



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**Valor Predictivo y Pronóstico de la Determinación de  
Células Tumoraes y ADN Libre Circulantes en Plasma  
en Carcinoma Epitelial de Ovario en Estadio  
Avanzado**

**D. Jerónimo Martínez García**

**2017**



## **TUTOR**

**Dr. D. Joaquín García-Estañ López**

Catedrático de Fisiología Médica. Universidad de Murcia

## **DIRECTORES**

**Dr. D. José Luis Alonso Romero**

Jefe de Servicio de Oncología Médica. Hospital C.U. Virgen de la Arrixaca  
Profesor asociado del Area Medicina. Universidad de Murcia

**Dr. D. Alfredo Minguela Puras**

Jefe de Sección del servicio de Inmunología Clínica. Hospital C.U. Virgen de la Arrixaca  
Profesor asociado del Area Medicina. Universidad de Murcia

**Dr. D. Pedro Antonio Cascales Campos**

F.E.A. del departamento de Cirugía General. Hospital C.U. Virgen de la Arrixaca  
Profesor asociado del Area Medicina. Universidad de Murcia





D. José Luis Alonso Romero, D. Alfredo Minguela Puras y D. Pedro Antonio Cascales Campos,

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Valor predictivo y pronóstico de la determinación de células tumorales y ADN libre circulantes en plasma en carcinoma epitelial de ovario en estadio avanzado", realizada por D. Jerónimo Martínez García bajo su inmediata dirección y supervisión, y que se presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 24 de abril de 2017

A blue ink signature consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke.

Fdo. Dr. José Luis Alonso Romero

A blue ink signature with a prominent vertical stroke and a horizontal stroke crossing it.

Fdo. Dr. Alfredo Minguela Puras

Fdo. Dr. Pedro Antonio Cascales Campos

A blue ink signature with a large, circular loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.



*A mis padres*

*A Hugo y Marco*

*A M<sup>a</sup> Carmen*



## AGRADECIMIENTOS

*La realización del presente trabajo solo ha sido posible por la colaboración y participación de muchas personas a quienes debo un enorme agradecimiento.*

*A las pacientes y a las voluntarias sanas que han participado en este estudio, las primeras, son la base de nuestro trabajo. Su participación desinteresada por el bien de futuras mujeres es un encomiable ejemplo a seguir.*

*Al Dr. José Luis Alonso Romero, director de esta tesis, por haber sido el pilar fundamental para realizar este estudio, por sus sabios consejos y por haber confiado en mí.*

*Al Dr. Alfredo Minguela Puras, codirector de esta tesis, por su gran trabajo con las células tumorales circulantes y por transmitirme el entusiasmo de un espíritu investigador.*

*Al Dr. Pedro Cascales, codirector de esta tesis, por su continua inquietud científica y dedicación.*

*Al Dr. Joaquín García-Estañ López, tutor de mi tesis, por su gran amabilidad y disposición, me ha permitido y ayudado en la consecución de este trabajo.*

*A todos los miembros del comité de tumores ginecológicos y carcinomas del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA), formado por ginecología oncológica, cirugía peritoneal, oncología médica, oncología radioterápica, radiología y anatomía patológica. A todos ellos les tendré siempre una enorme gratitud por su colaboración. Es un honor y un placer trabajar en este formidable equipo.*

*Al Dr. Daniel Carbonell de radiología, que siempre me aceptaba con gran amabilidad la realización de las biopsias que le pedía con tanta urgencia.*

*A la Dra. Edith Braun, del servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Santa Lucía de Cartagena, por su gran disposición a participar en este estudio.*

*A Vicky Martínez Sánchez, bióloga investigadora del servicio de Inmunología del HCUVA, por sus enseñanzas y por recibirme siempre con una sonrisa cuando le llevaba muestras.*

*Al equipo de Biobanco, dirigidos por la Dra. Teresa Escámez, por su continua ayuda y disponibilidad en todo momento.*

*A Anabel Antón García, coordinadora científica de la plataforma de genómica del IMIB (Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria), por sus grandes conocimientos y por tanta energía positiva que me ha transmitido.*

*A Guadalupe, estadística de la Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia, por sus enseñanzas y ayuda de los procedimientos estadísticos, y por hacer fácil lo que parece difícil.*

*A mis compañeros del servicio de Oncología Médica del HCUVA, tanto adjuntos como residentes, por su participación en este proyecto, por estar ahí cuando los he necesitado y por esos buenos momentos que siempre paso junto a ellos.*

*A mis queridas Ana y Paula, nuestras coordinadoras de proyectos, por todo el trabajo que les he dado con mis "renos" y el ánimo que siempre me han transmitido para continuar con este estudio.*

*A mi familia, y en especial a mis padres, por su entrega durante toda la vida y los valores que me han transmitido, y por haberme dado y seguir dándome tanto y tanto cariño.*

*Y muy especialmente a mis hijos Hugo y Marco, por ser la luz y el alma de todos mis días, y a mi amada M<sup>a</sup> Carmen, por haber hecho de mi vida en un sueño maravilloso. Gracias por tu apoyo, tu paciencia y por tu amor.*

*Gracias.*





# INDICE DE CONTENIDOS

Abreviaturas .....	XVII
Lista de tablas .....	XIX
Lista de figuras .....	XXI
<b>1. Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción .....</b>	<b>5</b>
2.1. Cáncer Epitelial de Ovario	7
2.1.1. Epidemiología	9
2.1.2. Factores de riesgo y factores protectores	13
2.1.3. Patogenia y carcinogénesis	15
2.1.4. Anatomía patológica	20
2.1.5. Historia natural	24
2.1.6. Diagnóstico	27
2.1.7. Estadificación	29
2.1.8. Factores pronósticos	29
2.1.9. Manejo terapéutico	33
2.1.9.1. Planteamiento terapéutico en estadio precoz	33
2.1.9.2. Planteamiento terapéutico en estadio avanzado	36
2.1.9.3. Tratamiento de la recaída tumoral	40
2.2. Biomarcadores	43
2.3. Células Tumorales Circulantes	49
2.4. DNA circulante plasmático	58
<b>3. Hipótesis y objetivos .....</b>	<b>71</b>
3.1. Justificación y pertinencia del estudio	73
3.2. Hipótesis	74
3.3. Objetivos	74
<b>4. Material y métodos .....</b>	<b>77</b>
4.1. Diseño del estudio	79
4.2. Población a estudio	79
4.3. Duración y centros de realización	81
4.4. Variables del estudio	81
4.5. Metodología	84
4.5.1. Plan de trabajo	84
4.5.2. Tratamiento de las pacientes	87
4.5.3. Valoración de respuesta	87
4.5.4. Metodología de procesamiento y análisis de parámetros bioquímicos y de hemograma	87
4.5.5. Metodología de procesamiento y análisis de CTC	90
4.5.6. Metodología de procesamiento y análisis de cfDNA	91
4.5.7. Recogida de datos	94
4.5.8. Planificación del análisis de los datos	95
4.6. Diseño estadístico	97
4.7. Consideraciones éticas	98
4.8. Financiación	98
<b>5. Resultados .....</b>	<b>99</b>
5.1. Estudio de las características clínicas de las pacientes .....	101

5.1.1.	Estudio descriptivo de las características clínicas de la muestra pacientes.	102
5.1.2.	Estudio comparativo de la edad y características analíticas entre la muestra pacientes y la muestra control.	106
5.1.3.	Análisis univariante del valor predictivo de las variables clínicas.	108
5.1.3.1.	Valor predictivo de respuesta tumoral a quimioterapia neoadyuvante.	108
5.1.3.2.	Valor predictivo de cirugía óptima.	109
5.1.3.3.	Valor predictivo de respuesta tumoral al finalizar el tratamiento.	110
5.1.4.	Análisis univariante del valor pronóstico de las variables clínicas.	111
5.1.4.1.	Valor pronóstico de supervivencia libre de progresión.	111
5.1.4.2.	Valor pronóstico de supervivencia global.	113
5.2.	Análisis de los biomarcadores planteados en este trabajo. . . . .	116
5.2.1.	Estudio descriptivo del nivel basal de los biomarcadores en el grupo de pacientes.	116
5.2.2.	Estudio comparativo de los biomarcadores entre el grupo pacientes y el grupo control.	117
5.2.3.	Estudio de la influencia de las características clínicas de las pacientes en el valor de los biomarcadores.	122
5.2.4.	Estudio de la influencia de los tratamientos en el nivel de los BM.	126
5.2.5.	Correlación entre los diferentes biomarcadores.	129
5.2.6.	Análisis univariante y multivariante del valor predictivo de respuesta de los biomarcadores.	132
5.2.6.1	Valor predictivo de respuesta a quimioterapia neoadyuvante.	132
5.2.6.2	Valor predictivo de cirugía óptima.	135
5.2.6.3	Valor predictivo de respuesta final.	137
5.2.7.	Análisis univariante y multivariante del valor pronóstico de los biomarcadores.	141
5.2.7.1.	Valor pronóstico de supervivencia libre de progresión.	141
5.2.7.2.	Valor pronóstico de supervivencia global.	145
<b>6.</b>	<b>Discusión . . . . .</b>	<b>151</b>
6.1.	Características clínicas de los sujetos incluidos	153
6.1.1.	Estudio descriptivo de las características clínicas de la muestra pacientes	153
6.1.2.	Comparación de edad y parámetros analíticos entre pacientes y grupo control	155
6.1.3.	Análisis univariante del valor predictivo de las variables clínicas	155
6.1.4.	Análisis univariante del valor pronóstico de las variables clínicas	156
6.2.	Biomarcadores planteados en este trabajo	157
6.2.1.	Estudio descriptivo del nivel basal de los biomarcadores en el grupo de pacientes	158
6.2.2.	Estudio comparativo de los biomarcadores entre el grupo pacientes y el grupo control	159

6.2.3. Influencia de las características clínicas de las pacientes en el valor de los biomarcadores	161
6.2.4. Influencia de los tratamientos en el nivel de cfDNA	164
6.2.5. Correlación entre los diferentes biomarcadores en el CEO	164
6.2.6. Análisis univariante y multivariante del valor predictivo de respuesta de los biomarcadores	166
6.2.7. Análisis univariante y multivariante del valor pronóstico de los biomarcadores	168
6.3. Limitaciones del estudio	170
<b>7. Conclusiones</b>	<b>173</b>
<b>8. Implicaciones clínicas y perspectivas futuras</b>	<b>177</b>
<b>9. Anexos</b>	<b>183</b>
I. Estadificación TNM y FIGO	185
II. ECOG	186
III. Criterios RECIST 1.1	187
IV. Criterios de respuesta y progresión en cáncer de ovario del GCIg 2011	188
V. Índice de carcinomatosis peritoneal (PCI) de Sugarbaker	190
VI. Evaluación del CEIC	191
VII. Consentimiento informado de BioBanc-Mur	192
VIII. Consentimiento informado del estudio	193
<b>10. Referencias bibliográficas</b>	<b>195</b>



## ABREVIATURAS

ADN	Acido Desoxi-ribo-Nucleico
AN	Acidos Nucleicos
ARN	Acido Ribo-Nucleico
ASCO	Sociedad americana de Oncología Médica ( <i>American Society of Clinical Oncology</i> )
AUC	Area bajo la Curva ( <i>Area Under Curve</i> )
BAG	Biopsia-aspiración con Aguja Gruesa
BM	BioMarcadores
CAM	Matriz de adhesión celular ( <i>Cell Adhesion Matrix</i> )
CAPP	CArcinomatosis Peritoneal Primaria
CDI	Cirugía De Intervalo
CEA	Antígeno Carcino-Embrionario
CEO	Carcinoma Epitelial de Ovario
cfDNA	ADN libre circulante ( <i>free circulating DNA</i> )
CKs	Citoqueratinas
COPR	Carcinoma epitelial de Ovario Platino-Resistente
COPS	Carcinoma epitelial de Ovario Platino-Sensible
CPP	Cirugía Peritoneal Primaria
CRD	Cuaderno de Recogida de Datos
CTC	Células Tumorales Circulantes
ctDNA	ADN tumoral circulante
DAPI	4,6-idamidino-2-fenilindol-2
DLP	Doxorubicina Liposomal Pegilada
ECOG	Estado general del paciente según la clasificación de la EORTC
EE	Enfermedad Estable
EpCAM	Molécula de Adhesión de Células Epiteliales
ESP	Especificidad
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	Grado histológico
GCIG	<i>Gynecologic Cancer InterGroup</i>
GE	Equivalentes genómicos
Hb	Hemoglobina
HCUVA	Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
HE4	<i>Human Epididymal Protein 4</i>
HIPEC	Quimioterapia intraperitoneal hipertérmica ( <i>Hyperthermic IntraPEritoneal Chemotherapy</i> )
HR	<i>Hazard ratio</i>
IC	Intervalo de Confianza
IHQ	InmunoHistoQuímica
ILP	Intervalo Libre de Platino
IMC	Indice de Masa Corporal
IMIB	Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria
LDH	Lactato DesHidrogenasa

LSN	Límite Superior Normal
mRNA	Acido Ribo-Nucleico Mensajero
mL	Mililitro
MS	Mediana de Supervivencia
MS	Mediana de Supervivencia
ng	nano-gramos
NLR	Ratio Neutrófilo-Linfocito ( <i>Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio</i> )
OC	Torta epiploica ( <i>Omental cake</i> )
OR	<i>Odds ratio</i>
PCI	Indice de carcinomatosis peritoneal ( <i>Peritoneal Cancer Index</i> )
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PE	Progresión de Enfermedad
PET/TC	Tomografía por Emisión de Positrones/Tomografía Computerizada
PMN	PoliMorfo-Neutrófilos
PNI	Indice Pronóstico Nutricional ( <i>Prognostic Nutritional Index</i> )
qPCR	PCR cuantitativa
QT	Quimioterapia
QTA	Quimioterapia Adyuvante
QTNA	QuimioTerapia NeoAdyuvante
RC	Respuesta Completa
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RP	Respuesta Parcial
RR	Riesgo relativo
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SG	Supervivencia Global
SG5a	Supervivencia Global a 5 años
SLE	Supervivencia Libre de Enfermedad
SLP	Supervivencia Libre de Progresión
SLT	Supervivencia Libre de Tratamiento
SS	Sensibilidad
TC	Tomografía Computerizada
TIL	Infiltrado linfocitario peritumoral ( <i>Tumor-infiltrating lymphocytes</i> )
TR	Tasa de Respuesta
VN	Valor Normal
vs	Versus

## LISTA DE TABLAS

### INTRODUCCION

Tabla 2.1.	Clasificación histológica de los tumores ováricos.	8
Tabla 2.2.	Cinco principales tipos de cáncer de mayor mortalidad en Estados Unidos en 2012, por edad.	11
Tabla 2.3.	Factores de riesgo, protectores y controvertidos en el CEO.	13
Tabla 2.4.	Clasificación de los carcinomas ováricos en 5 grupos diferentes de Prat.	18
Tabla 2.5.	Características clínicas y moleculares del carcinoma de ovario Tipo I y Tipo II	19
Tabla 2.6.	Tipos de tumores epiteliales ováricos.	20
Tabla 2.7.	Frecuencia de presentación y supervivencia a 5 años en función del estadio tumoral.	29
Tabla 2.8.	Factores pronósticos del CEO.	30
Tabla 2.9.	Guía quirúrgica en estadios iniciales.	34
Tabla 2.10.	Potenciales biomarcadores en el carcinoma epitelial de ovario.	43
Tabla 2.11.	Estudios sobre CTC en CEO.	55
Tabla 2.12.	Estudios con cfDNA en diversas neoplasias.	64
Tabla 2.13.	Estudios con cfDNA en carcinoma de ovario.	67

### MATERIAL Y METODOS

Tabla 4.1.	Determinaciones sanguíneas en grupo 1 (CPP y QTA).	86
Tabla 4.2.	Determinaciones sanguíneas en grupo 2º (QTNA y CDI).	86
Tabla 4.3.	Determinaciones sanguíneas en grupo 3º (QT paliativa, sin cirugía prevista).	86
Tabla 4.4.	Valores esperados de integridad del ADN.	93
Tabla 4.5.	Condiciones de funcionamiento del equipo LightCycler 480 (Roche).	93

### RESULTADOS

Tabla 5.1.	Estudio descriptivo de las características clínicas de la muestra pacientes.	103
Tabla 5.2.	Estudio descriptivo de variables de seguimiento.	105
Tabla 5.3.	Comparación de edad y variables analíticas entre pacientes y grupo control.	106
Tabla 5.4.	Análisis univariante del valor predictivo de respuesta a QTNA.	108
Tabla 5.5.	Análisis univariante del valor predictivo de resultado quirúrgico óptimo R0.	109
Tabla 5.6.	Análisis univariante del valor predictivo de respuesta al finalizar el tratamiento.	110
Tabla 5.7.	Análisis univariante del valor pronóstico de las variables clínicas en relación con la supervivencia libre de progresión.	111
Tabla 5.8.	Análisis univariante del valor pronóstico de supervivencia global de las variables clínicas.	114
Tabla 5.9.	Descripción cuantitativa de los niveles basales de los biomarcadores.	116
Tabla 5.10.	Descripción de biomarcadores por intervalos de valor.	116
Tabla 5.11.	Estudio descriptivo de los valores de CTC.	117

Tabla 5.12. Comparación de BM entre grupo de pacientes y grupo control. . . . .	118
Tabla 5.13. Comparación de BM entre pacientes, tumores benignos y controles sanos.	119
Tabla 5.14. Comparación CTC entre pacientes, tumores benignos y controles sanos.	121
Tabla 5.15. Valores de ROC, sensibilidad y especificidad para los BM. . . . .	122
Tabla 5.16. Influencia de las características clínicas en el valor de cfDNA. . . . .	122
Tabla 5.17. Influencia de las características clínicas en la presencia de CTC. . . . .	123
Tabla 5.18. Influencia de las características clínicas en el valor de Ca125. . . . .	124
Tabla 5.19. Influencia de las características clínicas en el valor de HE4. . . . .	125
Tabla 5.20. Correlaciones de los biomarcadores con las variables analíticas generales.	125
Tabla 5.21. Resumen de la influencia de características clínicas en el valor de los biomarcadores. . . . .	126
Tabla 5.22. Valoración del efecto de la CPP sobre el valor de los BM. . . . .	126
Tabla 5.23. Valoración del efecto del primer ciclo de QT sobre el valor de los BM. . . . .	128
Tabla 5.24. Valoración del efecto de la QTNA sobre el valor de los BM. . . . .	128
Tabla 5.25. Correlaciones entre los diferentes biomarcadores. . . . .	129
Tabla 5.26. Relación de CTC con el resto de BM. . . . .	130
Tabla 5.27. Valor predictivo del nivel basal de los BM respecto a la respuesta a QTNA.	132
Tabla 5.28. Valor predictivo de la reducción de los BM tras un ciclo de tratamiento respecto a la respuesta a QTNA. . . . .	134
Tabla 5.29. Valor predictivo de CTC respecto a la respuesta a QTNA. . . . .	134
Tabla 5.30. Análisis multivariante de los factores relacionados con respuesta a QTNA.	134
Tabla 5.31. Valor predictivo de resultado óptimo del valor previo a cirugía de los BM.	135
Tabla 5.32. Valor predictivo de CTC respecto a cirugía óptima R0. . . . .	136
Tabla 5.33. Análisis multivariante del valor predictivo de resultado quirúrgico óptimo R0. . . . .	137
Tabla 5.34. Valor predictivo del nivel basal de los BM respecto a la respuesta final. . . . .	137
Tabla 5.35. Valor predictivo del nivel tras cirugía de los BM respecto a la respuesta final. . . . .	139
Tabla 5.36. Valor predictivo de CTC respecto a la respuesta final. . . . .	139
Tabla 5.37. Análisis multivariante de los factores relacionados con respuesta final. . . . .	140
Tabla 5.38. Valores de ROC, sensibilidad y especificidad de los BM para SLP. . . . .	141
Tabla 5.39. Valor pronóstico de los BM respecto a la SLP. . . . .	142
Tabla 5.40. Análisis multivariante del valor pronóstico de supervivencia libre de progresión. . . . .	144
Tabla 5.41. Valores de ROC, sensibilidad y especificidad de los BM para SG. . . . .	145
Tabla 5.42. Valor pronóstico de los BM respecto a la SG. . . . .	146
Tabla 5.43. Análisis multivariante del valor pronóstico de supervivencia global. . . . .	149

# LISTA DE FIGURAS

## INTRODUCCION

Figura 2.1.	Incidencia a nivel mundial del CEO.	9
Figura 2.2.	Tasa de incidencia de cáncer de ovario por periodo. Región de Murcia 1983-2012.	10
Figura 2.3.	Tasa de incidencia de cáncer de ovario por grupo de edad. Región de Murcia 2003-2007.	10
Figura 2.4.	Mortalidad a nivel mundial del CEO.	12
Figura 2.5.	Tendencias de mortalidad en países desarrollados y en países en vías de desarrollo.	12
Figura 2.6.	Modelo dualista inicial de Shih y Kurman.	17
Figura 2.7.	Modelo dualista de Kurman y Shih expandido.	18
Figura 2.8.	Patogénesis del modelo dual de Kurman y Shih.	19
Figura 2.9.	Rutas moleculares alteradas en el CEO Seroso alto grado.	21
Figura 2.10.	Mecanismos de metástasis en cáncer de ovario y las proteínas implicadas.	26
Figura 2.11.	Supervivencia en función del estadio.	30
Figura 2.12.	Supervivencia global estratificado en función de la enfermedad residual tras cirugía.	32
Figura 2.13.	SG5a en pacientes estadio precoz. Análisis conjunto estudio ACTION e ICON-1.	35
Figura 2.14.	Curva de SG comparando tratamiento intravenoso con intraperitoneal.	39
Figura 2.15.	Proceso de metástasis de las células tumorales.	49
Figura 2.16.	Sistema <i>CellSearch</i> .	51
Figura 2.17.	Imagen de células tumorales circulantes.	52
Figura 2.18.	Prevalencia de CTC en 7.5 mL de sangre en diferentes poblaciones.	53
Figura 2.19.	Acidos nucleicos en plasma de Mandel y Métais (1948).	58
Figura 2.20.	Mecanismos de producción del cfDNA.	60
Figura 2.21.	Acidos nucleicos libres en la circulación.	61
Figura 2.22.	Eficiencia relativa de la cuantificación de cfDNA en términos de longitud de ADN.	62
Figura 2.23.	Metodologías de estudio del ctDNA.	63

## MATERIAL Y METODOS

Figura 4.1.	Tubos de extracción sanguínea.	85
Figura 4.2.	Analizador CellTracks Analyzer II®.	90
Figura 4.3.	Curva estándar Alu115.	94
Figura 4.4.	Curva estándar Alu247.	94

## RESULTADOS

Figura 5.1.	Diagrama con las mujeres incluidas en el estudio.	101
Figura 5.2.	Histograma con la distribución de edades por grupos etarios.	102
Figura 5.3.	Diagrama de cajas de las variables cuantitativas entre pacientes y grupo control.	107

Figura 5.4. Curvas de supervivencia libre de progresión en relación a variables clínicas.	112
Figura 5.5. Curvas de supervivencia global en relación a las variables clínicas.	115
Figura 5.6. Diagrama de cajas con los BM en el grupo pacientes, grupo tumores benignos y grupo de controles sanos.	120
Figura 5.7. Curva ROC de los BM respecto a la capacidad para diferenciar pacientes y grupo control.	121
Figura 5.8. Valoración del efecto de la CPP sobre el valor de los BM.	127
Figura 5.9. Valoración del efecto del primer ciclo de QT sobre el valor de los BM.	127
Figura 5.10. Valoración del efecto de la QTNA sobre el valor de los BM.	128
Figura 5.11. Gráfico con la correlación entre variables continuas.	129
Figura 5.12. Gráfico de cajas de los BM en función de CTC.	131
Figura 5.13. Valor predictivo del nivel basal de los BM respecto a la respuesta a QTNA.	133
Figura 5.14. Valor predictivo del nivel de los BM respecto al resultado óptimo de cirugía.	135
Figura 5.15. Valor predictivo del nivel basal de los BM respecto a la respuesta final.	138
Figura 5.16. Area bajo la curva de los BM respecto a SLP.	141
Figura 5.17. Curvas de SLP respecto al valor basal de los BM.	143
Figura 5.18. Curvas de SLP en función de la reducción del valor del BM tras un ciclo de QT.	144
Figura 5.19. Area bajo la curva de los BM respecto a SG.	145
Figura 5.20. Curvas de supervivencia global en función del valor basal de los BM.	147
Figura 5.21. Curvas de SG en función de la reducción del valor del BM tras un ciclo de QT.	148

# 1. Resumen

---



## **Español**

El carcinoma epitelial de ovario (CEO) es la segunda neoplasia ginecológica más frecuente y la de mayor mortalidad. A pesar de una alta quimiosensibilidad inicial, la mayoría de pacientes con estadio avanzado presentarán recaída tumoral. La recurrencia supondrá generalmente una enfermedad incurable que precisará tratamiento indefinido con quimioterapia y, finalmente, desarrollará resistencia a quimioterapia y tendrá una supervivencia reducida. La valoración de la respuesta tumoral se basa en criterios clínicos, radiológicos y serológicos. Los dos únicos biomarcadores (BM) aprobados en la práctica clínica son el Ca 125 y HE4, pero presentan limitaciones de sensibilidad y especificidad.

Debido a estas limitaciones, al alto índice de recaída del CEO avanzado y al mal pronóstico de la enfermedad resistente, en los últimos años hay numerosas investigaciones que evalúan nuevos BM y nuevas estrategias terapéuticas para mejorar los resultados de los tratamientos. Se necesitan nuevos indicadores capaces de lograr una valoración más sensible y específica de la enfermedad.

Una de las vías de estudio es analizar el papel que juegan las células tumorales circulantes (CTC) y el ADN libre circulante (cfDNA) en plasma en los procesos oncológicos. En el presente trabajo hemos realizado un estudio observacional prospectivo durante 3 años, en pacientes con carcinoma epitelial de ovario en fase avanzada de enfermedad o recaída sensible, para determinar el valor pronóstico y predictivo de los nuevos biomarcadores CTC y cfDNA.

Se han incluido pacientes procedentes del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca y, en el año 2016, se ha añadido el Hospital Universitario Santa Lucía de Cartagena. Se ha incluido un grupo control de tumores benignos y grupo control de mujeres sanas. También se han realizado determinaciones basales de BM antes del inicio del tratamiento y extracciones seriadas a lo largo de él, y se han comparado con las características clínicas y evolución de las pacientes.

El presente trabajo ha sido posible gracias a la colaboración múltiples personas y la participación de pacientes y voluntarias. El estudio recibió dictamen favorable del comité de ética del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

Los datos expuestos aquí son el resultado de este trabajo.

## **Inglés**

Ovarian epithelial carcinoma is the second most frequent gynecological cancer and has the highest mortality. Despite a high initial chemosensitivity, most patients with advanced disease will relapse. Recurrent disease is usually incurable and need several lines of chemotherapy until it develop resistance. The evaluation of the tumour response is based on clinical, radiological and serological criteria. The only two biomarkers approved in clinical practical are Ca 125 and HE4, but they have limitations in sensitivity and specificity.

Due to these limitations, the high rate of relapse of the advanced CEO and the poor prognosis of the resistant disease, new BMs and new therapeutic strategies are needed to improve the prognosis. New indicators are needed to achieve more sensitive and specific assessment of the disease.

One of the research lines is to analyse the role of circulating tumour cells (CTC) and circulating free DNA (cfDNA) in plasma in oncological processes. We have carried out a 3 years prospective observational study in patients with advanced ovarian epithelial carcinoma or sensitive relapsed tumour to determine the prognostic and predictive value of the new biomarkers CTC and cfDNA.

We have included in this investigation projet patients from Clinical Hospital Virgen de la Arrixaca and -from 2016- patients from University Hospital Santa Lucía de Cartagena. A control group of benign tumours and control group of healthy women have been included. Baseline biomarkers determinations were also performed before the start of treatment and serial extractions through the treatment and have been compared with clinical characteristics and tumour evolution.

This work has been possible due to collaboration of many researchers, physicians and the other clinicians, and the participation of patients and volunteers. This study was approved by Hospital Clinical University Virgen de la Arrixaca Ethics Committee.

The data presented here are the result of this research.

## 2. Introducción

---



## 2.1. CANCER EPITELIAL DE OVARIO

---

Las neoplasias ováricas engloban el conjunto de tumores que surgen de las estructuras anexiales del aparato reproductor femenino. Suponen un grupo muy heterogéneo en su histogénesis e historia natural. Podríamos dividirlos en 4 grandes categorías: tumores epiteliales (65-70%), tumores de los cordones sexuales-estroma (15-20%), tumores de las células germinales (5-10%) y metástasis (5%)<sup>1</sup> (tabla 2.1).

Los tumores epiteliales son los más frecuentes, pudiendo ser de subtipo seroso (46%), mucinoso (36%), endometriode (8%), células claras (3%), transicional (2%), indiferenciado (2%) y mixtos (3%)<sup>1</sup>. Cada subtipo puede presentarse con comportamiento benigno, *borderline* o de bajo potencial maligno, y maligno.

Los tumores de cordones sexuales y estroma derivan de los cordones sexuales y del estroma ovárico. Suponen el 15-20% de las neoplasias malignas ováricas y suelen darse en jóvenes y adultos. El más frecuente es el tumor de células de la granulosa.

Los tumores de células germinales derivan de las células germinales primitivas del ovario. Suponen el 5-10% de las neoplasias malignas ováricas y suele darse en pacientes jóvenes. En su mayoría son teratomas quísticos maduros y benignos. El resto son malignos, siendo el más frecuente el disgerminoma.

Las metástasis pueden proceder de cualquier tumor sistémico, siendo el más frecuente el carcinoma de colon seguido del carcinoma de mama. Suelen ser tumoraciones bilaterales y de tamaño menor a 10 cm. El tumor de Kruckenberg clásico se refiere al carcinoma metastásico de células en anillo de sello de primario gástrico, apéndice o colon, y que afecta a los ovarios de forma secundaria.

El presente trabajo se basa en el estudio de los tumores epiteliales malignos de ovario. Todo lo que se comente a continuación hará referencia a ellos.

