

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Análisis de los polimorfismos del gen del factor de crecimiento vasculo endotelial (VEGF) y de la expresión del gen del factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) en el cáncer de ovario**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Blanca González Palomares**

DIRECTORES

**José Antonio Vidart Aragón**  
**María Luisa Maestro de las Casas**  
**Pluvio Coronado Martín**

Madrid, 2018

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Obstetricia y Ginecología**



**ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DEL FACTOR  
DE CRECIMIENTO VÁSCULO ENDOTELIAL (*VEGF*) Y DE LA  
EXPRESIÓN DEL GEN DEL FACTOR DERIVADO DEL  
EPITELIO PIGMENTARIO (*PEDF*) EN EL CÁNCER DE OVARIO**

**TESIS DOCTORAL**

**BLANCA GONZÁLEZ PALOMARES**

**DIRECTORES DE TESIS**

**JOSE ANTONIO VIDART ARAGÓN**

**MARIA LUISA MAESTRO DE LAS CASAS**

**PLUVIO CORONADO MARTÍN**

**MADRID, 2017**



UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

D. José Antonio Vidart Aragón, Profesor Emérito de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “**Análisis de los polimorfismos del gen del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) y de la expresión del gen del Factor Derivado del Epitelio Pigmentario (PEDF) en el cáncer de ovario**”, del que es autora D<sup>a</sup>. Blanca González Palomares, ha sido realizado bajo su dirección, y reúne las características necesarias para su presentación y defensa pública con el fin de optar al Grado de doctor.

Y para que conste, firma el presente certificado en Madrid, a 15 de Marzo de 2017.

Prof. José Antonio Vidart Aragón



UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

D<sup>a</sup>. María Luisa Maestro de las Casas

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado "**Análisis de los polimorfismos del gen del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) y de la expresión del gen del Factor Derivado del Epitelio Pigmentario (PEDF) en el cáncer de ovario**", del que es autora D<sup>a</sup>. Blanca González Palomares, ha sido realizado bajo su dirección, y reúne las características necesarias para su presentación y defensa pública con el fin de optar al Grado de doctor.

Y para que conste, firma el presente certificado en Madrid, a 15 de Marzo de 2017.

María Luisa Maestro de las Casas



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

D. Pluvio Coronado Martín, Facultativo Especialista en Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico San Carlos y Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado **“Análisis de los polimorfismos del gen del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) y de la expresión del gen del Factor Derivado del Epitelio Pigmentario (PEDF) en el cáncer de ovario”**, del que es autora D<sup>a</sup>. Blanca González Palomares, ha sido realizado bajo su dirección, y reúne las características necesarias para su presentación y defensa pública con el fin de optar al Grado de doctor.

Y para que conste, firma el presente certificado en Madrid, a 15 de Marzo de 2017.



Pluvio Coronado Martín

*A mis padres, mi ejemplo a seguir*

## **AGRADECIMIENTOS**

Llegó el momento que tantas veces he pensado; finalizar este proyecto de tesis doctoral y sentarme a escribir para dar las gracias a todas aquellas personas que me han ayudado en este camino.

En primer lugar al Profesor José Antonio Vidart Aragón, que confió en mí para otorgarme en mi segundo año de residencia, un estudio de cáncer de ovario, con una beca de la Fundación Mutua Madrileña. En ese momento, me llené de ilusión por colaborar en un proyecto de cuatro años y que ha sido, finalmente, mi tesis doctoral.

Al Dr. Pluvio Coronado Martín, codirector, no puedo dejar de agradecerle su ayuda, conocimiento científico, apoyo incondicional, y cada palabra de ánimo cuando más lo necesitaba. Gracias.

A la Dra. María Luisa Maestro de las Casas, codirectora de tesis, que siempre impulsó este proyecto y su gran ayuda desde la Unidad de Biología Molecular del Servicio de Análisis Clínicos.

A todos mis compañeros del Instituto de Salud de la Mujer José Botella Llusía, gracias por todo lo enseñado y por todo lo que me han aportado en este tiempo trabajando juntos. Gracias a mis residentes mayores y pequeños que además me ayudaron en la recogida de muestras de las pacientes del estudio.

Al Servicio de Análisis Clínicos, en especial a Silvia, Sara, Marta, Virginia y Beatriz, por su disposición, ayuda y animo constante.

Al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos, en especial a la Dra. Pelayo y al Dr. Pascual por su ayuda y conocimiento.

A la Unidad de Investigación Clínica y Estadística del Hospital Clínico San Carlos, en especial a Manuel Fuentes, un gran profesional que ya casi conoce tanto de estadística como de polimorfismos y haplotipos. Gracias por la paciencia, dedicación y ayuda constante.

No puedo dejar de agradecerle a mis tres amigas incondicionales que me llevo del Hospital, a Teresa, Lydia y Ana; porque sois el mejor regalo que me ha dado el Clínico, porque sin vosotras no hubiera sido lo mismo. Gracias por cada día juntas. Siempre os llevaré conmigo.

Y por último, dar las gracias a mis hermanas y a mis padres, porque me han transmitido la felicidad y la fuerza desde que era pequeña. Durante toda mi vida me han enseñado con ejemplo constante de esfuerzo y voluntad. Gracias por haber aguantado mis buenos y malos momentos durante la carrera; por apoyarme en todos los momentos cruciales de la residencia hasta que llegué a ser Ginecóloga, y gracias por seguir disfrutando de la vida todos juntos. Sé, que para ellos, es una gran satisfacción que sea médico y por fin ahora, Doctora.

Este trabajo se ha realizado gracias al Proyecto que la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Clínico San Carlos ha gestionado con la entidad financiera Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña con nombre ANALISIS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO VÁSCULO ENDOTELIAL (VEGF) Y DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DEL FACTOR DERIVADO DEL EPITELIO PIGMENTARIO (PEDF) EN EL CÁNCER DE OVARIO (AP103082012); con fecha de inicio el 02/07/2012 y fecha de fin el 01/07/2015 cuyo investigador principal ha sido Jose Antonio Vidart Aragón.

Madrid, 15 de marzo de 2017

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL  
CLÍNICO SAN CARLOS**  
Domicilio Social: C/ Profesor Martín Lagos - 28040 Madrid  
N.I.F. G88727115

D. Antonio Portolés Pérez, con D.N.I. 395789-M, en calidad de Director de la Fundación para la Investigación Biomédica, Órgano de Gestión del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, por la presente

**CERTIFICA**

que, Dña. **BLANCA GONZALEZ PALOMARES** con NIF 449685551, ha participado como **INVESTIGADOR-COLABORADOR** en el Proyecto que la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Clínico San Carlos ha gestionado y que a continuación se indica:

Proyecto:	AP103082012 ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO VÁSULO-ENDOTELIAL (VEGF) Y DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DEL FACTOR DERIVADO DEL EPITELIO PIGMENTARIO (PEDF) EN EL CÁNCER DE OVARIO.	
Fecha de inicio:	02/07/2012	Fecha de fin: 01/07/2015
Entidad Financiadora	FUNDACION DE INVESTIGACIÓN MEDICA MUTUA MADRILEÑA	
Investigador Principal	VIDART ARAGÓN, JOSÉ ANTONIO	

# ÍNDICE

**INDICE**

<b>I.</b>	<b>RESUMEN.....</b>	13
	<b>SUMMARY.....</b>	21
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	28
	II A. Epidemiología y factores de riesgo.....	29
	II B. Anatomía patológica del cáncer epitelial de ovario.....	39
	II B 1. Tumores serosos.....	42
	II B 2. Tumores mucinosos.....	42
	II B 3. Tumores endometrioides.....	43
	II B 4. Tumores de células claras.....	44
	II B 5. Tumores de Brenner.....	44
	II B 6. Tumores seromucinosos.....	45
	II B 7. Carcinoma indiferenciado.....	45
	II C. Factores pronóstico en el cáncer de ovario.....	46
	II D. Angiogénesis.....	51
	II E. Antiangiogénesis.....	58
<b>III.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	63
<b>IV.</b>	<b>PACIENTES Y MÉTODO.....</b>	66
	IV A. Metodología clínica.....	68
	IV A 1. Etapa preoperatoria.....	68

IV A 2. Etapa operatoria.....	69
IV A 3. Etapa post-operatoria.....	70
IV B. Metodología analítica.....	71
IV B 1. Análisis de los niveles de la proteína VEGF en suero.....	71
IV B 2. Extracción y cuantificación del ácido desoxirribonucleico	74
IV B 3. Estudio de los polimorfismos del gen <i>VEGF</i> .....	75
IV B 4. Extracción y cuantificación del ácido ribonucleico.....	86
IV B 5. Análisis de la expresión del gen <i>PEDF</i> .....	87
IV C. Metodología estadística.....	92
<b>V. RESULTADOS</b> .....	<b>95</b>
V A. Análisis descriptivo de la población estudiada.....	95
V B. Estudio de los polimorfismos del gen <i>VEGF</i> .....	102
V C. Estudio de los niveles de VEGF en suero.....	113
V D. Asociación de genotipos y VEGF en suero.....	117
V E. Estudio de haplotipos.....	120
V F. Estudio de <i>PEDF</i> .....	122
V G. Asociación de genotipos y expresión de <i>PEDF</i> .....	127
V H. Análisis de supervivencia.....	130

<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	143
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	160
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	162
- Documento de Consentimiento Informado.....	163
- Informe de Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos.....	164
- Publicación aceptada “ <i>VEGF</i> polymorphisms and serum VEGF levels in women with epithelial ovarian cancer, benign tumors and healthy ovaries” en International Journal of Gynecological Cancer (Marzo 2017).....	165
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	167

**INDICE DE TABLAS**

- Tabla 1. Estimación de incidencia de cáncer en España en 2012 y predicción para 2020.
- Tabla 2. Estimación de la incidencia de cáncer en España, mujeres, 2014 (REDECAN).
- Tabla 3. Miembros de la familia VEGF, receptores y principales funciones.
- Tabla 4. Secuencias de cebadores y sondas del polimorfismo -2578 C/A.
- Tabla 5. Secuencias de cebadores y sondas del polimorfismo -1154 G/A.
- Tabla 6. Secuencias de cebadores y sondas del polimorfismo +936 C/T.
- Tabla 7. Secuencias de cebadores y sondas del polimorfismo -460 C/T.
- Tabla 8. Secuencias de cebadores y sondas del polimorfismo -405 C/G.
- Tabla 9. Secuencias de cebadores para el gen a estudiar *PEDF*.
- Tabla 10. Secuencias de cebadores para el gen de referencia *GAPDH*.
- Tabla 11. Estudio descriptivo de pacientes con cáncer de ovario (n=46).
- Tabla 12. Estudio anatómo-patológico de los tumores benignos de ovario (n=31).
- Tabla 13. Análisis de los cinco polimorfismos del gen *VEGF* en los tres grupos de estudio.
- Tabla 14. Relación entre *VEGF* -2578 C/A WT vs No WT y las principales variables de estudio en pacientes con cáncer de ovario.
- Tabla 15. Relación entre *VEGF* -1154 G/A WT vs No WT y las principales variables de estudio en pacientes con cáncer de ovario.
- Tabla 16. Relación entre *VEGF* -460 C/T WT vs No WT y las principales variables de estudio en pacientes con cáncer de ovario.
- Tabla 17. Relación entre *VEGF* +405 C/G WT vs No WT y las principales variables de estudio en pacientes con cáncer de ovario.

- Tabla 18. Relación entre *VEGF* +936 C/T WT vs No WT y las principales variables de estudio en pacientes con cáncer de ovario.
- Tabla 19. Relación de los niveles de *VEGF* en suero con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer de ovario.
- Tabla 20. Relación entre los niveles de *VEGF* en suero de pacientes con cáncer de ovario y los alelos de cada polimorfismo del gen *VEGF*.
- Tabla 21. Relación entre los niveles de *VEGF* en suero de mujeres con tejido ovárico sano y los alelos de cada polimorfismo del gen *VEGF*.
- Tabla 22. Estudio comparativo de haplotipos en las tres poblaciones de estudio.
- Tabla 23. Relación de la expresión de *PEDF* con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer de ovario.
- Tabla 24. Relación entre la expresión de *PEDF* en pacientes con cáncer de ovario y los alelos de cada polimorfismo del gen *VEGF*.
- Tabla 25. Relación entre la expresión de *PEDF* en mujeres con tejido ovárico sano y los alelos de cada polimorfismo del gen *VEGF*.
- Tabla 26. Análisis de supervivencia global en pacientes con cáncer de ovario.
- Tabla 27. Características clínico-patológicas y supervivencia global.
- Tabla 28. Genotipos del gen *VEGF* y supervivencia global.
- Tabla 29. Relación de haplotipos y supervivencia global en pacientes con cáncer de ovario.
- Tabla 30. Análisis de supervivencia y niveles de *VEGF* en suero.
- Tabla 31. Análisis de supervivencia y expresión de *PEDF*.

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Incidencia de tumores en España en el año 2012. Datos proporcionados por EUCAN.*
- Figura 2. Prevalencia de tumores en España en mujeres en 2012.*
- Figura 3. Mortalidad estimada en mujeres en 2012.*
- Figura 4. Clasificación de tumores de Órganos Reproductivos Femeninos de la Organización Mundial de Salud (WHO) 2014.*
- Figura 5. Carcinoma seroso de ovario.*
- Figura 6. Carcinoma mucinoso de ovario.*
- Figura 7. Carcinoma endometrioides de ovario.*
- Figura 8. Carcinoma tipo células claras.*
- Figura 9. Tumor de Brenner.*
- Figura 10. Carcinoma seromucinoso de ovario.*
- Figura 11. Carcinoma indiferenciado de ovario.*
- Figura 12. Clasificación TNM y FIGO de tumores de Órganos Reproductivos Femeninos de la Organización Mundial de Salud (WHO) 2014.*
- Figura 13. Esquema de la familia VEGF y sus receptores.*
- Figura 14. Efectos de PEDF: directos e indirectos. (-) PEDF como ausencia de PEDF, (+) PEDF como presencia de PEDF; flecha indica activación, (--) indica inhibición.*
- Figura 15. Esquema de las uniones antígeno-anticuerpo y del marcaje con HRP del ELISA tipo sándwich utilizado para la valoración de los niveles séricos de VEGF.*

- Figura 16. *Esquema de de los cambios colorimétricos generados por la acción de la enzima HPR (paso 5) y por el ácido sulfúrico (paso 6).*
- Figura 17. *Esquema del funcionamiento de las sondas tipo TaqMan.*
- Figura 18. *Esquema de interpretación de la amplificación de un SNP en función de la señal de fluorescencia del fluoróforo FAM (A) o del fluoróforo TET (B).*
- Figura 19. *Ejemplo de los resultados mostrados por el termociclador a tiempo real Smart Cycler® para la interpretación de los SNP.*
- Figura 20. *Gel de agarosa al 3,5% de los productos de digestión enzimática de los amplificados del SNP VEGF -460 C/T.*
- Figura 21. *Gel de agarosa al 3,5% de los productos de digestión enzimática de los amplificados del SNP VEGF +405 C/G.*
- Figura 22. *Esquema de retrotranscripción y amplificación con marcaje fluorescente SYBR Green.*
- Figura 23. *Población de estudio: pacientes con cáncer de ovario, quimioterapia neoadyuvante, tumores benignos de ovario y tejido ovárico sano.*
- Figura 24. *Asociaciones de polimorfismos en pacientes con cáncer de ovario.*
- Figura 25. *Asociaciones de polimorfismos en pacientes con tumores benignos de ovario.*
- Figura 26. *Asociaciones de polimorfismos en mujeres con tejido ovárico sano.*
- Figura 27. *Mediana de los niveles de VEGF en suero en pacientes con cáncer de ovario vs mujeres con tejido ovárico sano.*
- Figura 28. *Asociación de genotipos y niveles de VEGF en el suero de pacientes con cáncer de ovario.*
- Figura 29. *Asociación de genotipos y niveles de VEGF en el suero de mujeres con tejido ovárico sano.*

- Figura 30. Mediana de la expresión de PEDF en pacientes con cáncer de ovario vs mujeres con tejido ovárico sano.*
- Figura 31. Genotipos y expresión de PEDF en pacientes con cáncer de ovario.*
- Figura 32. Genotipos y expresión de PEDF en mujeres con tejido ovárico sano.*
- Figura 33. Análisis de supervivencia global en pacientes con cáncer de ovario.*
- Figura 34. Análisis de tiempo libre de enfermedad en pacientes con cáncer de ovario.*
- Figura 35. Gráfica Kaplan- Meier: asociación de -2578 C/A y TLE ( $p=0,207$ ).*
- Figura 36. Gráfica Kaplan- Meier: asociación de -1154 G/A y TLE ( $p=0,271$ ).*
- Figura 37. Gráfica Kaplan- Meier: asociación de -460 C/T y TLE ( $p=0,210$ ).*
- Figura 38. Gráfica Kaplan- Meier: asociación de -405 C/G y TLE ( $p=0,333$ ).*
- Figura 39. Gráfica Kaplan- Meier: asociación de +936 C/T y TLE ( $p=0,204$ ).*
- Figura 40. Haplotipo CACGC y supervivencia global.*
- Figura 41. Curva ROC para calcular la relación de la expresión de PEDF y la supervivencia libre de enfermedad.*

**INDICE DE ABREVIATURAS**

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>BAX</b>	Factor implicado en apoptosis
<b>Bcl2</b>	Factor implicado en apoptosis
<b>BsaH1</b>	Enzima de restricción
<b>BsmF1</b>	Enzima de restricción
<b>BRCA</b>	Gen implicado en síndrome hereditario de cáncer de mama y ovario
<b>CA 125</b>	Marcador tumoral
<b>CA 19.9</b>	Marcador tumoral
<b>CDC25</b>	Factor implicado en ciclo celular
<b>CDK4</b>	Factor implicado en ciclo celular
<b>CEA</b>	Antígeno carcinoembrionario
<b>CCR</b>	Cáncer colorrectal
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>EE</b>	Error estándar
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
<b>EOC</b>	Epithelial ovarian cancer
<b>FAM</b>	Fluoróforo
<b>FDA</b>	Agencia de Alimentos y Medicamentos. Food and Drug Administration
<b>FGF</b>	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
<b>FIGO</b>	International Federation of Gynecology and Obstetrics
<b>GADPH</b>	Gen de referencia
<b>GLOBOCAN</b>	Previsiones demográficas proporcionadas por las Naciones Unidas

---

<b>HNPCC</b>	Cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis
<b>HPR</b>	Peroxidasa de rábano
<b>HR</b>	Hazard ratio
<b>HTR</b>	Transcriptasa inversa
<b>HWE</b>	Equilibrio Hardy-Weinberg
<b>H2O2</b>	Peróxido de hidrógeno
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>IL-18</b>	Interleucina 18
<b>INE</b>	Instituto Nacional de Estadística
<b>LPA</b>	Vía de ácido lisofosfatídico
<b>MLH</b>	Gen implicado en síndrome de Lynch
<b>MMP2</b>	Metaloproteasa
<b>MSH</b>	Gen implicado en síndrome de Lynch
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>No WT</b>	No Wild Type
<b>Nrp-1</b>	Neuropilina 1
<b>Nrp-2</b>	Neuropilina 2
<b>OMS</b>	Organización Mundial de Salud
<b>PEDF</b>	Factor Derivado del Epitelio Pigmentario
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PCR-RFLP</b>	PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>PDGF</b>	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
<b>PGI2</b>	Prostaciclina
<b>PIGF</b>	Factor de Crecimiento Placentario
<b>PMS1</b>	Gen implicado en síndrome de Lynch
<b>PTEN</b>	Gen implicado en síndrome de hamartoma tumoral

<b>p16</b>	Factor implicado en ciclo celular
<b>p27/Kip1</b>	Factor implicado en ciclo celular
<b>p53</b>	Gen supresor tumoral. Factor implicado en apoptosis
<b>RECIST</b>	Response Evaluation Criteria in Solid Tumor
<b>REDECAN</b>	Red Española de Registros de Cáncer
<b>REST</b>	Relative expression software tool
<b>RIC</b>	Rango intercuartílico
<b>SEGO</b>	Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia
<b>SLE</b>	Supervivencia libre de enfermedad
<b>SNP</b>	Polimorfismos de un único nucleótido
<b>STK11</b>	Gen implicado en síndrome de Peutz-Jeghers
<b>TET</b>	Fluoróforo
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Crecimiento Transformante alfa
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de Crecimiento Transformante beta
<b>TGFBR2</b>	Gen implicado en síndrome de Lynch
<b>TLE</b>	Tiempo libre de enfermedad
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral alfa
<b>TNM</b>	Estadificación del cáncer
<b>TSH</b>	Tirotropina
<b>TSP-1</b>	Trombospondina 1
<b>UTR</b>	Región no traducida
<b>VEGF</b>	Factor de Crecimiento Vásculo endotelial
<b>VEGFR</b>	Receptor de VEGF
<b>WT</b>	Wild Type

# **RESUMEN**

## I RESUMEN

### Introducción

El cáncer de ovario es la principal causa de muerte entre los tumores ginecológicos del tracto genital, y es el quinto cáncer más frecuente en la mujer en España<sup>1</sup>. Es el cáncer ginecológico más agresivo; su alta mortalidad se debe a la dificultad del diagnóstico precoz y a su sintomatología inespecífica.

La angiogénesis juega un rol fundamental en la patogénesis del cáncer, invasión tumoral y desarrollo de metástasis<sup>3</sup>. Es un proceso complejo en el que están implicados factores angiogénicos como el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (*VEGF*) y factores antiangiogénicos como el Factor Derivado del Epitelio Pigmentario (*PEDF*). La implicación de estos genes en el cáncer de ovario hace que sea un objetivo terapéutico muy atractivo.

### Objetivos

Analizar cinco polimorfismos (SNPs) del gen *VEGF* en pacientes con cáncer epitelial de ovario, en comparación con pacientes con patología benigna de ovario y tejido ovárico sano. Estudiar los niveles de la proteína VEGF en suero de las pacientes con carcinoma de ovario y determinar la expresión del gen *PEDF*, y evaluar su correlación con las variables clínico-patológicas y su balance con la supervivencia libre de enfermedad (SLE).

### **Pacientes y métodos**

Este estudio se ha realizado en el Hospital Clínico San Carlos durante los años 2012-2016. Se estudiaron cinco polimorfismos del gen *VEGF* (-2578 C/A, -1154 G/A, -460 C/T, +405 C/G y +936 C/T) mediante cuantificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) en muestras sanguíneas de 46 mujeres con cáncer epitelial de ovario (17 de ellas tratadas con quimioterapia neoadyuvante), 31 mujeres con tumores benignos de ovario y 36 mujeres con tejido ovárico sano. Los genotipos se evaluaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se analizaron dichos SNPs según si fueron Wild Type (WT) o no Wild Type (No WT), y su relación con las principales características clínico-patológicas (edad, estadio, estudio histológico, enfermedad residual, recidiva y muerte).

La determinación de la proteína VEGF se realizó en el suero de pacientes con cáncer y en mujeres con tejido ovárico sano mediante la técnica de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Para el análisis de la expresión génica de *PEDF* se realizó extracción y cuantificación del ácido ribonucleico (ARN) de muestras de carcinoma y de tejido ovárico sano.

### **Resultados**

La distribución de los genotipos de *VEGF* fue diferente en los tres grupos de estudio sin objetivar diferencias estadísticamente significativas. En el estudio de cada genotipo por alelos en las pacientes con cáncer, se observó menor probabilidad de muerte en las pacientes WT frente no WT en el caso del polimorfismo -2578 C/A ( $p=0,064$ ) y -1154 G/A ( $p=0,051$ ); y menor enfermedad residual en pacientes con

polimorfismo -1154 G/A WT respecto a no WT ( $p=0,009$ ); al contrario que -460 C/T WT que presentaron mayor enfermedad residual post-cirugía ( $p=0,001$ ).

En cuanto al estudio de los niveles de VEGF en suero, se objetivaron mayores niveles en mujeres con tejido ovárico sano en comparación con las pacientes con cáncer, sin significación estadística. Se relacionó con las características clínico-patológicas destacando mayores niveles en pacientes con cáncer de ovario de tipo células claras comparado con tipo seroso, mucinoso y endometrioides ( $p=0,02$ ,  $p=0,05$  y  $p=0,02$  respectivamente). Se observaron mayores niveles de VEGF en pacientes menores de 50 años, estadio III, enfermedad bilateral, enfermedad metastásica o con ganglios positivos, sin significación estadística.

No se observó asociación entre los niveles de VEGF en el suero de las pacientes con cáncer y los cinco polimorfismos del gen *VEGF*; así como tampoco en las mujeres con tejido ovárico sano. En el subanálisis por alelos, no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en las mujeres con cáncer; mientras que en el grupo de mujeres con tejido ovárico sano se observó que en el caso del SNP -2578 C/A, el no presentar el alelo A conllevaba mayor nivel de VEGF en suero, frente a presentar dicho alelo ( $p=0,058$ ) al igual que en los casos del polimorfismo -460 C/T no presentando el alelo C ( $p=0,058$ ).

Se estudiaron doce haplotipos para evaluar el efecto combinado de los cinco polimorfismos del gen *VEGF*. Se observó que presentar el haplotipo CACGC tenía peor supervivencia global comparado a no presentar dicha combinación: HR 2,95 (IC 1,13-7,66,  $p=0,026$ ). El estudio comparativo en los tres grupos de estudio no mostró diferencias estadísticamente significativas.

Se analizó el factor derivado del epitelio pigmentario (*PEDF*) como proteína antiangiogénica y se observó menor expresión de *PEDF* en las mujeres con cáncer epitelial de ovario en comparación con las mujeres con tejido ovárico sano ( $p < 0,001$ ). Se relacionó con las principales características clínico-patológicas objetivando menor expresión de *PEDF* en las pacientes con cáncer y ganglios positivos ( $p = 0,05$ ); y en tumores tipo células claras, comparado con tumor mucinoso y tumor endometriode sin significación estadística ( $p = 0,65$  y  $p = 0,15$  respectivamente). No se observó correlación entre la expresión de *PEDF* y los cinco polimorfismos del gen *VEGF*. En el análisis por alelos, no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas.

En el análisis de supervivencia, se objetivó peor pronóstico en las pacientes sintomáticas en el momento del diagnóstico ( $p = 0,013$ ); enfermedad metastásica ( $p = 0,049$ ); pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante ( $p = 0,001$ ) y pacientes con estadios III-IV ( $p = 0,028$ ). No se observaron asociaciones entre los polimorfismos del gen *VEGF* y la supervivencia libre de enfermedad, pero si se objetivó que los polimorfismos -2578 C/A y -1154 G/A heterocigotos presentaban peor supervivencia global ( $p = 0,032$  y  $p = 0,011$  respectivamente).

### **Discusión**

La relación entre el gen *VEGF* y el cáncer de ovario ha sido publicada en numerosos trabajos. La distribución de los polimorfismos objetivada en las pacientes con cáncer de ovario fue similar a la descrita por Steffensen et al<sup>75</sup>, aunque en nuestro caso pudimos analizar cada polimorfismo en tres grupos de estudio. Zhang et al<sup>101</sup> asociaron el SNP +936 C/C al cáncer de ovario mientras que no encontraron relación

con los SNPs -2578 C/A o -460 T/C. En nuestro estudio se objetivaron asociaciones estadísticamente significativas entre polimorfismos en los tres grupos de estudio.

Se han relacionado niveles altos de la proteína VEGF en las pacientes con cáncer, estadio avanzado de la enfermedad y peor pronóstico<sup>69,70,71</sup>. En nuestro estudio se observaron niveles mayores de VEGF, no estadísticamente significativo, en mujeres con tejido ovárico sano en comparación con mujeres con cáncer; pero este resultado podría no ser concluyente hasta ser confirmado con una muestra mayor de pacientes. Li et al<sup>64</sup> objetivaron niveles mayores de VEGF en suero de pacientes con tumores malignos de ovario, en comparación con tumores benignos y mujeres sanas; detallando mayores niveles de VEGF en el momento previo a la cirugía en estadios III-IV y en ascitis; sin encontrar diferencias en los niveles de VEGF según el estudio anatómo-patológico del cáncer. En nuestro estudio, se observó mayor nivel de VEGF en el suero de las pacientes con cáncer de ovario de tipo células claras comparado con tumores malignos de tipo seroso, mucinoso y de tipo endometrioides ( $p=0,02$ ,  $p=0,05$  y  $p=0,02$  respectivamente). Estos resultados podrían apoyar el conocido peor pronóstico de los tumores de células claras. Wong et al<sup>108,109</sup> describieron en dos estudios, diferente expresión de VEGF según los tipos histológicos y objetivaron mayores niveles en los tumores serosos, tanto malignos como benignos. La diferencia con respecto a nuestros resultados podría explicarse ya que en su muestra solo incluyeron dos pacientes con cáncer de tipo células claras.

No se objetivó asociación entre los niveles de VEGF en suero de las pacientes con cáncer y los SNPs del gen *VEGF*; ni en el grupo de mujeres con tejido ovárico sano. En el subanálisis por alelos no se observaron diferencias estadísticamente significativas mientras que otros autores han descrito mayor nivel de VEGF si 2578C, 460T y 405C<sup>75</sup>.

Renner et al<sup>58</sup> describieron menores niveles en el suero de las pacientes con 936T, coincidiendo con nuestra muestra sin lograr significación estadística en nuestro caso.

El haplotipo que se relacionó con peor supervivencia en nuestro estudio fue CACGC, mientras que otros autores<sup>75</sup> describieron tendencia para mejor supervivencia libre de enfermedad con la presencia del haplotipo AGCGC.

El Factor Derivado del Epitelio Pigmentario es un factor antiangiogénico con potentes acciones en las células tumorales. En nuestro estudio se observó menor expresión de *PEDF*, estadísticamente significativo, en las mujeres con cáncer epitelial de ovario comparado con las mujeres con tejido ovárico sano. Estos resultados apoyan la teoría de que *PEDF* presenta la capacidad de inducir apoptosis en el tumor y en células endoteliales, siendo un potente factor antitumoral. No se objetivó relación significativa con las principales características clínico-patológicas estudiadas ni con los cinco polimorfismos del gen *VEGF*.

No se objetivaron asociaciones entre los polimorfismos del gen *VEGF* y la SLE; pero los SNPs -2578 C/A y -1154 G/A en su variedad heterocigota presentaron peor supervivencia global de manera estadísticamente significativa ( $p=0,032$  y  $p=0,011$  respectivamente). Smerdel et al<sup>116</sup> describieron mejor supervivencia global en presencia de los polimorfismos heterocigotos -460 T/C y +405 G/C mientras que otros autores como Camerin et al<sup>119</sup> asociaron -2578 C/C con menor supervivencia libre de enfermedad planteando este polimorfismo como posible factor pronóstico en el cáncer de ovario.

Existen pocas publicaciones sobre *PEDF* y la supervivencia en pacientes con cáncer de ovario. En nuestro estudio, no se objetivó asociación estadísticamente

significativa entre la expresión de *PEDF* y la supervivencia libre de enfermedad. Sin embargo, utilizando un punto de corte 0,195 se observó una tendencia no significativa hacia una mejor supervivencia.

Otros autores<sup>93</sup> han descrito menor expresión de este factor antiangiogénico en pacientes con cáncer de ovario con niveles no elevados de VEGF, concluyendo que la reducción de expresión de *PEDF* podría ser la responsable de la agresividad en dichos tumores de ovario. Sería interesante realizar más estudios sobre la implicación de la reducción de expresión de *PEDF* en las pacientes con cáncer de ovario y la supervivencia libre de enfermedad para poder considerarlo en un futuro como nuevo factor pronóstico en este tipo de tumores.

### **Conclusiones**

El análisis comparativo de los polimorfismos del gen *VEGF* no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de estudio. Los niveles de la proteína VEGF fueron menores en mujeres con cáncer en comparación con mujeres con tejido ovárico sano, sin alcanzar significación estadística. No se observó relación entre los SNPs del gen *VEGF* y los niveles de VEGF en suero en pacientes con cáncer. Se objetivaron niveles mayores de VEGF en pacientes con cáncer de ovario tipo células claras en comparación con otros tipos histológicos. Se observó una expresión de *PEDF* significativamente menor en las pacientes con cáncer de ovario en comparación con mujeres con tejido ovárico sano. No se objetivó asociación estadísticamente significativa entre la SLE y los polimorfismos del gen *VEGF* así como tampoco de la expresión de *PEDF*, mientras que los SNPs -2578 C/A y -1154 G/A heterocigotos presentaron significativamente peor supervivencia global en pacientes con cáncer.

# **SUMMARY**

### **Introduction**

Ovarian cancer is the leading cause of gynecologic cancer death and it is the fifth most common malignancy in women in Spain<sup>1</sup>. It is the most aggressive gynecological cancer. The initial symptoms are nonspecific, that is the reason why the majority of women have been diagnosed in advanced-stage of disease. Epithelial ovarian cancer (EOC) is the most common type of malignances arising from the ovaries.

Angiogenesis plays a fundamental role in the development of solid tumors, invasion and metastasis<sup>3</sup>. It is a process that involves angiogenic factors like Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and anti angiogenic factors like Pigment Epithelium-derived Factor (PEDF). The disruption of the delicate balance of pro- and anti- angiogenic factors, results in the creation and maintenance of a growing vascular network; with special interest in metastasis and possible therapeutic strategies targeting these signal transduction pathways.

### **Objectives**

This study analyzed the relation of five single nucleotide polymorphisms (SNPs) -2578 C/A, -1154 G/A, -460 C/T, +405 C/G and +936 C/T in the *VEGF* gene in patients with EOC, compared to patients carrying benign tumors or healthy ovaries. Serum VEGF levels were studied and also *PEDF* gene, and their relation with the main clinicopathological variables and progression-free survival (PFS) in patients with cancer.

### **Methods**

This study was performed in Hospital Clínico San Carlos (Madrid, Spain), from 2012 to 2016, and included 113 women (46 EOC, 17 treated with neoadjuvant chemotherapy; 31 women carrying benign tumors and 36 healthy women). The genotyping of *VEGF* gene polymorphisms (-2578 C/A, -1154 G/A, -460 C/T, +405 C/G and +936 C/T) was performed in DNA isolated from blood samples. The different genotypes were evaluated by quantitative real time polymerase chain reaction. VEGF protein concentration was assessed in serum using solid-phase sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *PEDF* gene was performed in RNA isolated from carcinoma sample and healthy ovaries.

### **Results**

Genotyping for the five SNPs were obtained for all patients; it was different in the comparative analysis of the three study groups. Wild Type (WT) or not Wild Type (No WT) were studied, and their relation with the main clinicopathological variables (age, stage of tumor, histological study, residual disease, relapse and death) in women with EOC. Lower death rate was found in patients with SNPs WT -2578 C/A ( $p=0,064$ ) and - 1154 G/A ( $p=0,051$ ); lower residual disease in patients with SNP -1154 G/A WT vs No WT ( $p=0,009$ ), and higher residual disease in women with SNP -460 C/T WT ( $p=0,001$ ).

VEGF serum levels were analyzed; higher levels were found in healthy women compared to EOC patients (without reaching statistical significance). Higher levels were observed in patients with clear cell carcinoma compared to serous ( $p=0,02$ ), mucinous

( $p=0,05$ ) or endometrioid tumors ( $p=0,02$ ); as well as in women under 50 years, stage III of tumor, bilateral disease, metastatic disease or positive lymph nodes (without statistical significance).

No clear association was observed between *VEGF* SNPs and VEGF serum levels in EOC patients or healthy women. In allele analysis, no statistically significant differences were observed in EOC patients, while in healthy women -2578A and -460 no C, higher VEGF levels were found ( $p=0,058$  in both).

Twelve haplotypes were studied in order to analyze the combined impact of the five polymorphisms of the *VEGF* gene. Worse overall survival was observed in women with haplotype CACGC HR 2,95 (IC 1,13-7,66,  $p$  0,026). The comparative analysis in the three groups of study did not show statistically significant differences.

*PEDF* was analyzed as a potent antiangiogenesis agent. Lower *PEDF* expression was observed in EOC patients in comparison to healthy women ( $p<0,001$ ). *PEDF* expression and the relation with the classical clinicopathological variables was analyzed; lower expression was observed in EOC patients with positive lymph nodes ( $p=0,05$ ), and in clear cell tumor compared to mucinous ( $p=0,65$ ) or endometrioid ( $p=0,15$ ). No correlation was found between *PEDF* and the five SNPs; neither in allele analysis.

Worse overall survival was observed in EOC women with clinical symptoms at diagnosis ( $p=0,013$ ), metastatic disease ( $p=0,049$ ), women with neoadjuvant chemotherapy ( $p=0,001$ ) or women with stage III-IV of tumor ( $p=0,028$ ). No statistical association were found between *VEGF* genotypes and PFS, but SNPs -2578 C/A and -

1154 G/A heterozygous showed worse overall survival in EOC patients ( $p=0,032$  y  $p=0,011$  respectively).

### **Discussion**

Several studies have reported that polymorphisms in the *VEGF* gene are associated with different EOC characteristics.

Genotype distribution was different among the three groups of our study without statistical significance. The analysis of *VEGF* polymorphisms in women with EOC showed similar results that those published by Steffensen et al<sup>75</sup>, but in our study we could compare with other study groups. Zhang et al<sup>101</sup> associated SNP +936 C/C with EOC but they did not found association with -2578 C/A o -460 T/C. In our study, associations between SNPs were observed in the three study groups.

Previous studies have revealed that *VEGF* expression is higher in ovarian cancers and increasing *VEGF* expression is associated with advanced stage and worse survival<sup>69,70,71</sup>. In our study, higher but not significant *VEGF* levels were observed in healthy women, but this result should be confirmed with a study on a larger number of patients. Li et al<sup>64</sup> showed higher *VEGF* levels in EOC women, compared to normal ovarian tissue or benign ovarian neoplasms; maximum rate was described prior to surgery, ascitis and EOC stage III-IV with no differences about histological study. In our study, higher levels were observed in clear cell carcinoma (compared to serous, mucinous and endometrioid tumors) ( $p=0,02$ ,  $p=0,05$  y  $p=0,02$  respectively). It might be a supporting data of the well-known poorer prognosis of clear cell carcinoma.

Wong et al<sup>108,109</sup> observed differences in VEGF expression between several histological subtypes, and they showed higher levels in serous subtypes of benign and malignant tumors. Unlike our results, could be explained because they only recruited two patients with ovarian clear cell carcinoma.

There were no correlations between SNPs and serum VEGF levels in our study, unlike what have been described by other authors, for example, higher serum VEGF levels in 2578C, 460T and 405C alleles compared to non-carriers<sup>75</sup>. Renner et al<sup>58</sup> demonstrated that plasma VEGF levels were significantly lower in 936T allele carriers, the same as in our study but we did not reach statistical significance.

Twelve haplotypes were analyzed in women with EOC. CACGC haplotype showed worse prognosis, while Steffensen et al<sup>75</sup> observed a trend for AGCGC haplotype to increased progression-free survival.

*PEDF* is an antiangiogenic factor with potent actions in tumor cells. In our study, statistically significant lower *PEDF* expression was observed in women with EOC compared to healthy women. These results support theory that *PEDF* induces apoptosis in tumor and endothelial cells, being a potent antitumor factor. No significant association was observed with the main clinicopathological variables or polymorphisms of VEGF gene.

In current study no clear association were observed between VEGF genotypes and progression-free survival, the same as others<sup>75</sup>; but SNPs -2578 C/A and -1154 G/A heterozygous showed worse overall survival with statistical significance (p=0,032 and p=0,011 respectively). Smerdel et al<sup>116</sup>, found better overall survival in the -460 T/C and + 405 G/C heterozygous patients, while others authors like Camerin et al<sup>119</sup>

described the relation between SNP -2578 C/C and lower PFS raising this SNP as a possible prognosis factor in ovarian cancer.

