ml de DNasa para eliminar los restos de DNA.

3.3 Cuantificación del ARN extraído en ambas cohortes.

Para la cuantificación y estimación de la calidad del ARN extraído utilizamos la determinación por nanoespectrofotometría de las absorbancias de las muestras. Para ello, se determinaron las absorbancias a 260, 280 y 230 nm con el equipo NanoDrop 2000® (Thermo Scientific). Este espectrofotómetro es capaz de realizar medidas precisas con cantidades de muestra muy pequeñas, del orden de 0,5 µl. Para estimar la concentración de ARN se utilizan las medidas de absorbancia a 260 nm. A la vez, el equipo proporciona información sobre la pureza del ARN, mediante las ratios de absorbancia a 260/280nm y 260/ 230 nm que deben oscilar entre 1,65 – 2 y 2 – 2,2, respectivamente para considerar una muestra como pura.

3.4 Transcripción Reversa.

A partir del ARN extraído de las muestras de ambas cohortes se realizó la reacción de Retotranscripción (RT) para la síntesis del ADN complementario de cadena simple (ADNc). La reacción se llevó a cabo a partir de 1 µg de ARN total para un volumen final de reacción de 20 µl, utilizando el kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems) que usa hexámeros al azar y empleando un Termociclador Mastercycler (Eppendorf), según las instrucciones del fabricante. Las condiciones para el termociclador se detallan en la [tabla 5](#). Terminada la RT, las muestras de ADNc se congelaron inmediatamente a -20°C hasta su utilización.

Tabla 5. Programa de tiempos y temperaturas utilizados por la transcripción reversa

Pasos	Duración	Temperatura
1	10 minutos	25 °C
2	2 horas	37 °C
3	5 segundos	85 °C

3.5 PCR Cuantitativa a tiempo real (RTqPCR).

La cuantificación de los transcritos de los genes problema se llevó a cabo mediante la reacción de PCR cuantitativa en tiempo real (RTqPCR) usando sondas de hidrólisis es-

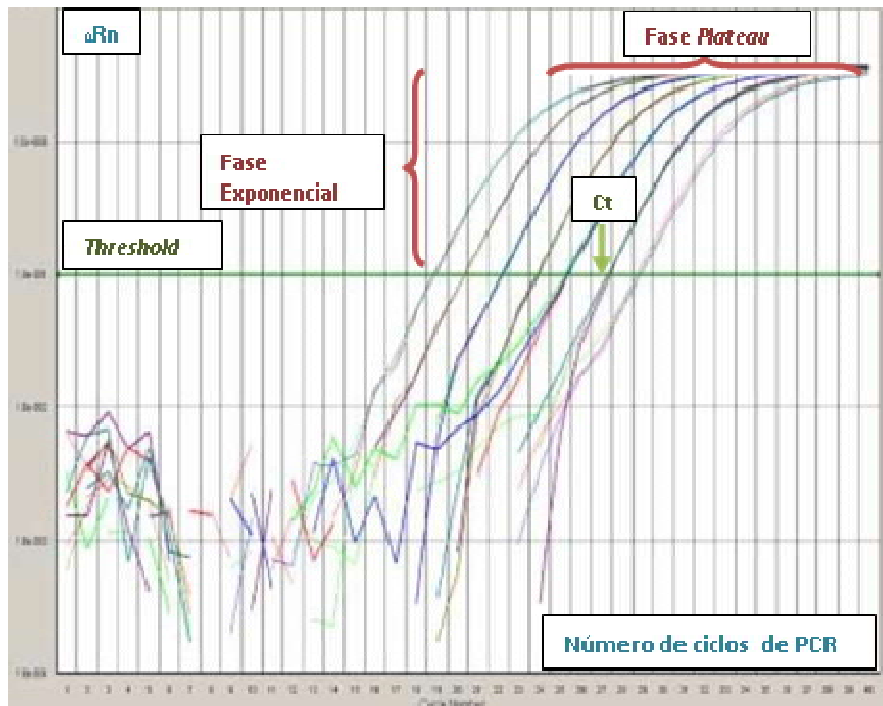


Figura 19. Esquema de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real. RT-qPCR figura reproducida por Taron et al.2014.

El valor Ct es el que se empleará para determinar la cantidad relativa de cada gen, ya que el valor Ct está relacionado con la cantidad de moléculas diana presentes en cada muestra. La presencia de mayor cantidad de ADNc molde al inicio de la reacción se asocia a un menor valor Ct ya que son necesarios un menor número de ciclos de PCR para que la señal de fluorescencia supere el *Threshold*. El valor Ct se alcanza en la fase exponencial de amplificación. Cuando los componentes de la reacción sean limitantes, no se generará producto de amplificación exponencialmente y se alcanza la fase de plateau. En este sentido, el valor Ct proporciona una medida más fiable y reproducible que una medición del producto acumulado al final de la reacción, ya que durante la fase exponencial no se presenta ningún factor limitante.

En este estudio la RTqPCR ha sido la técnica de elección para evaluar la expresión diferencial de varios genes ya que permite la amplificación y cuantificación del ADNc de los mismos en la muestra empleando como medida el valor Ct, que dota de fiabilidad y reproducibilidad a los datos. Además, esta técnica consigue minimizar tanto el riesgo de falsos negativos, por su fiabilidad, así como el riesgo de falsos positivos ya que, trabajando en condiciones adecuadas, las probabilidades de contaminación son bajas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron la expresión de 20 genes diana resumidos en la [tabla 7](#) utilizando sondas de hidrólisis prediseñadas TaqMan Gene Expression Assay (Life Technologies). Como controles endógenos se emplearon los genes de referencia *ACTB*, *HPDR1*, *CDKN1B*, *GUSB*, *PPIA* ([tabla 6](#)). Esta combinación de genes de referencia se eligió en función del resultado obtenido después de analizar aproximadamente un 30% de las muestras mediante el software GeNorm.

En la normalización posterior, realizada mediante el método Pfaffl (Pfaffl, 2001), el factor de normalización para tejido normal y para tejido tumoral se calculó a partir de la media geométrica de los cinco genes de referencia.

Tabla 6. Genes de referencia utilizados como controles endógenos

GEN	AMPLICON (pb)
ACTB	63
HPDR1	72
CDKN1B	71
GUSB	71
PPIA	68

Tabla 7. Sondas Taqman Gene Expression Assay utilizadas en el estudio

Gen	Nombre	Amplicon (pb)	Hs
CD25	<i>interleukin 2 receptor, alpha</i>	67	Hs00166229_m1
CD274	<i>CD274 molecule</i>	89	Hs01125301_m1
CD4	<i>CD4 molecule</i>	60	Hs00181217_m1
CD8A	<i>CD8</i>	58	Hs00233520_m1
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>	93	Hs00175480_m1
CXCR4	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>	78	Hs00237052_m1
FoxP3	<i>forkhead box P3</i>	64	Hs00203958_m1
IDO-1	<i>indoleamine 2,3-dioxygenase 1</i>	66	Hs00984148_m1
IL10	<i>interleukin 10</i>	74	Hs00961622_m1
IL7R	<i>interleukin 7 receptor</i>	68	Hs00233682_m1
PDCD1	<i>programmed cell death 1</i>	89	Hs00169472_m1
PDCD1LG2	<i>programmed cell death 1 ligand 2</i>	61	Hs00998133_m1
TNFRSF4	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4</i>	93	Hs01057777_m1

Gen	Nombre	Amplicon (pb)	Hs
TNFSF4	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4</i>	72	Hs00533968_m1
ICOS	<i>inducible T-cell co-stimulator</i>	71	Hs00182411_m1
ICOSLG	<i>inducible T-cell co-stimulator ligand</i>	59	Hs04261471_m1
LGALS9	<i>lectin, galactoside-binding, soluble, 9</i>	82	Hs00323621_m1
TNFRSF9	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9</i>	67	Hs00371321_m1
TNFSF9	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9</i>	73	Hs00155512_m1

Previamente a analizar la expresión de los 20 genes estudiados en las muestras de tejido tumoral para la cohorte retrospectiva y de tejido tumoral y sano adyacente de la cohorte prospectiva de pacientes, se calcularon las eficiencias de estos genes. La eficiencia de un gen es la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de ADNc en cada ciclo de reacción (Bustin y Nolan, 2004). Para calcular la eficiencia de cada gen, se realizaron 5 diluciones seriadas de una muestra de ADNc de referencia (Human Reference cDNA, Clontech) y se llevó a cabo la amplificación de cada gen mediante RT-qPCR. Además, en todos los casos se incluyó un control negativo (NTC). Con los valores de Ct de estas diluciones se construye una curva, de la cual se debe obtener la pendiente. Aplicando la siguiente relación, $E = (10^{-1/\text{pendiente}})$, obtuvimos directamente el valor de la eficiencia de amplificación para cada gen analizado.

Todas las reacciones de RTqPCR del estudio se llevaron a cabo en placas de 384 pocillos, con un volumen final de reacción de 5 μl por pocillo (4 μl de Máster Mix (tabla 8) y 1 μl de muestra) (tabla 8).

Tabla 8. Componentes de la Máster Mix para la amplificación de la RT-qPCR por cada caso a analizar.

Reactivo	Volumen (μl)
TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)®(Life Technologies)	2,5
TaqMan Gene Expression Assay (Life Technologies)	0,25
Agua libre de RNAsas	1,25

El reactivo TaqMan Gene Expression Máster Mix (2X) (Life Technologies) contiene la enzima AmpliTaq Gold DNA® polimerasa, dNTPs, buffer y AmpErase UNG®, una enzima

uracil N- glicosilasa que evita la reamplificación de productos previamente amplificados. Una vez calculadas las eficiencias de los genes, se procedió a analizar la expresión de estos en las muestras de ambas cohortes de las 70 pacientes diagnosticadas con cáncer de ovario seroso de alto grado (50 cohorte retrospectiva y 20 cohorte prospectiva).

En las reacciones de amplificación se incluyeron diferentes controles: control negativo procedente de la reacción de Retotranscripción, NTC (No Template Control) con el objetivo descartar cualquier tipo de contaminación, y como controles positivos se emplearon: ADNc humano de referencia (Human reference cDNA, Clontech).

Cada reacción se realizó por duplicado en placas de 384 pocillos con un volumen final de 5 µl, de los cuales, 2,5 µl de *TaqMan Gen Expression Máster Mix II, no UNG* (Applied Biosystems), 1,25 µl de agua libre de nucleasas, 0,25 µl de *TaqMan MicroRNA Assay* (Applied Biosystems), y 1 µl de ADNc. En cada PCR se incluyeron controles negativos. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo *LightCycler® 480 System* (Roche, Basilea, Suiza) siguiendo las condiciones que se describen en la [tabla 9](#).

Tabla 9. Programa de ciclos empleados para la RTqPCR

Fase		Duración	Temperatura
Pre-PCR	<i>AmpErase UNG</i>	2 minutos	50°C
	<i>Hot Start</i>	10 minutos	95°C
PCR (40 ciclos)	<i>Desnaturalización</i>	15 segundos	95°C
	<i>Unión/Extensión</i>	1 minuto	60°C

4. Cálculo de eficiencias de los genes analizados.

Se calcularon las eficiencias de los genes estudiados ya que para la aplicación del método de normalización Pfaffl (Pfaffl, 2001) se requiere que el gen tenga un valor de eficiencia aproximadamente de 2. A partir de los valores Ct obtenidos después de la reacción de amplificación, se calcularon las rectas de regresión para cada uno de los genes analizados.

Para obtener dicha ratio, en primer lugar, se calcula el factor de normalización, para tejido sano y tumoral, a partir del promedio del valor Ct de los controles endógenos. El factor de normalización de tejido sano y tumoral para cada muestra será la media geométrica de los promedios del valor Ct de *ACTB*, *HPDR1*, *CDKN1B*, *GUSB*, *PPIA* (Vandesompele *et al.*, 2002). Esta normalización es necesaria ya que si la expresión de los controles endógenos varía es indicativo de variaciones en la cantidad de ARN total empleada en la síntesis de ADNc y no a cambios en la expresión. El factor de normalización, tanto para tejido sano como tumoral, se usará como la expresión génica de referencia a la hora de calcular la diferencia relativa de la expresión génica.

5. Cuantificación relativa de la expresión génica.

Para la cuantificación de la expresión génica relativa se usó el método matemático desarrollado por Michael W. Pfaffl (Pfaffl, 2001). Este método se basa en la cuantificación relativa de la expresión del gen problema en tejido tumoral respecto a su expresión en tejido normal esto para el caso de la cohorte prospectiva donde contábamos con tejido normal adyacente y en el caso de la cohorte retrospectiva donde no se cuenta con tejido normal se basó en la cuantificación relativa de la expresión del gen problema en tejido tumoral con respecto al cDNA de referencia. Este análisis de la expresión génica por RT-qPCR se basa en una cuantificación relativa comparando la expresión del gen diana en las muestras respecto a la expresión de los controles endógenos (*ACTB*, *HPDR1*, *CDKN1B*, *GUSB*, *PPIA*) seleccionados debido a que son los que presentan expresión más estable en las muestras analizadas. El modelo matemático empleado para la cuantificación relativa de la expresión génica es el propuesto por W. Pfaffl (Pfaffl, 2001), que permite estimar la cantidad relativa de un gen determinado basándose en la siguiente ecuación (Ecuación 1) :

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

Ecuación 1. Formula de Pfaffl para el cálculo de la ratio de expresión génica relativa. Target: Gen analizado; ref: gen endógeno; E: eficiencia del gen; Cp: ciclo de corte; ΔCp: diferencia de expresión entre el tejido normal y tumoral.

6. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa estadístico SPSS 15.0. El principal objetivo del análisis estadístico es determinar la influencia de la expresión génica en el tiempo libre de progresión (TLP), supervivencia global (SG), así como establecer una relación entre los niveles de expresión génica relativa con las variables clínico-patológicas de los pacientes. Para ello, se han analizado la edad, los antecedentes patológicos, el estadio, el tipo de cirugía, la intención del tratamiento y el hábito tabáquico como las variables clínico-patológicas más relevantes en la población.

Previamente a realizar los análisis estadísticos, se revisaron los datos de expresión introducidos en la base de datos y se cribaron aquellos valores anómalos. Cabe mencionar que el nivel de expresión de algunos de los genes estudiados en ciertas muestras se encontraba por debajo del límite de detección del equipo, por lo que fue imposible conseguir un valor medible en estos casos. En estas muestras se consideró el valor de Ct máximo (correspondiente a la mínima expresión detectable) para el gen y se calculó la ratio de expresión génica relativa como se ha descrito previamente.

Para determinar la distribución de los datos de las variables a estudio, se realizó un análisis de normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov puesto que el tamaño muestral es mayor de 50 casos. La significación ($p < 0,05$) de la prueba de Kolmogorov-Smirnov reveló que las variables no siguen una distribución normal. Por consiguiente, los análisis estadísticos realizados pertenecen a la estadística no paramétrica.

La dicotomización de variables se realizó en los análisis estadísticos que así lo requerían, tomando la mediana como valor de corte en el caso de variables continuas. En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de la cohorte y de la expresión de los genes estudiados. Se consideró arbitrariamente qué valores de mediana de expresión génica relativa mayores a 1,5 o menores a 0,5, indicaban mayor o menor expresión respectivamente, en tejido tumoral respecto a tejido sano. Se tomó la mediana como

medida comparativa ya que se ve afectada en menor medida que la media por la variabilidad de los datos y aporta mayor robustez al análisis estadístico.

Para analizar las asociaciones entre los niveles de expresión génica relativa y las principales variables clinicopatológicas, se emplearon las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney para la comparación de dos grupos independientes y la de Kruskal Wallis para la comparación de más de dos grupos independientes de muestras.

Las tablas de contingencia (estadístico χ^2) se utilizaron para determinar la correlación (dependencia o independencia) entre dos variables cualitativas nominales. Para establecer la correlación entre dos variables en el mismo caso, o paciente, se llevó a cabo la prueba de Wilcoxon perteneciente a la estadística no paramétrica.

Por último, se realizaron los análisis de supervivencia teniendo en cuenta el tiempo libre de progresión (TLP) y la supervivencia global (SG). El tiempo libre de progresión (TLP) se conoce como el periodo comprendido entre la fecha del diagnóstico, en este caso, cirugía, y la fecha en la que se observa recaída de la enfermedad (local o a distancia). La supervivencia global (SG) abarca el periodo comprendido entre la fecha de cirugía y la fecha de óbitos. En los pacientes que no habían recidivado ni fallecido, se tomó como la fecha del último seguimiento como fecha final. Para ello, se determinó el valor pronóstico de cada uno de los genes estudiados, así como de las principales variables clinicopatológicas, mediante el análisis univariante de regresión de Cox, y se representaron las curvas de supervivencia mediante el análisis *Kaplan-Meier* (estadístico de contraste Log-rango). Finalmente, se realizó un análisis multivariante de regresión de Cox con todas aquellas variables que habían resultado significativas previamente para determinar si se podían establecer como biomarcadores pronóstico-independientes.

En todos los análisis estadísticos realizados se consideró un nivel de significación estadística correspondiente a un p-valor $< 0,05$, a partir del cual se rechaza la hipótesis de partida y se acepta la hipótesis alternativa.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo I.

1. Características Clinicopatológicas de la Cohorte

Retrospectiva

1.1 Características de la Cohorte Retrospectiva

La cohorte retrospectiva está compuesta por 50 pacientes, provenientes de cirugías de cáncer de ovario realizadas en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia entre los años 2004-2015; en la [tabla 10](#) se muestran las principales características clinicopatológicas de la cohorte. La mediana de edad de las pacientes fue de 65 años, 62% entre 31-65 años, seguido del 38% igual o mayores de 65 años. Un número reducido de pacientes presentaban antecedentes oncológicos, únicamente el 2% presentaron antecedentes de cáncer de mama en familiares de primera línea y 6% antecedentes de cáncer de ovario en familiares de primera línea. El 78% de los casos intervenidos quirúrgicamente fueron estadios III y IV según el sistema de estadificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia FIGO, siendo los estadios en los que con más frecuencia se diagnóstica este tipo de tumores. (15% estadio I, 7% estadio II, 55% estadio III y 23% estadio IV). En cuanto a hábitos tóxicos como el tabaquismo, el 58% de las pacientes eran fumadoras.

En relación con la técnica quirúrgica, se plantearon 2 variables (cirugía óptima y cirugía subóptima), la cirugía óptima (enfermedad no macroscópicamente visible) representaba el 40%, siendo cirugía subóptima (enfermedad macroscópicamente visible) un 54% y finalmente un 6% no pudo recibir cirugía por distintas causas, en las que se destacan pelvis congeladas y comorbilidades de alto riesgo quirúrgico.

Respecto al abordaje oncológico, un 68% de las pacientes recibieron terapia adyuvante y el 22% neoadyuvante. Así mismo, tan solo el 10% no recibió tratamiento por distintas causas, entre las que se destacaron las comorbilidades asociadas que contraindicaban el tratamiento actual.

Tabla 10. Características clinicopatológicas de la cohorte retrospectiva

CARACTERÍSTICAS	N: 50	%
EDAD		
Mediana	65 [31-87]	
<65	31	62%
≥ 65	19	38%
ANTECEDENTE ONCOLÓGICO		
Cáncer de mama	1	2%
Cáncer de ovario	3	6%
No	46	92%
ESTADIOS		
I-II	11	22%
III-IV	39	78%
HÁBITO TABÁQUICO		
Si	29	58%
No	21	42%
CIRUGÍA		
Óptima	20	40%
Subóptima	27	54%
No	3	6%
TRATAMIENTO		
Adyuvante	34	68%
Neoadyuvante	11	22%
Sin tratamiento	5	10%

2. Características de la infiltración linfocitaria

2.1 Características de la infiltración en la cohorte retrospectiva

Debido a la importancia que presenta el infiltrado linfocitario se procedió a caracterizar las diferentes muestras en base al patrón, grado y localización linfocitaria como queda plasmado en la [tabla 11](#).

Tabla 11. Características de la infiltración cohorte retrospectiva

CARACTERÍSTICAS	N:50	%
INFILTRACIÓN		
Sí	50	100%
No	0	0%
LOCALIZACIÓN DE LA INFILTRACIÓN		
Peritumoral	13	26%
Intratumoral	17	33%
Peri-intratumoral	20	41%
PATRÓN DE INFILTRACIÓN		
Focal	14	28%
Difuso	36	72%
GRADO DE INFILTRACIÓN		
Débil <10%	11	22%
Intermedio 10-33%	17	34%
Fuerte >33%	22	44%
CUERPOS DE PSAMOMA		
Si	35	70,37%
No	15	29,62%

Para la caracterización del infiltrado linfocitario se seleccionaron solo las láminas de hematoxilina y eosina de cada muestra tumoral con infiltración linfocitaria. Así mismo, se procedió a describir las características de cada muestra observándose que el patrón de localización predominante fue el peri-intratumoral (figura 20) representado por el 41%, seguido del intratumoral (figura 21) en un 33% y la localización peritumoral (figura 22,23,24) en un 26%.

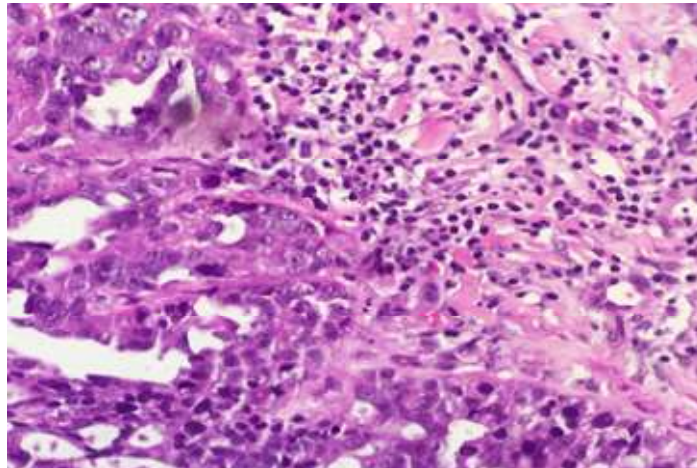


Figura 20. Patrón de infiltración peri-intratumoral la hematoxilina tiñe los núcleos de las células linfocitarias en azul a púrpura y la eosina colorea otros elementos celulares en los tejidos en una tonalidad del rosa al rojo (40x).