**TABLA 2.1. Clasificación histológica de los tumores ováricos.**

Tipo Histológico	Subtipos Histológicos
<b>Tumores epiteliales</b>	<p>Seroso</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Tumor seroso benigno (cistoadenofibroma)</li> <li>Tumor seroso <i>borderline</i> o de bajo potencial maligno</li> <li>Carcinoma seroso                             <ul style="list-style-type: none"> <li>Carcinoma seroso de bajo grado</li> <li>Carcinoma seroso de alto grado</li> </ul> </li> </ul> <p>Mucinosos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Tumor mucinoso benigno</li> <li>Tumor mucinoso <i>borderline</i> o de bajo potencial maligno                             <ul style="list-style-type: none"> <li>Tipo gastrointestinal</li> <li>Tipo endocervical, seromucinoso o Mülleriano</li> </ul> </li> <li>Carcinoma mucinoso tipo intestinal</li> <li>Tumor mucinoso con Pseudomixoma Peritoneal</li> </ul> <p>Endometriode</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Tumor endometriode benigno</li> <li>Tumor endometriode <i>borderline</i> o de bajo potencial maligno</li> <li>Carcinoma endometriode                             <ul style="list-style-type: none"> <li>Carcinoma endometriode de bajo grado</li> <li>Carcinoma endometriode de alto grado</li> </ul> </li> </ul> <p>Células claras</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Tumor células claras benigno</li> <li>Tumor células claras <i>borderline</i> o de bajo potencial maligno</li> <li>Carcinoma de células claras</li> </ul> <p>Tumor de células transicionales (Brenner)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Tumor de células transicionales benigno (Brenner)</li> <li>Tumor de Brenner <i>borderline</i> o de bajo potencial maligno</li> <li>Tumor de Brenner maligno</li> <li>Carcinoma de células transicionales</li> </ul> <p>Indiferenciado</p> <p>Mixto</p>
<b>Tumores de los cordones sexuales-estroma</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tumores de células de la granulosa del adulto</li> <li>Tumores de células de la granulosa juvenil</li> <li>Tumor de células de Sertoli-Leyding</li> <li>Tumor de los cordones sexuales con túbulos anulares</li> <li>Ginandroblastoma</li> <li>Fibroma-tecoma</li> <li>Tumores estromales esclerosantes</li> <li>Tumores de células esteroideas sin otra especificación</li> <li>Tumores de células de Leydig y luteomas estromales</li> </ul>
<b>Tumores germinales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Teratoma quístico maduro</li> <li>Teratoma inmaduro</li> <li>Disgerminoma</li> <li>Tumor del saco vitelino (<i>Yolk Sac</i>)</li> <li>Gonadoblastoma</li> <li>Carcinoma embrionario</li> </ul>
<b>Miscelánea</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Paraganglioma</li> <li>Mixoma</li> <li>Carcinoma de células pequeñas tipo hipercalcemiente</li> <li>Carcinoma de células pequeñas tipo pulmonar</li> <li>Carcinoma neuroendocrino de células grandes</li> </ul>
<b>Metástasis</b>	

Adaptado de: Kong CS, Longacre TA and Hendrickson MR. Pathology. En: Berek & Hacker's. Gynecologic Oncology. Sixth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2015

### 2.1.1. EPIDEMIOLOGÍA

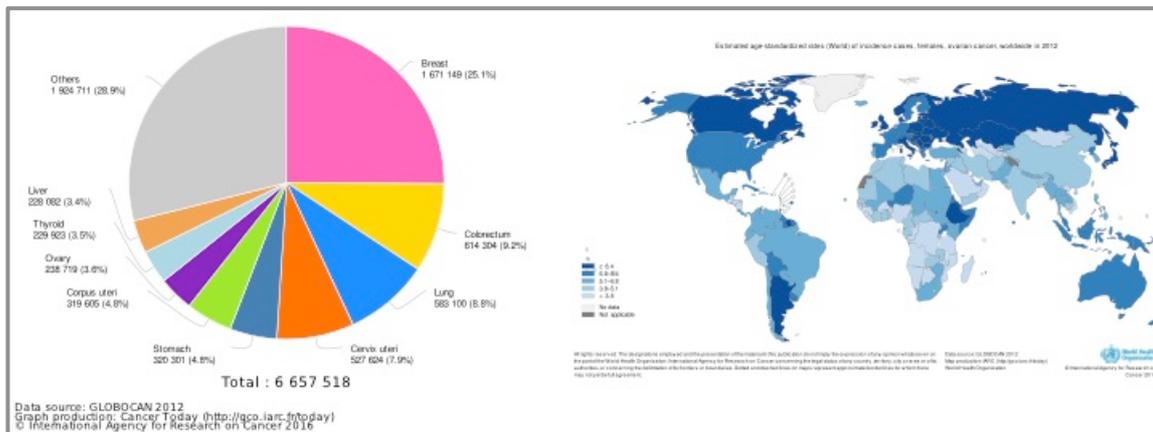
El cáncer epitelial de ovario (CEO) supone un importante problema de salud para el sexo femenino. En países desarrollados es la segunda neoplasia ginecológica más frecuente y la principal causa de muerte por cáncer ginecológico. En la mortalidad por cáncer en la mujer ocupa el quinto lugar, con un 5% del total<sup>2</sup>.

#### INCIDENCIA

A nivel mundial, el CEO se sitúa como el séptimo tumor más frecuente en el sexo femenino, con un total de 238.719 casos en 2012<sup>3</sup>. Dentro de las neoplasias ginecológicas, ocupa el tercer lugar, por detrás del carcinoma de útero y de cérvix (figura 2.1)<sup>2,3</sup>. En países desarrollados es el segundo a nivel ginecológico, sólo por detrás del cáncer de endometrio, debido a la disminución de incidencia del carcinoma cervical.

La tasa de incidencia es mayor en Europa del este, Rusia, Canadá y Argentina, con una incidencia estandarizada a la edad mayor de 8.4 casos/100.000 personas y año, siendo máxima en Bulgaria, Letonia e islas Jiji, con una tasa de incidencia anual de 14 casos/100.000. La menor incidencia corresponde a África, Arabia y países del sur de Asia, con una tasa menor de 6 casos/100.000 (figura 2.1).

FIGURA 2.1. Incidencia a nivel mundial del CEO.



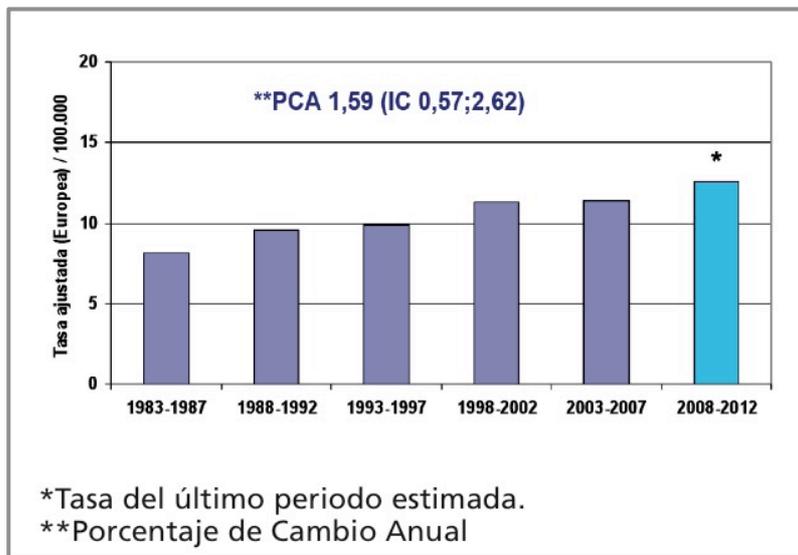
Hay una tendencia a una disminución de la incidencia en los últimos 30 años. En el registro SEER<sup>4</sup> se aprecia una tasa de incidencia anual de 16.32 casos/100.000 en 1975, y en 2007 se reduce a 12.97 casos/100.000. La reducción es mayor en la raza blanca.

La incidencia del CEO aumenta con la edad, pasando desde 3.2 casos/100.000 entre los 30-34 años hasta 55.6 casos/100.000 entre los 80-84 años. La edad media es de 63 años, con un riesgo a lo largo de la vida de padecer un cáncer de ovario de 1.4<sup>3,4</sup>. Entre los 50 y 70 años se da el 50% de los casos, siendo raro por debajo de los 40 años (menos de un 10%)<sup>5</sup>.

En España en 2014, según la Red Española de Registros en Cáncer<sup>6</sup>, el CEO fue el 5º cáncer más frecuente en el sexo femenino, con un total de 3276 casos, con una tasa de incidencia ajustada por edad de 10,2 casos/100.000 personas, situándose en la 4ª tasa más baja de Europa, por encima solo de Portugal, Chipre y Holanda.

En la Región de Murcia, el CEO supone el 6º cáncer en frecuencia en la mujer, con un 4%, siendo también el 2º del aparato genital, por detrás del cáncer de útero<sup>7</sup>. En el periodo 1983-2007 se han diagnosticado 1498 nuevos casos en la región de Murcia. La incidencia ha ido aumentando de forma lenta en los últimos 30 años, pasando de una tasa ajustada a la edad de 7,5 casos/100.000 en 1984 y 7,9 en 1985, a una tasa 12,5 en 2006 y 9 en 2007, con un porcentaje de cambio anual de 1,59 (figura 2.2)<sup>8</sup>.

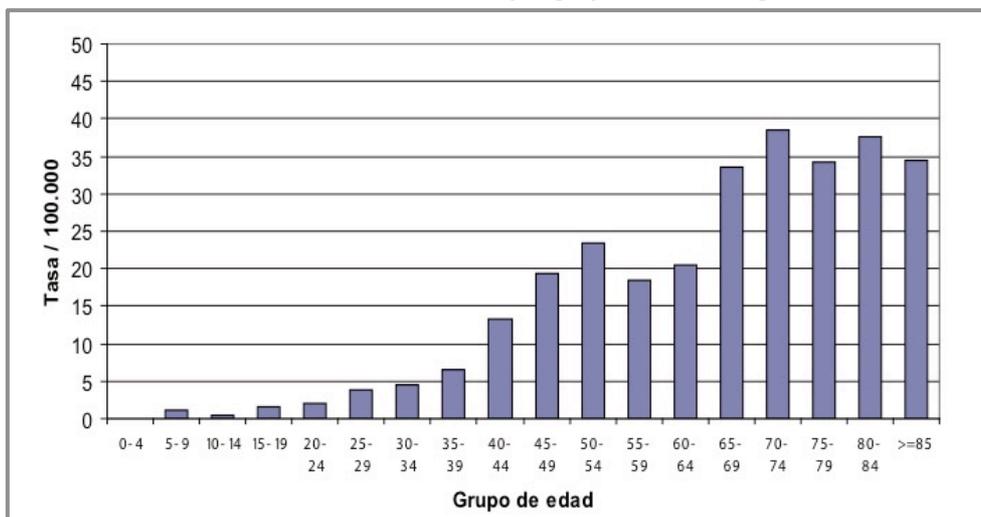
**FIGURA 2.2: Tasa de incidencia de cáncer de ovario por periodo. Región de Murcia 1983-2012**



De: Boletín epidemiológico de Región de Murcia.

Respecto a la distribución por edad, en la figura 2.3 vemos también un aumento progresivo con la edad, con una elevación en la incidencia a partir de los 45-50 años, con una tasa de 20-25/100.000, y por encima de 65 años superando los 30 casos/100.000.

**FIGURA 2.3: Tasa de incidencia de cáncer de ovario por grupo de edad. Región de Murcia 2003-2007**



De: Boletín epidemiológico de Murcia.

## MORTALIDAD

En países desarrollados, el CEO supone la principal causa de mortalidad por cáncer ginecológico. Globalmente, es la quinta causa de mortalidad global por cáncer en mujeres, con un 5% del total, quedando por debajo del cáncer de pulmón, mama, colorrectal y páncreas. En la 5ª y 6ª década de la vida, se eleva a la 4ª causa de mortalidad oncológica en mujeres (tabla 2.2). Se estima que en 2016 habrán en EEUU 14.240 muertes por CEO<sup>2</sup>.

La elevada mortalidad global por cáncer de ovario parece explicarse, en parte, porque la mayoría de las pacientes son diagnosticadas en estadios avanzados de la enfermedad (70-80%), en donde ya las posibilidades de curación son escasas y la supervivencia a 5 años es en torno al 40%<sup>9</sup>. La falta de especificidad de los síntomas iniciales de la enfermedad, la localización intraperitoneal y la ausencia de métodos eficaces de diagnóstico precoz, parecen ser los principales responsables del retraso en el diagnóstico<sup>10</sup>.

**TABLA 2.2. Cinco principales tipos de cáncer de mayor mortalidad en Estados Unidos (2012), por edad**

ALL AGES	<20	20 TO 39	40 TO 59	60 TO 79	≥80
FEMALE					
ALL SITES 276,953	ALL SITES 851	ALL SITES 4,407	ALL SITES 50,462	ALL SITES 132,104	ALL SITES 89,122
Lung & bronchus 70,736	Brain & ONS 252	Breast 984	Breast 11,356	Lung & bronchus 39,918	Lung & bronchus 19,481
Breast 41,152	Leukemia 224	Uterine cervix 446	Lung & bronchus 11,134	Breast 17,760	Breast 11,050
Colorectum 24,651	Soft tissue (including heart) 74	Colorectum 367	Colorectum 4,206	Colorectum 9,905	Colorectum 10,170
Pancreas 19,079	Bones & joints 73	Leukemia 345	Ovary 3,018	Pancreas 9,407	Pancreas 7,031
Ovary 14,404	NHL 27	Brain & ONS 336	Pancreas 2,571	Ovary 7,384	NHL 4,170

NHL: *non-Hodgkin lymphoma*

De: Siegel RL, Miller KD and Jemal A. Cancer Statistics, 2016. *Ca Cancer J Clin* 2016; 66: 7-30

A nivel mundial, el CEO es la 8ª causa de mortalidad por cáncer, con un 4,3%, y la segunda de origen ginecológico tras el carcinoma de cérvix<sup>11</sup>. La tasa de mortalidad, al igual que la incidencia, también es mayor en países de Europa del Este y Canadá, siendo también alta en el norte de Asia, en algunos países africanos y en Estados Unidos. En España y en los países del sur de América, África y Asia se da la menor tasa de mortalidad (figura 2.4).

Un aspecto muy importante a destacar, es que en los últimos 30 años se ha observado una mejoría en la supervivencia global a 5 años, pasando de un 36% en el periodo 1975-1977, a un 46% en 2005-2011<sup>2,4</sup>. En el registro de la FIGO también se constata esta mejoría, pasando de una supervivencia global a 5 años de un 30% en los años 70, a un 50% en los años 1999-2001<sup>5</sup>. Esta tendencia se ha visto en los países desarrollados, sin embargo en países en vías de desarrollo, como Sudáfrica y países de Sudamérica, la tendencia se mantiene o incluso está aumentando (figura 2.5).

FIGURA 2.4: Mortalidad a nivel mundial del CEO.

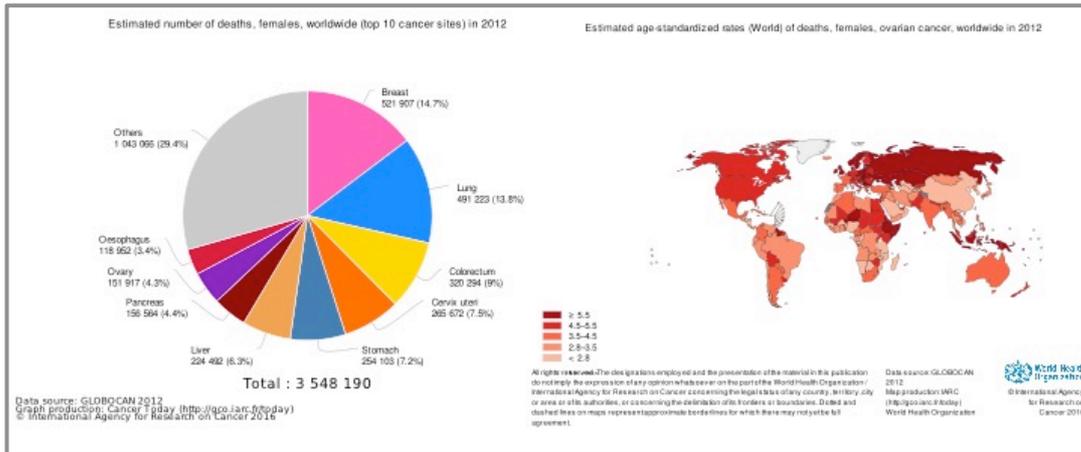
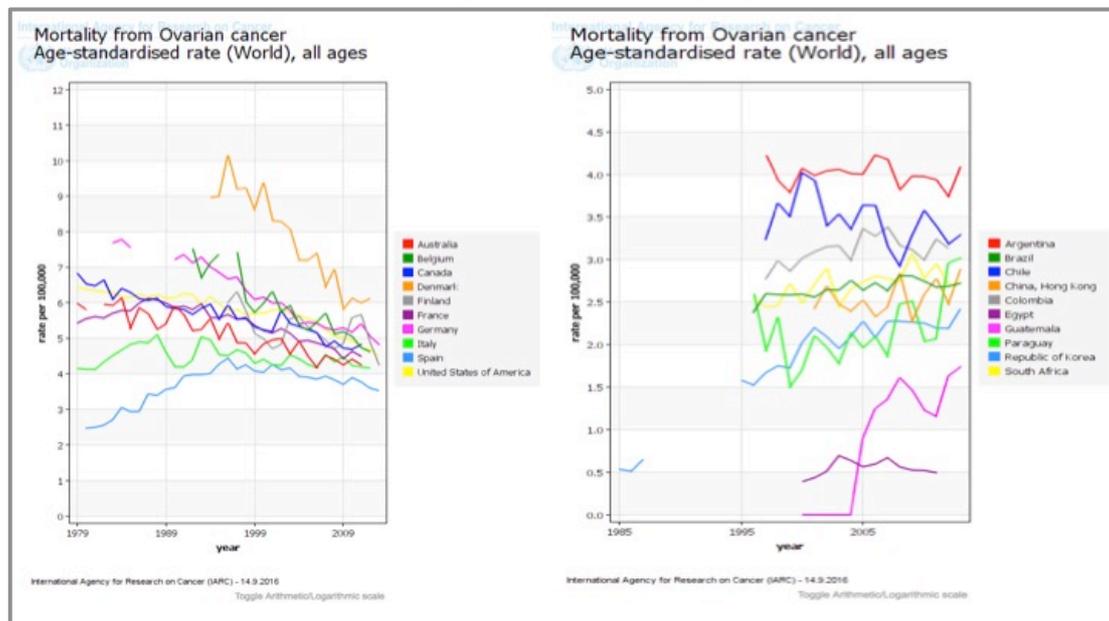


FIGURA 2.5. Tendencias de mortalidad en países desarrollados y en países en vías de desarrollo.



En España, la tasa de supervivencia ajustada por edad a los 5 años en el periodo 2000-2007 (EUROCARE-5) fue del 34.76%, y la tasa de supervivencia relativa ajustada a la edad a los 1, 3 y 5 años, fue de 69.63%, 45.77% y 36.80% respectivamente. Comparando la tasa de supervivencia ajustada a la edad del periodo de 1995-1999 (EUROCARE-4) y el periodo 2000-2007, se observa una estabilización con un 36.90% y 36.80% respectivamente, con una variación sólo de -0.10%. La mortalidad en España por cáncer de ovario en 2014 presentó una tasa bruta de 9.11/100.000, con edad media de 70 años<sup>12</sup>. Comparando con el resto de países europeos, España presenta una tasa de supervivencia relativa ajustada por edad similar a la media europea<sup>13</sup>.

## 2.1.2. FACTORES DE RIESGO Y FACTORES PROTECTORES

Hay una serie de factores, llamados factores de riesgo y factores protectores, que se relacionan con aumento o disminución de la incidencia de CEO respectivamente (tabla 2.3). Una gran parte de los factores de riesgo se relacionan con la historia reproductiva de la mujer y su duración. Factores que conllevan mayor actividad ovárica, como la nuliparidad, menarquia precoz y menopausia tardía, se relacionan con aumento del riesgo de CEO. Sin embargo, otros factores en donde hay periodos de descanso ovulatorio ovárico, como la gestación y la lactancia, parecen ser factores protectores. Esta relación entre la actividad ovárica y el riesgo de CEO ha llevado a la hipótesis de que la ovulación puede tener una importante relación con la incidencia de CEO<sup>14</sup>, y que un ambiente con aumento de la exposición a progestágenos se relaciona con efecto protector<sup>15</sup>.

Un aspecto muy interesante es como los diversos factores afectan de forma diferente según el tipo histológico<sup>16</sup>. Los factores reproductivos como la paridad y el número de hijos, suelen ser factores protectores en todos los subtipos, aunque con diferente fuerza de asociación. El uso de anticonceptivos orales se relaciona con todos los subtipos histológicos menos con el mucinoso. La obesidad parece relacionarse solo con los tumores mal diferenciados y no con el resto<sup>16</sup>.

**TABLA 2.3. Factores de riesgo, protectores y controvertidos en el CEO**

FACTORES DE RIESGO	FACTORES PROTECTORES	FACTORES CONTROVERTIDOS
Factores genéticos (mutaciones BRCA, MMR, otros)	Anticonceptivos orales	Menarquia precoz
Historia familiar de cáncer de ovario o mama	Gestación	Estrategias hormonales reproductivas
Edad	Lactancia	Dieta
Nuliparidad	Ligadura de trompas	Talco
Endometriosis	Histerectomía	Tabaco
Síndrome de ovario poliquístico	Salpingo-oforectomía bilateral	Alcohol
Edad del primer hijo después de los 35 años	Consumo de soja	Antiinflamatorios no esteroideos
Menopausia tardía	Exposición al sol	
Terapia hormonal sustitutiva	Vino tinto	
Obesidad	Aspirina	
Dieta rica en grasas animales		
Asbesto		

### FACTORES DE RIESGO

Dentro de los factores de riesgo, podríamos agruparlos en aquellos relacionados con la carga genética de la paciente, los relacionados con el ambiente hormonal y otros de mecanismo diverso.

Dentro de los primeros, hay que destacar que un porcentaje considerable de mujeres tendrán predisposición genética para desarrollar CEO. Se han descritos varias alteraciones genéticas, como las mutaciones BRCA, Síndrome de Lynch y otros, en donde aumenta de forma importante la incidencia de CEO. Las más importantes son las mutaciones del gen BRCA. Para mujeres con mutaciones BRCA1, la probabilidad acumulada absoluta hasta los 70 años de padecer CEO es del 39% (95% IC 22-51%) y en mutaciones BRCA2 del 11% (95% IC 4.1-18%), con un riesgo relativo de CEO de 21 para mutación BRCA1 (95%IC 12-36) y de 7 para la mutación BRCA2 (95%IC 3.1-16)<sup>17</sup>. La prevalencia de la mutación BRCA en pacientes con cáncer de ovario es solo del 10-15%, aunque en los serosos de alto grado, puede llegar al 17%<sup>18</sup>.

Otra alteración genética importante es el Síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis. Se debe a una mutación en la línea germinal de los genes de reparación de apareamientos o *mismatch* (MMR). Esta mutación producirá un aumento de riesgo acumulado absoluto de un 6-8% de padecer CEO, siendo responsable del 10-15% de los cánceres de ovario hereditarios<sup>19,20</sup>. Presenta una prevalencia entre las pacientes de cáncer de ovario de solo un 0.9-2.7%<sup>20</sup>.

Se han descrito otros factores genéticos menos prevalentes, como los genes RAD51 y BRIP1<sup>21</sup>, y también la existencia de pacientes con una historia familiar de cáncer de ovario o cáncer de mama sin afectación de los genes de susceptibilidad conocidos de cáncer. El tener un familiar afecto en primer grado de cáncer de ovario presenta un aumento de riesgo con riesgo relativo (RR) de 1.48 (95% IC 1.26-1.75), sobre todo en el subtipo seroso<sup>16</sup>.

Otro grupo importante de factores de riesgo son aquellos relacionados con un aumento de la actividad hormonal ovárica. Situaciones como la nuliparidad<sup>22,23</sup>, endometriosis<sup>23,24</sup>, síndrome de ovario poliquístico<sup>25</sup>, edad del primer hijo después de los 35 años<sup>26</sup>, menarquia precoz y menopausia tardía<sup>27,28</sup>, se han relacionado con aumento de la incidencia de CEO. Un aspecto controvertido durante muchos años ha sido el uso de terapia hormonal sustitutiva. A pesar de que hay resultados contradictorios, con algunos estudios que no mostraron relación<sup>29</sup>, la mayoría de trabajos muestran un pequeño aumento del riesgo de CEO<sup>30</sup>. El riesgo parece disminuir al mínimo cuando se añaden progestágenos al tratamiento hormonal sustitutivo, pasando de un RR de 1.22 (95%IC 1.18-1.27), cuando se usan estrógenos durante al menos 5 años, a un RR de 1.10 (95%IC 1.04-1.16)<sup>15</sup>. Otro aspecto polémico ha sido el uso cada vez mayor de estrategias hormonales reproductivas en parejas con dificultad para gestación. La valoración del riesgo de este tipo de tratamientos es muy complejo, puesto que hay muchos sesgos, desde los factores que producen la propia dificultad de gestación, que a su vez pueden asociarse con aumento del riesgo de CEO, hasta una falta de bases de datos de pacientes para un adecuado estudio poblacional. No obstante, estas estrategias hormonales no han mostrado relación con el carcinoma invasivo, y sí con el seroso *bordeline*<sup>23</sup>.

Por último, hay otra serie de factores que presentan un mecanismo variado. Entre ellos estaría la edad, que es el principal factor de riesgo para padecer cáncer en general y el CEO en particular<sup>3,4</sup>. La incidencia aumenta de forma exponencial a partir de los 40 años, con un 50% de pacientes entre 40 y 70 años, y una edad media de 55 años<sup>5,31</sup>. Otro factor importante es la obesidad, que se ha relacionado en la mayoría de estudios con un incremento de CEO, con una odds ratio entre 1,2 -1,3<sup>32</sup>. Otros factores de riesgo comunicados han sido una dieta rica en grasas<sup>33</sup> y el asbesto<sup>34</sup>.

## FACTORES PROTECTORES

Al contrario que en los factores de riesgo, aquellas situaciones con disminución de la actividad ovárica y mayor exposición a progestágenos, como la gestación<sup>16,26</sup> y la lactancia<sup>35,36</sup>, se han relacionado con reducción del riesgo de CEO.

La toma de anticonceptivos orales presenta efecto protector. Desde hace más de 30 años numerosos estudios han demostrado una relación inversa entre la toma de anticonceptivos orales y la incidencia de CEO, con una reducción del riesgo de hasta un 29-40% en los 10 años posteriores a dejar de tomarlos<sup>22,37,38</sup>. Este efecto protector se relaciona con todos los subtipos histológicos menos el mucinoso<sup>16</sup>. Sin embargo, este beneficio en la reducción del CEO hay que sopesarlo con el pequeño aumento de riesgo que parecen presentar de cáncer de mama (RR 1.24; 95% IC 1.15-1.33)<sup>39</sup>. Estudios más recientes, parece que las nuevas formulaciones con dosis bajas de estrógenos pudiera no aumentar ese riesgo (OR 1.0; 95% IC 0.6-1.7)<sup>40</sup>.

Hay ciertas maniobras quirúrgicas que se han descrito como factores protectores. La ligadura de trompas<sup>22,41</sup>, histerectomía<sup>41,42</sup> y, sobre todo, la salpingo-ooforectomía bilateral, se han relacionado con menor incidencia de neoplasia ovárica. Esta última opción quirúrgica supone una medida agresiva pero que en población con alto riesgo de CEO, como los portadores de mutación BRCA, ha supuesto una reducción del 80% de padecer CEO. Un meta-análisis muestra una *hazard ratio* (HR) de 0.21 (95% IC 0.12-0.39) en esta población<sup>43</sup>. Sin embargo, esta actitud hay que valorarlo individualmente con la paciente, puesto que una menopausia precoz conlleva riesgos para la paciente como sofocos, osteoporosis, dispareunia, enfermedades cardiovasculares, etc<sup>44</sup>.

Otros factores protectores descritos han sido una dieta con suplementos de calcio<sup>45</sup> y soja<sup>46</sup>, y la exposición al sol<sup>45</sup>. También parece que el consumo de vino tinto<sup>47</sup> y la toma de aspirina y otros antiinflamatorios no esteroideos también pudieran reducir el riesgo de CEO, pero los estudios son contradictorios.

### 2.1.3. PATOGENIA Y CARCINOGENESIS

En el desarrollo embrionario, del mesodermo primitivo surge el epitelio celómico embrionario, del que derivan el epitelio de superficie ovárico y el tejido Mülleriano. De este último se desarrollarán las trompas de Falopio, útero, cérvix y parte superior de vagina<sup>48</sup>. El 90% de las neoplasias ováricas surgirán de células derivadas del epitelio celómico embrionario<sup>14</sup>.

Es importante tener en cuenta todos los procesos por los cuales los factores etiológicos pudieran interferir en la célula para promover cambios que terminarán en la transformación maligna. Veremos primero aquellos procesos fisiológicos que se han relacionado con el favorecimiento de la acción de los agentes oncogénicos y, después, los procesos de carcinogénesis ovárica que finalizan en la etapa de carcinoma.

## PROCESOS PATOGENICOS

Diversas observaciones epidemiológicas y preclínicas han relacionado ciertos factores con un aumento o disminución del riesgo de transformación maligna ovárica, tal y como hemos expuesto en el apartado anterior 2.1.2. Pero el proceso por el cual estos factores interactúan con las células normales no está bien establecido, por lo que se han postulado varias hipótesis que intentan explicarlos<sup>49</sup>:

- **Hipótesis de la ovulación incesante.** Propuesta en 1971 por Fathalla<sup>50</sup>, indica el riesgo de desarrollar mutaciones en relación a los microtraumatismos y posteriores mecanismos de reparación del epitelio ovárico debido a los ciclos ovulatorios. Esta hipótesis justificaría el hecho de que mujeres con menos ovulaciones (múltiples gestaciones, lactancia, anticonceptivos orales, menarquia tardía y menopausia precoz, etc) tienen menos riesgo de CEO, y aquellas situaciones con más ovulaciones aumentan el riesgo.
- **Estimulación gonadotrófica**<sup>51</sup>. La estimulación excesiva del epitelio ovárico por las gonadotropinas FSH/LH promovería el crecimiento y la división celular, y facilitaría la susceptibilidad a mutaciones. Se relaciona con el aumento de riesgo de CEO en casos de infertilidad y tras la menopausia<sup>48</sup>. También se ha visto que la FSH in vitro promueve diversos oncogenes y promotores del crecimiento.
- **Hipótesis de estimulación hormonal.** Explicaría el hecho de que situaciones con aumento de andrógenos circulantes (síndrome ovario poliquístico, acné, hirsutismo) se relacionan con aumento del riesgo de CEO. Se cree que una exposición prolongada a altas concentraciones de andrógenos en el microambiente, promoverían mecanismos oncogénicos. Otros cambios hormonales también tendrían un papel patogénico, como la reducción de riesgo de CEO ante un aumento de progestágenos.
- **Papel etiológico de los procesos de inflamación**<sup>52</sup>. El daño en el epitelio de superficie ovárico con cada ovulación produciría inflamación y cambios en el potencial redox, que conllevaría a mecanismos de reparación y mayor susceptibilidad a mutaciones. Justificaría el hecho de que la toma crónica de antiinflamatorios se relacione con menor riesgo de CEO y, por otro lado, inductores de inflamación, como el talco y asbesto, se relacionen con mayor riesgo de CEO.
- **Factores genéticos.** Hay un número creciente de factores genéticos con un papel patogénico en el CEO. Los más relevantes son las mutaciones de BRCA 1/2 y de los genes de reparación del ADN<sup>53</sup>.
- **Otras hipótesis** han propuesto otros procesos patogénicos, con mayor o menor evidencia, tales como la teoría de la contaminación pélvica y mecanismos inmunológicos relacionados con la ovulación<sup>53</sup>. Nuevas evidencias abogan sobre un papel cada vez más importante del microambiente tumoral<sup>54</sup>.

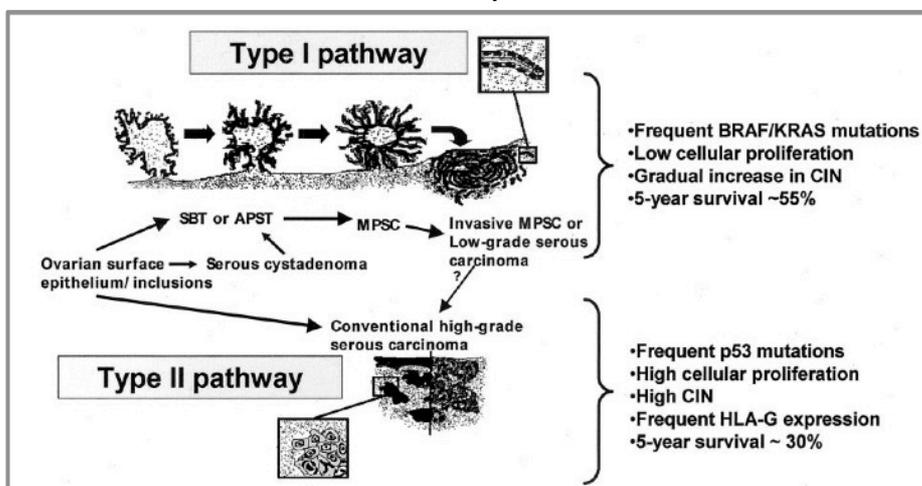
Aunque cada mecanismo tenga un cierto papel patogénico en el desarrollo del CEO, probablemente sea la asociación de múltiples procesos la que conlleve finalmente al proceso de transformación maligna<sup>49</sup>.