There are few publications on *PEDF* and overall survival in EOC patients. In our study, no statistical association was found between *PEDF* expression and PFS. Although, using a cutoff of 0,195, a non significant trend toward better survival was observed. Another authors<sup>93</sup> have described lower *PEDF* expression in EOC patients with lower VEGF levels. They supported that *PEDF* expression could be in part, responsible for tumor malignancy in that type of ovarian cancer. They conclude that *PEDF* may be useful as a marker of malignancy in ovarian tumors with lower levels of VEGF. It would be interesting to carry out further studies about *PEDF* and progression-free survival in EOC patients to be considered in the future as a new prognostic factor.

### **Conclusions**

No significant differences of the analyzed genotype distribution were observed among the three groups of study. Higher but not significant VEGF levels were observed in healthy women compared to EOC. There were no correlations between SNPs and serum VEGF levels in EOC women. Higher VEGF levels were observed in patients with clear cell carcinoma compared to serous, mucinous or endometrioid. Statistically significant lower *PEDF* expression was observed in women with EOC compared to healthy women. No clear association was observed between VEGF genotypes, *PEDF* and progression-free survival, but SNPs -2578 C/A and -1154 G/A heterozygous showed worse overall survival in EOC patients with statistical significance.

# **INTRODUCCIÓN**

## II INTRODUCCIÓN

El cáncer de ovario es la principal causa de muerte entre los tumores malignos del tracto genital, y es el quinto cáncer más frecuente en la mujer en España en 2012 (por detrás del cáncer de mama, colon, útero y pulmón) (*Figura 1*)<sup>1</sup>.

Es el cáncer ginecológico más agresivo; su alta mortalidad se debe a la dificultad del diagnóstico precoz y a sus síntomas inespecíficos (aproximadamente el 70% de los pacientes se diagnostican en una fase avanzada de la enfermedad).

El cáncer epitelial de ovario es el tipo histológico más frecuente, conforma el 90% de los tumores primarios de ovario; el resto de tumores son derivados de células germinales, estroma y cordones sexuales<sup>2</sup>.

La angiogénesis juega un papel fundamental en la fisiología del ovario y en la patogénesis del cáncer de ovario<sup>3</sup>. La alteración del balance de factores pro y antiangiogénicos conlleva a la formación de redes vasculares implicadas en el crecimiento tumoral, invasión y formación de metástasis; por lo que el estudio de factores angiogénicos y antiangiogénicos puede resultar de especial interés como diana terapéutica en el cáncer de ovario.

## II.A EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

El cáncer de ovario fue el séptimo cáncer más frecuente en las mujeres en el mundo en el año 2012 diagnosticándose 239.000 nuevos casos<sup>4</sup>; un aumento de morbilidad comparado con los 225.500 casos descritos en el año 2008. A pesar de los últimos avances en el tratamiento, el cáncer de ovario sigue siendo la principal causa de muerte de cáncer ginecológico; registrándose 151.905 muertes en 2012<sup>2</sup>.

La tasa de incidencia es el número de casos nuevos de una enfermedad en una población y en un periodo de tiempo determinado. La incidencia de cáncer de España en 2012 (excluyendo tumores cutáneos no melanoma) fue de 215.534 casos (128.550 en varones y 86.984 en mujeres). La predicción para el año 2020, teniendo en cuenta las previsiones demográficas proporcionadas por las Naciones Unidas (GLOBOCAN 2012), se calcula que se diagnosticarán 246.713 casos nuevos de cáncer en España; 148.998 en varones y 97.715 en mujeres (Tabla 1)<sup>1</sup>.

Tabla 1. Estimación de incidencia de cáncer en España en 2012 y predicción para 2020.

Año	Número estimado de nuevos casos	Hombre	Mujer	Ambos sexos
2012	Todas las edades	128.550	86.984	215.534
	< 65 años	46.202	39.225	85.427
	> = 65 años	82.348	47.759	130.107
2020	Todas las edades	148.998	97.715	246.713
	< 65 años	54.031	43.251	97.282
	> = 65 años	94.967	54.464	149.431

GLOBOCAN 2012 (IARC) - 14.I.2016  
 Las predicciones poblacionales fueron realizadas por el proyecto GLOBOCAN a partir de la revisión 2012, perspectivas población mundial, Naciones Unidas.

Los tumores más frecuentemente diagnosticados para la población general en España en el 2012 fueron el cáncer de colon (32.240 casos nuevos), cáncer de próstata (27.853), pulmón (26,715), mama (25.215) y vejiga (13.789).

Al analizar la incidencia en mujeres, el cáncer de mama fue el cáncer más diagnosticado en 2012 en España (25.215 casos nuevos), seguido del cáncer de colon (12.979), útero (5.121), pulmón (4.935) y ovario (3.236) (Figura 1)<sup>1</sup>.

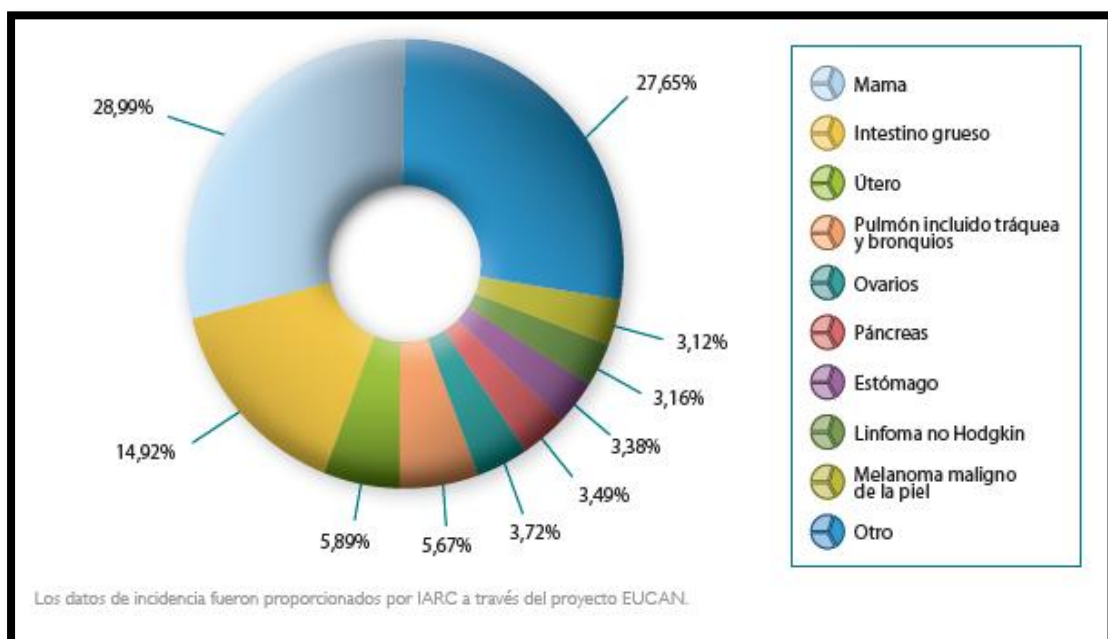


Figura 1. Incidencia de tumores en España en el año 2012. Datos proporcionados por EUCAN.

La prevalencia es el número o la proporción de la población con una enfermedad determinada durante un periodo o en un momento concreto. Incluye los pacientes con diagnóstico reciente y los diagnosticados en el pasado; y está determinada por la supervivencia. En mujeres, los tumores más prevalentes en 2012 fueron, por este orden,

cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de útero, melanoma maligno de la piel, cérvix y ovario (Figura 2)<sup>1</sup>.

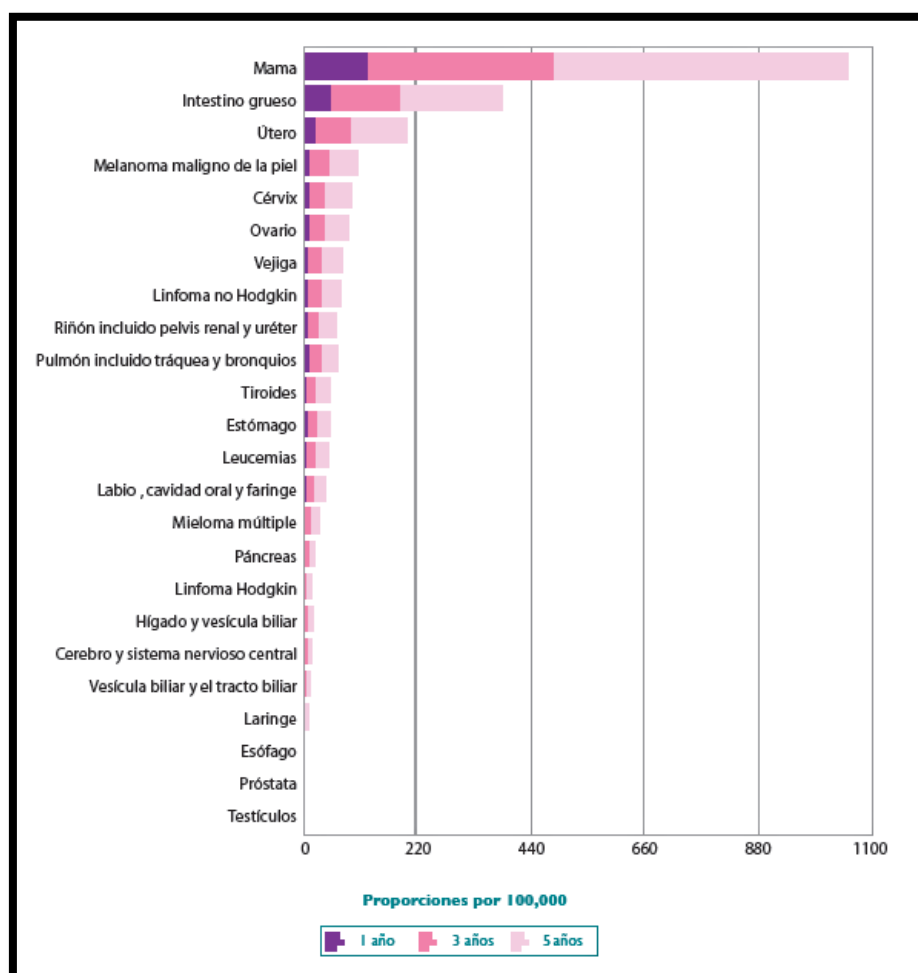


Figura 2. Prevalencia de tumores en España en mujeres en 2012.

La tasa de mortalidad es el número de fallecimientos ocurridos en un periodo concreto de una población determinada. De acuerdo con los datos de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), el cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares en la población general española, y la primera causa de muerte en varones en España. Sin embargo por los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), la principal causa de muerte en los hospitales españoles fueron los

tumores. Los tumores responsables del mayor número de fallecimientos en 2012 en España en la población general fueron el cáncer de pulmón (21.118 muertes) y el cáncer de colon (14.700 muertes), seguidos del cáncer de mama (6.075), páncreas (5.720) y próstata (5.481). En mujeres, el cáncer de mama fue la principal causa de muerte (6.075 casos), seguido del cáncer de colon (5.985), pulmón (3.688), páncreas (2.717) y estómago (2.054) (Figura 3)<sup>1</sup>.

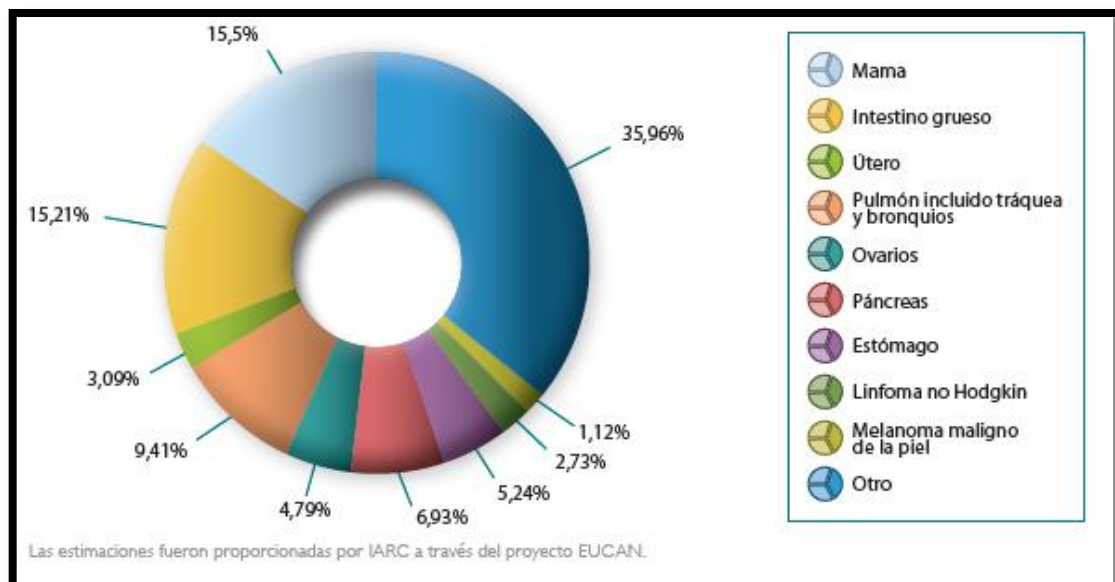


Figura 3. Mortalidad estimada en mujeres en 2012.

Según datos de REDECAN, en España en 2014 se diagnosticaron 3.276 nuevos casos de cáncer de ovario, siendo el quinto cáncer más frecuente en las mujeres, igual que en el resto de Europa<sup>5</sup> (Tabla 2).

Tabla 2. Estimación de la incidencia de cáncer en España, mujeres, año 2014. (REDECAN).

Tipo tumoral	N Casos	IC 95%	TB	IC 95%	TAm	IC 95%	T Ae	IC 95%
Labio, Cavidad oral y Faringe	1.671	( 1.473 - 1.886 )	7,1	( 6,2 - 8,0 )	3,4	( 3,0 - 3,9 )	4,8	( 4,2 - 5,4 )
Esófago	387	( 302 - 488 )	1,6	( 1,3 - 2,1 )	0,7	( 0,6 - 0,9 )	1,1	( 0,8 - 1,4 )
Estómago	3.248	( 2.924 - 3.598 )	13,8	( 12,4 - 15,3 )	5,3	( 4,8 - 5,9 )	8,0	( 7,2 - 8,8 )
Colon	11.687	( 10.529 - 12.934 )	49,5	( 44,6 - 54,8 )	19,8	( 17,9 - 21,9 )	29,5	( 26,7 - 32,6 )
Recto	4.384	( 3.515 - 5.450 )	18,6	( 14,9 - 23,1 )	7,9	( 6,3 - 9,8 )	11,6	( 9,3 - 14,4 )
Colorectal	16.071	( 14.623 - 11.712 )	68,1	( 62,0 - 75,1 )	27,7	( 25,2 - 30,5 )	41,1	( 37,4 - 45,3 )
Higado	1.552	( 1.288 - 1.848 )	6,6	( 5,5 - 7,8 )	2,3	( 2,0 - 2,8 )	3,6	( 3,0 - 4,2 )
Vesícula y vías biliares	1.033	( 874 - 1.212 )	4,4	( 3,7 - 5,1 )	1,4	( 1,2 - 1,6 )	2,2	( 1,9 - 2,6 )
Páncreas	3.183	( 2.836 - 3.562 )	13,5	( 12,0 - 15,1 )	4,9	( 4,4 - 5,5 )	7,5	( 6,7 - 8,4 )
Laringe	295	( 127 - 663 )	1,3	( 0,5 - 2,8 )	0,7	( 0,3 - 1,7 )	1,0	( 0,4 - 2,3 )
Pulmón	5.404	( 4.856 - 6.003 )	22,9	( 20,6 - 25,4 )	11,8	( 10,6 - 13,2 )	16,6	( 14,8 - 18,5 )
Melanoma cutáneo	2.352	( 2.038 - 2.695 )	10,0	( 8,6 - 11,4 )	5,7	( 4,9 - 6,6 )	7,5	( 6,5 - 8,7 )
Mama	26.354	( 22.991 - 30.117 )	111,7	( 97,5 - 127,7 )	53,0	( 54,5 - 72,4 )	85,0	( 73,8 - 97,6 )
Cuello uterino	2.375	( 1.969 - 2.839 )	10,1	( 8,3 - 12,0 )	6,3	( 5,2 - 7,6 )	8,2	( 6,7 - 9,9 )
Cuerpo uterino	5.963	( 5.232 - 6.759 )	25,3	( 22,2 - 28,7 )	13,0	( 11,3 - 14,9 )	18,5	( 16,1 - 21,1 )
Ovario	3.276	( 2.904 - 3.681 )	13,9	( 12,3 - 15,6 )	7,4	( 6,5 - 8,3 )	10,2	( 9,0 - 11,5 )
Riñón	1.854	( 1.600 - 2.139 )	7,9	( 6,8 - 9,1 )	3,9	( 3,4 - 4,5 )	5,4	( 4,7 - 6,3 )
Vejiga urinaria	3.498	( 2.989 - 4.059 )	14,8	( 12,7 - 17,2 )	5,9	( 5,0 - 6,8 )	8,8	( 7,5 - 10,2 )
Encéfalo y SNC	1.646	( 1.443 - 1.866 )	7,0	( 6,1 - 7,9 )	4,0	( 3,5 - 4,5 )	5,2	( 4,5 - 5,9 )
Tiroides	2.417	( 2.252 - 2.590 )	10,2	( 9,5 - 11,0 )	6,6	( 6,1 - 7,0 )	8,9	( 8,2 - 9,5 )
Linfoma de Hodgkin	669	( 582 - 765 )	2,8	( 2,5 - 3,2 )	2,6	( 2,2 - 3,0 )	2,7	( 2,4 - 3,1 )
Linfomas no hodgkinianos	3.315	( 2.944 - 3.716 )	14,1	( 12,5 - 15,8 )	6,9	( 6,1 - 7,7 )	9,5	( 8,4 - 10,6 )
Mieloma	1.233	( 862 - 1.751 )	5,2	( 3,7 - 7,4 )	2,0	( 1,4 - 2,8 )	3,0	( 2,1 - 4,3 )
Leucemias	2.615	( 2.199 - 3.090 )	11,1	( 9,3 - 13,1 )	5,7	( 4,9 - 6,7 )	7,3	( 6,2 - 8,5 )
Otros cánceres	5.060	( 4.302 - 5.882 )	21,4	( 18,2 - 24,9 )	9,0	( 7,8 - 10,3 )	12,8	( 11,1 - 14,6 )
<b>Total exc. piel no melanoma</b>	<b>95.471</b>	<b>( 91.414 - 100.025 )</b>	<b>404,7</b>	<b>( 387,5 - 424,0 )</b>	<b>200,3</b>	<b>( 190,8 - 210,9 )</b>	<b>278,8</b>	<b>( 266,0 - 293,2 )</b>

TB: Tasa bruta. TAm: Tasa ajustada a la población estándar mundial. T Ae: Tasa ajustada a la población estándar europea

Fuente: Red Española de Registros de Cáncer

La etiología del cáncer de ovario es desconocida, aceptándose un origen multifactorial. Se han implicado **factores de riesgo** de tipo endocrino, reproductivo, dietético; siendo considerado el más importante la predisposición genética.

- **Factores hereditarios:**

Aproximadamente 5-10% de los casos de cáncer de ovario forman parte de los síndromes de cáncer familiar, ocasionados por mutaciones en ciertos genes.

Entre un 6-15% de los casos de cáncer de ovario se asocian a la mutación *BRCA* (síndrome hereditario de cáncer de mama y ovario con las mutaciones de *BRCA1* y *BRCA2*). Las mujeres portadoras de la mutación *BRCA1* presentan un riesgo de padecer un cáncer de ovario antes de los 70 años del 39%. En España, el riesgo acumulado de cáncer de ovario a los 70 años se ha estimado en un 22% (95% IC, 0-40%) en portadores de la mutación *BRCA1* y del 18% (95% IC, 0-35%) en *BRCA2*<sup>6</sup>.

El **síndrome de Lynch** o actualmente conocido como cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (HNPCC), causado por mutaciones en diferentes genes como *MLH1*, *MLH3*, *MSH2*, *MSH6*, *TGFBR2*, *PMS1* y *PMS2*, también se relaciona con un aumento de riesgo para el cáncer de ovario<sup>7</sup>. Estos pacientes tienen un riesgo aumentado de cáncer de colon y útero, y en el transcurso de sus vidas un 10% desarrollará cáncer de ovario<sup>8</sup>.

El **síndrome de hamartoma tumoral** o enfermedad de Cowden, se produce por mutaciones hereditarias en el gen *PTEN*. Se caracteriza por la afectación de cáncer de tiroides y cáncer de mama, pero también tienen más riesgo de presentar cáncer de ovario<sup>8</sup>.

El **síndrome de Peutz-Jeghers** es un síndrome genético poco común causado por mutaciones en el gen *STK11* que también favorece la aparición de cáncer de ovario, incluyendo cáncer epitelial de ovario y un tipo de tumor estromal llamado tumor de los cordones sexuales con túbulos anulares (SCTAT)<sup>8</sup>.

- **Edad:**

La edad está asociada al cáncer de ovario. El riesgo de padecer cáncer de ovario aumenta con la edad; la mayoría se originan después de la menopausia. La mitad de todos los cánceres de ovario se diagnostican en mujeres a partir de los 63 años<sup>8</sup>. A su vez, la edad avanzada está considerada como factor de riesgo para la supervivencia en el cáncer de ovario; varios estudios describen al menos un incremento doble en el riesgo de muerte en mujeres con edades superiores a los 65 años<sup>9</sup>.

- **Factores endocrinos y reproductivos:**

La nuliparidad es un factor de riesgo conocido. Está apoyada en la hipótesis de la “ovulación incesante” descrita por Fatallah<sup>10</sup> en 1971, donde defendía que la superficie del ovario sufre traumatismos menores con cada ovulación y que el efecto acumulativo de estas lesiones podría desembocar en una neoplasia. La edad de la ovulación y el número de ciclos ovulatorios a lo largo de la vida, son

un índice de riesgo individualizado de cada mujer para cáncer de ovario. Un incremento de un año de ovulación se asocia a un incremento de un 6% en el riesgo de cáncer de ovario<sup>11</sup>. De esta manera se entiende que el uso de anovulatorios hormonales disminuya el riesgo de cáncer de ovario un 30% en las mujeres que los toman<sup>12</sup> y que la mujer embarazada y que haya conseguido un embarazo a término, tiene menor riesgo de padecer cáncer de ovario. La lactancia materna parece disminuir el riesgo aun más<sup>8</sup>.

En población infértil, la relación entre el uso de tratamientos inductores de la ovulación y el cáncer de ovario es controvertida<sup>13,14</sup>. Siristatidis et al<sup>15</sup> publicaron un meta-análisis en el año 2014 donde concluyeron que la hiperestimulación ovárica controlada para tratamientos de fecundación in vitro no parecía modificar el riesgo de cáncer de cérvix, endometrio ni de ovario en mujeres infértiles comparado con la población general, asumiendo y neutralizando el factor de confusión de la propia infertilidad; aunque dada la controversia son necesarios más estudios para confirmarlo.

El uso de la terapia hormonal sustitutiva para la menopausia se ha asociado a un aumento del riesgo<sup>16</sup> en determinadas circunstancias, sobre todo tras un largo periodo de tratamiento, siendo un riesgo reversible tras abandonar el mismo<sup>17</sup>.

La endometriosis también aumenta el riesgo de cáncer de ovario<sup>18</sup>. Parece predisponer al desarrollo de dos tipos histológicos concretos, células claras y endometrioides<sup>19</sup>.

Se ha descrito que el cáncer de ovario seroso de alto grado podría tener un posible origen tubárico mediado por una célula precursora común. Se han localizado las lesiones precursoras en las fimbrias de las trompas de Falopio. Asimismo, se ha objetivado que en dicho lugar comienza el crecimiento tumoral inicial y que en el 70% de los carcinomas serosos se ve implicado el endosalpinx<sup>20</sup>. Este es el tipo de cáncer que suele afectar a las portadoras de *BRCA+*, y por ello, está descrito que la salpingooforectomía profiláctica bilateral es una de las estrategias más eficaces para prevenir el cáncer de ovario en estas mujeres<sup>21</sup>.

La ligadura tubárica parece reducir la probabilidad de cáncer de ovario, así como la histerectomía que tiene un papel protector en el cáncer de ovario<sup>22</sup>.

- **Factores ambientales y dietéticos:**

El cáncer de ovario es más frecuente en países desarrollados que en países en vías de desarrollo, lo que lleva a pensar en la influencia de ciertos factores ambientales que favorezcan el cáncer.

El tabaco aumenta el riesgo del cáncer de ovario, en concreto para uno de los tipos histológicos, el adenocarcinoma mucinoso, en un 120% en las mujeres fumadoras respecto a las no fumadoras<sup>23</sup>.

La relación del consumo del alcohol y café con el cáncer de ovario es controvertido; ya que hay estudios que demuestran asociación y otros que no.

La obesidad (mujeres con índice de masa corporal igual o superior a 30 kg/m<sup>2</sup>) también se relaciona con aumento de riesgo para este cáncer<sup>24</sup>, de la misma manera que una dieta rica en grasas saturadas.

- **Otros:**

Otros factores de riesgo menos estudiados que podrían relacionarse con una mayor incidencia de cáncer de ovario son: radiaciones ionizantes, exposición al asbesto (mineral reconocido como carcinogénico) y al talco<sup>8</sup>.

## II.B ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL CÁNCER EPITELIAL DE OVARIO

El ovario puede originar tumores histológicamente muy diferentes con comportamientos biológicos variados.

El 90% de los tumores malignos de ovario son epiteliales (derivados del epitelio y estroma superficial). Estas neoplasias se originan en el epitelio de revestimiento que a su vez, embriológicamente procede del peritoneo primitivo (mesotelio celómico). Durante el desarrollo se produce una invaginación lateral para formar el conducto paramesonéfrico; del que derivan los epitelios tubárico, endometrial y cervical. Esto explica la capacidad metaplásica del epitelio ovárico y las variedades histológicas posibles, de ahí que los tumores epiteliales de ovario se asemejen a los derivados del conducto de Müller: trompas de Falopio (tumores serosos), endocérvix (tumores mucinosos), endometrio (tumores endometrioides y de células claras), e incluso pueden experimentar una metaplasia urotelial (tumores de células transicionales / tumor de Brenner)<sup>25,26</sup>.

La clasificación de los tumores de ovario de la Organización Mundial de Salud (OMS 2014) incluye los siguientes tipos que se presentan en la *Figura 4*<sup>27</sup>.

<b>Epithelial tumours</b>		Malignant	
<b>Serous Tumours</b>		Malignant Brenner tumour	9000/3
Benign		<b>Seromucinous tumours</b>	
Serous cystadenoma	8441/0	Benign	
Serous adenofibroma	9014/0	Seromucinous cystadenoma	8474/0*
Serous surface papilloma	8461/0	Seromucinous adenofibroma	9014/0*
Borderline		Borderline	
Serous borderline tumour /		Seromucinous borderline tumour / Atypical	
Atypical proliferative serous tumour	8442/1	proliferative seromucinous tumour	8474/1*
Serous borderline tumour - micropapillary		Malignant	
variant / Non-invasive low-grade		Seromucinous carcinoma	8474/3*
serous carcinoma	8460/2*	<b>Undifferentiated carcinoma</b>	8020/3
Malignant		<b>Mesenchymal tumours</b>	
Low-grade serous carcinoma	8460/3	Low-grade endometrioid	
High-grade serous carcinoma	8461/3	stromal sarcoma	8931/3
<b>Mucinous tumours</b>		High-grade endometrioid	
Benign		stromal sarcoma	8930/3
Mucinous cystadenoma	8470/0	<b>Mixed epithelial and mesenchymal tumours</b>	
Mucinous adenofibroma	9015/0	Adenosarcoma	8933/3
Borderline		Carcinosarcoma	8980/3
Mucinous borderline tumour / Atypical		<b>Sex cord-stromal tumours</b>	
proliferative mucinous tumour	8472/1	<b>Pure stromal tumours</b>	
Malignant		Fibroma	8810/0
Mucinous carcinoma	8480/3	Cellular fibroma	8810/1
<b>Endometrioid tumours</b>		Thecoma	8600/0
Benign		Luteinized thecoma associated	
Endometriotic cyst		with sclerosing peritonitis	8601/0
Endometrioid cystadenoma	8380/0	Fibrosarcoma	8810/3
Endometrioid adenofibroma	8381/0	Sclerosing stromal tumour	8602/0
Borderline		Signet-ring stromal tumour	8590/0
Endometrioid borderline tumour / Atypical		Microcystic stromal tumour	8590/0
proliferative endometrioid tumour	8380/1	Leydig cell tumour	8650/0
Malignant		Steroid cell tumour	8760/0
Endometrioid carcinoma	8380/3	Steroid cell tumour, malignant	8760/3
<b>Clear cell tumours</b>		<b>Pure sex cord tumours</b>	
Benign		Adult granulosa cell tumour	8620/3
Clear cell cystadenoma	8443/0	Juvenile granulosa cell tumour	8622/1
Clear cell adenofibroma	8313/0	Sertoli cell tumour	8640/1
Borderline		Sex cord tumour with annular tubules	8623/1
Clear cell borderline tumour / Atypical		<b>Mixed sex cord-stromal tumours</b>	
proliferative clear cell tumour	8313/1	Sertoli-Leydig cell tumours	
Malignant		Well differentiated	8631/0
Clear cell carcinoma	8310/3	Moderately differentiated	8631/1
<b>Brenner tumours</b>		With heterologous elements	8634/1
Benign		Poorly differentiated	8631/3
Brenner tumour	9000/0	With heterologous elements	8634/3
Borderline		Retiform	8633/1
Borderline Brenner tumour / Atypical		With heterologous elements	8634/1
proliferative Brenner tumour	9000/1	Sex cord-stromal tumours, NOS	8590/1

Figura 4. Clasificación de tumores de los Órganos Reproductivos Femeninos de la Organización Mundial de Salud 2014.

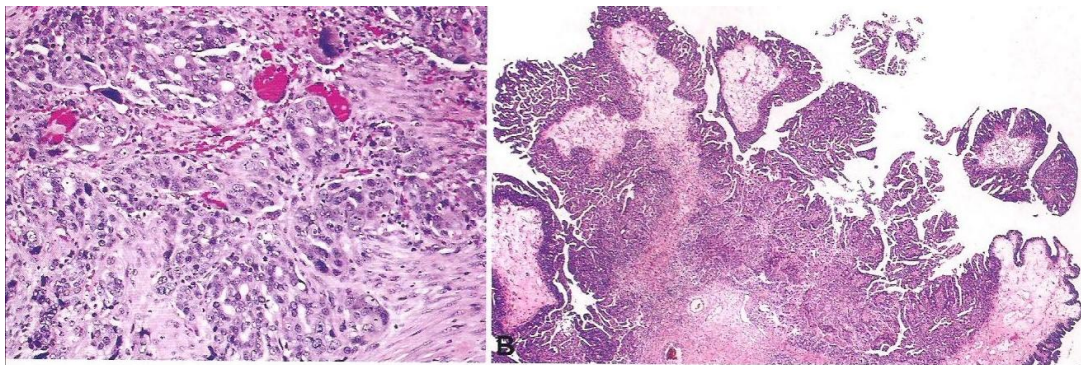
<b>Germ cell tumours</b>		Wolffian tumour	9110/1
Dysgerminoma	9060/3	Small cell carcinoma, hypercalcaemic type	8044/3*
Yolk sac tumour	9071/3	Small cell carcinoma, pulmonary type	8041/3
Embryonal carcinoma	9070/3	Wilms tumour	8960/3
Non-gestational choriocarcinoma	9100/3	Paraganglioma	8693/1
Mature teratoma	9080/0	Solid pseudopapillary neoplasm	8452/1
Immature teratoma	9080/3		
Mixed germ cell tumour	9085/3	<b>Mesothelial tumours</b>	
<b>Monodermal teratoma and somatic-type tumours arising from a dermoid cyst</b>		Adenomatoid tumour	9054/0
Struma ovarii, benign	9090/0	Mesothelioma	9050/3
Struma ovarii, malignant	9090/3	<b>Soft tissue tumours</b>	
Carcinoid	8240/3	Myxoma	8840/0
Strumal carcinoid	9091/1	Others	
Mucinous carcinoid	8243/3	<b>Tumour-like lesions</b>	
Neuroectodermal-type tumours		Follicle cyst	
Sebaceous tumours		Corpus luteum cyst	
Sebaceous adenoma	8410/0	Large solitary luteinized follicle cyst	
Sebaceous carcinoma	8410/3	Hyperreactio luteinalis	
Other rare monodermal teratomas		Pregnancy luteoma	
Carcinomas		Stromal hyperplasia	
Squamous cell carcinoma	8070/3	Stromal hyperthecosis	
Others		Fibromatosis	
<b>Germ cell - sex cord-stromal tumours</b>		Massive oedema	
Gonadoblastoma, including gonadoblastoma with malignant germ cell tumour	9073/1	Leydig cell hyperplasia	
Mixed germ cell-sex cord-stromal tumour, unclassified	8594/1*	Others	
<b>Miscellaneous tumours</b>		<b>Lymphoid and myeloid tumours</b>	
Tumours of rete ovarii		Lymphomas	
Adenoma of rete ovarii	9110/0	Plasmacytoma	9734/3
Adenocarcinoma of rete ovarii	9110/3	Myeloid neoplasms	
		<b>Secondary tumours</b>	

<sup>a</sup> The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) (575A). Behaviour is coded /0 for benign tumours, /1 for unspecified, borderline or uncertain behaviour, /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia and /3 for malignant tumours; <sup>b</sup> The classification is modified from the previous WHO classification of tumours (1906A), taking into account changes in our understanding of these lesions; \*These new codes were approved by the IARC/WHO Committee for ICD-O in 2013.

*Figura 4 (Continuación). Figura 4. Clasificación de tumores de los Órganos Reproductivos Femeninos de la Organización Mundial de Salud 2014.*

**CARACTERÍSTICAS ANATOMO-PATOLÓGICAS: TUMORES EPITELIALES**

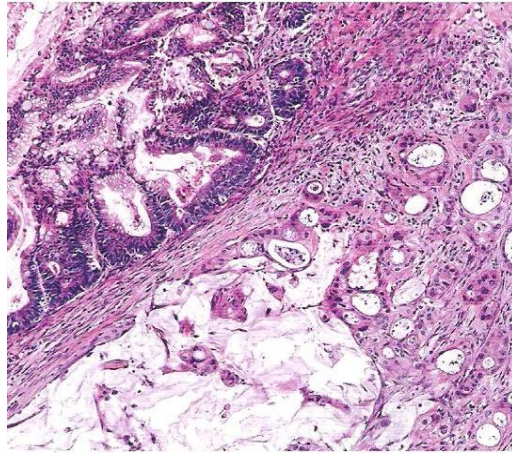
**Tumores serosos:** es el tipo histológico más frecuente, representa aproximadamente un 40-70% de los casos. Con frecuencia son bilaterales (aproximadamente 50%). No suelen alcanzar grandes tamaños; pueden tener superficie lisa o excrecencias papilares. Las células tienen núcleos grandes, hipercromáticos y pleomorfos. Es muy frecuente la atipia celular y alto grado de mitosis. El estroma suele ser edematoso, pudiéndose encontrar en su interior células neoplásicas dispersas, depósitos intracelulares de calcio (los llamados “cuerpos de psamoma”), áreas de necrosis y hemorragia<sup>28</sup>. A continuación se representa un corte histológico de tumor seroso de ovario (*Figura 5*).



*Figura 5. Carcinoma seroso de ovario*<sup>27</sup>.

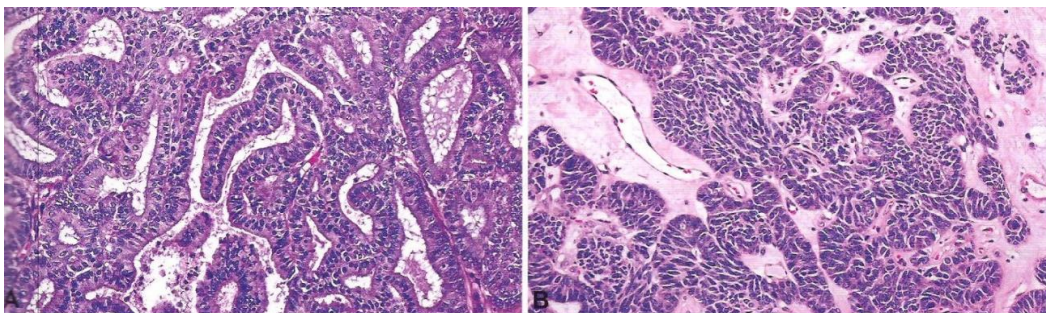
**Tumores mucinosos:** representa el 10% de las neoplasias malignas de ovario, con pronóstico más favorable que los tumores serosos. Generalmente son unilaterales. Son tumores sólidos o quísticos, con zonas de necrosis y hemorragia frecuente. Microscópicamente se observan formaciones de tipo glandular cuyas células epiteliales se caracterizan por grandes acúmulos citoplásmicos de mucina. Suelen presentar alta actividad mitótica. Pueden observarse abundantes células intestinales que dificulten el

diagnóstico diferencial con el cáncer de colon<sup>26</sup>. A continuación se detalla imagen histológica de carcinoma mucinoso de ovario (*Figura 6*).



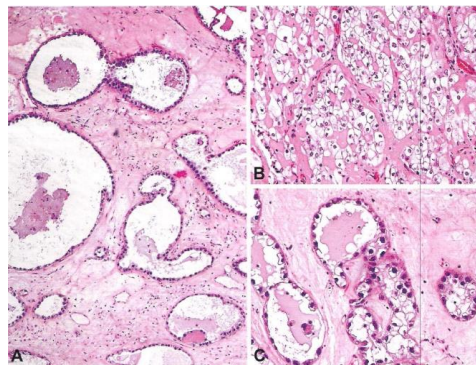
*Figura 6. Carcinoma mucinoso de ovario<sup>27</sup>.*

**Tumores endometrioides:** su incidencia varía entre 15-35%. Aproximadamente un 40% de los tumores se asocian a endometriosis en el mismo ovario o en cualquier localización de la pelvis; y un 15-20% coexisten con cáncer de endometrio. En general suelen afectar a un solo ovario, y solo el 17- 20% son bilaterales. Macroscópicamente son tumores sólido-quísticos de gran tamaño y microscópicamente presentan patrones glandulares similares a los de origen endometrial<sup>26</sup>. La mayoría suelen ser tumores bien diferenciados y pueden coexistir áreas de hemorragia y necrosis. Se representa imagen histológica en la *Figura 7*.



*Figura 7. Carcinoma endometrioides de ovario<sup>27</sup>.*

**Tumores de células claras:** representan el 5-10% de todos los cánceres de ovario. Son los tumores ováricos que con mayor frecuencia se asocian a endometriosis ovárica o pélvica. Son tumoraciones típicamente unilaterales; quísticas frecuentemente unilobuladas, que ocasionalmente tienen un componente sólido. Es un tumor de alto grado, constituido por dos tipos celulares: células con citoplasma amplio y claro debido a un gran acúmulo de glucógeno y células con escaso citoplasma y núcleo pleomórfico que protruye adoptando forma de “clavo”<sup>26</sup>. A continuación se representa corte histológico (*Figura 8*).