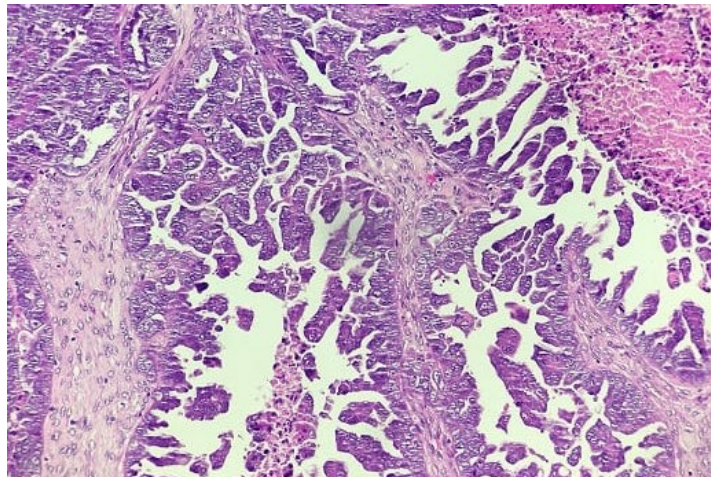


Figura 21. Patrón de infiltración linfocitaria intratumoral la hematoxilina tiñe los núcleos de las células linfocitarias en azul a púrpura y la eosina colorea otros elementos celulares en los tejidos en una tonalidad del rosa al rojo (20x).

En cuanto a la valoración cuantitativa de la infiltración inflamatoria, el patrón focal, descrito como la infiltración de linfocitos que se concentran en un foco determinado de la muestra o tejido fue del 28%; mientras que el patrón difuso, caracterizado por una población linfocitaria dispersa por todo el tejido, donde las células se hallan distanciadas entre ellas y las cuales no llegan a confluir en ningún punto en concreto del área sometida a estudio representó el 72% (figura 25).

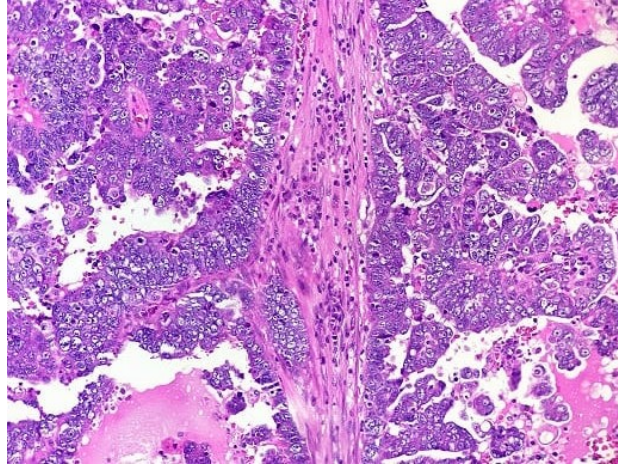


Figura 22. Grado de débil de infiltración linfocitaria Peritumoral. La figura representa un patrón de infiltración de localización peritumoral con un grado de infiltración linfocitaria leve 20X HE.

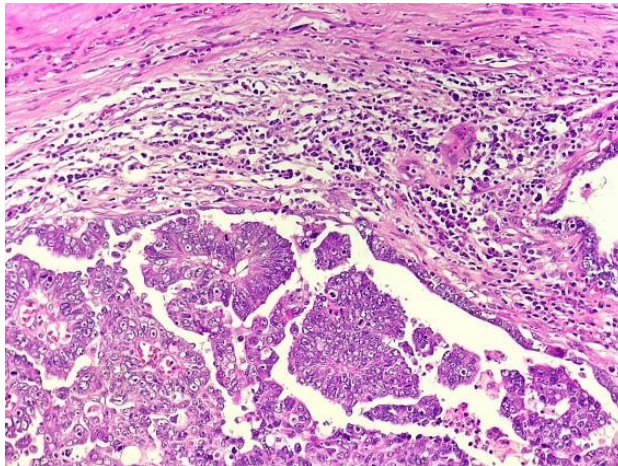


Figura 23. Grado intermedio de infiltración linfocitaria Peritumoral. La figura representa un patrón de infiltración de localización peritumoral con un grado de infiltración linfocitaria moderado 20X HE.

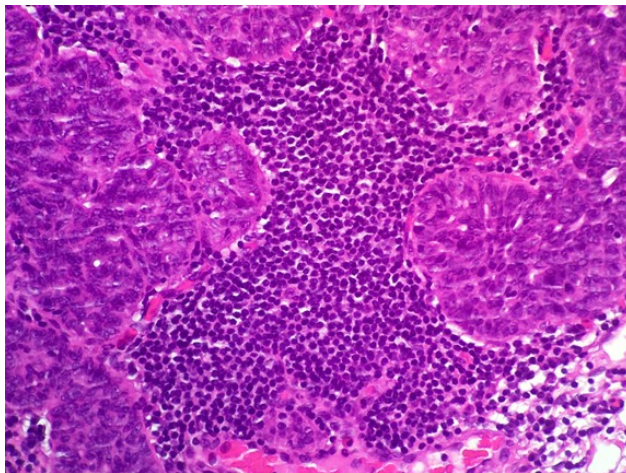


Figura 24. Grado severo de infiltración linfocitaria Peritumoral. La figura representa un patrón de infiltración de localización peritumoral con un grado de infiltración linfocitaria fuerte 40X HE.

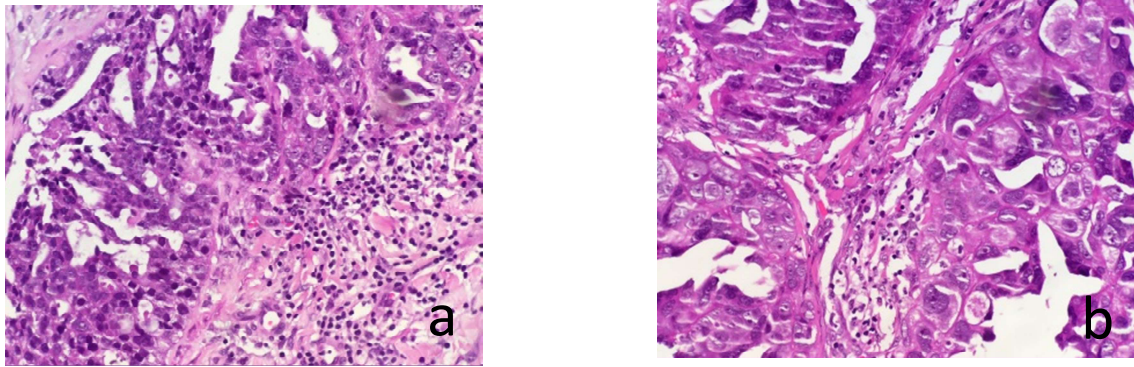


Figura 25. Representación del patrón de infiltración linfocitaria. a) patrón difuso b) patrón focal, 20x.

El grado de infiltración mayormente observado fue el grado de infiltración severo (figura 24) en un 44%, seguido del grado intermedio (figura 23) (34%) y del débil (figura 22) (22%). En las figuras 22, 23, 24 se muestra una sección de tumor de ovario observada en un microscopio óptico con una lente de 20-40x aumentos, en donde la hematoxilina tiñe los núcleos de las células linfocitarias en azul a púrpura y la eosina colorea otros elementos celulares en los tejidos en una tonalidad del rosa al rojo.

También se describieron otras características propias de estos tumores como la presencia de los cuerpos de Psamoma, visualizándose en un 70% de las muestras (tabla 11). Los cuerpos de Psamoma son patognomónicos de carcinoma ovárico tipo seroso ver figura 26.

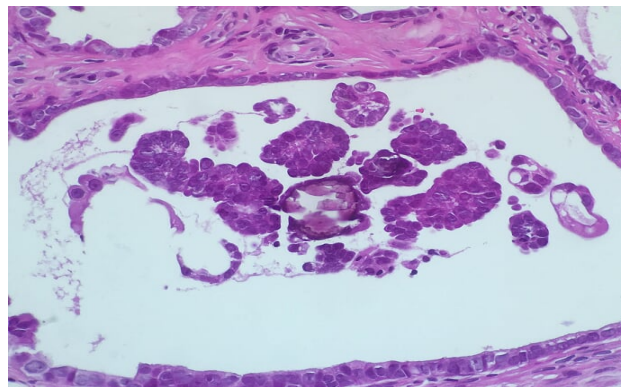


Figura 26. Imagen en la que se aprecia los cuerpos de Psamoma en región central (microcalcificación en laminas concéntricas) HE 40X.

Los cuerpos de Psamoma (CPS) inicialmente fueron descritos en 1971 en el carcinoma seroso de ovario, como una reacción específica tumor-huésped que representaban una

degeneración gradual y calcificación de pequeñas papilas epiteliales (Aure, Høeg y Kolstad, 1971). Años más tarde, estas estructuras concéntricas en forma de laminillas calcificadas se observaron con más frecuencia en el carcinoma papilar de tiroides, meningioma y cistadenocarcinoma seroso papilar de ovario, pero raramente se han notificado en otros tumores y lesiones benignas. Posteriormente, Meng y colaboradores describen estas estructuras en el cáncer seroso ovárico con un diámetro máximo de 35 μm y que estaban compuestas de cristales columnares ligeramente más largos y granulados con 20-100 nm de diámetro. Estas características mineralógicas detalladas ayudan a diferenciar estas estructuras de otros tipos de tumores (Fanlu *et al.*, 2015). Sin embargo, a pesar de numerosos estudios, la formación de estos sigue siendo un mecanismo poco conocido. Se sugiere que los CPS pueden representar un proceso biológico activo que en última instancia conduce a la degeneración y muerte de las células tumorales y al retraso del crecimiento de la neoplasia (Caro, 2009).

3. Análisis de Expresión Génica

3.1 Cuantificación y valoración de la calidad del RNA de la cohorte retrospectiva

Para la determinación relativa de la expresión génica se analizaron 50 muestras de tumor de COSAG. El ARN se aisló a partir de los cortes de parafina que contenían las piezas de resección de tejido (aproximadamente 10-20 mg). Se obtuvo una concentración óptima de ARN de todas las muestras; la mediana para los tejidos tumorales fue de 96,2 (15,5 – 480,3) (tabla 12).

La calidad e integridad del ARN extraído se evaluó mediante nanoespectrofotometría de las absorbancias de las muestras. Para ello, se determinaron las absorbancias a 260, 280 y 230 nm con el equipo NanoDrop 2000® (Thermo Scientific). Este espectrofotómetro es capaz de realizar medidas precisas con cantidades de muestra muy pequeñas, del orden de 0,5 μl . Para estimar la concentración de ARN se utilizan las medidas de absorbancia a 260 nm. A la vez, el equipo proporciona información sobre la pureza del ARN, mediante los ratios de absorbancia a 260/280nm y 260/ 230 nm que

deben oscilar entre 1,65 – 2 y 2 – 2,2, respectivamente para considerar una muestra como pura. A pesar de que algunas muestras tenían ratios que se salían de los límites obtuvo suficiente ARN para realizar el estudio.

Tabla 12. Cuantificación del RNA cohorte retrospectiva

MUESTRA	ng/μL	260/280	260/230	MUESTRA	ng/μL	260/280	260/230
TUMOR 1	136,8	1,86	0,92	TUMOR 26	406,1	1,91	1,63
TUMOR 2	97,2	1,84	0,74	TUMOR 27	46,2	1,88	1,04
TUMOR 3	41,5	1,83	0,14	TUMOR 28	41,1	1,87	1,05
TUMOR 4	26,8	1,76	2,26	TUMOR 29	105,8	1,81	0,88
TUMOR 5	55,1	1,88	0,41	TUMOR 30	102,7	1,86	0,43
TUMOR 6	68,6	1,79	1,47	TUMOR 31	187,3	1,87	1,81
TUMOR 7	985,9	1,9	1,97	TUMOR 32	245,2	1,91	2,06
TUMOR 8	480,3	1,94	1,87	TUMOR 33	30,4	1,96	0,16
TUMOR 9	248,4	1,91	1,24	TUMOR 34	57,8	1,83	1,5
TUMOR 10	233,3	1,85	1,69	TUMOR 35	75,3	1,88	0,29
TUMOR 11	226,7	1,75	1,52	TUMOR 36	93,8	1,88	2,31
TUMOR 12	80	1,79	1,29	TUMOR 37	40,2	1,99	0,12
TUMOR 13	571,4	1,86	1,83	TUMOR 38	82,4	1,94	0,98
TUMOR 14	309,7	1,86	1,6	TUMOR 39	362	1,95	1,79
TUMOR 15	95,2	1,87	1,51	TUMOR 40	174,1	1,93	1,28
TUMOR 16	71	1,87	1,05	TUMOR 41	86,9	1,97	0,17
TUMOR 17	70,5	1,85	1,53	TUMOR 42	56,6	1,99	1,47
TUMOR 18	99,9	1,82	1,59	TUMOR 43	280,5	1,98	1,48
TUMOR 19	49,2	1,81	1,02	TUMOR 44	102,5	1,89	0,79
TUMOR 20	20	2,03	0,85	TUMOR 45	149,8	1,92	1,62
TUMOR 21	139,2	1,84	1,52	TUMOR 46	82,4	1,94	0,7
TUMOR 22	59,4	1,89	1,32	TUMOR 47	138,3	1,93	1,13
TUMOR 23	15,5	2,02	0,51	TUMOR 48	75,7	1,97	1,12
TUMOR 24	19,6	2,03	0,21	TUMOR 49	157,1	1,89	1,21
TUMOR 25	176,2	1,84	1,56	TUMOR 50	421,6	1,91	1,57

3.2 Análisis de Expresión Génica Relativa de la cohorte retrospectiva

El análisis de la expresión génica relativa de los genes implicados en la inmunoregulación tumoral se realizó en las 50 muestras de COSAG incluidas en parafina. Los 20 genes fueron: genes involucrados en los infiltrados inflamatorios (*CD4*, *CD8*), población Treg (*TGFβ1*, *CTLA-4*, *IL-10*, *FOXP3*, *CD25*, *CD127*, *CXCX4*, *IDO*) y mediadores involucrados en el control de los checkpoints inmunológicos (como: *PD-1*,

PDL-1, PDL-2; OX40, OX40L; ICOS, ICOS-L; galectina 9; CD137, CD137L). Los niveles relativos de expresión génica se basaron en la expresión de los 20 genes diana analizados en tejidos tumorales frente a su cDNA de referencia; éstos se normalizaron contra genes endógenos y se calcularon usando la fórmula matemática de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Se resalta que solo se expresaron 17 genes por lo que se excluyeron 3 (*OX40, CD137L, IL10*) de los análisis de expresión génica relativa ya que no se expresaron en ninguna de las muestras.

La expresión de cinco genes endógenos (*ACTB, HPDR1, CDKN1B, GUSB, PPIA*) se ensayó en un subconjunto que comprende aproximadamente el 30% de las muestras con el fin de establecer el mejor control interno. Para este propósito, utilizamos los softwares Genorm, Bestkeeper, Normfinder y finalmente el Delta Ct comparando por orden de prioridad que indicó que la opción más estable era la combinación de los 5 *ACTB, HPDR1, CDKN1B, GUSB, PPIA* ver [figura 27](#). Siguiendo el procedimiento propuesto por Vandesompele et al., se calculó un factor de normalización basado en la expresión de estos cinco genes endógenos utilizando la media geométrica (Vandesompele *et al.*, 2002).

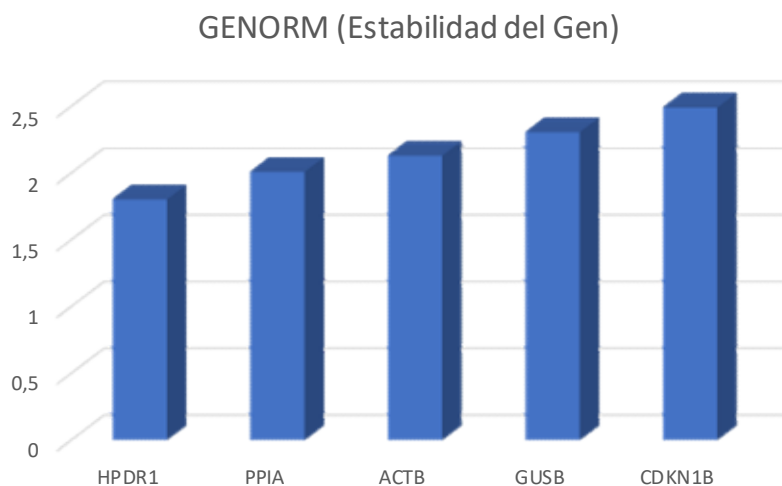


Figura 27. Programa Genorm que evalúa la estabilidad de los genes endógenos utilizados lo cual demostró que los 5 genes utilizados fueron los ideales para normalizar los valores de los biomarcadores.

De esta manera, los resultados se expresan en relación entre la expresión del gen analizado y la de los genes de referencia endógenos que son *ACTB, HPDR1, CDKN1B, GUSB,*

PPIA en comparación en la muestra tumoral con respecto cDNA de referencia debido a que en la cohorte retrospectiva incluida en parafina presenta la dificultad de poder obtener tejido normal adyacente. El factor de normalización del tejido tumoral y el cDNA para cada muestra fue la media geométrica de los promedios del valor Ct de *ACTB*, *HPDR1*, *CDKN1B*, *GUSB*, *PPIA*. Esta normalización es necesaria ya que si la expresión de los controles endógenos varía es indicativo de variaciones en la cantidad de ARN total empleada en la síntesis de ADNc y no a cambios en la expresión. El factor de normalización para el tejido tumoral dio como resultado los niveles de la expresión génica de referencia a la hora de calcular la diferencia relativa de la expresión génica.

Se considero expresión diferencial el ratio obtenido con valores superiores a 2, indicando mayor expresión del gen diana en tejido tumoral que en el cDNA de referencia, o inferiores 0,5 en el caso de que el gen diana se encuentre menos expresado en tejido tumoral que en el cDNA de referencia.

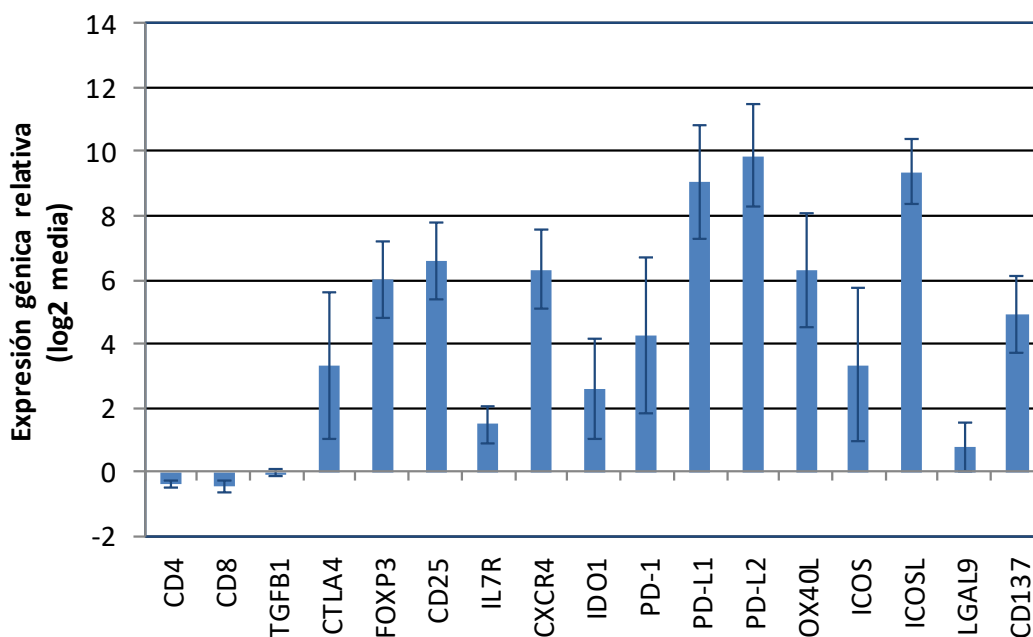


Figura 28. Representación gráfica de la expresión génica relativa de la cohorte retrospectiva. Los resultados representados son \log_2 media \pm error típico de la media.

Los niveles de expresión de los genes estudiados se expresaron como valores de cuantificación relativa (figura 28). Consideramos que un gen está sobreexpresado cuando la mediana de expresión es superior a 2 (2x), e infraexpresado si la mediana tiene un va-

lor por debajo de 0,5 (0,5x). Por tanto, nuestros resultados mostraron que *CTLA4* (2,5x), *FOXP3* (6x), *CD25* (7x), *CXCR4* (6,1x), *PD-1* (4x), *PD-L1* (8,5x), *PDL2* (10x), *OX40L* (6x), *ICOS* (3x), *ICOSL* (9x) *CD137* (4,5x) se encontraba sobreexpresado en el tejido tumoral en relación con el cDNA de referencia, mientras que *TGFB1* (-0,3x), *CD4* (0,5x), *CD8* (0,6X) se encontraba infraexpresado en el tumor. Para visualizar mejor estos resultados, fueron log2-normalizados y su media fue representada (figura 28).

A continuación, realizamos un análisis en mayor profundidad de los genes estudiados.

En referencia a *CD8* en nuestra cohorte se encontró infraexpresado, no siendo así en otros estudios de mayor tamaño muestral (Li *et al.*, 2017). Además, la infraexpresión encontrada de este gen en nuestro estudio, pudiera estar relacionada con las diferentes características muestrales y técnicas utilizadas en investigaciones previas.

Se aprecia la expresión elevada de *FOXP3* con una mediana de 5,22 (0,42-1242,33). Toker caracterizó las células Treg que infiltran cánceres de ovario y las cuales muestran un fenotipo que se caracteriza por mayor expresión de *FOXP3* asociándose con un aumento de la plasticidad y la función de las células T efectoras (Toker *et al.*, 2018). También han sido reportados valores similares en otros tipo de cáncer como en el melanoma primario (Gerber *et al.*, 2014). Uno de los grandes aportes a la regulación inmune es la identificación de este biomarcador, un factor regulador de la transcripción que participa directamente en la función de las células reguladoras T (*CD4+*). La expresión de *FOXP3* también se induce transitoriamente en células T *CD4+* y *CD8+* tras la estimulación (Roncador *et al.*, 2005) y, su expresión en células tumorales ha sido reportada en diferentes tipos de cánceres aparte del melanoma (Triulzi *et al.*, 2013).