## CARCINOGENESIS OVARICA

La visión clásica de la carcinogénesis ovárica era como un proceso que se originaba en el epitelio de la superficie ovárica (mesotelio peritoneal) que se invaginaba y formaba inclusiones quísticas, después presentaba cambios metaplásicos y finalmente transformación maligna, y desde allí se extendía al resto de la cavidad abdominal, estando representado como casi única enfermedad el seroso de alto grado<sup>55</sup>. Sin embargo, posteriormente se vio que la patogénesis del CEO era más compleja y heterogénea de lo que se pensaba, con diferentes subtipos tumorales con características propias.

Kurman y Shih<sup>56</sup> proponen en 2004 un modelo dualista de desarrollo basado en el análisis morfológico y molecular. Según ellos habrían 2 vías de carcinogénesis diferentes, llamadas tipo I y tipo II, que conducirían al desarrollo de diferentes CEO (figura 2.6). Los tumores de tipo I corresponderían a tumores de bajo grado, en donde se incluirían el seroso de bajo grado y también el endometriode, mucinoso, tumor transicional de Brenner maligno y el de células claras. Son genéticamente más estables que el tipo II y se asociarían a cambios moleculares que son raros en los tipo II, como mutaciones BRAF, KRAS, PTEN, PIK3CA y otros. La oncogénesis semeja la secuencia adenoma-carcinoma del cáncer colorrectal, en donde hay una lesión precursora reconocida (cistoadenoma, tumor *borderline*) que presentará transformación maligna.

FIGURA 2.6. Modelo dualista inicial de Shih y Kurman.



MPSC: carcinoma seroso bajo grado (micropapilares). De: Shih and Kurman. Am J Pathol 2004;164:1511-8

Los tumores tipo II corresponderían a tumores de alto grado, como el seroso de alto grado, el carcinosarcoma y el carcinoma indiferenciado. Suelen presentar mutación de p53 y raramente presentan mutaciones de BRAF o KRAS. Tienen también un alto nivel de inestabilidad cromosómica, incluso desde etapas tempranas del desarrollo.

Este nuevo modelo conlleva implicaciones clínicas importantes, pues nos enfrentamos a dos procesos con diferente historia natural, con repercusión diagnóstica y terapéutica.

No obstante, algunos autores han dudado de la relevancia pronóstica de este modelo dualista, proponiendo una nueva clasificación en 5 grupos tumorales con marcadas diferencias en sus características patogénicas, moleculares, morfológicas y clínicas<sup>57, 58</sup> (tabla 2.4).

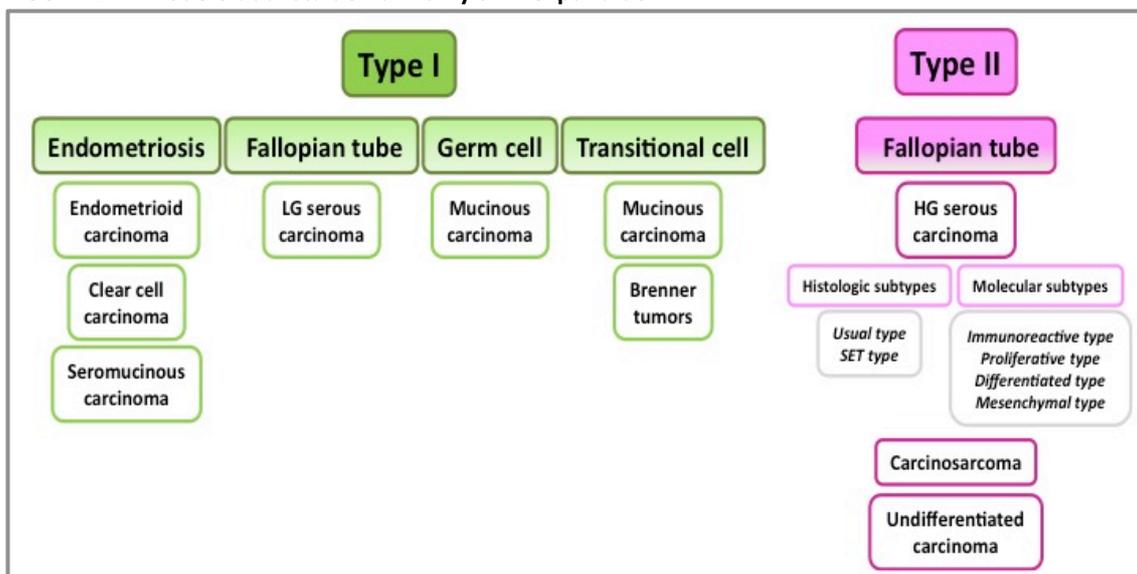
**TABLA 2.4. Clasificación de los carcinomas ováricos en 5 grupos diferentes de Prat.**

TIPO	Seroso alto grado	Seroso bajo grado	Mucinoso	Endometriode	Células claras
<b>Frecuencia (%)</b>	70	<5	3	10	5-10
<b>Factor de Riesgo</b>	BRCA 1-2	¿?	¿?	Síndrome Lynch	Síndrome Lynch
<b>Precursor</b>	Carcinoma seroso intraepitelial tubárico	Seroso <i>borderline</i>	Mucinoso <i>borderline</i>	Endometriosis	Endometriosis
<b>Anormalidad molecular</b>	p53 96% BRCA 22%	BRAF 5-38% KRAS 19%	KRAS 86% HER2 18%	Beta-catenina 48% PTEN 20% ARID1A 33% MSI 19%	HNF1b 95% ARID1A 46% PIK3CA 33% MET 24%
<b>Extensión</b>	Rápida transcelómica	Transcelómica	Confinado en ovario	Confinado en ovario	Confinado en ovario
<b>Quimiosensibilidad</b>	Alta	Intermedia	Baja	Alta	Baja
<b>Pronóstico</b>	Desfavorable	Intermedio	Favorable	Favorable	Intermedio

Adaptado de: Prat J, Virchows Arch 2012 y Devouassoux et al, Bull Cancer 2016

Sin embargo, en el año 2016 el grupo de Kurman y Shih publican una revisión y actualización de su modelo dual, manteniendo su base morfológica pero integrando también los avances moleculares (figura 2.7)<sup>59</sup>. Adaptan el Tipo I a 3 subgrupos: tumores relacionados con endometriosis, como el endometriode, células claras y carcinoma seromucinoso, también llamado tumor Müllleriano mixto; tumores serosos de bajo grado; y subtipo mucinoso y tumor maligno de Brenner. Su origen sería el carcinoma intraepitelial seroso tubárico y su diseminación sería a ovario y resto de estructuras peritoneales.

**FIGURA 2.7. Modelo dualista de Kurman y Shih expandido.**



El tumor seromucinoso correspondería al tumor Müllleriano mixto. SET: transición pseudoendometriode sólida  
 De: Kurman and Shih. Am J Pathol 2016;186(4):733-747

Cada grupo tiene unas características clínicas propias (tabla 2.5). El tipo I son tumores de bajo grado (excepto el subtipo células claras que se considera de alto grado), de curso indolente, habitualmente unilaterales con gran masa quística. En la presentación precoz el pronóstico es excelente, pero en fase avanzada el pronóstico es pobre por su escasa respuesta a quimioterapia. Los tumores de Tipo II son de alto grado, crecimiento rápido y con mayor afectación del estado general. Se presentan habitualmente en estadio avanzado con diseminación peritoneal. Son responsables del 90% de las muertes por CEO<sup>59</sup>.

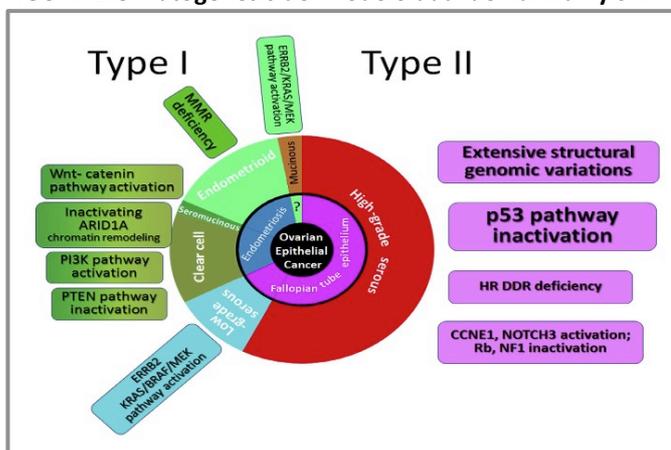
**TABLA 2.5. Características clínicas y moleculares del carcinoma de ovario Tipo I y Tipo II**

Características	Tipo I	Tipo II
<b>Estadio de presentación habitual</b>	Estadio precoz	Estadio avanzado
<b>Grado tumoral</b>	Bajo grado *	Siempre alto grado
<b>Ki-67</b>	Bajo, 10-15%	Alto, en general >50%
<b>Presentación</b>	Masa ovárica quística unilateral, de gran tamaño	Masa ovárica bilateral, menor tamaño que tipo I
<b>Ascitis</b>	Raro	Común
<b>Respuesta a quimioterapia</b>	Mala	Buena
<b>Evolución</b>	Lenta e indolente	Rápida y agresiva
<b>Precusores</b>	Tumores <i>borderline</i>	La mayoría carcinoma seroso intraepitelial tubárico
<b>Inestabilidad cromosómica</b>	Baja	Alta
<b>Mutación tp53</b>	Infrecuente	Muy frecuente
<b>Mecanismos reparación homóloga</b>	Raramente afectados	Frecuentemente afectados
<b>Mutaciones accionables</b>	Pueden estar presentes	Raro
<b>Pronóstico</b>	Favorable	Desfavorable

\* El carcinoma de células claras no tiene grado, se considera de alto grado  
 Adaptado de: Kurman and Shih. Am J Pathol 2016;186(4):733-747

La principal diferencia a nivel molecular entre ambos grupos es la relativa estabilidad genética del tipo I comparada con la inestabilidad cromosómica del tipo II<sup>59</sup>. Las mutaciones inactivadoras de p53 son características del tipo II pero raras en el tipo I. También suelen presentar, al menos en un tercio de los pacientes, deficiencias en los mecanismos de reparación del ADN. Sin embargo, en el tipo I son frecuentes otras mutaciones como las de la vía ERBB2/KRAS/BRAF/MEK, vía PI3K/AKT, inactivación de PTEN, ARID1A, etc (figura 2.8).

**FIGURA 2.8. Patogénesis del modelo dual de Kurman y Shih.**



De: Kurman and Shih. Am J Pathol 2016;186(4):733-747

### 2.1.4. ANATOMÍA PATOLÓGICA.

Los tumores epiteliales ováricos son los tumores ováricos más frecuentes, suponiendo un 65-70% del total<sup>1</sup>. Se han dividido por su aspecto morfológico en 6 subtipos histológicos (tabla 2.6) y cada uno puede ser benigno, *borderline* o de bajo potencial maligno, y maligno.

En el presente trabajo sólo nos referiremos a los tumores epiteliales malignos de ovario, que suponen una enfermedad heterogénea y representan el 90% de los tumores malignos ováricos<sup>60</sup>. También comentaremos brevemente el carcinoma peritoneal primario y el tubárico primario, debido a que, como veremos después, conforman con el CEO una única entidad.

La clasificación de los tumores ginecológicos de la OMS de 2014 introduce una nueva categoría de neoplasias ováricas, los tumores seromucinosos o tumores Müllermanos mixtos<sup>61</sup>.

**TABLA 2.6. Tipos de tumores epiteliales ováricos**

Subtipo Histológico (de mayor a menor frecuencia)	Subtipos
<b>Seroso (46%)</b>	Tumor seroso benigno (cistoadenofibroma) Tumor seroso <i>borderline</i> o de bajo potencial maligno Carcinoma seroso Carcinoma seroso de bajo grado Carcinoma seroso de alto grado
<b>Mucinosos (36%)</b>	Tumor mucinoso benigno Tumor mucinoso <i>borderline</i> o de bajo potencial maligno Tipo gastrointestinal Tipo endocervical, seromucinoso o Müllermano Carcinoma mucinoso tipo intestinal Tumor mucinoso con pseudomixoma peritoneal
<b>Endometriode (8%)</b>	Tumor endometriode benigno Tumor endometriode <i>borderline</i> o de bajo potencial maligno Carcinoma endometriode Carcinoma endometriode de bajo grado Carcinoma endometriode de alto grado
<b>Células claras (3%)</b>	Tumor células claras benigno Tumor células claras <i>borderline</i> o de bajo potencial maligno Carcinoma de células claras
<b>Tumor de células transicionales (Brenner) (2%)</b>	Tumor de células transicionales benigno (Brenner) Tumor de Brenner <i>borderline</i> o de bajo potencial maligno Tumor de Brenner maligno Carcinoma de células transicionales
<b>Indiferenciado (2%)</b>	
<b>Mixto (3%)</b>	

Adaptado de: Kong CS, Longacre TA and Hendrickson MR. Pathology. En: Berek & Hacker's. Gynecologic Oncology. Sixth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2015

## CARCINOMA SEROSO DE ALTO GRADO

Supone el 35-40% de todas la neoplasias ováricas serosas, el 90% de los carcinomas serosos<sup>58</sup>, y el 75% de los carcinomas epiteliales ováricos<sup>1</sup>. Es el subtipo habitual en los pacientes con mutación BRCA<sup>58</sup>. La apariencia macroscópica es un tumor sólido o sólido-quístico. A nivel microscópico presenta estructuras papilares que pueden fundirse y formar láminas de células sólidas con espacios similares a una hendidura. Hay un gran pleomorfismo nuclear, con numerosas figuras mitóticas y atipias<sup>1</sup>. Pueden presentar un patrón papilar, glandular y cribiforme, a veces acompañado de necrosis<sup>59</sup>.

Clínicamente se caracteriza por ocurrir en la 6ª-7ª década de la vida, con una edad media de 56 años, tumoración bilateral en el 60% de los casos, presentación en fase avanzada, alta quimiosensibilidad y frecuente adquisición de resistencias en cada recurrencia<sup>9</sup>.

En el nuevo modelo dual de Kurman y Shih de 2016<sup>59</sup>, se establecen dos subtipos histológicos, el tipo usual y el tipo SET (transicional pseudoendometriode sólido) y cuatro subtipos moleculares. El subtipo SET se presenta en mujeres más jóvenes, se observa un mayor índice mitótico y mayor infiltración de linfocitos en el tumor, y tiene mayor sensibilidad a quimioterapia y un mejor pronóstico<sup>59</sup>.

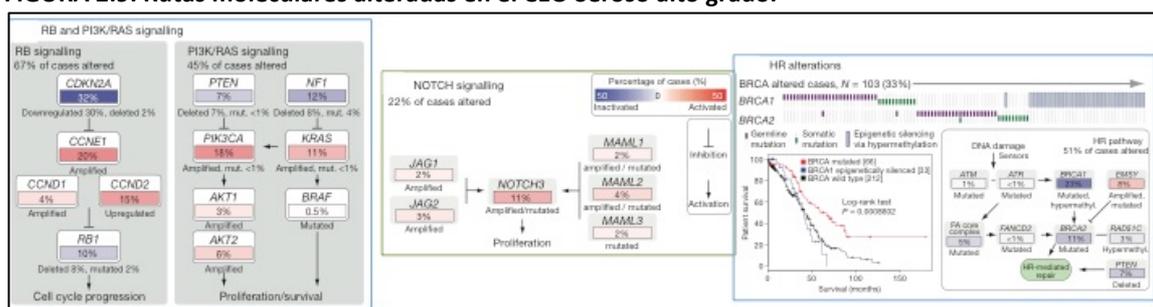
### Alteraciones genéticas asociadas

El CEO seroso de alto grado se caracteriza por una gran inestabilidad genómica, con pérdida y ganancias de segmentos de genoma, con frecuentes amplificaciones y deleciones, y con mutaciones de p53 en más del 96% de los casos. Presenta deficiencia de la recombinación homóloga en la mitad de los casos, siendo lo más habitual mutaciones y cambios epigenéticos en BRCA 1-2 (33% de casos)<sup>59, 62, 63</sup>. El subtipo SET se relaciona con más mutaciones BRCA-1<sup>59</sup>.

Un estudio de expresión génica con microarrays sobre 285 CEO seroso y endometriode, establece 4 subtipos moleculares (inmunoreactivo, proliferativo, diferenciado y mesenquimal), con expresión génica, comportamiento y pronóstico diferentes<sup>64</sup>. Estos subtipos fueron confirmados por el proyecto ATLAS sobre 489 CEO seroso alto grado<sup>62</sup>. También presentan diferente nivel y patrón de infiltración tumoral inmune. Parece que el subtipo inmunoreactivo es el más favorable, con mejor supervivencia<sup>59</sup>.

El proyecto ATLAS muestra que la inestabilidad genómica del seroso alto grado conlleva a la afectación de múltiples vías de señalización celular, como la vía RB1 en el 67%, PI3K/KRTAS en el 45%, NOTCH en el 22%, BRCA en el 33% (figura 2.9)<sup>62</sup>.

FIGURA 2.9. Rutas moleculares alteradas en el CEO Seroso alto grado.



De: The Cancer Genome Atlas Research Network. Nature 2011

### **CARCINOMA SEROSO DE BAJO GRADO**

Son mucho menos frecuentes que los de alto grado (<10% de los carcinomas serosos), se presenta a edad más joven y con una evolución más indolente<sup>9,60</sup>. A nivel microscópico muestran papilas finas y ramificadas que invaden el estroma, pero con moderada atipia y escasa actividad mitótica<sup>1</sup>. Comparte muchas características con los tumores serosos *borderline*, tanto a nivel genético como histológico y clínico, lo que ha llevado a la hipótesis de que el seroso de bajo grado pudiera ser la progresión natural del tumor *borderline*<sup>58,60</sup>. En ocasiones pueden darse de forma sincrónica ambos tipos tumorales<sup>58</sup>. Tras la cirugía, la tasa de recurrencia es sólo del 10%, la mayoría de bajo grado, siendo raro la progresión a un alto grado<sup>59</sup>. Presentan escasa respuesta a quimioterapia<sup>9,58</sup>.

Las alteraciones genéticas asociadas suelen ser mutaciones de BRAF y KRAS, de forma similar a los serosos *borderline*<sup>59</sup>.

### **CARCINOMA MUCINOSO**

El CEO mucinoso representa sólo el 10% de todas las neoplasias ováricas mucinosas, e histológicamente semeja el epitelio intestinal<sup>1</sup>. Suele presentarse limitado a pelvis, unilateral, con tamaño del tumor grande, con una media de 18-20 cm<sup>60</sup>. Suele ser bien diferenciado y heterogéneo, con áreas de cistoadenoma y proliferación atípica y áreas de carcinoma<sup>59</sup>. Presentan una mucosecreción de tipo intestinal<sup>58</sup>.

El subtipo mucinoso primario puede ser difícil de diferenciar de una metástasis de un tumor mucinoso de origen intestinal, sobre todo apendicular<sup>60</sup>. Esta dificultad es mayor cuando se presenta en estadio avanzado y/o bilateral<sup>1</sup>. El tumor mucinoso con pseudomixoma peritoneal suele ser un proceso metastásico de un tumor mucinoso primario apendicular<sup>1</sup>. Es raras ocasiones su origen primario es el ovario.

Las alteraciones genéticas más frecuentes son las mutaciones activadoras de KRAS en el 65% de los casos. En contraste con el resto de tumores de tipo I, la mutación de p53 se da en el 57%, a diferencia también de los tumores *borderline* mucinosos que solo se presenta en el 11%<sup>65</sup>.

### **CARCINOMA ENDOMETRIOIDE**

Suele presentarse a edad más joven que el carcinoma seroso, generalmente en estadio precoz y con escasa ascitis<sup>66</sup>. A nivel histológico es similar al carcinoma endometrial. Suelen ser de bajo grado, aunque a veces presentan un alto grado histológico, con patrón más sólido, y los cambios metaplásicos son frecuentes, principalmente metaplasia escamosa. Pueden presentar una gran variedad de patrones que a veces pueden dificultar el diagnóstico diferencial. En un 40% se asocia con endometriosis y en un 20% de los pacientes presentan un tumor sincrónico primario endometrial<sup>1</sup>.

La alteración genética más frecuente es la mutación en ARID1A, sobre todo cuando está asociado a endometriosis<sup>67</sup>. También se han descrito otras alteraciones como mutaciones de PTEN, PIK3A y KRAS y BRAF<sup>59</sup>.

## CARCINOMA DE CELULAS CLARAS

Los tumores de células claras representan sólo el 3% de todos los tumores epiteliales ováricos, pero la mayoría son malignos<sup>1</sup>. Suelen presentarse en la 5ª-7ª década de la vida (edad media 55 años), en estadio precoz y con una masa ovárica unilateral generalmente grande<sup>68</sup>. La mayoría de mujeres suelen ser nulíparas y en la mitad de los casos se asocia con endometriosis. En los casos de endometriosis puede haber de forma sincrónica carcinoma endometriode y de células claras. Presentan escasa respuesta a quimioterapia<sup>9</sup>. Se relaciona con síndromes paraneoplásicos como hipercalcemia o eventos tromboembólicos<sup>9</sup>.

A nivel microscópico, se caracterizan por glándulas revestidas de células poligonales con citoplasma claro o granular eosinófilo y núcleos alargados hiper cromáticos y pleomórficos. Los carcinoma de células claras no están clasificados por grados, siendo todos de alto grado<sup>1</sup>.

A nivel genético son relativamente estables y no presentan mutación de p53<sup>58</sup>. La mutación más frecuente es la de ARID1A, en el 46% de CEO de células claras, sobre todo asociado a endometriosis<sup>67</sup>. La vía PI3K/AKT/mTOR también suele estar alterada<sup>58,69</sup>.

## CARCINOMA SEROMUCINOSO (CARCINOMA MÜLLERIANO MIXTO)

El tumor seromucinoso ha sido añadido en la clasificación de tumores ginecológicos de la OMS de 2014. Correspondería al previo carcinoma seroso de tipo endocervical<sup>58</sup>. Puede ser dividido en cistoadenoma, tumor *borderline* y carcinoma. Se asocia frecuentemente a endometriosis. Está compuesto por una mezcla de células epiteliales, incluyendo epitelio seroso y mucinoso de tipo endocervical, epitelio endometriode y escamoso<sup>55</sup>. Presentan en el estudio inmunohistoquímico un fenotipo "Mülleriano", con expresión alta de receptores estrogénicos y progesterona, escaso de WT1 y ausencia de CK20 y CDX2<sup>55</sup>.

Por estas características clínicas, morfológicas, inmunohistoquímicas, junto con la pérdida de expresión de ARID1A en un tercio de los casos, el tumor seromucinoso se parece más a un tumor endometriode o células claras que a un tumor mucinoso o seroso. Por ello, algunos autores creen que sería más correcto llamarlo tumor Mülleriano mixto<sup>55</sup>.

## TUMOR DE CELULAS TRANSICIONALES (BRENNER) MALIGNO Y CARCINOMA DE CELULAS TRANSICIONALES

Son tumores poco frecuentes de pequeño tamaño, con masas sólidas con metaplasia del epitelio superficial del ovario. La mayoría son benignos (95%), raro *borderline* (4%) y muy raro el carcinoma (<1%)<sup>1,58</sup>. Suelen presentarse en estadio precoz y presentan gran sensibilidad a quimioterapia basada en platinos, con un excelente pronóstico<sup>58</sup>. A nivel molecular presentan inmunohistoquímica con p16 en el 92% de los casos<sup>59</sup>. No tienen mutación de p53<sup>58</sup>.

## CARCINOMA INDIFERENCIADO

Son tumores poco frecuentes que carecen de características histológicas identificables con un tipo específico de célula. Siempre son de alto grado<sup>1</sup>.

## **CARCINOMA MIXTO**

Se diagnostica de carcinoma mixto cuando hay presentes 2 o más tipos histológicos diferentes, y cada uno ocupa al menos un 10% del tumor<sup>1,60</sup>. Inicialmente se creía que representaban al menos un 3% de los tumores epiteliales, pero estudios recientes morfológicos y moleculares han reducido esta incidencia a menor de 1%<sup>70</sup>.

## **CARCINOMA PERITONEAL PRIMARIO**

También llamado carcinoma seroso-papilar de peritoneo, es morfológicamente similar al carcinoma seroso de alto grado de ovario. Los criterios establecidos por el Gynecologic Oncology Group americano para definirlo son: 1) tamaño normal del ovario; 2) afectación extraovárica mayor que la afectación ovárica; 3) histología serosa predominante y 4) afectación de la superficie ovárica menor de 5 mm en profundidad y anchura<sup>60</sup>.

Parecen derivar de residuos Müllermanos o de las fimbrias de las trompas de Falopio<sup>14</sup>. El comportamiento y manejo terapéutico es similar al CEO<sup>60</sup>. No obstante, comparado con el CEO seroso, el carcinoma peritoneal primario parece tener peor pronóstico, con necesidad de mayor quimioterapia, menores tasas de resección completa y menor supervivencia global<sup>71</sup>.

## **CARCINOMA TUBARICO PRIMARIO**

Tumor muy poco frecuente, con una tasa de 0.41/100.000<sup>72</sup>, su diagnóstico está basado en la ausencia de enfermedad ovárica o endometrial primaria. De forma arbitraria se ha establecido que debe haber menos de 5 mm de afectación del parénquima ovárico y, en el caso de estadio precoz, por la ausencia de afectación ovárica. El tipo más frecuente es el seroso, pero también puede haber endometriode. Sin embargo, está actualmente aceptado que el epitelio tubárico es el origen del carcinoma seroso de ovario<sup>1</sup>, por lo cual probablemente la incidencia sea mayor de lo considerado hasta ahora.

## **TUMORES BORDERLINE O DE PROLIFERACION ATIPICA**

Suponen un grupo heterogéneo de tumores que se basan en una proliferación epitelial atípica sin invasión estromal<sup>60</sup>. Representan un 10% de tumores epiteliales de ovario. La mayoría son serosos, los pacientes suelen ser más jóvenes que en el caso de los carcinomas, generalmente premenopáusicas, y la mayoría se presentan como estadio localizado<sup>14,60</sup>. Tienen un pronóstico excelente, con supervivencia a los 5 años mayor del 85%<sup>5</sup>. En ocasiones pueden presentar implantes peritoneales, que a veces podrán ser invasivos<sup>14</sup>. En esta tesis doctoral no abordaremos este grupo de tumores.

### **2.1.5. HISTORIA NATURAL DEL CANCER EPITELIAL DE OVARIO**

Los tumores de la trompa de Falopio y el carcinoma peritoneal primario presentan características histológicas y clínicas similares al CEO, pues todos derivan de la transformación maligna del mismo precursor de origen, el epitelio celómico embrionario, formando un

continuo en la superficie ovárica, trompas y la superficie peritoneal. Por ello, estas tres entidades se suelen englobar conjuntamente como una misma enfermedad, con manejo clínico, estadificación y tratamiento similares<sup>14</sup>.

En el presente trabajo nos referiremos al CEO, incluyendo en el mismo a carcinoma de la trompa de Falopio y al carcinoma peritoneal primario.

## **PRESENTACION CLINICA**

La presentación clínica suele ser una mujer posmenopáusica, de 55 a 65 años, con molestias abdominales inespecíficas desde 3-4 meses, sobre todo distensión abdominal y dolor pélvico<sup>9,14,73</sup>. La mayor parte de los síntomas se deben a la extensión extrapélvica de la enfermedad, de ahí que en estadio inicial la paciente suele estar asintomática, excepto que presente alguna complicación como torsión ovárica<sup>48,74</sup>. Sólo un 15% de los casos se diagnostica en fase precoz, habiéndose llamado al CEO como el “asesino silencioso”<sup>60</sup>. Más del 90% refiere al menos un síntoma y esto fue el motivo de consulta en la mayoría de veces, conduciendo al diagnóstico del CEO en el 74%, mientras que el diagnóstico casual a través de una exploración física rutinaria solo es el 12%<sup>75</sup>.

En la exploración podrán presentar distensión abdominal, ascitis, derrame pleural y masa palpable pélvica o abdomino-pélvica<sup>14,48</sup>.

Se han intentado usar tablas basadas en la clínica para identificar mujeres con alto riesgo de padecer CEO. Goff et al<sup>76</sup> realizan un estudio de casos-controles sobre un total 637 personas entre pacientes y controles, desarrollando un índice con solo síntomas que presenta una sensibilidad de 57% en enfermedad precoz y 80% en enfermedad avanzada, con especificidad mayor del 86%. Este índice considera los síntomas dolor pélvico/abdominal, distensión o aumento del tamaño abdominal, anorexia y saciedad precoz, cuando ocurren más de 12 veces al mes y han aparecido en el último año.

Los eventos paraneoplásicos son poco frecuentes, habiéndose descrito hipercalcemia (asociada al subtipo células claras), degeneración cerebelosa, queratosis seborreica y trombosis arteriales y venosas<sup>73</sup>.

## **PATRON DE DISEMINACION**

El CEO suele propagarse por el compartimento peritoneal, por vía linfática y por vía hematológica<sup>14</sup>.

### **Vía Peritoneal**

La vía peritoneal o transcelómica es la forma más habitual y precoz de diseminación. Ocurre por la exfoliación de células desde la superficie del tumor primario al resto de la cavidad, con circulación de estas células por el abdomen y pelvis, y finalmente implantación en algún lugar de la superficie peritoneal<sup>14,60</sup>. Las células tumorales exfoliadas se distribuirán por todo el compartimento abdominal siguiendo el sentido circulatorio del líquido peritoneal, por los espacios paracólicos y el mesenterio intestinal, subiendo hasta las cúpulas diafragmáticas, sobre todo la derecha. Por ello, es fundamental en la cirugía del CEO realizar una cuidadosa

exploración de toda la cavidad abdominal, incluyendo las cúpulas diafragmáticas, sobre todo la cápsula hepática<sup>14</sup>.

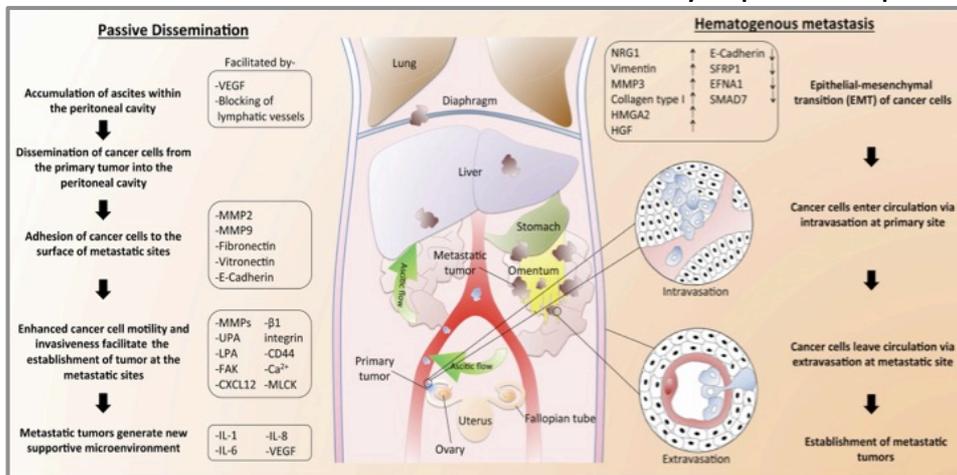
### Vía Linfática

La diseminación a ganglios pélvicos y para-aórticos es frecuente, sobre todo en estadio avanzado<sup>14</sup>. En una serie retrospectiva sobre 276 pacientes, la frecuencia de afectación linfática fue del 44%, estando afectados los ganglios pélvicos en el 30% y los para-aórticos en el 40%<sup>77</sup>. En el estadio I estaban afectados en un 20%, 40% en estadio II y 55% en estadio III y IV. En IA 13%, IB 33% y IC 38%, pero en IAG1 ninguno afecto. Ningún mucinoso estadio I tenía afectación linfática. La diseminación linfática a ganglios extra-abdominales es rara, siendo lo más frecuente a nivel inguinal y supraclavicular, y con el subtipo CEO seroso de alto grado<sup>78</sup>.