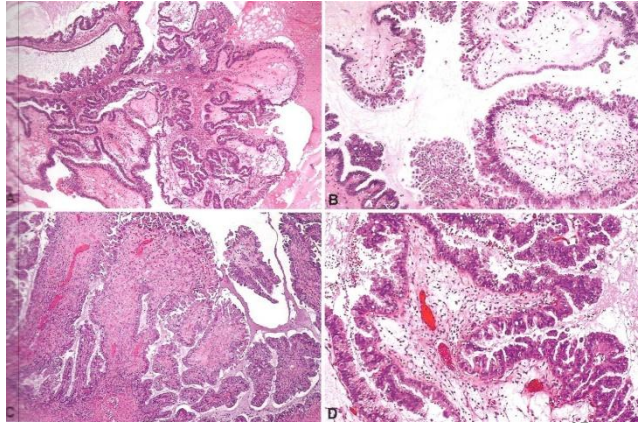
*Figura 8. Carcinoma tipo células claras*<sup>27</sup>.

**Tumores de Brenner:** tumores infrecuentes (2%). El 80% son unilaterales. Suelen tener gran tamaño; sólidos o quísticos. Típicamente asocian un componente de tumor de Brenner benigno que puede estar fibrótico o incluso calcificado. Se caracterizan por una intensa proliferación fibrosa sobre la que asientan nidos celulares que recuerdan al epitelio de transición<sup>26</sup>. La invasión puede ser difícil de diagnosticar dada la alta densidad celular del tumor y el marcado componente fibromatoso. Imagen de pieza quirúrgica (*Figura 9*).



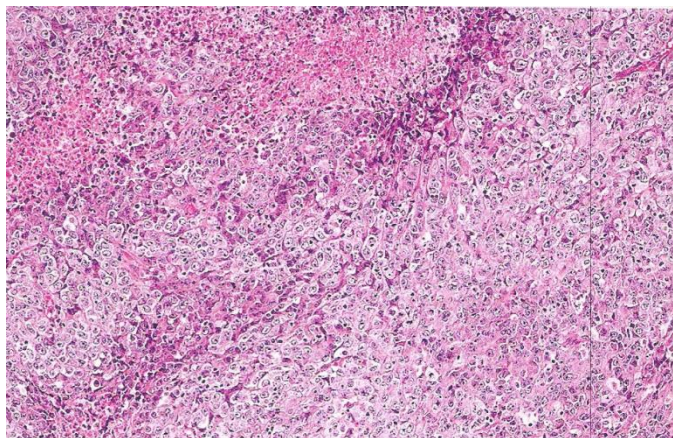
*Figura 9. Tumor de Brenner*<sup>27</sup>.

**Tumores seromucinosos:** son tumores muy poco frecuentes. La mitad de los casos son bilaterales. Pueden ser uni o multiloculares y contienen áreas sólidas. Por definición, contienen epitelio mucinoso de tipo endocervical y epitelio seroso con índice mitótico variable<sup>26</sup>. Se representa imagen histológica de tumor seromucinoso en *Figura 10*.



*Figura 10. Carcinoma seromucinoso de ovario<sup>27</sup>.*

**Carcinoma indiferenciado:** aproximadamente 15% de los casos. Constituyen un grupo de tumores con alto grado de anaplasia. Macroscópicamente está formado por masas sólidas y quísticas con abundantes áreas de necrosis y hemorragia<sup>26</sup>. A continuación se detalla corte histológico en *Figura 11*.



*Figura 11. Carcinoma indiferenciado de ovario<sup>27</sup>.*

## II.C FACTORES PRONÓSTICO EN EL CÁNCER DE OVARIO

Se han descrito diferentes factores pronóstico en el cáncer de ovario, siendo el estadio tumoral el principal factor que determina la supervivencia. La FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) detalla la última clasificación y estadios TNM de este cáncer en 2014 (*Figura 12*). De forma que, la probabilidad de supervivencia a 5 años está por encima del 80% en las pacientes con estadio I, se encuentra entre el 40-60% para estadio II, desciende al 10-30% para estadio III y se sitúa por debajo del 5% en las pacientes con estadio IV<sup>29</sup>.

En las pacientes con etapas iniciales, el principal factor pronóstico es el grado tumoral, mientras que en las pacientes con enfermedad avanzada, es la enfermedad residual tras la primera cirugía citorreductora. Se han descrito factores biológicos y moleculares con significado pronóstico o predictor de respuesta a esquemas terapéuticos pero se necesitan estudios prospectivos que validen los resultados.

**En estadios iniciales**, el estudio más importante sobre factores pronóstico de cáncer de ovario en estadio I, se publicó en 2001 e incluyó 1545 pacientes procedentes de instituciones Europeas y Canadienses<sup>30</sup>. El análisis multivariable demostró que los únicos factores de riesgo significativos que son factores pronóstico e independientes para la supervivencia libre de enfermedad son:

- Grado histológico de diferenciación (el más importante)
- Ruptura de cápsula antes o durante la cirugía
- Estadio FIGO
- Edad

T - Primary Tumour		N — Regional Lymph Nodes	
TNM	FIGO		
TX	Primary tumour cannot be assessed	NX	Regional lymph nodes cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumour	N0	No regional lymph node metastasis
T1	I Tumour limited to the ovaries	N1	Regional lymph node metastasis
T1a	IA Tumour limited to one ovary (capsule intact) or fallopian tube surface; no malignant cells in ascites or peritoneal washings	N1a	Lymph node metastasis up to 10 mm in greatest dimension
T1b	IB Tumour limited to one or both ovaries (capsules intact) or fallopian tubes; no tumour on ovarian or fallopian tube surface; no malignant cells in ascites or peritoneal washings	N1b	Lymph node metastasis more than 10 mm in greatest dimension
T1c	IC Tumour limited to one or both ovaries or fallopian tubes with any of the following:		
T1c1	IC1 Surgical spill		
T1c2	IC2 Capsule ruptured before surgery or tumour on ovarian or fallopian tube surface		
T1c3	IC3 Malignant cells in ascites or peritoneal washings		
T2	II Tumour involves one or both ovaries or fallopian tubes with pelvic extension below pelvic brim or primary peritoneal cancer		
T2a	IIA Extension and/or implants on uterus and/or fallopian tubes and/or ovaries		
T2b	IIB Extension to other pelvic intraperitoneal		
T3	III Tumour involves one or both ovaries or fallopian tubes, and/or primary peritoneal carcinoma, with cytologically or histologically confirmed spread to the peritoneum		
N1	outside the pelvis and/or metastasis to the retroperitoneal lymph nodes		
N1	IIIA1 Retroperitoneal lymph node metastasis only		
N1a	IIIA1i Lymph node metastasis up to 10 mm in greatest dimension		
N1b	IIIA1ii Lymph node metastasis more than 10 mm in greatest dimension		
T3a	IIIA2 Microscopic extrapelvic (above the pelvic brim) peritoneal involvement with or without retroperitoneal lymph node		
T3b	IIB Macroscopic peritoneal metastasis beyond the pelvis up to 2 cm in greatest dimension with or without retroperitoneal lymph node metastasis		
T3c	IIIC Macroscopic peritoneal metastasis beyond the pelvis more than 2 cm in greatest dimension, with or without retroperitoneal lymph node metastasis (excludes extension of tumour to capsule of liver and spleen without parenchymal involvement of either organ)		
M1	IV Distant metastasis excluding peritoneal metastasis		
M1a	IVA Pleural effusion with positive cytology		
M1b	IVB Parenchymal metastasis and metastasis to extra-abdominal organs (including inguinal lymph nodes and lymph nodes outside the abdominal cavity)		
		<b>M — Distant Metastasis</b>	
		M0	No distant metastasis
		M1	Distant metastasis
		M1a	Pleural effusion with positive cytology
		M1b	Parenchymal metastasis and metastasis to extra abdominal organs (including inguinal lymph nodes and lymph nodes outside the abdominal cavity)
		<b>pTNM Pathological Classification</b>	
			The pT and pN categories correspond to the T and N categories.
		pM1	Distant metastasis microscopically confirmed
			<b>Note:</b> pM0 and pMX are not valid categories.
		<b>pN0</b>	Histological examination of a pelvic lymphadenectomy specimen will ordinarily include 10 or more lymph nodes. If the lymph nodes are negative, but the number ordinarily examined is not met, classify as pN0.
		<b>Stage Grouping</b>	
		Stage IA	T1a N0 M0
		Stage IB	T1b N0 M0
		Stage IC1	T1c1 N0 M0
		Stage IC2	T1c2 N0 M0
		Stage IC3	T1c3 N0 M0
		Stage IIA	T2a N0 M0
		Stage IIB	T2b N0 M0
		Stage IIC	T2c N0 M0
		Stage IIIA1	T1/T2 N1 M0
		Stage IIIA2	T3a N0/N1 M0
		Stage IIIB	T3b N0/N1 M0
		Stage IIIC	T3c N0/N1 M0
		Stage IV	Any T Any N M1
		<b>References</b>	
			American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual, 7th ed. (2011). Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti III eds. Springer: New York
			International Union against Cancer (UICC): TNM Classification of Malignant Tumours, 7th ed. (2009) Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch eds. Wiley-Blackwell: Oxford
			A help-desk for specific questions about the TNM classification is available at <a href="http://www.uicc.org">http://www.uicc.org</a> .
			Prat J, FIGO Committee on Gynecologic Oncology (2014). Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. Int J Gynaecol Obstet 124:1-5.

Figura 12. Clasificación TNM y FIGO de Tumores de Órganos Reproductivos Femeninos de la Organización Mundial de la Salud 2014<sup>27</sup>.

Otros factores pronóstico, descritos en estudios previos, como el tipo histológico, adherencias, ascitis, crecimiento extracapsular o el tamaño del tumor, no resultaron factores independientes en el análisis multivariable. Nuevos marcadores biológicos como la ploidía del ácido desoxirribonucleico (ADN), han demostrado ser factores pronóstico aunque su estandarización parece compleja<sup>31</sup>.

**En estadios avanzados**, el volumen de enfermedad residual tras la cirugía es el factor pronóstico más importante. Por tanto, el tratamiento inicial con cirugía de estadificación y citorreductora tiene como objetivo extirpar la mayor cantidad de masa tumoral posible. Se ha relacionado una mayor supervivencia con un menor tamaño de enfermedad residual (<1 cm)<sup>32</sup>. Un meta-análisis en el que analizaron 81 cohortes de pacientes con estadio III-IV (6.885 pacientes), objetivó una mediana de supervivencia de 22,7 meses en pacientes con citorreducción de menos del 25% del tumor, frente a una mediana de supervivencia de 33,9 meses en aquellas con citorreducción mayor del 75%, lo que supone un incremento de supervivencia del 50%<sup>33</sup>. Desafortunadamente, esta situación de citorreducción inicial óptima se consigue en menos del 40% debido a la extensa afectación abdominal con la que debutan la mayoría de las pacientes. Otros factores clínicos que se han relacionado son:

- Edad: peor supervivencia por encima de los 65 años.
- Grado histológico (grado 1 o bien diferenciado, grado 2 o moderadamente diferenciado, grado 3 o escasamente indiferenciado)
- Tipo histológico (los tumores de células claras de alto grado suelen ser platino-resistentes y cursan con peor supervivencia global y libre

de enfermedad; y los carcinomas anaplásicos son típicamente muy agresivos).

- Marcador tumoral CA 125: suele correlacionarse con el volumen de enfermedad.

Gracias a los avances en investigación y al desarrollo de la biología molecular, estudiando los fenómenos de proliferación celular, diseminación y quimioresistencia, se han identificado otros factores como por ejemplo:

- Factores implicados en el ciclo celular (ciclina E, CDC25, p27/Kip1, p16/cyclin D1/CDK4/pRb pathway).
- Factores implicados en apoptosis (p53, Bcl2, BAX).
- Angiogénesis (Factor de Crecimiento Vascular Endotelial o *VEGF*) y antiangiogénesis (Factor Derivado del Epitelio Pigmentario o *PEDF*).

Se han descrito determinados factores moleculares relacionados con la respuesta a la quimioterapia:

- Expresión de p21 (WAF1/CIP1): asociado a la respuesta a quimioterapia basada en platino. Ha resultado un factor predictor de supervivencia<sup>34</sup>.
- Glicoproteína P: la ausencia de expresión de esta proteína de transporte transmembrana (asociada a la resistencia a fármacos), se asocia a mayor respuesta a quimioterapia y supervivencia<sup>35</sup>.

- p53: gen supresor tumoral. Mutaciones de p53 en el tejido tumoral antes de la quimioterapia ha mostrado resultados contradictorios en diversos estudios<sup>36,37</sup>.
- Expresión de Cox-2: se asocia a pobre respuesta a quimioterapia y menor supervivencia<sup>38</sup>.
- Expresión de LRP (lung resistance protein): relacionada con pobre respuesta al platino y menor supervivencia<sup>39</sup>.
- HTR: la expresión del gen humano de la transcriptasa inversa de telomerasa (hTERT), medida por RT-PCR, se ha demostrado como un marcador independiente de respuesta a quimioterapia basada en platino<sup>40</sup>.

## ILD ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis consiste en la formación y desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vascularización preexistente. El proceso de la angiogénesis incluye la migración y proliferación de células endoteliales, la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que eventualmente se unirán, para finalmente formar vasos sanguíneos estables.

Este fenómeno sucede de forma fisiológica desde la embriogénesis y continúa durante el desarrollo temprano postnatal. En la etapa adulta, ocurre en el ovario durante el ciclo folicular para el desarrollo del folículo y cuerpo lúteo correspondiente, así como también ocurre en la cicatrización de heridas. Sin embargo, la angiogénesis ocurre en situaciones patológicas como el cáncer, donde este proceso resulta crucial para la invasión tumoral y desarrollo de metástasis<sup>3</sup>.

Es un proceso complejo regulado por el balance de **factores proangiogénicos y antiangiogénicos**<sup>41</sup>. Como factores proangiogénicos destacan VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular), FGF (Factor de Crecimiento de Fibroblastos), TGF- $\alpha$  (Factor de Crecimiento Transformante alfa), TGF- $\beta$  (Factor de Crecimiento Transformante beta), TNF- $\alpha$  (Factor de Necrosis Tumoral alfa), IL-8 (Interleucina 8), PDGF (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas), integrinas y cadherinas. Como factores antiangiogénicos señalar TSP-1 (Trombospondina 1), endostatina, IL-4, 12 y 18 (Interleucina 4, 12 y 18)<sup>42</sup> y PEDF (Factor Derivado del Epitelio Pigmentario).

En los años 70, Judah Folkman sugirió que los tumores cancerosos debían producir sustancias que estimulaban su invasión por vasos sanguíneos, y de esta forma los tumores obtenían la capacidad de crecer<sup>43</sup>.

Esta teoría ha impulsado numerosas investigaciones con el fin de conocer el complejo mecanismo de la angiogénesis y su correlación con el comportamiento biológico de las neoplasias; así como las intervenciones terapéuticas relacionadas para controlar la agresividad de los tumores<sup>44</sup>.

El VEGF es el factor más potente de todos los implicados en la **angiogénesis**. Fue descrito por Senger<sup>45</sup> en 1983 como factor de permeabilidad vascular y posteriormente por Leung<sup>46</sup> como factor de crecimiento vascular endotelial en 1989. Su función es estimular el crecimiento y proliferación de células endoteliales vasculares e inducir la síntesis de óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), además de potenciar la expresión de genes (NOS, factor tisular, proteínas anti-apoptóticas, PlGF) y de factores de transcripción (Ets1, NFAT, Stat)<sup>47</sup>. El VEGF influye en la vasculatura del tumor de varias formas; ayuda a formar nuevos vasos, estimula el crecimiento de los nuevos vasos al proporcionar el aporte metabólico necesario, y permite la supervivencia vascular ya que inhibe la apoptosis de las células endoteliales<sup>48</sup>.

El gen *VEGF* se localiza en el cromosoma 6p21.3, está formado por 8 exones y 7 intrones<sup>49</sup>. Su ARN mensajero presenta un “*splicing*” alternativo que da lugar a las isoformas (proteínas angiogénicas similares) que constituyen la familia VEGF<sup>50</sup>.

La expresión del gen *VEGF* es regulada por distintos estímulos: hipoxia, factores de crecimiento, p-53, estrógenos, tirotrópina o TSH, óxido nítrico. Bajo condiciones de hipoxia la célula sintetiza el factor de transcripción HIF (factor inducible por hipoxia)

que induce la expresión del gen *VEGF*<sup>51</sup>. Valladares et al<sup>52</sup> publicaron un estudio donde objetivaron que las células de cáncer de ovario estimuladas por estradiol producían niveles mayores de proteína VEGF mediado por la activación de receptores  $\alpha$ .

VEGF pertenece a una familia de seis miembros que regulan el crecimiento y diferenciación de los componentes del sistema vascular, especialmente de los vasos linfáticos y vasos sanguíneos (Tabla 3). El VEGF-A es el miembro principal, conocido como VEGF, es una glicoproteína de 45 kDa, homodimérica y básica<sup>53</sup>.

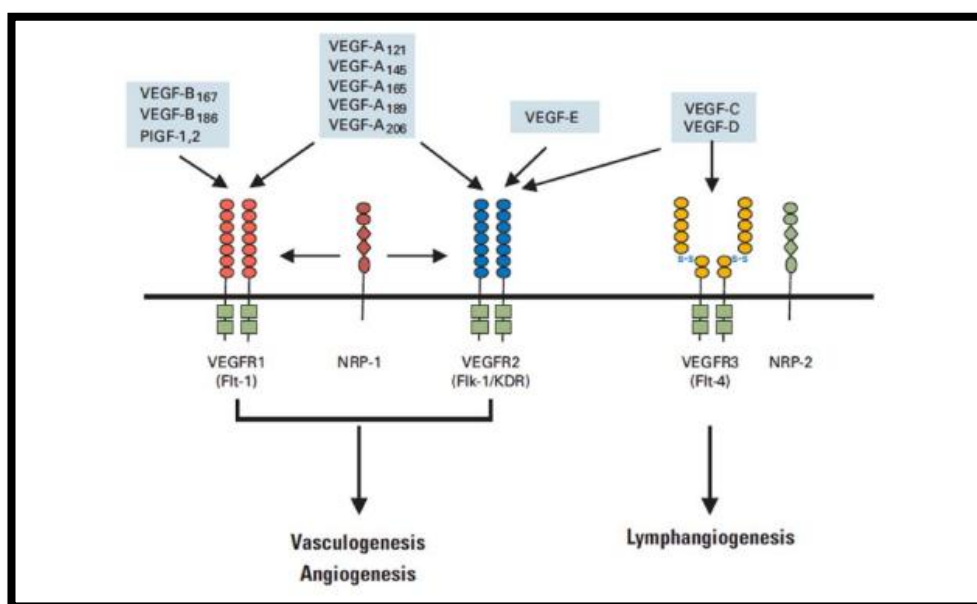
Tabla 3. Miembros de la familia VEGF, receptores y principales funciones.

Miembros de la familia VEGF	Receptores	Funciones
<b>VEGF (VEGF-A)</b>	VEGFR-1	Angiogenesis
	VEGFR-2	Mantenimiento vascular
	Neuropilina-1	
<b>VEGF-B</b>	VEGFR-1	Desconocido
<b>VEGF-C</b>	VEGFR-2	Linfangiogénesis
	VEGFR-3	
<b>VEGF-D</b>	VEGFR-2	Linfangiogénesis
	VEGFR-3	
<b>VEGF-E (factor viral)</b>	VEGFR-2	Angiogenesis
<b>Factor de crecimiento placentario (PIGF)</b>	VEGFR-1	Angiogenesis
	Neuropilina-1	Inflamación

Todas las proteínas comparten una estructura molecular típica, pero tienen diferente actividad biológica como resultado de su distinta afinidad a los receptores VEGF.

Las proteínas VEGF se unen a receptores tirosin-quinasas VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR/Flk-1) y VEGFR3 y a co-receptores no enzimáticos: neuropilina-1 y 2 (Nrp-1 y Nrp-2). Al unirse VEGF al receptor se produce una dimerización del receptor y su autofosforilación, provocando una cascada de señales intracelulares que inducen el aumento de la permeabilidad vascular y la angiogénesis.

El receptor VEGFR-1 se une a VEGF, VEGF-B y PlGF; se caracteriza por una gran afinidad por VEGF aunque tiene una baja actividad tirosin-quinasa. El receptor VEGFR-2 es el mediador predominante de la vía de la señalización angiogénica inducida por VEGF; tiene menor afinidad por VEGF pero se caracteriza por una gran actividad quinasa. El receptor VEGFR-3 se une a VEGF-C y VEGF-D; y sus funciones están implicadas en la angiogénesis y linfangiogénesis en los adultos (*Figura 13*).



*Figura 13. Esquema de la familia VEGF y sus receptores.*

Los **polimorfismos genéticos** son variantes del genoma, que aparecen en algunos individuos por mutaciones, y pueden ser silentes, proporcionar ventajas o contribuir a enfermedades. Los más frecuentes son los cambios de una única base, llamados polimorfismos de un único nucleótido (SNP). Se conocen al menos 30 polimorfismos en este gen *VEGF*, que influyen en la expresión del gen, producción y concentración de la proteína VEGF<sup>54</sup>. Estos SNPs afectan a la angiogénesis y podrían relacionarse con una variación intraindividual del riesgo y progreso de tumores y con la resistencia a los tratamientos.

Varios SNPs se localizan en la región del promotor o en las regiones no traducidas (UTR) 3' y 5'; por ejemplo -2578 C/A, -1154 G/A, -634 G/C desde la posición de inicio de la transcripción (UTR 5'), el +936 C/T en la región 3' UTR.

UTR 3' y 5' contienen los elementos reguladores sensibles a la hipoxia por lo que contribuyen a la alta variabilidad de la síntesis de VEGF en los tejidos. Los SNPs localizados en UTR 5' afectan a la eficacia de la traducción de la proteína y los de la UTR 3' influyen en las concentraciones plasmáticas y en la expresión de VEGF en los tejidos. Sin embargo, se cree que solo unos pocos polimorfismos causan un efecto en la traducción de VEGF<sup>46</sup>. Los genotipos -2578 C/A, -1154 G/G y -634 G/C parecen estar asociados a una mayor expresión de VEGF<sup>55,56</sup>. Los alelos -2578C, -1154G y +936C se asocian con un aumento de la expresión de VEGF<sup>57</sup>, mientras que el alelo +936T se correlaciona con una menor expresión de VEGF<sup>58</sup>. También se ha descrito que el alelo -2578A predispone a una disminución de la capacidad de producción proteica de VEGF<sup>59</sup>.

Hay estudios publicados en la literatura que han analizado la correlación entre la expresión de VEGF en diferentes tipos de cáncer y su pronóstico<sup>60,61,62</sup>. El alelo +936T se asocia con menor riesgo en el cáncer de mama pero con un mayor riesgo en el cáncer colorrectal (CCR), y el alelo -634C se asocia con mayor riesgo de cáncer prostático y menor riesgo de CCR.

Un estudio realizado en población femenina polaca portadoras de la mutación *BRCA 1*, concluyó que el polimorfismo y alelo +936T se asociaba con menor riesgo de cáncer de mama, y a una tendencia no significativa de menor riesgo de cáncer de ovario<sup>63</sup>.

Muchos estudios resaltan la importancia de los niveles de VEGF en suero con fines diagnósticos y propósitos terapéuticos<sup>64,65,66,67,68</sup>.

Especialmente en cáncer de ovario, la expresión de la proteína VEGF y los niveles de VEGF en ascitis, se han correlacionado con estadios avanzados de la enfermedad y peor supervivencia<sup>69,70,71</sup>.

Se ha descrito que las células cancerígenas del cáncer de ovario que sobreexpresan VEGF tienen mayor capacidad de metastatizar que las que no lo sobreexpresan<sup>72</sup>. De esta manera, inhibir VEGF podría reducir el crecimiento tumoral, la producción de ascitis y suprimir la capacidad de invasión y metástasis<sup>73</sup>.

VEGF también está implicado en la diseminación del cáncer de ovario interactuando en el microambiente del tumor; así So et al<sup>74</sup>, demostraron que la vía LPA (ácido lisofosfatídico) está mediada por VEGFR-2, que contribuye a la secreción y activación de MMP-2 (metaloproteasa) y activador de plasminógeno tipo uroquinasa.

Sin embargo, hay muy pocos estudios publicados sobre los polimorfismos del gen *VEGF* en pacientes con cáncer de ovario y su asociación con la supervivencia libre de enfermedad<sup>75</sup>. En nuestro estudio se correlacionan cinco polimorfismos del gen *VEGF* con la supervivencia global y el tiempo libre de enfermedad.

## II.E ANTIANGIOGÉNESIS

En el proceso de la angiogénesis también intervienen los **factores antiangiogénicos** como por ejemplo endostatina, trombospondina 1 y el factor derivado del epitelio pigmentario (*PEDF*).

El gen *PEDF* tiene una homología de secuencia extensa con la familia del gen de la serpina y su secuencia genómica se representa por SEQ ID NO:43. La ubicación del gen es 17p13.1, muy próxima al gen supresor de tumores p53, así como a la ubicación cromosómica de varios genes implicados en cánceres hereditarios no relacionados con mutaciones en el producto del gen p53; convirtiéndose en gen candidato principal para estos cánceres. Abarca aproximadamente 16 Kb y contiene 8 exones que tienen todos sitios de corte y empalme consenso convencionales<sup>76</sup>.

El factor derivado del epitelio pigmentario se aisló de las células pigmentarias de la retina humana y se ha demostrado que posee actividad antiangiogénica<sup>77</sup>. En el ojo humano, *PEDF* regula la neovascularización anormal mediante su reducción pero recientemente hay evidencia sobre su implicación en la regulación de la angiogénesis que interviene en el desarrollo de la vascularización tumoral. Su expresión esta inversamente relacionada con la progresión del cáncer<sup>78</sup>, la densidad microvascular tumoral<sup>79,80</sup>, el potencial metastático<sup>81</sup> y un pronóstico más desfavorable; situando este factor como posible tratamiento antitumoral.

La fuente de *PEDF*, concretamente el epitelio pigmentario de la retina (EPR), puede ser crucial para el desarrollo y función normales de la retina neural. Las células del EPR sintetizan y secretan una variedad de moléculas, incluyendo factores de crecimiento bien conocidos como PDGF, FGF, TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ . *PEDF* se expresa en

tejido fetal y en tejido adulto; incluyendo cerebro, medula espinal, ojo, plasma, hueso, próstata, páncreas, corazón y pulmón<sup>82</sup>.

La regulación de *PEDF* no está muy clara, pero se sabe que el estrés oxidativo como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduce la expresión de *PEDF* de manera dosis dependiente. Está descrito que la hipoxia es un fuerte estímulo de la angiogénesis; y se conoce que eleva los niveles de VEGF y disminuye la secreción de *PEDF*<sup>83</sup>. *PEDF* induce la apoptosis de manera directa sobre las células tumorales y células endoteliales inhibiendo la proliferación, invasión y metástasis; y de manera indirecta, actuando como antiangiogénico<sup>84</sup>. Actúa sobre la familia de proteínas Bcl-2 (la mayor reguladora de la apoptosis celular)<sup>85</sup>; en células del glioma se demostró su efecto positivo sobre Bax (proteína pro-apoptótica) y efecto negativo sobre Bcl-2 (anti-apoptótica); y además, se objetivó que inducía la actividad del gen supresor p53 en las células gliales, aunque sus mecanismos son desconocidos<sup>86</sup>.

*PEDF* es un potente inhibidor de la angiogénesis; previene la formación de nuevos vasos de manera más efectiva que otros inhibidores de la angiogénesis como la angioestatina, trombospondina 1 y endostatina. Inhibe la proliferación vascular y migración de células endoteliales inducido por el mecanismo de actuación del VEGF; por todo ello es considerado actualmente el factor antiangiogénico más potente en los humanos (*Figura 14*)<sup>87</sup>.

Los efectos de *PEDF* se han analizado en distintos tipos de tumores, como próstata<sup>88</sup>, ovario<sup>89</sup>, páncreas<sup>90</sup>, melanomas<sup>86</sup>, gliomas<sup>91</sup> y osteosarcoma<sup>92</sup>.

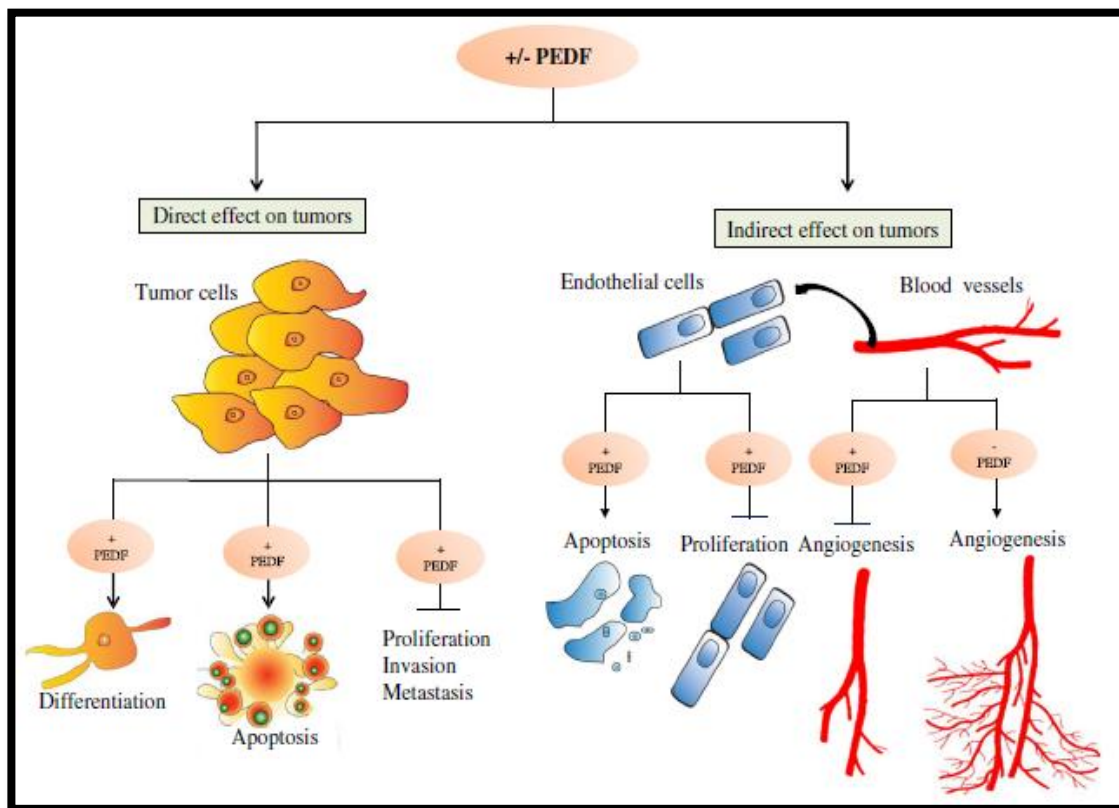


Figura 14. Efectos de PEDF: directos e indirectos. (-) PEDF como ausencia de PEDF, (+) PEDF como presencia de PEDF; flecha indica activación, (--) indica inhibición<sup>84</sup>.

En el cáncer de ovario los estudios centrados en este marcador son escasos. Solo existen dos referencias sobre el posible valor biológico de este factor en el cáncer de ovario. Un estudio de 13 muestras de tejido ovárico benigno y 36 de tejido maligno refleja como la expresión inmunohistoquímica fue significativamente más alta en el tejido ovárico normal que en el cáncer epitelial de ovario<sup>89</sup>. Otro estudio mediante PCR y Western-Blot evidenció que los niveles de expresión de PEDF en los tumores malignos de ovario eran significativamente inferiores a los de tumores benignos y que la reducción en los niveles de expresión de PEDF pueden ser, en parte, responsables de la malignidad del tumor así como un marcador útil de malignidad<sup>93</sup>.

Dado el interés que conlleva la relación angiogénesis y antiangiogénesis en el desarrollo de tumores y en concreto en el cáncer de ovario, el proyecto de esta tesis doctoral consiste en analizar la implicación de los genes *VEGF* y *PEDF*; ya que pueden ser dianas terapéuticas para el tratamiento de este tumor con su característica elevada morbimortalidad.

# **OBJETIVOS**

### III OBJETIVOS

1. Estudiar el posible el valor pronóstico en términos de supervivencia global de la expresión de los genes *VEGF* y *PEDF* en el carcinoma epitelial de ovario.
2. Realizar el análisis de los polimorfismos -2578 C/A, -1154 G/A, -460 T/C, +405 G/C y +936 C/T del gen *VEGF* en pacientes con carcinoma ovárico y estudiar su relación con los niveles de VEGF en suero.
3. Realizar la determinación de la proteína VEGF en el suero de las pacientes afectas de carcinoma de ovario y evaluar su correlación con sus variables clínico-patológicas.
4. Analizar la expresión del gen *PEDF* en el tejido maligno de ovario y su relación con las variables histopatológicas.
5. Estudiar la relación entre los niveles de expresión de *PEDF* y *VEGF* y evaluar el balance resultante con las variables pronóstico clásicas del cáncer de ovario.

6. Analizar la relación entre los niveles de expresión de *PEDF* y *VEGF* y su balance con la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer de ovario.
  
7. Realizar el análisis comparativo de los polimorfismos del gen *VEGF*, niveles de *VEGF* en suero y expresión de *PEDF* en pacientes con cáncer de ovario, tumores benignos de ovario y tejido ovárico sano.

**PACIENTES**

**Y**

**MÉTODOS**

## **IV PACIENTES Y MÉTODOS**

El estudio se ha realizado en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid, desarrollado de manera multidisciplinar por el Instituto de Salud de la Mujer José Botella Llusía y el Laboratorio de Genómica del Servicio de Análisis Clínicos, durante el periodo comprendido 2012-2016.

Se trata de un estudio prospectivo observacional de cohortes clínica de mujeres con cáncer de ovario; con una selección de dos series de pacientes controles (mujeres con patología benigna ovárica y tejido ovárico sano) con el objetivo de comparar los polimorfismos del gen *VEGF*, niveles de VEGF en suero y expresión de PEDF.

La población de estudio incluye un total de 113 mujeres: 46 pacientes con cáncer epitelial de ovario (17 de ellas tratadas con quimioterapia neoadyuvante), 31 pacientes con tumores benignos de ovario y 36 muestras de tejido ovárico de mujeres sanas.

Todas las pacientes firmaron el consentimiento informado (ANEXO I). La cirugía correspondiente fue realizada en Hospital Clínico San Carlos desde febrero de 2012 hasta febrero de 2015. El periodo de seguimiento se realizó hasta agosto de 2016.

El comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos aprobó este estudio con código 12/D85-7 (ANEXO II).

Los criterios de inclusión y exclusión del estudio realizado son los siguientes:

**Criterios de inclusión:**

- Mujeres mayores de 18 años.
- Pacientes diagnosticadas de carcinoma epitelial de ovario en el Hospital Clínico San Carlos, y tratadas, mediante cirugía primaria, o cirugía de intervalo tras neoadyuvancia.
- Pacientes con patología benigna de ovario intervenidas en el Hospital Clínico San Carlos.
- Mujeres con consentimiento informado firmado para la cesión de datos personales y de muestras biológicas.

**Criterios de exclusión:**

- Mujeres embarazadas.
- Pacientes diagnosticadas de tumores no epiteliales de ovario.
- Pacientes diagnosticadas de tumores de ovario metastásico.
- Pacientes con recidivas tumorales en las que previamente no se haya recogido muestra tumoral de la primera cirugía diagnóstica.
- Pacientes con quistes ováricos benignos de tipo endometriósico.
- Mujeres que no tengan firmado el consentimiento informado correspondiente.

## **IV.A METODOLOGIA CLINICA**

### **IV A 1. Etapa preoperatoria**

Se realizó una historia clínica completa de cada paciente en la consulta de Ginecología Oncológica del Hospital Clínico San Carlos, con la correspondiente anamnesis para identificar factores de riesgo, exploración física completa, estudio ecográfico valorando signos de malignidad (tamaño tumoral, coexistencia de áreas sólidas, bordes mal definidos, presencia de papilas, tabiques, ascitis y estudio Doppler con aumento de la vascularización y flujos de baja resistencia), analítica general y estudio de marcadores tumorales como CA 125 y CA 19.9, y pruebas de imagen complementarias como TAC abdomino-pélvico para la valoración de la extensión pélvica y abdominal, y otras si fueron necesarias como RNM abdomino-pélvica. Los datos fueron recogidos y archivados en una base de datos.

El algoritmo diagnóstico y terapéutico de cada paciente fue seleccionado según las recomendaciones de la SEGO (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia) y tras presentar cada caso en el Comité de Tumores en conjunto con el Servicio de Oncología del Hospital Clínico San Carlos. Los criterios utilizados para clasificar el estadio tumoral en el momento del diagnóstico fueron los establecidos según la clasificación FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) del año 2014.

Se recogieron dos muestras de sangre periférica de cada paciente para el estudio antes de la cirugía.

#### **IV A 2. Etapa operatoria**

La cirugía propuesta para cada paciente fue realizada por ginecólogos en el Hospital Clínico San Carlos.

Las pacientes con cáncer de ovario fueron sometidas a una estadificación quirúrgica mediante laparotomía o laparoscopia (en estadios iniciales); realizándose una cuidadosa inspección intraabdominal. El procedimiento quirúrgico incluyó lavado peritoneal para evaluación citológica, omentectomía, apendicectomía (si sospechosa o confirmación histológica de tumor mucinoso), histerectomía total abdominal, anexectomía bilateral, biopsias peritoneales de zonas sospechosas (peritoneo vesical, fondo de saco, ambos parietocólicos, fosa ovárica del lado afecto y cúpula diafragmática si preciso), liberación de adherencias adyacentes al tumor primario y linfadenectomía pélvica y paraaórtica a lo largo de los vasos iliacos, aorta y cava entre arteria mesentérica inferior y vena renal izquierda. En el caso de las pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante se les realizó cirugía citorreductora secundaria a los 3-6 meses.

Las cirugías de patología benigna de ovario fueron realizadas mediante abordaje laparoscópico siempre que fue posible, realizando anexectomía unilateral. El tejido ovárico sano se obtuvo de mujeres sin patología anexial en el transcurso de cirugía de histerectomía y doble anexectomía por patología uterina u otras indicaciones como prolapsos, etc.

En dicho acto quirúrgico se obtuvieron muestras de tejido para el estudio histológico correspondiente y para el análisis de ARN en el Laboratorio de Genómica. Todo el material histológico obtenido fue analizado en el Servicio de Anatomía

Patológica del Hospital Clínico San Carlos por dos facultativos expertos en Ginecología Oncológica. Para el estudio anatómo-patológico se obtuvieron muestras de carcinoma de ovario, tumores benignos de ovario y tejido ovárico sano. Se realizaron bloques de tejido fijados en formol tamponado al 10% e incluidos en parafina. Las muestras seleccionadas fueron identificadas mediante un código y junto con los datos de cada paciente fueron archivados con las medidas de seguridad adecuadas en cumplimiento con la Ley Orgánica 15/1999 de protección de datos. Se realizaron cortes del tejido incluido en parafina para una posterior tinción con hematoxilina-eosina y valorar así el grado tumoral según criterios de la OMS.

#### **IV A 3. Etapa post operatoria**

Se realizó un seguimiento clínico en las consultas de Ginecología Oncológica, y las pacientes con cáncer de ovario fueron remitidas a consulta de Oncología Médica para tratamiento adyuvante siendo de primera elección la asociación de paclitaxel con carboplatino. Las recomendaciones de la SEGO sobre las pacientes de bajo riesgo, estadios IA-IB grado I y una correcta cirugía de estadificación, apoyan que no es necesario tratamiento adyuvante dada la alta supervivencia a largo plazo.

El esquema de seguimiento realizado fue el propuesto por la SEGO, exploración física con valoración pélvica, marcadores tumorales (CA 125 en tumores epiteliales y CA 19.9 especialmente en tumores de estirpe mucinosa), y TAC abdominopélvico. Las visitas se realizaron cada 3-6 meses durante los dos primeros años, cada 6 meses los siguientes tres años y con carácter anual a partir de los cinco años. La recidiva de la enfermedad fue diagnosticada según la clínica y pruebas de imagen complementarias. Todas fueron confirmadas según el sistema RECIST; con biopsia y estudio histológico cuando fue posible.