Por el contrario, la baja expresión de *TGFB-1* con una mediana de 0,67 (0,13-3,38) no se ha visto documentada previamente en cáncer de ovario. A pesar de tener bajos niveles, el *TGFB-1* tiene funciones pleiotrópicas que regulan el crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis, la motilidad y la invasión, la producción de matriz extracelular, la angiogénesis y la respuesta inmune (Neuzillet *et al.*, 2015). La desregulación de señalización de *TGFB-1* es frecuente en tumores y tiene un papel crucial en el inicio, desarrollo y metástasis del tumor, *TGFB1* es una citoquina reguladora que actúa como supresor tumoral y con efectos promotores del tumor como lo es en líneas celulares del tejido

de cáncer de mama (CM). Los datos sobre el nivel de *TGFB1* circulante y su posible valor pronóstico en pacientes con CM son contradictorios. El nivel sérico de *TGFB1* es elevado en pacientes con CM y tiene un valor pronóstico favorable. Sin embargo, no tiene un papel predictivo en la respuesta de quimioterapia (Ciftci *et al.*, 2014). También se ha encontrado que el polimorfismo *TGFB1* rs1800469 podría ser un biomarcador predictivo del riesgo de desarrollar metástasis cerebrales en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (Wang *et al.*, 2015).

CTLA4 se encontró sobreexpresado con una mediana de 3,50 (0,18-89,74). El punto de control inmune *CTLA4* regula la activación de las células T en las primeras fases de la respuesta inmune, la sobreexpresión de este gen en COSAG está siendo objeto de estudio en la inmunoterapia (Gaillard y Secord, 2016).

La expresión elevada de *CD25* con una mediana de 40,03 (1,07-1297,6) en el tumor en comparación con el cDNA de referencia podría indicar una infiltración importante de diferentes tipos de células inmunes. *CD25* es la cadena alfa del receptor *IL2*, que se convierte rápidamente tras la activación de las células T convencionales, Tregs y células NK, así como las células B y precursores mieloides (Becknell y Caligiuri, 2005). La sobreexpresión de *CD25* al igual que *CD4+* desempeñan un papel central en el mantenimiento del sistema inmune contra el cáncer (Vargas *et al.*, 2017). Se ha encontrado sobreexpresado en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Kuhn *et al.*, 2003).

En referencia a *PD-1* se encontró una sobreexpresión con una mediana 12,05 (1.27-66,06) Huang y colaboradores demostraron que *PD-1* se expresa en células T inespecíficas que infiltran tumores de ovario, cuyos datos indicaron que *PD-1* contribuye al desarrollo de una rápida sinapsis inmunológica lo que lleva a un efecto inhibitorio sinérgico sobre la señalización de las células T (Huang *et al.*, 2015).

En el análisis de *PDL1* encontramos que este marcador se encontró con una expresión elevada en nuestra cohorte con una mediana de 277,40 (8,95-3235,60). En estos momentos actualmente hay tratamientos que bloquean a las moléculas de punto de control inmunitario como lo es a la muerte celular programada (*PD-1*) o su ligando PD-ligando-I (*PD-L1*) produciendo un efecto beneficioso y prolongado en un subgrupo de pacientes. En el COSAG *PD-L1* se expresó principalmente por macrófagos *CD68 +* asociados a tumores en lugar de células tumorales y está fuertemente asociado con sub-

conjuntos de TIL tanto citolíticos como regulatorios, lo que resulta en una asociación neta positiva (Webb *et al.*, 2016). En el caso del melanoma la sobreexpresión de este biomarcador ha sido utilizado como punto clave para los tratamientos actuales que conllevan al restablecimiento de la inmunidad del huésped contra el tumor (Patel y Kurzrock, 2015). En el cáncer renal se ha visto sobreexpresado este biomarcador correlacionándose esto a una mayor agresividad del tumor. La expresión del ligando de muerte programado *PD-L1* representa un mecanismo de escape inmune para las células tumorales en el cáncer renal (Jilaveanu *et al.*, 2014). Sin embargo, existe un debate en la literatura sobre el valor pronóstico de la expresión de estas moléculas en tumores, con respuesta de inmunoterapia y supervivencia. En el estudio llevado por Drakes y colaboradores; se concluyó que un subgrupo de pacientes con cáncer de ovario de alto grado en enfermedad avanzada presentan una sobreexpresión *PD-L1* pudiendo este tipo de cáncer ser uno de los principales candidatos para la inmunoterapia dirigida a la señalización de *PD-1* (Drakes *et al.*, 2018). En el cáncer de cuello uterino el estado del virus del papiloma humano también se correlacionó con la expresión de *PD-L1*, la expresión de *PD-1 / PD-L1* en células inflamatorias infiltrantes de tumor fue mayor en cáncer cervical en comparación con adenocarcinomas endometriales y ováricos (Saglam y Conejo-Garcia, 2018). Al igual que se ha visto sobre expresado en el cáncer de mama inflamatorio siendo este marcador frecuente y predictor de la respuesta patológica a la quimioterapia en este tipo de tumores (Bertucci *et al.*, 2015). *PD-L2* se encontró sobreexpresado con una mediana 529 (68,12-4826) no hay datos de este tipo de expresiones en cáncer de ovario pero sí, sobreexpresado junto a *PDL1* en cáncer gástrico interviniendo en los puntos de control de la inmunoregulación (Xing *et al.*, 2018).

La sobreexpresión en nuestra cohorte de *CXCR4* con una mediana 35,88 (4,06-1102,9) proteína de superficie de los linfocitos, ha sido ampliamente descrita en más de 23 tipos de cáncer incluidos riñón, pulmón, cerebro, próstata, mama, páncreas y melanomas entre otros contribuyendo en el crecimiento tumoral, angiogénesis, metástasis y resistencia terapéutica (Chatterjee, Behnam Azad y Nimmagadda, 2014). En el cáncer de mama está bien establecido el papel del *CXCR4* en la regulación del crecimiento, la invasión y la metástasis del tumor (Chu *et al.*, 2010). Así mismo se sabe que la expre-

sión también aumenta con el grado tumoral 20% en tejido normal mamario, 43% en ductal in situ y el 67% carcinoma invasivo (Salvucci *et al.*, 2006). Más importante aún la sobreexpresión del 75% en cáncer de mama triple negativo (Hassan *et al.*, 2009). En un metaanálisis la sobreexpresión del biomarcador *CXCR4* se encontró muy relacionado con las metástasis óseas (Kang y Mansela, 2005). En el cáncer de esófago la sobreexpresión se ha visto asociado como biomarcador de mal pronóstico ya que lo encontraron relacionado con la capacidad de metástasis de este tumor (Wu *et al.*, 2014); por lo que la sobreexpresión en cáncer de ovario seroso papilar de alto grado se pueda ver relacionado con el mal pronóstico que tienen este tipo de tumores.

En cuanto a *ICOS* se encontró sobreexpresado con una mediana 1,16 (0,03-8,46) al igual que su ligando *ICOSL* mediana 389,72 (16,23-3411,79). La interacción mediada por *ICOS* entre células T *CD4+* infiltrantes de tumor y células dendríticas conduce a la amplificación de Tregs (Faget *et al.*, 2013).

Los resultados han revelado la sobreexpresión de *IDO1* mediana 1,52 (0,05-65,92) Los niveles de sobreexpresión de *IDO1* destacan su fuerte asociación con la infiltración de células T (Zhai *et al.*, 2018). En cuanto a *OX40* se encontró sobreexpresado, no ha sido estudiado en ovario pero sí en otros tumores en los que se evidencia que la sobreexpresión promueve la activación de células NK, la producción de citoquinas y la citotoxicidad (Nuebling *et al.*, 2018).

Uno de los biomarcadores analizados en nuestra cohorte es *CD137*, un receptor coestimulador importante que promueve la supervivencia, la expansión y la activación de las células T con respecto a proliferación, adquisición de funciones efectoras y diferenciación de memoria (Li *et al.*, 2008). La tendencia a la sobreexpresión en nuestra cohorte nos orienta en el comportamiento en este tipo de tumores, sin embargo, pocos estudios han realizados hasta el momento. En estudios de microambiente tumoral se ha encontrado sobreexpresado este biomarcador (Taylor *et al.*, 2015). Actualmente es utilizado como coestimulador en la inmunoterapia por su papel en la supervivencia (Sanmamed *et al.*, 2015).

3.3 Correlación de los genes de la cohorte retrospectiva entre ellos

Se compararon los genes analizados mediante el test Rho de Spearman para así saber la correlación que tenían entre ellos. Se encontró una correlación entre ellos significativas $> 0,005$. Al analizar los marcadores de infiltrado linfocitario se encontró una correlación en la expresión de *CD4* con *CD8* ($p=0,001$) al igual que la expresión de *CD4* con *FOXP3* ($p=0,003$) por lo que se demuestra que dichos genes se encuentran correlacionados en el microambiente tumoral. Así mismo encontramos correlación entre el biomarcador *CD8* con *IDO1* ($p=0,002$) y el punto de control inmunológico *PDL1* ($p=0,004$) Estudios en ratones han revelado que la expresión regulada en la elevación de *IDO1* y *PDL1* dependía de la presencia de células T *CD8+* dentro del microambiente tumoral (Spranger *et al.*, 2013). Con este estudio se demostró que la mayoría de los genes se correlacionan entre sí y cuya función es lograr un acto de equilibrio entre los genes activadores y supresores que mantiene la homeostasis en el microambiente tumoral y que es la sobreexpresión de los genes inmunosupresores los causantes de una menor respuesta del sistema inmune en contra el tumor afectando de esta manera la supervivencia.

3.4 Correlaciones de los biomarcadores con las variables clinicopatológicas

Se llevaron a cabo pruebas no paramétricas como las pruebas U de Mann-Whitney, Kruskal Wallis y Chi-cuadrado para analizar la asociación de marcadores inmunoreguladores con las variables clinicopatológicas, en la tabla se representan las correlaciones más relevantes (tabla 13).

Tabla 13. Correlación de biomarcadores con variables clinicopatológicas

Variable	Gen		N	Mediana	Rango[min-max]	p-valor
Hábito Tabáquico	TGB1	Fumador	29	0,9863	0,30-3,84	0,014
		No Fumador	21	0,4763	0,01-27,26	
	IDO1	Fumador	29	2,4275	0,05-65,92	0,021
		No Fumador	21	0,7351	0,11-30,82	
Grado Histológico	CD8	I	37	1,385	0,5-6,76	0,028
		II/III	13	0,690	0,8-1,26	
Recaída	IDO1	NO	18	0,9477	0,27-7,27	0,05
		SI	32	2,1135	0,05-65,92	
Estadío FIGO	FOXP3	I/II	11	82,144	2,40-345,39	0,010
		III/IV	39	58,6001	0,42-1242,34	
	PD-L2	I/II	11	1615,8525	149,23-4826,11	0,017
		III/IV	39	747,7566	68,13-4777,49	
	CXCR4	I/II	11	23,2450	7,27-63,55	0,009
		III/IV	39	94,9062	4,07-1102,92	

La prueba U de Mann-Whitney reveló que había varias asociaciones significativas entre la expresión de diferentes genes y las variables clinicopatológicas tales como hábito tabáquico, estadio y grado histológico (tabla 13). La expresión de *TGFB1*, *IDO1* se asoció con el hábito tabáquico y sus niveles de expresión fueron más elevados en los fumadores. En referencia al hábito tabáquico (fumadores frente a no fumadores) y la expresión de *TGFB1* ($p = 0,014$) y *IDO1* ($p = 0,021$) (figura 29) la expresión de *TGFB1* fue mayor en pacientes con hábito tabáquico; este tipo de observaciones no se ha descrito aún en ningún tipo de tumores ginecológicos, pero sí se ha visto relacionado en carcinoma de células escamosas a nivel gingival en donde se aprecia una sobreexpresión de dicho gen en fumadores (Singh *et al.*, 2017). *IDO1* aún no se ha visto relacionado con el tabaco en cánceres ginecológicos ni en otro tipo de tumores pero coincidentemente, numerosos estudios han demostrado que *IDO1* está altamente expresado en múltiples tipos de cáncer por lo que el bloqueo de la expresión de *IDO1* produce un beneficio sinérgico contra el crecimiento tumoral y / o la supervivencia y actualmente es un objetivo relevante en la inmunoterapia del cáncer (Zhai *et al.*, 2018).

Se deja en evidencia con este estudio que aquellas pacientes con hábito tabáquico expresan niveles elevados de *IDO1*, biomarcador supresor del sistema inmune asociado a mal pronóstico. En cuanto a la recaída el gen *IDO1* se correlacionó con mayor expresión en las pacientes que habían recaído en comparación del grupo no habían recaído.

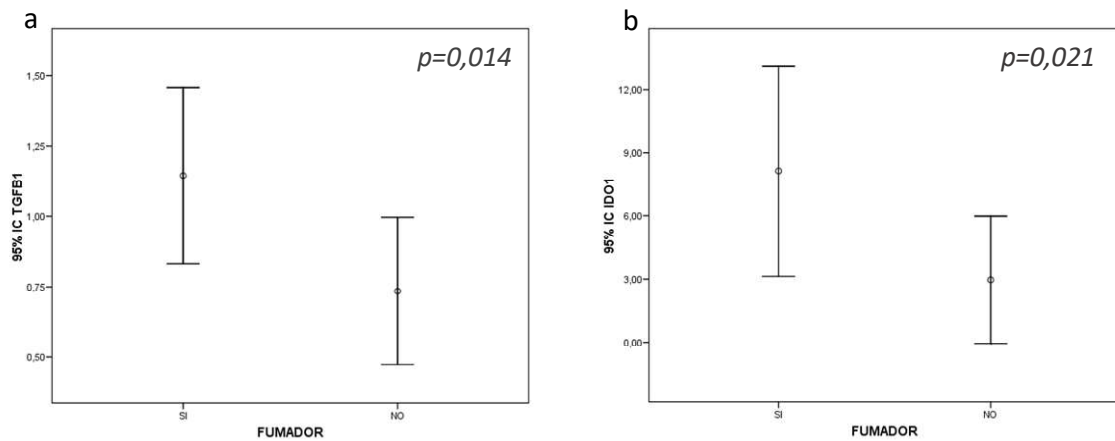


Figura 29. Correlación entre variables clinicopatológicas y marcadores de expresión génica. a) Representación de la expresión de TGFβ1 según el hábito tabáquico y, b) representación de IDO1 según hábito tabáquico. Las barras de error representan el intervalo de confianza (IC) del 95% de la media.

Se encontró una correlación entre el grado histológico o grado de diferenciación celular con la expresión de *CD8* el cual se vio expresado en los grados I o también llamado bien diferenciados. La evidencia de la acumulación de TIL específicamente los tipo *CD8* en el cáncer de ovario es buen indicador de pronóstico para la supervivencia (Santoiemma y Powell, 2015). Por lo que se demuestra que estas dos variables de buen pronóstico en este tipo de cáncer se encuentran fuertemente correlacionadas.

El grado histológico se correlacionó con la expresión *CD8* y la expresión fue más alta en los grados histológicos I vs II/III. *FOXP3* y *PD-L2* se encontró más expresado en los estadios I/II de la FIGO vs III/IV y en el caso de *CXCR4* se encontró más expresado en los estadios III/IV vs I/II.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

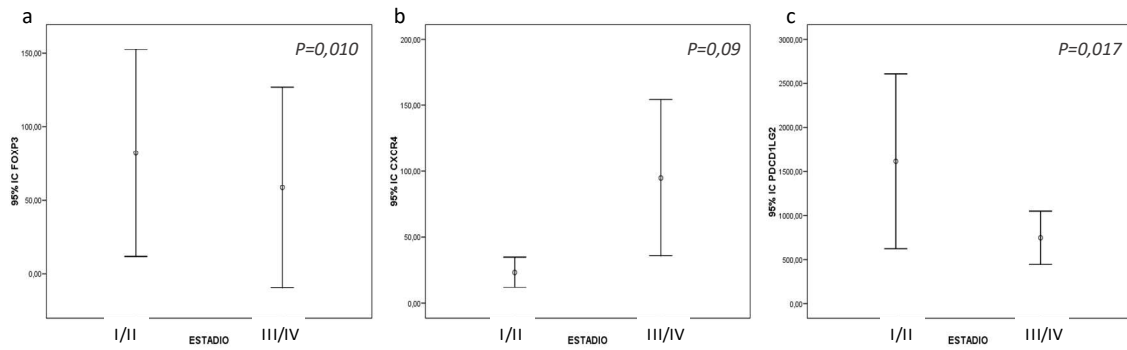


Figura 30. Correlación entre variables clinicopatológicas y marcadores de expresión génica. a) Representación de la expresión de FOXP3 según el estadio FIGO (0=I/II Y 1=III/IV, b) CXCR4 con el estadio FIGO, c) PDCDLG2 (PD-L2) según el estadio FIGO. Las barras de error representan el intervalo de confianza (IC) del 95% de la media.

FOXP3 y PD-L2 se encontró más expresado en los estadios I/II de la FIGO estadios iniciales de la enfermedad en el caso de FOXP3 a pesar de que los niveles son más elevados en estadios tempranos y dada la relevancia de FOXP3 en la evolución tumoral también hay niveles altos en los estadios avanzados. Este hallazgo de FOXP3 es un dato de importancia en vista que FOXP3 controla directa o indirectamente cientos de genes (aproximadamente 700) y se une directamente a alrededor del 10% de ellos, actuando como un activador o supresor de su expresión en los estadios iniciales de la enfermedad (Zheng *et al.*, 2007). Con referencia a PD-L2 relacionado con los estadios I/II es principalmente una molécula inhibidora, expresada no solo por células presentadoras de antígenos, sino también por otras células inmunes que incluyen células T y células no inmunes de manera inducible, principalmente a través de citoquinas asociadas a Th2 (Rozali *et al.*, 2012).

CXCR4 se encontró correlacionado con los estadios III/IV niveles más elevados en estadios más avanzados de la enfermedad; estadios que están caracterizados por la presencia de metástasis hallazgos que sustentan el papel que juega este biomarcador en el COSAG el cual cuya función contribuye en el crecimiento tumoral, la angiogénesis y así mismo la metástasis. Dicho hallazgo se ha visto descrito en más de 23 tipos diferentes tipos de cánceres (Chatterjee, Behnam Azad y Nimmagadda, 2014).

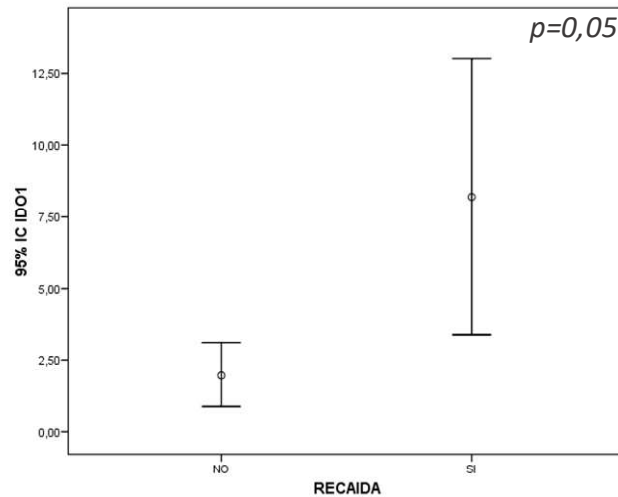


Figura 31. Expresión de *IDO1* en relación con la recaída. Las barras de error representan el intervalo de confianza (IC) del 95% de la media.

Las pacientes que habían recaído presentaban en el tumor una mayor expresión de *IDO1*, una enzima metabólica clave implicada en el catabolismo de triptófano. Sus funciones de supresión inmune se deben a la menor disponibilidad de triptófano y la generación de sus metabolitos que culminan en efectos negativos en los linfocitos T en la proliferación, función y supervivencia (Godin-Ethier *et al.*, 2011). Es por esto, que es necesario más estudios sobre si la degradación del triptófano por *IDO1* es realmente el mecanismo inmunosupresor clave y cómo este afecta en la progresión del tumor.

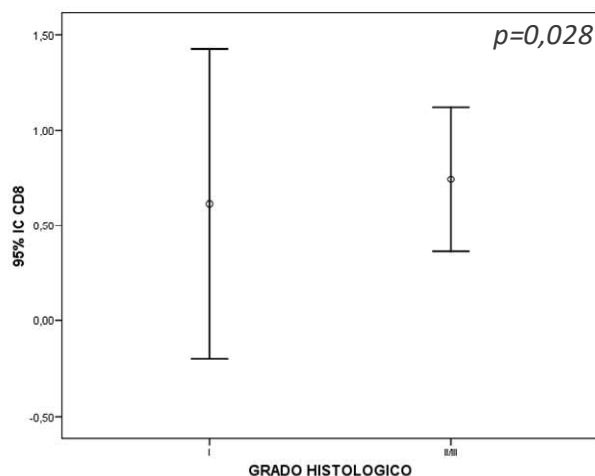


Figura 32. Expresión de *CD8* en relación con el grado histológico. Las barras de error representan el intervalo de confianza (IC) del 95% de la media.

4. Análisis de supervivencia de los biomarcadores

4.1 Variables Clinicopatológicas de la Cohorte

Para el estudio de estas variables clinicopatológicas se realizó el análisis univariante según el método de regresión de Cox, con el fin de revelar cuáles de las variables clinicopatológicas analizadas en nuestra cohorte retrospectiva tenían valor pronóstico para el TLP (tiempo libre a la progresión) y la SG (supervivencia global) en pacientes con cáncer de ovario seroso de alto grado, también se utilizó para representar estas variables el análisis univariante de *Kaplan-Meier* ($p \leq 0,05$).

En la cohorte retrospectiva de pacientes con cáncer de ovario seroso de alto grado la mediana de seguimiento fue de 18 meses (rango: 0,20-47,03). De las 50 pacientes incluyendo todos los estadios, 18 (36%) progresaron y 26 (52%) fallecieron. Las medianas de TLP y SG para la población total de la cohorte retrospectiva fueron de 22,3 meses (rango: 0,20-132,77) y 25,4 meses (rango: 0,20-151,77) respectivamente. A continuación, se demuestra en la tabla 14 el estudio univariante de regresión de COX para las variables clinicopatológicas (tabla 14).