### Vía Hematógena

La diseminación vía hematógena ha sido durante años poco importante, teniendo más protagonismo la vía peritoneal. No obstante, en los últimos años están surgiendo datos que indican que quizás tenga mayor relevancia de lo que se pensaba. Algunos autores abogan por un importante papel de la vía hematógena en las metástasis peritoneales, con predilección en el omento<sup>54</sup> (figura 2.10).

**FIGURA 2.10. Mecanismos de metástasis en cáncer de ovario y las proteínas implicadas.**



De: Yeung et al. Am J Physiol Cell Physiol 2015.

Al diagnóstico la afectación visceral es poco frecuente (2-3% de las pacientes)<sup>14</sup>. Sin embargo, en la evolución tumoral esta diseminación aumentará con metástasis sistémicas hasta en el 38% de las pacientes, siendo lo más habitual la afectación pleural en un 25% de los pacientes, seguida de la hepática en un 9.4%<sup>79</sup>. Se dio con mayor frecuencia en los casos con enfermedad peritoneal extensa y afectación de ganglios retroperitoneales<sup>79</sup>. Un estudio suizo sobre 197 autopsias de pacientes fallecidos por cáncer de ovario, muestra que las metástasis sistémicas pudieran ser incluso más frecuentes. Los autores encontraron en el 66.% de los casos realizados, siendo el hígado y espacio pleuropulmonar lo más frecuente<sup>80</sup>.

### 2.1.6. DIAGNOSTICO

Un aspecto que hay que tener presente es que el diagnóstico de certeza de CEO se realiza a través del examen histológico del ovario resecado<sup>14</sup>. En la práctica clínica, tendremos en cuenta el diagnóstico de CEO ante una mujer de 55-65 años con distensión abdominal progresiva en los últimos meses, con o sin otros síntomas abdominales generalmente inespecíficos. A la exploración podrá presentar distensión abdominal y masa pélvica.

Si tras la clínica y la exploración tenemos sospecha de CEO, solicitaremos una serie de exploraciones que nos orienten el diagnóstico antes de plantear una actitud quirúrgica.

#### ANALITICA

Dentro de los parámetros analíticos, hay dos marcadores tumorales con uso clínico. Por una parte el Ca-125, que es el más utilizado, es una glicoproteína de alto peso molecular que se encuentra elevado en el 80% de los pacientes con CEO avanzado, en el 50% en estadio precoz y en el 1-2% de la población normal<sup>60</sup>. En tumores serosos suele ser presentar valores altos, mientras que en mucinosos suelen estar bajos. En presencia de carcinomatosis, una relación de Ca125/CEA >25 es sugestiva de cáncer de origen ovárico<sup>81</sup>. No obstante, el Ca-125 no es específico de CEO, y puede estar elevado en otros procesos con afectación peritoneal, tales como endometriosis, enfermedad pélvica inflamatoria, y en otros procesos neoplásicos como cáncer de páncreas y endometrial<sup>60</sup>.

El otro biomarcador es la glicoproteína epididimal humana HE4, que ha sido incorporada recientemente<sup>48</sup>. El HE4 no se expresa en tejido normal del ovario y su elevación sugiere malignidad.

Con el objetivo de mejorar la precisión del diagnóstico diferencial de una masa anexial, se han planteado paneles con diferentes combinaciones de biomarcadores. Uno de ellos es el algoritmo ROMA, que se basa en el valor de Ca-125, HE4 y el estado menstrual. Se sitúa como una importante herramienta diagnóstica que posee mayor sensibilidad y especificidad que cada uno de los marcadores usados por separado. Da un valor que representa el riesgo de malignidad de una masa ovárica, alcanzando un área bajo la curva (AUC) de 0.909<sup>82</sup>. Un reciente meta-análisis valida definitivamente su uso en la práctica clínica, con un AUC de 0.921 (95% IC 0.855-0960)<sup>83</sup>. Está aprobado por la FDA y en Europa para su uso en la práctica clínica.

#### ECOGRAFIA VAGINAL

La ecografía vaginal es la técnica de imagen inicial en el estudio de masas anexiales<sup>84</sup>. El abordaje vaginal es más sensible que el TC para la valoración de masas pélvicas<sup>48</sup>, y también presenta mejor resolución que la ecografía trans-abdominal<sup>14</sup>. La presencia de una masa compleja mayor de 8-10 cm con componente sólido y quístico, con septos densos e irregulares, y sombras ecográficas, es altamente sugestivo de malignidad<sup>14,48</sup>.

Con la intención de aportar herramientas para diferenciar una masa anexial entre benigna y maligna, se han hecho varios índices de riesgo<sup>85,86,87</sup>. La base de todos ellos es la creación de un modelo con variables clínicas y ecográficas que mejoren la sensibilidad y especificidad. Se alcanzan áreas bajo la curva (AUC) de hasta 0.95<sup>85</sup>.

No obstante, hay que tener en cuenta que la mayoría de masas anexiales son benignas. Sólo el 30% de las neoplasias ováricas en mujeres post-menopausias serán malignas y en premenopáusicas el 7%<sup>14</sup>.

### **TOMOGRAFIA COMPUTERIZADA (TC) y Radiografía/TC de tórax**

Un TC abdomino-pélvico y una prueba de imagen torácica (radiografía o TC) suelen hacerse en la primera línea del estudio de la extensión extrapélvica y extra-abdominal de la enfermedad<sup>9,14</sup>. Es una prueba fundamental para valorar el retroperitoneo y en la evaluación de la resecabilidad quirúrgica<sup>84,88</sup>. La sensibilidad para detectar carcinomatosis peritoneal se sitúa en torno al 60-76%, sin embargo, la sensibilidad para nódulos menores de 1 cm es muy baja, subiendo conforme aumenta el tamaño de los nódulos<sup>89</sup>.

### **RMN PELVICA**

Su papel está siendo cada vez más importante en la valoración de una masa pélvica, con aplicación de nuevas secuencias funcionales como difusión e imágenes dinámicas, con un 94% de sensibilidad y 97% de especificidad para detectar CEO<sup>90</sup>. La difusión aporta una mejor caracterización del tumor y la diseminación peritoneal que el TC y el PET/TC<sup>91</sup>.

### **PET/TC y PET/RM**

La técnica de PET/TC combina imagen metabólica con su correspondiente imagen anatómica, con lo que podría mejorar la valoración de masas pélvicas<sup>92</sup>. Una captación aumentada del marcador 18-fluor-desoxi-glucosa en una masa anexial es muy específico de malignidad en una mujer postmenopáusica<sup>48</sup>. En comparación con TC y ecografía trans-abdominal, parece mejorar tanto la valoración de las masas pélvicas, como la detección de enfermedad a distancia, sobre todo adenopatías, y detección de recurrencias<sup>93, 94</sup>. No obstante, su papel no ha sido aún bien establecido, pues parece que pudiera presentar menos sensibilidad en la valoración de la enfermedad peritoneal respecto al TC<sup>95</sup>. Hay que tener en cuenta la posibilidad de falsos negativos en lesiones quísticas y de falsos positivos en la captación de F-FDG en lesiones inflamatorias y ciertas lesiones benignas<sup>92</sup>.

Nuevas técnicas como el PET/RM mezclan la imagen metabólica a la imagen de la RMN, con una mejor caracterización de las partes blandas, pudiendo ayudar a mejorar la valoración de lesiones pélvicas, y aportar un posible papel predictivo y pronóstico<sup>96</sup>.

En investigación está el posible uso de imágenes moleculares usando marcadores de p53, KRAS, BRAF, etc para la valoración de enfermedad y su actividad biológica, así como la monitorización de la respuesta a quimioterapia.

### **OTRAS PRUEBAS**

Se deberían plantear otras pruebas diagnósticas, tales como endoscopias, mamografía, etc, para descartar otro origen del tumor de forma individualizada en función de la clínica de la paciente<sup>14</sup>. No se aconseja la punción externa del componente quístico, por el riesgo de diseminación tumoral peritoneal que conlleva<sup>48</sup>.

### 2.1.7. ESTADIFICACION

La estadificación del CEO, en ausencia de enfermedad metastásica extra-abdominal, es quirúrgica. La Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) y el Comité Estadounidense Conjunto sobre el Cáncer han establecido unos estadios relacionados y que agrupa tanto al CEO, como al carcinoma de la trompa de Falopio y al carcinoma peritoneal primario (ver ANEXO I)<sup>97</sup>.

La frecuencia de presentación según estadios se expone en la tabla 2.7<sup>5</sup>.

**Tabla 2.7. Frecuencia de presentación y supervivencia a 5 años en función del estadio tumoral.**

Estadio	Frecuencia (%)	Supervivencia global a 5 años (%)
IA	13,1	89,6
IB	1,4	86,1
IC	13,7	83,4
IIA	1,5	70,7
IIB	1,9	65,5
IIC	5,0	71,4
IIIA	2,6	46,7
IIIB	5,6	41,5
IIIC	42,1	32,5
IV	13,0	18,6

### 2.1.7. FACTORES PRONOSTICOS

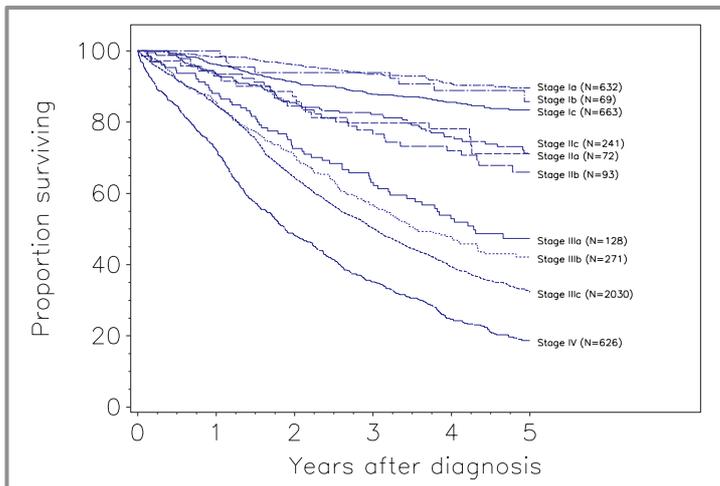
Un factor pronóstico es aquel aspecto o característica que predice el comportamiento de una enfermedad. El conjunto de factores pronósticos de una determinado paciente condicionará la evolución de su cáncer, presentando una mayor o menor supervivencia. Influyen de forma diferente si la enfermedad se presenta en un estadio precoz o en un estadio avanzado (tabla 2.8). El estadio precoz es cuando el CEO se confina a los órganos del aparato ginecológico en la pelvis, correspondiendo al estadio I-IIA. En la enfermedad avanzada habría extensión a la cavidad peritoneal o afectación extra-peritoneal (estadios IIB-IV)<sup>98</sup>.

De todos los factores pronósticos, el principal factor que determina la supervivencia de las pacientes con cáncer de ovario es el estadio quirúrgico al diagnóstico. La supervivencia global a 5 años (SG5a) varía desde un 80-90% en estadio I, hasta un 65-70 en estadio II, 30-45% en estadio III y un 20% en estadio IV (tabla 2.7 y figura 2.11)<sup>5</sup>.

**TABLA 2.8. Factores pronósticos del CEO**

ESTADIO PRECOZ	ESTADIO AVANZADO
Grado histológico	Estadio
Estadio	Enfermedad residual tras cirugía
Tipo histológico: COCC, indiferenciado, epitelial mixto	Grado histológico
Rotura cápsula	Tipo histológico: COMU, COCC, indiferenciado
Edad	Edad
Citología peritoneal positiva	ECOG
Ca 125	CA 125
Número de cromosomas	Ascitis >500 ml (intraoperatoria)
	PCI (Índice de Carcinomatosis Peritoneal)

**FIGURA 2.11. Supervivencia en función del estadio.**



De: Heintz et al. Carcinoma of the Ovary. FIGO 26th Annual Report Editorial Office, EIO Milan. 2006

**FACTORES PRONOSTICOS EN ESTADIO PRECOZ (I-IIA)**

**Grado histológico**

El factor pronóstico más importante lo constituye el grado histológico (G). En el análisis de factores pronósticos de Vergote et al<sup>99</sup> sobre 1545 pacientes con estadio I, la SG5a para el grado 1 (G1) fue superior al 90 %, 81% para moderadamente diferenciado y 60% para aquellas pacientes con tumores grado 3. La HR entre G1 y G2 fue de 3.13 (95%IC 1.68-5.85), y la HR entre G2 y G3 fue de 8.89 (95% IC 4.96-15.9). En el registro FIGO<sup>5</sup> sobre 1837 pacientes, tanto el G2 como el G3 supusieron una HR 1.9 de forma significativa respecto al G1.

**Estadio**

Presentan diferente pronóstico el estadio IA frente al IB, IC y IIA, con SG5a del 90% para el estadio IA, del 86% para IB, 83% para IC y del 71% para IIA<sup>5,99,100</sup>.

**Subtipo histológico**

Parecen presentar peor pronóstico el indiferenciado, células claras y epitelial mixto<sup>5,98</sup>.

**Rotura de la cápsula en estadio precoz**

La rotura de la cápsula, tanto si estaba presente antes de la cirugía como de forma iatrogénica en el acto quirúrgico, se ha visto que implica una peor supervivencia, con HR 2.65 (95%IC 1.53-4.56) y HR 1.64 (95% IC 1.07-2.51) respectivamente<sup>99,100</sup>.

**Edad**

En el trabajo de Vergote et al<sup>99</sup>, los pacientes con más de 50 años tenían un aumento de riesgo de HR 1.02 (95% IC 1.00-1.03).

**Ca 125**

El valor prequirúrgico de Ca-125 se ha relacionado en algunas series con la supervivencia. Una serie retrospectiva australiana sobre 518 pacientes con estadio I, mostró diferencias en SG5a cuando el valor de Ca-125 era mayor o mejor a 30 UI/mL, pasando de 82% a 95% ( $p=0.028$ )<sup>101</sup>. Nagele et al también comunica sobre 201 pacientes con estadio I que Ca-125 fue el más importante factor pronóstico de supervivencia en el análisis multivariado, con un HR 6.37 (95% IC 2.39-16.97)<sup>102</sup>.

**Otros**

No está claro el papel pronóstico en estadio I de la presencia de ascitis, el tamaño del tumor o el crecimiento extracapsular<sup>99</sup>. No obstante, se han descrito mayores recaídas peritoneales en los pacientes con citología peritoneal positiva, con influencia en la supervivencia<sup>100</sup> y aquellos que presentan aneuploidía<sup>103</sup>.

**FACTORES PRONOSTICOS EN ESTADIO AVANZADO (IIB-IV)**

En los estadios avanzados, el estadio tumoral y la enfermedad residual tras la cirugía son los dos principales factores pronósticos.

**Estadio tumoral**

La estadificación tumoral marcará la evolución de la paciente. La SG5a pasa desde un 67% en el IIB, hasta un 50% en IIIA, 42% en IIIB, 33% en IIIC y 18% en estadio IV<sup>5</sup>.

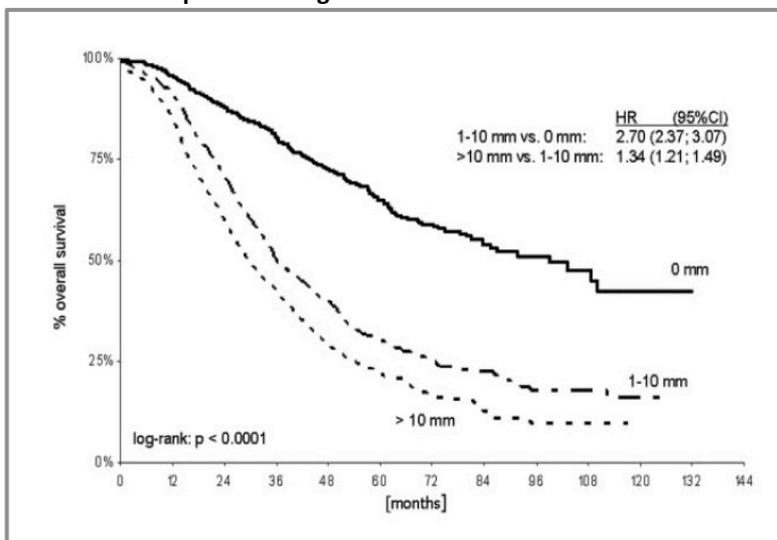
**Enfermedad residual tras la cirugía**

La enfermedad residual tras el gesto quirúrgico determina también la evolución del paciente. Cuando el residuo es mayor de 2 cm tendrá una SG5a del 25%, que subirá al 33% si es menor de 2 cm y al 62% cuando no queda enfermedad macroscópica<sup>5</sup>.

En un análisis de du Bois et al<sup>104</sup> de 3 estudios aleatorizados sobre un total de 3126 pacientes, observaron que optimizando la resección a nulo residuo tumoral, aún se conseguían

mejores resultados. Cuando la resección era completa (residuo tumoral de 0 mm) había diferencia en la SG5a respecto al residuo de 1-10mm y mayor de 10 mm (figura 2.12).

**FIGURA 2.12. Supervivencia global estratificado en función de la enfermedad residual tras cirugía.**



De: du Bois et al. Cancer 2009.

### Grado histológico

En el estadio avanzado habría dos grupos pronósticos en relación al grado histológico, el formado por el grado 1 de bien diferenciado, con una SG5a de 57%, y el otro grupo que serían el grado 2, 3 y desconocido, que presentan una SG5a de un 30%<sup>5,104</sup>.

### Subtipo histológico

Presentan peor pronóstico el mucinoso, células claras y el indiferenciado, y mejor pronóstico el endometriode<sup>5,105, 106, 107</sup>. En la serie de Mackay et al<sup>107</sup> la mediana de supervivencia fue de 51, 41, 21 y 15 meses para el subtipo endometriode, seroso, mucinoso y células claras, respectivamente.

### Edad

Constituye un importante factor pronóstico, pasando de una SG5a del 60% entre los 40-49 años, a de 44% entre los 60-69 años y de 33% entre los 70-79 años<sup>5</sup>.

### Ca 125

El valor pronóstico de la disminución del antígeno tumoral CA 125 durante la quimioterapia en estadios avanzados ha sido objeto de estudio de numerosos estudios, mostrándose como un importante factor pronóstico<sup>108, 109</sup>.

### ECOG

El ECOG 1-2 presenta un HR 1.12 (95% IC 1.01-1.24) respecto al ECOG 0<sup>104, 106</sup>.

## Otros

En el estudio de duBois et al<sup>104</sup> la presencia de una ascitis intraoperatoria mayor de 500 ml supuso en el análisis multivariante una HR de 1.36 (95% IC 1.22-1.51).

La extensión de la enfermedad, medida por el índice de carcinomatosis peritoneal (anexo V), también se ha relacionado con el pronóstico.

### 2.1.9. MANEJO TERAPEUTICO

Ante una paciente con sospecha de cáncer de ovario, tras completar el estudio clínico y radiológico, el siguiente paso será presentar el caso clínico ante el comité de tumores ginecológicos y carcinomatosis del centro hospitalario que corresponda. Este comité será un equipo multidisciplinario formado por todas aquellas especialidades involucradas en la patología tumoral ginecológica. En el participarán especialistas de ginecología oncológica, cirugía peritoneal, oncología médica, radiología, patología.

Tras valorar el caso clínico, se adoptará una decisión interdisciplinaria para abordar la patología de la paciente de una forma consensuada.

En general, nos enfrentaremos a tres escenarios clínicos diferentes: cuando la enfermedad se presente en estadio precoz limitada a pelvis, cuando se presente en estadio avanzada con diseminación peritoneal y las situaciones de recaída tumoral.

Estas situaciones las abordaremos de forma separada, para una mejor comprensión del abordaje terapéutico.

#### 2.1.9.1. PLANTEAMIENTO TERAPEUTICO EN ESTADIO PRECOZ (I-IIA)

En aquellas situaciones en donde se sospeche una neoplasia ovárica en estadio precoz, correspondiendo esto a aquella limitada al aparato genital (estadio I-IIA), el primer paso será plantear una laparotomía para diagnóstico histológico, estadificación y resección tumoral óptima<sup>14, 48, 60, 110, 111</sup>. Hay que tener en cuenta que la estadificación del CEO se basa en los hallazgos quirúrgicos, siguiendo las guías de la *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO)<sup>97</sup>. El abordaje quirúrgico en estadios iniciales deberá plantearse según las recomendaciones del GCG-EORTC, realizando resección tumoral óptima y estadificación quirúrgica completa (tabla 2.9)<sup>112</sup>. La laparoscopia está mostrando similares resultados oncológicos y de seguridad que la laparotomía, por lo que podría ser un procedimiento alternativo<sup>113</sup>.

Una cirugía inicial sub-óptima puede conllevar a una infraestadificación hasta en un 31% de los casos, por ser pacientes con aparente enfermedad limitada a pelvis pero que tienen enfermedad metastásica oculta en el abdomen superior o ganglios linfáticos. Este aspecto es de suma importancia, pues implicaría consecuencias negativas para la paciente desde el punto de vista terapéutico y pronóstico<sup>14,48,112</sup>. El grado histológico se relaciona con la presencia de metástasis ocultas, pues se dan en el 16% del G1, 34% de G2 y en el 46% de G3<sup>14, 112</sup>.

La realización de linfadenectomía sistemática es un tema discutido, pues aunque puede haber afectación hasta en el 13% de los pacientes, sobre todo en tumores G3<sup>114</sup>, aún no

se ha demostrado que suponga beneficio en supervivencia para la paciente<sup>115</sup>. En los tumores de bajo grado y en los tumores mucinosos la afectación linfática suele ser muy rara<sup>116, 117</sup>.

**TABLA 2.9. Guía quirúrgica en estadios iniciales.**

- Histerectomía abdominal total con salpingo-ooforectomía bilateral. La salpingo-ooforectomía unilateral esta permitida en pacientes jóvenes con estadio IA que deseen mantener su fertilidad.
- Lavado peritoneal para estudio citológico.
- Inspección cuidadosa y palpación de todas las superficies peritoneales.
- Biopsia de cualquier lesión sospechosa de metástasis tumoral.
- Omentectomía infracólica.
- Biopsia o resección de cualquier adherencia adyacente al tumor primario.
- Biopsia a ciegas (>2) del peritoneo vesical y fondo de saco.
- Biopsias a ciegas (>3) de los repliegues paracólicos derecho e izquierdo.
- Biopsias a ciegas (>2) o extensiones para citología del hemidiafragma derecho.
- Biopsias a ciegas (>2) del peritoneo de la pared pélvica adyacente al tumor primario (fosa ovárica).
- Muestreo ganglionar a lo largo de las arterias y venas ilíacas externas y comunes.
- Muestreo ganglionar a lo largo de la aorta y de la vena cava, incluyendo el nivel entre la arteria mesentérica inferior y la vena renal izquierda.

De: Subcomité quirúrgico del GCCG EORTC (Young et al, JAMA 1983)

En los tumores mucinosos se recomienda realizar estudio del aparato digestivo y en la cirugía se deberá completar apendicectomía. No precisa linfadenectomía<sup>14,110,111,118</sup>.

## VALORACIÓN DE ADYUVANCIA

Tras el estudio histológico y estadificación quirúrgica, se podrán establecer todos los factores pronósticos de la paciente. En estadio precoz, la tasa de recaída varía entre un 10% y un 40%, la SLE a 5 años 55-89% y la SG5a de 70-90%, dependiendo del conjunto de factores de riesgo que presente<sup>5</sup>.

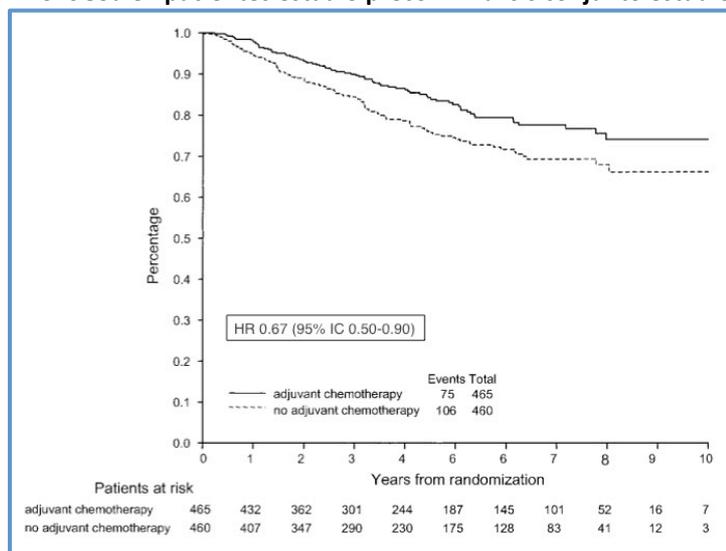
Para buscar terapias que reduzcan ese riesgo, se pusieron en marcha una serie de ensayos clínicos que evaluaron diversos tratamientos complementarios, tales como melfalan, fósforo-32 intraperitoneal, radioterapia abdominal total, alquilantes y otros, pero fueron estudios pequeños y con resultados desiguales<sup>119, 120</sup>. El tratamiento que mostró mayor beneficio fue el tratamiento sistémico con cisplatino<sup>121</sup>.

La demostración definitiva del beneficio de administrar tratamiento frente a observación, llegó con dos grandes estudios europeos aleatorizados, el estudio ACTION y el ICON-1<sup>122,123</sup>. El análisis conjunto de los datos de las casi 900 pacientes incluidas en estos dos estudios (ACTION e ICON-1) demostró que el tratamiento adyuvante con un esquema basado en platino (carboplatino o cisplatino) produce un beneficio tanto en SLE como en SG<sup>124</sup>. La SLE a 5 años mejoró un 11%, pasando de 65% a 76%, con un HR 0.64 (95%IC 0.50-0.82; p=0.001). La SG5a mejoró un 8%, pasando de 74% a 82%, con una HR 0.67 (95% IC 0.50-0.90; p= 0.008) (figura 2.13). Debido a la mejor tolerancia del carboplatino frente al cisplatino, se sugiere el primero como el tratamiento de elección. Tras estos resultados, se establece que el

tratamiento complementario basado en platino aporta beneficio en el CEO precoz<sup>98,103</sup>. Este beneficio en SG se confirmó en el meta-análisis de *Cochrane* 2012<sup>125</sup> y de 2015<sup>126</sup>.

Un aspecto de suma importancia será identificar bien a aquellas pacientes con mayor riesgo de recaída y de muerte que se puedan beneficiar del tratamiento. Diversos trabajos han analizado esta cuestión, siendo lo más aceptado plantear tres grupos de riesgo: un grupo de bajo riesgo con excelente pronóstico que no se beneficiaría de QT adyuvante (estadio IA G1); un grupo de medio riesgo en donde no hay datos concluyentes (estadio IB o IC G1, IA G2); y un grupo de alto riesgo en donde la QT sí parece aportar beneficio en SG (estadio IB o IC G2-3, y células claras)<sup>103, 124, 125, 126, 127</sup>. Las pacientes mal estadificadas también se beneficiarían de la quimioterapia<sup>103, 125, 126</sup>. No obstante, dada la heterogeneidad de los estudios, los autores expresan que estos subgrupos había que analizarlos con precaución.

**FIGURA 2.13. SG5a en pacientes estadio precoz. Análisis conjunto estudio ACTION e ICON-1.**



De: Trimbos et al. J Natl Cancer Inst 2003;95(2):105-112

Otra cuestión discutida es el número de ciclos que sería preciso administrar. El ensayo GOG-157<sup>128</sup> comparó en 427 pacientes estadio I administrar 3 versus 6 ciclos de paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> y carboplatino 7.5AUC. Aunque en la rama de 6 ciclos hubo una tendencia a menores recaídas, esto no fue significativo (HR 0.76, 95% IC 0.51-1.13; p=0.18), y tampoco hubo diferencias en el riesgo de muerte (HR 1.02, 95% IC 0.66-1.57). Los tumores serosos de alto grado presentaron menos recurrencias cuando reciben 6 ciclos frente a 3 ciclos (HR 0.33, 95% IC 0.14-0.77; p=0.04)<sup>129</sup>.

Por lo tanto, como conclusión al tratamiento en estadios localizados, tenemos que plantearnos en estas pacientes la realización de una cirugía peritoneal primaria con exéresis tumoral completa y estadificación operatoria correcta. Tras el abordaje quirúrgico, habrá que examinar el conjunto de factores pronósticos para clasificarla en un grupo de riesgo y así plantear la mejor terapia adyuvante y seguimiento posterior. Debido a que hay aspectos controvertidos, las diferentes guías clínicas<sup>110, 111, 118</sup> varían respecto a sus recomendaciones.

### 2.1.9.2. PLANTEAMIENTO TERAPÉUTICO EN ESTADIO AVANZADO

Cuando el CEO se presenta en estadio avanzado supone una enfermedad que ya se ha diseminado por el peritoneo abdominal, presentando una mayor carga tumoral y mayor riesgo de recaída. Nos referiremos a los estadios IIB-IV. Suponen el 75% de CEO<sup>60</sup> y presentarán una supervivencia libre de progresión (SLP) de 16 meses y mediana de supervivencia (MS) de 44 meses<sup>130</sup>. La SG5a varía desde 65% en estadio IIB a 47% en el IIIA, 41% en IIIB, 32% en el IIIC y 18% en el IV<sup>5</sup>.

El planteamiento terapéutico se basará en una cirugía peritoneal de citorreducción óptima y quimioterapia complementaria.

#### CIRUGIA PERITONEAL PRIMARIA Y DE INTERVALO

El consenso de 2004 de la GCIG-OCCC recomendaba un esfuerzo quirúrgico inicial máximo de citorreducción, con el objetivo de no dejar enfermedad residual<sup>98</sup>. Inicialmente se consideraba cirugía óptima a aquella que dejaba un residuo menor de 1 cm, pero en el último consenso internacional del *Gynecologic Cancer InterGroup* de 2010 se considera la cirugía óptima cuando no queda enfermedad residual macroscópica<sup>131</sup>, es decir, una citorreducción completa "R0", siendo uno de los principales factores pronósticos<sup>48, 60, 84, 130</sup>. La MS pasa en el estadio IIIC de 34 meses cuando queda algún residuo hasta 81 meses cuando no queda resto tumoral<sup>104</sup>. Para ello, se precisan de equipos quirúrgicos especializados con una adecuada curva de aprendizaje<sup>132</sup>.

En aquellas situaciones en donde una cirugía primaria óptima no fuera factible alcanzarla (ver criterios de cirugía subóptima más abajo) o el paciente presentara alto riesgo de morbilidad operatoria, se aconseja quimioterapia neoadyuvante (QTNA) y cirugía de intervalo (CDI) en aquellos pacientes que no progresen tras 3-4 ciclos de QTNA<sup>98, 133</sup>. En estos casos será necesaria una biopsia previa para el diagnóstico histológico.

Cuatro ensayos aleatorizados han mostrado resultados similares entre cirugía peritoneal primaria (CPP) y CDI, incluso con menor morbilidad y menor estancia hospitalaria con la CDI<sup>134, 135, 136, 137</sup>. En ellos se comparó el tratamiento con CPP seguido de 6-8 ciclos de QT adyuvante basada en platino, frente a QTNA basada en platino durante 3-4 ciclos seguido de CDI y después QT adyuvante 3-4 ciclos con el mismo esquema. Los criterios de inclusión se basaron en la presencia de metástasis de al menos 2 cm fuera de la pelvis, afectación adenopática regional o estadio IV, y un ratio CA-125/CEA mayor de 25. Los resultados en SLE y SG fueron similares en ambos brazos. Hubo menor morbilidad en el brazo de QTNA y CDI. Se consiguió mayor cirugía con resultado óptimo en la CDI, llegando hasta un 70-80% frente al 40% en la CPP. En el meta-análisis de Cochrane de 2016 tampoco encuentra diferencia entre ambas alternativas en SLP ni SG ni calidad de vida<sup>138</sup>. En las guías ASCO de 2016 se aconseja ofrecer en aquellas pacientes resecables de forma óptima y bajo riesgo operatorio, la posibilidad de elegir entre CPP o CDI<sup>133</sup>.