## **IV.B METODOLOGIA ANALITICA: TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR**

Todas las técnicas de Biología Molecular se realizaron en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico San Carlos. Para el procesamiento de las muestras sanguíneas de los casos y controles, se siguieron los siguientes pasos: separación del suero sanguíneo para la determinación de la concentración de la proteína *VEGF*; y extracción y cuantificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) para la determinación de los polimorfismos del gen *VEGF*: -2578 C/A, -1154 G/A, -460 C/T, +405 C/G y +936 C/T. Para facilitar la nomenclatura de las dos variables alélicas de cada polimorfismo, denominaremos variable normal o Wild Type (WT) al alelo C de rs699947, alelo G de rs1570369, alelo C de rs3025031, alelo C de rs2010963 y alelo C de rs3025039; y No Wild Type al alelo contrario (No WT). Para el análisis de la expresión génica de *PEDF* se realizó extracción y cuantificación del ácido ribonucleico (ARN).

### **IV B 1. Análisis de los niveles de la proteína VEGF en suero**

La determinación de la proteína VEGF se realizó en el suero de pacientes con cáncer y pacientes controles mediante la técnica de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Las muestras de suero fueron obtenidas mediante centrifugación de las muestras sanguíneas durante 15 minutos a 3.000 rpm. Tras este proceso, se realizaron dos alícuotas de cada muestras de suero y se congelaron a -40 °C hasta su procesamiento. La valoración de los niveles de *VEGF* se realizó mediante el enzimoimmunoanálisis tipo sándwich *Hu VEGF* ELISA kit (Invitrogen Life

Technologies). Este es un proceso en el que se usan anticuerpos para detectar los antígenos deseados, mediante la unión antígeno-anticuerpo que es analizada a través del marcaje con una enzima específica. La sensibilidad de esta técnica es menor de 5pg/ml, incluyendo una curva de estándares con concentraciones conocidas en el rango 1500 pg/ml – 0pg/ml.

El proceso se llevó a cabo en seis pasos diferenciados (*Figuras 15 y 16*) con diferentes incubaciones, a 37°C o a temperatura ambiente, para conseguir las reacciones enzimáticas correspondientes:

1. Se parte de una placa con 96 pocillos, preconjugado cada uno de ellos con anticuerpos específico para *VEGF* para que la reacción antígeno-anticuerpo quede inmobilizada.
2. Se añadieron 50µL de las muestras de los pacientes y de los controles y 100µL de los estándares incluidos en el kit. Estas muestras contienen los antígenos que se unirán a los anticuerpos adheridos a la placa.
3. Se incorporó un segundo anticuerpo específico para *VEGF* conjugado con biotina que también se une al antígeno presente en las muestras en un epítipo diferente.
4. Se añadió estreptavidina conjugada con la enzima HRP (peroxidasa de rábano) que se une al anticuerpo marcado con biotina.
5. Se incorporó el sustrato, tetrametilbenzidina (TMB) que, por la acción de la HRP, se convierte en una forma detectable, por lo que los pocillos en los está presente el complejo antígeno-anticuerpo presentan una variación en el color (azul).
6. Se añadió una solución de ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto generó un cambio en el color de las muestras (amarillo) proporcionando una señal cuantificable, siendo la intensidad de la señal directamente proporcional a la concentración de la proteína *VEGF*.

Por último se realizó la lectura espectrofotométrica a 450nm y la determinación de la concentración de cada muestra por comparación de la lectura de la densidad óptica con la curva estándar generada.

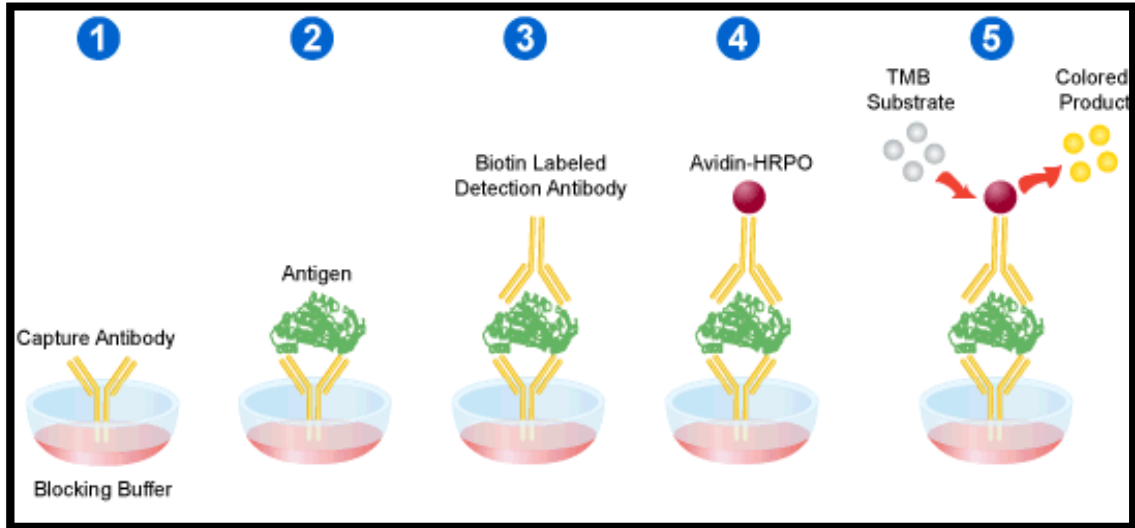


Figura 15. Esquema de las uniones antígeno-anticuerpo y del marcaje con HPR del ELISA tipo sándwich utilizado para la valoración de los niveles séricos de VEGF. Imagen obtenida en: [http://www.leinco.com/sandwich\\_elisa](http://www.leinco.com/sandwich_elisa)

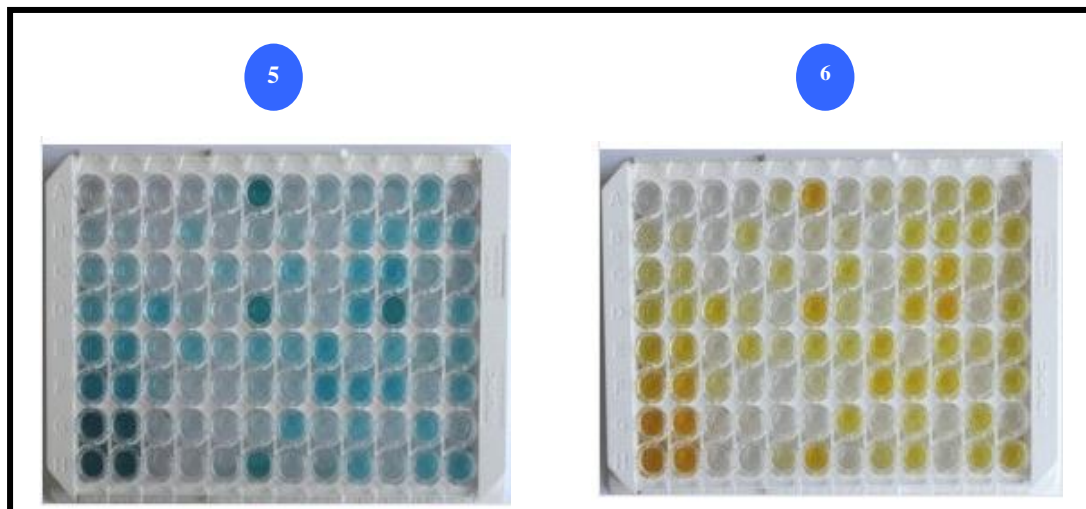


Figura 16. Esquema de los cambios colorimétricos generados por la acción de la enzima HPR (paso 5) y por el ácido sulfúrico (paso 6).

## IV B 2. Extracción y cuantificación del ácido desoxirribonucleico (ADN)

### Extracción del ADN

Se extrajo el ADN de las muestras de sangre, utilizando el Kit de extracción QIAamp DNA Mini ® (Qiagen), basado en la tecnología de membrana de gel de sílice, para el aislamiento y purificación del ADN genómico.

El ADN se obtuvo a partir de 200µl de la muestra de sangre fresca o congelada, que se mezcló con 20µl de proteasa (Qiagen) y 200µl de solución tampón de lisis, y se incubó durante 10 minutos a 56°C, para producir la lisis de las células presentes en la sangre. Posteriormente, se añadió 200µl de etanol al 100% para optimizar la unión del ADN a la membrana de la columna de centrifugación *QIAamp Mini*. El paso siguiente consistió en pasar la mezcla a una columna *QIAamp Spin* colocada sobre un tubo de 2ml, para que usando la fuerza de la centrifugación el ADN genómico se adsorbiera sobre la membrana de gel de sílice, a medida que la mezcla de lisado atravesara la columna. Finalmente se realizó el lavado de la membrana y la elución del ADN de la membrana en un volumen final de 200µl.

### Cuantificación del ADN

La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría (Thermo Scientific NanoDrop™). Se realizó una primera medición a 260nm para cuantificar el ADN de doble hebra. Se aplicó la fórmula:  $[ADN] = \Delta 260 \times 50\mu g/ml \times \text{factor de dilución}$ .

Se realizó una segunda medida a 280nm para confirmar la pureza del ADN. Considerándose el ADN puro cuando la relación entre las absorbancias  $\Delta 260/\Delta 280$  estaba comprendida entre 1,8 y 2. A continuación se congelaron las muestras de ADN a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento.

### **IV B 3. Estudio de los polimorfismos genéticos del gen del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (*VEGF*)**

#### **Polimorfismos -2578 C/A, -1154 G/A y +936 C/T**

La determinación de los polimorfismos -2578 C/A, -1154 G/A y +936 C/T del gen *VEGF* se realizó mediante la amplificación de cada secuencia, a partir del ADN extraído de las muestras de sangre, mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, combinado con un análisis de la curva de crecimiento exponencial del amplificado.

#### *Genotipado de polimorfismos mediante PCR en tiempo real*

Para cada SNP se emplearon dos cebadores específicos para acotar la región de interés y dos sondas tipo TaqMan específicamente diseñadas para discriminar las dos variantes alélicas con marcaje diferencial. Las sondas seleccionadas se marcaron con moléculas fluorescentes distintas (fluoróforo), la sonda normal con la molécula FAM y la sonda mutada con la molécula TET. Las tablas 4, 5 y 6 muestran las secuencias de los cebadores y sonda utilizadas en cada polimorfismo estudiado.

Tabla 4. Secuencias de cebadores y sondas del polimorfismo -2578 C/A

<b>POLIMORFISMO -2578 C/A</b>	
Cebador sentido	5' CCA CAG AGG CTA TGC CAG CTG TA 3'
Cebador antisentido	5'GGT TTC TGA CCT GGC TAT TTC CA 3'
Sonda normal	FAM-ACC CAG ATC <b>G</b> TG CCA G-MGB-NFQ
Sonda mutada	TET- CAC CCA GAT <b>CT</b> T GCC AG-MGB-NFQ

MGB: molécula que estabiliza las últimas pares de base de la sonda. NFQ: non fluorescent quencher.

Nucleótido en rojo indica la variación del SNP

Tabla 5. Secuencias de cebadores y sondas del polimorfismo -1154 G/A

<b>POLIMORFISMO -1154 G/A</b>	
Cebador sentido	5' CGG GCC AGG CTT CAC T 3'
Cebador antisentido	5'CCG CTA CCA GCC GAC TTT TAA 3'
Sonda normal	FAM-CTC AGC <b>CC</b> C TCC ACA C-MGB-NFQ
Sonda mutada	TET- CCT CAG <b>CCC</b> <b>T</b> TC CAC AC-MGB-NFQ

MGB: molécula que estabiliza las últimas pares de base de la sonda. NFQ: non fluorescent quencher.

Nucleótido en rojo indica la variación del SNP

Tabla 6. Secuencias de cebadores y sondas del polimorfismo + 936 C/T

<b>POLIMORFISMO +936 C/T</b>	
Cebador sentido	5' ACT CCG GCG GAA GCA TTC 3'
Cebador antisentido	5'AGC AAG AAA AAT AAA ATG GCG AAT CCA 3'
Sonda normal	FAM-CAA GAG GGA <b>CC</b> G TGC TG-NFQ
Sonda mutada	TET- AAG AGG GAC <b>CA</b> T GCT G-MGB-NFQ

MGB: molécula que estabiliza las últimas pares de base de la sonda.NFQ: non fluorescent quencher.

Nucleótido en rojo indica la variación del SNP

Cada polimorfismo se analizó mediante una reacción de PCR individual en la que se incluyeron estos dos cebadores que acotan el polimorfismo y las dos sondas tipo Taqman marcadas con diferentes fluoróforos, que incluyen la secuencia nucleotídica del polimorfismo, utilizando un equipo Smart Cycler® de Cepheid®.

Esta técnica está basada en el diseño de los dos oligonucleótidos marcados, uno con el extremo 5', por una molécula que emite fluorescencia (fluoróforo), y en el extremo 3' por una molécula receptora de la fluorescencia (*quencher*). Ambos oligonucleótidos marcados o sondas, difieren en la molécula emisora de la fluorescencia, para poder diferenciarlos y determinar el genotipo.

Cuando la sonda no hibrida con el ADN, durante la amplificación, el fluoróforo no emite fluorescencia, que pueda ser captada por el equipo Smart Cycler®, ya que el receptor absorbe esta frecuencia. Por el contrario, cuando la sonda hibrida con el ADN, se une al amplicón acotado por los cebadores seleccionados. Durante las fases de hibridación/extensión la actividad 5' exonucleasa de la enzima polimerasa rompe la sonda y escinde el fluoróforo. En este momento el receptor deja de absorber la fluorescencia emitida, y el equipo Smart Cycler detecta y cuantifica la señal fluorescente (*Figura 17*).

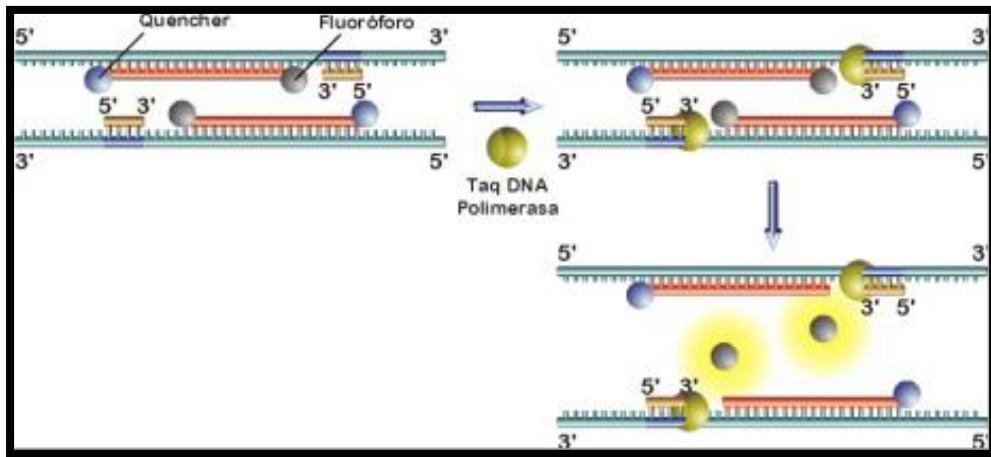


Figura 17. Esquema del funcionamiento de las sondas tipo TaqMan ([www.asuragen.com](http://www.asuragen.com)).

En función de los resultados, si se obtiene señal de sólo uno de los fluoróforos es que la muestra analizada es homocigota para el alelo correspondiente; y si obtenemos señal de los dos fluoróforos, la muestra es heterocigota para el SNP estudiado.

### Amplificación génica

Para cada paciente o control, y para cada polimorfismo, se realizó una amplificación génica. La mezcla de reactivos de la PCR a tiempo real contuvo 12,5µl de la preparación de enzima y tampón específico, *Taqman Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 2,5µl de cada cebador (sentido y antisentido) con una concentración de 10µM, 30ng del ADN de cada paciente, y la cantidad de agua necesaria para obtener un volumen final de 25µl.

Para analizar los polimorfismos -2578 C/A y +936 C/T, se realizó una desnaturalización inicial de 15 minutos a 95°C. A continuación se efectuaron 45 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95°C durante 15 segundos alternados con la

hibridación de los cebadores con las secuencias específicas de ADN a amplificar a 60°C durante 60 segundos en el Smart Cycler®<sup>94</sup>.

Para el polimorfismo -1154 G/A, el programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 15 minutos a 95°C, seguida por 50 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, hibridación de los cebadores a 62°C durante 60 segundos, extensión a 72°C durante 60 segundos.

Para comprobar que la amplificación fue realizada correctamente, se incorporaron dos controles: negativo y positivo. El negativo tenía todos los reactivos de la muestra, excepto el ADN, en su lugar tenía agua destilada; y el positivo una muestra de ADN con el polimorfismo *VEGF* conocido por secuenciación directa.

#### *Interpretación de los resultados*

Para la interpretación de las curvas de amplificación, estableciendo el umbral de fluorescencia en 30 para eliminar el ruido de fondo, se compararon los Ct (*Cycle threshold*, ciclo umbral) de cada reacción, para cada paciente y para cada sonda. El Ct es el ciclo de la PCR en el que el aumento del ADN amplificado se hace exponencial, siendo siempre anterior al ciclo 35 de la reacción.

Las sondas marcadas con el fluoroforo FAM discriminan el alelo normal y las sondas marcadas con el fluoroforo TET el alelo mutado. Según esto, una muestra homocigota normal presentará una curva alta y de aparición temprana con FAM y curva baja y tardía con TET (línea roja), una muestra heterocigota mostrará curvas intermedias con ambos marcajes (línea verde) y una muestra homocigota mutada

presentará una curva baja y tardía con FAM y alta y de aparición temprana con TET (línea negra) (Figuras 18 y 19).

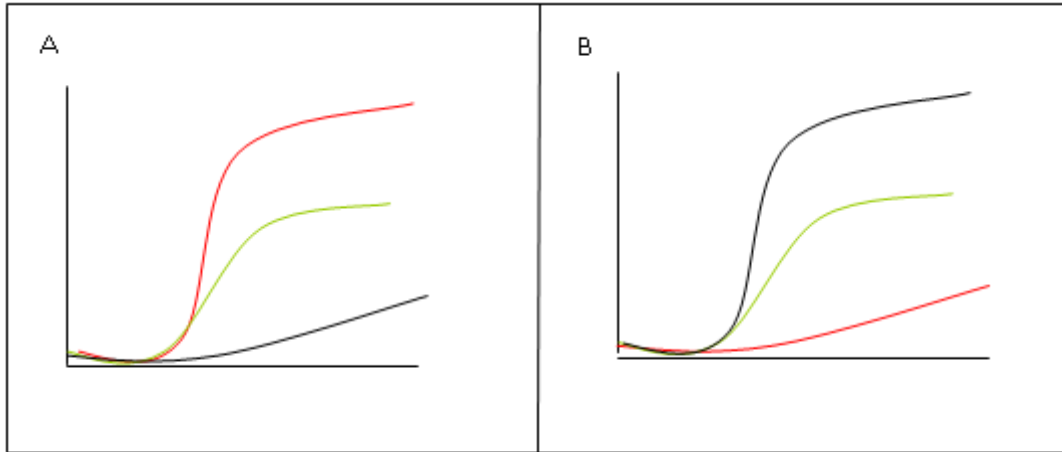


Figura 18: Esquema de interpretación de la amplificación de un SNP en función de la señal de fluorescencia del fluoróforo FAM (A) o del fluoróforo TET (B). Ejemplo de los 3 posibles genotipos: Homocigoto normal (línea roja), heterocigoto (línea verde) y homocigoto mutado (línea negra).

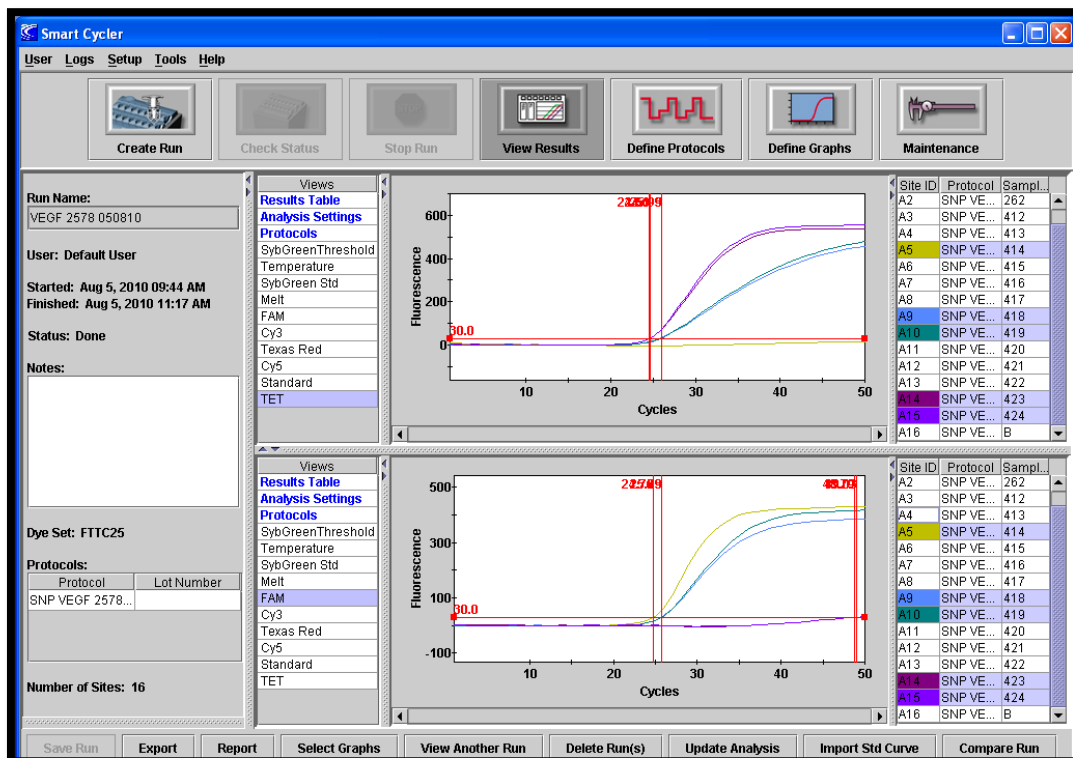


Figura 19. Ejemplo de los resultados mostrados por el termociclador a tiempo real Smart Cycler® para la interpretación de los SNP.

### Polimorfismos -460 C/T y +405 C/G

El análisis de los polimorfismos -460 C/T y +405 C/G se realizó mediante el método PCR-RFLP (*PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism*), que consiste en una PCR convencional seguida de una digestión enzimática que discrimina la presencia del polimorfismo.

#### Genotipado de polimorfismos mediante PCR-RFLP

Para cada SNP se emplearon dos cebadores específicos para acotar la región de interés y una enzima de restricción que realiza un corte en la doble cadena del ADN en la base nucleotídica que implica el SNP. Las tablas 7 y 8 muestran las secuencias de los cebadores utilizados en cada polimorfismo.

Tabla 7. Secuencias de cebadores del polimorfismo -460 C/T

<b>POLIMORFISMO -460C/T</b>	
Cebador sentido	5' CCT CTT TAG CCA GAG CCG GGG 3'
Cebador antisentido	5' TGG CCT TCT CCC CGC TCC GAC 3'

Tabla 8. Secuencias de cebadores del polimorfismo -405 C/G

<b>POLIMORFISMO -405C/G</b>	
Cebador sentido	5' CCG ACG GCT TGG GGA GAT TG 3'
Cebador antisentido	5' CGG CGG TCA CCC CCA AAA G 3'

Cada polimorfismo se analizó mediante una reacción de PCR convencional en la que se incluyeron los cebadores que acotan cada polimorfismo (con la amplificación se obtiene una gran cantidad fragmentos de ADN que incluyen el SNP). Posteriormente se somete cada amplificado a una incubación con una enzima de restricción específica que tiene como punto de reconocimiento uno de los alelos implicados en el polimorfismo de estudio. Esta técnica se basa en la especificidad de la enzima elegida para realizar un corte en la doble hebra de ADN amplificada previamente en el nucleótido de interés. Estas enzimas reconocen secuencias palindrómicas concretas y cortan los enlaces fosfodiéster de la doble hebra de ADN en sitios específicos, obteniendo así fragmentos de tamaños determinados.

Las enzimas de restricción utilizadas fueron BsaH1 para la detección del polimorfismo -460 C/T, y BsmF1 para la detección del polimorfismo +405 C/G. La enzima BsaH1 realiza un corte por delante del alelo C cuando este está presente, ya que reconoce la secuencia: 5'..GR**C**GY..3'. La enzima BsmF1 realiza la digestión del ADN cuando está presente el alelo G, ya que reconoce la secuencia: 5..'G**G**GAC(N<sub>10</sub>)..3'.

El análisis mediante electroforesis en agarosa muestra el número y el tamaño de los fragmentos obtenidos después de cada digestión enzimática, lo que indica la presencia o ausencia de los diferentes alelos<sup>95,96</sup>.

### Amplificación génica

Para cada paciente o control y para cada polimorfismo se realizó una amplificación génica. La mezcla de reactivos de la PCR contiene 0,22U de Taq polimerasa (*Amplitaq DNA polymerase*, Roche), 2,5µl de tampón para PCR 10x

(*Amplicor*, Roche), 2µl de MgCl<sub>2</sub> a 25mM, 0,5µl de dNTP, 1,5µl de cada cebador (sentido y antisentido) con una concentración de 10µM, 100ng del ADN de cada paciente, y la cantidad de agua necesaria para obtener un volumen final de 25µl. En cada ronda de amplificación se incluyó un control negativo para excluir una posible contaminación de los reactivos. El control contenía todos los reactivos de la mezcla de amplificación excepto el ADN que fue sustituido por agua destilada.

La PCR se realizó en un termociclador convencional, y para ello se sometió a cada mezcla de reacción a una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, a continuación se efectuaron 40 ciclos de 3 fases; una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, una hibridación de los cebadores con las secuencias específicas de ADN a 66°C durante 30 segundos y una extensión de la cadena amplificada a 72°C durante 30 segundos.

Los productos de la amplificación se sometieron a una digestión enzimática mediante una enzima de restricción. En este procedimiento se utilizaron 5µl de cada amplificado y 10U de cada enzima. Los fragmentos amplificados del SNP -460 C/T se incubaron con la enzima BsaH1 durante 2 horas a 37°C para la digestión y 20 minutos a 80°C para la inactivación proteica. Las secuencias amplificadas del SNP +405 C/G se incubaron con la enzima BsmF1 durante 3 horas a 65°C para la digestión y 20 minutos a 80°C para la inactivación proteica.

### *Interpretación de resultados*

Los fragmentos de ADN obtenidos tras la digestión enzimática se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3,5%. Se preparó el gel con 27ml de agua

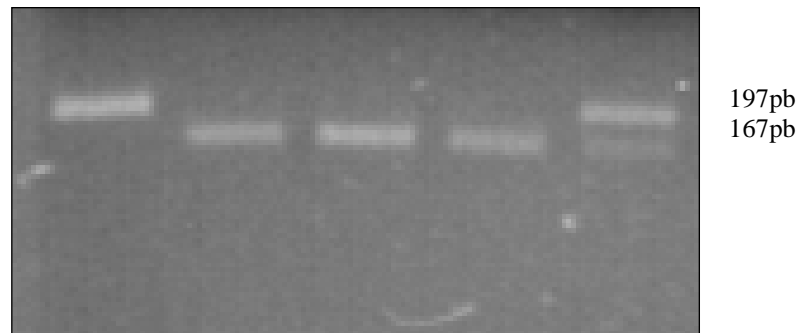
destilada, 3ml de Tris-Acetato EDTA 10x, 1gr de agarosa y 3µl de Bromuro de Etidio. Como marcador de peso molecular conocido se utilizó el *ADN Molecular Weight Marker VIII* (Roche) que muestra fragmentos de entre 19 y 1114pb. Una vez polimerizado el gel, se cargaron los productos amplificados y se sometió a 100V durante 35 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se sometió a una exposición a luz ultravioleta para visualizar las bandas de ADN amplificado y digerido en las que se ha intercalado el Bromuro de Etidio.

Para el análisis del SNP -460 C/T, se parte de un fragmento de 176pb obtenido en la amplificación. Tras la digestión con la enzima BsaH1, si está presente el alelo C se produce un corte en la doble cadena y se generan dos fragmentos de 154pb y 22pb; si solo está presente el alelo T no se genera ningún corte, siendo el fragmento visualizado de 176pb. En los casos de heterocigosis se observan tres fragmentos diferentes de 176pb, 154pb y 22pb (*Figura 20*).



*Figura 20. Gel de agarosa al 3,5% de los productos de digestión enzimática de los amplificadores del SNP VEGF -460 C/T. Se observa el genotipo TT en primera posición, el heterocigoto CT en segunda, tercera y quinta posición y el genotipo CC en último lugar.*

Para el análisis del SNP +405 C/G, se parte de un fragmento de 197pb obtenido en la amplificación. Tras la digestión con la enzima BsmF1, si está presente el alelo G se produce un corte en la doble cadena y se generan dos fragmentos de 167pb y 30pb, si solo está presente el alelo C no se genera ningún corte, siendo el fragmento visualizado de 197pb. En los casos de heterocigosis se observan tres fragmentos diferentes de 197pb, 167pb y 30pb (*Figura 21*).



*Figura 21. Gel de agarosa al 3,5% de los productos de digestión enzimática de los amplificadores del SNP VEGF +405 C/G. Se observan el genotipo CC en primera posición, el genotipo GG en segunda, tercera y cuarta posición y el heterocigoto GC en último lugar.*

#### **IB B 4. Extracción y cuantificación del ácido ribonucleico (ARN)**

##### Extracción del ARN

Se extrajo el ARN de las muestras de tejido incluidas en la solución preservante *RNAlater* (Sigma Aldrich), utilizando el Kit de extracción *RNeasy mini* (Qiagen), que se basa en la tecnología de membrana de gel de sílice, para el aislamiento y purificación del ARN celular.

El ARN se obtuvo a partir de 20-30 mg de tejido que se disgregó mecánica y químicamente con un tampón de lisis con  $\beta$ -mercaptoetanol. Posteriormente se añadió un volumen de etanol al 70%, para limpiar el lisado y precipitar el ARN extraído, y se depositó la mezcla en una columna *RNeasy mini spin* acoplada a un tubo colector de 2ml. Tras someter la muestra a una centrifugación, el ARN se adhiere a la membrana de la columna, y tras tres lavados de la membrana con los diferentes tampones incluidos en el kit, se añade a la columna 100  $\mu$ l de agua destilada estéril para eluir el ARN.

##### Cuantificación del ARN

La concentración de ARN se determinó por espectrofotometría (Thermo Scientific NanoDrop™). Se realizó una primera medición a 260nm para cuantificar el ARN total. Se aplicó la fórmula:  $[\text{ARN}] = \Delta 260 \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{factor de dilución}$ .

Se realizó una segunda medida a 230nm para confirmar la pureza del ARN. Considerando óptima la muestra de ARN cuando la relación entre las absorbancias  $\Delta 260/\Delta 230$  está comprendida entre 2 y 2,2, ya que si la ratio de las absorbancias es menor de lo esperado indica presencia de contaminación. A continuación se congelaron las muestras de ARN a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su posterior procesamiento.

#### IV B 5. Análisis de la expresión del gen *PEDF*

Tras valorar la concentración y calidad del ARN, se realizó el análisis de la expresión del gen *PEDF* en las muestras en las que se obtuvo al menos una concentración de ARN de 5ng/μl y una pureza en el rango establecido.

El análisis de la expresión de *PEDF* se analizó mediante una cuantificación relativa de su expresión en comparación con la expresión del gen de referencia *GAPDH*, que presenta una expresión constante. De esta manera se consigue una normalización de la expresión del gen problema, ya que si la cantidad de producto del gen constitutivo varía, es debido a cambios en la cantidad de ARN total empleada en la síntesis de ADNc, no a cambios en su expresión. Este análisis se llevó a cabo mediante una RT-qPCR (retrotranscripción cuantitativa) a tiempo real, analizando ambos genes por duplicado en cada muestra de tejido (tumor y control). Los cebadores utilizados para la amplificación se presentan en las Tablas 9 y 10.

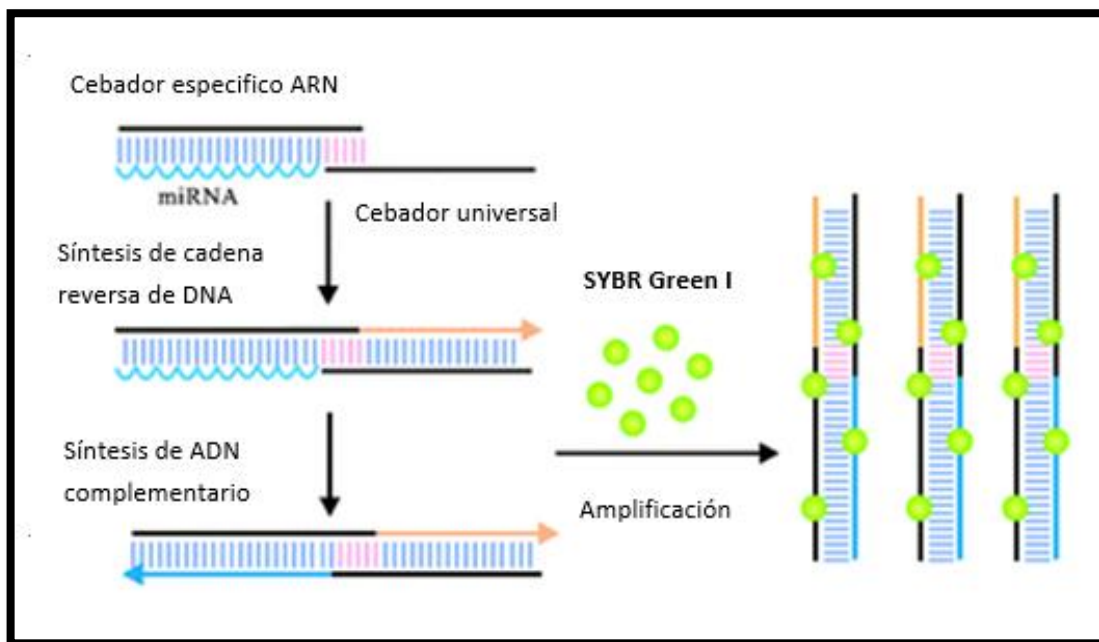
Tabla 9. Secuencias de cebadores para el gen a estudiar *PEDF*.

<b>GEN <i>PEDF</i></b>	
Cebador sentido	5' CCA TGA TGT CGG ACC CTA AG 3'
Cebador antisentido	5' GAA TGA ACT CGG AGG TGA GG 3'

Tabla 10. Secuencias de cebadores para el gen de referencia *GAPDH*.

<b>GEN <i>GAPDH</i></b>	
Cebador sentido	5' TCA ACG ACC ACT TTG TCA AGC TCA 3'
Cebador antisentido	5' GCT GGT GGT CCA GGG GTC TTAC T 3'

Esta técnica se realizó en una única preparación de PCR diferenciada en 2 fases; en primer lugar se realiza la retrotranscripción del ARNm (ARN mensajero) a ADNc (ADN complementario) con la enzima transcriptasa inversa y con cebadores universales, de forma que se realiza la retrotranscripción de todo del ARNm celular. El segundo paso consiste en la amplificación específica de la región de ADNc que queremos analizar usando los cebadores específicos previamente descritos y la enzima Taq Polimerasa (durante esta PCR la molécula fluorescente SYBR Green se intercala entre los nucleótidos de la doble hélice de ADNc de manera que hace posible visualizar el producto de la PCR) (*Figura 22*).



*Figura 22: Esquema de retrotranscripción y amplificación con marcaje fluorescente SYBR Green<sup>97</sup>.*

*Retrotranscripción del ARN y amplificación del ADNc*

Para la retrotranscripción y amplificación de cada gen se preparó una mezcla de reacción en un volumen final de 25µl, añadiendo 0,25µl de preparado para la retrotranscripción; cebadores, tampón y enzima retrotranscriptasa (*Quantitect RT-mix*, Qiagen), 12,5µl de preparado para la amplificación y marcaje; dNTPs, ADN polimerasa, *SYBR Green I*, tampón y MgCl<sub>2</sub> (*Quantitect SYBR green RT-PCR Master Mix*, Qiagen), 2,5µl de mezcla de ambos cebadores (*Quantitect assay*, Qiagen) y 10ng de ARN.

Utilizando el termociclador a tiempo real Smart Cycler® (Cepheid) se realizó en una sola reacción la retrotranscripción a 50°C durante 20 minutos y tras la activación de la Taq polimerasa a 95°C durante 15 minutos se llevó a cabo la amplificación del ADNc en 35 ciclos de 3 temperaturas; 94°C durante 1 segundo para la desnaturalización del ADNc, 55°C durante 30 segundos para la hibridación de los cebadores y 72°C durante 30 segundos para la elongación de la nueva cadena de ADN.

*Interpretación de los resultados*

Se generó una muestra estándar formada por la mezcla de 10 ARNs procedentes de tejidos ováricos control. La muestra de ARN estándar se diluyó desde 1:2 hasta 1:128 y se construyó una curva de calibración para cada gen, utilizando las mismas condiciones de RT-qPCR. Basándonos en la pendiente de cada curva estándar (-3,33 para *PEDF* y -3,46 para *GAPDH*) se aplicó la fórmula  $E=10[-1/pendiente]-1$  para calcular las eficiencias de la PCR en tiempo real.

Debido a que las curvas de calibración de ambos genes obtuvieron eficiencias elevadas y comparables, 94% para *PEDF* y 99% para *GAPDH*, el análisis de expresión de *PEDF* se realizó por el método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  y mediante el programa informático REST© (*relative expression software tool*) V2.0.13.<sup>98</sup>

#### *Cuantificación relativa normalizada*

La cuantificación de las moléculas de ARNm a estudiar se debe normalizar con la concentración total de ARNm presente en las muestras. Todas las moléculas de ARNm se encuentran sometidas a las mismas variaciones (durante el proceso de extracción y valoración del ARN, preparación de la PCR y amplificación del ADNc), tanto en controles como en pacientes, por lo que se utilizó el ARN estándar como calibrador para normalizar los resultados.

Se calculó la  $\Delta\text{Ct}$  para cada paciente y para cada control con la fórmula:  $\Delta\text{Ct}_{\text{paciente}} = (\text{Ct}_{\text{PEDF}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}})$ , y también para el ARN estándar;  $\Delta\text{Ct}_{\text{estándar}} = (\text{Ct}_{\text{PEDF}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}})$ . Posteriormente se normalizó cada paciente y control con el ARN estándar aplicando la fórmula  $\Delta\Delta\text{Ct}$  adaptada a cada muestra;  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{paciente}} - \Delta\text{Ct}_{\text{estándar}}$ , normalizando así la cantidad relativa de *PEDF* con el ARN estándar.

Tras realizar el análisis por el método  $\Delta\Delta\text{Ct}$ , comparamos el nivel de expresión génica de *PEDF* normalizado con *GAPDH*, mediante la variable  $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ , que nos indica cuantas veces más se expresa *PEDF* respecto a *GAPDH* en cada muestra<sup>99</sup>.

*Programa REST©*

El programa REST© se basa en la eficiencia de la PCR corregida matemáticamente para el análisis de datos. Este método calcula la expresión relativa del gen a estudiar basándose en la desviación media de Ct entre el grupo control y el grupo de pacientes, normalizados con el gen de referencia. REST© es un Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test®. Con esta tecnología se analizan las posibles diferencias en la expresión de *PEDF* entre el grupo de pacientes y el grupo de controles<sup>98</sup>.