Tabla 14. Estudio Univariante de Regresión de COX

VARIABLE	Comparación	TLP			SG		
		HR	95% IC	p-valor	HR	95% IC	p-valor
EDAD	≥65 vs <65	1,592	0,599-4,233	0,351	3,046	1,271-7,301	0,013
FUMADOR	Fum/Exfum vs. No fum	1,065	0,398-2,847	0,900	1,038	0,429-2,511	0,935
ESTADIO	III/IV vs. I/II	2,153	0,704-6,583	0,179	6,514	1,479-28,686	0,013
GRADO DE DIFERENCIACIÓN	III vs. I/II	2,446	0,323-18,536	0,387	2,971	0,397-22,247	0,289
INTENCIÓN TRATAMIENTO	NEO vs. ADY	1,698	0,519-5,556	0,381	3,713	1,497-9,213	0,005
RESPUESTA AL TRATAMIENTO	PARCIAL vs COMPLETA	5,478	1,852-16,205	0,002	2,998	1,222-7,356	0,017
CIRUGIA	SI vs NO	0,046	0,000-3,784	0,594	0,046	0,000-1052,456	0,548
TIPO CIRUGIA PRIMARIA	SUBOPTIMA vs OPTIMA	2,019	0,642-6,348	0,229	15,858	3,490-72,044	0,001

De acuerdo con el análisis de supervivencia aquellas pacientes mayores de 65 años tienen una SG menor a las menores de 65 años ($p=0,013$) (tabla 15, figura 33). Las pacientes mayores se presentan menor supervivencia que las pacientes más jóvenes, lo que puede ser explicado por la asociación de edad avanzada con factores pronósticos adversos (comorbilidades), además de un enfoque más conservador en la cirugía es generalmente adoptado para estos pacientes, reflejado por un tasa menor de cirugías de citorreducción óptima, como una escasa tolerancia a la quimioterapia que podrían explicar estos valores de supervivencia (Efstathiou *et al.*, 2007; Tortorella *et al.*, 2017). Gracias a los avances en nuevos tratamientos, la mortalidad por cáncer de ovario ha disminuido en los países desarrollados en la última década. Esta disminución en la tasa de mortalidad se distribuye de manera desigual en todo el espectro de edad. Mientras que la mortalidad en mujeres más jóvenes ha disminuido 21,7%, para mujeres ancianas ha disminuido sólo 2,2%. Incluso si el cáncer de ovario es claramente una enfermedad de mujeres mayores, es una duda ya que están subrepresentadas en los ensayos clínicos, y existe escasa evidencia para el tratamiento en mujeres mayores de 65 años. Además, las mujeres mayores a menudo reciben un tratamiento insuficiente, reciben menos quimioterapia y menos combinación de cirugía y quimioterapia, a pesar de que se considera la modalidad de tratamiento óptima. Esto puede deberse principalmente a la falta de evidencias y la confianza de los médicos en el tratamiento de las mujeres de edad avanzada con cáncer de ovario (Tortorella *et al.*, 2017).

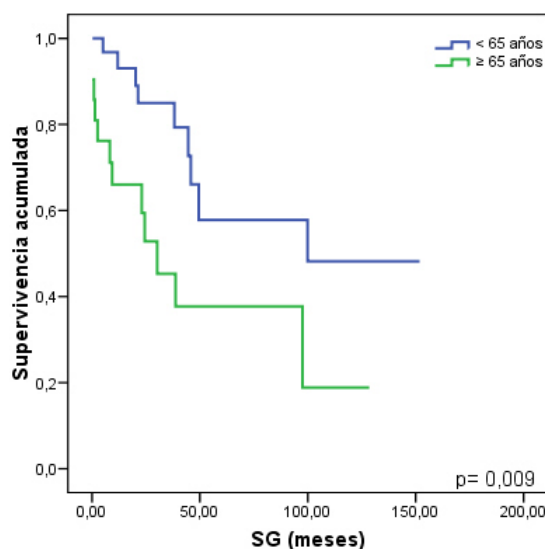


Figura 33. Gráfica de Kaplan-Meier para SG en pacientes con una edad superior a 65 años o inferior. La línea azul representa las pacientes menores de 65 años que tienen una supervivencia global mayor.

El estadio es un factor pronóstico importante en este tipo de cánceres, nuestro análisis revela que los tumores en estadios III y IV dan lugar a menor supervivencia ($p=0,013$) (figura 34) como es de esperar (Karst y Drapkin, 2010). Los COSAG son responsables del 75% de morbilidad y de diagnósticos tardíos en etapas III y IV que tienden a presentar peor pronóstico y recaída más temprana (Marigreisy y Azcuy, 2016).

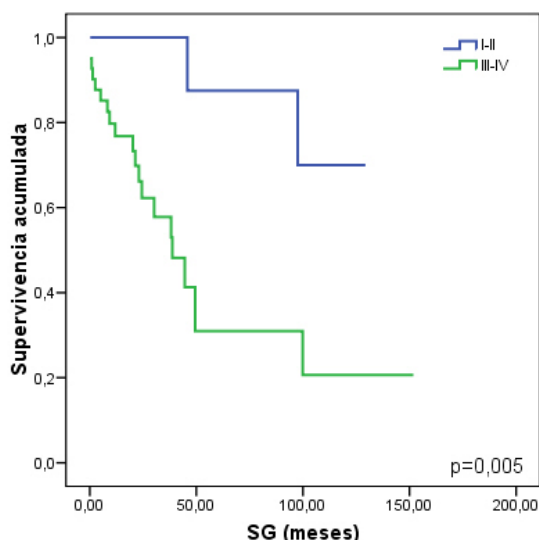


Figura 34. Gráfica de Kaplan-Meier para SG respecto a los estadios FIGO. La línea azul representa los estadios I-II presentando una mayor supervivencia en comparación a los estadios III-IV línea verde.

En las pacientes candidatas a una cirugía óptima [HR=15,85; 95% IC, 3,490-72,044; $p=0,0001$] con un posterior tratamiento adyuvante [HR=3,71; 95% IC, 1,497-9,213; $p=0,0001$] y que presentaron una respuesta completa [HR=2,99; 95% IC, 1,222-7,356; $p=0,017$] se vio un aumento en la supervivencia global (tabla 15) por lo que estos análisis sustentan que la cirugía citorreductora en el cáncer de ovario seroso de alto grado siga siendo el gold estándar en el manejo de las pacientes, quedando demostrado el aumento de la supervivencia tanto en nuestra serie como en otros estudios similares como el llevado a cabo por Aluloski et al en el cual los datos se analizaron de forma descriptiva concluyendo que la citorreducción quirúrgica óptima influyó de manera significativa en la supervivencia de la serie de pacientes analizadas, La supervivencia estimada de los pacientes que tenían la enfermedad residual postoperatoria de ≤ 1 cm fue de 75,55 meses (IC 95% = 66,47-84,63), mientras que los pacientes con citorreducción quirúrgica subóptima (es decir, una enfermedad residual posoperatoria de > 1 cm) tuvieron una supervivencia estimada de 30,78 meses (IC 95% = 24,14-37,42) ($p < 0,001$) (Stewart et al., 2016; Aluloski et al., 2017).

En relación con el anterior análisis aquellas pacientes que reciben adyuvancia vs neoadyuvancia se demostró en nuestra cohorte el papel que tiene la adyuvancia en la supervivencia confirmado en el estudio de supervivencia de *Kaplan-Meier*. Aquellas pacientes con un tratamiento adyuvante presentan mayores supervivencias en comparación con aquellas con tratamiento neoadyuvante ($p=0,002$) (figura 35). Hallazgos que ya fueron demostrados por Trimbos y colaboradores; en el cual se concluyó que quimioterapia adyuvante mejora de forma estadísticamente significativa la supervivencia libre de progresión en pacientes con COSAG (Trimbos *et al.*, 2003).

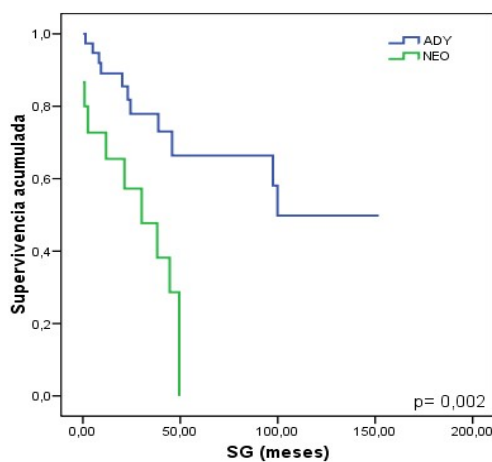


Figura 35. Gráfica de Kaplan-Meier para SG respecto al tratamiento. La línea azul representa aquellas pacientes que recibieron tratamiento adyuvante presentando una mayor supervivencia.

Como se mencionó anteriormente y analizado con el método de la regresión de *COX* se pudo confirmar que aquellas pacientes que recibieron una cirugía citorreductora con enfermedad no macroscópica (óptima), no quedando tejido residual con una mayor supervivencia (figura 36).

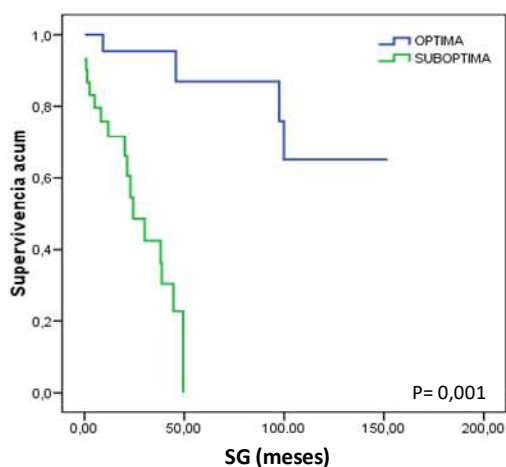


Figura 36. Gráfica de Kaplan-Meier para SG respecto a la cirugía. La línea azul representa el grupo con cirugía citorreductora no macroscópica (óptima) y la verde subóptima.

En cuanto al hábito tabáquico no se evidenció significancia en TLP Y SG ($p=0,90$; $p=0,93$) sin embargo se sabe que el tabaquismo puede influir en otros tipos histológicos, aunque la magnitud de las asociaciones observadas es modesta (Faber *et al.*, 2014).

2.2 Valor Pronóstico del infiltrado linfocitario

El patrón, grado y localización de la infiltración linfocitaria en el COSAG fue evaluado mediante el estudio univariante de regresión de COX. Se analizó el grado de infiltración en leve, moderado y severo, agrupando moderado y severo, no obteniendo significación ni con el tiempo libre a la progresión o la supervivencia global ($p=0,171$; $p=0,337$). Así mismo se valoró el patrón de la infiltración observando un impacto en la supervivencia global en el caso de la infiltración difusa ($p=0,005$) con una localización intratumoral con efecto en el TLP y SG ($p=0,012$; $p=0,049$). No se vio impacto la presencia de los cuerpos de Psamoma en este tipo de tumores en TLP y SG ($p=0,457$; $p=0,175$) ver [tabla 15](#).

Tabla 15. Análisis del Infiltrado linfocitario

Infiltrado	TLP			SG		
	HR	95% IC	p-valor	HR	95% IC	p-valor
Grado de Infiltración <10% vs.>10-33%	0,468	0,158-1,386	0,171	0,605	0,217-1,687	0,337
Patrón de Infiltración Focal & Difuso	0,629	0,216-1,833	0,395	0,271	0,108-0,678	0,005
Localización de la Infiltración Peritumoral vs. Intratumoral	0,263	0,093-0,746	0,012	0,386	0,150-0,994	0,049
Cuerpos de Psamoma SI vs NO	1,481	0,526-4,171	0,457	2,103	0,718-6,159	0,175

IC, intervalo de confianza; HR hazard ratio; TLP, Tiempo libre de progresión, SG, supervivencia global; * $p < 0,05$.

En los últimos años distintos grupos en el campo de la investigación han trabajado en la detección y caracterización del tumor en referencia a la infiltración de linfocitos (TIL) en el cáncer de ovario y evaluando su papel en el proceso de desarrollo de la enfermedad (Raspollini *et al.*, 2005). Los TIL son un tipo de glóbulos blancos detectables en islote y estroma tumoral que reconoce las células tumorales a causa de la respuesta inmune, el primer informe sobre el beneficio de la supervivencia en cáncer de ovario se atribuyó a Mei-Jiao en 1991 encontró que el grado de infiltración linfocitaria se relacionaba directamente a la tasa de supervivencia de las pacientes al igual que la estadificación clínica, así como a la clasificación y la tipificación histológica del tumor. Este estudio de TIL y células cancerosas sugirió que la muerte de las células tumorales está relacionada con el efecto de los TIL. (J, 1991). Los TIL tienen importancia pronóstica en el cáncer de ovario, los efectos pronósticos de los TIL sobre el cáncer de ovario dependen de la proporción de los diferentes subconjuntos de TIL presentes en lugar así como el patrón en que infiltran y su localización siendo útil como una herramienta para guiar el tratamiento en pacientes con cáncer de ovario (Li *et al.*, 2017).

Los resultados significativos obtenidos del método de regresión de COX univariante también se analizaron usando el método de Kaplan-Meier (rango largo) para obtener los gráficos de supervivencia. Las pacientes con infiltrado linfocitario con un patrón intratumoral tuvieron un mejor pronóstico en comparación con el grupo que tenía un patrón peritumoral (SG, NA vs 44,57 meses, $p = 0,041$) (figura 37). Además, las muestras con un patrón de infiltración difusa se asociaron con una mayor supervivencia en comparación con aquellas que presentaban un patrón focal (SG, NA vs 20,20 meses $p < 0,0001$) (figura 38). Nuestros resultados destacan el papel de importancia que representa el infiltrado linfocitario en el cáncer de ovario y el cual comprende diferentes tipos celulares que pueden orquestar en conjunto respuestas del huésped contra el tumor como en el caso del COSAG el cual se caracteriza por ser un grupo de tumores altamente inmunorreactivos. Aquellos con el mejor pronóstico están representados por un patrón intratumoral difuso con un fuerte grado de infiltración, estos hallazgos podrían abrir una nueva ventana para los enfoques terapéuticos en COSAG.

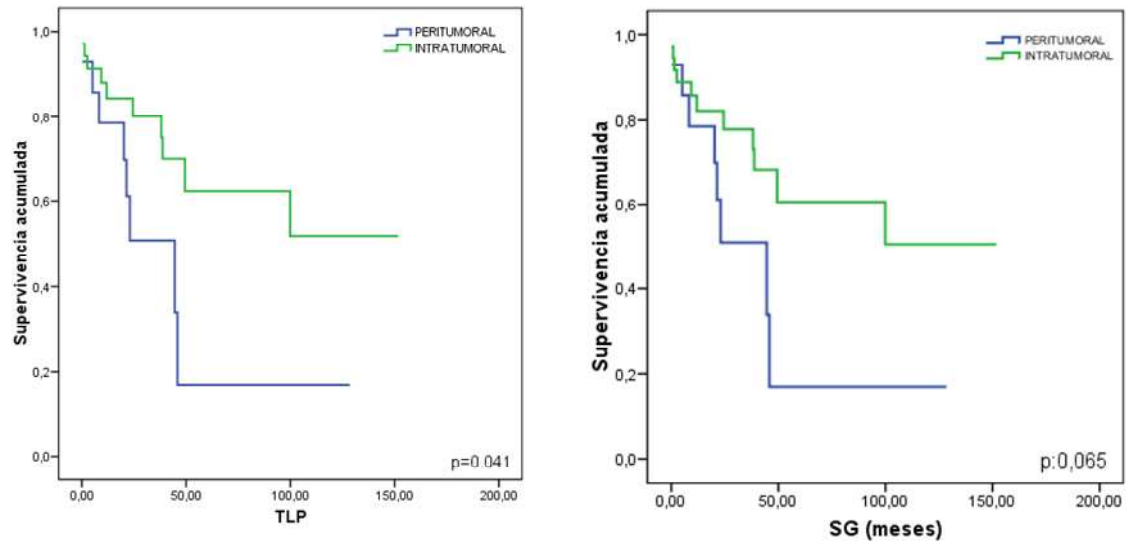


Figura 37. Gráficos de Kaplan-Meier para TLP y SG de acuerdo con la localización de la infiltración. a) TLP y b) SG. La línea azul representa la localización peritumoral, mientras que la línea verde representa la localización intratumoral. Los valores P se calcularon usando la prueba de Kaplan-Meier.

La infiltración linfocitaria ha sido analizada ampliamente en estos últimos años en las diferentes neoplasias demostrando el valor pronóstico que tienen los TIL en diversos tipos de tumores en los que se destaca carcinomas de pulmón, tracto gastrointestinal, sistema genitourinario, sistema ginecológico y cabeza y cuello, así como tumores cerebrales primarios, mesotelioma y melanoma (Hendry *et al.*, 2017). En estudios llevados a cabo en el nuestro laboratorio se ha demostrado el papel que representa el microambiente tumoral en el cáncer la proporción relativa de células T convencionales y reguladoras presentes en el entorno tumoral se han evaluado y encontrándose que los TIL en el compartimento tumoral se asocian a un mejor pronóstico (Usó *et al.*, 2016). De manera más específica en el cáncer de mama ha sido reportado la importancia entre la interacción de la respuesta inmune del tumor y huésped, siendo los tumores inmunogénicos aquellos que pueden presentar mejor pronóstico (Uen *et al.*, 2016). En cáncer de ovario existen pocos estudios pero cabe destacar un metaanálisis reciente de 2017 donde concluyen el papel del infiltrado en el COSAG en el que destacan que a mayor infiltración linfocitaria en el microambiente tumoral mejor respuesta (Li *et al.*, 2017).

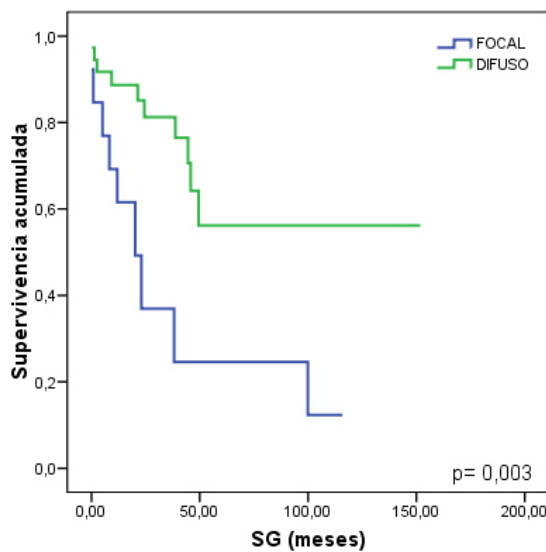


Figura 38. Gráfica de Kaplan-Meier para SG según con el patrón de infiltración, la línea azul representa el patrón focal, mientras que la línea verde representa el patrón difuso. Los valores P se calcularon usando la prueba de Kaplan-Meier

Los escasos estudios actuales en COSAG han demostrado que los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) se correlacionan con un pronóstico favorable, siendo determinantes de la SG en COSAG. Conocer el grado, patrón y localización de la infiltración se convierte en un factor pronóstico y de evolución de la enfermedad (Pinto *et al.*, 2018). Actualmente en un reciente estudio han demostrado que los TIL intraepiteliales se asocian a una mejor supervivencia en pacientes con COSAG sin embargo son múltiples los mecanismos aun desconocidos (Stanske y Wienert, 2018).

4.3 Valor pronóstico de los genes inmunoreguladores

El valor pronóstico de la expresión de genes inmunoreguladores se evaluó utilizando el método de regresión de Cox univariante para TLP y SG (tabla 16). Para aquellos casos en los que se encontraron asociaciones significativas, se representaron las curvas de Kaplan-Meier. Antes de eso, los datos de expresión génica fueron dicotomizados de acuerdo con la mediana de cada gen, dividiendo los datos en dos grupos: I) "alto" correspondiente a aquellas muestras cuyos valores de expresión eran $>$ a la mediana, y II) "baja" para aquellas muestras cuyo valor de expresión eran \leq a la mediana.

Tabla 16. Resultados del análisis de supervivencia basado en biomarcadores de expresión génica en cáncer de ovario seroso de alto grado

Gen	Comparación	TLP			SG		
		HR	95% IC	p-valor	HR	95% IC	p-valor
CD4	Alto vs. Bajo	2,392	0,851-6,722	0,098	1,729	0,674-4,435	0,255
CD8	Alto vs. Bajo	0,689	0,233-2,037	0,501	1,263	0,498-3,202	0,623
FOXP3	Alto vs. Bajo	1,475	0,529-4,116	0,458	0,859	0,336-2,191	0,750
ICOSL	Alto vs. Bajo	0,396	0,139-1,123	0,081	0,656	0,254-1,694	0,384
ICOS	Alto vs. Bajo	0,427	0,155-1,181	0,101	0,292	0,088-0,962	0,043
PD-L2	Alto vs. Bajo	0,821	0,295-2,284	0,705	0,586	0,223-1,537	0,277
TGFB1	Alto vs. Bajo	1,461	0,540-3,948	0,455	1,949	0,730-5,200	0,183
CD25	Alto vs. Bajo	0,505	0,183-1,391	0,186	0,576	0,223-1,488	0,255
IDO1	Alto vs. Bajo	0,632	0,234-1,707	0,365	0,644	0,251-1,649	0,359
IL7R	Alto vs. Bajo	2,991	1,035-8,646	0,033	1,940	0,748-5,031	0,173
PD-L1	Alto vs. Bajo	1,522	0,549-4,219	0,419	1,365	0,526-3,541	0,522
CTLA4	Alto vs. Bajo	0,711	0,263-1,924	0,502	0,720	0,282-1,838	0,492
CXCR4	Alto vs. Bajo	1,281	0,471-3,488	0,628	0,958	0,373-2,458	0,929
PD1	Alto vs. Bajo	1,275	0,448-3,631	0,649	1,224	0,463-3,231	0,684
OX40	Alto vs. Bajo	1,276	0,476-3,419	0,629	2,833	1,007-7,975	0,049
LGAL	Alto vs. Bajo	2,306	0,826-6,436	0,111	1,416	0,556-3,606	0,466
CD137	Alto vs. Bajo	0,630	0,231-1,719	0,367	0,301	0,109-0,827	0,020

Los resultados se obtuvieron utilizando el método de regresión de Cox univariante. Los niveles de expresión génica se dicotomizaron como altos y bajos según su mediana. IC intervalo de confianza; HR hazard ratio; TLP Tiempo libre de progresión, SG supervivencia global; * $p < 0,05$.

El análisis encontró que niveles altos de *ICOS* estaban relacionados con SG [HR=0,292; 95% CI, 0,088-0,962; $p=0,043$]. *ICOS* es un coestimulador de células T inducible que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas *B7-CD28*, que actualmente es objeto de un intenso estudio debido a los grandes éxitos obtenidos en el tratamiento de diferentes tumores. El papel que juega *ICOS* en el cáncer de ovario seroso de alto grado sigue siendo poco conocido. Sin embargo en un estudio de cáncer colorrectal concluyó que la expresión de *ICOS* se asocia con una mejor supervivencia y el porcentaje de células *ICOS* en el tejido tumoral primario o en sangre periférica puede ser un biomarcador clínico para un buen pronóstico (Zhang *et al.*, 2016).