No obstante, un estudio de subgrupos no planificado del estudio EORTC-55971, indica que pudiera haber mayor beneficio en SG en pacientes estadio IIIC con lesiones <45 mm cuando reciben CPP, y los pacientes con estadio IV y IIIC con lesiones mayores de 45 mm

parece tener mejor supervivencia cuando se someten a CDI<sup>139</sup>. Pero estos datos son sólo exploratorios y sólo representan una hipótesis de trabajo.

Analizando los datos de los ensayos publicados hasta la fecha, revisiones Cochrane y meta-análisis, Makar et<sup>140</sup> al sugiere dividir a los pacientes en 5 categorías en función de la extensión de la enfermedad, biología tumoral y situación clínica, para justificar una mejor toma de decisiones entre CPP y CDI.

En otro orden, en algunos centros se viene aplicando la técnica intraoperatoria de HIPEC (Hipertermia). Esta técnica consiste en la aplicación de quimioterapia a temperatura 41.5º durante 60-90' directamente en el campo operatorio tras realizar una cirugía peritoneal óptima. Los estudios observacionales muestran que se trata de una técnica segura con escasa morbilidad, aunque dado que todavía no está avalada por estudios fases III, no se debe recomendar fuera de ensayo clínico<sup>141</sup>.

En pacientes con estadio IV e inoperables, se debería plantear QT de enfermedad avanzada<sup>60</sup>. En casos seleccionados de metástasis únicas con opciones de resección completa R0, se podría plantear tratamiento quirúrgico como en estadio III<sup>142</sup>.

## CRITERIOS DE CIRUGIA SUBOPTIMA

No se disponen hasta la fecha de parámetros preoperatorios predictivos de resección óptima de suficiente fiabilidad. Hay varios criterios de irresecabilidad propuestos en base a parámetros clínicos, valor de Ca-125 y los hallazgos radiológicos en TC:

- A nivel clínico, una edad mayor de 60 años y una valoración de riesgo anestésico (ASA) 3-4, se relaciona con cirugía subóptima<sup>143</sup>.
- En valores serológicos, el valor de plaquetas sanguíneo<sup>144</sup> y un valor de Ca-125 mayor de 500 U/mL<sup>145</sup> se relaciona con mayor riesgo de cirugía subóptima.
- Radiológicamente en el TC, la presencia de adenopatías retroperitoneales por encima de las arterias renales mayores de 1 cm, carcinomatosis difusa en mesenterio de intestino delgado, afectación de tronco de arteria mesentérica superior y área periesplénica, se relacionan con baja probabilidad de resección óptima<sup>143</sup>. La presencia de ascitis importante también se relaciona con cirugía subóptima<sup>144</sup>.

Algunos autores han planteado un *score predictivo* que se relaciona con la posibilidad de resección óptima<sup>143</sup>, aunque todavía no está implantado en la práctica clínica.

En algunos centros usan laparoscopia para valorar resecabilidad como paso previo a una cirugía peritoneal, pero no está aún estandarizado<sup>133,146</sup>. Hay que tener en cuenta que se han descrito metástasis en el puerto de entrada hasta en el 17% de los pacientes, aunque no parece comprometer el pronóstico<sup>147</sup>.

Los pacientes con metástasis pulmonares y hepáticas múltiples, masas voluminosas en raíz de mesenterio que afecten a la arteria mesentérica superior, conglomerados adenopáticos retroperitoneales voluminosos por encima de los vasos renales, gran afectación de la serosa intestinal que obligara a extensa resección intestinal, nódulos diafragmáticos voluminosos con penetración en tórax y los pacientes inoperables por comorbilidad o situación clínica, no serían candidatos a cirugía, indicando inicio de QT con esquema de enfermedad avanzada<sup>84</sup>.

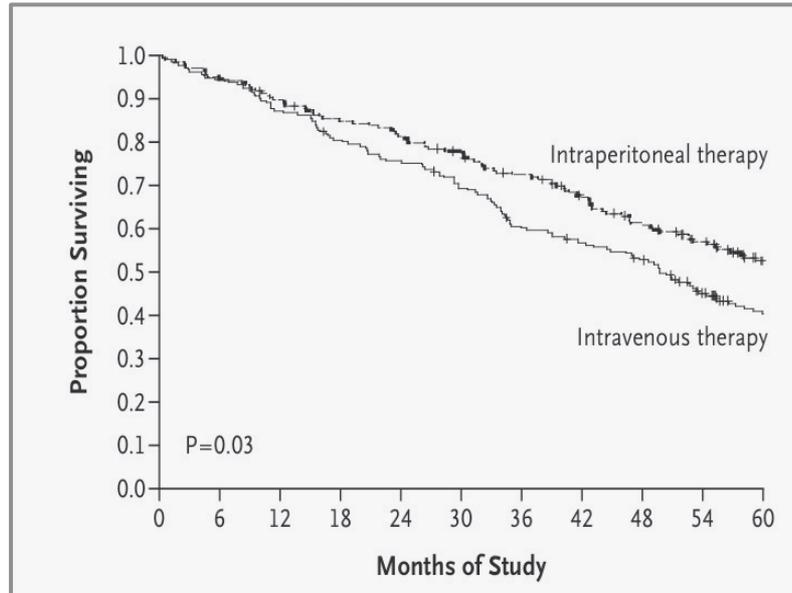
## QUIMIOTERAPIA COMPLEMENTARIA

Los estadios avanzados presentan de por sí un alto riesgo de recaída (75-80%), por lo que siempre estará indicado un tratamiento complementario. En el desarrollo de la quimioterapia dos hitos muy importantes han marcado el tratamiento. El primero fue la aparición de los compuestos de platino, en los años 70, y el segundo el descubrimiento de los taxanos en los años 80<sup>14</sup>. El esquema paclitaxel/cisplatino demostró que mejoraba tanto la SLP como la SG frente al esquema de ciclofosfamida/cisplatino<sup>148</sup>. Después, en el año 2003, el esquema de QT de paclitaxel/carboplatino demostró su equivalencia en resultados al esquema de paclitaxel/cisplatino, pero con mejor tolerancia<sup>149</sup>. Actualmente, el tratamiento estándar de QT es la combinación de paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> y carboplatino 5-7.5 AUC cada 3 semanas durante 6 ciclos<sup>98</sup>, y la valoración de QT intraperitoneal en determinados casos<sup>60</sup>.

Posteriormente se han intentado modificaciones del esquema para mejorar los resultados, ya fuera cambiando el acompañante al platino o asociando un tercer fármaco como en el estudio ICON-5<sup>130</sup>, pero ninguna estrategia ha conseguido mejorar la combinación de paclitaxel y carboplatino en primera línea.

Otra vía ha sido el uso de dosis densas de paclitaxel. El estudio japonés JGOC-3016<sup>150</sup> demostró beneficio tanto en SLP como en SG en población japonesa del esquema de carboplatino trisemanal y paclitaxel semanal frente al esquema clásico trisemanal. Por ello, se pusieron en marcha diferentes estudios en población europea para intentar reproducir esos resultados, como el estudio MITO-7<sup>151</sup> y el GOG-262<sup>152</sup>. Lamentablemente, los resultados han sido similares entre los dos brazos de tratamiento, por lo que en población europea el tratamiento con dosis densas de paclitaxel y carboplatino sólo debe plantearse dentro del marco de un ensayo clínico. Quizás las características genéticas de la población asiática pueda justificar estas diferencias de actividad<sup>14</sup>.

Un importante avance en el tratamiento de estas pacientes ocurre en el año 2006 con la publicación del trabajo de quimioterapia intraperitoneal de Armstrong et al<sup>153</sup>. Pacientes con enfermedad avanzada que reciben cirugía primaria con resultado óptimo con residuo tumoral menor de 1 cm, son aleatorizadas a esquema con QT intraperitoneal o esquema intravenoso estándar. Con un total de 429 pacientes incluidas, se obtiene una gran mejoría en SLP, pasando de 18.3 a 23.8 meses ( $p=0.05$ ), y de SG, pasando de 49.7 a 65.6 meses ( $p=0.03$ ). La calidad de vida fue peor durante el tratamiento, pero al año fue similar en los dos grupos. Este trabajo confirmaba los datos de 2 trabajos previos de QT peritoneal que también habían logrado mejorar la supervivencia respecto al tratamiento estándar intravenoso<sup>154, 155</sup>. Varios meta-análisis Cochrane confirman este beneficio en SG con la aplicación de QT intraperitoneal en pacientes con cirugía primaria óptima, constituyendo el tratamiento estándar en esta población (figura 2.14)<sup>156, 157</sup>. Una serie de factores pronósticos se han descrito en relación con mayor SG, tales como histología serosa vs células claras/mucinoso, ausencia de enfermedad residual vs presencia, y 6 ciclos de QT peritoneal vs 3 ciclos<sup>158</sup>.

**FIGURA 2.14. Curva de SG comparando tratamiento intravenoso con intraperitoneal**

De: Amstrong et al, NEJM 2006

Otro importante avance ha sido la inclusión de un anticuerpo antiangiogénico llamado bevacizumab en combinación con quimioterapia. Dos ensayos fase III muestran beneficio de añadir bevacizumab al esquema estándar de paclitaxel/carboplatino durante 6 ciclos seguido de mantenimiento entre 12-22 ciclos<sup>159, 160</sup>. En los dos trabajos se demuestra un aumento de la SLP al usar bevacizumab, aunque la SG fue similar<sup>161</sup>. No obstante, en uno de los estudios, el ICON7<sup>159</sup>, se diferencia un subgrupo denominado de alto riesgo, caracterizado por ser estadio I-III con enfermedad residual >1cm, estadio III irresecable y los estadio IV, en donde se presentó un importante beneficio: la SLP pasó de 14.5 meses a 18.1 meses, y la SG pasó de 28.8 meses a 36.6 meses. Tras estos resultados, se sugiere estandarizar el tratamiento con bevacizumab junto a QT con paclitaxel/carboplatino y mantenimiento 12-22 ciclos en esta población de alto riesgo<sup>110, 118</sup>.

Respecto al abordaje con QT neoadyuvante, el esquema usado será el mismo que en adyuvancia, es decir, paclitaxel y carboplatino trisemanal. Aunque no está claro el número de ciclos a administrar, se sugiere usar no más de 4 ciclos<sup>133</sup>. Posteriormente al acto quirúrgico se completaría QT adyuvante hasta un número empírico total de 6-8 ciclos, aconsejándose al menos 2 ciclos como mínimo tras la cirugía. Los pacientes que progresaran durante la QTNA presentarán un mal pronóstico, tratándose de una enfermedad refractaria y se desestimaría gesto quirúrgico salvo el meramente paliativo. Se podrían recomendar varias alternativas, como otro régimen de QT, participar en ensayo clínico, cuidados paliativos<sup>133</sup>.

Otra opción investigada es el tratamiento de mantenimiento con QT tras conseguir respuesta completa a primera línea. Lamentablemente los ensayos realizados no han demostrado claro beneficio frente a observación, por lo que no se puede recomendar esta estrategia<sup>60, 162</sup>, salvo el mantenimiento con bevacizumab en alto riesgo comentado antes.

En pacientes con mala situación clínica pero en donde la QT podría aportarle beneficio, se podría valorar un esquema semanal de quimioterapia con paclitaxel y carboplatino<sup>163</sup>.

Como conclusión, tendremos en cuenta estas consideraciones con respecto al tratamiento sistémico en los pacientes con estadio avanzado IIB-IV:

- Tratamiento adyuvante estándar con paclitaxel y carboplatino trisemanal durante 6-8 ciclos.
- En los pacientes con estadio III, buen ECOG, no comorbilidad y enfermedad residual < 1cm estaría indicada la quimioterapia Intraperitoneal.
- En aquellos pacientes de alto riesgo (enfermedad residual > 1cm, III-irreseccable y estadio IV) parece aportar beneficio en SG el añadir bevacizumab al tratamiento estándar.
- Si recibe QTNA se deberían administrar 3-4 ciclos de QT estándar y, tras la cirugía peritoneal, completar hasta 6-8 ciclos.

## SEGUIMIENTO

La base del seguimiento es la situación clínica de la paciente (anamnesis y exploración), analítica y pruebas de imagen<sup>111</sup>. No obstante, no se ha demostrado aún cual es la mejor estrategia de seguimiento, por ello, las diferentes guías varían en sus recomendaciones<sup>84,110,111</sup>. Un aspecto importante a tener en cuenta, es realizar una adecuada educación del paciente acerca de los síntomas y signos sugestivos de recaída<sup>111</sup>.

La monitorización de Ca-125 en el seguimiento es un tema discutido. Rustin et al<sup>164</sup> muestran que el tratamiento precoz de la paciente en base al aumento del Ca-125 sin otro dato de progresión, no mejora la supervivencia en comparación al tratamiento cuando se demuestre progresión clínica o radiológica. No obstante, posiblemente algún subgrupo de pacientes se pudiera beneficiar del seguimiento con Ca-125<sup>60</sup>.

El PET/TC parece detectar más lugares de metástasis a nivel abdominal y más afectación adenopática que el TC normal, por lo que estaría especialmente indicado si el paciente es candidato a cirugía<sup>165</sup>.

### 2.1.9.3. TRATAMIENTO DE LA RECAÍDA TUMORAL

A pesar de que el CEO presenta una gran sensibilidad inicial al tratamiento, un 20% de pacientes no responderán a la QT de primera línea y de los que respondan una mayoría presentarán recaída tumoral. En concreto, recaerán hasta un 20-30% de los estadios precoces y un 80% de pacientes en estadios avanzados<sup>103, 130</sup>.

La recaída podrá ser sospechada por el desarrollo de nuevos síntomas, por hallazgos radiológicos y/o por aumento de Ca-125, que puede preceder a la progresión radiológica en varios meses (2-6 meses de media)<sup>48, 60</sup>. Los criterios de respuesta serológica se basan en el valor de Ca-125 y los criterios de respuesta radiológica en los criterios RECIST 1.1 (anexo I y II respectivamente). Para valorar respuesta o progresión se valorarán según los criterios propuestos por el GCIg (anexo III).

La mayoría de estas pacientes con recaída serán candidatas a un tratamiento sistémico de segunda línea, pero teniendo en cuenta que no será curativo<sup>9, 60, 166</sup>. El objetivo del

tratamiento será el alivio sintomático, mejora de la calidad de vida, retraso de la progresión y aumento de la supervivencia<sup>14,48,60</sup>. La elección del tratamiento dependerá de muchos factores a considerar: número de lugares de recaída, tipo histológico, intervalo libre de platino (ILP), tratamiento previo y respuesta al mismo, toxicidad residual del paciente, estado general del paciente, comorbilidades y preferencias del paciente<sup>14,166,167</sup>.

El ILP se define como el tiempo entre la finalización del tratamiento previo de platino y la recaída actual. En el trabajo de Markman et al de 1991 se observó que la posibilidad de respuesta a un esquema basado en platino dependía en gran medida del tiempo desde el último ciclo de platino hasta la recaída actual<sup>168</sup>. Desde entonces, tanto el tipo como la duración de la respuesta a la QT previa se han constituido como los dos factores pronósticos más importantes<sup>14,169</sup>. Basándose en estos dos criterios, Thigpen et al<sup>169</sup> propusieron una clasificación para enfocar el pronóstico y el tratamiento: por una parte aquellas pacientes que no respondan al tratamiento o que respondan pero presenten un ILP menor de 6 meses serán clasificados como “recaída platino resistente” y conllevan un mal pronóstico, con una TR 10-20% y una MS de 9 meses<sup>170</sup>. Rara vez alcanzarán una respuesta completa<sup>60</sup>. Por otra parte, aquellas pacientes que presenten respuesta al tratamiento y un ILP mayor de 6 meses se clasificarán como “recaída platino sensible”, con mejor pronóstico, con TR 27-70% y una MS 12-24 meses<sup>14,168,171</sup>. En los casos de conseguir remisión completa, ésta será de menor duración que la anterior en el 97% de los casos<sup>172</sup>.

Posteriormente se han realizado varias modificaciones a esta clasificación para adaptarla mejor al comportamiento de la enfermedad y consensuar diferentes poblaciones para su inclusión en ensayos clínicos<sup>131</sup>. En el 4º consenso del *Intergroup* de 2010 se sugiere considerar cuatro subgrupos: pacientes platino-refractarias, aquellas que progresan durante el tratamiento o en las 4 semanas siguientes a finalizarlo, siendo las de peor pronóstico con TR 10%<sup>14</sup>; pacientes platino-resistentes, aquellas con ILP menor de 6 meses; pacientes parcialmente sensibles a platino, con ILP 6-12 meses, que presentarían una sensibilidad moderada a platino; y otro grupo de platino-sensibles con ILP mayor de 12 meses, que tendrán mayor sensibilidad a un esquema con platino y mejor pronóstico<sup>131</sup>. Sin embargo, otros autores consideran el ILP como una variable continua, con altas TR asociados a largos ILP<sup>48</sup>.

El momento para iniciar el tratamiento de 2ª línea es otro tema controvertido: en aquellas mujeres sintomáticas debería ser de forma inmediata, con el objetivo de paliación clínica, pero en aquellas que se encuentren asintomáticas y sólo presenten aumento de Ca-125 el tratamiento no ha demostrado beneficio, incluso conlleva deterioro en calidad de vida<sup>9,60,164</sup>.

En algunas pacientes podría considerarse la cirugía de rescate, con beneficio importante en supervivencia cuando se alcanza una resección completa<sup>9,131,173,174,175</sup>. Para ello, será fundamental realizar una buena selección de la paciente, evitando cirugías innecesarias cuando no sea previsible un resultado óptimo.

Las pacientes platino sensibles (ILP de 6 o más meses) presentan aún una alta sensibilidad al re-tratamiento con platino, por lo que éste debería ser el tratamiento de elección. La combinación basada en platino se ha demostrado superior a la monoterapia de platino en numerosos estudios, tanto en TR como en SLP y SG, alcanzando cifras de TR 50-80%, SLP 8-2 meses y MS de 18-33 meses<sup>166,171,176,177</sup>. Tendríamos diferentes opciones de tratamiento, sin clara evidencia de superioridad de una combinación respecto a otra<sup>178</sup>.

Recientemente, se han añadido nuevos fármacos como bevacizumab<sup>179</sup>, olaparib<sup>180</sup> y niraparib<sup>181</sup>.

Un grupo de especial análisis es el formado por aquellas pacientes con ILP entre 6-12 meses. Este grupo se denomina “recaída parcialmente sensible a platino” y presenta solo una modesta sensibilidad a esquemas de platino, por lo cual se buscan nuevas vías de tratamiento. Una interesante estrategia es el uso de una combinación sin platino, aumentando de esta forma el ILP y así se podría elevar la sensibilidad a un posterior re-tratamiento con platino<sup>14</sup>. En un ensayo randomizado, aquellas pacientes en recaída con ILP 6-12 meses tratados con trabectedin-doxorubicina liposomal pegilada (DLP) mejoraron la SLP y la SG en comparación a los tratados sólo con DLP<sup>182</sup>. Estos pacientes mejoraron su ILP, obteniendo mayor beneficio en la siguiente línea de tratamiento con platino. No obstante, aquellos pacientes no candidatos a esta combinación sin platino, un estudio randomizado muestra que la monoterapia no platino resulta inferior en SLP y SG a una combinación con platino<sup>183</sup>. Por ahora, no hay datos concluyentes que avalen esta teoría<sup>14</sup>.

La mayoría de pacientes con enfermedad recurrente desarrollará finalmente condición platino-resistente<sup>9,60</sup>. Corresponderá a aquellas pacientes que presenten recaída o progresión antes de 6 meses de haber finalizado el tratamiento con platino (ILP < 6 meses). Representa una enfermedad con escasas tasas de respuesta y progresión precoz, conllevando a una menor supervivencia. El objetivo principal del tratamiento será mejorar la calidad de vida y controlar la sintomatología, pasando a segundo plano prolongar la SLP y SG<sup>14,166</sup>.

En estas pacientes estará indicado el tratamiento en monoterapia con paclitaxel, topotecan, gemcitabina o DLP. No hay diferencias significativas en eficacia entre estos fármacos, con TR 10-20%<sup>48, 60</sup>. Será de suma importancia la valoración de los perfiles de toxicidad de los fármacos, dado que nuestro objetivo principal será la calidad de vida de la paciente<sup>48</sup>.

La adición de bevacizumab junto a QT, en aquellas pacientes que no lo hubieran recibido antes, mejora la TR de 12% a 27% ( $p=0.001$ ) y la SLP de 3.4 a 6.7 meses ( $p<0.001$ ), con mejoría de la calidad de vida<sup>184,185</sup>. No hay beneficio en SG de forma significativa.

Estos tratamientos podrán mejorar la supervivencia y calidad de vida del paciente, pero no serán curativos, desarrollando finalmente progresión tumoral refractaria y fallecerán por la enfermedad<sup>9</sup>.

## 2.2. BIOMARCADORES

Dada la alta tasa de recaída del CEO y el mal pronóstico de la enfermedad recurrente, se están investigando nuevas estrategias para mejorar el resultado de los tratamientos, tales como añadir un tercer fármaco, mantenimiento, radioterapia, inmunología, etc. Para ello, también necesitaremos herramientas que nos den una adecuada valoración tanto de la enfermedad como de los tratamientos. De aquí surgen los llamados biomarcadores (BM), que son indicadores biológicos medibles relacionados con procesos biológicos, en nuestro caso con procesos oncológicos. Podrán ser BM circulantes o tisulares (tabla 2.10). Buscaremos aquellos que nos aporten información pronóstica de la enfermedad, valoren la respuesta al tratamiento o que nos ayuden en la monitorización de la terapia. Sin embargo, cada uno presenta limitaciones en su aplicación clínica, por lo que en los últimos años hay numerosas investigaciones sobre nuevos BM.

**TABLA 2.10. Potenciales biomarcadores en el Carcinoma Epitelial de Ovario.**

Biomarcadores circulantes	Biomarcadores tisulares
<b>APROBADOS EN EL CEO</b> Ca 125, HE4	<b>Proteínas reguladoras de apoptosis y ciclo celular</b>
<b>Proteínas circulantes</b> CEA, Ca 19.9 LDH Albúmina Citoqueratinas solubles Kalikreínas Receptor de folato Citoquinas VEGF	Kinasas dependientes de ciclinas Proteína del retinoblastoma P53
<b>Hematológicos</b> Ratio polimorfo/linfocito Ratio polimorfo/plaquetas Trombocitosis	<b>Transcriptasas de la telomerasas</b>
<b>Acidos nucleicos</b> ADN circulante ARN circulante Metilación de ADN miRNA	<b>Receptores de membrana tirosin-kinasa</b>
<b>Células circulantes</b> Células tumorales circulantes Células tumorales diseminadas Células endoteliales circulantes	<b>Metaloproteinasas</b>
<b>Otros</b> Dímero D	<b>Infiltrado Linfocitario Tumoral</b>

En este apartado abordaremos diferentes BM circulantes y su relación con el CEO, dejando para los siguientes apartados dos nuevos BM muy prometedores y que son objeto de nuestra investigación, las células tumorales circulantes (CTC) y el ADN libre circulante (cfDNA).

## BIOMARCADORES CIRCULANTES ONCOLOGICOS

Los BM circulantes oncológicos, también llamados marcadores tumorales, son moléculas o sustancias producidas por o en respuesta a procesos neoplásicos y se encuentran en la circulación sanguínea en cantidades detectables<sup>186</sup>. Suelen relacionarse con la presencia de células neoplásicas y/o aportan información sobre su comportamiento<sup>186</sup>. La determinación de marcadores tumorales circulantes en plasma es una opción muy atractiva puesto que son muy accesibles y por un método poco invasivo (venopunción), su resultado es un dato objetivo y pueden hacerse múltiples repeticiones en el tiempo.

El valor de un BM estará determinado por su sensibilidad (proporción de cánceres detectados por una prueba positiva) y su especificidad (proporción de casos no neoplásicos identificados por una prueba negativa)<sup>186</sup>. Lo ideal sería que tuviera un 100% de sensibilidad, de especificidad y valor predictivo positivo y negativo, pero esto no existe<sup>186</sup>. La mayor limitación será la falta de especificidad, puesto que la mayoría de BM no son específicos de un cáncer concreto, estando habitualmente aumentados en varios tipos tumorales, así como en patología benigna y en situaciones fisiológicas<sup>186</sup>. Por ello, en la mayoría de situaciones los BM no son diagnósticos, especialmente cuando no hay clínica acompañante relacionada. Su principal misión es la monitorización de la paciente y contribuir al diagnóstico diferencial<sup>186, 187</sup>.

Se han estudiado una gran cantidad de sustancias con potencial papel como BM, tales como enzimas, hormonas, receptores, etc, pero sin embargo, el número de ellos que realmente tiene aplicación clínica es muy limitado<sup>186</sup>. Esto se puede deber o bien porque realmente ese BM no tiene utilidad clínica, o bien porque los estudios de ese marcador estaban mal diseñados.

Con el objetivo de estandarizar y mejorar los estudios de validación clínica de marcadores tumorales, han surgido una serie de guías que orientan sobre su diseño y publicación. Las recomendaciones *STROBE* y *REMARK* establecen unos principios básicos para diseñar estudios observacionales de calidad sobre BM, y poder ofrecer una información completa y transparente, para así realizar una adecuada valoración de los datos presentados<sup>188, 189, 190</sup>. Consideran una serie de ítems a seguir (20 en la guía *REMARK* y 22 en la guía *STROBE*) repartidos en 4 apartados principales: introducción, material y métodos, resultados y discusión. Se define marcador pronóstico como aquel que tiene asociación con algún resultado clínico, tal como tiempo hasta un evento, SLP o SG<sup>189</sup>. Se define marcador predictivo como aquel que nos indica el beneficio probable en un paciente de un tratamiento concreto, para poder elegir mejor entre varias opciones de tratamiento<sup>189</sup>. No obstante, algunos autores ven a los marcadores predictivos como una clase especial de marcadores pronósticos<sup>190</sup>. Otras guías para la elaboración de estudios de BM son las guías *PROBE* (*prospective-specimen-collection, retrospective-blinded-evaluation*), que incorporan recogida de muestras biológicas de forma prospectiva de la cohorte a estudio<sup>191</sup>.

Un aspecto muy importante a tener en cuenta es valorar la utilidad clínica de ese BM, entendida ésta como la capacidad que posee para mejorar la toma de decisiones clínicas y los resultados en el paciente<sup>192</sup>. Un BM puede tener una validez analítica y clínica sobresaliente, pero si no aporta un beneficio o información adicional frente a los BM ya establecidos en esa patología, finalmente no tendrá utilidad clínica<sup>192</sup>. Es un parámetro difícil de evaluar, pues

depende por múltiples factores, tales como situación clínica, disponibilidad y magnitud del beneficio de los tratamientos, repercusión en calidad de vida para el paciente, etc<sup>192</sup>.

Todas estas premisas han llevado a establecer una serie de requisitos que todo BM deberá cumplir. La Academia Nacional de Bioquímica Clínica de Estados Unidos expone que los marcadores tumorales sólo son útiles si cumplen 3 circunstancias: que los resultados sean adecuados precisamente para la aplicación requerida (screening, diagnóstico, pronóstico, seguimiento o predictivo); que los resultados del BM separen a los pacientes en dos o más poblaciones cuyos resultados difieran de tal forma que permitiera aplicar tratamientos diferentes a cada grupo; y que la estimación de la separación para un resultado positivo y negativo sea fiable<sup>193</sup>.

El Instituto de Salud Americano (NIH por su siglas en inglés) señala las siguientes circunstancias que un factor pronóstico debería cumplir: proporcionar un significativo e independiente valor clínico pronóstico, validado por test clínicos; su determinación deberá ser factible, reproducible y ampliamente disponible, con control de la calidad; y los resultados deberían ser fácilmente interpretados por los médicos<sup>194</sup>.

Por último, algunos autores proponen una gradación en niveles de evidencia de cada biomarcador, para así evaluar su utilidad clínica y su incorporación en la práctica diaria<sup>195</sup>.

## CEA

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una proteína que se encuentra en el tejido fetal o embrionario, pero tras el nacimiento solo persiste en pequeña cantidad en el colon. Representa un importante BM pronóstico del carcinoma colorrectal<sup>196,197</sup>, y es el marcador de elección en el seguimiento<sup>196</sup>. Sin embargo, en el CEO presenta escasa utilidad, pues solo aumenta en el subtipo mucinoso y en los tumores metastásicos en ovario<sup>198</sup>. Un valor por encima de 5 ng/mL sólo está presente en el 14% de las pacientes<sup>199</sup>. Además, puede aumentar en otras neoplasias, como cáncer de mama, páncreas, tiroides y pulmón, así como en procesos benignos, tales como colecistitis, cirrosis hepática, enfermedad inflamatoria intestinal, cistoadenoma mucinoso, etc<sup>200</sup>. También se ha relacionado con el hábito tabáquico<sup>200</sup>.

## Ca 19.9

El antígeno tumoral Ca 19.9 es una proteína mucinosa que se usa principalmente en el manejo de las neoplasias biliopancreáticas, aunque también se ha descrito en otros tipos de neoplasias y patología benigna. En los sujetos sanos se ha descrito aumentada en el 0.6%<sup>201</sup>. En el CEO muestra escasa utilidad, con solo un 29% de sensibilidad, relacionándose más con el subtipo mucinoso, donde puede llegar al 50%<sup>202</sup>.

## CA-125

El Ca 125 es una glicoproteína de alto peso molecular descrita por Bast et al<sup>199</sup> en 1981 que se ha constituido como el BM básico en el CEO, aunque no es específico de él<sup>186</sup>. Se expresa en tejidos derivados del epitelio celómico (endocérvix, endometrio y trompa de

Falopio) y del mesotelio (pleura, pericardio y peritoneo)<sup>203</sup>. Se podrá encontrar en el ovario adulto y en el epitelio de colon, páncreas, pulmón, riñón, próstata, mama, estómago y vesícula biliar<sup>186, 204</sup>. La concentración sérica de Ca-125 dependerá de dos factores principales: del aumento de la síntesis por parte del tejido y de la presencia de alteraciones en la membrana basal que permitan el paso de Ca-125 a la circulación<sup>204, 205</sup>. Por ello, en tumores benignos se verá escasamente aumentado, debido a la integridad de la membrana basal, mientras que en CEO se encontrará elevado en la mayoría de ocasiones, tanto por aumento de la síntesis como por la invasión tisular<sup>206</sup>.

El CA-125 no es completamente específico del CEO. Hay una serie de enfermedades benignas que también presentan elevación del nivel sérico de Ca-125, tanto patologías ginecológicas (endometriosis, infecciones, enfermedades inflamatorias y fibromas) como no ginecológicas (cuadros inflamatorios como pancreatitis, hepatitis, pericarditis, etc, e infecciones como tuberculosis), así como aumentará en otros tipos de neoplasias como cáncer de endometrio, mama, páncreas, colon y pulmón<sup>60, 186, 204</sup>. Además, los valores de Ca-125 presentan una gran variabilidad dependiendo de la raza, edad, embarazo, ciclo menstrual, hábitos sociales como el tabaquismo y la ingesta de cafeína<sup>186, 204</sup>.

En el CEO se encuentra elevado en el 80-90% de las pacientes, aunque fluctúa dependiendo del estadio de la paciente, variando de un 50-78% de las pacientes con estadio I a más de un 90% en estadio III-IV, del subtipo histológico, siendo mayor en el seroso alto grado y menor en el mucinoso, y del grado de diferenciación<sup>207, 208</sup>. Un estudio de Bast et al<sup>209</sup> estableció el valor de corte más adecuado de la concentración sérica en 35 UI/ml. Con este valor el 82% de CEO presentó cifras superiores a 35 UI/ml, mientras que solo el 1% de la población sana y el 6% de patología no neoplásica presentó valores superiores.