#### **IV.C METODOLOGÍA ESTADÍSTICA**

Las variables cualitativas se presentaron con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumieron en su media y desviación estándar (DE) o su mediana y rango intercuartílico (RIC) para variables que no siguieron una distribución normal.

Se evaluó la asociación entre variables cualitativas con el test de  $\chi^2$  o prueba exacta de Fisher, en el caso de que más de un 25% de los esperados fueran menores de 5. Para la comparación de medias entre dos grupos independientes, en el caso que la variable cuantitativa se ajustara a una distribución normal, se empleó el test de la T de Student. Para la comparación de medias de más de dos grupos independientes se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA). Para las variables cuantitativas que no se ajustaron a una distribución normal se utilizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney para la comparación de la distribución de la variable entre dos grupos diferentes, y el test de Kruskal-Wallis para más de dos grupos.

Se estimaron las funciones de supervivencia por el método de Kaplan-Meier para cada una de las variables independientes para el estudio de los eventos mortalidad global y recidiva (tiempo libre de enfermedad). Se presentan las gráficas de las curvas estimadas. La comparación de las funciones de supervivencia de los distintos subgrupos se realizó mediante el test exacto de Breslow. Consiste en comparar el número de eventos observados en cada uno de los subgrupos con el número de eventos esperados en el caso de que la distribución de la variable dependiente fuera la misma en todas las categorías (hipótesis nula).

Se realizó un modelo univariado de regresión de riesgos proporcionales de Cox para cada una de las variables de interés para el evento mortalidad global. Se presentan los “razones de tasas” (hazard ratio, HR) junto a sus intervalos de confianza al 95%.

En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos.

En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I o error  $\alpha$  menor a 0,05.

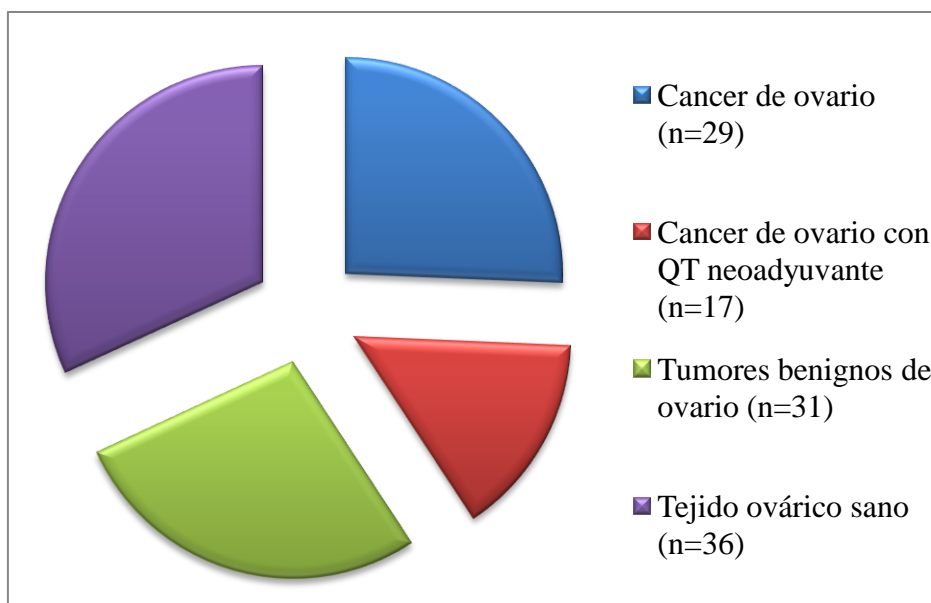
El paquete informático utilizado para el análisis fue SPSS para Windows versión 15.0.

# **RESULTADOS**

## V RESULTADOS

### V.A ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACION ESTUDIADA

El estudio incluye un total de 113 mujeres; de las cuales 46 fueron diagnosticadas de cáncer de ovario (17 de ellas tratadas con quimioterapia neoadyuvante), y otros dos grupos para realizar estudio comparativo con 31 pacientes con tumores benignos de ovario y 36 mujeres con tejido ovárico sano (*Figura 23*).



*Figura 23. Población de estudio: mujeres con cáncer de ovario, tratadas con quimioterapia neoadyuvante, tumores benignos de ovario y mujeres con tejido ovárico sano.*

#### Pacientes con cáncer de ovario

Las características de las pacientes con **cáncer de ovario** (n=46) se detallan en la Tabla 11. Las pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante (n=17) recibieron 3-4 ciclos de carboplatino y paclitaxel previo a la cirugía citorreductora del cáncer.

El 32,6% de las mujeres con cáncer tenían menos de 50 años, el 37% entre 51-65 años y el 30,4% tenían más de 65 años. La edad media fue 57,5 años. Todas las mujeres incluidas en el estudio fueron de raza caucásica.

El 28,2% tenían antecedentes familiares de cáncer ginecológico, y 8,6% antecedentes familiares de cáncer de pulmón o colon. El 78,3% de las pacientes habían tenido alguna gestación a lo largo de su vida.

La clínica que presentaron al diagnóstico fue variada: 6,5 % de las mujeres eran asintomáticas, 13% presentaba metrorragia, 13% astenia, 21,7% aumento de perímetro abdominal, 21,7% de las mujeres refirieron dolor abdominal, y el 23,9% fueron diagnosticadas tras un hallazgo ecográfico.

Se objetivó ascitis en el 47,8% de las mujeres, y derrame pleural en el 13%. La afectación bilateral ocurrió en el 43,2% de los casos; y se comprobó metástasis a distancia en el 43,5%.

Con respecto a la clasificación FIGO, el 70,5 % de los tumores fueron estadio III, 11,4% fueron estadio IV y solo 18,2% fueron estadio I. No hubo ningún caso de tumor epitelial de ovario estadio II.

El tumor histológico más frecuente fue el carcinoma seroso de ovario (63%), seguido del carcinoma endometriode con 13%, carcinoma mucinoso 8,7%, tipo células claras (6,5%) y 4,3% de tumores indiferenciados e inclasificables.

En 40 mujeres con cáncer epitelial de ovario se estudió la afectación del apéndice, objetivando que el 15% tenían el apéndice afecto. Del total de mujeres del estudio, se comprobó afectación de recto-sigma en el 17,4% de ellas.

El lavado peritoneal fue positivo en el 28,2% de las mujeres con estudio citológico realizado.

Con respecto al estudio ganglionar, el 77,5% de las mujeres no tuvieron ganglios positivos, mientras que el 10% presentó ganglios positivos pélvicos, el 2,5% paraaórticos y el 10% ambos.

La enfermedad residual postquirúrgica fue detallada en todos los casos. En el 44,4% se consiguió cirugía completa (sin evidencia macroscópica de tumor residual tras la cirugía); en el 40% de los casos se alcanzó cirugía óptima (implante de mayor tamaño de < 1 cm) y en el 15,6% cirugía subóptima (implante de mayor tamaño al finalizar la cirugía de  $\geq 1$  cm).

Tabla 11. Estudio descriptivo de las pacientes con cáncer de ovario (n=46).

Características	Nº pacientes	Porcentaje
<b>Edad</b>		
< 50	15	32,6 %
51-65	17	37,0 %
> 65	14	30,4 %
Media	57,5	
<b>Raza caucásica</b>	46	100 %
<b>Antecedentes familiares</b>		
Cáncer ginecológico	13	28,2 %
Cáncer de pulmón/colon	4	8,6 %
<b>Gestaciones previas</b>	36	78,3 %
<b>Clínica al diagnóstico</b>		
Asintomática	3	6,5 %
Metrorragia	6	13,0 %
Astenia	6	13,0 %
Masa/>perímetro abdominal	10	21,7 %
Dolor abdominal	10	21,7 %
Hallazgo ecográfico	11	23,9 %
<b>Presencia de ascitis</b>	22	47,8 %
<b>Presencia de derrame pleural</b>	6	13,0 %
<b>Afectación bilateral (n=44)</b>	19	43,2 %
<b>Metástasis a distancia</b>	20	43,5 %
<b>Quimioterapia neoadyuvante</b>	17	37,0 %
<b>Estadio FIGO</b>		
I	8	18,2 %
II	0	0,00 %
III	33	70,5 %
IV	5	11,4 %

Tabla 11 (Continuación). Estudio descriptivo de las pacientes con cáncer de ovario (n=46).

Características	Nº pacientes	Porcentaje
<b>Anatomía Patológica</b>		
Seroso	29	63,0 %
Mucinoso	4	8,7 %
Endometrioide	6	13,0 %
Células claras	3	6,5 %
Indiferenciado	2	4,3 %
Inclasificable	2	4,3 %
<b>Apéndice afectado (n=40)</b>	6	15,0 %
<b>Afectación recto-sigma</b>	8	17,4 %
<b>Lavado peritoneal (n=39)</b>		
Positivo	11	28,2 %
<b>Ganglios positivos</b>		
No	31	77,5 %
Pélvicos	4	10,0 %
Paraaórticos	1	2,5 %
Ambos	4	10,0 %
<b>Enfermedad residual</b>		
No	20	44,4 %
< 1cm	18	40,0 %
≥ 1 cm	7	15,6 %

El estudio de los marcadores tumorales en las pacientes con cáncer de ovario expresado con valores de la mediana y rango intercuartílico p25-p75 (RIC), fue el siguiente:

- Ca 125: 832,40 (RIC 229,20-1667,30)
- CEA: 1,4 (RIC 0,8-3,6)
- Ca 19.9: 11,30 (RIC 3,8-74,70)

Todas las pacientes diagnosticadas de cáncer epitelial de ovario recibieron quimioterapia adyuvante con una media de 6-8 ciclos (excepto tres pacientes diagnosticadas de cáncer de ovario de tipo mucinoso estadio IA que no recibieron dicho tratamiento).

La mediana de seguimiento del estudio fue de 32,7 meses (RIC 22,1-42,4 meses).

### Tumores benignos de ovario

La edad media de las pacientes diagnosticadas de **tumores benignos de ovario** fue de 47,9 años. El 54,8% tenían menos de 50 años, el 25,8% entre 51-65 años y el 19,4% eran mayores de 65 años. En esta población predominó la raza caucásica (83,9%) frente a la raza latino-americana (16,1%). El 35,5% de ellas fueron nuligestas, frente al 64,5% que habían tenido al menos una gestación.

El estudio anatómo-patológico de los tumores benignos de ovario incluidos en el estudio se detalla en la Tabla 12. El tumor benigno más frecuente fue cistoadenoma (11 casos, correspondiente al 35,5% del total), seguido de 9 mujeres que presentaron quiste

simple de ovario (29%), 6 diagnosticadas de tumor dermoide (19,4%) y por ultimo 5 mujeres con fibrotecoma (16,1%).

Tabla 12. Estudio anatómo-patológico de los tumores benignos de ovario (n=31).

Tumores benignos	Frecuencia	Porcentaje
<b>Dermoide</b>	6	19,4 %
<b>Fibrotecoma</b>	5	16,1 %
<b>Quiste simple</b>	9	29,0 %
<b>Cistoadenoma</b>	11	35,5 %

### Tejido ovárico sano

La edad media de las mujeres que aportaron muestras de **tejido ovárico sano** fue de 48,9 años. El 61,1% de las mujeres sanas tenían menos de 50 años, 33,3% entre 51-65 años y solo el 5,6% más de 65 años. El estudio anatómo-patológico confirmó tejido ovárico sano en todas ellas.

## V.B ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN *VEGF*

Se analizaron los cinco polimorfismos del gen *VEGF* (-2578 C/A, -1154 G/A, -460 C/T, +405 C/G y +936 C/T) en las 113 pacientes reclutadas, divididas en tres grupos de estudio (cáncer epitelial de ovario, tumores benignos de ovario y tejido ovárico sano). Los resultados se representan en la Tabla 13.

La distribución de los genotipos de *VEGF* -2578 C/A, -1154 G/A, +936 C/T y +405 C/G fue acorde al equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) en los tres grupos de estudio, mientras que el polimorfismo *VEGF* -460 C/T respetó el equilibrio en el grupo de pacientes con cáncer epitelial de ovario y tumores benignos de ovario, pero no en el grupo de estudio de las mujeres con tejido ovárico sano ( $\chi^2 = 5.03$ ,  $p = 0.02$ ).

El polimorfismo -2578 C/A en el grupo de mujeres con cáncer de ovario fue predominantemente heterocigoto C/A (54,3%), seguido de 23,9% A/A y 21,7% C/C; con la misma tendencia en el grupo de mujeres con tumores benignos de ovario que presentaron el 54,8% el genotipo C/A, el 25,8% C/C, y el 19,4% A/A; mientras que en el grupo de mujeres con tejido ovárico sano se objetivó con la misma frecuencia los genotipos C/A y C/C con 41,7%, y con menor porcentaje el genotipo A/A (16,7%).

Con respecto al polimorfismo -1154 G/A, en las mujeres con cáncer de ovario se objetivó mayor frecuencia de homocigosis G/G (45,7%), seguido de G/A en un 43,5% y de homocigosis A/A en 10,9%. En el grupo de tumores benignos de ovario se obtuvo la misma frecuencia de los genotipos G/A y G/G (41,9%), a diferencia del genotipo A/A con solo 16,1%; mientras que en las mujeres con tejido ovárico sano predominó el genotipo G/G (52,8%), seguido de G/A en 44,4% y A/A en 2,8%..

El polimorfismo -460 C/T se presentó como heterocigoto en la mayoría de mujeres con cáncer de ovario (52,2%), mientras que C/C se objetivó en el 26,1% y T/T en el 21,7%. Esta tendencia fue similar en el grupo de mujeres con tumores benignos de ovario, C/T en el 54,8% de mujeres, C/C en el 25,8% y T/T en el 19,4%; mientras que en el grupo de mujeres con tejido ovárico sano se objetivó que el 41,7% presentaron T/T, el 38,9% presentaron C/T y el 19,4% el genotipo C/C.

En cuanto al polimorfismo +405 C/G, la distribución fue similar en las mujeres con cáncer de ovario y tumores benignos, el genotipo más frecuente fue homocigoto G/G en 50% y 58,1% respectivamente, C/G en segundo lugar (39,1% y 29%) y por último C/C en 10,9% en mujeres con cáncer y 12,9% en mujeres con tumores benignos. En mujeres con tejido ovárico sano el 42,9% presentaron C/G, frente al 37,1% con el genotipo G/G y el 20% con genotipo C/C.

Por último, el estudio del polimorfismo +936 C/T resultó similar en los tres grupos de estudio; el genotipo más frecuente en los tres grupos fue C/C (78,3% en mujeres con cáncer de ovario, 64,5% en mujeres con patología benigna y 72,2% en mujeres con tejido ovárico sano). El genotipo C/T se objetivó en el 19,6% de las mujeres con cáncer, 35,5% de las mujeres con tumores benignos y en el 22,2% de las mujeres con tejido ovárico sano; y el genotipo T/T, escasamente representado en todos los grupos (2,2% en mujeres con cáncer, ningún caso en mujeres con tumores benignos y 5,6% en mujeres con tejido ovárico sano).

Tabla 13. Análisis de los cinco polimorfismos del gen *VEGF* en los tres grupos de estudio.

SNPs	Cancer ovario (n=46)	Tumores benignos (n=31)	Tejido sano (n=36)	Valor P
<b>-2578 C/A</b>				
C/C	10 (21,7%)	8 (25,8%)	15 (41,7%)	0,371
C/A	25 (54,3%)	17 (54,8%)	15 (41,7%)	
A/A	11 (23,9%)	6 (19,4%)	6 (16,7%)	
<b>-1154 G/A</b>				
G/G	21 (45,7%)	13 (41,9%)	19 (52,8%)	0,392
G/A	20 (43,5%)	13 (41,9%)	16 (44,4%)	
A/A	5 (10,9%)	5 (16,1%)	1 (2,8%)	
<b>-460 C/T</b>				
C/C	12 (26,1%)	8 (25,8%)	7 (19,4%)	0,262
C/T	24 (52,2%)	17 (54,8%)	14 (38,9%)	
T/T	10 (21,7%)	6 (19,4%)	15 (41,7%)	
<b>+405 C/G</b>				
C/C	5 (10,9%)	4 (12,9%)	7 (20%)	0,451
C/G	18 (39,1%)	9 (29%)	15 (42,9%)	
G/G	23 (50%)	18 (58,1%)	13 (37,1%)	
<b>+936 C/T</b>				
C/C	36 (78,3%)	20 (64,5%)	26 (72,2%)	0,293
C/T	9 (19,6%)	11 (35,5%)	8 (22,2%)	
T/T	1 (2,2%)	0 (0%)	2 (5,6%)	

Se observó una asociación estadísticamente significativa entre la distribución de los polimorfismos (SNPs) en las pacientes con cáncer epitelial de ovario: -2578 C/A -1154 G/A ( $p < 0,001$ ), -2578 C/A -460 C/T ( $p < 0,001$ ), -2578 C/A +405 C/G ( $p < 0,001$ ), -1154 G/A -460 C/T ( $p < 0,001$ ), -1154 G/A + 405 C/G ( $p = 0,002$ ), -460 C/T +405 C/G ( $p < 0,001$ ); en pacientes con tumores benignos de ovario: -2578 C/A -1154 G/A ( $p < 0,001$ ), -2578 C/A -460 C/T ( $p < 0,001$ ), -2578 C/A +405 C/G ( $p = 0,001$ ), -1154 G/A -460 C/T ( $p = 0,001$ ), -1154 G/A + 405 C/G ( $p = 0,012$ ), -460 C/T +405 C/G ( $p < 0,001$ ); y en mujeres con tejido ovárico sano: -2578 C/A -1154 G/A ( $p < 0,001$ ), -2578 C/A -460 C/T ( $p < 0,001$ ), -2578 C/A +405 C/G ( $p < 0,001$ ), -1154 G/A -460 C/T ( $p < 0,001$ ), -1154 G/A + 405 C/G ( $p = 0,011$ ), -460 C/T +405 C/G ( $p < 0,001$ ).

Estas asociaciones se representan en las Figuras 24,25 y 26 según los grupos de estudio.

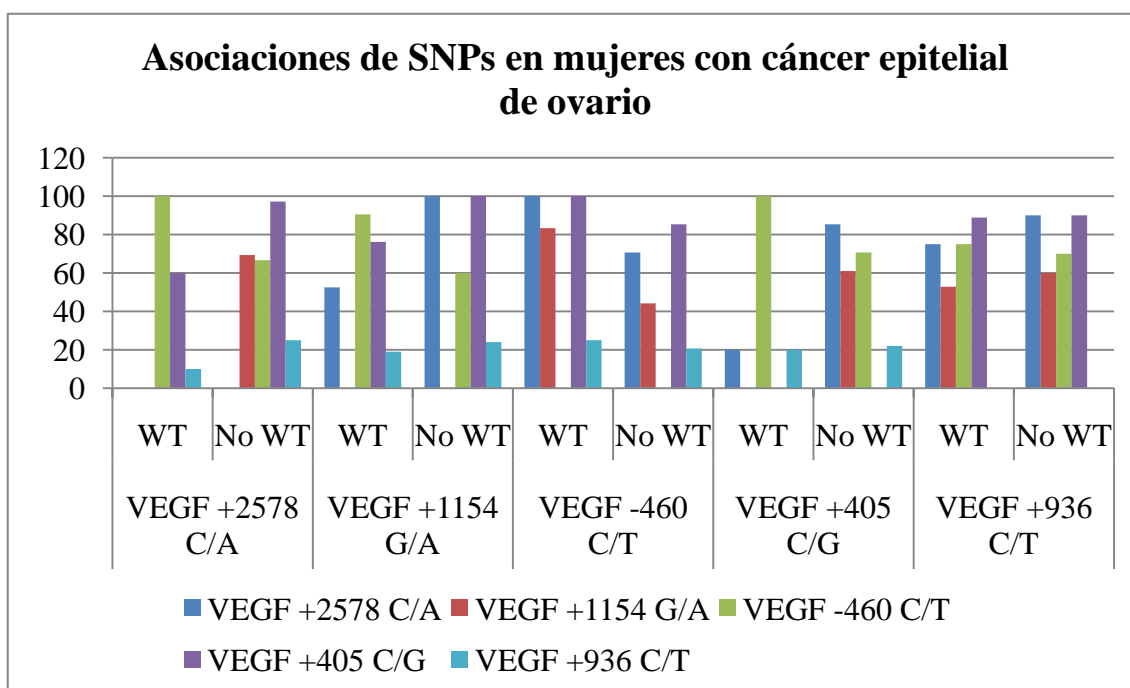


Figura 24. Asociaciones de SNPs en pacientes con cáncer de ovario. Wild type vs No Wild Type.

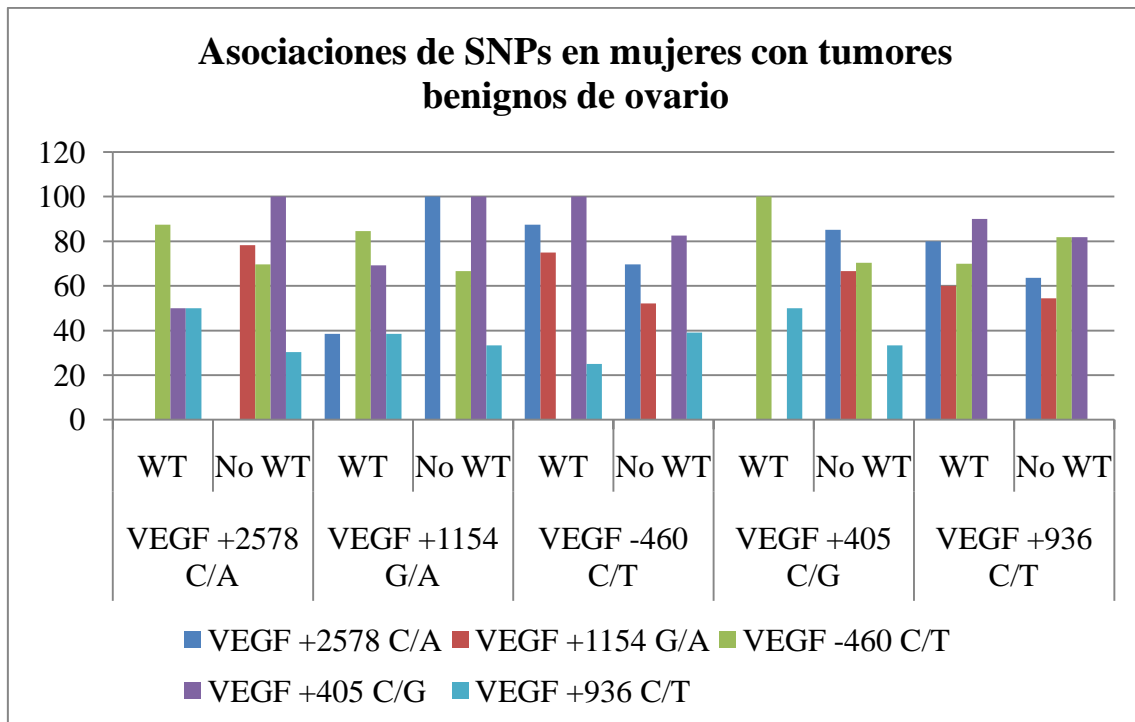


Figura 25. Asociaciones de SNPs en pacientes con tumores benignos de ovario, Wild type vs No Wild Type.

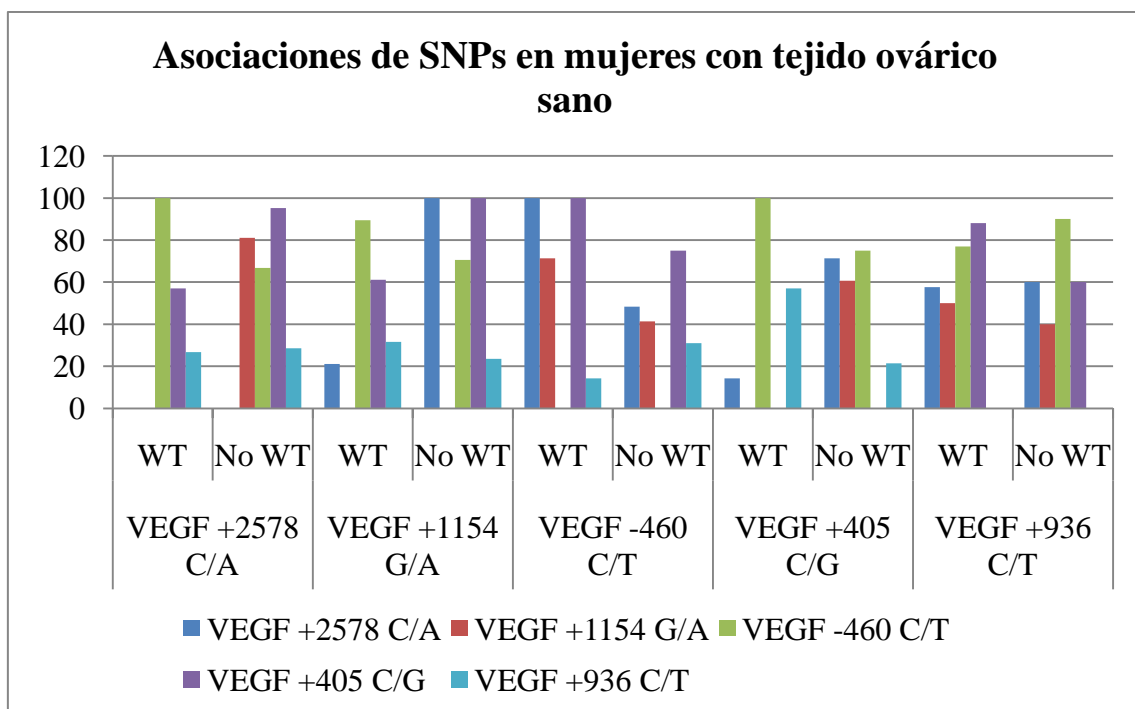


Figura 26. Asociaciones de SNPs en mujeres con tejido ovárico sano, Wild type vs No Wild Type.

Se analizó la relación entre las principales variables de estudio de las pacientes con cáncer (edad, estadio, estudio anatómico-patológico, enfermedad residual postquirúrgica, recidiva y muerte) y cada polimorfismo según si se presentaba como Wild Type (WT) o no Wild Type (No WT). Se representan los cinco polimorfismos en la Tablas 14-18.

En el estudio de *VEGF* -2578 C/A se observó menor probabilidad de muerte en las pacientes WT frente a no WT con tendencia estadística ( $p=0,064$ ); mientras que en el estudio de *VEGF* - 1154 G/A se alcanzó significación estadística ( **$p=0,051$** ).

Por otro lado, con respecto a la enfermedad residual postquirúrgica, se objetivó que en el análisis de *VEGF* - 1154 G/A WT presentaban menor enfermedad residual respecto a no WT ( **$p=0,009$** ); en contraste a la comparación de *VEGF* -460 C/T donde se objetivó que los WT presentaron más enfermedad residual post-cirugía ( **$p=0,001$** ).

No se objetivaron otras relaciones significativas del resto de variables en los cinco polimorfismos estudiados.

Tabla 14. Relación entre *VEGF* - 2578 C/A WT vs No WT y las principales variables de estudio en pacientes con cáncer de ovario.

Principales variables a estudio	<i>VEGF</i> - 2578 C/A (WT)	<i>VEGF</i> - 2578 C/A (No WT)	Valor p
<b>Edad</b>			
<50	2 (20 %)	13 (36,1 %)	0,537
51-65	5 (50 %)	12 (33,3 %)	
>65	3 (30 %)	11 (30,6 %)	
<b>Estadio</b>			
I	2 (20 %)	6 (16,7 %)	1,000
III-IV	8 (80 %)	30 (83,3 %)	
<b>Anatomía Patológica</b>			
Seroso	5 (50 %)	24 (66,7 %)	0,116
Mucinoso	3 (30 %)	1 (2,8 %)	
Endometriode	1 (10 %)	5 (13,9 %)	
Células claras	0 (0 %)	3 (8,3 %)	
Indiferenciado	1 (10 %)	1 (2,8 %)	
Inclasificable	0 (0 %)	2 (5,6 %)	
<b>Enfermedad residual</b>			
No	5 (55,6 %)	15 (41,7 %)	0,176
<1 cm	4 (44,4 %)	14 (38,9 %)	
≥1 cm	0 (0 %)	7 (19,4 %)	
<b>Recidiva</b>			
No	5 (50 %)	14 (38,9 %)	0,719
Si	5 (50 %)	22 (61,1 %)	
<b>Muerte</b>			
No	9 (90 %)	19 (52,8 %)	0,064
Si	1 (10 %)	17 (47,2 %)	

Tabla 15. Relación entre *VEGF* - 1154 G/A WT vs No WT y las principales variables de estudio en pacientes con cáncer de ovario.

Principales variables a estudio	<i>VEGF</i> - 1154 G/A (WT)	<i>VEGF</i> - 1154 G/A (No WT)	Valor p
<b>Edad</b>			
<50	5 (23,8 %)	10 (40 %)	0,341
51-66	10 (47,6 %)	7 (28 %)	
>65	6 (28,6 %)	8 (32 %)	
<b>Estadio</b>			
I	4 (19 %)	4 (16 %)	1,000
III-IV	17 (81 %)	21 (84 %)	
<b>Anatomía Patológica</b>			
Seroso	12 (57,1 %)	17 (68 %)	0,374
Mucinoso	3 (14,3 %)	1 (4 %)	
Endometrioides	4 (19 %)	2 (8 %)	
Células claras	1 (4,8 %)	2 (8 %)	
Indiferenciado	1 (4,8 %)	1 (4 %)	
Inclasificable	0 (0 %)	2 (8 %)	
<b>Enfermedad residual</b>			
No	10 (50 %)	10 (40 %)	<b>0,009</b>
<1 cm	10 (50 %)	8 (32 %)	
≥1 cm	0 (0 %)	7 (28 %)	
<b>Recidiva</b>			
No	8 (38,1 %)	11 (44 %)	0,685
Si	13 (61,9 %)	14 (56 %)	
<b>Muerte</b>			
No	16 (76,2 %)	12 (48 %)	<b>0,051</b>
Si	5 (23,8 %)	13 (52 %)	

Tabla 16. Relación entre *VEGF* - 460 C/T WT vs No WT y las principales variables de estudio en pacientes con cáncer de ovario.

Principales variables a estudio	<i>VEGF</i> - 460 C/T (WT)	<i>VEGF</i> - 460 C/T (No WT)	Valor p
<b>Edad</b>			
<50	5 (41,7 %)	10 (29,4 %)	0,737
51-65	4 (33,3 %)	13 (38,2 %)	
>65	3 (25 %)	11 (32,4 %)	
<b>Estadio</b>			
I	2 (16,7 %)	6 (17,6 %)	1,000
III-IV	10 (83,3 %)	28 (82,4 %)	
<b>Anatomía Patológica</b>			
Seroso	11 (91,7 %)	18 (52,9 %)	0,081
Mucinoso	1 (8,3 %)	3 (8,8 %)	
Endometrioides	0 (0 %)	6 (17,6 %)	
Células claras	0 (0 %)	3 (8,8 %)	
Indiferenciado	0 (0 %)	2 (5,9 %)	
Inclasificable	0 (0 %)	2 (5,9 %)	
<b>Enfermedad residual</b>			
No	3 (25 %)	17 (51,5 %)	0,001
<1 cm	3 (25 %)	15 (45,5 %)	
≥1 cm	6 (50 %)	1 (3 %)	
<b>Recidiva</b>			
No	4 (33,3 %)	15 (44,1 %)	0,735
Si	8 (66,7 %)	19 (55,9 %)	
<b>Muerte</b>			
No	7 (58,3 %)	21 (61,8 %)	1,000
Si	5 (41,7 %)	13 (38,2 %)	

Tabla 17. Relación entre *VEGF* + 405 C/G WT vs No WT y las principales variables de estudio en pacientes con cáncer de ovario.

Principales variables a estudio	<i>VEGF</i> + 405 C/G (WT)	<i>VEGF</i> + 405 C/G (No WT)	Valor p
<b>Edad</b>			
<50	1 (20 %)	14 (34,1 %)	0,540
51-66	3 (60 %)	14 (34,1 %)	
>65	1 (20 %)	13 (31,7 %)	
<b>Estadio</b>			
I	1 (20 %)	7 (17,1 %)	1,000
III-IV	4 (80 %)	34 (82,9 %)	
<b>Anatomía Patológica</b>			
Seroso	3 (60 %)	26 (63,4 %)	0,408
Mucinoso	1 (20 %)	3 (7,3 %)	
Endometrioides	0 (0 %)	6 (14,6 %)	
Células claras	0 (0 %)	3 (7,3 %)	
Indiferenciado	1 (20 %)	1 (2,4 %)	
Inclasificable	0 (0 %)	2 (4,9 %)	
<b>Enfermedad residual</b>			
No	2 (40 %)	18 (45 %)	0,338
<1 cm	3 (60 %)	15 (37,5 %)	
≥1 cm	0 (0 %)	7 (17,5 %)	
<b>Recidiva</b>			
No	2 (40 %)	17 (41,5 %)	1,000
Si	3 (60 %)	24 (58,5 %)	
<b>Muerte</b>			
No	3 (60 %)	25 (61 %)	1,000
Si	2 (40 %)	16 (39 %)	

Tabla 18. Relación entre *VEGF* + 936 C/T WT vs No WT y las principales variables de estudio en pacientes con cáncer de ovario.

Principales variables a estudio	<i>VEGF</i> + 936 C/T (WT)	<i>VEGF</i> + 936 C/T (No WT)	Valor p
<b>Edad</b>			
<50	11 (30,6 %)	4 (40 %)	0,226
51-65	12 (33,3 %)	5 (50 %)	
>65	13 (36,1 %)	1 (10 %)	
<b>Estadio</b>			
I	5 (13,9 %)	3 (30 %)	0,344
III-IV	31 (86,1 %)	7 (70 %)	
<b>Anatomía Patológica</b>			
Seroso	23 (63,9 %)	6 (60 %)	0,185
Mucinoso	3 (8,3 %)	1 (10 %)	
Endometriode	6 (16,7 %)	0 (0 %)	
Células claras	1 (2,8 %)	2 (20 %)	
Indiferenciado	1 (2,8 %)	1 (10 %)	
Inclasificable	2 (5,6 %)	0 (0 %)	
<b>Enfermedad residual</b>			
No	17 (48,6 %)	3 (30 %)	0,348
<1 cm	12 (34,3 %)	6 (60 %)	
≥1 cm	6 (17,1 %)	1 (10 %)	
<b>Recidiva</b>			
No	14 (38,9 %)	5 (50 %)	0,719
Si	22 (61,1 %)	5 (50 %)	
<b>Muerte</b>			
No	21 (58,3 %)	7 (70 %)	0,717
Si	15 (41,7 %)	3 (30 %)	

## V.C ESTUDIO DE NIVELES DE VEGF EN SUERO

Se analizaron los niveles de VEGF en el suero de las pacientes con cáncer (n=29) y en mujeres con tejido ovárico sano (n=36).

La mediana obtenida en pacientes con cáncer fue 90,90 pg/ml (RIC 40,65-158,50), mientras que en mujeres con tejido ovárico sano la mediana fue 106,50 pg/ml (RIC 61,98-200,50) ( $p= 0,518$ ) (Figura 27).

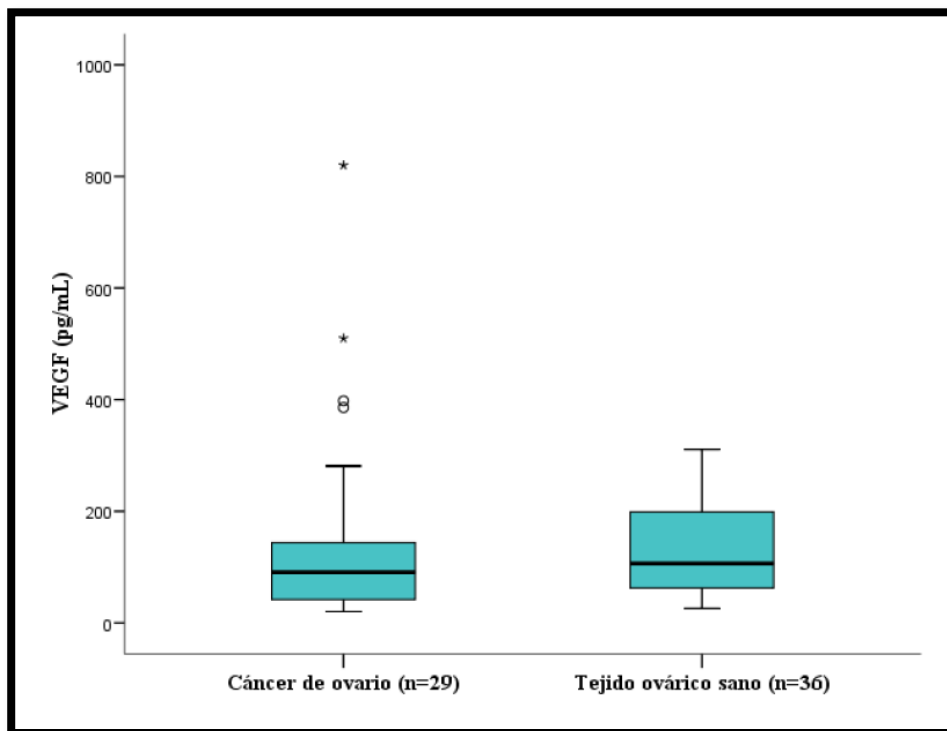


Figura 27. Mediana de los niveles de VEGF en suero en pacientes con cáncer de ovario vs mujeres con tejido ovárico sano.

Se estudió la relación entre los niveles de VEGF en suero y las características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer. Los resultados se detallan en Tabla 19.

Tabla 19. Relación de los niveles de VEGF en suero con las variables clínico patológicas en pacientes con cáncer de ovario.

Características clínico-patológicas	VEGF pg/ml	RIC	Valor p
Edad			
<50	129,00	80,10-144,00	0,578
51-65	86,90	32,20-333,50	
>65	76,00	34,2-165,0	
Estadio FIGO			
I	64,95	28,60-143,50	0,435
III	94,90	50,15-190,50	
Anatomía Patológica			
Seroso	88,95	54,28-149,00	0,038
Mucinoso	39,40	25,00-49,80	
Endometriode	122,00	27,70-143,00	
Células claras	386,00	281,00-510,00	
Afectación bilateral			
No	78,05	40,03-192,00	0,882
Si	90,90	38,00-122,00	
Metástasis			
No	90,90	40,65-143,00	0,542
Si	104,00	48,53-359,75	
Lavado peritoneal			
Negativo	94,90	30,40-208,00	0,618
Positivo	88,95	79,08-226,25	
Apéndice afectado			
No	94,90	44,60-190,50	0,313
Si	87,00	27,65-115,95	
Rectosigma afectado			
No	107,95	56,25-181,75	0,114
Si	38,00	24,90-122,00	
Ganglios positivos			
No	86,90	39,40-142,00	0,285
Si	141,00	38,00-398,00	
Masa residual postoperatoria			
No	98,50	32,65-143,50	0,590
< 1 cm	90,90	58,40-281,00	
>=1 cm	87,00	29,20-168,50	

No se objetivó relación significativa entre las características estudiadas y el valor de VEGF en el suero de las pacientes con cáncer; excepto en el estudio anatómico-patológico en el que se realizó una comparación entre los distintos tipos histológicos y se observó mayor nivel de VEGF en el suero de las pacientes con cáncer de ovario de tipo células claras, comparado con tumor seroso ( $p=0,027$ ), tumor mucinoso ( $p=0,050$ ) y tumor endometriode ( $p=0,025$ ).