Otro biomarcador que demostró en nuestro estudio tener significancia en el TLP fue la *IL7* [HR=2,991; 95% CI, 1,035-8,646; p=0,033]. Lambeck y colaboradores encontraron que los niveles de *IL-7* están fuertemente asociados con el cáncer de ovario y plantearon que podrían usarse en combinación con CA-125 para distinguir entre tumores ováricos malignos y benignos (Lambeck *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta la fecha no se han vuelto a realizar más estudios referentes a este biomarcador con el cáncer de ovario. La *IL-7* puede inducir la producción de *IL-1 α* , *IL-1 β* y *TNF- α* por monocitos, estas citoquinas promovidas por la *IL-7* parece ayudar a inhibir el crecimiento en melanoma (Alderson *et al.*, 1991). Algunos estudios sugieren que la *IL-7* puede mejorar respuesta linfocitaria en los tumores de próstata (Fujio *et al.*, 2015). La *IL-7* ha demostrado ser la citoquina más efectiva en el aumento de linfocitos *CD8+* T citotóxicos (células T *CD8+*) en comparación con *IL-2* e *IL4* (Lynch, Namen y Miller, 1991) lo que favorece a los tumores inmunorreactivos, disminuyendo la respuesta del tumor.

CD137 se expresó en nuestra cohorte retrospectiva teniendo un impacto en la supervivencia global [HR=0,301; 95% CI, 0,109-0,827; p=0,020] que también se reflejó en las gráficas de Kaplan-Meier para SG (p=0,022). *CD137* es actualmente objeto de estudio en distintos tumores inmunorreactivos como lo es el melanoma por su función de activar específicamente las células T *CD8+*, aumentando el rendimiento, fenotipo y actividad funcional de los T *CD8*; mejorando en gran medida la persistencia del infiltrado linfocitario y la actividad antitumoral aumentando la supervivencia (Chacon *et al.*, 2013). En nuestra cohorte se comprobó que en los tumores de ovario seroso de alto grado con niveles altos de *CD137* aumenta de manera significativa la supervivencia global (p=0,020) (figura 39). Por lo que *CD137* se convierte en uno de los biomarcadores de mayor importancia en nuestra cohorte y el que hasta el momento no había sido objeto de estudio en los tumores ginecológicos.

El resto de los biomarcadores fueron también analizados sin embargo no se obtuvieron resultados significativos como queda representado en la tabla 16. Dichos biomarcadores en el cáncer de ovario se han encontrado en el microambiente tumoral por método de inmunofluorescencia y muestran por primera vez el papel que juegan

estos biomarcadores en la supervivencia en el cáncer de ovario seroso (Preston *et al.*, 2013).

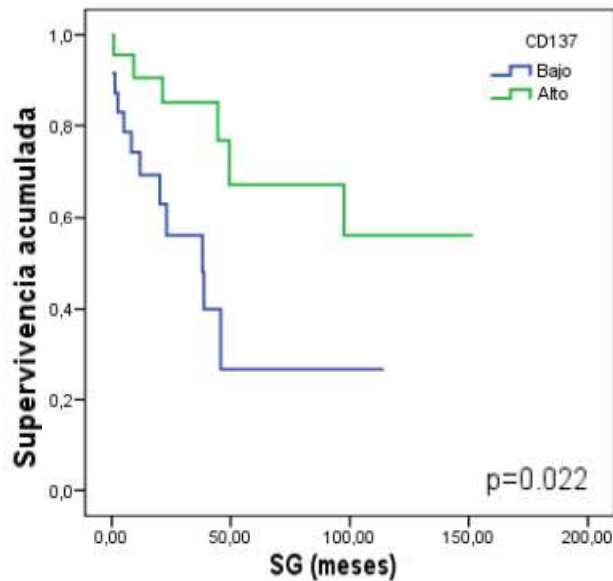


Figura 39. Kaplan-Meier para SG de CD137. Los niveles de expresión génica se dicotomizaron según sus medianas. La línea azul representa pacientes con bajos niveles de expresión, mientras que la línea verde representa pacientes con altos niveles de expresión. Los valores P se obtuvieron usando la prueba de Kaplan-Meier.

4.8 Análisis de supervivencia multivariante

Posteriormente se realizó un análisis de regresión de Cox multivariante con el fin de establecer biomarcadores pronóstico independientes en nuestra cohorte retrospectiva de pacientes con COSAG. Para el tiempo libre de progresión, se realizó un análisis de supervivencia multivariante que incluía las variables significativas como fueron respuesta al tratamiento, localización de la infiltración e *IL7R*. Tal como se observa en la [tabla 17](#), *IL7R* se podría establecer como un potencial biomarcador pronóstico independiente para el tiempo libre de progresión [HR=3,637; 95% IC, 1,199-11,029; p=0,023]. Así mismo para la respuesta al tratamiento parcial y completa [HR=6,336; 95% IC, 1,918-20,924; p=0,02].

Tabla 17. Análisis de Regresión de Cox multivariante para TLP

Variable	TLP		
	HR	95% IC	p-valor
Respuesta al Tratamiento <i>Parcial - Completa</i>	6,336	1,918-20,924	0,02
IL7R <i>Alto vs Bajo</i>	3,637	0,199-11,029	0,023

IC, intervalo de confianza; HR, hazard ratio; TLP, Tiempo libre de progresión; * p <0,05.

Para la supervivencia global, se realizó al igual que para TLP un análisis de supervivencia multivariante que incluía las variables significativas como son el tipo de cirugía, *CD137*. Tal como se observa en la [tabla 18](#), *CD137* se podría establecer como un potencial biomarcador pronóstico independiente para tiempo libre de progresión [HR=0,274; 95% CI, 0,094-0,800; p=0,018]. Al igual que el tipo de cirugía Óptima-Subóptima [HR=10,132; 95% IC, 3,018-34,018; p=0,001].

Tabla 18. Análisis de Regresión de Cox multivariante para SG

Variable	SG		
	HR	95% IC	p-valor
Tipo de Cirugía <i>Optima-Subóptima</i>	10,132	3,018-34,018	0,001
CD137 <i>Alto vs Bajo</i>	0,274	0,094-0,800	0,018

IC, intervalo de confianza; HR hazard ratio; SG supervivencia global; * p <0,05,

Capítulo II

1. Características clínico-patológicas

1.1 Características de la cohorte prospectiva

La cohorte prospectiva está compuesta por 20 pacientes, provenientes de cirugías de cáncer de ovario realizadas en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia entre los años 2016-2017; en la [tabla 19](#) se muestran las principales características clinicopatológicas de la cohorte. En la cohorte prospectiva la mediana de edad de las

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

pacientes fue de 57 años [26-90], 70% <57 años, seguido del 30% años \geq 57; con datos similares a la cohorte retrospectiva. La mayoría de las pacientes no tenían antecedentes oncológicos, solo el 5% tenían antecedente de cáncer de mama en familiares de primera línea y el 95% referirían no tener antecedentes o desconocerlos en el momento de la anamnesis de la historia clínica oncológica. Así mismo, la mayoría de los casos fueron estadios III y IV representando el 80% y sólo un 20% estadios I y II. Datos similares a los recogidos en la cohorte retrospectiva pese a la diferencia muestral.

En cuanto al hábito tabáquico, el 15% de la cohorte eran pacientes fumadoras, una menor proporción respecto a la cohorte retrospectiva. En relación con la técnica quirúrgica, el 45% recibió una cirugía óptima, un 45% cirugía subóptima y al 10% de las pacientes restantes no se les practicó cirugía.

Respecto al tipo de tratamiento oncológico, el 70% recibió terapia adyuvante y el 15% neoadyuvante. Así mismo, solo el 15% no recibió tratamiento por distintas causas entre las que se destacaron las comorbilidades asociadas a la paciente que contraindicaban el tratamiento actual. (tabla 19).

Tabla 19. Características Clinicopatológicas de la Cohorte Prospectiva

CARACTERÍSTICAS	N: 20	%
EDAD		
Mediana	57 [26-90]	
<57	14	70%
\geq 57	6	30%
ANTECEDENTES ONCOLÓGICOS		
Cáncer de mama	1	5%
Cáncer de ovario	0	0%
No	19	95%
ESTADIOS		
I-II	4	20%
III-IV	16	80%
HÁBITO TABÁQUICO		
Si	3	15%
No	17	85%

CARACTERÍSTICAS	N: 20	%
CIRUGÍA		
Óptima	9	45%
Subóptima	9	45%
No	2	10%
TRATAMIENTO		
Adyuvante	12	70%
Neoadyuvante	3	15%
Sin tratamiento	3	15%

Las características de la cohorte prospectiva en cuanto a los porcentajes de cada una de las variables clinicopatológicas guarda similitud con la cohorte retrospectiva lo que respalda que el COSAG desde el punto de vista clínico se caracteriza por ser una patología que se presenta más frecuentemente en la tercera década de la vida y con un diagnóstico generalmente que se realiza en estadios avanzados III/IV en donde ya se presentan las manifestaciones patológicas de la enfermedad lo que dificulta para un tratamiento efectivo en vista de la agresividad que presentan este tipo de tumores .

2. Análisis de Expresión Génica

2.1 Cuantificación y valoración de la calidad del RNA de la cohorte prospectiva

Para la determinación relativa de la expresión génica se analizaron 20 muestras de tumor de cáncer de ovario seroso de alto grado y tejido normal adyacente. El ARN se aisló de pequeñas piezas de tejido (aproximadamente 10-20 mg). Se obtuvo una concentración óptima de ARN de todas las muestras; la mediana para los tejidos tumorales fue de 219,05 [66,5 – 1805,1] (tabla 20).

La calidad e integridad del ARN extraído se evaluó mediante nanoespectrofotometría de las absorbancias de las muestras. Para ello, se determinaron las absorbancias a 260, 280 y 230 nm con el equipo NanoDrop 2000® (Thermo Scientific). Este espectrofotómetro es capaz de realizar medidas precisas con cantidades de muestra muy pequeñas, del orden de 0,5 µl. Para estimar la concentración de ARN se utilizan las medidas de absorbancia a 260 nm. A la vez, el equipo proporciona información sobre la

pureza del ARN, mediante las ratios de absorbancia a 260/280nm y 260/ 230 nm que deben oscilar entre 1,65 – 2 y 2 – 2,2, respectivamente para considerar una muestra como pura.

Tabla 20. Cuantificación del RNA cohorte retrospectiva

MUESTRA	RNA NORMAL			RNA TUMORAL		
	ng/ul	260/280	260/230	ng/ul	260/280	260/230
TUMOR 1	705,4	2,02	2,16	1855,5	2,06	2,14
TUMOR 2	176	2,03	2,13	121,4	1,94	1,82
TUMOR 3	1805,1	2,06	2,21	2361,3	2,07	1,47
TUMOR 4	221,1	2,03	2,11	868,6	2,01	2,2
TUMOR 5	1072	2,02	2,06	2355,3	2,08	2,17
TUMOR 6	181,2	2	2,24	1320,6	2,04	2,14
TUMOR 7	1016,7	2,06	2,16	163,5	1,88	2,93
TUMOR 8	66,5	2,07	2,08	370,5	2,06	2,05
TUMOR 9	293,3	2,03	2,17	2319,3	2,08	2,18
TUMOR 10	129,8	1,94	2	1356,5	1,95	2
TUMOR 11	4506	2,01	2,09	1339,4	2,05	2,17
TUMOR 12	217	2,02	2,15	2908,7	2,04	2,11
TUMOR 13	125,2	2,01	1,76	4009	2,04	2,1
TUMOR 14	240	2,02	1,9	2889	2,07	2,12
TUMOR 15	161,7	2,04	2,05	3395,5	2,05	2,11
TUMOR 16	374,8	2,01	1,72	2305,2	2,05	2,03
TUMOR 17	785,5	1,96	2,12	3345,9	2,03	2,02
TUMOR 18	188,6	2,07	2,06	4147,5	2,04	2,09
TUMOR 19	183,5	2,06	2,06	596,2	2,01	1,8
TUMOR 20	68,7	2,05	2,02	4734,6	2,04	2,12

En la cohorte prospectiva se resalta la cantidad de ARN que se obtuvo de la extracción de ARN con ratios dentro de los límites normales lo que demuestra estos datos la calidad del ARN el cual no tenía ningún grado de contaminación y del que se pudieron almacenar cantidades suficientes para estudios posteriores. A diferencia de la cohorte retrospectiva el cual fue obtenido de muestras de parafina con gran cantidad de tejido necrótico por lo que las cantidades de ARN fueron menores sin embargo no dificultó para la realización de las técnicas moleculares.

2.2 Análisis de Expresión Génica Relativa de la cohorte prospectiva

El análisis de la expresión génica de los 20 genes analizados: *CD4*, *CD8*, *TGFβ1*, *CTLA-4*,

IL-10, FOXP3, CD25, CD127, CXC4, IDO, PD-1, PD-L1, PDL-2; OX40, OX40L; ICOS, ICOS-L; galectina 9; CD137, CD137L se realizó en una cohorte prospectiva de 20 pacientes con COSAG. Los niveles relativos de expresión génica se basaron en la expresión de los 20 genes diana analizados en tejidos tumorales frente a tejido normal adyacente; éstos se normalizaron contra genes endógenos y se calcularon usando la fórmula matemática de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

La expresión de cinco genes endógenos (*ACTB, HPDR1, CDKN1B, GUSB, PPIA*) se ensayó en un subconjunto que comprende aproximadamente el 30% de las muestras con el fin de establecer el mejor control interno. Para este propósito, utilizamos el software Genorm, Bestkeeper, Normfinder y Delta Ct y fueron comparados por orden de prioridad que indicó que la opción más estable era la combinación de los 5 *ACTB, HPDR1, CDKN1B, GUSB, PPIA* ver [figura 23](#). Siguiendo el procedimiento propuesto por Vandesompele et al., se calculó un factor de normalización basado en la expresión de estos cinco genes endógenos utilizando la media geométrica (Vandesompele et al., 2002).

De esta manera, los resultados se expresan en relación entre la expresión del gen analizado y la de los genes de referencia endógenos que son *ACTB, HPDR1, CDKN1B, GUSB, PPIA* en comparación en la muestra tumoral con respecto al tejido normal adyacente a diferencia de la cohorte retrospectiva que no contábamos con tejido normal adyacente.

Los niveles de expresión de los genes estudiados se expresaron como valores de cuantificación relativa ([figura 40](#)). Se consideró que un gen estaba sobreexpresado en muestras tumorales en comparación con el tejido normal cuando la mediana de la expresión del gen relativo cuando la mediana de expresión era superior a 2 (2x), e infraexpresado si la mediana tiene un valor por debajo de 0,5 (0,5x), Por tanto, usando este criterio nuestros resultados mostraron que *FOXP3* (3,2x), *ICOSL* (2,1x), *IDO1* (3,7x), *PD-1* (2,9x), *CD137* (3,5x) se encontraba sobreexpresado en el tejido tumoral en relación con el tejido normal adyacente. Para visualizar mejor estos resultados, fueron normalizados con log2 seguidamente su media se representó ([figura 39](#)).

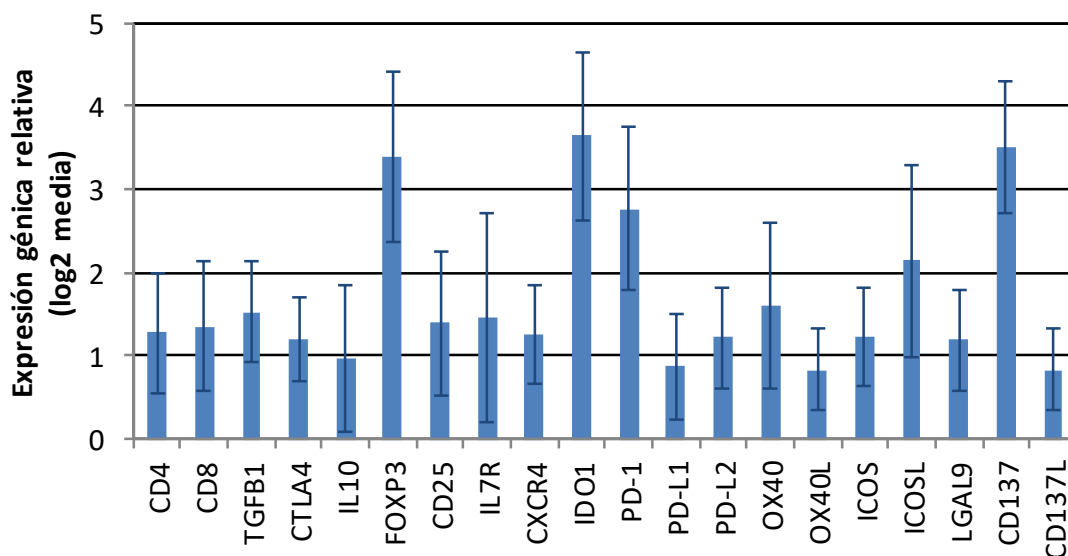


Figura 40. Representación gráfica de la expresión génica relativa de la cohorte prospectiva. Esta gráfica representa el log2 de la media de la expresión génica relativa para cada gen. Los resultados representados son log2 media \pm error típico de la media.

En ambas cohortes se aprecia la sobreexpresión *FOXP3* con una mediana de 2,65 (0,02-85,2) este tipo de hallazgo no ha sido reportado en ovario pero sí ha sido reportados en otros tipos de cáncer (Gerber *et al.*, 2014). Es un factor regulador de la transcripción que participa directamente en la función de las células reguladoras T (CD4+). La expresión de *FOXP3* también se induce transitoriamente en células T *CD4+* y *CD8+* tras la estimulación (Roncador *et al.*, 2005). Otro de los hallazgos encontrado al igual que en la cohorte retrospectiva fue la sobreexpresión de *IDO-1* con una mediana 1,76 (0,01-77,19) cuya función es la de supresión inmune que culmina en efectos negativos sobre los linfocitos T (Godin-Ethier *et al.*, 2011). Numerosos estudios han demostrado que *IDO1* está altamente expresado en múltiples tipos de cáncer humano y que los niveles de transcripción de genes para *IDO1* destacan su fuerte asociación con la infiltración de células T (Zhai *et al.*, 2018).

Uno de los puntos de control inmunológico más estudiados hoy en día es *PD-1* el cual se sobreexpresó en ambas cohortes con una mediana de 1,32 (0,01-58,12). Expresado en el COSAG, *PD-1* junto a sus dos ligandos *PD-L1* y *PD-L2*, da como resultado la inhibición de la señalización de las células T (Gaillard y Secord, 2016). Al

igual que en la cohorte retrospectiva se evidenció la sobreexpresión de *ICOSL* con una mediana 2,43 (0,50-18,47).

El *CD137* o también llamado *TNFRSF9* lo encontramos sobreexpresado al igual que en la cohorte retrospectiva. Este biomarcador es un importante coestimulador del sistema inmune (figura 41) su papel de importancia se encuentra basado en la coestimulación que tiene sobre los linfocitos CD8 citotóxicos cuya función es atacar el tumor. Resaltar que en ovario no se han llevado a cabo estudios con este biomarcador pero sí en otros tipos de tumores en los que se resalta su papel en el microambiente tumoral (Makkouk, Chester y Kohrt, 2016). En ambas cohortes se encontró sobreexpresado este biomarcador y en la cohorte retrospectiva asociado a mayor supervivencia por lo que este marcador abre la ventana a nuevos tratamientos inmunoterápicos en cáncer.

En la actualidad no se han llevado estudios a cabo con este biomarcador sin embargo sí que se conoce su papel ampliamente en el sistema inmune. Se basa en su capacidad para inducir la activación de los linfocitos T citotóxicos (CTL) y entre otras altas cantidades de IFN- γ . Además de su capacidad de coestimular a las células T, las señales vuelven a las células presentadoras de antígenos promoviendo su activación y diferenciación (Zhao *et al.*, 2009).

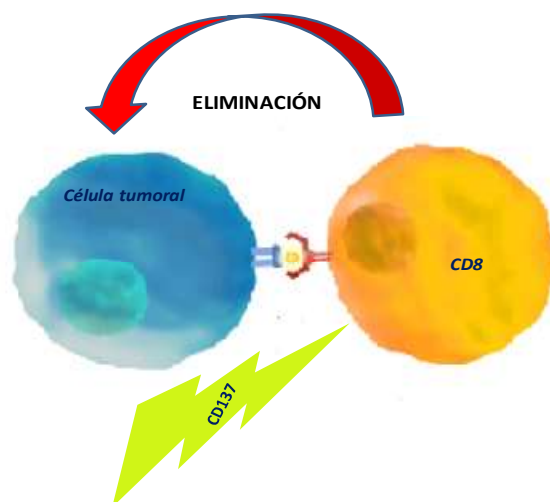


Figura 41. Mecanismo CD137. Imagen que resume el papel del CD137 como coestimulador del linfocito CD8 citotóxico; con un papel de inmunoactivador del sistema inmune contra la célula tumoral.

2.3 Correlaciones de los biomarcadores con las variables clinicopatológicas

Se llevaron a cabo pruebas no paramétricas como las pruebas U de Mann-Whitney, Kruskal Wallis y Chi-cuadrado para investigar la asociación de marcadores inmunoreguladores con características clinicopatológicas (tabla 21).