El Ca-125 se ha situado como el BM más importante en el CEO, con un papel crucial en el screening, diagnóstico, pronóstico, monitorización y detección de recaídas<sup>48,186</sup>. Su evolución durante el tratamiento forma parte de los criterios de respuesta y progresión en CEO del GCIG (anexo IV).

Respecto al screening, los métodos de detección precoz que se están evaluando se basan en la combinación de Ca-125 y ecografía vaginal, alcanzando cifras de 89% sensibilidad, 99% especificidad y valor predictivo positivo de 40%<sup>210</sup>.

En el diagnóstico, el Ca-125 por sí solo presenta escasa rentabilidad, mostrando en estadios III y IV una sensibilidad del 77%, una especificidad del 80% y un valor predictivo positivo del 69%<sup>211</sup>. Estos resultados mejoran de forma importante cuando se incluye en algoritmos diagnósticos junto a otros factores, como los paneles comentados anteriormente ROMA<sup>83</sup>, RMI<sup>86</sup> y ADNEX<sup>87</sup>. También se ha visto que en presencia de carcinomatosis, una relación de Ca125/CEA >25 es sugestiva de cáncer de origen ovárico, por lo que podría orientar el diagnóstico<sup>81</sup>.

El Ca-125 presenta un importante valor pronóstico. El valor prequirúrgico de Ca-125 se ha relacionado en algunas series con la supervivencia de las pacientes. En estadio I, una serie retrospectiva australiana sobre 518 pacientes, mostró diferente supervivencia en función del valor de Ca-125, pasando la SG5a de 82% cuando el valor de Ca-125 era mayor a 30 UI/mL, a una SG5a de 95% cuando era menor ( $p=0.028$ )<sup>101</sup>. Nagele et al también comunica sobre 201 pacientes con estadio I que Ca-125 fue el más importante factor pronóstico de supervivencia

en el análisis multivariado, con un HR 6.37 (95% IC 2.39-16.97)<sup>102</sup>. Sin embargo, otros estudios no han confirmado este valor pronóstico<sup>212</sup>.

El valor de Ca-125 antes de la QT también tiene valor pronóstico. Un estudio francés sobre 553 pacientes estadios IIC-IV mostró un beneficio en SLP y SG cuando el Ca-125 era menor de 230 UI/mL antes de la QT (MS de 48.6 meses versus 25.1 meses,  $p < 0.0001$ )<sup>213</sup>. No obstante, en el estudio de Gadducci et al<sup>212</sup> un valor de Ca-125 mayor de 500 UI/mL antes del primer ciclo de QT fue factor predictivo de menor respuesta patológica completa, pero no alcanzó la significación para SG.

Otro momento en donde el Ca-125 tiene valor pronóstico, ha sido su determinación tras la cirugía. Makar et al<sup>214</sup> muestran que en pacientes sin enfermedad residual un valor menor de 35 UI/mL o menor de 65 UI/mL en aquellos con cirugía sub-óptima, es un factor pronóstico independiente.

Pero quizás uno de los aspectos más importantes del uso del Ca-125 es la monitorización del tratamiento. Ya desde el trabajo inicial de Bast et al<sup>199</sup> se observó que la cinética del Ca-125 durante la quimioterapia se relacionaba con la evolución de las pacientes, postulándose que la determinación seriada de Ca-125 podría ayudar en el manejo terapéutico del CEO. Desde entonces se han planteado varios parámetros para analizar mejor la evolución de Ca-125, presentando diferentes resultados. Las dos variables más validadas han sido su valor más bajo alcanzado durante la QT, también llamado *nadir*, y la semivida de Ca-125 (*Ca-125 half-life*), considerado un indicador temprano de quimio-sensibilidad<sup>212,213</sup>. Crawford and Peace<sup>215</sup> analizan el valor del *nadir* en 79 pacientes, obteniendo que un *nadir* de  $< 10$  UI/mL se relacionaba con una MS de 2968 días frente a 537 días en los que tenían un valor superior ( $p < 0.001$ ). En el estudio francés de Riedinger et al<sup>213</sup> un *nadir* de menor de 20 UI/mL y tiempo para alcanzarlo menor de 72 días se relacionaron con la SLP y la SG. En este mismo estudio, una *Ca-125 half-life* igual o menor de 14 días fue el factor pronóstico más importante de SLP y SG, siendo la media de 15.8 días. En el estudio italiano de Gadducci et al<sup>212</sup> también la *Ca-125 half-life* menor de 25 días fue un factor pronóstico importante de SG y de alcanzar respuesta patológica completa. Este mismo autor volvió a analizar en otro trabajo la *Ca-125 half-life*, obteniendo que el cuartil 50% correspondía a 14 días, relacionándose con la respuesta tumoral y la SG<sup>216</sup>.

No obstante, hay que recordar que el Ca-125 no presenta una sensibilidad óptima. Niloff et al<sup>217</sup> encontraron que hasta un 60% de pacientes que alcanzaron un valor menor de 35 UI/mL tras QT tuvieron tumor residual en la cirugía de *second-look*, aunque los tumores fueron menores de 1 cm. Sin embargo, un valor mayor de 35 predijo la presencia de tumor en el 95% de los casos.

#### HE4

El segundo biomarcador aprobado por la FDA en el CEO es la glicoproteína epididimal humana HE4 (*Human Epididymal Protein 4*)<sup>48</sup>. También conocida como WFDC2, pertenece a la familia de proteínas ácidas séricas nucleares de 4 enlaces disulfuro (WFDC)<sup>218</sup>. Aunque fue aislado originalmente de células epiteliales del epidídimo humano, se ha comprobado su

presencia en el epitelio de muchos tejidos normales y varios tipos de neoplasia, estando especialmente elevado en el CEO<sup>219</sup>.

Los estudios han mostrado que su nivel sérico representa un nuevo BM pronóstico con sensibilidad equiparable a Ca-125 pero con mayor especificidad<sup>220</sup>. Otros estudios han mostrado mayor sensibilidad que Ca-125, tanto en estadio precoz como avanzado, con similar especificidad<sup>221</sup>. En el caso de la endometriosis hay una especial diferencia, estando elevado el HE4 sólo en el 3% mientras que Ca-125 se eleva en el 67% ( $p < 0.0001$ )<sup>222</sup>. Ferraro et al realizan una revisión sistemática que encuentra que HE4 parece ser superior a Ca-125 en términos de rendimiento diagnóstico de CEO en mujeres con sospecha de patología ginecológica<sup>223</sup>. También presenta un importante valor en el seguimiento, con alta sensibilidad para la detección de recurrencia, especialmente cuando se combina con Ca-125<sup>224, 225</sup>.

## TROMBOCITOSIS

Las plaquetas producen factores que promueven el crecimiento celular, como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, y factores que facilitan adhesión de las células, como la trombospondina<sup>226</sup>. La presencia de trombocitosis pre-quirúrgica mayor de 400 células x 10(9)/L se ha relacionado con peor pronóstico en el CEO<sup>227</sup>. Se comporta como factor predictivo, con más cirugía subóptima en aquellos con trombocitosis, y como factor pronóstico, con menor SLE (12 vs 34 meses,  $p < 0.001$ ) y menor SG (28 vs 79 meses,  $p < 0.001$ )<sup>228</sup>.

## LDH y ALBUMINA

Algunos parámetros analíticos generales como LDH y albúmina presentan relación pronóstica en cáncer, principalmente por su papel como reactantes de fase aguda. En el carcinoma renal el valor de albúmina sérica y lactato deshidrogenasa (LDH) tienen un destacado papel pronóstico<sup>229, 230, 231</sup>. En el CEO, Deeba et al<sup>232</sup> analizó el valor de LDH como BM diagnóstico, con sensibilidad de 57% y especificidad 82% para tumor ovárico maligno, mejorando cuando se combinaba con Ca-125.

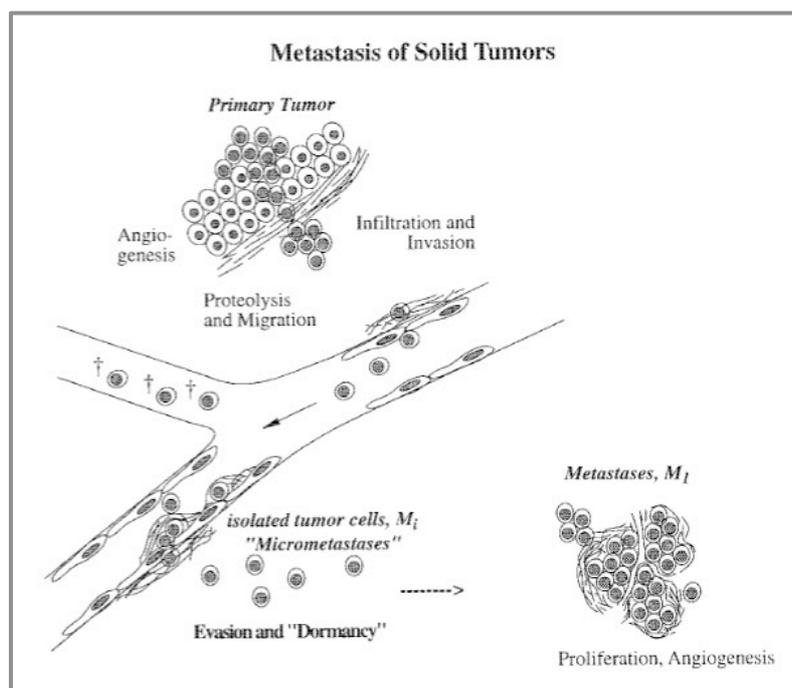
El valor de albúmina sérica se relaciona con el estado nutricional de la paciente. Ataseven et al<sup>233</sup> demostraron en un estudio retrospectivo sobre 604 pacientes con CEO intervenido con cirugía primaria, que la hipoalbuminemia prequirúrgica era un factor predictivo independiente de complicaciones post-quirúrgicas y también un factor pronóstico de SG. Chi et al<sup>234</sup> desarrolló un nomograma para predecir la SG5a en CEO tras la cirugía peritoneal primaria, en donde el valor sérico de albúmina es uno de los 7 parámetros. También forma parte de índices nutricionales con importante papel pronóstico. Recientemente, se ha planteado el uso del Índice Pronóstico Nutricional (*PNI-Prognostic Nutritional Index*), que incluye el nivel de albúmina y el número de linfocitos, y que ha demostrado ser un marcador pronóstico independiente en varios estudios<sup>235, 236, 237</sup>.

## 2.3. CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES (CTC).

Los tumores son heterogéneos en su habilidad metastásica, siendo la proporción de células que puede dar metástasis muy baja<sup>238</sup>. Precisan adquirir competencia metastásica, mediante la integración de alteraciones genéticas, que posibiliten todos los pasos para llegar a dar metástasis sistémicas viables<sup>239</sup>. La recaída metastásica en pacientes con tumores sólidos será causada por la diseminación sistémica de las células tumorales<sup>240</sup>. En pacientes con tumores localizados sin enfermedad a distancia visible, la detección de la enfermedad micrometastásica oculta, también llamada enfermedad mínima residual, será de suma importancia por las implicaciones pronósticas que conlleva<sup>240</sup>. La médula ósea fue el lugar en donde inicialmente se estudió esta enfermedad oculta, apareciendo el concepto de células tumorales diseminadas. La presencia de células epiteliales tumorales en médula ósea se ha relacionado con mayores recaídas y peor SG en varios estudios prospectivos y metanálisis<sup>240,241</sup>. La incidencia suele ser del 20-40% de pacientes con un cáncer epitelial<sup>238</sup>. Sin embargo, dada la mayor accesibilidad y comodidad para el paciente de la venopunción frente a la biopsia de médula ósea, el estudio de estas células epiteliales tumorales en la circulación periférica ha ido aumentando.

Las células tumorales circulantes (CTC) serán aquellas células viables presentes en la sangre periférica que posean características antigénicas o genéticas de un específico tipo tumoral<sup>242</sup>. Las CTC tendrían un papel crítico en el proceso de progresión y metástasis (figura 2.15). El análisis de CTC podría mejorar el conocimiento sobre la fisiopatología de la enfermedad y el proceso de diseminación sistémica, aumentar la sensibilidad del diagnóstico de la enfermedad micrometastásica, aportar información pronóstica y predictiva, y tener probable influencia en la toma de decisiones terapéuticas<sup>240, 242, 243</sup>.

**FIGURA 2.15. Proceso de metástasis de las células tumorales.**



De: Pantel et al. J Natl Cancer Inst 1999.

Muchos estudios en diferentes tumores han relacionado la presencia de CTC con resultados clínicos desfavorables<sup>243</sup>. En pacientes metastásicos, trabajos en tumores como cáncer de mama<sup>244, 245, 246</sup>, cáncer de próstata<sup>247</sup>, cáncer de pulmón microcítico<sup>248</sup> y no microcítico<sup>249</sup>, y cáncer de colon metastásico<sup>250</sup>, han establecido que la presencia y persistencia de CTC es el más potente factor pronóstico de SLP y SG, y en algunos casos también factor predictivo de respuesta a la terapia. Además, se ha visto que la variación del número de CTC durante el tratamiento se relaciona con el pronóstico del paciente, pudiendo convertirse en un biomarcador de monitorización, valorando de forma precoz una buena o mala respuesta al tratamiento<sup>251, 252</sup>.

También se han detectado CTC en pacientes con cáncer de mama precoz, siendo factor pronóstico<sup>253</sup>. En un fase II en cáncer de mama operable avanzado, la detección de 1 o más CTC en la circulación se dio en el 23%, y se relacionó de forma independiente con una recaída precoz<sup>254</sup>. En el estudio más grande en cáncer de mama localizado, el estudio alemán SUCCESS sobre 2026 pacientes, el valor de CTC antes y después de la QT adyuvante fue un factor pronóstico independiente de SLP y SG<sup>255</sup>. Esto indica que los tumores primarios envían células cancerosas en la fase inicial de la enfermedad. Dado que el papel de la terapia adyuvante es la eliminación de las células tumorales diseminadas ocultas antes de evolucionar a una enfermedad clínicamente metastásica, la detección temprana de micrometástasis podría identificar aquellos pacientes que más se benefician del tratamiento adyuvante<sup>240</sup>.

Algunos autores han analizado características de las CTC, como patrones de transportadores de membrana<sup>256, 257</sup>, vías proteínicas<sup>258</sup> o caracterización fenotípica de las células<sup>257, 259</sup>, en busca de indicadores de sensibilidad y resistencia a la quimioterapia. Esta caracterización biológica podría ser factor predictivo de respuesta y mejorar nuestro conocimiento de la capacidad metastásica de estas células y de la enfermedad en sí<sup>243</sup>.

Se ha postulado que el valor de CTC pudiera servir para la selección del tratamiento. Por ello, se han iniciado varios ensayos prospectivos que evalúan la elección de la terapia en función del valor de CTC<sup>260</sup>. El estudio SWOG S0500 compara a pacientes con cáncer de mama metastásico que tras inicio de la primera línea de quimioterapia presentan aumento del número de CTC, siendo aleatorizados a seguir con el mismo esquema o un régimen alternativo<sup>261</sup>. El estudio confirma el valor pronóstico negativo de la presencia de CTC, pero no encuentra diferencias en SG con el cambio de régimen terapéutico en base a la evolución de CTC, aunque este hecho pudiera indicar una quimiorresistencia de la propia enfermedad, por lo que se sugiere la participación en ensayos clínicos de nuevos agentes.

## MÉTODOS DE DETECCIÓN DE CTC

Hasta la fecha actual se han empleado diferentes métodos para la detección de CTC en la circulación periférica, cada uno con diferente sensibilidad y especificidad<sup>240, 242, 243</sup>. Debido a que en la sangre hay muy baja concentración de CTC y a la presencia de diferentes elementos como leucocitos, plaquetas, hematíes, células epiteliales, células apoptóticas y fragmentos de células, etc, habría una primera fase de separación y enriquecimiento de aquellas células que fueran candidatas a CTC y después otra fase de identificación de las verdaderas CTC<sup>243</sup>. En la primera etapa se han empleado diferentes técnicas, como enriquecimiento celular mediante centrifugación por gradiente de densidad<sup>262, 263</sup>, separación por tamaño<sup>264</sup> y la mayoría

separación inmunomagnética<sup>265, 266</sup>. Esta última se basa en el empleo de partículas magnéticas recubiertas por un anticuerpo específico que se une a las células que se quieren detectar, en este caso células neoplásicas. Una vez detectadas las probables CTC, se aíslan y se caracterizan por IHQ o por métodos de expresión génica para seleccionar finalmente las verdaderas CTC. En esta identificación se han usado sobre todo citoqueratinas (CKs), que son queratinas de los filamentos intermedios presentes en el citoesqueleto de las células epiteliales<sup>243</sup>. La base de todos estos métodos es el uso de una combinación de antígenos celulares<sup>242</sup>.

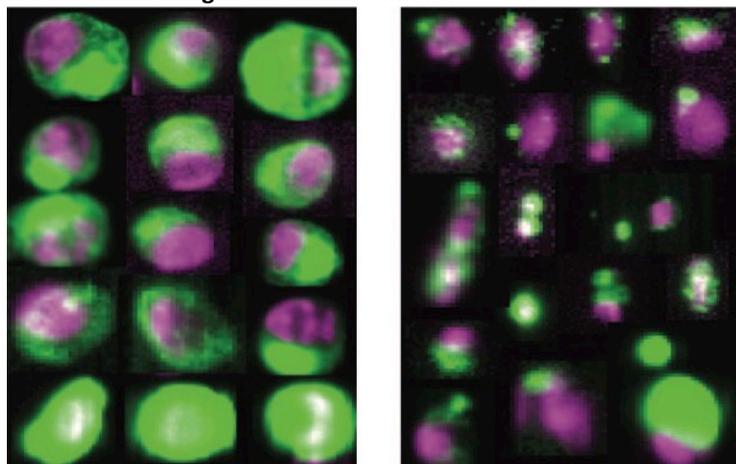
Un aspecto muy importante es estandarizar la determinación de CTC para que sea reproducible y validada en todos los centros<sup>243</sup>. Por ello, en el 2004 la *US Food and Drug Administration* (FDA) aprobó y validó el sistema *CellSearch*® CTC Test (Veridex, LLC, a Johnson & Johnson Company; Raritan, NJ) ([http://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf3/k031588.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf3/k031588.pdf)) para estandarizar la determinación de CTC en cáncer de mama, colon y próstata. El *CellSearch* es un método semiautomático de enumeración de las CTC en sangre periférica mediante separación inmunomagnética y detección por IHQ (figura 2.16). Hay una primera fase que emplea partículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo frente a la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), para así realizar la captura de las potenciales CTC<sup>242</sup>. La EpCAM es una glicoproteína transmembrana que sólo se expresa en células epiteliales, tanto en epitelio normal como en la mayoría de tumores epiteliales<sup>267, 268</sup>. La proliferación activa tumoral aumenta la expresión de EpCAM, aunque su papel en la carcinogénesis se desconoce<sup>268</sup>. Después habrá una segunda fase de tinción con anticuerpos de CKs 8, 18 y 19 y el anticuerpo CD45, que se une al antígeno de diferenciación leucocitario. La tinción con 4,6-idamidino-2-fenilindol-2 (DAPI) confirma la presencia de un núcleo celular. La detección de CTC se basará en la tinción para CKs y DAPI, falta de expresión de CD45 y morfología celular (figura 2.17)<sup>242</sup>.

**FIGURA 2.16. Sistema *CellSearch*.**



De: <https://www.cellsearchctc.com/product-systems-overview/cellsearch-system-overview>

**FIGURA 2.17. Imagen de células tumorales circulantes.**



En la imagen de la izquierda CTC viables. A la derecha fragmentos de CTC y CTC apoptóticas no viables.  
De: Allard et al. CCR 2004

Una validación multicéntrica independiente del sistema *CellSearch* en tumores de mama confirma su estandarización, con una tasa de hasta un 80% de concordancia entre los diferentes centros<sup>269</sup>. También se obtuvo que las CTC se mantenían estables a temperatura ambiente durante al menos 72 horas antes de su análisis. Su uso actualmente se ha extendido a otros tipos tumorales.

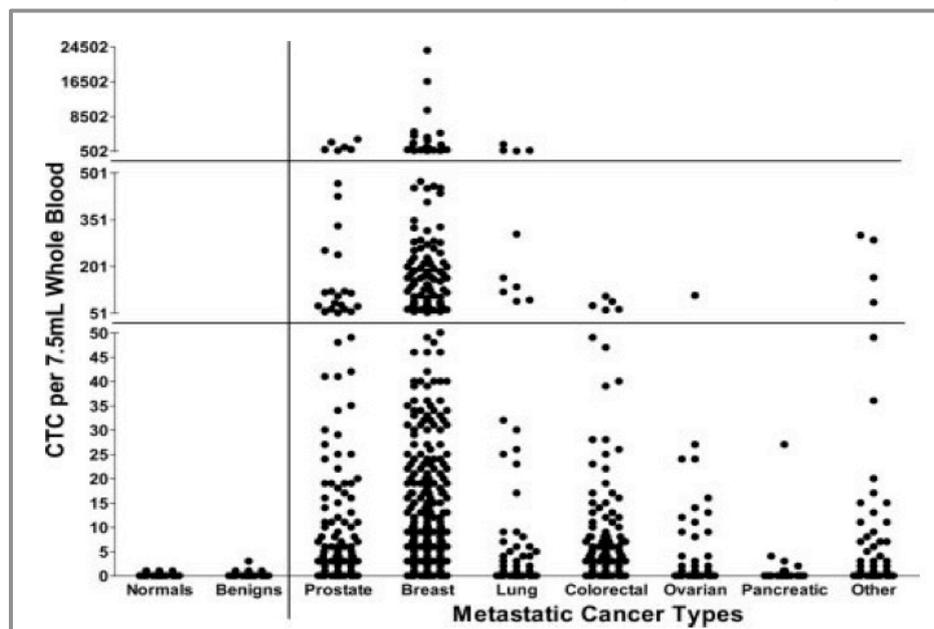
No obstante, existen controversias acerca de las limitaciones del método *CellSearch*. Se han descrito falsos positivos por tinción anormal de CKs en células no epiteliales y en células epiteliales circulantes en sujetos sanos y en patología benigna, lo que implicaría disminución de la especificidad<sup>243, 269</sup>. Una limitación es que la sensibilidad del método se basa en la detección de CTC por la expresión única de EpCAM, por cual las CTC que no expresen EpCAM no serán detectadas, aunque éstas representan una minoría<sup>267, 268, 269</sup>. Por ejemplo, en el fenotipo normal-like del cáncer de mama, la expresión de EpCAM es muy baja, con lo que la sensibilidad de *CellSearch* en este subtipo es mínima<sup>270</sup>. También se ha descrito que la expresión pudiera ser variable y dependiente del microambiente, pudiendo disminuir hasta 10 veces la expresión de EpCAM en CTC respecto a su expresión en el tejido<sup>271</sup>. Por ello, el sistema *CellSearch* incorpora avidina-biotina que mejora la captura magnética de EpCAM, para compensar esta baja densidad de antígeno<sup>269</sup>. Otra posibilidad es que la célula exprese EpCAM pero tenga una falta de expresión de CKs. En el proceso de transición epitelio-mesenquimal necesario para la migración e invasión celular, se ha visto una disminución de la expresión de CKs<sup>272</sup>. Para amortiguar esta disminución de CKs, el sistema *CellSearch* usa un panel con varias CKs, para compensar la falta de alguna en particular<sup>269</sup>. Otra crítica del método *CellSearch* es que debido a que se produce una destrucción de la célula, no permite realizar estudios in vitro de viabilidad con esas células<sup>273</sup>.

Ante estas limitaciones, diferentes tecnologías han intentado mejorar las limitaciones del abordaje *CellSearch*. El sistema *AdnaTest BreastCancer* usa separación inmunomagnética con dos anticuerpos (EpCAM y otro frente al antígeno MUC1), después aislamiento de mRNA y paso a cDNA, y posterior identificación de diferentes paneles de genes tumorales mediante RT-PCR, entre los que se incluyen EpCAM, MUC1 y Her2<sup>274</sup>. La tecnología microfluídica combina la detección de marcadores de superficie con el aislamiento con flujo laminar en función del

tamaño y características hidrópicas de las CTC, capturando las células vivas<sup>273, 275</sup>. Otro método es la detección directa en sangre completa usando una combinación de marcadores, sin necesidad de aislar primero las CTC como en *CellSearch*, mediante el uso de una tecnología muy sensible que es la resonancia magnética micro-nuclear<sup>276</sup>. Otra vía de mejora es optimizar la identificación de las células usando paneles con nuevos genes que mejoren la sensibilidad y especificidad<sup>277</sup>. No obstante, a pesar de estos inconvenientes, la cuantificación por el método *CellSearch* es actualmente el más estandarizado y validado, y el único aprobado por la FDA.

Por otro lado, la detección de CTC por el método *CellSearch* en sujetos sanos y en patología benigna es sumamente rara. En un estudio para analizar la prevalencia de CTC en diferentes poblaciones por el método *CellSearch*, se incluyeron 964 pacientes con carcinomas metastásicos, 199 pacientes con enfermedades benignas y 145 controles sanos<sup>278</sup>. Entre los sujetos sanos, un 5.5% presentaron 1 CTC por 7.5 mL de sangre periférica, pero ninguno 2 o más. Entre los pacientes con patología benigna, sólo un 7.5% presentaron 1 CTC en 7.5mL, y un paciente con patología tiroidea obtuvo 3 CTC/7.5 mL. Por lo tanto, situando el nivel de positividad de CTC en 2 o más cada 7.5 mL de sangre periférica, solo 1 persona de las 344 no neoplásicas dio positivo, lo que supone un 0.3% del total y una especificidad del 99.7%. La prevalencia en los diferentes tumores también es diferente, con un 57% en cáncer de próstata, 37% en cáncer de mama, 30% en cáncer de colon y 37% en cáncer de ovario (figura 2.18).

**FIGURA 2.18. Prevalencia de CTC en 7.5 mL de sangre en diferentes poblaciones.**



De: Allard et al. CCR 2004.

## CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN CÁNCER DE OVARIO.

En el carcinoma epitelial de ovario (CEO) hay más discusión en torno a la relevancia clínica de las CTC, debido a su peculiar historia natural de diseminación principalmente vía peritoneal, con larga evolución dentro de la cavidad abdominal y bajo porcentaje de metástasis vía hematogena<sup>279</sup>. No obstante, la diseminación sistémica esta cobrando cada vez más importancia<sup>54</sup>. Varios trabajos muestran un porcentaje mayor de metástasis ocultas de lo

esperado, especialmente en médula ósea, en donde alcanza hasta un 27-54% de las pacientes<sup>280,281</sup>. La presencia de células tumorales en médula ósea se relaciona con menor SLE y menor SG (MS de 51 meses vs 33 meses,  $p=0.023$ )<sup>280</sup>.

Al igual que en el resto de tumores, debido a la escasa aceptación de realizar biopsia de médula ósea y la mayor comodidad y accesibilidad de la venopunción, también en CEO se focalizó el estudio de detección de la enfermedad oculta a través de las CTC en la circulación. Los primeros trabajos tuvieron bajas tasas de detección (12 y 19%) y no hallaron relación con la SG<sup>282, 283</sup>. Posteriormente, con la aparición de mejores técnicas de detección, otros trabajos han tenido tasas superiores al 20% (tabla 13) y sí han mostrado relación entre la enumeración de CTC con el pronóstico de la enfermedad. Dos metanálisis en 2015 sobre 1164 y 1129 pacientes confirman el valor pronóstico de la presencia de CTC, con disminución de la SLP (HR 1.44-2.52) y la SG (HR 1.61-1.97)<sup>284, 285</sup>. En el de Cui et al<sup>284</sup> muestra que la presencia de CTC se relacionó con el estadio (OR 1.90, 95%IC 1.02-3.56) y con la respuesta al tratamiento (OR 0.55, 95%IC 0.34-0.90) pero no con la histología serosa, afectación linfática o enfermedad residual.

Uno de los problemas principales es que no hay un método específico validado para la detección y caracterización de CTC en CEO, por lo que hay mucha variación de los sistemas empleados (tabla 2.11). Los principales métodos de aislamiento de CTC son los mismos que hemos expuesto previamente, pudiendo ser separación por tamaño, densidad celular, carga magnética o propiedades físico-dinámicas, siendo el más usado el enriquecimiento por partículas inmunomagnéticas<sup>286</sup>. Respecto a los métodos de identificación, los dos principales son por RT-PCR o por IHQ, aunque parece que la RT-PCR es más sensible<sup>284, 286</sup>.

Desde la aprobación del método *CellSearch* en cáncer de mama, su uso se ha extendido también a CEO, aunque hay que tener en cuenta las limitaciones comentadas anteriormente. Además, la expresión de EpCAM en CEO es controvertida, con autores que encuentran reducción y otros aumento<sup>286, 287</sup>. Por otro lado, la mayoría de estudios han mostrado resultados negativos en cuanto su papel pronóstico<sup>286, 288, 289, 290</sup>, incluso en el metanálisis de Zhou et al<sup>285</sup> el subgrupo de estudios realizados con *CellSearch* no obtuvo relación con la SG. Behbakht et al<sup>288</sup> analizó su papel en un fase II sobre 54 pacientes en recaída, obteniendo una tasa de detección del 44% usando un dintel de  $\geq 1/7.5\text{ml}$ , pero no hubo relación pronóstica con SLP ni SG. En algunos pacientes se hizo una monitorización de CTC, pero la muestra fue escasa. Uno de los estudios más grandes fue comunicado por Poveda et al<sup>289</sup> sobre la determinación de CTC del fase III OVA-301. Sobre una muestra de 216 pacientes en recaída obtuvo una tasa de detección de 14.4% usando el dintel en  $\geq 2/7.5\text{ml}$ . La presencia de CTC se relacionó con el ECOG, el Ca-125 y la presencia de ascitis. Se alcanzaron diferencias significativas en el análisis univariante en SLP (3.2 meses vs 6.6 meses,  $p=0.0024$ ) y en SG (12.4 meses vs 20.6 meses,  $p=0.0017$ ), pero no se confirmaron en el multivariante (HR 1.58,  $p=0.058$ , y HR 1.54,  $p=0.096$  respectivamente). Liu et al<sup>290</sup> analizan el papel de CTC por *CellSearch* en 30 pacientes de nuevo diagnóstico y 48 recaídas. Usando un dintel de  $\geq 2/7.5\text{ml}$ , encuentran CTC en el 60% de pacientes, tanto al diagnóstico inicial como en recaída, pero no encontraron relación con características clínicas ni con supervivencia. La determinación seriada tampoco fue predictivo de respuesta tumoral.

Tabla 2.11. Estudios sobre CTC en CEO.