Se analizó el estudio de cada polimorfismo por alelos y su relación con los niveles de VEGF en las pacientes con cáncer epitelial de ovario y en comparación con el grupo de estudio de mujeres con tejido ovárico sano (Tablas 20 y 21).

Tabla 20. Relación entre los niveles de VEGF en suero de pacientes con cáncer de ovario y los alelos de cada polimorfismo del gen *VEGF*.

Alelos SNPs	VEGF pg/mL	RIC	Valor p
<b>-2578 C</b>	86,95	32,30-137,00	0,503
<b>-2578 A</b>	72,65	32,30-192,00	0,738
<b>-1154 G</b>	87,00	30,40-144,00	0,936
<b>-1154 A</b>	54,10	38,00-186,25	0,571
<b>-460 T</b>	86,95	32,30-137,00	0,503
<b>-460 C</b>	72,65	32,30-192,00	0,738
<b>+405 G</b>	86,90	34,20-143,00	0,317
<b>+405 C</b>	83,45	29,05-151,25	0,719
<b>+936 C</b>	86,90	34,20-158,50	0,640
<b>+936 T</b>	85,40	33,60-361,00	0,879

SNPs: polimorfismos. RIC: rango intercuartílico.

Tabla 21. Relación entre los niveles de VEGF en suero de mujeres con tejido ovárico sano y los alelos de cada polimorfismo del gen *VEGF*.

Alelos SNPs	VEGF pg/mL	RIC	Valor p
-2578 C	106,50	63,33-207,00	0,420
-2578 A	79,40	56,85-156,00	<b>0,058</b>
-1154 G	105,00	61,30-202,00	0,847
-1154 A	98,70	64,75-156,00	0,375
-460 T	108,00	62,65-207,00	0,358
-460 C	79,40	56,85-156,00	<b>0,058</b>
+405 G	101,35	61,98-195,25	0,592
+405 C	111,50	63,33-209,75	0,322
+936 C	111,50	63,33-203,25	0,316
+936 T	65,90	38,18-221,75	0,237

SNPs: polimorfismos. RIC: rango intercuartílico.

Se analizó la posible relación de los niveles de VEGF con la presencia o ausencia de un alelo de cada polimorfismo. No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis por alelos y niveles de VEGF en el grupo de las pacientes con cáncer de ovario. Sin embargo, en el grupo de mujeres con tejido ovárico sano, se observó que en el caso del SNP -2578, el no presentar el alelo A conllevaba mayor nivel de VEGF en suero, frente a presentar dicho alelo (**p=0,058**). Igualmente, en este mismo grupo de estudio, se obtuvieron niveles mayores de VEGF en los casos del polimorfismo -460 no presentando el alelo C (**p=0,058**).

#### **V.D ASOCIACIÓN DE GENOTIPOS Y VEGF EN SUERO**

Se analizó la asociación de los cinco polimorfismos del gen *VEGF* (-2578 C/A, -1154 G/A, -460 C/T, +405 C/G y +936 C/T) en pacientes con cáncer y su relación con los niveles de VEGF en el suero de las mismas. Asimismo, se analizó en las mujeres con tejido ovárico sano, para realizar una comparación entre ambos grupos. Los resultados se muestran mediante diagramas tipo Scatter-plot en la *Figura 28* y *29*.

No se objetivó ninguna asociación significativa en ninguno de los grupos estudiados.

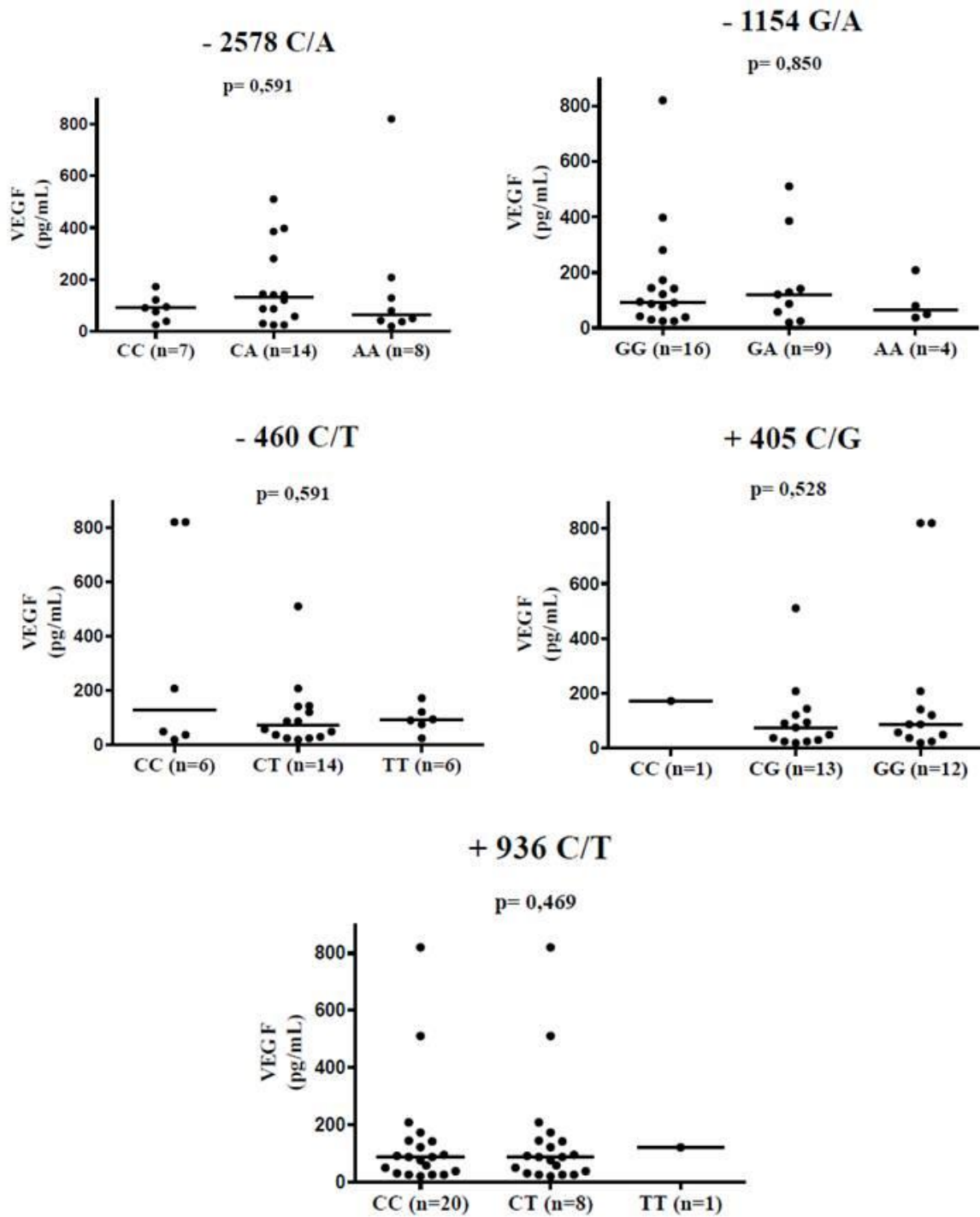


Figura 28. Asociación de genotipos y niveles de VEGF en suero de pacientes con cáncer de ovario.

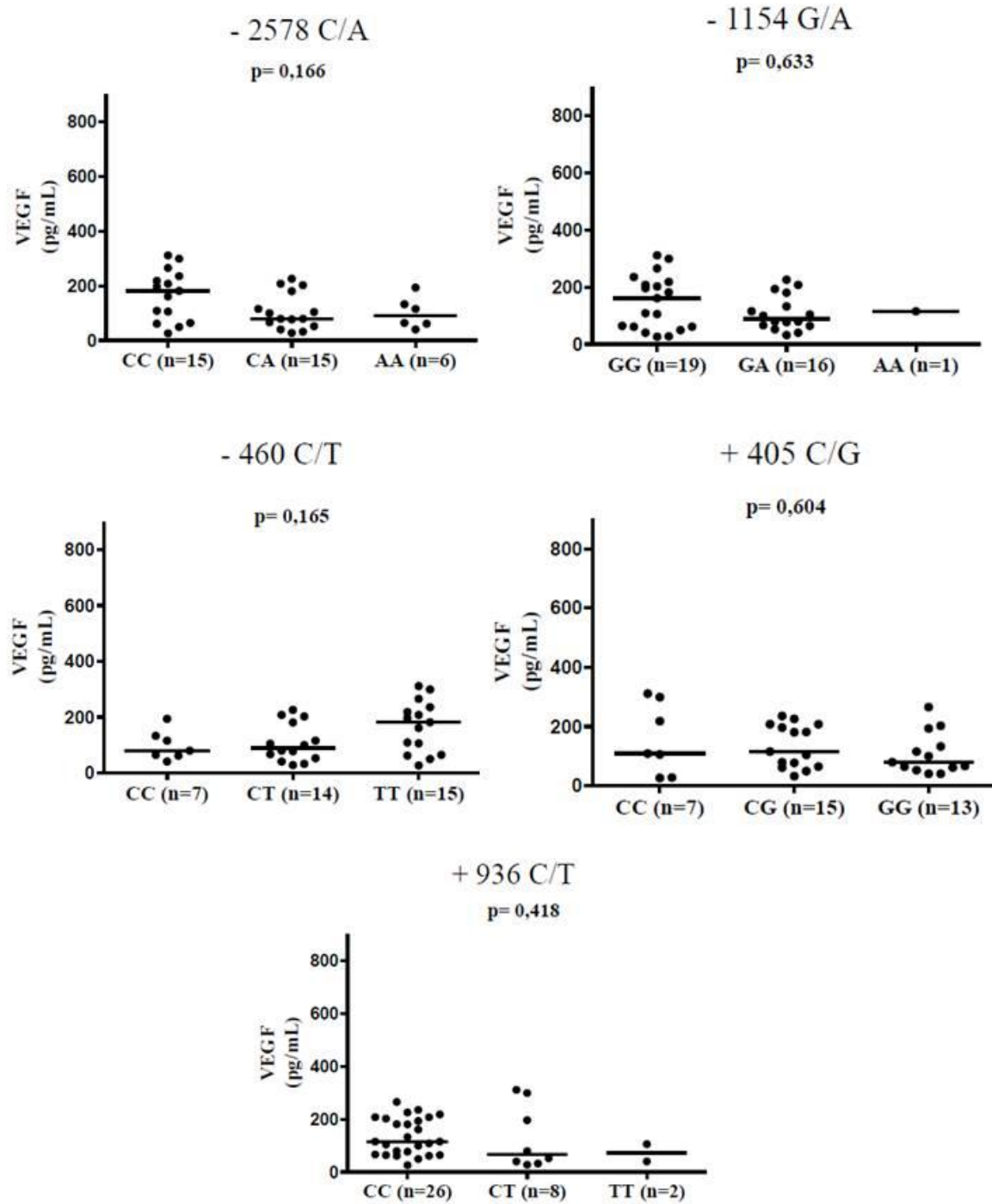


Figura 29. Asociación de genotipos y niveles de VEGF en suero de mujeres con tejido ovárico sano.

## V.E ESTUDIO DE HAPLOTIPOS

Se analizaron los haplotipos para evaluar el efecto combinado de los cinco polimorfismos del gen *VEGF*: -2578 C/A, -1154 G/A, -460 C/T, +405 C/G y +936 C/T.

Se calcularon en total doce haplotipos: los ocho más frecuentes de nuestra población de pacientes con cáncer y otros cuatro haplotipos descritos en la literatura. Se detalla la frecuencia de cada uno entre el total de haplotipos posibles dentro del grupo cáncer (n=1472); y el porcentaje de presentar dicho haplotipo frente a no presentarlo dentro del grupo de cáncer.

Asimismo, se analizaron dichos haplotipos en la población de mujeres con tumores benignos de ovario y mujeres con tejido ovárico sano para realizar un estudio comparativo. Se detallan los porcentajes de cada haplotipo entre todas las combinaciones posibles (992 en el grupo de tumores benignos de ovario y 1120 en el grupo de mujeres sanas); y el porcentaje de presentar dicho haplotipo frente a no presentarlo dentro de cada grupo. Los datos se presentan en la Tabla 22.

El haplotipo más frecuente entre todas las posibilidades en la población de pacientes con cáncer de ovario fue AACGC, al igual que en la cohorte de pacientes con tumores benignos de ovario; mientras que la combinación más frecuente en la población de mujeres con tejido ovárico sano fue CGTCC. El estudio comparativo de los tres grupos no mostró diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 22. Estudio comparativo de haplotipos en las tres poblaciones de estudio.

Haplotipo	Cáncer ovario		Tumores benignos		Tejido ovárico sano		Valor p*
	% total	% grupo	% total	% grupo	% total	% grupo	
AACGC	16,6 %	52,17 %	15,4 %	58,06 %	10 %	45,71 %	0,604
CGTCC	16,4 %	50 %	12,2 %	41,94 %	22,3 %	60 %	0,338
AGCGC	12,4 %	63,04 %	9,7 %	58,06 %	11,7 %	51,43 %	0,577
CGTGC	12 %	60,87 %	9,6 %	58,06 %	15 %	57,14 %	0,938
CGCGC	6,8 %	50 %	9,5 %	54,84 %	4 %	37,14 %	0,318
AGTGC	5,5 %	47,83 %	4,7 %	48,39 %	2,9 %	34,29 %	0,395
CGCCC	3,1 %	28,26 %	2,5 %	25,81 %	2,4 %	25,71 %	0,958
CACGC	3,1 %	32,61 %	5,3 %	41,94 %	2,9 %	34,29 %	0,688
AGCGT	2,3 %	17,39 %	1,7 %	19,35 %	2,1 %	14,29 %	0,856
AACGT	2,1 %	13,04 %	2,9 %	19,35 %	0,7 %	11,43 %	0,624
CGTCT	1,6 %	13,04 %	4,3 %	19,35 %	7 %	20 %	0,652
CGTGT	0,7 %	13,04 %	2,5 %	22,58 %	1,4 %	14,29 %	0,504

\*Valor p de la comparación de frecuencias por grupos

## V.F ESTUDIO DE *PEDF*

Se analizó la expresión del gen del factor derivado del epitelio pigmentario (*PEDF*) en el tejido ovárico de 26 pacientes con cáncer epitelial de ovario que no recibieron quimioterapia neoadyuvante (no siendo posible en tres pacientes) y en 35 mujeres con tejido ovárico sano (no realizado en una paciente).

La mediana obtenida en pacientes con cáncer fue 0,21 (RIC 0,11-0,49), mientras que en mujeres con tejido ovárico sano se observó mayor expresión de *PEDF*: 1,34 (RIC 0,68-2,43) siendo estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) (Figura 30).

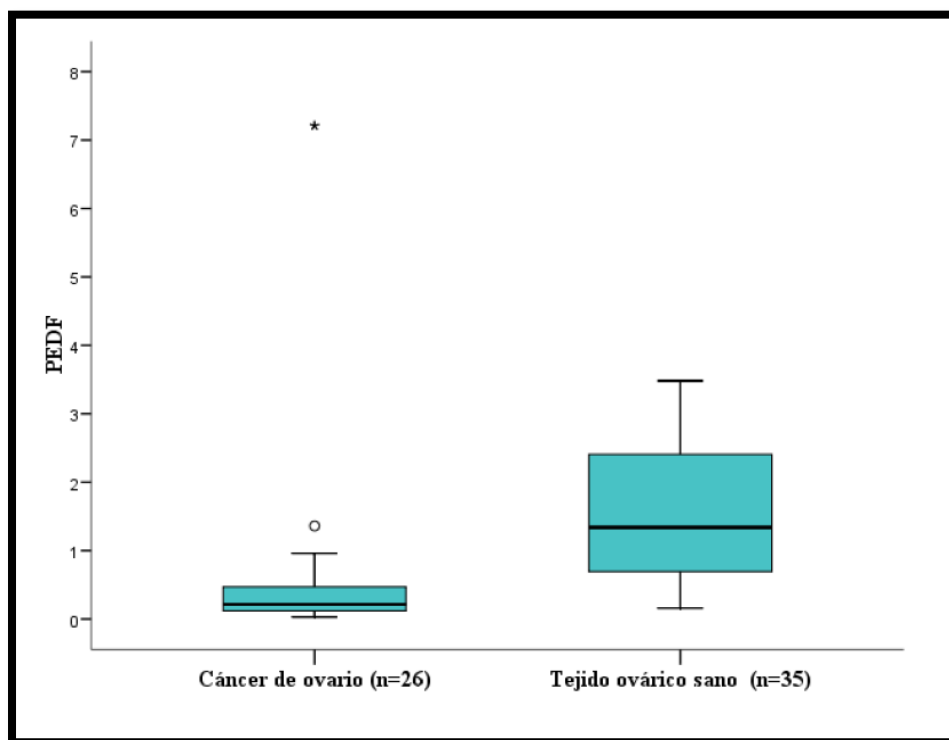


Figura 30. Mediana de la expresión de *PEDF* en pacientes con cáncer de ovario vs mujeres con tejido ovárico sano.

Se estudió la relación entre la expresión de *PEDF* y las características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer. Los resultados se presentan en la Tabla 23.

Tabla 23. Relación de la expresión de *PEDF* con las variables clínico-patológicas en pacientes con cáncer de ovario.

Características clínico-patológicas	<i>PEDF</i>	RIC	Valor p
Edad			
<50	0,19	0,08-0,57	0,616
51-65	0,29	0,16-1,36	
>65	0,22	0,10-0,36	
Estadio FIGO			
I	0,37	0,22-0,57	0,161
III	0,17	0,08-0,40	
Anatomía Patológica			
Seroso	0,15	0,08-0,66	0,584
Mucinoso	0,47	0,16-0,57	
Endometriode	0,27	0,24-0,40	
Células claras	0,21	0,21-0,21	
Afectación bilateral			
No	0,23	0,11-0,49	0,978
Si	0,18	0,12-0,96	
Metástasis			
No	0,23	0,09-0,46	0,855
Si	0,15	0,11-2,20	
Lavado peritoneal			
Negativo	0,21	0,13-0,45	0,483
Positivo	0,28	0,14-0,76	
Apéndice afectado			
No	0,21	0,12-0,29	0,619
Si	0,44	0,05-4,08	
Rectosigma afectado			
No	0,17	0,09-0,47	0,259
Si	0,28	0,18-0,96	
Ganglios positivos			
No	0,27	0,17-0,52	<b>0,057</b>
Si	0,12	0,08-0,17	
Masa residual postoperatoria			
No	0,26	0,19-0,49	0,205
< 1 cm	0,14	0,07-0,36	
>=1 cm	0,09	0,07-3,69	

Solo se objetivó relación significativa entre la expresión de *PEDF* y la afectación de ganglios linfáticos, de manera que presentaron menores niveles de *PEDF* aquellas pacientes que tuvieron ganglios positivos (**p=0,057**).

Con respecto al estudio anatómo-patológico, se realizó una comparación entre los distintos tumores de ovario y se observó menor nivel de *PEDF* en el tejido de tumores de tipo células claras, comparado con tumor mucinoso y tumor endometriode sin alcanzar significación estadística (p=0,655 y p=0,157 respectivamente).

Se analizó el estudio de cada polimorfismo por alelos en las pacientes con cáncer epitelial de ovario, y en el grupo de mujeres con tejido ovárico sano para comparar la expresión de *PEDF* según la presencia de un determinado alelo. Los resultados se muestran en las Tablas 24 y 25. No se objetivaron diferencias significativas en ninguno de los grupos estudiados.

Tabla 24. Relación entre la expresión de *PEDF* en pacientes con cáncer de ovario y los alelos de cada polimorfismo del gen *VEGF*.

Alelos SNPs	<i>PEDF</i>	RIC	Valor p
<b>-2578 C</b>	0,23	0,13-0,44	0,718
<b>-2578 A</b>	0,21	0,09-0,57	0,885
<b>-1154 G</b>	0,21	0,12-0,44	0,803
<b>-1154 A</b>	0,16	0,08-0,49	0,354
<b>-460 T</b>	0,23	0,13-0,44	0,718
<b>-460 C</b>	0,21	0,09-0,57	0,885
<b>+405 G</b>	0,21	0,09-0,53	0,700
<b>+405 C</b>	0,21	0,10-0,40	0,589
<b>+936 C</b>	0,22	0,10-0,52	0,548
<b>+936 T</b>	0,14	0,08-0,57	0,729

SNPs: polimorfismos. RIC: rango intercuartílico.

Tabla 25. Relación entre la expresión de *PEDF* en mujeres con tejido ovárico sano y los alelos de cada polimorfismo del gen *VEGF*.

Alelos SNPs	<i>PEDF</i>	RIC	Valor p
<b>-2578 C</b>	1,25	0,66-2,33	0,325
<b>-2578 A</b>	1,34	0,60-2,46	0,855
<b>-1154 G</b>	1,29	0,67-2,44	0,961
<b>-1154 A</b>	1,15	0,54-2,02	0,267
<b>-460 T</b>	1,18	0,65-2,26	0,180
<b>-460 C</b>	1,34	0,60-2,46	0,855
<b>+405 G</b>	1,34	0,64-2,43	0,624
<b>+405 C</b>	1,30	0,82-2,41	0,857
<b>+936 C</b>	1,34	0,66-2,45	0,696
<b>+936 T</b>	1,29	0,82-2,62	0,756

SNPs: polimorfismos. RIC: rango intercuartílico.

## **V.G ASOCIACIÓN DE GENOTIPOS Y EXPRESIÓN DE *PEDF***

Se realizó un análisis comparativo de la expresión de *PEDF* en función de los cinco polimorfismos del gen *VEGF* (-2578 C/A, -1154 G/A, -460 C/T, +405 C/G y +936 C/T) y cada variedad alélica; en el grupo de pacientes con cáncer y en el grupo de mujeres con tejido ovárico sano. Los resultados se detallan mediante diagramas tipo Scatter-plot en las *Figuras 31* y *32*.

No se obtuvieron asociaciones significativas en ninguno de los grupos de estudio.

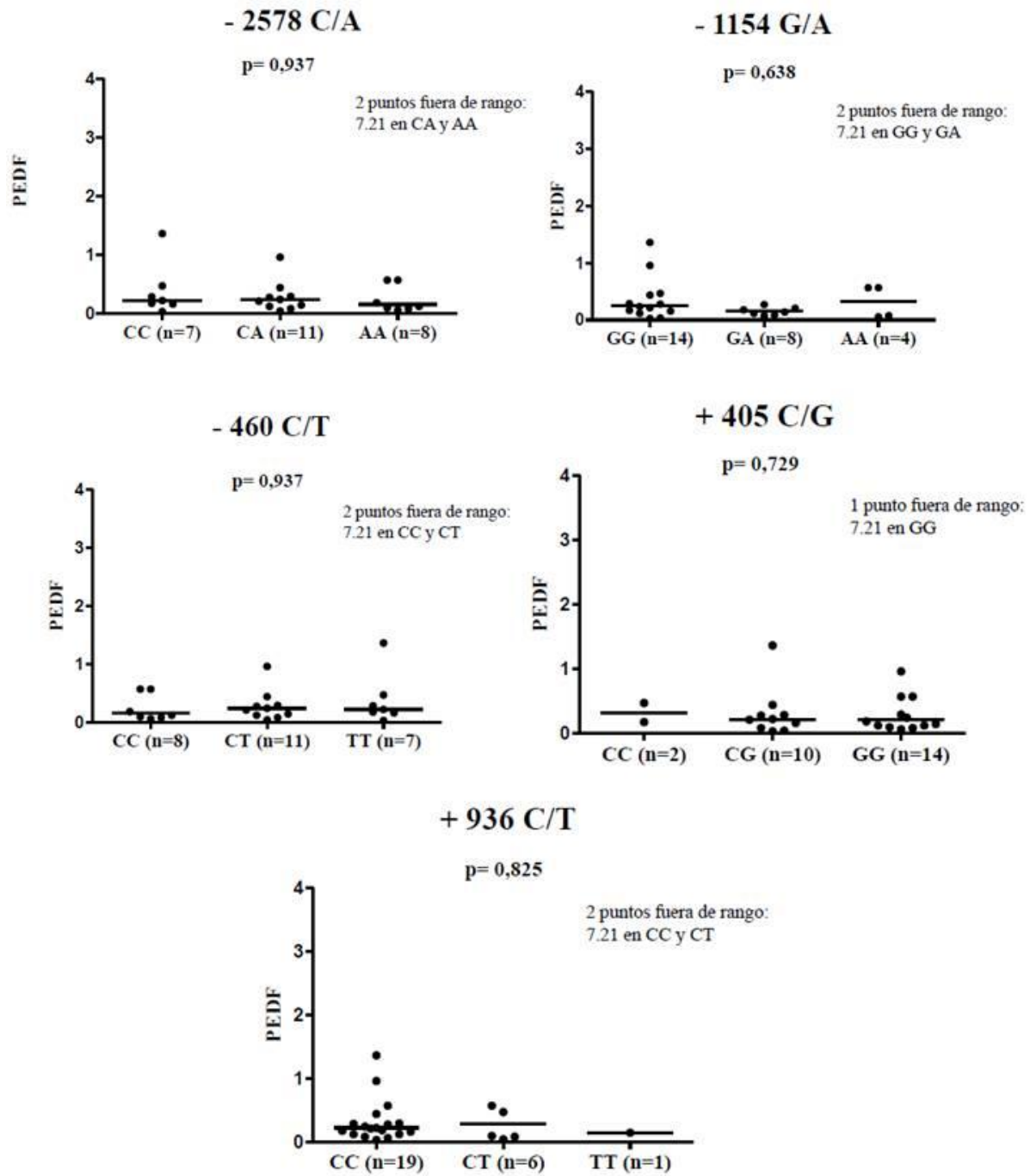


Figura 31. Genotipos y expresión de PEDF en pacientes con cáncer de ovario.

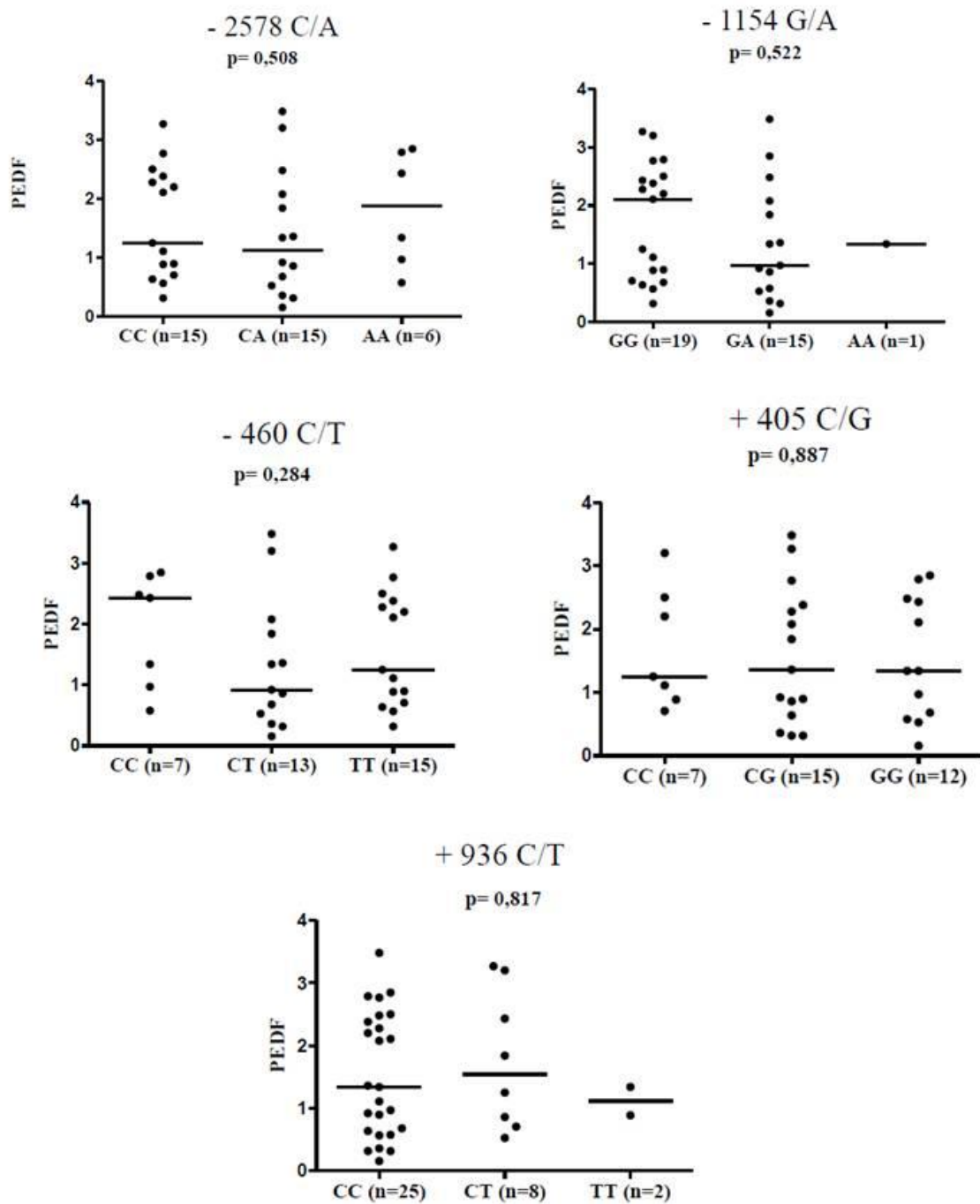


Figura 32. Genotipos y expresión de PEDF en mujeres con tejido ovárico sano.

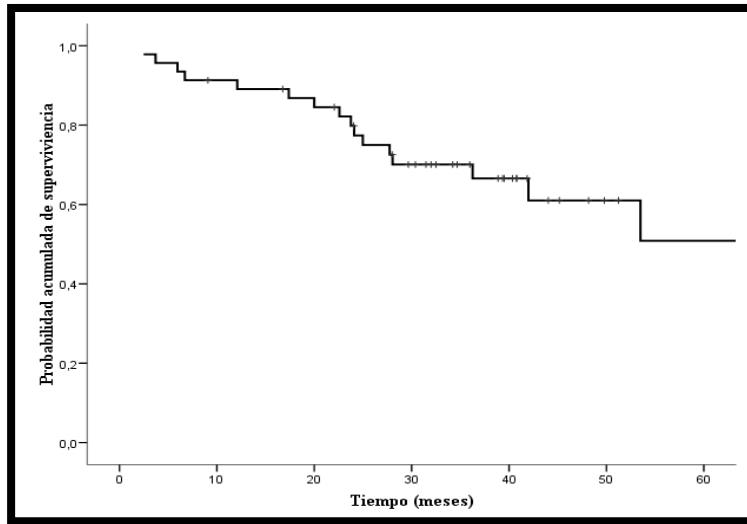
## V.H ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

La mediana de seguimiento del estudio fue de 32,7 meses (RIC 22,1-42,4 meses). El análisis de supervivencia global de las pacientes con cáncer epitelial de ovario se detalla en la Tabla 26. Durante el periodo de seguimiento, 18 mujeres fallecieron (39,1%); el 77,8% de ellas debido al tumor y 22,2% debido a otras causas. Se diagnosticó recidiva tumoral en el 58,7% de las mujeres; siendo la localización más frecuente en abdomen (44,4%), en comparación a pelvis (18,5%), hígado (18,5%), ganglionar (11,1%) o pulmón (7,4%). A fecha final de estudio, 12 mujeres estaban vivas con enfermedad (42,8%) y 16 vivas sin enfermedad (57,1%).

Tabla 26. Análisis de supervivencia global en pacientes con cáncer de ovario.

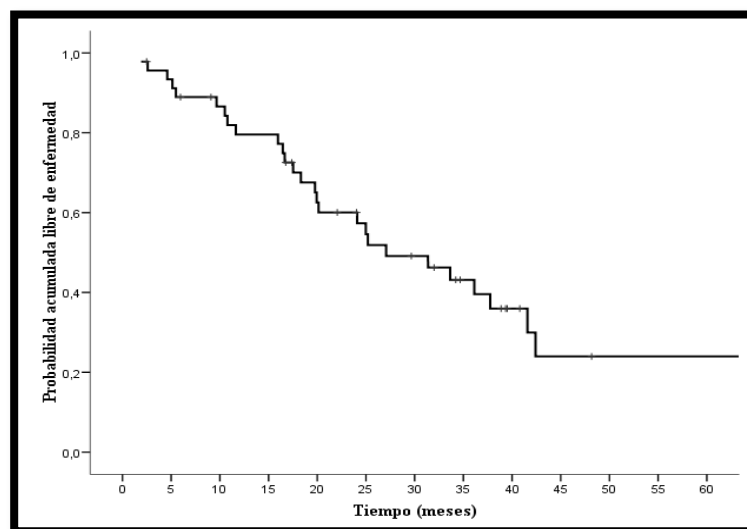
Supervivencia	Nº pacientes	Porcentaje
Viva	28	60,9 %
Fallecida	18	39,1 %
<b>Causa muerte (n=18)</b>		
Por el tumor	14	77,8 %
Otras causas	4	22,2 %
<b>Recidiva</b>		
No	19	41,3 %
Si	27	58,7 %
<b>Localización recidiva (n=27)</b>		
Abdomen	12	44,4 %
Pelvis	5	18,5 %
Hígado	5	18,5 %
Ganglios	3	11,1 %
Pulmón	2	7,4 %

La mediana de supervivencia global en las pacientes con cáncer fue 73,8 meses. A los 12 meses de seguimiento, la supervivencia fue 91,3 %; y a los 24 meses fue 79,8%. A los 5 años la supervivencia fue 50,8 %. Datos representados en la *Figura 33*.



*Figura 33. Análisis de supervivencia global en pacientes con cáncer de ovario.*

La mediana de tiempo libre de enfermedad fue 27 meses. A los 12 meses de seguimiento, la supervivencia libre de enfermedad (SLE) fue 79,6% y a los 24 meses 60%. A los 5 años la mediana de tiempo libre de enfermedad fue 24 %. Datos representados en la *Figura 34*.



*Figura 34. Análisis de tiempo libre de enfermedad en pacientes con cáncer de ovario.*

Se analizó la relación de las principales características clínico-patológicas con la supervivencia global en las pacientes con cáncer epitelial de ovario. Se detalla en la Tabla 27.

Tabla 27. Características clínico-patológicas y supervivencia global.

Variable	SV 12 meses (EE)	SV 24 meses (EE)	SV 60 meses (EE)	Valor p*	HR	IC 95% (valor p**)
<b>Edad</b>				0,559		
≥50	93,5% (4,4%)	83,6% (6,7%)	64,7% (9,2%)		1	
<50	86,7% (8,8%)	71,5% (12,2%)	35,8% (18,9%)		1,47	0,56-3,82 (0,428)
<b>Clínica</b>				<b>0,013</b>		
Sintomático	87,5% (5,8%)	70,8% (8,2%)	51,9% (9,6%)		2,09	0,68-6,42 (0,194)
Asintomático	100% (--)	100% (--)	55,6% (24,8%)		1	
<b>Ascitis</b>				0,143		
Si	95,5% (4,4%)	79,8% (9,1%)	66,5% (14,3%)		1	
No	87,5% (6,8%)	79,2% (8,3%)	--		2,9	0,90-9,35 (0,072)
<b>Derrame pl.</b>				0,084		
Si	66,7% (19,2%)	50% (20,4%)	50% (20,4%)		1,55	0,44-5,44 (0,493)
No	95% (3,4%)	84,3% (5,9%)	50,2% (13,5%)		1	
<b>Bilateral</b>				0,830		
Si	84,2% (8,4%)	78,6% (9,5%)	41,5% (19,1%)		1,08	0,40-2,85 (0,875)
No	96% (3,9%)	79,2% (8,3%)	66% (9,8%)		1	
<b>Metástasis</b>				<b>0,049</b>		
Si	80% (8,9%)	68,6% (10,7%)	49,1% (12,3%)		1,63	0,64-4,14 (0,301)
No	96,2% (3,8%)	88,3% (6,4%)	50,2% (17,8%)		1	
<b>QT neoad.</b>				<b>0,001</b>		
Si	76,5% (10,3%)	64,7% (11,6%)	32,3% (12,1%)		3,83	1,47-9,97 (0,006)
No	100% (--)	88,9% (6,1%)	63,2% (16,5%)		1	
<b>Estadio</b>				<b>0,028</b>		
I	100% (--)	85,7% (13,2%)	85,7% (13,2%)		1	
III	90,9% (5 %)	81,3 % (6,9 %)	46,9 % (15,6%)		4,47	0,57-34,97 (0,154)
IV	80% (17,9%)	60% (21,9%)	--		17,73	1,81-173,6 (0,014)

Tabla 27 (Continuación). Características clínico-patológicas y supervivencia global.

Variable	SV 12 meses (EE)	SV 24 meses (EE)	SV 60 meses (EE)	Valor p*	HR	IC 95% (valor p**)
<b>Anatomía Patológica</b>				0,814		
Seroso	89,7% (5,7%)	81,9% (7,4%)	42,6% (15,5%)		1,30	0,48-3,49 (0,287)
Resto	94,1% (5,7%)	76,5% (10,3%)	64,7% (11,6%)		1	
<b>Apéndice afectado</b>				0,943		
Si	100% (--)	83,3% (15,2%)	44,4% (22,2%)		1,49	0,45-4,92 (0,512)
No	88,2% (5,5%)	78,9% (7,1%)	65,9% (9,3%)		1	
<b>Recto-sigma afectado</b>				0,362		
Si	87,5% (11,7%)	62,5% (17,1%)	--		1,94	0,61-6,11 (0,256)
No	92,1% (4,4%)	83,6% (6,1%)	56,5% (12,4%)		1	
<b>Lavado positivo</b>				0,435		
Si	90,9% (8,7%)	80,8% (12,2%)	53,9% (23,5%)		1	0,40-5,35 (0,559)
No	89,3% (5,8%)	78,1% (7,9%)	59,6% (10,4%)		1,47	
<b>Ganglios positivos</b>				0,679		
Si	88,9% (10,5%)	88,9% (10,5%)	44,4% (22,8%)		1,25	0,38-4,10 (0,704)
No	90,3% (5,3%)	77% (7,6%)	66,8% (8,6%)		1	
<b>Enfermedad residual</b>				0,304		
Si	84% (7,3%)	75,4% (8,8%)	39,1% (17,6%)		2,08	0,77-5,61 (0,147)
No	100% (--)	84,2% (8,4%)	61,1% (14%)		1	

SV: supervivencia global, EE: error estándar, HR: Hazard ratio, IC: intervalo de confianza, AP: anatomía patológica, Derrame pl: derrame pleural, QT neoad: quimioterapia neoadyuvante. \* Significación estadística test de Breslow.

\*\* Significación estadística test de COX.

Se observó que las pacientes sintomáticas en el momento del diagnóstico del cáncer de ovario tuvieron peor supervivencia comparado con las pacientes asintomáticas **p = 0,013** (HR 2,09 IC 95% 0,68-6,42, p test de COX 0,194). Además las pacientes con metástasis presentaron peor supervivencia que las que no tenían, **p = 0,049** (HR 1,63 IC 95% 0,64-4,14, p test de COX 0,301), de la misma manera que las pacientes con cáncer tratadas con quimioterapia neoadyuvante **p=0,001** (HR 3,83 IC 95% 1,47-9,97, p test de COX 0,006); hecho ligado al probable cáncer avanzado que determinó la indicación de dicho tratamiento neoadyuvante. Igualmente se observó que las pacientes con estadios III y IV de cáncer epitelial de ovario tuvieron peor supervivencia, **p = 0,028**; HR 4,47 IC 95% 0,57-34,97 para estadios III y HR 17,73 IC 95% 1,81-173,6 para estadio IV.