Tabla 21. Correlación de biomarcadores con variables clinicopatológicas

Variable	Gen		N	Mediana	Rango[min-max]	p-valor
Hábito Tabáquico	CTLA4	Fumador	2	6,0452	4,03-8,06	0,032
		No Fumador	18	1,7975	0,04-7,42	
Estadio FIGO	ICOS	I/II	8	0,4797	0,04-1,83	0,022
		III/IV	12	2,5989	0,34-8,06	
	LGAL9	I/II	8	0,4679	0,04-1,80	0,018
		III/IV	12	1,8679	0,52-9,29	
	CD137L	I/II	8	0,4797	0,04-1,34	0,028
		III/IV	12	1,3391	0,36-8,06	

La prueba U de Mann-Whitney reveló que había varias asociaciones significativas entre la expresión de diferentes genes y las variables clinicopatológicas tales como hábito tabáquico y el estadio FIGO (tabla 21). En cuanto al hábito tabáquico se encontró mayor expresión de CTLA4 en las pacientes fumadoras relación de relevancia ya CTLA4 interviene en las vías inhibitorias (Eastwood *et al.*, 2010). En cuanto al estadio FIGO ICOS, LGAL9 y CD137L (figura 42) se encontró más expresado en los estadios III/IV de la FIGO vs I/II. Estos hallazgos aún no han sido vistos en el cáncer de ovario sin embargo nos ayuda comprender más el comportamiento de estos tumores en el que los estadios más avanzados como los son los estadios III/IV que están caracterizados por mayor extensión de la tumoración con invasión linfática por lo que estos biomarcadores pueden cursar con un efecto de inmunosupresión favoreciendo al crecimiento tumoral. Es sabi-

do que la galactina-9 (*LGAL9*) como se comentó en los apartados anteriores es un gen que desempeña un papel en la inmunoregulación induciendo a la apoptosis de células T razón que podría explicar el comportamiento tórpido de estos tumores (Ito *et al.*, 2012)

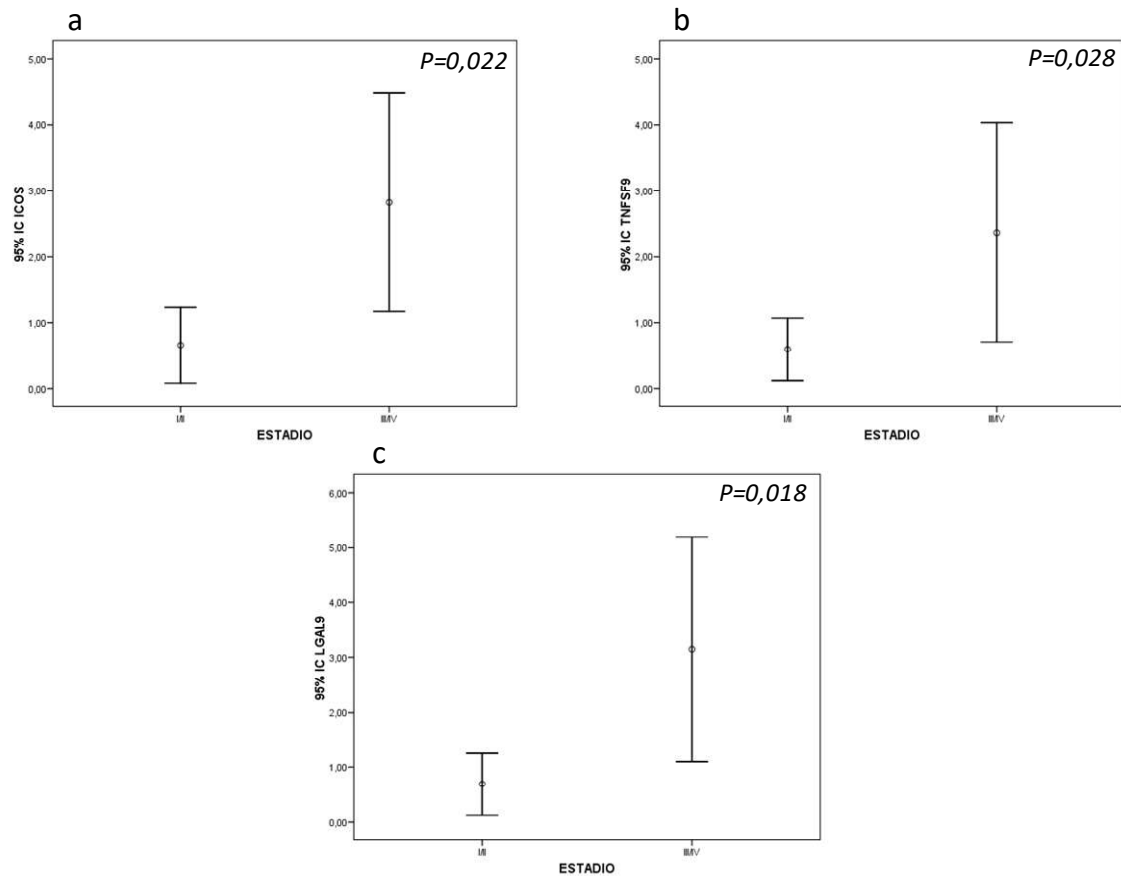


Figura 42. Estas figuras representan la correlación entre variables clinicopatológicas y marcadores de expresión génica. a) Representación de la expresión de ICOS según el estadio FIGO (0=I/II Y 1=III/IV, b) representación de CD137L según el estadio FIGO y c) Galectina-9 con el estadio FIGO. Las barras de error representan el intervalo de confianza (IC) del 95% de la media.

Nuestro estudio en ambas cohortes nos ha ayudado a comprender en mayor profundidad el comportamiento del COSAG y el importante papel que juega el microambiente tumoral en la evolución de esta enfermedad, como queda representado en la [figura 43](#). En la presente tesis doctoral hemos podido evidenciar la expresión elevada de biomarcadores característicos de la población Tregs. Dentro de los marcadores con elevada expresión se encuentran inmunosupresores como *FOXP3*, *CD25*, *CXCR4*, estos hallazgos podrían explicar el mal pronóstico que presenta este tipo de tumores, aunque más estudios son necesarios para poder discernir el papel de cada una de las moléculas implicadas en el microambiente tumoral. Adicionalmente resaltar los genes de inmunocheckpoints con elevada expresión como lo son *CTLA4*, *PD-L1*, *PD-L2*, *OX40*, *ICOS*, *ICOSL*, genes que pueden abrir nuevas opciones terapéuticas en inmunoterapia dentro del COSAG como ya ha sido demostrado en otras neoplasias. Adicionalmente de todos los marcadores analizados cabe destacar los niveles elevados de *CD137*, su función en el sistema inmune es la de coestimular a los linfocitos T citotóxicos para atacar la célula tumoral ver [figura 43](#); siendo un marcador de pronóstico independiente en la serie retrospectiva.

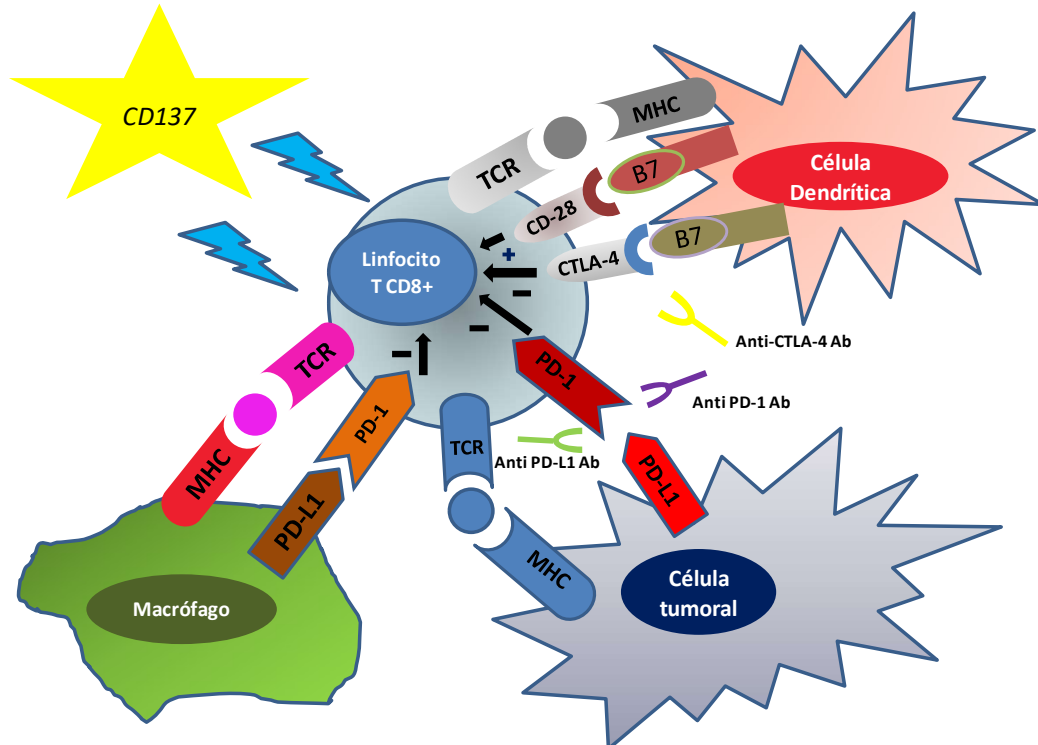


Figura 43. Mecanismo de estimulación del CD137 sobre el sistema inmune como molécula estimuladora, estimulando a los linfocitos T citotóxicos CD8 desencadenando un proceso en cascada cuyo fin es disminuir la respuesta del tumor.

V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

1. El cáncer de ovario seroso de alto grado es un tumor inmunogénico con una elevada expresión de genes asociados a la población Treg (*CTLA-4*, *FOXP3*, *CD25*, *CXCR4*) y mediadores involucrados en el control de los checkpoints inmunológicos (*PD-1*, *PD-L1*, *PD-L2*, *OX40L*, *ICOS*, *ICOS-L*, *CD137*).
2. Las técnicas histopatológicas empleadas revelaron que el patrón de infiltrado linfocitario que más predominó en la cohorte retrospectiva fue el peri-intratumoral con un patrón difuso.
3. Los análisis de correlación revelaron asociaciones entre los genes estudiados y características clínico-patológicas como hábito tabáquico (*TGFB1*; *IDO1*), grado histológico (*CD8*), recaída (*IDO1*) y estadio FIGO (*FOXP3*, *PD-L2*, *CXCR4*).
4. En la cohorte prospectiva se validaron genes checkpoints inmunológicos de la cohorte retrospectiva, observando una sobreexpresión de *FOXP3*, *IDO1*, *PD-1*, *ICOSL*, *CD137* en tejido tumoral frente al tejido adyacente no tumoral.
5. El infiltrado linfocitario intratumoral con patrón difuso se correlacionó con mejor supervivencia global. Además, altos niveles de expresión de *IL7* se asociaron significativamente con mayor tiempo libre de progresión, y elevados niveles de *CD137* se relacionaron con una mayor supervivencia global.
6. Los resultados presentados en esta tesis proponen la existencia de diferentes biomarcadores inmunes que pueden ayudar con el manejo terapéutico de estos tumores, como es *CD137* biomarcador pronóstico independiente en supervivencia global en la serie retrospectiva; lo que podría abrir un abanico de posibilidades en futuras estrategias terapéuticas.

CONCLUSIONES

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Adris, S. K. *et al.* (2005) «IL-12 and IL-10 Expression Synergize to Induce the Mammary Tumors and Lung Metastasis 1», *J. Immunol*, 175, pp. 5885-5894.
- Al-Shibli, K. I. *et al.* (2008) «Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer», *Clinical Cancer Research*, 14(16), pp. 5220-5227.
- Alderson, M. R. *et al.* (1991) «Interleukin 7 induces cytokine secretion and tumoricidal activity by human peripheral blood monocytes», *Journal of Experimental Medicine*, 173(4), pp. 923-930.
- Alli, P. M. y Ali, S. Z. (2002) «Micropapillary serous carcinoma of the ovary: Cytomorphologic characteristics in peritoneal/pelvic washings», *Cancer*, 96(3), pp. 135-139.
- Aluloski, I. *et al.* (2017) «Survival of Advanced Stage High-Grade Serous Ovarian Cancer Patients in the Republic of Macedonia.», *Open access Macedonian journal of medical sciences*, 5(7), pp. 904-908.
- Anderson, M. W. *et al.* (2012) «CD137 Is Expressed in Follicular Dendritic Cell Tumors and in Classical Hodgkin and T-Cell Lymphomas Diagnostic and Therapeutic Implications», *AJPA*. Elsevier Inc., 181(3), pp. 795-803.
- Auer, K. *et al.* (2016) «Role of the immune system in the peritoneal tumor spread of high grade serous ovarian cancer», *Oncotarget*, 7(38), pp. 61336-61354.
- Auersperg, N. *et al.* (2001) «Ovarian Surface Epithelium : Biology , Endocrinology », *Endocrine Reviews*, 22(2), pp. 255-288.
- Auersperg, N. (2013) «Ovarian surface epithelium as a source of ovarian cancers: Unwarranted speculation or evidence-based hypothesis?», *Gynecologic Oncology*. Elsevier Inc., 130(1), pp. 246-251.
- Auersperg, N., Woo, M. M. M. y Gilks, C. B. (2008) «The origin of ovarian carcinomas: A developmental view», *Gynecologic Oncology*, 110(3), pp. 452-454.
- Aure, J. C., Høeg, K. y Kolstad, P. (1971) «Psammoma bodies in serous carcinoma of the ovary. A prognostic study», *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Elsevier Inc., 109(1), pp. 113-118.

BIBLIOGRAFIA

- Baecher-Allan, C. *et al.* (2001) «CD4+CD25^{high} Regulatory Cells in Human Peripheral Blood», *The Journal of Immunology*, 167(3), pp. 1245-1253.
- Banerjee, A., Vasanthakumar, A. y Grigoriadis, G. (2013) «Modulating T regulatory cells in cancer: How close are we?», *Immunology and Cell Biology*. Nature Publishing Group, 91(5), pp. 340-349.
- Bast, R., Hennessy, B. y Mills, G. (2009) «The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation», *Nature Reviews Cancer*, 9(6), pp. 1-28.
- Bates, G. J. *et al.* (2006) «Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse», *Journal of Clinical Oncology*, 24(34), pp. 5373-5380.
- Becknell, B. y Caligiuri, M. A. (2005) «Interleukin-2 , Interleukin-15 , and Their Roles in Human Natural Killer Cells», *Adv. Immunology*, 86, pp. 209-239.
- Bell, K. A., Smith Sehdev, A. E. y Kurman, R. J. (2001) «Refined diagnostic criteria for implants associated with ovarian atypical proliferative serous tumors (borderline) and micropapillary serous carcinomas», *American Journal of Surgical Pathology*, 25(4), pp. 419-432.
- Bennett, C. L. *et al.* (2001) «The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3», *Nature Genetics*, 27(1), pp. 20-21.
- Berchuck, a y Carney, M. (1997) «Human ovarian cancer of the surface epithelium.», *Biochemical pharmacology*, 54(5), pp. 541-4.
- Bertucci, F. *et al.* (2015) «PDL1 expression in inflammatory breast cancer is frequent and predicts for the pathological response to chemotherapy», *Oncotarget*, 6(15), pp. 13506-13519.
- Bhoola, S. y Hoskins, W. J. (2006) «Diagnosis and Management of Epithelial Ovarian Cancer», *Obstetrics & Gynecology*, 107(6), pp. 1399-1410.
- Bois, A. Du *et al.* (2009) «Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer», *Cancer*, 115(6), pp. 1234-1244.
- Bremnes, R. M. *et al.* (2011) «The role of tumor-infiltrating immune cells and chronic

- inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: Emphasis on non-small cell lung cancer», *Journal of Thoracic Oncology*. International Association for the Study of Lung Cancer, 6(4), pp. 824-833.
- Bron, L. *et al.* (2013) «Prognostic value of arginase-II expression and regulatory T-cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma», *International Journal of Cancer*, 132(3), pp. 85-93.
- Bustin, S. A. y Nolan, T. (2004) «Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction.», *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 15(3), pp. 155-66.
- Cannistra, S. A. y Cannistra, G. M. (2011) «Ovarian Cancer, Fallopian Tube Carcinoma, and Peritoneal Carcinoma», en *Cancer Principles and Practice of Oncology*. 9.^a ed, pp. 1368-1391.
- Caro, I. (2009) «Psammoma Body: A Product of Dystrophic Calcification or of a Biologically Active Process That Aims at Limiting the Growth and Spread of Tumor?», *Diagnostic Cytopathology*, 37(7), pp. 534-539.
- Carreno, B. M. *et al.* (2000) «CTLA-4 (CD152) Can Inhibit T Cell Activation by Two Different Mechanisms Depending on Its Level of Cell Surface Expression», *The Journal of Immunology*, 165(3), pp. 1352-1356.
- Cavallo, F. *et al.* (2011) «2011: The immune hallmarks of cancer», *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(3), pp. 319-326.
- Chacon, J. A. *et al.* (2013) «Co-Stimulation through 4-1BB/CD137 Improves the Expansion and Function of CD8+ Melanoma Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Adoptive T-Cell Therapy», *PLoS ONE*, 8(4).
- Chatterjee, S., Behnam Azad, B. y Nimmagadda, S. (2014) *The intricate role of CXCR4 in cancer*. 1.^a ed, *Advances in Cancer Research*. 1.^a ed. Elsevier Inc.
- Chen, W. *et al.* (2003) «Conversion of Peripheral CD4 + CD25 – Naive T Cells to CD4 + CD25 + Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3», *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), pp. 1875-1886.
- Cheng, W. *et al.* (2005) «Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by

BIBLIOGRAFIA

- HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract», *Nature Medicine*, 11(5), pp. 531-537.
- Chu, Q. D. *et al.* (2010) «High Chemokine Receptor CXCR4 Level in Triple Negative Breast Cancer Specimens Predicts Poor Clinical Outcome», *Journal of Surgical Research*. Elsevier Ltd, 159(2), pp. 689-695.
- Ciftci, R. *et al.* (2014) «High serum transforming growth factor beta 1 (TGFB1) level predicts better survival in breast cancer», *Tumor Biology*, 35(7), pp. 6941-6948.
- Cisterna, P. y Orellana, R. (2007) «Tumor Ovárico De Bajo Potencial Maligno (Borderline): Patrón Seroso Micropapilar», *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 72(4), pp. 241-246.
- Cui, W. *et al.* (1996) «TGFβ1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice», *Cell*, 86(4), pp. 531-542.
- Cui, Y. y Guo, G. (2016) «Immunomodulatory function of the tumor suppressor p53 in host immune response and the tumor microenvironment», *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), pp. 2-16.
- Curiel, T. J. *et al.* (2004) «Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival», *Nature Medicine*, 10(9), pp. 942-949.
- Date, S. *et al.* (2008) «A Kinetic and Dynamic Analysis of Foxp3 Induced in T Cells by TGFB», *The Journal of Immunology*, 177, pp. 3327-3336.
- Dehari, R. *et al.* (2007) «The development of high-grade serous carcinoma from atypical proliferative (borderline) serous tumors and low-grade micropapillary serous carcinoma: A morphologic and molecular genetic analysis», *American Journal of Surgical Pathology*, 31(7), pp. 1007-1012.
- Dogan, E. y Saygili, U. (2005) «p53 and mdm2 as prognostic indicators in patients with epithelial ovarian cancer : A multivariate analysis», *Gynecologic Oncology*, 97(7), pp. 46-52.
- Drakes, M. L. *et al.* (2018) «Stratification of ovarian tumor pathology by expression of

- programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand- 1 (PD-L1) in ovarian cancer», *Journal of Ovarian Research*. *Journal of Ovarian Research*, 11(1), pp. 1-11.
- Dubeau, L. (1999) «The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: Does the emperor have no clothes?», *Gynecologic Oncology*, 72(3), pp. 437-442.
- Ducie, J. *et al.* (2017) «Molecular analysis of high-grade serous ovarian carcinoma with and without associated serous tubal intra-epithelial carcinoma», *Nature Communications*. Springer US, 8(1), pp. 1-9.
- Eastwood, D. *et al.* (2010) «Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4+effector memory T-cells», *British Journal of Pharmacology*, 161(3), pp. 512-526.
- Efstathiou, E. *et al.* (2007) «Advanced Epithelial Ovarian Cancer in the Elderly: Chemotherapy Tolerance and Outcome», *Anticancer Research*, 618(4), pp. 611-617.
- Elinav, E. *et al.* (2013) «Inflammation-induced cancer: Crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms», *Nature Reviews Cancer*, 13(11), pp. 759-771.
- Faber, M. T. *et al.* (2014) «Cigarette smoking and risk of ovarian cancer: a pooled analysis of 21 case–control studies», *Cancer Causes Control*, 24(5), pp. 9-11.
- Faget, J. *et al.* (2013) «ICOS is associated with poor prognosis in breast cancer as it promotes the amplification of immunosuppressive CD4 + T cells by plasmacytoid dendritic cells», *OncotImmunology*, 2(3), p. e23185.
- Fanlu, M. *et al.* (2015) «Psammoma bodies in two types of human ovarian tumours: a mineralogical study», *Mineralogy and Petrology*, 109(3), pp. 357-365.
- Fathalla, M. F. (1971) «Incessant Ovulation-a Factor in Ovarian Neoplasia ?», *The Lancet*, 298(7716), p. 163.
- Ferlay, J. *et al.* (2015) «Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012», *International Journal of Cancer*, 136(5), pp. E359-E386.
- Finn, O. J. (2012) «Immuno-oncology: Understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer», *Annals of Oncology*, 23(SUPPL.8), pp. 8-11.

BIBLIOGRAFIA

- Folkman, J. (2003) «Fundamental concepts of the angiogenic process.», *Current molecular medicine*, 3(7), pp. 643-51.
- Fridman, W. H. *et al.* (2012) «The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome», *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 12(4), pp. 298-306.
- Fujio, K. *et al.* (2015) «A vaccine strategy with multiple prostatic acid phosphatase-fused cytokines for prostate cancer treatment», *Oncology Reports*, 33(4), pp. 1585-1592.
- Gaillard, S. L. y Secord, A. A. (2016) «The role of immune checkpoint inhibition in the treatment of ovarian cancer», *Gynecologic Oncology Research and Practice*. Gynecologic Oncology Research and Practice, 3(1), p. 11.
- Gao, Q. *et al.* (2007) «Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection», *Journal of Clinical Oncology*, 25(18), pp. 2586-2593.
- Gerber, A. L. *et al.* (2014) «High expression of FOXP3 in primary melanoma is associated with tumour progression», *British Journal of Dermatology*, 170(1), pp. 103-109.
- Gershenson, D. M. *et al.* (1998) «Ovarian serous borderline tumors with invasive peritoneal implants.», *Cancer*, 82(6), pp. 1096-1103.
- Gershenson, D. M. (2011) «The continuum of serous ovarian tumors of low malignant potential and low-grade serous carcinoma of the ovary», *Rare and Uncommon Gynecological Cancers: A Clinical Guide*, 23(4), pp. 105-111.
- Godin-Ethier, J. *et al.* (2011) «Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Human Cancers: Clinical and Immunologic Perspectives», *Clinical Cancer Research*, 17(22), pp. 6985-6991.
- Graeff, P. De *et al.* (2006) «Factors influencing p53 expression in ovarian cancer as a biomarker of clinical outcome in multicentre studies», *British Journal of Cancer*, 94(8), pp. 627-633.
- Griffiths, R. W. *et al.* (2007) «Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival», *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 56(11), pp. 1743-1753.