Estudio	Método	Nº Pacientes	Tasa CTC	Nivel CTC	Valor Pronóstico	Relación
Marth 2002	Inmunomagnético (Dynabeads)	90	12%	≥ 2 rosetas	No	
Judson 2003	Cuerpo Inmunomagnético	59	19%	≥ 1	No	
Allard 2004	CellSearch	53	38%	≥ 2/7.5ml	NR	
Wimberger 2007	OncoQuick	57 P	21%	≥ 1	No	
Fan 2009	CAM+	66 P y R	60%	≥ 1/3ml	Si SLP (HR 1.44)	Ca-125, estadio
Behbakht 2011	CellSearch	54 R	44%	≥ 1/7.5ml	No	Problemas de validez
Poveda 2011	CellSearch	216 R	14%	≥ 2/7.5ml	No	Ca-125, ascitis, ECOG
Aktas 2011	AdnaTest	122 P	19%	≥ 2/5ml	Si SG (HR 4.56)	Cirugía subóptima
Obermayr 2013	Gradiente densidad y ARN extracción (Qiacube System)	216 P	24%	≥ 1	Si SLP (HR 3.5) SG (HR 2.3)	Ca-125 y HE4, ascitis, cirugía subóptima
Liu 2013	CellSearch	78 P y R	60%	≥ 2/7.5ml	No	
Kuhlmann 2014	AdnaTest	143 P	14%	≥ 1/7.5ml	Si SG (HR 1.85)	
Pearl 2014	CAM+	129 P	88%	≥ 5/1 ml	Si SLP (p 0.0024) SG (p 0.0219)	Ca-125, estadio
Kolostova 2015	MetaCell + cultivo	118 P	65%	≥ 1	NR	
Cui. 2015 Metanálisis		1164			Si SLP (HR 2.52) SG (HR 1.97)	
Zhou. 2015 Metanálisis		1129			Si SLP (HR 1.44) SG (HR 1.61)	

SLP=supervivencia libre de progresión; SG=supervivencia global; NR=No reportado

P=Paciente con Primer diagnóstico actual, tratamiento Primario; R= Pacientes en Recaída

Aktas et al<sup>291</sup> aplican el sistema *AdnaTest BreastCancer*, basado en enriquecimiento inmunomagnético detectando EpCAM y MUC1 y posterior identificación por RT-PCR de un panel con genes de EpCAM, MUC1, Her2 y Ca-125. Incluyen 122 pacientes en total, con determinación antes de cirugía (n=86) y/o 4-6 meses después del tratamiento con quimioterapia (n=70). Con un dintel de  $\geq 2/5$ ml, encuentran una tasa de detección del 19% antes de la cirugía y de 27% después de QT. Se relacionó con resección quirúrgica óptima (21% vs 34%). Obtuvieron que la positividad para CTC se relacionaba con SG de forma significativa, tanto antes de cirugía como después de QT, aunque no se relacionó con SLP.

Para solventar el problema de la dependencia de la expresión de EpCAM disponemos de los métodos de gradiente de densidad y de filtración por tamaño, como por ejemplo los métodos *OncoQuick*<sup>®</sup> y *MetaCell*<sup>®</sup>. Wimberger et al<sup>281</sup> usan el método *OncoQuick*<sup>®</sup> y posterior detección por IHQ con anticuerpo de CKs A45-B/B3 y EpCAM, aunque la detección sólo alcanzó un 21% de las muestras (12 de 57). Kolostova et al<sup>292</sup> emplean el método de aislamiento por tamaño *MetaCell*<sup>®</sup>, lo que les permite obtener células viables y después hacer una evaluación cito-morfológica y caracterización de su expresión génica a través de cultivos. Consiguieron

CTC positivas en el 65% de pacientes<sup>293</sup>. Este grupo obtuvo que los genes más frecuentemente elevados en CEO seroso fueron EpCAM, KRT19 y MUC1, presentes en el 90% de los casos<sup>293</sup>.

Un nuevo sistema de detección y enriquecimiento de CTC es el uso de una matriz de adhesión celular (*Cell Adhesion Matrix* – CAM), en donde la CTC se uniría a una matriz de colágeno tipo I y después ingeriría la proteína de la matriz marcada (CAM+), identificando una subpoblación de CTC con fenotipo invasivo (iCTC)<sup>286</sup>. Con este método la identificación se realiza mediante citometría de flujo multiparamétrica y se mantienen las células viables, con mínima pérdida celular, lo que permitiría realizar cultivos celulares posteriores<sup>286</sup>. Un estudio sobre 129 pacientes usando la tecnología CAM y confirmando la identidad de iCTC con marcadores epiteliales (EpCAM, Ca125, DPP4 y CKs) y CD45, aumentó de forma considerable la sensibilidad<sup>294</sup>. Detectó la presencia de iCTC en el 41% de CEO en estadios I y II y en el 83% entre todos los estadios, mostrando mejor correlación con SLE y SG que Ca-125. Fan et al<sup>295</sup> usando la misma tecnología en 66 pacientes detectó CTC en el 61% de pacientes y también fue factor pronóstico de SLP aunque no de SG, aunque el seguimiento fue escaso. Los marcadores epiteliales que usaron fueron EpCAM, ESA y varias CKs, junto con CD45.

Otro método estudiado también en CEO es la resonancia magnética micro-nuclear<sup>276</sup>. Se comparó en 15 pacientes la detección de CTC por el método *CellSearch* y por resonancia micro-nuclear, presentando mayor sensibilidad la segunda. La positividad de CTC se dio en el 20% y 87% respectivamente, usando dintel de *CellSearch* en  $\geq 2/7.5\text{ml}$ , y obteniendo un rango de CTC de 0-18 (media 2) y 0-170 (media 40) respectivamente.

El umbral de positividad de CTC en CEO es otro tema discutido, variando según la técnica empleada. En tumores con mayor diseminación vía hematológica como cáncer de mama, el dintel con *CellSearch* se sitúa en  $\geq 5\text{CTC}/7.5\text{ml}$ <sup>244</sup>, pero en tumores con menos diseminación sistémica, como el CEO, se disminuye según los trabajos a  $\geq 2\text{CTC}/7.5\text{mL}$ <sup>288, 289, 290</sup> o  $\geq 1\text{CTC}/7.5\text{ mL}$ <sup>277, 284</sup>, intentando compensar sensibilidad y especificidad (ver tabla 2.13). En el trabajo de Allard et al<sup>278</sup> se obtiene en todos los tumores que con un dintel de 1 CTC/7.5 ml hay una especificidad del 87%, pero con el dintel en  $\geq 2\text{CTC}/7.5\text{ml}$  subía la especificidad al 99.7%. Fan et al<sup>295</sup> incluye 5 pacientes benignos en su estudio, sin que ninguno mostrara CTC positivas ( $\geq 1$ ). En el estudio de Obermayr et al<sup>277</sup> situando el dintel en  $\geq 1\text{CTC}/7.5\text{ mL}$ , encuentran CTC en 2 de 39 sujetos sanos (especificidad del 95%).

La detección se ha realizado en la mayoría de estudios al diagnóstico inicial o en la recaída, pero en algunos también se ha realizado una determinación seriada durante la QT<sup>286</sup>. En el trabajo de Wimberger et al<sup>281</sup> el valor de CTC varió con la QT. Hubo un subgrupo de 30 pacientes a los cuales se analizaron CTC antes y después de QT, siendo positivas en 5/30 (16%) antes y solo uno después, por lo que ellos plantean que se debería analizar su papel como monitorización del tratamiento. Pearl et al<sup>296</sup> monitorizaron las CTC durante la QT en 31 pacientes de su serie de 123 pacientes, encontrando mayor sensibilidad de las CTC respecto a Ca-125 para predecir progresión o recaída. Sin embargo, en el trabajo de Liu et al<sup>290</sup>, usando el método *CellSearch*, no encontraron relación de la variación de CTC con la QT respecto a la respuesta tumoral.

La relación de CTC con el nivel de Ca-125 también ha sido analizada y se confirma una relación positiva en la mayoría de las series<sup>277, 293, 295</sup> y en el metanálisis de Zhou et al<sup>285</sup>. Kolostova et al<sup>293</sup> observan que CTC se relaciona con el estadio tumoral, ascitis y

especialmente con Ca-125, y dado que en los pacientes con ascitis tienden a tener niveles más altos de Ca-125, incluso con CTC negativos, postulan que CTC podría reflejar mejor la diseminación hematológica y Ca-125 el crecimiento peritoneal.

Además de su enumeración, otro aspecto muy importante es la caracterización fenotípica y genotípica de las CTC. Diversos trabajos han buscado expresiones génicas que pudieran mejorar la detección de CTC, predecir comportamientos de la enfermedad o sensibilidad/resistencia a la quimioterapia<sup>286</sup>. Kuhlmann et al<sup>297</sup> encuentran una relación positiva entre la expresión de ERCC1 (*excision repair cross-complementation group 1*) y la resistencia a platino al diagnóstico, aunque la expresión fue solo en el 8% de las pacientes, sobre una tasa de detección de CTC de 14%. Obermayr et al<sup>298</sup> estudian nuevos marcadores génicos específicos de las CTC en CEO para mejorar su detección. Incluyen 39 controles sanos y 216 pacientes, haciendo determinación antes del inicio del tratamiento y 6 meses después de finalizar la QT. Emplean una técnica de gradiente de densidad y extracción de ARN llamado *Qiacube System*. Sitúan el dintel en  $\geq 1/7.5$ ml, detectando CTC en el 24.5% de pacientes. La presencia de CTC se relacionó con la presencia de ascitis, cirugía sub-óptima y niveles séricos elevados de Ca-125 y HE4, y también tuvo impacto tanto en SLP como en SG, aunque solo la determinación hecha en el seguimiento, no la basal. El análisis de expresión génica se realizó por *microarrays* y RT-PCR, obteniendo finalmente 11 genes como posibles marcadores de CTC además de EpCAM, siendo el gen *Cyclophilina C* el más frecuente, con importante influencia pronóstica. Kolostova et al<sup>287</sup> también analizan la expresión génica de CTC para mejorar la detección, encontrando diferencias significativas en un panel de 8 genes, incluida EpCAM. El panel génico planteado en ambos trabajos sólo coinciden en la proteína EpCAM.

## CONCLUSION

Las CTC serán aquellas células viables presentes en la sangre periférica que posean características antigénicas o genéticas de un específico tipo tumoral. Su análisis podría mejorar nuestro conocimiento sobre la biología del cáncer y el proceso de metástasis, y ser un potencial valor pronóstico y predictivo para individualizar estrategias de tratamiento para los pacientes. Se ha demostrado ser un importante factor pronóstico en tumores como cáncer de mama, colon y próstata, pero en CEO el estudio de CTC no ha sido tan concluyente. Los estudios han sido pequeños, los métodos diferentes, los resultados de los estudios a veces contradictorios y no siempre han demostrado ser factor pronóstico o predictivo. Los metanálisis derivados de ellos muestran relación con el pronóstico, pero están limitados por ese pequeño tamaño de los estudios y la variedad de metodología.

Así pues, el papel de la determinación de CTC en CEO no está bien establecido, necesitando más estudios prospectivos.

## 2.4. ADN CIRCULANTE PLASMÁTICO

El estudio de ácidos nucleicos (AN) libres en la circulación ha sido un área activa de investigación en múltiples disciplinas médicas desde hace más de 60 años, con la comunicación inicial de Mandel y Métais en 1948 (figura 2.19)<sup>299,300</sup>. El incremento de los niveles de AN circulantes en la sangre (ADN, mRNA y miRNA) refleja la existencia de un proceso patológico de aumento del recambio celular, incluyendo patologías benignas y malignas<sup>301</sup>. Durante estos procesos, los AN son liberados a la sangre principalmente por células necróticas y restos apoptóticos<sup>301</sup>.

FIGURA 2.19. Ácidos nucleicos en plasma de Mandel y Métais (1948).

**Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme.**  
par P. MANDEL et P. MÉTAIS.

Sujet	Sexe	Age	Affection	P phospho-protéine mg.	P ribonucléique mg.	P desoxyribonucléique mg.	P total acides nucléiques mg.
1	F	42	Normal	0	5,0	1,2	6,2
2	F	22	"	0	4,0	0,4	4,4
3	H	24	"	0	5,2	1,3	6,5
4	F	27	"	0	4,7	0,3	5,0
5	F	20	"	0	3,7	0,8	4,5
6	H	48	"	0	4,6	1,3	5,9
7	H	45	"	0	4,5	0,6	5,1
8	F	26	"	0	5,0	0,2	5,2
9	F	37	"	0	4,8	0,6	5,4
10	H	39	"	0	5,0	0,9	5,9
11	H	62	Insuffis. card.	0	3,8	0,7	4,5
12	H	62	"	0	3,8	0,45	4,25
13	H	42	"	0	5,1	0,9	6,0
14	F	33	Endocard. maligne	0	3,35	0,65	4,0
15	H	19	Goutte	0	3,5	0,8	4,3
16	F	5	Basedow	0	5,6	0,4	6,0
17	H	48	Diabète	0	3,6	0,3	3,9
18	H	61	"	0	3,6	0,4	4,0
19	H	48	Cirrhose	0	3,5	0,4	3,9
20	F	52	Ictère	0	5,3	1,2	6,5
21	H	48	Goutte	0	3,6	0,4	4,0
22	"	"	"	0	3,5	1,0	4,5
23	H	33	Goutte	0	2,66	0,8	3,46
24	F	23	"	0	5,5	0,5	6,0
25	H	26	Néphrite	0	4,75	0,75	5,5
26	H	37	Tuberculose	0	3,75	0,7	4,45
27	F	23	Grossesse 7 <sup>e</sup> m.	0	3,5	0,45	3,95
28	"	"	"	0	7,65	1,35	9,0
29	"	"	"	0	7,25	1,00	8,25

**BIOLOGIE. COMPTES RENDUS. — N° 3-4, 1948. T. CXLII.**

De: Thierry et al. Cancer Metastasis Rev 2016

Se ha descrito aumento de ADN libre circulante (cfDNA) en diversas patologías neoplásicas como enfermedades inflamatorias<sup>302</sup>, traumatismos<sup>303</sup>, hemodiálisis<sup>304</sup>, sepsis<sup>305</sup>, infarto agudo de miocardio<sup>306</sup>, accidente cerebrovascular agudo<sup>307</sup>. En general, corresponden a patologías o situaciones que presentan un aumento del daño celular y necrosis<sup>300,301</sup>. Incluso se ha descrito cfDNA elevado en situaciones de ejercicio físico intenso<sup>300</sup>. Un área de aplicación que presenta gran interés es el estudio de ADN fetal en plasma de la mujer embarazada<sup>308</sup>, abriendo la puerta al asesoramiento genético prenatal no invasivo<sup>309</sup>.

En oncología, desde hace más de 3 décadas varios trabajos han relacionado la presencia de AN circulantes libres en plasma con la carga y progresión tumoral<sup>301,310</sup>. Los

tumores liberan ADN a la circulación sistémica principalmente a través de la necrosis y apoptosis celular, pero también por secreción directa desde las células tumorales del tumor primario, de las CTC y de las propias metástasis<sup>301, 311</sup>. Este ADN libre proveniente de los tumores se mezcla con ADN liberado por células normales, formando el ADN circulante libre total (cfDNA). Los pacientes con cáncer tienen niveles de cfDNA mayores que los sujetos sanos<sup>300</sup>. También se ha visto que cuando los niveles de cfDNA se mantienen altos tras una cirugía curativa, podrían indicar la persistencia de células tumorales, con lo que podría ser un marcador de la enfermedad mínima residual<sup>301</sup>. Los niveles varían entre menos de 10 ng/ml hasta más de 1500 ng/ml<sup>312</sup>. No obstante, algunos autores indican que el cfDNA no sería útil como biomarcador aislado, debido a su supuesta falta de especificidad, sugiriendo su combinación con otros biomarcadores<sup>301</sup>.

El ADN específico del tumor en el plasma, llamado ADN tumoral circulante (ctDNA) es una pequeña fracción del cfDNA total caracterizado por la presencia de alteraciones genéticas y epigenéticas específicas del tumor primario<sup>300, 301, 311</sup>. Este hecho le confiere una especificidad idónea como biomarcador tumoral<sup>300</sup>. Hasta hace poco, debido a la baja proporción de ctDNA dentro del cfDNA total, a veces <1%<sup>313</sup>, y la limitada sensibilidad de las técnicas disponibles, su estudio no ha sido viable, detectándolo sólo cuando había altos niveles de ctDNA<sup>300</sup>. La aparición de nuevas técnicas genómicas digitales ha aumentado de forma considerable la sensibilidad de detección, permitiendo el análisis del genotipo del cfDNA, incluso en presencia de fracciones muy pequeñas de ctDNA<sup>300</sup>. Esto hace de él una diana atractiva para el desarrollo como biomarcador y abre un nuevo y prometedor campo de aplicación clínica<sup>300</sup>.

Otros tipos de AN circulantes son los ARN mensajero y microRNA (miRNA), que son pequeñas moléculas que han mostrado tener un papel importante en la carcinogénesis y también podrían ser buenos candidatos a biomarcadores<sup>314, 315</sup>. Varios trabajos han mostrado un importante valor pronóstico y predictivo en varios tipos de cánceres<sup>316, 317, 318</sup>.

También se han descrito otros elementos circulantes relacionados con procesos neoplásicos como son los nucleosomas, ADN viral y ADN en superficie celular. Cuando hay una alta destrucción celular como en tumores de rápido crecimiento o tras quimioterapia, hay aumento en sangre de los llamados nucleosomas, que son conjuntos de histona y una hebra de ADN que en condiciones fisiológicas suelen ser atrapados por los macrófagos<sup>319</sup>. También se ha descrito un aumento de ADN viral libre circulante con papel diagnóstico y pronóstico en procesos neoplásicos. Se relacionan con aquellos tumores en donde son factores etiológicos, como virus Epstein-Barr para linfoma de Burkitt y carcinoma nasofaríngeo, virus de hepatitis B para algunas formas de hepatocarcinoma, y virus del papiloma humano para carcinoma de cabeza y cuello y carcinoma cervical<sup>301, 320</sup>. Se ha descrito otro tipo de ADN circulante, que se encuentra situado en la superficie de las células sanguíneas, pudiendo ser otro candidato a biomarcador<sup>312</sup>. Por último, comentar que está habiendo un creciente interés por los exosomas, micropartículas estables portadoras de material genético y proteico, habiéndose demostrado que poseen un importante y activo papel en la carcinogénesis<sup>321</sup>.

## MECANISMOS DE PRODUCCION DE ADN CIRCULANTE

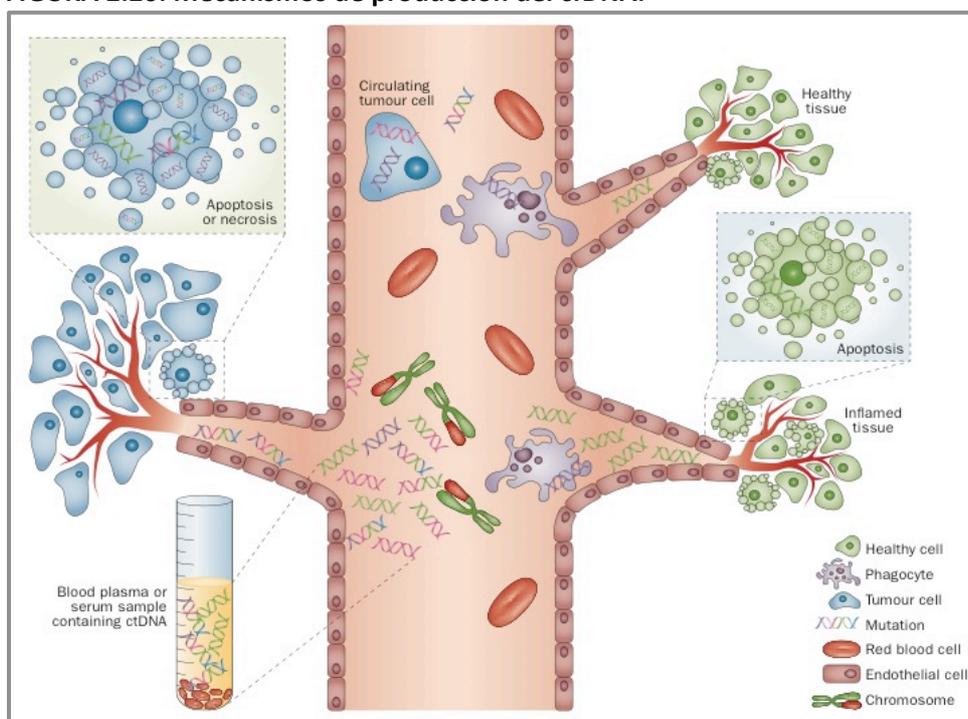
En circunstancias fisiológicas, los fagocitos limpian la mayoría de cuerpos necróticos y apoptóticos de los tejidos, siendo la cantidad de cfDNA normalmente baja<sup>301</sup>. En procesos

neoplásicos, debido al aumento del recambio celular y del volumen de la masa celular, este sistema se hace insuficiente, conduciendo a la acumulación de detritus celulares y su inevitable envío a la circulación<sup>300</sup>.

La cantidad de ADN proveniente del tumor dentro del total de cfDNA varía en función de múltiples circunstancias, como localización y tamaño del tumor, crecimiento, vascularización<sup>300</sup>. Se han descrito grandes variaciones de su proporción, pudiendo ir desde menos del 1% hasta un 93%, en función de la carga y dinámica tumoral de ese momento<sup>301, 313, 322</sup>. Los dos principales mecanismos de liberación de ADN tumoral a la circulación son la apoptosis y la necrosis tumoral<sup>301, 323</sup>. Algunos estudios indican que la apoptosis sería el proceso predominante, debido a que la longitud predominante del cfDNA es alrededor de 180 pares de bases, que se relaciona con cuerpos apoptóticos<sup>300, 322, 324, 325</sup>. La necrosis da lugar a fragmentos más largos<sup>324</sup>. Otros mecanismos de producción descritos son la secreción directa por parte del tumor primario, desde CTC y desde las células de los lugares metastásicos (figura 2.20)<sup>301, 311, 323</sup>.

La cantidad de cfDNA también está influida por el aclaramiento, degradación y otros eventos fisiológicos como la circulación sanguínea y linfática<sup>301</sup>. La eliminación de la circulación se realiza principalmente por vía hepática<sup>326</sup>. Estudios realizados comparando voluntarios sanos con pacientes con insuficiencia renal crónica y en diálisis, indican que el aclaramiento vía renal es poco relevante<sup>327</sup>. Generalmente, los AN son eliminados de la circulación rápidamente. La vida media del ctDNA se estima en aproximadamente 114 min tras la cirugía<sup>313</sup>.

**FIGURA 2.20. Mecanismos de producción del cfDNA.**



Se muestran diferentes mecanismos de producción del cfDNA, desde las células normales, tejido inflamatorio y células neoplásicas. En la circulación se combinan elementos celulares como CTC, hematíes, fagocitos, y AN con diferentes alteraciones como mutaciones y anomalías cromosómicas.

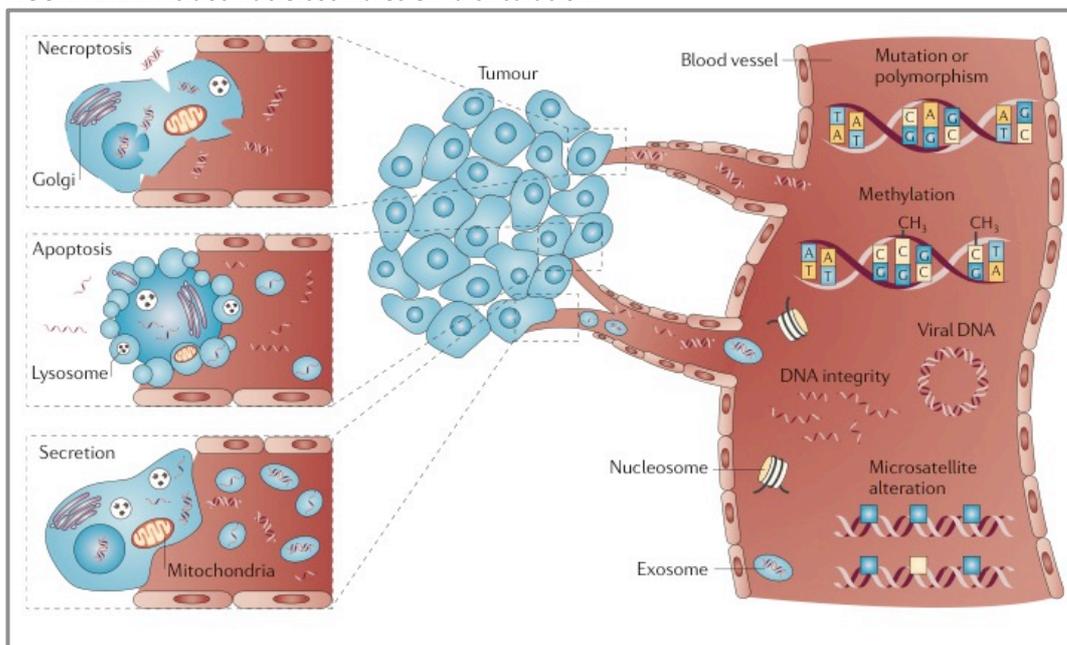
De: Crowley et al. Nat Rev Clin Oncol 2013.

El cfDNA de origen no tumoral proviene de los tejidos normales, procesos inflamatorios y también se ha indicado que una proporción importante pudiera provenir de células periféricas al tumor, que se destruyen por el propio crecimiento tumoral<sup>322, 323</sup>. El mecanismo principal de producción es casi exclusivamente por apoptosis. Por ello, la fragmentación en sujetos será más uniforme que en procesos tumorales, en donde la fuente de cfDNA es más variada<sup>328</sup>.

## MÉTODOS DE ESTUDIO DEL ADN CIRCULANTE

El cfDNA está compuesto por ADN genómico y ADN mitocondrial. Usualmente el ADN genómico circula en plasma en forma libre, pero el ADN mitocondrial puede ir en forma libre o asociada a partículas<sup>301</sup>. El estudio de cfDNA podrá focalizarse en la enumeración de la fracción libre o la detección de alteraciones como metilaciones, alteración de microsatélites, anomalías cromosómicas o mutaciones puntuales (corresponderá a ctDNA) (figura 2.21)<sup>301, 312</sup>.

**FIGURA 2.21. Ácidos nucleicos libres en la circulación.**



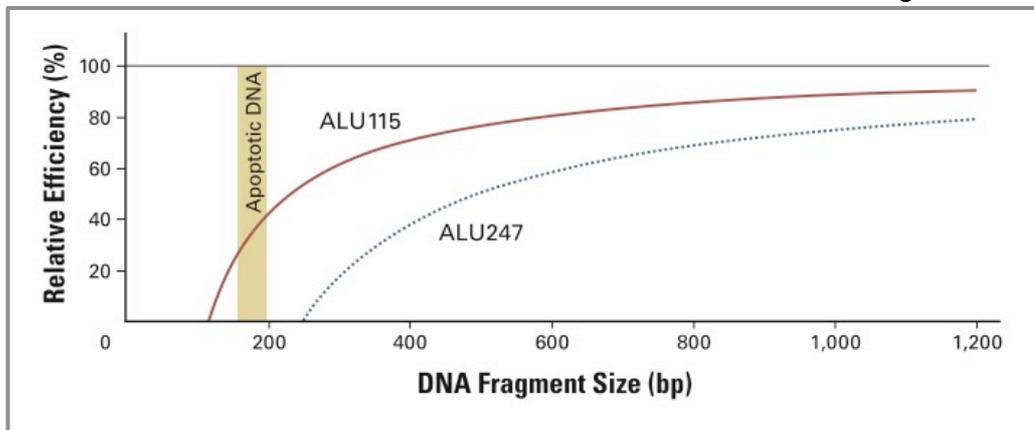
El cfDNA puede presentar diversas alteraciones como mutaciones, polimorfismos, metilaciones, alteración de microsatélites y otros. También en los procesos tumorales de rápida destrucción celular hay presentes en la circulación de nucleosomas.

De: Schwarzenbach et al. Nat Rev 2011.

Los métodos que se han empleado para medir el cfDNA han sido variados, tanto para el aislamiento y purificación de cfDNA de la circulación como para la detección. Dentro de los primeros se pueden emplear el método *QIAamp* y protocolo *QIAamp* modificado, el protocolo Tritón/Calor/Fenol, la amplificación del genoma entero mediada por ligadura de los extremos ciegos (BL-WGA) o el método *NucleoSpin*<sup>326</sup>. Dentro de los métodos de detección están los basados en fluorescencia, como *PicoGreen* y espectrometría ultravioleta, los cuantitativos, como la PCR en sus varias opciones, sobre todo PCR cuantitativa (qPCR), o la técnica qMAMBA, y los métodos de secuenciación<sup>301, 326</sup>.

Una de las formas más extendidas de determinar la concentración de cfDNA es mediante la detección de la fragmentación del cfDNA, a través de secuencias no codificantes del ADN genómico<sup>301</sup>. Estas secuencias son series de nucleótidos repetidos intercalados en el ADN, pudiendo ser secuencias cortas (ALU) o largas (LINE1). Las secuencias ALU (*Arthrobacterluteus*) son las más abundantes del genoma humano<sup>329</sup>. Naoyuki et al<sup>328</sup> desarrollan un método para cuantificar la cantidad de cfDNA y su integridad, basándose en esta fragmentación del ADN. Con ello intentan cuantificar el cfDNA circulante total y también intentan hacer una aproximación al cfDNA relacionado con origen tumoral. Parten de la premisa que el cfDNA en sujetos sanos deriva principalmente de apoptosis, estando la mayoría en torno a 180-200 pares de bases, y el cfDNA de origen tumoral presentará una fragmentación más variada pues su origen es más diverso (apoptosis, necrosis, secreción), por lo que habrá más porcentaje de fragmentos largos que en personas sanas. Diseñan 2 *primers* o cebadores para secuencias ALU: el primero con 115 pares de bases (ALU115) amplifica secuencias cortas, generalmente derivadas de apoptosis, y fragmentos largos, de otros orígenes; el segundo *primers* está formado por 247 pares de bases (ALU247) y amplifica solo fragmentos largos de ADN (figura 2.22). Recogen 1 ml de muestra sanguínea y realizan una RT-PCR de las secuencias de ambos *primers* para cuantificar el cfDNA (*ALU-qPCR*) y calculan la integridad del ADN mediante la razón entre ALU247/ALU115. Como la ALU115 pueden amplificar la mayoría de fragmentos de ADN, su valor de ALU-qPCR representará la cantidad total de cfDNA. La fracción de la integridad será más próxima a 1 cuando más cerca está todo de fragmentos largos, y se aproximará más a 0 cuanto más fragmentos pequeños predominen. La tendencia al valor de 1 se relacionará con proceso tumoral, y la tendencia a valor de 0 se relacionará con sujeto sano. En el estudio de Naoyuki et al la cuantificación de cfDNA por ALU115 en voluntarios sanos fue de 0.34 ng/mcL y la media de integridad fue de 0.13, siendo independientes del sexo y la edad. En pacientes con carcinoma colorrectal avanzado el cfDNA fue de 1.73 ng/mcL, siendo significativamente mayores que en sanos ( $p=0.004$ ), y la integridad de 0.22, también más elevada que en sanos ( $p=0.006$ ). Las curvas ROC del valor absoluto y la integridad fueron similares, indicando que ambos parámetros tienen un interesante valor como biomarcadores.

FIGURA 2.22. Eficiencia relativa de la cuantificación de cfDNA en términos de longitud de ADN.



De: Naoyuki et al. J Clin Oncol 2006.

El análisis de ctDNA se realiza mediante la detección en cfDNA de alteraciones específicas del tumor, como mutaciones, alteraciones epigenéticas o cromosómicas. La mayoría de estudios se focalizan en la detección de mutaciones presentes en el tejido tumoral. Debido a la baja frecuencia de algunas de estas mutaciones, hasta hace poco su estudio no era factible o los resultados eran contradictorios<sup>323</sup>. Gracias a la aparición de nuevas técnicas con una muy alta sensibilidad, como los métodos de plataforma digital y secuenciación de nueva generación, actualmente se puedan realizar estudios viables de ctDNA (figura 2.23). La aparición de la PCR digital ha permitido aumentar la sensibilidad de la detección a límites de 0.1% o mayores, y realizar una cuantificación absoluta en lugar de relativa que se hace con qPCR<sup>300, 326</sup>. Una de las plataformas digitales es la llamada BEAMing (*Beads, Emulsions, Amplification and Magnetics*), que alcanza un factor de detección de 10.000 a 1.