Relación de los genotipos del gen VEGF y supervivencia:

Se analizó cada variedad alélica de los cinco polimorfismos del gen *VEGF* y su repercusión sobre la supervivencia global de las pacientes con cáncer a los 12, 24 y 60 meses. Los resultados se detallan en la Tabla 28.

Tabla 28. Genotipos del gen *VEGF* y supervivencia global.

Variable	SV 12 meses (EE)	SV 24 meses (EE)	SV 60 meses (EE)	Valor p*	HR	IC 95% (valor p**)
<b>-2578 C/A</b>				<b>0,032</b>		
CC	100% (--)	100% (--)	--		1	
CA	84% (7,3%)	62,5% (10%)	46,9% (11%)		5,76	0,74-44,83 (0,094)
AA	100% (--)	100% (--)	47,4% (22,8%)		2,97	0,32-27,28 (0,335)
<b>-1154 G/A</b>				<b>0,011</b>		
GG	100% (--)	95% (4,9%)	68% (16,5%)		1	
GA	80% (8,9%)	58,7% (11,2%)	35,6% (13,4%)		2,98	1,02-8,65 (0,045)
AA	100% (--)	100% (--)	50% (35,4%)		0,81	0,09-7,11 (0,857)
<b>-460 C/T</b>				0,114		
CC	91,7% (8%)	91,7% (8%)	43,5% (21,2%)		1	
CT	87,5% (6,8%)	65,1% (10%)	48,8% (11,3%)		1,43	0,50-4,09 (0,499)
TT	100% (--)	100% (--)	--		0,26	0,03-2,35 (0,235)
<b>+405 C/G</b>				0,737		
CC	100% (--)	100% (--)	--		1	
CG	94,4% (5,4%)	77,8% (9,8%)	77,8% (9,8%)		0,58	0,11-3,07 (0,524)
GG	87 % (7%)	77,3 % (9%)	35,7% (14,5%)		1,04	0,22-4,88 (0,955)
<b>+936 C/T</b>				0,146		
CC	88,9% (5,2%)	75% (7,2%)	48,7% (11,5%)		1	
CT	100% (--)	100% (--)	75% (21,7%)		0,43	0,11-1,58 (0,205)
TT	--	--	--		--	--

\* Significación estadística test de Breslow. \*\* Significación estadística test de COX.

Se objetivó que los polimorfismos -2578 C/A y -1154 G/A presentaban diferencias significativas en cuanto a la supervivencia global, de manera que los polimorfismos heterocigotos tuvieron peor supervivencia global que los homocigotos ( $p=0,032$  y  $p=0,011$  respectivamente).

Se analizó la asociación de cada polimorfismo del gen *VEGF* con el tiempo libre de enfermedad (TLE) en las pacientes con cáncer de ovario. Se representan mediante gráficas tipo Kaplan-Meier en la Figuras 35-39. No se objetivó ninguna asociación estadísticamente significativa.

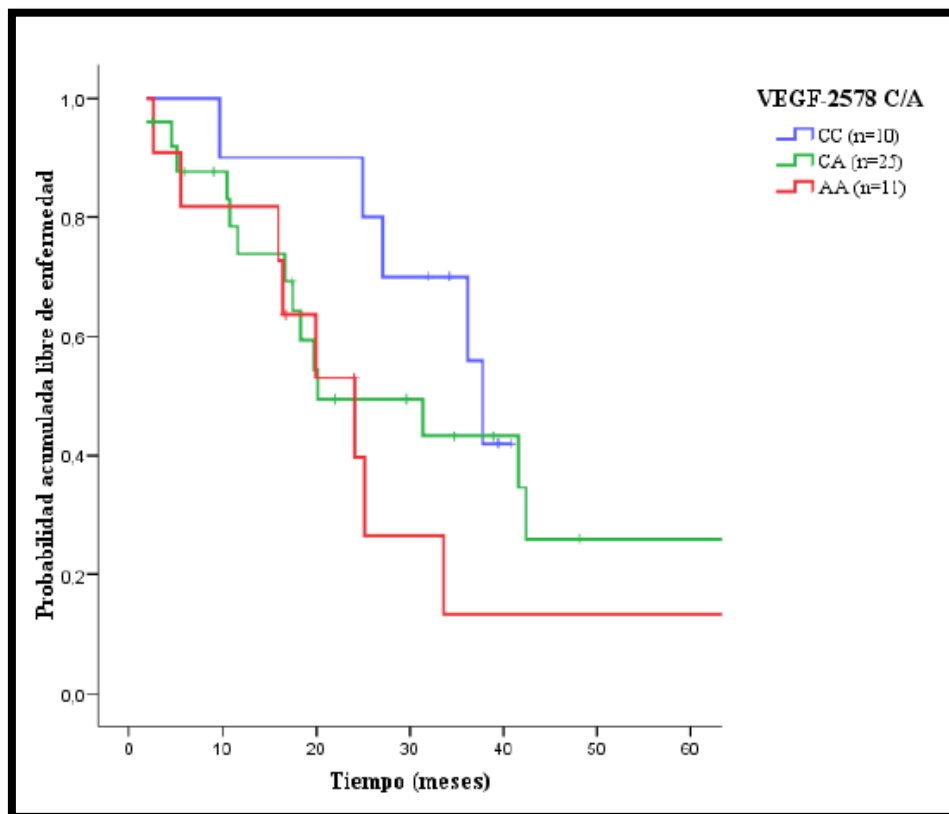


Figura 35. Gráfica Kaplan-Meier: asociación de -2578 C/A y TLE ( $p=0,207$ )

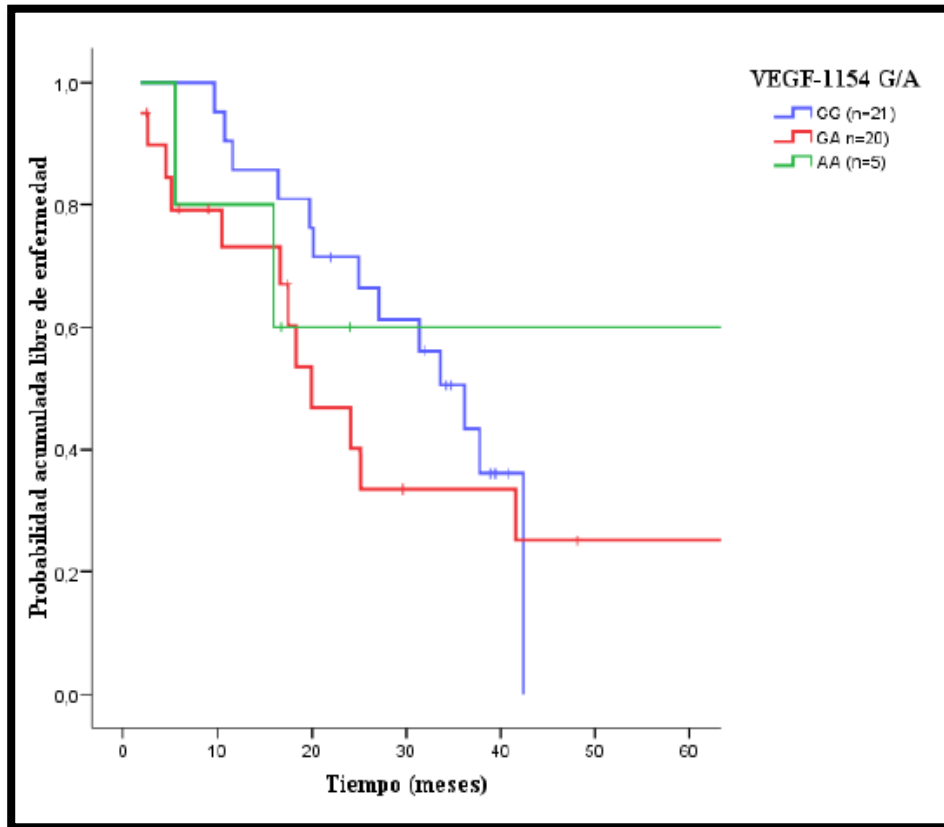


Figura 36. Gráfica Kaplan-Meier: asociación de -1154 G/A y TLE ( $p=0,271$ )

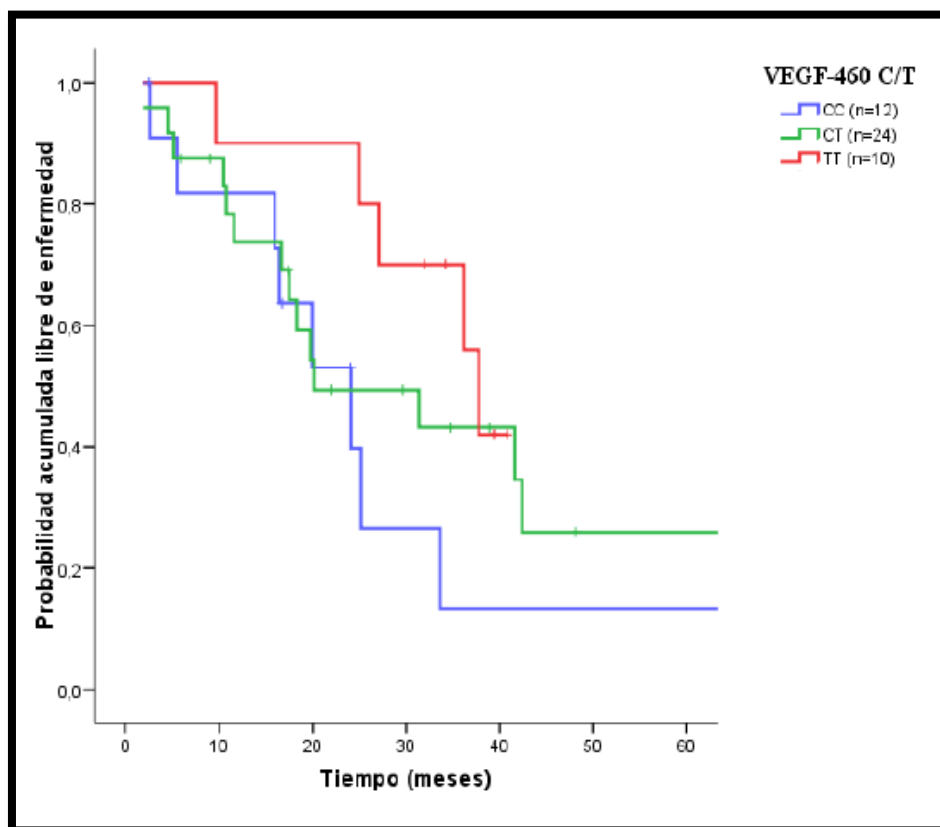


Figura 37. Gráfica Kaplan-Meier: asociación de -460 C/T y TLE ( $p=0,210$ )

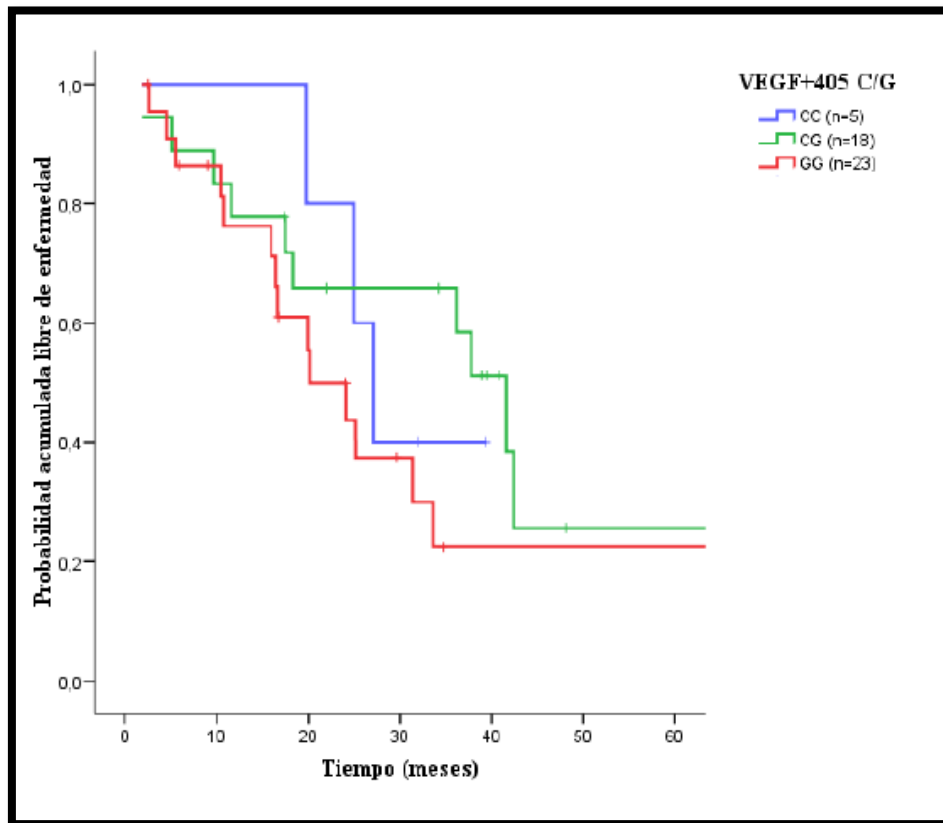


Figura 38. Gráfica Kaplan-Meier: asociación de +405 C/G y TLE ( $p=0,333$ )

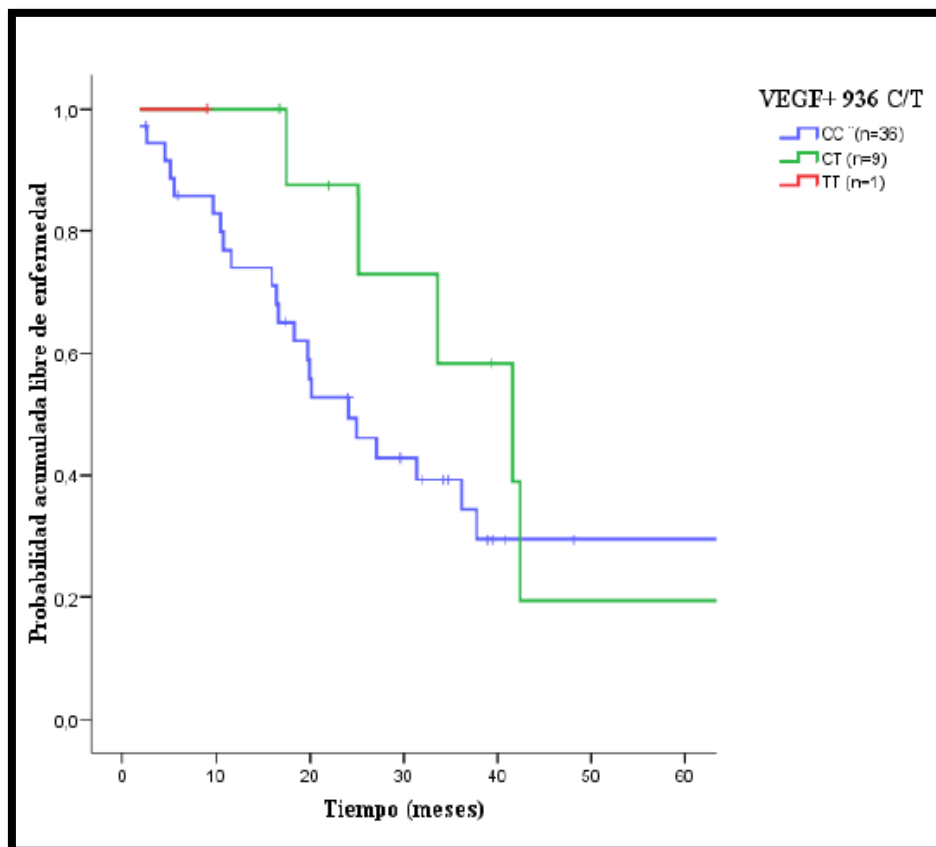


Figura 39. Gráfica Kaplan-Meier: asociación de +936 C/T y TLE ( $p=204$ )

Se estudió el efecto de los doce haplotipos estudiados con la supervivencia global en pacientes con cáncer. Se observó que presentar el haplotipo CACGC tenía peor supervivencia global que si no se presentaba dicha combinación de polimorfismos: HR 2,95 (IC 1,13-7,66, **p 0,026**). Los resultados se detallan en Tabla 29 y Figura 40.

Tabla 29. Relación de haplotipos y supervivencia global en pacientes con cáncer de ovario.

Haplotipo	% del total*	% grupo cáncer**	HR	IC 95%	p
AACGC	16,6 %	52,17 %	2,53	0,88-7,26	0,084
CGTCC	16,4 %	50 %	0,63	0,24-1,64	0,347
AGCGC	12,4 %	63,04 %	2,80	0,80-9,82	0,106
CGTGC	12 %	60,87 %	1,03	0,40-2,69	0,938
CGCGC	6,8 %	50 %	2,26	0,84-6,06	0,105
AGTGC	5,5 %	47,83 %	1,77	0,68-4,62	0,237
CGCCC	3,1 %	28,26 %	1,22	0,45-3,29	0,689
CACGC	3,1 %	32,61 %	2,95	1,13-7,66	<b>0,026</b>
AGCGT	2,3 %	17,39 %	0,48	0,12-1,80	0,281
AACGT	2,1 %	13,04 %	0,53	0,11-2,43	0,417
CGTCT	1,6 %	13,04 %	0,23	0,03-1,79	0,163
CGTGT	0,7 %	13,04 %	0,26	0,33-2,00	0,197

\*Porcentaje con respecto al total de haplotipos posibles; \*\*Porcentaje de presentar dicho haplotipo frente a no presentarlo dentro del grupo cáncer.

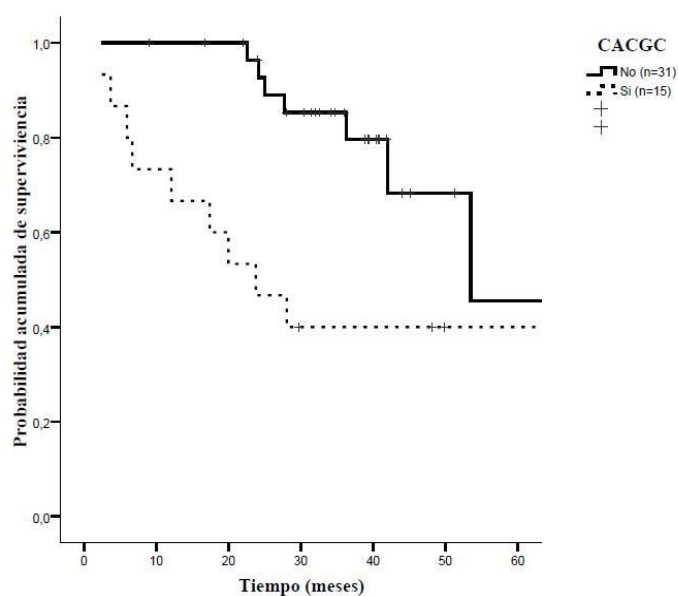


Figura 40. Haplotipo CACGC y supervivencia global.

Niveles de VEGF en suero y relación con la supervivencia:

El análisis de supervivencia y la relación con los niveles de VEGF en suero de las pacientes con cáncer se describe en la Tabla 30. No se objetivó asociación significativa entre los niveles de la proteína VEGF y la presencia de recidiva de cáncer ni éxitus.

Tabla 30. Análisis de supervivencia y niveles de VEGF en suero.

Análisis de supervivencia	VEGF pg/ml	RIC	Valor p
Supervivencia			
Viva	92,90	47,20-181,75	0,593
Fallecida	87,00	25,00-141,00	
Recidiva			
No	87,50	39,05-151,25	0,760
Si	90,90	41,90-208,00	

No se analizó la relación entre los niveles de VEGF en suero y la supervivencia libre de enfermedad debido a la baja capacidad de predicción (área bajo la curva ROC no significativa).

Expresión de *PEDF* y relación con la supervivencia:

El análisis de supervivencia y la relación con *PEDF* en las pacientes con cáncer se describe en la Tabla 31. No se objetivó asociación significativa con la recidiva de cáncer ni éxitus.

Tabla 31. Análisis de supervivencia y expresión de *PEDF*.

Análisis de supervivencia	<i>PEDF</i>	RIC	Valor p
Supervivencia			
Viva	0,18	0,12-0,44	0,272
Fallecida	0,27	0,09-7,21	
Recidiva			
No	0,20	0,12-0,54	1,000
Si	0,21	0,08-0,57	

Se analizó la relación de la expresión de *PEDF* y la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer epitelial de ovario. Se calculó el punto de corte para la mejor sensibilidad (S) y especificidad (E) mediante la curva ROC (Área bajo la curva 0,643); cuyo resultado fue 0,1950 (S= 71,4 %, E= 52,6 %). (Figura 41).

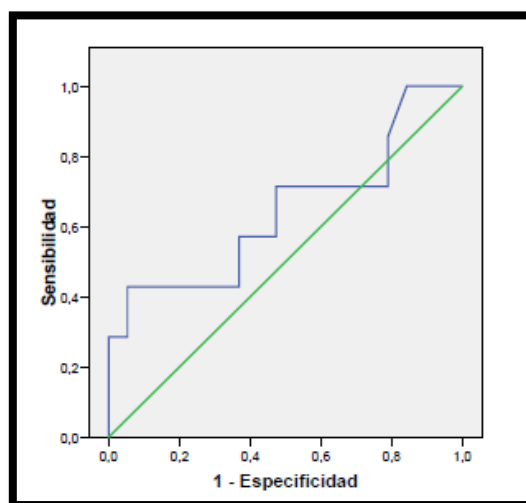


Figura 41. Curva ROC para calcular la relación de la expresión de *PEDF* y la supervivencia libre de enfermedad.

En las pacientes con valores de *PEDF*  $\geq 0,1950$ , la supervivencia a los 12 meses fue del 100% (EE --), a los 24 meses fue 77,4% (EE 11,5%) y a los 60 meses fue 58% (EE 18,8%); p test de Breslow 0,128 (HR 1,59 IC 95%: 0,29-8,79, p test de COX 0,591).

# DISCUSIÓN

## VI DISCUSIÓN

El cáncer de ovario es el cáncer ginecológico más agresivo, con una alta mortalidad. La angiogénesis juega un rol fundamental en la patogénesis del cáncer, invasión tumoral y desarrollo de metástasis. Es un proceso complejo en el que están implicados factores angiogénicos como el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial y factores antiangiogénicos como el Factor Derivado del Epitelio Pigmentario. Resulta de interés estudiar la implicación de estos genes en el cáncer de ovario y poder establecer un objetivo terapéutico futuro.

### Polimorfismos del gen VEGF

En nuestro estudio el análisis de los polimorfismos del gen *VEGF* (-2578 C/A, -1154 G/A, -460 C/T, +405 C/G y +936 C/T) en mujeres con cáncer epitelial de ovario fue similar al publicado por Steffensen et al<sup>75</sup> donde estudiaron los genotipos del gen *VEGF* en 143 mujeres con cáncer de ovario, 21 de ellas tratadas con quimioterapia neoadyuvante. En nuestro caso pudimos analizar la frecuencia de cada polimorfismo en tres grupos de estudio y observamos mayor incidencia de mujeres con SNP -1154 G/G tanto en el grupo de pacientes con cáncer como en el grupo de mujeres sanas.

Rinck-Junior et al<sup>100</sup> compararon el ADN genómico en pacientes con cáncer de ovario y controles, y objetivaron mayor frecuencia del polimorfismo *VEGF* +936 C/C en pacientes con cáncer, lo que podría conllevar a un riesgo aumentado de cáncer de ovario en mujeres con dicho genotipo. En nuestro estudio también se observó mayor frecuencia de SNP +936 C/C en mujeres con cáncer comparado con mujeres con

tumores benignos y tejido ovárico sano (sin alcanzar significación estadística). Zhang et al<sup>101</sup> publicaron un meta-análisis en el año 2015 relacionando el SNP +936 C/C con el cáncer de ovario; mientras que no encontraron relación con -2578 C/A o -460 T/C y la susceptibilidad de desarrollar cáncer de ovario.

En nuestro trabajo se observaron asociaciones estadísticamente significativas entre la distribución de los polimorfismos en las mujeres con cáncer epitelial de ovario, al igual que lo descrito por otros autores<sup>75</sup>: -2578 C/A -1154 G/A ( $p < 0,001$ ), -2578 C/A -460 T/C ( $p < 0,001$ ), -2578 C/A +405 G/C ( $p < 0,001$ ), -1154 G/A -460 C/T ( $p < 0,001$ ), -1154 G/A + 405 C/G ( $p = 0,002$ ), -460 C/T +405 C/G ( $p < 0,001$ ). Asimismo, se objetivaron asociaciones estadísticamente significativas en el grupo de pacientes con tumores benignos de ovario: -2578 C/A -1154 G/A ( $p < 0,001$ ), -2578 C/A -460 C/T ( $p < 0,001$ ), -2578 C/A +405 C/G ( $p = 0,001$ ), -1154 G/A -460 C/T ( $p = 0,001$ ), -1154 G/A + 405 C/G ( $p = 0,012$ ), -460 C/T +405 C/G ( $p < 0,001$ ); y en mujeres con tejido ovárico sano: -2578 C/A -1154 G/A ( $p < 0,001$ ), -2578 C/A -460 C/T ( $p < 0,001$ ), -2578 C/A +405 C/G ( $p < 0,001$ ), -1154 G/A -460 C/T ( $p < 0,001$ ), -1154 G/A + 405 C/G ( $p = 0,011$ ), -460 C/T +405 C/G ( $p < 0,001$ ), no encontrados estudios similares en la bibliografía revisada.

El análisis de los cinco polimorfismos del gen *VEGF*, según si fueron Wild Type o no Wild Type, con las principales características clínico-patológicas (edad, estadio, estudio histológico, enfermedad residual, recidiva y muerte) mostró menor probabilidad de muerte en las pacientes WT frente no WT en el caso del polimorfismo -2578 C/A

( $p=0,064$ ) y -1154 G/A ( $p=0,051$ ). Por otro lado, con respecto a la relación con la enfermedad residual postquirúrgica, se objetivó que las pacientes que presentaron el polimorfismo -1154 G/A WT presentaban menor enfermedad residual respecto a los no WT ( $p=0,009$ ); al contrario que -460 C/T WT que presentaron mayor enfermedad residual post-cirugía ( $p=0,001$ ).

En el año 2015 se publicó un estudio en población India donde Janardhan et al<sup>102</sup> estudiaron el impacto de seis polimorfismos del gen *VEGF* en pacientes con cáncer de ovario y en pacientes controles (-2578 C/A, -460 T/C, -1154 G/A, + 405 G/C, +674 C/T, +936 C/T). El SNP +936 C/T resultó ser un marcador de agresividad tumoral, tendencia a recurrencia y peor pronóstico. Los SNPs -1154 G/A y -460 T/C se asociaron a características clínico-patológicas como afectación bilateral y niveles de CA 125, y SNP + 405 G/C se asoció a mayor ascitis.

Bhaskari et al<sup>103</sup> publicaron en 2016, otro estudio en India, sobre los mismos seis genotipos de *VEGF* (-2578 C/A, -460 T/C, -1154 G/A, + 405 G/C, + 674 C/T, +936 C/T), analizando también su expresión en tejido, en mujeres con cáncer de ovario y tumores benignos de ovario. Concluyeron que las pacientes con cáncer presentaron mayor expresión en tejido de VEGF-A y en suero; y que cuatro polimorfismos (SNPs -460 T/C, -1154 G/A, + 405 G/C y +674 C/T) se asociaron a malignidad, recurrencia y peor pronóstico.

### Niveles de VEGF en suero

Varios estudios han demostrado mayores niveles de la proteína VEGF en el suero de las pacientes con cáncer, comparado con pacientes con tejido ovárico sano o neoplasias benignas de ovario; y que niveles más altos de VEGF estaban asociados a un estadio avanzado de la enfermedad y peor pronóstico<sup>66,104</sup>. En nuestro estudio se observaron niveles mayores de VEGF, no significativo, en mujeres con tejido ovárico sano comparadas con mujeres con cáncer; pero este resultado podría no ser concluyente hasta ser confirmado en un estudio con una muestra mayor de pacientes.

Li et al<sup>64</sup> objetivaron niveles mayores de VEGF en el suero de las pacientes con tumores malignos de ovario, comparándolo con tumores benignos y mujeres sanas donantes de sangre. Además especificaron mayores niveles de VEGF en el momento previo a la cirugía, si se trataba de estadios III/IV y en ascitis; sin encontrar diferencias en los niveles de VEGF según el estudio anatómo-patológico del cáncer.

Akçay et al<sup>105</sup> publicaron un estudio en 2016 sobre el valor predictivo de diferentes factores de crecimiento (oncoproteína c-erbB-2, factor de crecimiento insulínico tipo 1 o IGF-1 y niveles de VEGF) en el suero de pacientes con cáncer comparado con mujeres sanas. Objetivaron mayores niveles de VEGF en el grupo de pacientes con cáncer, sin encontrar relación con c-erbB-2 ni IGF-1.

En nuestro estudio, la correlación entre los niveles de VEGF y las características clínico-patológicas estudiadas (edad, estadio, estudio histológico, afectación bilateral,

metástasis, afectación del apéndice o rectosigma, lavado peritoneal positivo, ganglios linfáticos positivos y enfermedad residual postquirúrgica) fue significativa en el caso del estudio anatómico-patológico de los tumores; se observó mayor nivel de VEGF en el suero de las pacientes con cáncer de ovario de tipo células claras comparado con tumores malignos de tipo seroso, mucinoso y de tipo endometriode ( $p=0,02$ ,  $p=0,05$  y  $p=0,02$  respectivamente). Estos resultados podrían apoyar el conocido peor pronóstico del cáncer de tipo células claras<sup>106,107</sup>.

Wong et al<sup>108,109</sup> describieron en dos estudios diferente expresión de VEGF según los tipos histológicos y objetivaron mayores niveles en los tumores serosos, tanto malignos como benignos. La diferencia con respecto a nuestros resultados podría explicarse ya que en su muestra solo incluyeron dos pacientes con cáncer de tipo células claras.

Un estudio publicado en 2016 por Premalata et al<sup>110</sup> sobre la expresión tisular de VEGF-A en diferentes tipos histológicos de cáncer epitelial de ovario, objetivó que los de tipo seroso, indiferenciado y mixto presentaron mayor expresión. Igualmente, se relacionó mayor expresión de VEGF-A con carcinomas de alto grado y estadio avanzado de la enfermedad.

Con respecto al resto de variables estudiadas, en nuestro estudio se objetivaron mayores niveles de VEGF en pacientes menores de 50 años, estadio III de la enfermedad, enfermedad bilateral, enfermedad metastásica o con ganglios positivos, sin alcanzar significación estadística.

Wang et al<sup>111</sup> publicaron en 2011 un estudio retrospectivo en pacientes con cáncer de ovario objetivando sobreexpresión tisular de VEGF en pacientes con afectación ganglionar metastásica; mientras que no se relacionó con otras variables como menopausia, grado histológico, tipo histológico o estadio FIGO.

En nuestro estudio no se observó asociación entre los niveles de VEGF en el suero de las pacientes con cáncer y los cinco polimorfismos del gen *VEGF*; así como tampoco en el grupo de mujeres con tejido ovárico sano. En el subanálisis por alelos, no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en las mujeres con cáncer epitelial de ovario; no así en otras publicaciones previas que mostraron mayores niveles de VEGF en presencia de 2578C, 460T y 405C, con respecto a no presentar dichos alelos<sup>75</sup>. En nuestro grupo de mujeres con tejido ovárico sano se observó que en el caso del SNP -2578 C/A, el no presentar el alelo A conllevaba mayor nivel de VEGF en suero, frente a presentar dicho alelo ( $p=0,058$ ). Igualmente, se obtuvieron niveles mayores de VEGF en los casos del polimorfismo -460 C/T no presentando el alelo C ( $p=0,058$ ).

Renner et al<sup>58</sup> describieron menores niveles de VEGF en el suero de las pacientes con 936T, coincidiendo con nuestra muestra sin lograr significación estadística en nuestro caso. Watson et al<sup>112</sup>, observaron menores niveles de VEGF en los casos de presencia CC homocigota del genotipo +405; y mayores niveles de VEGF si se presentaba como GG homocigoto.

### Estudio de haplotipos

Con respecto al estudio de los haplotipos, se analizaron doce haplotipos para evaluar el efecto combinado de los cinco polimorfismos del gen *VEGF*: -2578 C/A, -1154 G/A, -460 T/C, +405 G/C y +936 C/T; los ocho más frecuentes de nuestra población de pacientes con cáncer y otros cuatro haplotipos descritos en la literatura. Se observó que el haplotipo CACGC tenía peor supervivencia global con respecto a no presentar dicha combinación de polimorfismos: HR 2,95 (IC 1,13-7,66, p 0,026).

El haplotipo más frecuente en la población de pacientes con cáncer de ovario fue AACGC, al igual que en la cohorte de pacientes con tumores benignos de ovario; mientras que la combinación más frecuente en la población de mujeres con tejido ovárico sano fue CGTCC. El estudio comparativo de haplotipos en los tres grupos de estudio no mostró diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, Steffensen et al<sup>75</sup>, describieron en su estudio en el año 2010 la tendencia del haplotipo AGCGC para una mejor supervivencia libre de enfermedad comparado con el resto de haplotipos.

Janardhan et al<sup>102</sup> en su estudio de 2015 en India sobre los SNPs (-2578 C/A, -460 T/C, -1154 G/A, + 405 G/C, + 674 C/T, +936 C/T) en cáncer de ovario, analizaron los haplotipos excluyendo -2578 C/A y +674 C/T, y objetivaron que el haplotipo TGCC actuaba como factor protector y el haplotipo CGCC como factor de riesgo.

En 2016, Bhaskari et al<sup>103</sup>, publicaron un estudio también en población India, con los haplotipos de los seis SNPs estudiados (-2578 C/A, -460 T/C, -1154 G/A, + 405 G/C, + 674 C/T, +936 C/T) y concluyeron que el haplotipo CCGGCC se relacionó con

mayores niveles de VEGF en plasma y tejido y se relacionó con peor pronóstico, mayor recurrencia de la enfermedad con probable resistencia al tratamiento.

Sería interesante estudiar más polimorfismos y poder realizar análisis comparativo con otros haplotipos y su implicación en el cáncer.

### **Estudio de PEDF**

El Factor Derivado del Epitelio Pigmentario (*PEDF*) es un factor antiangiogénico con potentes acciones en las células tumorales. La mayor expresión de *PEDF* en una variedad de tumores se ha asociado con mejor pronóstico, mientras que menores niveles de *PEDF* fueron indicativos de peor pronóstico; demostrado en casos de glioma, adenocarcinoma pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer renal, cáncer de próstata y cáncer de ovario<sup>113</sup>.

En nuestro estudio se observó menor expresión de *PEDF*, estadísticamente significativo, en las mujeres con cáncer epitelial de ovario: la mediana obtenida fue 0,21 (RIC 0,11-0,49), comparado con las mujeres con tejido ovárico sano en las que se observó mayor expresión del *PEDF*; 1,34 (RIC 0,68-2,43) ( $p < 0,001$ ). Estos resultados apoyan la teoría de que *PEDF* presenta la capacidad de inducir apoptosis en el tumor y en células endoteliales, siendo un potente factor antitumoral y antiangiogénico<sup>85</sup>.

Cheung et al<sup>89</sup> demostraron que los estrógenos inhiben la expresión de *PEDF* en las células del ovario, siendo un principal agente antiangiogénico determinante en el proceso de carcinogénesis.

En 2010 se publicó un estudio por Yang et al<sup>114</sup> sobre el efecto de *PEDF* en mujeres con carcinoma de cérvix. Objetivaron que la expresión de *PEDF* fue menor en el tejido de carcinoma cervical comparado con epitelio cervical normal o no tumoral; y se comprobó que la inyección intraperitoneal de *PEDF* en ratonas con carcinoma cervical disminuyó el crecimiento tumoral en un 68% mediante una vía anti-angiogénica inhibiendo la proliferación e induciendo la apoptosis en las células endoteliales.

En nuestro estudio no se objetivó relación significativa entre las principales características clínico-patológicas estudiadas y la expresión de *PEDF*; excepto en el caso de las pacientes con cáncer de ovario y ganglios positivos que presentaron menores niveles de *PEDF*, con respecto a las pacientes con ganglios negativos ( $p=0,05$ ). Con respecto al estudio anatómico-patológico de los distintos tumores de ovario; se observó menor nivel de *PEDF* en los tumores de tipo células claras, comparado con tumor mucinoso y tumor endometriode, sin alcanzar significación estadística ( $p=0,65$  y  $p=0,15$  respectivamente).

Tampoco se observó correlación entre los niveles de *PEDF* y los cinco polimorfismos del gen *VEGF*. En el análisis por alelos, no se objetivaron diferencias

estadísticamente significativas en los niveles observados de *PEDF* según la presencia de cada alelo en concreto.

### **Análisis de supervivencia**

Con respecto a la supervivencia, en nuestro estudio se relacionaron varias características de las pacientes con cáncer con peor supervivencia, estadísticamente significativas. Se observó que las pacientes sintomáticas en el momento del diagnóstico tenían peor supervivencia comparadas con las pacientes asintomáticas ( $p = 0,013$  HR 2,09 IC 95% 0,68-6,42,  $p$  test de COX 0,194); así como las pacientes con enfermedad metastásica ( $p = 0,049$  HR 1,63 IC 95% 0,64-4,14,  $p$  test de COX 0,301). Las pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante y las pacientes con estadios III y IV de la enfermedad tuvieron también peor supervivencia ( $p = 0,028$  HR 4,47 IC 95% 0,57-34,97 para estadios III y HR 17,73 IC 95% 1,81-173,6 para estadio IV).

En nuestro trabajo, no se objetivaron asociaciones entre los polimorfismos del gen *VEGF* y la supervivencia libre de enfermedad; al igual que en otros previamente publicados<sup>75</sup>. Si se objetivó que los polimorfismos -2578 C/A y -1154 G/A presentaban diferencias significativas en cuanto a la supervivencia global, de manera que los polimorfismos heterocigotos tuvieron peor supervivencia global que los homocigotos ( $p=0,032$  y  $p=0,011$  respectivamente).

La mayoría de publicaciones aportan datos sobre la supervivencia global, pero sin detallar la supervivencia libre de enfermedad. Lose et al<sup>115</sup>, reportaron mejor

supervivencia global en una cohorte de pacientes australianas con cáncer de ovario, en aquellas mujeres que presentaron +405 C/C, no extrapolable a otras poblaciones geográficas.

Smerdel et al<sup>116</sup>, describieron mejor supervivencia global en presencia de los polimorfismos heterocigotos -460 T/C y + 405 G/C, sin resultados para la supervivencia libre de enfermedad.

Hefler et al<sup>117</sup>, demostraron peor supervivencia en pacientes que simultáneamente presentaron genotipos homocigotos -2578 C/C, -1154 G/G y + 405 C/C, sin impacto de cada polimorfismo de manera individual sobre la supervivencia.

Schultheis et al<sup>118</sup>, investigaron distintos polimorfismos incluyendo + 405 G/C y +936 C/T en cáncer de ovario recidivante tratado con ciclofosfamida y bevacizumab, y sólo objetivaron una tendencia para mejor supervivencia libre de enfermedad en pacientes con genotipo C/T sin diferencias en la supervivencia global.

En 2017, Camerin et al<sup>119</sup> publicaron que las pacientes con cáncer de ovario y genotipo VEGF -2578 C/C tuvieron menor supervivencia libre de enfermedad comparado con otros; planteando este polimorfismo como posible factor pronóstico en el cáncer epitelial de ovario.

Tempfer et al<sup>120</sup>, evaluaron los niveles de VEGF antes del tratamiento en 60 mujeres con cáncer epitelial de ovario, y observaron peor supervivencia global y peor

supervivencia libre de enfermedad, de manera significativa, en aquellas con niveles mayores de VEGF.