- Grisham, R. N. *et al.* (2014) «BRAF Mutation is Associated with Early Stage Disease and Improved Outcome in Patients with Low-Grade Serous Ovarian Cancer Rachel», *Cancer.*, 119(3), pp. 548-554.
- Guleria, S., Jensen, A. y Kjær, S. K. (2018) «Risk of borderline ovarian tumors among women with benign ovarian tumors: A cohort study», *Gynecologic Oncology*. Elsevier Inc., 148(1), pp. 86-90.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2000) «The hallmarks of cancer.», *Cell*, 100(1), pp. 57-70.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2011) «Hallmarks of cancer: The next generation», *Cell*. Elsevier Inc., 144(5), pp. 646-674.
- Hassan, S. *et al.* (2009) «The influence of tumor-host interactions in the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 ligand/receptor axis in determining metastatic risk in breast cancer», *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 175(1), pp. 66-73.
- Hauptmann, S. *et al.* (2010) «OVARIAN LOW-GRADE AND HIGH-GRADE SEROUS CARCINOMA: Pathogenesis, Clinicopathologic and Molecular Biologic Features, and Diagnostic Problems», *Adv Anat Pathol*, 16(5), pp. 267-282.
- Hauptmann, S. *et al.* (2014) «Histologische Malignitätsgraduierung des Ovarialkarzinoms: Überblick und Empfehlung», *Pathologe*, 35(5), pp. 497-503.
- Hauptmann, S. *et al.* (2017) «Ovarian borderline tumors in the 2014 WHO classification : evolving concepts and diagnostic criteria», *Gynecology & Gynecologic Oncology*. Virchows Archiv, 470(4), pp. 125-142.
- Havrilesky, B. L. *et al.* (2015) «Prognostic Significance of p53 Mutation and p53 Overexpression in Advanced Epithelial Ovarian Cancer : A Gynecologic Oncology Group Study», *The American Society of Hematology*, 21(20), pp. 3814-3825.
- Hayflick, L. (2000) «The illusion of cell immortality», *British Journal of Cancer*, 83(7), pp. 841-846.
- Heintz, A. P. *et al.* (2003) «Carcinoma of the ovary.», *International journal of gynaecology and obstetrics the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 66(2), pp. 184-190.

BIBLIOGRAFIA

- Hendry, S. *et al.* (2017) «Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors : A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group : Part 2 : TILs in Melanoma , Gastrointestinal Tract Carc», *IRISAIR UNIVERSITA DEGLI STUDI DI MILANO*, 24(6), pp. 311-335.
- Heublein, S. *et al.* (2013) «Her-2 / neu expression is a negative prognosticator in ovarian cancer cases that do not express the follicle stimulating hormone receptor (FSHR)», *Journal of Ovarian Research*. *Journal of Ovarian Research*, 6(1), p. 1.
- Hiraoka, N. *et al.* (2006) «Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions», *Clinical Cancer Research*, 12(18), pp. 5423-5434.
- Hori, S., Nomura, T. y Sakaguchi, S. (2003) «Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3», *Journal of Immunology*, 198(3), pp. 981-985. doi: 10.1126/science.1079490.
- Huang, R.-Y. *et al.* (2015) «PD1 co-inhibitory molecules collaborate to limit CD8+ T cell signaling and dampen antitumor immunity in a murine ovarian cancer model», *Oncotarget*, 6(29), pp. 27359-27377.
- li, A. I. *et al.* (2002) «replacement in recurrent ovarian cancer», *Cancer Gene Therapy*, 53(9), pp. 553-566.
- li, J. O. M. *et al.* (2008) «Multivalent 4-1BB binding aptamers costimulate CD8 + T cells and inhibit tumor growth in mice», *Journal of Clinical Investigaton*, 118(1), pp. 376-386.
- Ito, K. *et al.* (2012) «Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: Role in the tumor microenvironment», *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(3-4), pp. 763-778.
- J, M. (1991) «Immune Effect of Tumor-infiltrating Lymphocytes and Its Relation to the Survival Rate of Patients with Ovarian Malignancies», *Journal o/ Tongfi Medical University*, 11(4), pp. 235-239.
- Jain, N. *et al.* (2010) «Dual function of CTLA-4 in regulatory T cells and conventional T cells to prevent multiorgan autoimmunity», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4), pp. 1524-1528.

- Jilaveanu, L. B. *et al.* (2014) «PD-L1 expression in clear cell renal cell carcinoma: An analysis of nephrectomy and sites of metastases», *Journal of Cancer*, 5(3), pp. 166-172.
- Kang, H. y Mansela, W. G. J. (2005) «The elevated level of CXCR4 is correlated with nodal metastasis of human breast cancer», *Breast Cancer Research and Treatment*, 14(5), pp. 360-367.
- Karst, A. M. y Drapkin, R. (2010) «Ovarian Cancer Pathogenesis: A Model in Evolution», *Journal of Oncology*, 2010(6), pp. 1-13.
- Köbel, M. *et al.* (2010) «Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas», *International Journal of Gynecological Pathology*, 29(3), pp. 203-211.
- Kojima, K. *et al.* (2016) «MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML : implications for leukemia therapy», *The American Society of Hematology*, 106(9), pp. 3150-3160.
- Konecny, G. E. *et al.* (2014) «Prognostic and Therapeutic Relevance of Molecular Subtypes in High-Grade Serous Ovarian Cancer», *Oxford University Press*, 106(10), pp. 2-8. doi: 10.1093/jnci/dju249.
- Koppenol, W. H., Bounds, P. L. y Dang, C. V. (2011) «Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism», *Nature Reviews Cancer*, 11(5), pp. 325-337.
- Kroeger, P. T. y Drapkin, R. (2017) «Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer», *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 29(1), pp. 26-34.
- Kryczek, I. *et al.* (2011) «IL-17+ Regulatory T Cells in the Microenvironments of Chronic Inflammation and Cancer», *The Journal of Immunology*, 186(7), pp. 4388-4395.
- Kuhn, D. J. *et al.* (2003) «Overexpression of interleukin-2 receptor alpha in a human squamous cell carcinoma of the head and neck cell line is associated with increased proliferation, drug resistance, and transforming ability.», *Journal of cellular biochemistry*, 89(4), pp. 824-36.
- Kurman, R. J. y Shih, I. M. (2016) «The dualistic model of ovarian carcinogenesis revisited, revised, and expanded», *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 186(4), pp. 733-747.
- Kurman, R. y Shih, I. (2010) «The Origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer-a

BIBLIOGRAFIA

- proposed unifying theory», *The American journal of surgical pathology*, 34(3), pp. 433-443.
- Kurte, M. *et al.* (2004) «A Synthetic Peptide Homologous to Functional Domain of Human IL-10 Down-Regulates Expression of MHC Class I and Transporter Associated with Antigen Processing 1/2 in Human Melanoma Cells», *The Journal of Immunology*, 173(3), pp. 1731-1737.
- Ladoire, S. *et al.* (2008) «Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy of Breast Carcinoma Is Associated with the Disappearance of Tumor-Infiltrating Foxp3+ Regulatory T Cells», *Clinical Cancer Research*, 14(8), pp. 2413-2420.
- Lambeck, A. J. A. *et al.* (2007) «Serum Cytokine Profiling as a Diagnostic and Prognostic Tool in Ovarian Cancer : A Potential Role for Interleukin 7», *Clin Cancer Res.*, 13(8), pp. 2385-2392.
- Leach, D. R. (1996) «Enhancement of Antitumor Immunity by», *Science*, 7(23), pp. 1734-1736.
- Li, J. *et al.* (2017) «The prognostic value of tumor-infiltrating T lymphocytes in ovarian cancer», *Oncotarget*, 8(9), pp. 15621-15631.
- Li, M. *et al.* (2006) «Transforming Growth Factor-B Regulation of Immune Responses», *Annual Review of Immunology*, 24(1), pp. 99-146.
- Ligament, B. (2018) «Special Section : Ovarian Cancer», *American Cancer Society*, 45(2), pp. 28-43.
- Lin, W. y Karin, M. (2007) «A cytokine-mediated link between innate immunity , inflammation , and cancer», *The Journal of Clinical Investigations*, 117(5), pp. 1175-1183.
- Liu, F. T. y Rabinovich, G. A. (2005) «Galectins as modulators of tumour progression», *Nature Reviews Cancer*, 5(1), pp. 29-41.
- Llueca, A. *et al.* (2018) «Prognostic value of peritoneal cancer index in primary advanced ovarian cancer», *European Journal of Surgical Oncology*, 44(1), pp. 163-169.
- Lynch, D. H., Namen, A. E. y Miller, R. E. (1991) «In vivo evaluation of the effects of interleukins 2, 4 and 7 on enhancing the immunotherapeutic efficacy of anti- tumor

- cytotoxic T lymphocytes», *European Journal of Immunology*, 21(3), pp. 2977-2985.
- Makkouk, A., Chester, C. y Kohrt, H. E. (2016) «Rationale for anti-CD137 cancer immunotherapy», *European Journal of Cancer*. Elsevier Ltd, 54(1), pp. 112-119.
- Malpica, A. y Longacre, T. A. (2018) «Prognostic indicators in ovarian serous borderline tumours», *Pathology*, 50(2), pp. 205-213.
- Mantovani, A. *et al.* (2008) «Cancer-related inflammation», *Nature*, 454(7203), pp. 436-444.
- Marigreisy, L. A. y Azcuy, S. (2016) «Overall survival of epithelial ovarian cancer in Pinar del Rio as prognostic factors .», *Rev. Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 20(2), pp. 212-219.
- Massagué, J. (2008) «TGF β in Cancer», *Cell*, 134(2), pp. 215-230.
- Melichar, B. *et al.* (2000) «Expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 and their receptors CD28, CTLA-4 on malignant ascites CD3+ tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with ovarian and other types of peritoneal carcinomatosis», *Clinical and Experimental Immunology*, 119(1), pp. 19-27.
- Michel, J. *et al.* (1999) «CD137-induced apoptosis is independent of CD95», *Immunology*, 98(1), pp. 42-46.
- Mignogna, C. *et al.* (2016) «Aurora Kinase A expression predicts platinum-resistance and adverse outcome in high-grade serous ovarian carcinoma patients», *Journal of Ovarian Research*. Journal of Ovarian Research, 9(1), pp. 1-8.
- Miller, K. R. *et al.* (2018) «HOXA4/HOXB3 gene expression signature as a biomarker of recurrence in patients with high-grade serous ovarian cancer following primary cytoreductive surgery and first-line adjuvant chemotherapy», *Gynecologic Oncology*. Elsevier Inc., 149(1), pp. 155-162.
- Mink, P. J., Sherman, M. E. y Devesa, S. S. (2002) «Incidence patterns of invasive and borderline ovarian tumors among white women and black women in the United States: Results from the SEER Program, 1978-1998», *Cancer*, 95(11), pp. 2380-2389.
- Mir, R. *et al.* (2014) «Gynecologic Oncology YM155 sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin inducing apoptosis and tumor regression», *Gynecologic Oncology*. Elsevier Inc., 132(1), pp. 211-220.

BIBLIOGRAFIA

- Moines, D. (2017) «The role of IL-7 in Immunity and Cancer», *Anticancer Research*, 37(3), pp. 963-968.
- Moy, J. D., Moskovitz, J. M. y Ferris, R. L. (2017) «ScienceDirect Biological mechanisms of immune escape and implications for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma», *European Journal of Cancer*. Elsevier Ltd, 76, pp. 152-166.
- van Nagell, J. R. *et al.* (2013) «Cancer Statistics, 2013», *Cancer*, 37(2), pp. 408-14.
- Network, T. C. G. A. R. (2011) «HHS Public Access», *Nature Medicine*, 474(7353), pp. 609-615.
- Neuzillet, C. *et al.* (2015) «Pharmacology & Therapeutics Targeting the TGF β pathway for cancer therapy», 147, pp. 22-31. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.001.
- Noppen, L. y Morisset, L. K. (2008) «New perspectives on an old triad», *Immunol. Rev*, 226, pp. 205-218.
- Norell, H. *et al.* (2006) «Frequent loss of HLA-A2 expression in metastasizing ovarian carcinomas associated with genomic haplotype loss and HLA-A2-restricted HER-2/neu-specific immunity», *Cancer Research*, 66(12), pp. 6387-6394.
- Nuebling, T. *et al.* (2018) «The immune checkpoint modulator OX40 and its ligand OX40L in NK-cell immunosurveillance and acute myeloid leukemia.», *Cancer immunology research*, 6(2), pp. 8-26.
- Odicino, F. *et al.* (2007) «New development of the FIGO staging system», *Gynecologic Oncology*, 107(1 SUPPL.), pp. 8-9.
- Oleinika, K. *et al.* (2013) «Suppression, subversion and escape: The role of regulatory T cells in cancer progression», *Clinical and Experimental Immunology*, 171(1), pp. 36-45.
- Önal, Y. (2017) «Assessment of prognostic factors in epithelial ovarian cancer», *Eurasian Journal of Medicine and Oncology*, 1(2), pp. 61-68.
- Palazzo, J. R. *et al.* (2000) «Overexpression of p21WAF1 / CIPI and MDM2 Characterizes Serous Borderline Ovarian Tumors», *Human Pathology*, 31(6), pp. 698-704.
- Pardoll, D. M. (2012) «The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy», *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 12(4), pp. 252-264.

- Pardoll, D. M. (2012) «The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy», *Nat Rev Cancer.*, 12(4), pp. 252-264.
- Parker, R. L. *et al.* (2004) «Early recurrence of ovarian serous borderline tumor as high-grade carcinoma: A report of two cases», *International Journal of Gynecological Pathology*, 23(3), pp. 265-272.
- Patel, S. P. y Kurzrock, R. (2015) «PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy», *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(4), pp. 847-856.
- Peres, L. C. *et al.* (2018) «Invasive epithelial ovarian cancer survival by histotype and disease stage», *Journal of the National Cancer Institute*, 111(4), pp. 1-9.
- Perrone, G. *et al.* (2008) «Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer», *European Journal of Cancer*, 44(13), pp. 1875-1882.
- Petersen, R. P. *et al.* (2006) «Tumor infiltrating FOXP3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients», *Cancer*, 107(12), pp. 2866-2872.
- Pfaffl, M. W. (2001) «A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR», 29(9), pp. 16-21.
- Pinto, M. P. *et al.* (2018) «Gynecologic Oncology Patient inflammatory status and CD4 + / CD8 + intraepithelial tumor lymphocyte infiltration are predictors of outcomes in high-grade serous ovarian cancer», *Gynecologic Oncology*. Elsevier Inc., 4, pp. 1-8.
- Prat Díaz de Losada, J. (2007) «Tumores Ováricos Borderline (de Bajo Potencial de Malignidad)», *Revista Española de Patología*. Elsevier, 40(4), pp. 201-216.
- Prat, J. y FIGO Committee on Gynecologic Oncology (2015) «Staging Classification for Cancer of the Ovary, Fallopian Tube, and Peritoneum: Abridged Republication of Guidelines From the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO).», *Obstetrics and gynecology*, 126(1), pp. 171-4.
- Press, D. (2014) «A survival analysis comparing women with ovarian low-grade serous carcinoma to those with high-grade histology», *OncoTargets and Therapy*, 201(7), pp. 1891-1899.
- Preston, C. C. *et al.* (2013) «The ratios of CD8+ T cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3- T

BIBLIOGRAFIA

- cells correlate with poor clinical outcome in human serous ovarian cancer», *PLOS ONE*, 8(11), pp. 1-10.
- Qian, X. *et al.* (2018) «Clinical Predictors of Recurrence and Prognostic Value of Lymph Node Involvement in the Serous Borderline Ovarian Tumor», *International Journal of Gynecological Cancer*, 28(2), pp. 279-284.
- Randall, T. C. y Rubin, S. C. (2010) «Cytoreductive Surgery for Ovarian Cancer», *Gynecology & Gynecologic Oncology*, 81(4), pp. 871-883.
- Raspollini, M. R. *et al.* (2005) «Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma», *Annals of Oncology*, 16(4), pp. 590-596.
- Romero, I. *et al.* (2013) «Gynecologic Oncology Low-grade serous carcinoma: New concepts and emerging therapies», *Gynecologic Oncology*. Elsevier Inc., 39(4), pp. 1-7.
- Roncador, G. *et al.* (2005) «Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4 + CD25 + regulatory T cells at the single-cell level», *European Journal of Immunology*, 35, pp. 1681-1691.
- Rozali, E. N. *et al.* (2012) «Programmed Death Ligand 2 in Cancer-Induced Immune Suppression», *Journal of Immunology Research*, 2012, pp. 1-5.
- Russell, J. H. y Ley, T. J. (2002) «Lymphocyte Mediated Cytotoxicity», *Annual Review of Immunology*, 20(1), pp. 323-370.
- Saglam, O. y Conejo-Garcia, J. (2018) «PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in advanced cervical cancer», *Integrative Cancer Science and Therapeutics*, 5(2), pp. 1-4.
- Sakaguchi, S. *et al.* (1995) «Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing 11-2 Receptor α -Chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases...», *J. Immunol*, 155(3), pp. 1152-1164.
- Salama, P. *et al.* (2009) «Tumor-Infiltrating FOXP3 + T Regulatory Cells Show Strong Prognostic Significance in Colorectal Cancer», *Journal of Clinical Oncology*, 27(2), pp. 186-192.
- Salvucci, O. *et al.* (2006) «The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: A large tissue microarray study», *Breast Cancer Research and Treatment*, 97(3), pp. 275-283.

doi: 10.1007/s10549-005-9121-8.

- Sanmamed, M. F. *et al.* (2015) «Agonists of Co-stimulation in Cancer Immunotherapy Directed Against CD137, OX40, GITR, CD27, CD28, and ICOS», *Seminars in Oncology*. Elsevier, 42(4), pp. 640-655.
- Santoiemma, P. P. y Powell, D. J. (2015) «Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer», *Cancer Biology & Therapy*, 16(6), pp. 807-820.
- Satoshi, K. y Ochiai, M. (2007) «Selected Summary PIEPOC : A New Prognostic Index for Advanced Epithelial Ovarian cancer-Japan Multinational Trial», *Oncology*, 28(3), pp. 24-26.
- Seidman, J. D. *et al.* (2004) «The Histologic Type and Stage Distribution of Ovarian Carcinomas of Surface Epithelial Origin», *International Journal of Gynecological Pathology*, 23(1), pp. 41-44.
- SEOM (2017) «La cifras del cáncer en España», *SEOM*, pp. 1-28.
- Shay, J. W. y Bacchetti, S. (1997) «A survey of telomerase activity in human cancer», *European Journal of Cancer*, 33(5), pp. 787-791.
- Shiraki, M. *et al.* (1992) «Ovarian serous borderline epithelial tumors with multiple retroperitoneal nodal involvement: Metastasis or malignant transformation of epithelial glandular inclusions?», *Gynecologic Oncology*, 46(2), pp. 255-258.
- Shukla, S. *et al.* (2018) «Serous adenofibroma of ovary : An eccentric presentation», *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 11(4), pp. 4-6.
- Singh, R. *et al.* (2017) «Analysis of the whole transcriptome from gingivo-buccal squamous cell carcinoma reveals deregulated immune landscape and suggests targets for immunotherapy», *PLoS ONE*, 12(9), pp. 1-17.
- Spranger, S. *et al.* (2013) «Up-regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8+ T cells», *Science Translational Medicine*, 5(200), pp. 1-10.
- Stanske, M. y Wienert, S. (2018) «Dynamics of the Intratumoral Immune Response during Progression of High-Grade Serous», *Neoplasia*. Elsevier Inc., 20(3), pp. 280-288.

BIBLIOGRAFIA

- Stewart, J. M. *et al.* (2016) «The optimal time for surgery in women with serous ovarian cancer», *Canadian Journal of Surgery*, 59(4), pp. 223-232.
- Stuart, G. C. E. *et al.* (2011) «2010 Gynecologic Cancer InterGroup (GCIg) consensus statement on clinical trials in ovarian cancer: Report from the fourth ovarian cancer consensus conference», *International Journal of Gynecological Cancer*, 21(4), pp. 750-755.
- Tanner, B. *et al.* (2018) «ErbB-3 Predicts Survival in Ovarian Cancer», *Journal OF Clinical Oncology Original*, 24(26), pp. 4317-4323.
- Taylor, P. *et al.* (2015) «for enhancing cancer immunotherapy Immune modulation of the tumor microenvironment for enhancing cancer immunotherapy», *Oncolmmunology*, 2(e25961-1), pp. 37-41.
- Thibodeau, J. (2012) «Targeting the MHC class II antigen presentation pathway in cancer immunotherapy», *Oncoimmunology*, 1(6), pp. 1-9.
- Toker, A. *et al.* (2018) «Regulatory T cells in ovarian cancer are characterized by a highly activated phenotype distinct from that in melanoma», *Clinical Cancer Research*, pp. 1-28.
- Tortorella, L. *et al.* (2017) «Ovarian Cancer Management in the Oldest Old: Improving Outcomes and Tailoring Treatments», *Aging and Disease*, 8(5), p. 677.
- Travis y Brambilla (2014) «World Health Organization Classification of Tumours», *International Agency for Research on Cancer*, 978(4), pp. 92-832.
- Trimbos, J. B. *et al.* (2003) «Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial.», *Journal of the National Cancer Institute*, 95(2), pp. 113-125.
- Triulzi, T. *et al.* (2013) «FOXP3 expression in tumor cells and implications for cancer progression», *Journal of Cellular Physiology*, 228(1), pp. 30-35.
- Tsang, Y. T. (2014) «KRAS (but not BRAF) mutations in ovarian serous borderline tumor are associated with recurrent low-grade serous carcinoma Yvonne», *NIH Public Access*, 231(4), pp. 449-456.

- Tumors, B. *et al.* (2005) «Ovarian Serous Tumors of Low Malignant Potential», *American Journal of Surgical Pathology, The*, 29(6), pp. 707-723.
- Uen, S. T. J. L. *et al.* (2016) «Tumour-infiltrating lymphocytes and the emerging role of immunotherapy in breast cancer», *Current Topics In Breast Pathology*, 31(3), pp. 1-15.
- Usó, M. *et al.* (2016) «Analysis of the immune microenvironment in resected non-small cell lung cancer: the prognostic value of different T lymphocyte markers», *Oncotarget*, 7(33), p. e.1260214.
- Vandesompele, J. *et al.* (2002) «Accurate normalization of real-time quantitative RT -PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes», pp. 1-12.
- Vargas, F. A. *et al.* (2017) «Regulatory T Cells and Synergizes with PD-1 Blockade to Eradicate Established Tumors Report Fc-Optimized Anti-CD25 Depletes Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells and Synergizes with PD-1 Blockade to Eradicate Established Tumors», *Immunity*, 46, pp. 1-10.
- Verhaak, R. y Tamayo, P. (2013) «Prognostically relevant gene signatures of high-grade serous ovarian carcinoma», *The Journal of Clinical Investigation*, 123(1), pp. 1-9.
- Versluys, A. B. *et al.* (2012) «New England Journal», *Outcomes After Induction Failure Inchildhood Acute Lymphoblastic Leukemia*, 366(15), pp. 1371-1381.
- Vesely, M. D. *et al.* (2011) «Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer», *Annual Review of Immunology*, 29(1), pp. 235-271.
- Vignali, D. A. A. (2008) «How regulatory T cells work», *Nature Reviews Immunology*, 8(7), pp. 523-532.
- De Visser, K. E., Eichten, A. y Coussens, L. M. (2006) «Paradoxical roles of the immune system during cancer development», *Nature Reviews Cancer*, 6(1), pp. 24-37.
- Vivier, E. y Anfossi, N. (2004) «Inhibitory NK-cell receptors on T cells: Witness of the past, actors of the future», *Nature Reviews Immunology*, 4(3), pp. 190-198.
- Wang, H. B. *et al.* (2015) «Role of TGFB1 polymorphism in the development of metastatic brain tumors in non-small cell lung cancer patients», *Genetics and Molecular Research*, 14(2), pp. 3545-3550.

BIBLIOGRAFIA

- Webb, J. R. *et al.* (2014) «Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker cd103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer», *Clinical Cancer Research*, 20(2), pp. 434-444.
- Webb, J. R. *et al.* (2016) «PD-L1 expression is associated with tumor-infiltrating T cells and favorable prognosis in high-grade serous ovarian cancer», *Gynecologic Oncology*. Elsevier B.V., 141(2), pp. 293-302.
- Winerdal, M. E. *et al.* (2011) «FOXP3 and survival in urinary bladder cancer», *BJU International*, 108(10), pp. 1672-1678.
- Wu, J. *et al.* (2014) «Clinicopathological and prognostic significance of chemokine receptor CXCR4 overexpression in patients with esophageal cancer: A meta-analysis», *Tumor Biology*, 35(4), pp. 3709-3715.
- Xing, X. *et al.* (2018) «Analysis of PD1, PDL1, PDL2 expression and T cells infiltration in 1014 gastric cancer patients», *Oncolmmunology*, 7(3), pp. e1356144-7.
- Yang, J. Y. *et al.* (2010) «Activation of FOXO3a is sufficient to reverse mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase inhibitor chemoresistance in human cancer», *Cancer Research*, 70(11), pp. 4709-4718.
- Ye, S. K. y Agata, Y. (2001) «The IL-7 receptor controls the accessibility of the TCR γ locus by Stat5 and histone acetylation», *Immunity*, 15(5), pp. 813-823.
- Zhai, L. *et al.* (2018) «IDO1 in cancer: a Gemini of immune checkpoints», *Cellular and Molecular Immunology*. Nature Publishing Group, 15(5), pp. 447-457.
- Zhang, L. *et al.* (2003) «Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer», *New England Journal of Medicine*, 348(3), pp. 203-213. doi: 10.1056/NEJMoa020177.
- Zhang, L. y Conejo-Garcia, J. R. (2003) «Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer», *The new england journal of medicine*, 348, pp. 203-213.
- Zhang, S. *et al.* (2015) «Stroma-associated master regulators of molecular subtypes predict patient prognosis in ovarian cancer», *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 24(October), pp. 1-10.
- Zhang, Y. *et al.* (2016) «The clinical impact of ICOS signal in colorectal cancer patients»,

Oncolimmunology. Taylor & Francis, 5(5), pp. 1-9.

Zhao, X. *et al.* (2009) «Human epithelial ovarian carcinoma cell-derived cytokines cooperatively induce activated CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺naïve T cells to express forkhead box protein 3 and exhibit suppressive ability in vitro», *Cancer Science*, 100(11), pp. 2143-2151.

Zheng, Y. *et al.* (2007) «Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells», *Nature Medicine*, 445(February), pp. 1-5.

Zou, W. y Chen, L. (2008) «Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment», *Nature Reviews Immunology*, 8(6), pp. 467-477.

BIBLIOGRAFIA

VII. ANEXOS

1. Gráficas de Kaplan-Meier de la cohorte retrospectiva

Kaplan-Meier de supervivencia global (SG) de los análisis de expresión de (a) PD-L2, (b) TGFB1, (c) CD8, (d) CD25

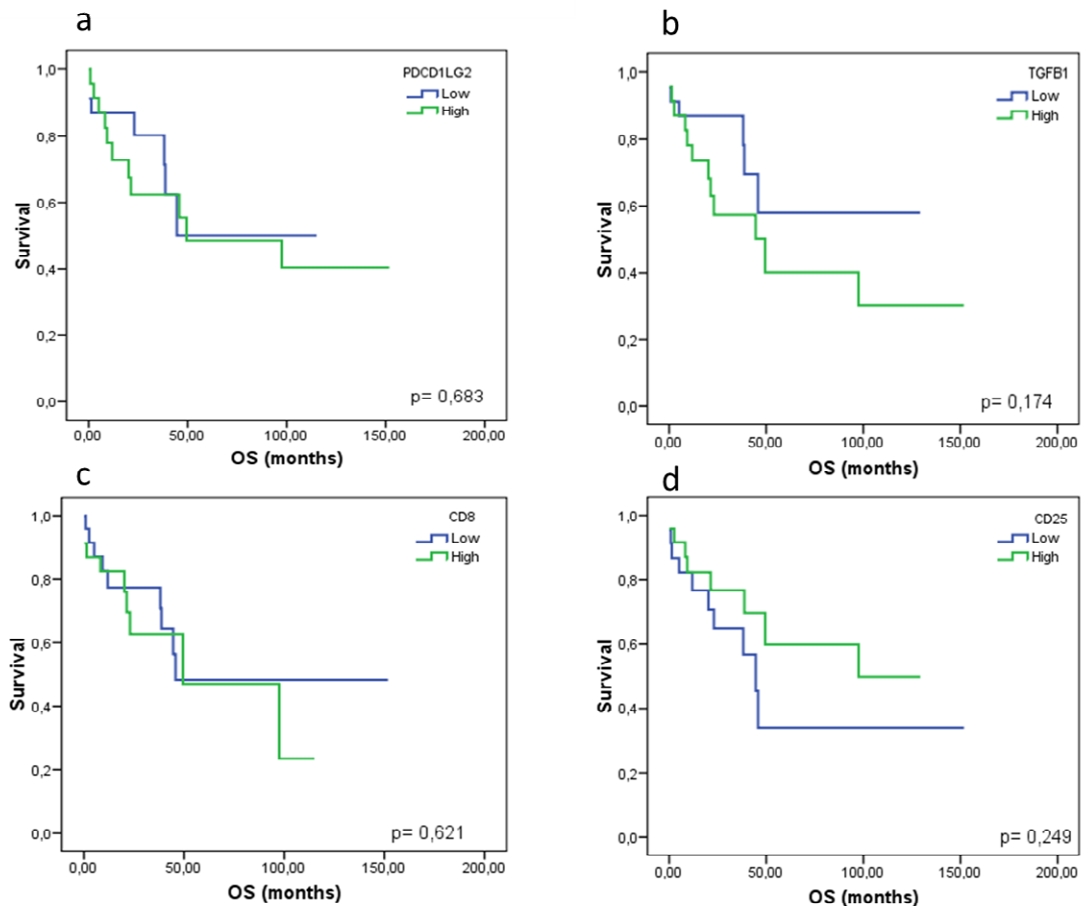


Figura 44. Kaplan-Meier para SG a) PDCD1LG2, b) TGFB1, c) CD8, d) CD25. Los niveles de expresión génica se dicotomizaron según sus medianas. La línea azul representa pacientes con bajos niveles de expresión, mientras que la línea verde representa pacientes con altos niveles de expresión. Los valores P se obtuvieron usando la prueba de Kaplan-Meier.

Kaplan-Meier de supervivencia global (SG) de los análisis de expresión de (e) IL-7, (f) CD4, (g) FOXP3, (h) PD-L1

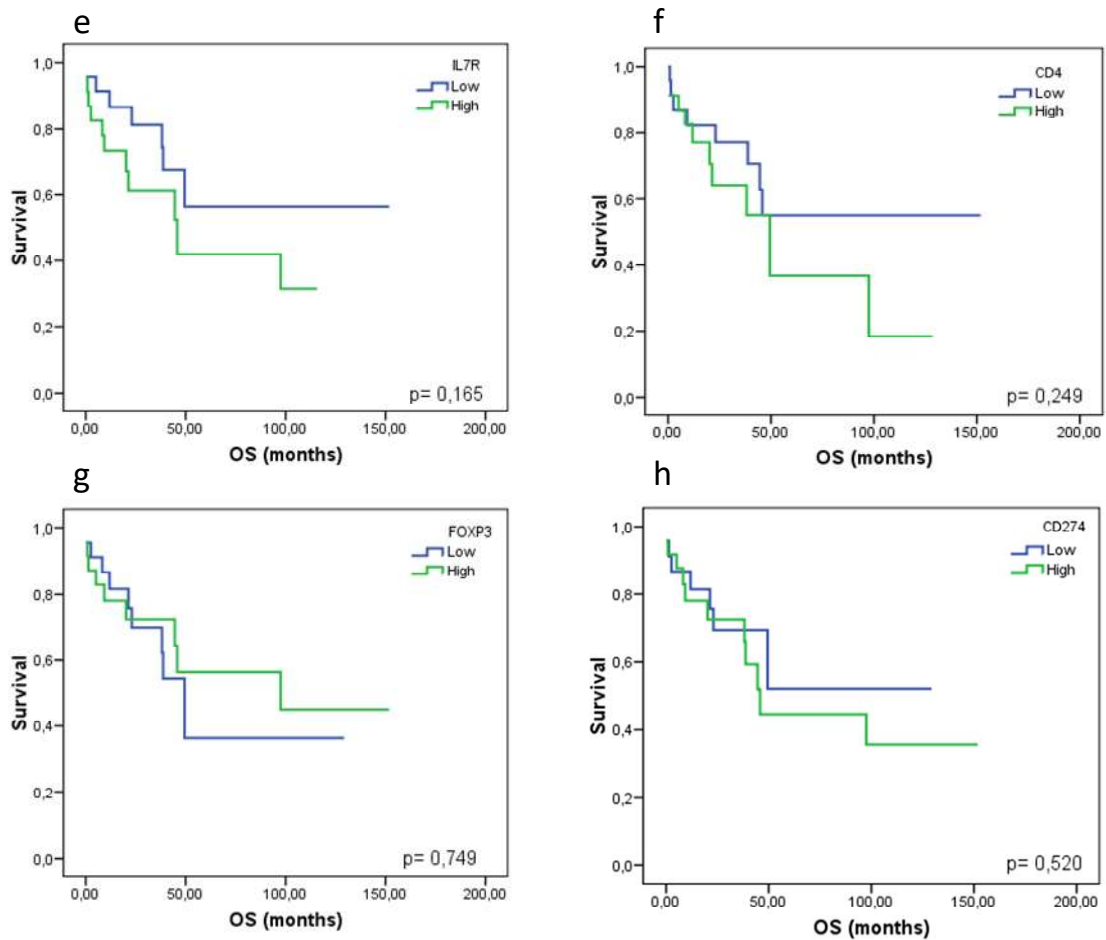


Figura 45. Kaplan-Meier para SG e) IL7R, f) CD4, g) FOXP3, h) CD274. Los niveles de expresión génica se dicotomizaron según sus medianas. La línea azul representa pacientes con bajos niveles de expresión, mientras que la línea verde representa pacientes con altos niveles de expresión. Los valores P se obtuvieron usando la prueba de Kaplan-Meier.

Kaplan-Meier de supervivencia global (SG) de los análisis de expresión de (i) Galectina-9, (j) ICOS, (k) CTLA4, (l) ICOSL

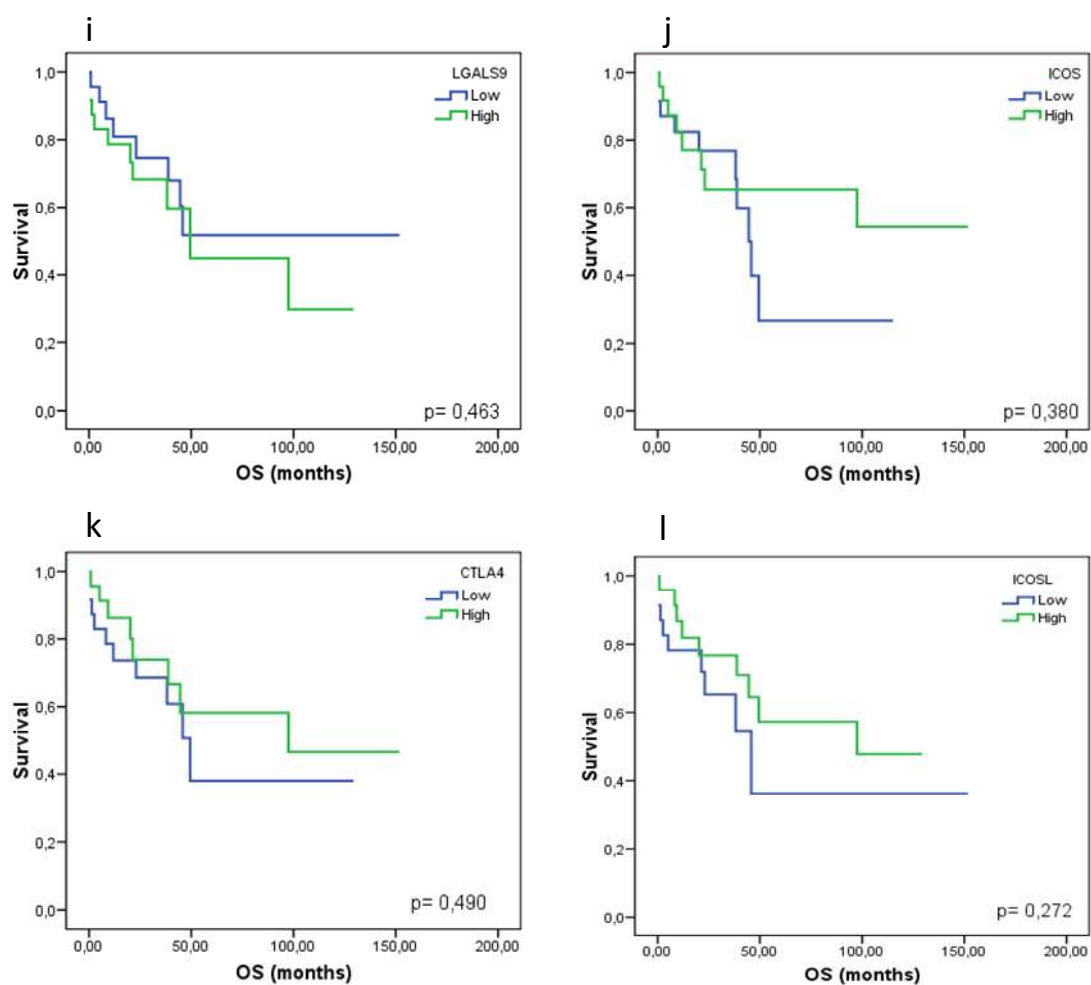


Figura 46. Kaplan-Meier para SG i) LGALS9, j) ICOS, k) CTLA4, l) ICOSL. Los niveles de expresión génica se dicotomizaron según sus medianas. La línea azul representa pacientes con bajos niveles de expresión, mientras que la línea verde representa pacientes con altos niveles de expresión. Los valores P se obtuvieron usando la prueba de Kaplan-Meier.

Kaplan-Meier de supervivencia global (SG) de los análisis de expresión de (m) CXCR4, (n) IDO1, (o) PD-1 y tiempo libre de progresión (TLP) (p) TNFRSF4

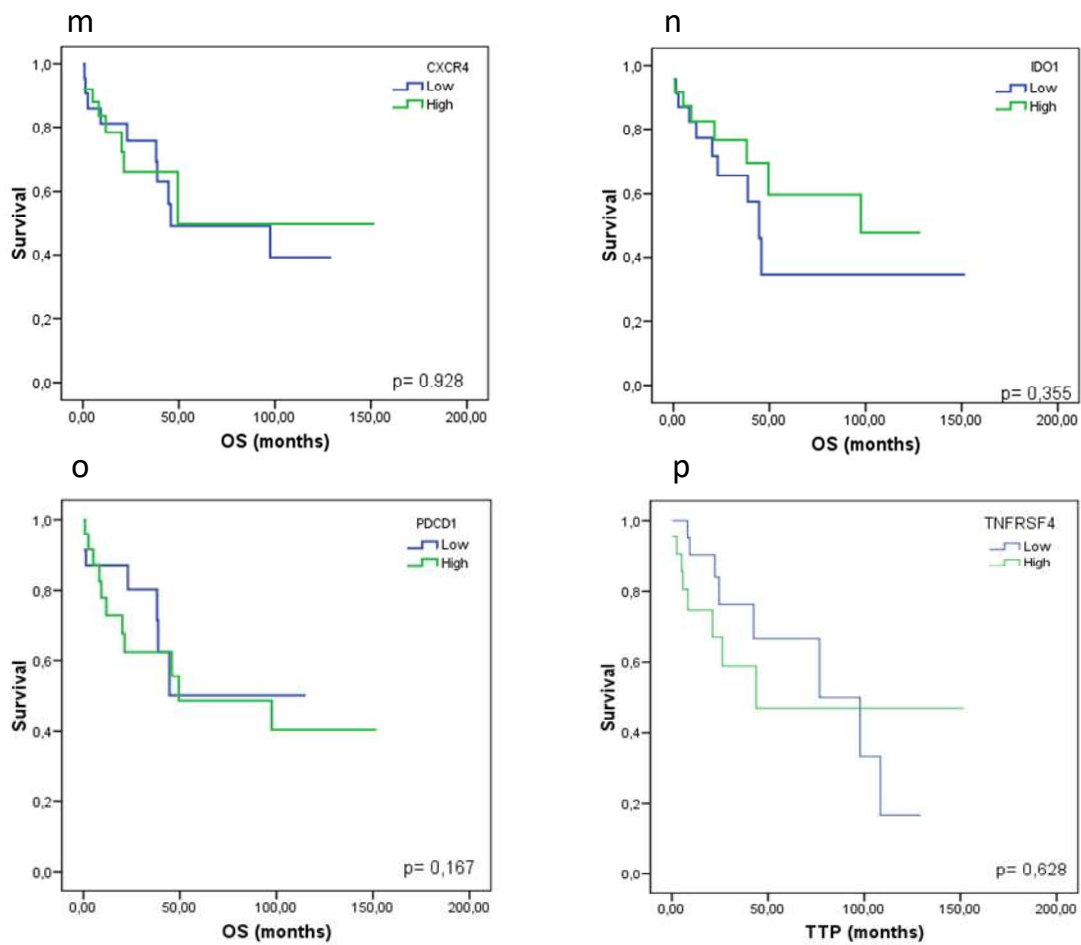


Figura 47. Kaplan-Meier para SG m) CXCR4, (n) IDO1, (o) PD-1 y TLP (p) TNFRSF4. Los niveles de expresión génica se dicotomizaron según sus medianas. La línea azul representa pacientes con bajos niveles de expresión, mientras que la línea verde representa pacientes con altos niveles de expresión. Los valores P se obtuvieron usando la prueba de Kaplan-Meier.

Kaplan-Meier de supervivencia global (SG) del análisis de expresión de (q) TNFRSF4, (r) Tiempo libre de progresión CD137.

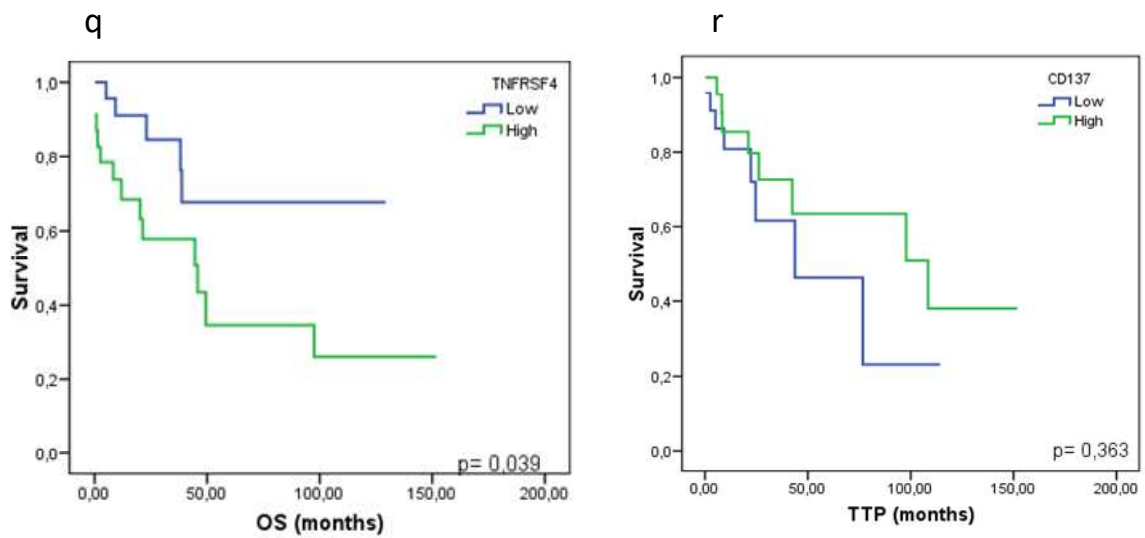


Figura 48. Kaplan-Meier para SG (q) TNFRSF4, (r) Tiempo libre de progresión CD137. Los niveles de expresión génica se dicotomizaron según sus medianas. La línea azul representa pacientes con bajos niveles de expresión, mientras que la línea verde representa pacientes con altos niveles de expresión. Los valores P se obtuvieron usando la prueba de Kaplan-Meier.

COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

❖ F. Herrera Cañizares, A. Herreros-Pomares, H. Amado Labrador, L. Valdivieso, C. Caballero, A. Chipirilu, S. Calabuig-Fariñas, E. Jantus-Lewintre, J. Gilabert, C. Camps. **“CARACTERIZACIÓN DEL MICROAMBIENTE TUMORAL EN CÁNCER DE OVARIO SEROSO DE ALTO GRADO: PATRÓN DE INFILTRACIÓN Y ANÁLISIS DE SU VALOR PRONÓSTICO”** SEOM 2017.

❖ F. Herrera Cañizares, A. Chipirliu, C. Caballero, A. Herreros-Pomares, S. Calabuig-Fariñas, L. Valdivieso⁵, M. Mosqueda, J. Marí Alexandre, E. Jantus-Lewintre, J. Gilabert, C. Camps **“Tumor microenvironment in high serous ovary cancer: characterization of the infiltration pattern and analysis of its prognostic value”** ESMO 2017.

❖. F. Herrera Cañizares, C. Caballero, A. Herreros-Pomares, A. Chipirliu, S. Calabuig-Fariñas, L. Valdivieso, E. Jantus-Lewintre, J. Gilabert, C. Camps **“Tumor microenvironment in high serous ovary cancer: characterization of the infiltration pattern and analysis of its prognostic value”** ASEICA 2017.