Hui et al<sup>121</sup>, concluyeron en su estudio la asociación entre la expresión de VEGF y el peor pronóstico y peor supervivencia global sin poder aportar datos sobre la supervivencia libre de enfermedad.

En 2016 Whynott et al<sup>122</sup> estudiaron la expresión de VEGF y COX-2 mediante inmunohistoquímica en 43 mujeres con carcinoma de ovario. Describieron que el 83,2% fueron VEGF + y el 76,9% COX-2 +; y se objetivó que las mujeres que presentaron expresión de ambos, VEGF y COX-2, tuvieron peor supervivencia global.

Existen pocas publicaciones sobre *PEDF* y la supervivencia en pacientes con cáncer de ovario. En nuestro estudio, no se objetivó asociación estadísticamente significativa entre la expresión de *PEDF* y la supervivencia libre de enfermedad. Sin embargo, utilizando un punto de corte 0,195 se observó una tendencia no significativa hacia una mejor supervivencia.

Otros autores<sup>93</sup> han descrito menor expresión de este factor antiangiogénico en pacientes con cáncer de ovario con niveles no elevados de VEGF, concluyendo que dicha reducción de expresión de *PEDF* podría ser la responsable de la agresividad en dichos tumores de ovario. Sería interesante realizar más estudios sobre la implicación de la reducción de expresión de *PEDF* en las pacientes con cáncer de ovario y la

supervivencia libre de enfermedad para poder considerarlo en un futuro como nuevo factor pronóstico en este tipo de tumores.

### **VEGF y otros tipos de cáncer**

Estos factores tan fuertemente implicados en la angiogénesis han sido estudiados en otros tipos de cáncer. En **el cáncer de mama**, niveles altos de VEGF se han relacionado con peor pronóstico, menor supervivencia global y resistencia a la hormonoterapia<sup>123</sup>. El polimorfismo VEGF -1154 G/A fue estudiado y se observó que la presencia del alelo G sobre A no tuvo efecto sobre el riesgo global de cáncer de mama, pero el alelo G se relacionó con mayor riesgo de enfermedad invasiva. Con respecto a -2578 C/A los resultados no fueron concluyentes; y en cuanto al polimorfismo +936 C/T, tres estudios demostraron un rol protector del alelo T mientras que cuatro estudios no encontraron relación. Solo un trabajo estableció que el alelo 936C como alelo protector en el cáncer de mama in situ; especificando que había diferencias en este SNP según el área geográfica de la población estudiada<sup>47</sup>.

En **el cáncer colorrectal**, existen estudios que afirman que 936T se asocia a mayor riesgo de enfermedad, estadio avanzado y peor supervivencia<sup>124</sup>; mientras que otros no encontraron asociación con el tamaño tumoral, grado, estadio o supervivencia<sup>125</sup>. Los genotipos -2578 C/A y -2578 A/A tuvieron un rol protector en las pacientes coreanas<sup>126</sup>.

En el **cáncer de pulmón no microcítico**, Koukourakis et al<sup>55</sup>, asociaron menores niveles de VEGF en el polimorfismo -1154 A/A comparado a la presencia homocigota GG; así como en -2578 C/C comparado con -2578 C/A.

Varios estudios realizados sobre los polimorfismos del gen *VEGF* y el **cáncer de próstata**, como por ejemplo en Austria, Japón, Taiwan, Turquía y Reino Unido, objetivaron que -1154 A predice un riesgo bajo, y protege frente a tumores de alto grado y agresividad tumoral<sup>127</sup>.

### **Implicación terapéutica en el contexto del cáncer**

El estudio de los factores que participan en el proceso de angiogénesis tiene una implicación terapéutica en el contexto del cáncer. Se han desarrollado varios agentes terapéuticos para la vía VEGF; hoy día aprobados y utilizados en la práctica clínica diaria. En general existen dos mecanismos anti-VEGF: mediante anticuerpos dirigidos a ligandos VEGF o receptores, o mediante inhibidores tipo tirosin quinasa<sup>128</sup>.

Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido al Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF). Se une con elevada afinidad a todas las isoformas del VEGF bloqueando la unión de éste a sus receptores biológicos presentes en la superficie de las células endoteliales vasculares. Es la terapia antiangiogénica más investigada, y fue la primera aprobada por la FDA. Estos fármacos antiangiogénicos tienen un efecto sinérgico con los quimioterápicos convencionales y una toxicidad

diferente, dado el distinto mecanismo de acción. Es importante conocer el manejo de los mismos, y la combinación a los quimioterápicos convencionales para realizar esquemas terapéuticos innovadores<sup>129</sup>.

Bevacizumab es una de las terapias dirigidas más estudiadas; y está aprobada para el tratamiento de cáncer de ovario, cáncer tubárico y tumores peritoneales. Cada vez se asocia más a la pauta quimioterápica convencional con buenos resultados, pero es necesario realizar una buena selección de pacientes y diseñar un esquema de administración con dosis y tiempo marcado<sup>130</sup>.

Un estudio publicado en 2017, analizó diferentes pautas de tratamiento quimioterápico adyuvante en pacientes con cáncer de ovario avanzado. Comparó el tratamiento con quimioterapia convencional y bevacizumab intraperitoneal vs bevacizumab intravenoso vs quimioterapia adyuvante convencional. Observó mejor tasa de remisión en las pacientes tratadas con bevacizumab intraperitoneal; así como mayor supervivencia global y mayor supervivencia libre de enfermedad (destacando que los dos grupos de pacientes tratadas con bevacizumab, intraperitoneal o intravenoso, tuvieron mejor supervivencia libre de enfermedad que las pacientes tratadas solo quimioterapia convencional). Describió varios efectos secundarios asociados a bevacizumab como hipertensión arterial y arritmia; pero concluyó que bevacizumab es un esquema terapéutico seguro y factible en pacientes con cáncer de ovario avanzado tras citoreducción<sup>131</sup>.

Son necesarios más estudios para continuar la investigación de estos factores dada su relevancia clínica en el cáncer. Todos los resultados publicados previamente muestran un valor importante en el cáncer de ovario, tanto del Factor de Crecimiento Endotelial (*VEGF*) como del Factor derivado del Epitelio Pigmentario (*PEDF*). El proceso de angiogénesis, con los genotipos de *VEGF* y niveles de *VEGF* en suero, así como la antiangiogénesis mediante la expresión de *PEDF*, conllevan una fuerte implicación en el cáncer de ovario, y hacen que sea un objeto de investigación futura y un objetivo terapéutico muy atractivo.

# **CONCLUSIONES**

## VII CONCLUSIONES

1. No se objetivó asociación estadísticamente significativa entre la supervivencia global y la expresión de *PEDF*; sin embargo, los polimorfismos del gen *VEGF* -2578 C/A y -1154 G/A en su variedad heterocigota, presentaron significativamente peor supervivencia global en pacientes con cáncer.
2. Se estudiaron los cinco polimorfismos del gen *VEGF* con cada una de las tres variedades alélicas posibles, y su relación con los niveles de VEGF en suero sin objetivar ninguna asociación estadísticamente significativa.
3. Se analizó la relación entre los niveles de VEGF en el suero de las pacientes con cáncer de ovario y las principales características clínico-patológicas, objetivando niveles de VEGF significativamente más altos en el suero de las pacientes con cáncer de ovario de tipo células claras, en comparación con tumores de tipo seroso, mucinoso y endometriode.
4. Se observó una expresión de *PEDF* significativamente menor en las pacientes con cáncer de ovario en comparación con mujeres con tejido ovárico sano. El análisis con las principales características clínico-patológicas no resultó significativo para ninguna de las variables estudiadas.

5. No se obtuvieron asociaciones estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de VEGF ni *PEDF* con las variables pronóstico clásicas para el cáncer de ovario.
  
6. No se objetivaron asociaciones estadísticamente significativas entre los polimorfismos del gen *VEGF* y la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer; así como tampoco de la expresión de *PEDF*. Sin embargo, utilizando un punto de corte 0,195 se observó una tendencia no significativa hacia una mejor supervivencia.
  
7. El análisis comparativo de los cinco polimorfismos del gen *VEGF* no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de estudio. Los niveles de la proteína VEGF fueron menores en mujeres con cáncer en comparación con mujeres con tejido ovárico sano, sin alcanzar significación estadística. La expresión de *PEDF* fue significativamente menor en las pacientes con cáncer de ovario respecto de las mujeres con tejido ovárico sano.

# **ANEXOS**

# ANEXO I: MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



Hospital Clínico San Carlos

Comunidad de Madrid

## DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA USO DE DATOS Y DONACIÓN DE TEJIDO

Doña .....  
de ..... años de edad con domicilio en .....  
..... y DNI N° .....

(Representante) Don/doña ..... de ..... años de  
edad, con domicilio en .....  
..... y DNI N° ..... en calidad de  
REPRESENTANTE LEGAL, FAMILIAR O ALLEGADO DE:  
.....

### AUTORIZO

A que el personal médico utilice, para fines de investigación actual y de futuro, los datos de mi historial clínico así como los tejidos y/o fluidos corporales obtenidos de las intervenciones médico-quirúrgicas que me van a ser practicadas, una vez realizado el diagnóstico adecuado de mi enfermedad. Todos los datos obtenidos serán manejados con la máxima confidencialidad y de acuerdo con la ley 15/99 de Protección de Datos de carácter personal.

Me reservo expresamente el derecho a revocar mi consentimiento en cualquier momento

En ..... (LUGAR Y FECHA)

Fdo. EL MÉDICO

Fdo. EL PACIENTE

### REVOCACION

Doña ..... de ..... años de  
edad con domicilio en ..... y  
DNI ..... (Representante) Don/doña .....  
..... de ..... años de edad, con domicilio en  
..... y DNI  
N° ..... en calidad de REPRESENTANTE LEGAL, FAMILIAR O  
ALLEGADO DE: .....  
Revoco el consentimiento prestado en fecha ..... y no deseo  
proseguir el tratamiento, que doy con esta fecha por finalizado.

En ..... (LUGAR Y FECHA)

Fdo. EL MÉDICO

Fdo. EL PACIENTE

# ANEXO II: INFORME DE COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS



Informe Dictamen Protocolo Favorable  
Otros Estudios

C.P. - C.I. 12/085-E

27 de febrero de 2012

CEIC Hospital Clínico San Carlos

Dra. Mar García Arenillas  
Secretaria del CEIC Hospital Clínico San Carlos

## CERTIFICA

1º. Que el CEIC Hospital Clínico San Carlos en su reunión del día 22/02/2012, acta 2.2/12 ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

**Título:** "Análisis de los polimorfismos del gen del factor de crecimiento vasculo-endotelial (VEGF) y de la expresión del gen del factor del epitelio pigmentario (PEDF) en el cáncer de ovario"

Que en este estudio:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son adecuados para llevar a cabo el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto de los postulados éticos.
- Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Orden SAS 3470/2009 y la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio.

Es por ello que el Comité informa favorablemente sobre la realización de dicho proyecto por el **Dr. José Antonio Vidart Aragón**, del Servicio de Ginecología como investigador principal en el Hospital Clínico San Carlos

Lo que firmo en Madrid, a 27 de febrero de 2012

Dra. Mar García Arenillas  
Secretaria del CEIC Hospital Clínico San Carlos

# ANEXO III: PUBLICACIÓN ACEPTADA EN INTERNATIONAL JOURNAL OF GYNECOLOGICAL CANCER (MARZO 2017)

International Journal of **Gynecological Cancer** Editorial Manager

HOME • LOG OUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW  
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: Author Username: blancagp

---

Submissions with an Editorial Office Decision for Author **BLANCA GONZALEZ, MD**

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status	Date Final Disposition Set	Final Disposition
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">Author Status</a> <a href="#">View Decision Letter</a> <a href="#">Send E-mail</a>	IGC-D-16-00783	VEGF polymorphisms and serum VEGF levels in women with epithelial ovarian cancer, benign tumors and healthy ovaries	11/22/2016	03/12/2017	Completed	03/12/2017	Accept

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions) Display 10 results per page.

**Date:** 03/12/2017  
**To:** "BLANCA GONZALEZ" bgonzalezpalomares@gmail.com  
**From:** "International Journal of Gynecological Cancer" beller.ijgc@gmail.com  
**Subject:** IGC Decision

03/12/2017

RE: IGC-D-16-00783, entitled "VEGF polymorphisms and serum VEGF levels in women with epithelial ovarian cancer, benign tumors and healthy ovaries"

Dear Mrs GONZALEZ,

I am pleased to inform you that your work has now been accepted for publication in International Journal of Gynecological Cancer. All manuscript materials will be forwarded immediately to the production staff for placement in an upcoming issue.

**OPEN ACCESS**

If you indicated in the revision stage that you would like your submission, if accepted, to be made open access, please go directly to step 2. If you have not yet indicated that you would like your accepted article to be open access, please follow the steps below to complete the process:

1. Notify the journal office via email that you would like this article to be available open access. Please send your Email to [Beller.IJGC@gmail.com](mailto:Beller.IJGC@gmail.com). Please include your article title and manuscript number.
2. A License to Publish (LTP) form must be completed for your submission to be made available open access. Please download the form from <http://links.lww.com/LWW-ES/A49>, sign it, and Email the completed form to the journal office.
3. **Within 48 hours of receiving this e-mail:** Go to <http://wolterskluwer.qconnect.com> to pay for open access. If you have not previously used this site to place an order, you will need to register for an account (your login will be different from your Editorial Manager login). When placing your order, you will be asked for the following information. Please enter exactly as shown:
  - a. Article Title - VEGF polymorphisms and serum VEGF levels in women with epithelial ovarian cancer, benign tumors and healthy ovaries
  - b. Manuscript Number - IGC-D-16-00783

Thank you for submitting your interesting and important work to the journal.

<http://igc.edmgr.com/>

With Kind Regards,

Professor Uzi Beller  
 Editor-in-Chief  
 International Journal of Gynecological Cancer

# **BIBLIOGRAFÍA**

## **IX BIBLIOGRAFÍA**

<sup>1</sup>Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Las cifras del Cáncer en España 2016.

<sup>2</sup> Epithelial Ovarian Cancer. Union for International Cancer Control. Review of Cancer Medicines on the WHO List of Essential Medicines 2014.

<sup>3</sup> Kumaran GC, Jayson GC, Clamp AR. Antiangiogenic drugs in ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 2009, 100 (1):1-7.

<sup>4</sup> Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>.

<sup>5</sup> Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013 Apr; 49(6):1374-403.

<sup>6</sup> Milne RL, Osorio A, Cajal TR, Vega A, Llort G, de la Hoya M et al. The average cumulative risks of breast and ovarian cancer for carriers of mutations in BRCA1 and BRCA2 attending genetic counseling units in Spain. *Clin Cancer Res* 2008; 14(9): 2861-2869.

<sup>7</sup> Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol.* 2007;25(11):1329-33.

<sup>8</sup> American Cancer Society. Ovarian cancer. Available in <https://old.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003130-pdf.pdf>. Access on 04 February 2017.

<sup>9</sup> Tew WP, Lichtman SM. Ovarian cancer in older women. *Semin Oncol.* 2008 Dec;35(6):582-9.

<sup>10</sup> Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet.* 1971 Jul 17;2(7716):163.

<sup>11</sup> Purdie DM, Bain CJ, Siskind V, Webb PM, Green AC. Ovulation and risk of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer.* 2003 Mar 20;104(2):228-32.

<sup>12</sup> Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet.* 2008; 371(9609):303-14.

<sup>13</sup> Brinton L. Long-term effects of ovulation-stimulating drugs on cancer risk. *Reprod Biomed Online.* 2007 Jul;15(1):38-44.

- <sup>14</sup> Jensen A, Sharif H, Kjaer SK. Use of fertility drugs and risk of uterine cancer: results from a large Danish population-based cohort study. *Am J Epidemiol.* 2009 Dec 1;170(11):1408-14.
- <sup>15</sup> Siristatidis C, Sergentanis TN, Kanavidis P, Trivella M, Sotiraki M, Mavromatis I et al. Controlled ovarian hyperstimulation for IVF: impact on ovarian, endometrial and cervical cancer--a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2013 Mar-Apr;19(2):105-23.
- <sup>16</sup> Beral V; Million Women Study Collaborators, Bull D, Green J, Reeves G. Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet.* 2007 May 19;369(9574):1703-10.
- <sup>17</sup> Cuna S, Hoffmann P, Pujol P. Estrogens and epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2004 Jul;94(1):25-32.
- <sup>18</sup> Borgfeldt C, Andolf E. Cancer risk after hospital discharge diagnosis of benign ovarian cysts and endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004 Apr;83(4):395-400.
- <sup>19</sup> Brinton LA, Sakoda LC, Sherman ME, Frederiksen K, Kjaer SK, Graubard BI et al. Relationship of benign gynecologic diseases to subsequent risk of ovarian and uterine tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Dec;14(12):2929-35.
- <sup>20</sup> Ferguson D, Han L, Wang Y, Cragun J, Hatch K, Chambers S et al. The role of the fallopian tube in ovarian serous carcinogenesis: biologic mechanisms and clinical impacts. *Am J Clin Exp Obstet Gynecol* 2015;2(1):1-13.

- <sup>21</sup> Laki F, Kirova YM, This P, Plancher C, Asselain B, Sastre X et al. Prophylactic salpingo-oophorectomy in a series of 89 women carrying a BRCA1 or a BRCA2 mutation. *Cancer*. 2007 May 1;109(9):1784-90.
- <sup>22</sup> Chiaffarino F, Parazzini F, Decarli A, Franceschi S, Talamini R, Montella M et al. Hysterectomy with or without unilateral oophorectomy and risk of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2005 May;97(2):318-22.
- <sup>23</sup> Jordan SJ, Whiteman DC, Purdie DM, Green AC, Webb PM. Does smoking increase risk of ovarian cancer? A systematic review. *Gynecol Oncol*. 2006;103(3):1122-9.
- <sup>24</sup> Schouten LJ, Rivera C, Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Arslan A et al. Height, body mass index, and ovarian cancer: a pooled analysis of 12 cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Apr;17(4):902-12.
- <sup>25</sup> Tornos C., Silva EG: Pathology of Epithelial Ovarian Cancer :Obst Gyn Clin N. A. 1994; 21:63-78.
- <sup>26</sup> Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO). Documento de consenso. Grupo cáncer de ovario. [www.sego.es/Content/pdf/cancerovario.pdf](http://www.sego.es/Content/pdf/cancerovario.pdf)
- <sup>27</sup> Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. Fourth Edition. 2014.
- <sup>28</sup> Martín-Francisco C, Lailla JM, Bajo JM. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO). Fundamentos de Ginecología. Patología tumoral de ovario.

Clasificación y terminología de los tumores de ovario. Histogénesis y anatomía patológica. 2009. ISBN 978-84-9835-276-4.

<sup>29</sup> González Martín A. Factores Pronóstico y Predicción de respuesta en el cáncer de ovario. IX Congreso Sociedad Española de Oncología Médica. 2003.

<sup>30</sup> Vergote I, De Brabanter J, Fyles A et al. Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian cancer. *Lancet* 2001; 357 (2951): 176-182.

<sup>31</sup> Tropé C, Kaern J, Hogberg T et al. Randomized study on adjuvant chemotherapy in stage I high-risk ovarian cancer with evaluation of DNA-ploidy as prognostic instrument. *Ann Oncol* 2000; 11: 282-288.

<sup>32</sup> Allen DG, Heintz AP, Touw FW. A meta-analysis of residual disease and survival in stage III and IV carcinoma of the ovary. *Eur J Gynaecol Oncol* 1995; 16 (5): 349-356.

<sup>33</sup> Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK et al. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum-era: a Meta-analysis. *J Clin Oncol* 2002; 20 (5): 1248-1259.

<sup>34</sup> Costa MJ, Hansen CL, Walls JE et al. Immunohistochemical markers of cell cycle control applied to ovarian and primary peritoneal surface epithelial neoplasms: p21(WAF1/CIP1) predicts survival and good response to platinum-based chemotherapy. *Hum Pathol* 1999; 30 (6):640-7.

<sup>35</sup> Baekelandt MM, Holm R, Nesland JM et al. P-glycoprotein expression is a marker for chemotherapy resistance and prognosis in advanced ovarian cancer. *Anticancer Res* 2000 ; 20 (2B):1061-7.

<sup>36</sup> Reles A, Wen WH, Schmider A et al. Correlation of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7 (10): 2984-97.

<sup>37</sup> Lavarino C, Pilotti S, Oggionni M et al. p53 Gene status and response to platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 2000; 18 (23): 3936-3945.

<sup>38</sup> Ferrandina G, Lauriola L, Zannoni GF et al. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is associated with chemotherapy resistance and outcome in ovarian cancer patients. *Ann Oncol* 2002;13 (8): 1169-1171.

<sup>39</sup> Izquierdo MA, van der Zee AG, Vermorken JB. Drug resistance-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995 Aug 16;87(16):1230-7.

<sup>40</sup> Buttitta F, Pellegrini C, Marchetti A et al. Human telomerase reverse transcriptase mRNA expression assessed by realtime reverse transcription polymerase chain reaction predicts chemosensitivity in patients with ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 2003; 21 (7): 1320-1325.

- <sup>41</sup> Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 2003, 9 (6): 669-76.
- <sup>42</sup> Gómez-Raposo C1, Mendiola M, Barriuso J, Casado E, Hardisson D, Redondo A. Angiogenesis and ovarian cancer. *Clin Transl Oncol.* 2009 Sep;11(9):564-71.
- <sup>43</sup> Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenesis process. *Curr Mol Med* 2003, 3 (7): 643-651.
- <sup>44</sup> Calvo M, Vidart JA, Moreno A. Valor de la angiogénesis como factor pronóstico en el cáncer de ovario: análisis multivariado. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 2002.
- <sup>45</sup> Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219(4587):983-985.
- <sup>46</sup> Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246(4935):1306-1309.
- <sup>47</sup> Jain L, Vargo CA, Danesi R, Sissung TM, Price DK, Venzon D, Venitz J, Figg WD. The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(9):2496-2508.
- <sup>48</sup> Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* 2008; 8 (8):579-591.

- <sup>49</sup> Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 1991 Jun 25;266(18):11947-54.
- <sup>50</sup> Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996 Apr 15;93(8):1493-1495.
- <sup>51</sup> Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001; 26(1):25-35.
- <sup>52</sup> Valladares M, Plaza-Parrochia F, Lépez M, López D, Gabler F, Gayan P et al. Effect of estradiol on the expression of angiogenic factors in epithelial ovarian cancer. *Histol Histopathol.* 2017 Jan 24:11874.
- <sup>53</sup> Shinkaruk S, Bayle M, Lain G, Deleris G. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003; 3(2):95-117.
- <sup>54</sup> Polterauer S, Grimm C, Mustea A, Concin N, Tanner B, Thiel F, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2007 May;105(2):385-9.

- <sup>55</sup> Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivridis E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 46 (3):293-8.
- <sup>56</sup> Yang B, Cross DF, Ollerenshaw M, Millward BA, Demaine AG. Polymorphisms of the vascular endothelial growth factor and susceptibility to diabetic microvascular complications in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2003; 17 (1):1-6.
- <sup>57</sup> Kong SY; Park JW, Lee JA, Park JE, Park KW, Hong EK, Kim CM. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and survival in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatology* 2007 Aug;46(2):446-55.
- <sup>58</sup> Renner W, Kotschan S, Hoffman C, et al. A common 936 C/T mutation in the gene of vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial factor plasma levels. *J Vasc Res* 2000 Nov-Dec;37(6):443-8.
- <sup>59</sup> Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchison IV, Harden PN. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002 Jan;13(1):260-4.
- <sup>60</sup> Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI. Angiogenesis in colorectal cancer: prognostic and therapeutic implications. *Am J Clin Oncol*. 2006 Aug;29(4):408-17.

- <sup>61</sup> Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* 2000, 5, 37-44.
- <sup>62</sup> Delongchamps NB, Peyromaure M, nh-Xuan AT. Role of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Urology*. 2006 Aug;68(2):244-8.
- <sup>63</sup> Jakubowska A, Gronwald J, Menkiszak J, Górski B, Huzarski T, Byrski T, Edler L, Lubiński J, Scott RJ, Hamann U. The VEGF\_936\_C>T 3'UTR polymorphism reduces BRCA1-associated breast cancer risk in Polish women. *Cancer Lett*. 2008 8;262(1):71-6.
- <sup>64</sup> Li L, Wang L, Zhang W, Tang B, Zhang J, Song H, et al. Correlation of serum VEGF levels with clinical stage, therapy efficacy, tumor metastasis and patient survival in ovarian cancer. *Anticancer Res*. 2004 May-Jun;24(3b):1973-9.
- <sup>65</sup> Alvarez SA, Sayer R, Snyder SA, Broadwater G, Rodriguez GC, Berchuck A, et al. The relationship between serum vascular endothelial growth factor, persistent disease, and survival at second-look laparotomy in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2004 Jul;94(1):74-9.
- <sup>66</sup> Cooper BC, Ritchie JM, Broghammer CL, Coffin J, Sorosky JI, Buller RE, et al. Preoperative serum vascular endothelial growth factor levels: significance in ovarian cancer. *Clin. Cancer. Res*. 2002 Oct;8(10):3193-7.

<sup>67</sup> Hefler LA, Zeillinger R, Grimm C, Sood AK, Cheng WF, Gadducci A, et al. Preoperative serum vascular endothelial growth factor as a prognostic parameter in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2006, 103 (2), 512-7.

<sup>68</sup> Steffensen KD, Waldstrom M, Jeppesen U, Knudsen HJ, Brandslund I, Jakobsen A. Preoperative serum levels of epidermal growth factor receptor, HER2, and vascular endothelial growth factor in malignant and benign ovarian tumors. *Clinical Ovarian Cancer* 2008, 1(2), 127-134.

<sup>69</sup> Bamberger ES, Perrett CW. Angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Mol. Pathol.* 2002, 55 (6), 348-59.

<sup>70</sup> Rudlowski C, Pickart AK, Fuhljohn C, Friepoertner T, Schlehe B, Biesterfeld S, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in ovarian cancer patients: a long-term follow-up. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2006, 16, 183-9.

<sup>71</sup> Yamamoto S, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Komatsu T, Nanbu K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian neoplasms: correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF levels. *Br. J. Cancer* 1997, 76 (9), 1221-7.

<sup>72</sup> Weis S., Cui J., Barnes L., Cheresch D. (2004). Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *The Journal of Cell Biology*, 2004; 167(2), 223–229.

<sup>73</sup> Moghaddam SM, Amini A, Morris DL, Pourgholami MH. Significance of vascular endothelial growth factor in growth and peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2012 Jun; 31(1-2): 143–162.

<sup>74</sup> So J., Wang F.Q., Navari J., Schreher J., Fishman D.A. LPA-induced epithelial ovarian cancer (EOC) in vitro invasion and migration are mediated by VEGF receptor-2 (VEGF-R2). *Gynecologic Oncology*, 2005, 97(3), 870–878.

<sup>75</sup> Steffensen KD, Waldstrom M, Brandslund I, Jakobsen A. The relationship of VEGF polymorphisms with serum VEGF levels and progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2010, 117(1), 109-16.

<sup>76</sup> Boletín europeo de patentes PEDF.

<sup>77</sup> Trombran-Tink J, Chader GG, Jonson LV. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye* 1991; 53(3): 411-4.

<sup>78</sup> Guan M, Yam HF, Su B, Chan KP, Pang CP, Liu WW, Zhang WZ, Lu Y. Loss of pigment epithelium derived factor expression in glioma progression. *J Clin Pathol.* 2003 Apr;56(4):277-82.

<sup>79</sup> Zhang L, Chen J, Ke Y, Mansel RE, Jiang WG. Expression of pigment epithelial derived factor is reduced in non-small cell lung cancer and is linked to clinical outcome. *Int J Mol Med* 2006;17 (5):937-44.

- <sup>80</sup> Uehara H, Miyamoto M, Kato K et al. Expression of pigment epithelium-derived factor decreases liver metastasis and correlates with favourable prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Res* 2004; 64 (10):3533-7.
- <sup>81</sup> Halin S, Wikstrom P, Rudolfsson SH et al. Decreased pigment epithelium-derived factor is associated with metastatic phenotype in human and rat prostate tumors. *Cancer Res* 2004; 64(16):5664-71.
- <sup>82</sup> Ek ET, Dass CR, Choong PF. PEDF: a potential molecular therapeutic target with multiple anti-cancer activities. *Trends Mol Med*. 2006 Oct;12(10):497-502.
- <sup>83</sup> Shweiki D, Itin A, Soffer D Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359 (6398):843-5.
- <sup>84</sup> Belkacemi L, Zhang SX. Anti-tumor effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF): implication for cancer therapy. A mini-review. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016; 35: 4.
- <sup>85</sup> Broadhead ML, Dass CR, Choong PF. Cancer cell apoptotic pathways mediated by PEDF: prospects for therapy. *Trends Mol Med*. 2009 Oct;15(10):461-7.
- <sup>86</sup> Yang H, Xu Z, Iuvone PM, Grossniklaus HE. Angiostatin decreases cell migration and vascular endothelium growth factor (VEGF) to pigment epithelium derived factor (PEDF) RNA ratio in vitro and in a murine ocular melanoma model. *Mol Vis*. 2006 May 22;12:511-7.

- <sup>87</sup> Tong JP, Yao YF. Contribution of VEGF and PEDF to choroidal angiogenesis: a need for balanced expressions. *Clin Biochem.* 2006 Mar;39(3):267-76.
- <sup>88</sup> Guan M, Jiang H, Xu C, Xu R, Chen Z, Lu Y. Adenovirus-mediated PEDF expression inhibits prostate cancer cell growth and results in augmented expression of PAI-2. *Cancer Biol Ther.* 2007 Mar;6(3):419-25.
- <sup>89</sup> Cheung LW, Au SC, Cheung AN, Ngan HY, Tombran-Tink J, Auersperg N, Wong AS. Pigment epithelium-derived factor is estrogen sensitive and inhibits the growth of human ovarian cancer and ovarian surface epithelial cells. *Endocrinology.* 2006 Sep;147(9):4179-91.
- <sup>90</sup> Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, Bergh AR, Lee C, Abramson LP, Cornwell ML, Pins MR, Borensztajn J, Crawford SE. Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):774-80.
- <sup>91</sup> Zhang T, Guan M, Xu C, Chen Y, Lu Y. Pigment epithelium-derived factor inhibits glioma cell growth in vitro and in vivo. *Life Sci.* 2007 Sep 29;81(16):1256-63.
- <sup>92</sup> Ek ET, Dass CR, Contreras KG, Choong PF. PEDF-derived synthetic peptides exhibit antitumor activity in an orthotopic model of human osteosarcoma. *J Orthop Res.* 2007 Dec;25(12):1671-80.

<sup>93</sup> Tsuchiya T, Nakahama K, Asakawa Y, Maemura T, Tanaka M, Takeda S, Morita M, Morita I. The reduction in pigment epithelium-derived factor is a sign of malignancy in ovarian cancer expressing low-level of vascular endothelial growth factor. *Gynecol Endocrinol.* 2009 Feb;25(2):104-9.

<sup>94</sup> Vidaurreta M, Sánchez-Muñoz R, Veganzones S, Rafael S, Gutiérrez M, de-la-Orden V, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in patients with colorectal cancer. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 2010, 102 (1), 20-31.

<sup>95</sup> Bányász I, Bokodi G, Vásárhelyi B, Treszl A, Derzbach L, Szabó A, et al. Genetic polymorphisms for vascular endothelial growth factor in perinatal complications. *Eur. Cytokine Netw.* 2006, 17 (4), 266-70.

<sup>96</sup> Talar-Wojnarowska R, Gasiorowska A, Olakowski M, Lekstan A, Lampe P, Smolarz B, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) genotype and serum concentration in patients with pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *J Physiol. Pharmacol.* 2010, 61(6), 711-6.

<sup>97</sup> Lu Z, Duan D, Cao R, Zhang L, Shen Y, Zheng K et al. A reverse transcription-free real-time PCR assay for rapid miRNAs quantification based on effects of base stacking. *Chem Commun*, 2011,47 (26), 7452-7454.

<sup>98</sup> Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1;30(9):e36.

<sup>99</sup> Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Method. 2011 *Methods*. 25; 402–408.

<sup>100</sup> Rinck-Junior JA, Oliveira C, Lourenço GJ, Sagarra RA, Derchain SF, Segalla JG et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphism and increased risk of epithelial ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015 Jan;141(1):69-73.

<sup>101</sup> Zhang X, Qin J, Qin A. Three Polymorphisms of Vascular Endothelial Growth Factor (+936C > T, -460C > T, and -2578C > A) and Their Susceptibility to Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *Int J Gynecol Cancer*. 2015 Jun;25(5):779-85.

<sup>102</sup> Janardhan B, Vaderhobli S, Bhagat R, Chennagiri Srinivasamurthy P, Venketeshiah Reddihalli P, Gawari R et al. Investigating impact of Vascular Endothelial Growth Factor Polymorphisms in Epithelial Ovarian Cancers: A Study in the Indian Population. *PLoS One*. 2015 Jul 9;10(7):e0131190.

<sup>103</sup> Bhaskari J, Premalata CS, Shilpa V, Rahul B, Pallavi VR, Ramesh G et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms and a synchronized examination of plasma and tissue expression in epithelial ovarian cancers. *Tumour Biol*. 2016 Jan; 37 (1):1017-1023.

<sup>104</sup> Kassim SK, El-Salahy EM, Fayed ST, Helal SA, Helal T, Azzam Eel-D et al. Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin Biochem*. 2004, 37 (5), 363-9.

- <sup>105</sup> Akcay T, Yasar O, Kuseyri MA, Dincer Y, Aydinli K, Benian A et al. Significance of serum c-erbB-2 oncoprotein, insulin-like growth factor-1 and vascular endothelial growth factor levels in ovarian cancer. *Bratisl Lek Listy*. 2016;117 (3): 156-160.
- <sup>106</sup> Lee YY, Kim TJ, Kim MJ, Kim HJ, Song T, Kim MK, et al. Prognosis of ovarian clear cell carcinoma compared to other histological subtypes: a metaanalysis. *Gynecol Oncol*. 2011, 122 (3), 541-7.
- <sup>107</sup> Chan JK, Teoh D, Hu JM, Shin JY, Osann K, Kapp DS. Do clear cell ovarian carcinomas have poorer prognosis compared to other epithelial cell types? A study of 1411 clear cell ovarian cancers. *Gynecol. Oncol*. 2008, 109 (3), 370-6.
- <sup>108</sup> Wong Te Fong LF, Kini M, Morris R. Angiogenesis in primary epithelial ovarian carcinomas. *Anticancer Res* 2001, 21,1662-8.
- <sup>109</sup> Wong Te Fong LF, Gammell SJ, Bamberger ES. Quantification of VEGF-A and PD-ECGF/TP in normal, benign and malignant ovarian lesions. *Rev. Oncol*. 2002, 4,122.
- <sup>110</sup> Premalata CS, Umadevi K, Shobha K, Anurekha M, Krishnamoorthy L. Expression of VEGF-A in Epithelial Ovarian Cancer: Correlation with Morphologic Types, Grade and Clinical Stage. *Gulf J Oncolog*. 2016 May;1(21):49-54.
- <sup>111</sup> Wang M, He Y, Shi L, Shi C. Multivariate analysis by Cox proportional hazard model on prognosis of patient with epithelial ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2011;32(2):171-7.

<sup>112</sup> Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine*. 2000 Aug;12(8):1232-5.

<sup>113</sup> Becerra SP, Notario V. The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer*. 2013 Apr;13(4):258-71.

<sup>114</sup> Yang J, Chen S, Huang X, Han J, Wang Q, Shi D et al. Growth suppression of cervical carcinoma by pigment epithelium-derived factor via anti-angiogenesis. *Cancer Biol Ther*. 2010 Jun 15;9(12):967-74.

<sup>115</sup> Lose F, Nagle CM, O'Mara T, Batra J, Bolton KL, Song H, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and ovarian cancer survival. *Gynecol Oncol*. 2010, 119 (3), 479-83.

<sup>116</sup> Smerdel MP, Waldstrom M, Brandslund I, Steffensen KD, Andersen RF, Jakobsen A. Prognostic importance of vascular endothelial growth factor-A expression and vascular endothelial growth factor polymorphisms in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2009, 19 (4), 578-84.

<sup>117</sup> Hefler LA, Zeillinger R, Grimm C, Sood AK, Cheng WF, Gadducci A et al. Preoperative serum vascular endothelial growth factor as a prognostic parameter in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2006 Nov;103(2):512-7.

<sup>118</sup> Schultheis AM, Lurje G, Rhodes KE, Zhang W, Yang D, Garcia AA, et al. Polymorphisms and clinical outcome in recurrent ovarian cancer treated with cyclophosphamide and bevacizumab. *Clin Cancer Res*. 2008, 14 (22), 7554-63.

- <sup>119</sup> Camerin GR, Brito AB, Vassallo J, Derchain SF, Lima CS. VEGF gene polymorphisms and outcome of epithelial ovarian cancer patients. *Future Oncol.* 2017 Feb;13(5):409-414.
- <sup>120</sup> Tempfer C, Obermair A, Hefler L, Husler G, Gitsch G, Kainz C. Vascular endothelial growth factor serum concentrations in ovarian cancer. *Obstet. Gynecol.* 1998, 92 (3), 360-3.
- <sup>121</sup> Hui G, Meng M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in women with ovarian cancer: A meta-analysis. *J BUON.* 2015, 20 (3) 870-8.
- <sup>122</sup> Whynott RM, Manahan P, Geisler JP. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and cyclooxygenase 2 (COX 2) immunostaining in ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2016;37(2):164-6.
- <sup>123</sup> Foekens JA, Peters HA, Grebenchtchikov N, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Geurts-Moespot A et al. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res.* 2001 Jul 15;61(14):5407-14.
- <sup>124</sup> Kim Kim JG, Chae YS, Sohn SK, Cho YY, Moon JH, Park JY et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Jan 1;14(1):62-6.
- <sup>125</sup> Zhang W, Gordon M, Press OA, Rhodes K, Vallböhmer D, Yang DY et al. Cyclin D1 and epidermal growth factor polymorphisms associated with survival in

patients with advanced colorectal cancer treated with Cetuximab. *Pharmacogenet Genomics*. 2006 Jul;16(7):475-83.

<sup>126</sup> Park HM, Hong SH, Kim JW, Oh D, Hwang SG, An HJ et al. Gender-specific association of the VEGF -2578C > A polymorphism in Korean patients with colon cancer. *Anticancer Res*. 2007 Jul-Aug;27(4B):2535-9.

<sup>127</sup> Sfar Sfar S, Hassen E, Saad H, Mosbah F, Chouchane L. Association of VEGF genetic polymorphisms with prostate carcinoma risk and clinical outcome. *Cytokine*. 2006 Jul;35(1-2):21-8.

<sup>128</sup> Tie J, Desai J. Antiangiogenic therapies targeting the vascular endothelia growth factor signaling system. *Crit Rev Oncog*. 2012;17(1):51-67.

<sup>129</sup> Bevacizumab in ovarian cancer: A critical review of phase III studies. Rossi L, Verrico M, Zaccarelli E, Papa A, Colonna M, Strudel M et al. *Oncotarget*. 2017; 8 (7): 12389-12405.

<sup>130</sup> Musella A, Vertechy L, Romito A, Marchetti C, Giannini A, Sciuga V et al. Bevacizumab in Ovarian Cancer: State of the Art and Unanswered Questions. *Chemotherapy*. 2017;62(2):111-120.

<sup>131</sup> DU F, Li P, Chen J, Gong Z, Chi C, Hu B, Chu H. Adjuvant chemotherapy with bevacizumab (i.p.) can prolong survival time of patients with advanced ovarian cancer after cytoreduction. *Neoplasma*. 2017;64(1):108-113.