**FIGURA 2.23. Metodologías de estudio del ctDNA.**

Technique	Sensitivity	Optimal Application
Sanger sequencing	> 10%	Tumor tissue
Pyrosequencing	10%	Tumor tissue
Next-generation sequencing	2%	Tumor tissue
Quantative PCR	1%	Tumor tissue
ARMS	0.10%	Tumor tissue
BEAMing, PAP, Digital PCR, TAM-Seq	0.01% or lower	ctDNA, rare variants in tumor tissue

De: Díaz y Bardelli. J Clin Oncol 2014

Uno de los problemas principales en la evaluación de cfDNA es la gran variedad y falta de estandarización de los métodos, desde las técnicas de aislamiento hasta la identificación. La extracción de cfDNA se puede realizar por varios métodos (diversos kits comerciales, protocolos individuales), incluso hay discusión sobre si es mejor el estudio sobre plasma o suero. Debido a la existencia de diferentes protocolos y plataformas para el análisis, resulta difícil la comparación. Por ello, es de suma importancia estandarizar todo el proceso<sup>193, 301, 330</sup>.

## ADN LIBRE CIRCULANTE

Los pacientes con cáncer tienen niveles de cfDNA mayores que los sujetos sanos<sup>300</sup>. Estudios en diferentes tumores han mostrado que la concentración y características del cfDNA pueden tener un destacable papel como potencial biomarcador (tabla 2.12). El primer trabajo publicado fue de Leon et al<sup>310</sup> en 1977. Compararon la cuantificación de cfDNA mediante radioinmunoensayo de 173 pacientes con varios tipos de cáncer frente a 55 sujetos sanos. Obtuvieron cifras más altas en pacientes neoplásicos que en sanos, y en pacientes metastásicos más que en enfermedad localizada. Resultó interesante que tras tratamiento presentaron reducción de las cifras de cfDNA que se relacionó con la respuesta tumoral. La persistencia o elevación de cfDNA se relacionó con mala evolución clínica.

TABLA 2.12. Estudios con cfDNA en diversas neoplasias.

Trabajo	Método	Pacientes	Cuantificación cfDNA	Integridad cfDNA	Valor
<b>Leon et al 1977</b>	RIA	55 sanos 173 varios tm	13 ng/ml 180 ng/ml		Pronóstico
<b>Sozzi et al 2003</b>	hTERT-qPCR	100 sanos 100 pulmón	3.1 ng/mL 24.3 ng/mL		Diagnóstico Monitorización Screening
<b>Herrera et al 2005</b>	Actina-qPCR	11 sanos 51 benignos 83 torácicos	11 mcg/L 432 mcg/L 819 mcg/L p=0.02		Diagnóstico
<b>Naoyuki et al 2006</b>	ALU-qPCR	51 sanos 32 colon	0.34 ng/mcL 1.73 ng/mcL p=0.004	0.13 0.22 p=0.006	Predictivo
<b>Naoyuki et al 2006</b>	ALU-qPCR	51 sanos 83 mama		p.13 0.29 p<0.001	
<b>Schwarzenbach 2008</b>	Espectrofotometría	20 sanos 55 colon	7 ng/mL 868 ng/mL		Pronóstico
<b>Schwarzenbach 2009</b>	Espectrofotometría	10 sanos 69 próstata L 12 próstata M	21 ng/mL 186 ng/mL 562 ng/mL p=0.03		Comparación entre cfDNA, CTC e inestabilidad microsatélites
<b>Park et al 2012</b>	ALU-qPCR	59 sanos 54 gástrico	29.8 ng/ml 71.4 ng/ml p<0.001		Diagnóstico
<b>Hashad et al 2012</b>	hTERT-qPCR	27 sanos 42 mama			Pronóstico Predictivo
<b>Salvianti et al 2012</b>	APP-qPCR	63 sanos 76 melanoma			Diagnóstico Monitorización
<b>Delgado et al 2013</b>	ALU-qPCR	20 sanos 19 próstata			Monitorización (integridad cfDNA)
<b>El-Gayar et al 2016</b>	ALU-qPCR	20 sanos 10 benignos 50 colon	2.8 ng/mcL 2.0 ng/mcL 4.6 ng/mcL p=0.002	0.173 0.3 1.54 p<0.001	Diagnóstico Monitorización
<b>Fawzy et al</b>	ALU-qPCR	30 sanos 25 benignos 50 próstata	0.1 ng/mcL 17.2 ng/mcL 408 ng/mcL p<0.001	0.03 0.10 0.29 p<0.001	Diagnóstico

RIA= radioinmunoensayo; Tm=tumores; próstata L= próstata localizada; próstata M= próstata metastásica  
qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Desde entonces se han realizado muchos estudios en múltiples tumores, aunque con diferentes métodos y diferente metodología. Herrera et al<sup>331</sup> proponen el uso de qPCR usando la secuencia de ADN genómica de beta-actina para la medición de cfDNA en tumores torácicos. Para ello comparan 83 pacientes con tumores torácicos (esofágicos y de pulmón) con 51 pacientes de enfermedad benigna por reflujo y 11 sanos. Obtuvieron mayores cuantificaciones

en pacientes con cáncer que enfermedad por reflujo de forma significativa (819 mcg/L vs 432 mcg/L,  $p=0.02$ ). No obstante, el mismo grupo analizó otras muestras obtenidas de forma prospectiva sin hallar diferencias entre los tres grupos.

Nayouki et al<sup>328</sup> comparan mediante ALU-qPCR el valor absoluto de cfDNA y la integridad de ADN en 32 pacientes con carcinoma de colon frente a voluntarios sanos, obteniendo diferencias significativas en los dos valores analizados, con valor predictivo. El-Gayar et al<sup>332</sup> aplican el mismo método en 50 pacientes también con carcinoma de colon y los comparan con 20 personas sanas y 10 pacientes con pólipos de colon, obteniendo diferencias significativas en cuantificación y valor de integridad del cfDNA. Obtienen que la integridad del cfDNA es un índice superior a la cuantificación, con mejor perfil como biomarcador tanto para diagnóstico como para monitorización, incluso también con valor en screening. Presenta un AUC de la curva ROC de 0.9 frente a 0.73 de la cuantificación.

Delgado et al<sup>333</sup> miden el cfDNA en pacientes de próstata también mediante ALU-qPCR. Comparan 19 pacientes con cáncer de próstata con 20 sujetos sanos. Recogen 4 ml de sangre al diagnóstico y a los 3 y 6 meses después. Hubo correlación entre PSA y cfDNA a los 3 y 6 meses, pero no al diagnóstico. Hubo un aumento de la cuantificación de cfDNA a los 3 meses que no se relacionó con el nivel de PSA ni otros parámetros clínicos. No obstante, la integridad de cfDNA tuvo mejor correlación con la evolución. El ratio de integridad ALU247/ALU115 al diagnóstico es menor de 1% solo en el 8.5%, a los 3 meses de 74% y a los 6 meses de 100%. Este hecho indica la progresiva disminución de fragmentos largos, por reducción de la necrosis como fuente de cfDNA, y el aumento del origen en cuerpos apoptóticos. Se sugiere que el ratio de integridad podría ser un candidato a biomarcador para monitorizar la enfermedad.

Fawzy et al<sup>334</sup> también en carcinoma de próstata, compara un grupo de 50 pacientes con grupo de tumores benignos y controles sanos. Encuentran diferencias significativas entre los tres grupos para cfDNA115, cfDNA247 y la integridad de cfDNA. Obtuvieron que el valor de cfDNA115 fue el que presentaba mayor valor clínico para diferenciar paciente metastásico del no metastásico.

En carcinoma de colon, Schwarzenbach et al<sup>335</sup> analizan la relevancia clínica de cfDNA usando espectrofotometría (fotómetro NanoDrop). Comparan 55 pacientes con enfermedad metastásica y 20 controles sanos, obteniendo diferencias significativas de concentración de cfDNA entre el grupo de pacientes y el grupo sano (868 ng/ml vs 7 ng/ml). Los pacientes con mayores niveles de cfDNA presentaron peor supervivencia ( $p=0.02$ ). No hubo relación con los parámetros clínicos de los pacientes. También hacen determinaciones posteriores de cfDNA en 14 de los pacientes, sugiriendo un papel en la monitorización tras el inicio del tratamiento.

Park et al<sup>336</sup> analizan 54 pacientes con cáncer gástrico con 59 controles sanos mediante la tecnología ALU-qPCR, pero usando secuencias de ALU con 81 pares de bases en lugar de 115. Obtienen que el cfDNA fue 2.4 veces más alto en pacientes que en el grupo control. Alcanzaron una sensibilidad de 75%, especificidad de 63% y un área bajo la curva ROC 0.78. El mismo grupo comparó ALU-qPCR con espectrofotometría (NanoDrop 1000, NanoDrop 3300), siendo superior ALU-qPCR. También compararon la medición en suero y en plasma, siendo esta última más fiable que en suero, en donde había una mayor variabilidad.

Sozzi et al<sup>337</sup> también emplean RT-PCR pero amplificando el gen hTERT (hTERT-qPCR), con 98 pares de bases. Comparan 100 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico y 100

controles sanos. Encuentran niveles de cfDNA mayores en pacientes frente a controles (24.3 vs 3.1 ng/mL), con un AUC de la curva ROC de 0.94 (95%IC 0.91-0.97). Los valores se vieron influidos por la edad, pero no se relacionaron con otros datos clínicos ni patológicos como el valor de Ki67 o la expresión de EGFR. Una segunda muestra en 35 pacientes se relacionó con la evolución clínica, presentando una mayor cfDNA los que presentaron recaída frente a los libres de enfermedad (7.1 vs 24.7 ng/mL,  $p=0.002$ ). Los autores valoran su papel diagnóstico y de monitorización, y sugieren un posible papel de screening en sujetos de alto riesgo.

En cáncer de mama, Hashad et al<sup>338</sup> también usan hTERT-qPCR para comparar 42 pacientes con cáncer de mama con 27 sujetos sanos y 30 pacientes con lesiones benignas. El cfDNA fue significativamente mayor en los pacientes con cáncer que en los otros dos grupos, y estuvo asociado con el estadio, tamaño tumoral, afectación ganglionar y grado histológico, sugestionando un valor pronóstico. La curva ROC para diferenciar lesiones malignas de controles sanos, presentó una sensibilidad de 97.6%, especificidad del 96.3%, valor predictivo positivo de 97.6% y negativo de 96.3%.

Debido a la falta de especificidad del cfDNA frente al ctDNA para discriminar entre pacientes y sanos, Salvianti et al<sup>339</sup> intentan responder a esta cuestión en pacientes con melanoma. Comparan el valor diagnóstico de la concentración e integridad de cfDNA frente a ctDNA basado en la mutación BRAF-V600E y en la metilación de RASSF1A. Incluyen 76 pacientes con melanoma con 63 controles sanos y emplean qPCR con dos secuencias del gen APP, con 67 y 180 pares de bases. Obtienen que el parámetro con mejor capacidad diagnóstica fue la concentración de cfDNA seguida de la integridad y después de ctDNA. La concentración de cfDNA alcanzó en el análisis univariante un AUC de 0.85 y una Odds Ratio (OR) de 5.6, la integridad 180/67 un área de 0.76 y una OR de 4.8, la metilación RASSF1A un AUC de 0.69 y una OR de 1.4 y la mutación BRAF un AUC de 0.64 y una OR de 6.1. También vieron que estos nuevos biomarcadores pudieran tener papel de monitorización con el tratamiento.

Naoyuki et al<sup>340</sup> realizan un estudio similar al anterior de colon pero en pacientes con cáncer de mama con qPCR de secuencias ALU. También encuentran diferencias entre grupo control y pacientes, con aumento del valor absoluto de cfDNA115, cfDNA247 y la integridad de cfDNA. La comparación de los tres valores muestra que la integridad de cfDNA presenta una mejor correlación con el estadio tumoral. La integridad se relacionó con el estadio, la invasión linfocelular, afectación ganglionar y el tamaño tumoral.

Otra cuestión es la comparación cfDNA con otros biomarcadores. Schwarzenbach et al<sup>341</sup> estudian en 10 sujetos sanos y en 81 pacientes con cáncer de próstata, 69 con enfermedad localizada y 12 metastásica, el valor de cfDNA, CTC y la inestabilidad de microsatélites. El ADN fue evaluado por espectrofotometría (espectrómetro NanoDrop ND-1000), las CTC por el sistema de *inmunospots* PSA-EPISPOT y la inestabilidad de microsatélites con un panel de 14 marcadores. Obtienen diferencias significativas de la cuantificación de cfDNA entre sanos y pacientes, y entre enfermedad localizada y metastásica, incluso observan relación con el estadio de la enfermedad ( $p<0.005$ ). La detección de CTC fue del 71% en localizados y de 92% en metastásicos, y ninguno en la cohorte sana. La detección de inestabilidad de microsatélites fue del 45% en localizados y de 58% en metastásicos, y ninguno en los sujetos sanos. La presencia de CTC no se relacionó con cfDNA pero sí con la presencia de ciertas alteraciones de microsatélites, reflejando la relación entre CTC y ctDNA.

En conclusión, dada la fácil accesibilidad al plasma y ADN sérico, su alta sensibilidad y la posibilidad de ser reflejo fiable de la carga tumoral, ha hecho que su análisis haya atraído el interés científico, pudiendo ser el cfDNA un biomarcador diagnóstico, pronóstico y de monitorización<sup>301</sup>.

## ADN LIBRE CIRCULANTE EN CÁNCER DE OVARIO

En cáncer de ovario también están apareciendo estudios que abogan por un posible papel como biomarcador (tabla 2.13). En modelo murino de cáncer de ovario se ha visto que el cfDNA se relaciona con la carga tumoral y se modifica en función de la respuesta al tratamiento, mostrándose como un potencial biomarcador de monitorización<sup>311</sup>.

**TABLA 2.13. Estudios con cfDNA en carcinoma de ovario.**

Trabajo	Método	Pacientes	Cuantificación cfDNA	Valor
<b>Kamat et al 2006</b>	qPCR (varios-1) Plasma	12 sanos 19 CEO III-IV alto grado	10105 29918 p=0.009	Diagnóstico
<b>Zachariah et al 2008</b>	GAPDH-qPCR Plasma y suero	36 sanos 24 benignos 23 endometriosis 21 CEO	1708 GE/mL (p=0.01) 2000 GE/mL (p=0.03) 2185 GE/mL (p=0.63) 3690 GE/mL	Diagnóstico No valor pronóstico
<b>Capizzi et al 2008</b>	hTERT-qPCR Plasma	22 CEO en QTNA 50 sanos	29,6 ng/mL 6,4 ng/mL	Pronóstico Predictivo
<b>Wimberger et al 2010</b>	PicoGreen Suero	28 sanos 62 CEO IB-IV		Pronóstico Predictivo
<b>Kamat et al 2010</b>	Globina-qPCR Plasma	75 sanos 49 benignos 164 CEO	1912 GE/mL 2365 GE/mL 10113 GE/mL p<0.0001	Pronóstico Predictivo
<b>No et al 2012</b>	RT-PCR (varios) Suero	16 benignos 36 CEO I-IV		No valor pronóstico
<b>Schilder et al 2012</b>	RT-PCR (varios-1)	23 CEO resistentes		No valor pronóstico
<b>Steffensen et al 2014</b>	Ciclofilina-qPCR Plasma	144 CEO resistentes-BV	5150 alelos/mL	Pronóstico

CEO=Carcinoma Epitelial de Ovario; GE=Equivalente genómico; BV=bevacizumab; qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; varios-1=GADPH, beta-actina y beta-globina; QTNA= quimioterapia neoadyuvante

Wimberger et al<sup>342</sup> analizaron en 62 pacientes con CEO estadios IB-IV y 28 controles sanos el valor de la cuantificación sérica de cfDNA, determinado mediante Quant-iT PicoGreen dsDNA Kit-Invitrogen, y lo relacionaron con otros biomarcadores (nucleosomas circulantes, actividad de proteasas y caspasas, células tumorales diseminadas en médula ósea). Realizó la determinación antes y después del tratamiento adyuvante. El grupo de pacientes presentó una concentración más elevada de cfDNA que el grupo control (p=0.0001), y en los pacientes fue

mayor antes que después de la quimioterapia ( $p=0.048$ ). Un nivel alto antes de la QT se relacionó con mayor riesgo de recaída ( $p=0.02$ ), presencia de metástasis ( $p=0.05$ ) y con peor supervivencia ( $p=0.01$ ). Una cirugía primaria sub-óptima (enfermedad residual mayor de 1 cm) se relacionó con niveles altos de cfDNA de forma significativa ( $p=0.0001$ ). Los autores concluyen que el cfDNA podría representar un nuevo biomarcador pronóstico y predictivo, mejor que los otros biomarcadores comparados.

Hay que tener muy presente la metodología usada. No et al<sup>343</sup> usaron qPCR amplificando 4 genes (B2M, RAB25, CLDN4 y ABCF2), no hallando diferencias de cfDNA entre 36 pacientes con CEO y 16 controles con tumores benignos de ovario. Sin embargo, en otro estudio usando también qPCR pero amplificando otros genes (GAPDH, beta-actina y beta-globina), Kamat et al<sup>344</sup> encuentran niveles de cfDNA mayores en el grupo de pacientes respecto al grupo control con los tres genes.

Zachariah et al<sup>345</sup> incluyen en su estudio a 36 controles sanos, 24 tumores ováricos benignos, 23 endometriosis y 21 pacientes con CEO. Emplean qPCR amplificando GAPDH sobre 500  $\mu$ L de plasma y suero. Los valores en suero no mostraron diferencias significativas, probablemente por el posible artefacto debido al procedimiento de aislamiento del suero. Los valores en plasma sí mostraron diferencias, encontrando niveles más elevados en pacientes con CEO que en el grupo control ( $p=0.009$ ) y de tumores benignos ( $p=0.027$ ), y también fue mayor que en el grupo de endometriosis pero no llegó al límite de la significación ( $p=0.63$ ). La curva ROC entre cáncer y sanos/tumores benignos muestra una sensibilidad de 74%, especificidad de 69% y un AUC de 0.72. Sin embargo, no encontraron relación de los niveles de cfDNA con la evolución, volumen tumoral y estadio.

Capizzi et al<sup>346</sup> estudian el papel de la cuantificación de cfDNA antes y después de la QT en pacientes con CEO. Incluyen 22 pacientes que reciben QT neoadyuvante y cirugía de intervalo. Las muestras se obtienen antes de cada ciclo, y antes y después de la cirugía de intervalo. Emplean qPCR amplificando el gen hTERT. Encuentran que la monitorización durante el tratamiento con QTNA presenta valor predictivo de respuesta a cirugía. Además, obtienen que también presenta valor pronóstico de supervivencia libre de progresión. En su estudio, cfDNA alcanzó una sensibilidad del 77% y especificidad del 96% para diferenciar pacientes de controles.

En un estudio prospectivo alemán en pacientes con CEO resistente tratados con el antiangiogénico bevacizumab, Steffensen et al<sup>347</sup> analizan el valor de la concentración de cfDNA en pacientes en recaída resistente. Usaron RT-PCR con 1 ml de plasma amplificando el gen ciclofilina-A. No hallaron diferencias entre el valor de cfDNA y el valor de Ca125 ni otros parámetros como el estadio, histología, grado tumoral o tasa de respuesta con criterios radiológicos RECIST, pero sí mostraron relación con el estado general ECOG, la respuesta tumoral serológica por medición de Ca125 y el pronóstico. Los valores altos de cfDNA se relacionaron fuertemente con la supervivencia libre de progresión ( $p=0.0004$ ) y la supervivencia global, con SG de 8.1 meses frente a 5.0 meses para bajo y alto nivel de cfDNA ( $p=0.005$ ). La HR fue de 1.98 ( $p=0.002$ ) para SLP y de 1.66 ( $p=0.02$ ) para SG.

Sin embargo, en un fase II del GOG de evaluación de dasatinib en 26 pacientes resistentes, se analizó la concentración de cfDNA medida por qPCR con los genes GAPDH,

beta-actina y beta-globina, no relacionándose con la evolución del paciente, ni con la SLP ni con la SG<sup>348</sup>.

Kamat et al<sup>349</sup> estudian el valor de cfDNA como biomarcador predictivo del resultado de la cirugía peritoneal. Incluyen a 164 pacientes con CEO, 49 neoplasias benignas y 75 controles. La metodología usada fue qPCR amplificando beta-globina y se determinó el número de equivalentes genómicos (GE) por mL. El grupo de CEO presentaron un valor mayor de cfDNA (10113 GE/mL), comparado con el grupo de neoplasias benignas (2365 GE/mL,  $p < 0.0001$ ) y con el grupo control (1912,  $p < 0.0001$ ). Las diferencias entre el grupo de neoplasias benignas y controles no fue significativo. Valores altos se relacionaron de forma significativa en el análisis multivariante con el estadio y con la cirugía sub-óptima. Los valores altos también fueron factores pronósticos independientes tanto de SLP como de supervivencia global (HR para mortalidad de 2.83 ( $p < 0.001$ )). Se situó la sensibilidad en 87% y la especificidad en 87%.

Un reciente metanálisis de 9 estudios, incluyendo 462 pacientes y 407 controles, muestra que el análisis cuantitativo de cfDNA presenta una baja sensibilidad (0.70; 95% IC 0.65-0.74) pero aceptable especificidad (0.90; 95% IC 0.87-0.93)<sup>350</sup>. La OR diagnóstica fue de 26.05 (95% IC 14.67-46.26) y el AUC fue de 0.89 (95% IC 0.83-0.95). No obstante, los estudios son pequeños, la mayoría retrospectivos y existen gran heterogeneidad. Sugieren que se necesitan de estudios prospectivos grandes para validar la aplicación clínica de cfDNA, tanto individual como en combinación con otros biomarcadores.

Así pues, la detección de cfDNA puede ser una nueva herramienta para mejorar el manejo clínico del paciente con cáncer de ovario, con papel tanto en el diagnóstico como en el tratamiento y pronóstico. No obstante, los resultados aún no son concluyentes, todavía quedan muchas preguntas por responder, por lo que se necesitan más estudios prospectivos que avalen los resultados. Adicionalmente, el cfDNA es una fuente para la identificación de mutaciones relacionadas con el tumor de una forma no invasiva, algunas de las cuales podrán ser candidatas a nuevas dianas terapéuticas.



## **3. Hipótesis y Objetivos**

---



## JUSTIFICACIÓN Y PERTINENCIA DEL ESTUDIO

El carcinoma epitelial de ovario (CEO) supone la segunda neoplasia ginecológica más frecuente y la de mayor mortalidad. Se trata de una enfermedad inicialmente muy quimio-sensible, con altas tasas de respuesta a quimioterapia (QT) basada en platino y altos índices de resección quirúrgica completa. Sin embargo, aproximadamente un 20-30% de pacientes no responderán al tratamiento inicial con QT y, de las pacientes en estadios avanzados que respondan al tratamiento, hasta un 75% presentarán recaída tumoral. La enfermedad recurrente representará, en la mayoría de ocasiones, una enfermedad incurable que precisará tratamiento indefinido con quimioterapia. Finalmente desarrollará resistencia al tratamiento y fallecerán por la enfermedad.

La valoración de la respuesta tumoral se basa en criterios clínicos, radiológicos y serológicos. Los dos únicos biomarcadores (BM) aprobados en el CEO son el Ca 125 y HE4, aunque presentan limitaciones de sensibilidad y especificidad. Su utilidad principal será la monitorización de la respuesta al tratamiento y el seguimiento de la paciente.

El alto índice de recaída del CEO avanzado y el mal pronóstico de la enfermedad resistente, junto con las limitaciones de los BM actuales, ha llevado a una búsqueda de nuevos indicadores y nuevas estrategias terapéuticas para mejorar los resultados de los tratamientos. Numerosas investigaciones evalúan nuevos BM capaces de lograr una valoración más sensible y específica de la enfermedad. Algunos presentan resultados prometedores pero, lamentablemente, los estudios actuales son de pequeño tamaño y con resultados a veces contradictorios, empleando diferentes técnicas y metodología de análisis que dificultan la comparación y validación de sus resultados. Son necesarios estudios que aporten más información sobre su relevancia clínica.

Una de las vías de estudio es analizar el papel que juegan las células tumorales circulantes (CTC) y ácidos nucleicos en los procesos oncológicos. El estudio de CTC y ADN libre circulante (cfDNA) puede mejorar nuestro conocimiento sobre la fisiopatología de la enfermedad y el proceso de diseminación sistémica, aportar información pronóstica y predictiva, y tener probable influencia en la toma de decisiones terapéuticas.

En el presente trabajo se ha analizado de forma prospectiva el valor clínico de dos nuevos BM circulantes como son las CTC y cfDNA, y se han comparado con los biomarcadores ya establecidos Ca125 y HE4. Hemos comparado su valor predictivo de respuesta a la QT basada en platino y el resultado de cirugía, y su valor pronóstico de supervivencia libre de progresión y supervivencia global.

Por ello, hemos planteado el siguiente estudio observacional prospectivo en pacientes con carcinoma epitelial de ovario, trompa de Falopio y peritoneal primario, en fase avanzada de enfermedad.

Muchos esfuerzos deben ser añadidos para mejorar nuestro conocimiento del CEO y así aportar beneficios en esta devastadora enfermedad. Según Michael M. Gottesman et al (Nat Rev Cancer 2002), “La mutabilidad y heterogeneidad de las células tumorales siempre les proporcionará la manera de superar la resistencia, no importa lo nuevo o importante de la droga anti-cáncer”. Nuestra misión será aprender a identificar y manejar esa situación.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

El análisis de células tumorales circulantes y ADN libre circulante plasmático puede suponer dos nuevos biomarcadores con mayor capacidad predictiva y pronóstica del carcinoma epitelial de ovario avanzado que los biomarcadores actualmente establecidos.

En caso de confirmarse nuestra hipótesis, aportaríamos dos nuevos biomarcadores que mejorarían la valoración clínica de la paciente y nos ayudarían a optimizar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas dirigidas a esta población neoplásica.

## **OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

### **Objetivo Principal**

Determinar el valor pronóstico de las células tumorales circulantes y ADN libre circulante en plasma en el CEO avanzado.

Se determinará la capacidad pronóstica que presentan los BM respecto a la supervivencia libre de progresión y supervivencia global de las pacientes. Se analizará tanto su valor basal y como la variación entre el valor basal y tras el primer ciclo de quimioterapia. El resultado se comparará con los BM de referencia Ca-125 y HE4, para valorar el verdadero beneficio que aportarían en la práctica clínica.

### **Objetivos Secundarios**

1. Determinar el valor predictivo de respuesta de los nuevos BM en el CEO avanzado.

Para analizar este objetivo, se determinará el valor que presentan los BM respecto a la respuesta tumoral de la paciente en tres aspectos:

- Respuesta tumoral tras finalizar todo el tratamiento de quimioterapia y cirugía planificado.
- Respuesta tumoral tras completar el tratamiento con quimioterapia neoadyuvante previo a cirugía de intervalo.
- Resultado de la cirugía peritoneal.

El resultado se comparará con los BM de referencia Ca-125 y HE4, para valorar el verdadero beneficio que aportarían en la práctica clínica.

2. Determinar la influencia que tienen las características clínicas de las pacientes en el valor de los BM.

Se analizarán cuales son las características del tumor y de las pacientes que determinan un valor diferente de los BM.

3. Determinar la influencia que tienen los tratamientos en el valor de los BM.

Vamos a estudiar como los tratamientos aplicados influyen y modifican el valor de los BM, para valorar su papel en la monitorización de la terapia. Para ello, se han establecido determinaciones seriadas durante el tratamiento. No se han evaluado CTC.

4. Estudio comparativo de los nuevos BM en la muestra pacientes respecto a un grupo control de tumores ováricos benignos y grupo de sujetos sanos.

Se valorará en qué medida los BM muestran diferencias en el grupo de pacientes, respecto a un grupo control de tumores ováricos benignos y un grupo control de sujetos sanos. Se determinará la capacidad de cada BM para discriminar entre pacientes y sujetos sin CEO, junto con su sensibilidad y especificidad.

5. Determinar la relación existente entre los diferentes BM analizados.

Se realizará análisis de correlación de variables para determinar si la variación en los valores de los BM en las pacientes sigue algún patrón o dinámica común.

6. Estudio descriptivo de las variables clínicas de nuestra serie y análisis de su valor predictivo y pronóstico.

Vamos a realizar un análisis descriptivo de las diferentes variables clínicas para conocer las características de nuestra serie y hemos estudiado su valor predictivo y pronóstico, para integrarlas en un análisis multivariante final y valorar su influencia en los BM planteados.



## 4. Material y métodos

---



#### 4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.

Estudio observacional prospectivo longitudinal no aleatorizado multicéntrico para determinación del valor predictivo y pronóstico de dos nuevos biomarcadores (BM) plasmáticos en el carcinoma epitelial de ovario, trompa de Falopio y peritoneal primario, en estadio avanzado de presentación (estadios II-B al IV) o recaída sensible. Los nuevos BM han sido células tumorales circulantes (CTC) y ADN libre circulante plasmático (cfDNA).

En el presente trabajo, no ha habido ningún tratamiento experimental a estudio. Las pacientes fueron valoradas por un comité de tumores ginecológicos y carcinomatosis y tratadas según las guías clínicas.

Se ha realizado determinación basal de los nuevos BM antes del inicio del tratamiento y determinaciones seriadas durante el mismo, para valorar su papel en la monitorización de la terapia. Los valores se han comparado con los BM de referencia Ca-125 y HE4. El estudio incluye un grupo control de 15 pacientes con tumores ováricos benignos y 15 sujetos sanos.

La medición de cfDNA se ha realizado mediante las secuencias Alu-115 y Alu-247, estableciendo 3 valores a estudiar: cfDNA115 se ha determinado por el valor de la secuencia Alu-115, cfDNA247 por el valor de la secuencia Alu-247 y la integridad de cfDNA ha sido definida por el cociente de cfDNA247/cfDNA115<sup>328</sup>. El estudio de cfDNA se ha realizado en 1 ml de plasma mediante PCR cuantitativa (qPCR).

Las CTC se han analizado mediante el método *CellSearch*<sup>®</sup>. Se ha considerado un resultado positivo de CTC cualquier presencia confirmada de CTC en la muestra sanguínea (mayor o igual a 1 CTC/7.5 mL de sangre periférica).

Se ha estimado un tamaño muestral total de 90 pacientes, a razón de 30 pacientes por año durante un periodo de 3 años. Los estudios estadísticos se han llevado a cabo con el software SPSS v. 20.0.

El estudio ha sido valorado por el Comité de ética del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca emitiendo dictamen favorable el 27 de mayo de 2013 (anexo VI).

#### 4.2. POBLACIÓN A ESTUDIO.

Se han incluido pacientes con diagnóstico actual de carcinoma epitelial de ovario, trompa de Falopio y peritoneal primario, en estadio avanzado de presentación (estadio IIB-IV) o recaída sensible que inician tratamiento con quimioterapia.

#### CRITERIOS DE INCLUSION

1. Diagnóstico actual de carcinoma epitelial de ovario, trompa de Falopio y peritoneal primario, confirmado y documentado histológica o citológicamente, en estadio avanzado de presentación (IIB-IV).

Dado que la estadificación es quirúrgica, se ha supuesto que presentaban estadio avanzado al diagnóstico en estas dos situaciones:

- Hallazgos en pruebas diagnósticas de imagen de una estadificación compatible con IIB o superior. Se ha admitido diagnóstico por imagen mediante ecografía vaginal, tomografía computerizada (TC), resonancia magnética (RM) o PET/TC. La clasificación TNM y FIGO del CEO se exponen en el anexo I.
  - Hallazgos de tumoración ovárica sugestiva de origen neoplásico con estadificación por imagen inferior a IIB pero que con un valor de Ca-125 superior a 350.
2. Carcinoma epitelial de ovario, trompa de Falopio y peritoneal primario, en recaída tumoral sensible a quimioterapia basada en platino.
- Se ha considerado recaída sensible aquella que ocurre tras respuesta a un esquema de quimioterapia basado en platino y que presentan recaída tumoral o progresión tras 6 meses de intervalo libre de tratamiento. Se ha admitido el diagnóstico de recaída a través de confirmación histológica por citología o biopsia, o a falta de estudio patológico, por pruebas de imagen y clínica compatible o aumento de Ca-125 (anexo IV).
3. Se han admitido de forma provisional pacientes sin confirmación histológica, en aquellas situaciones en donde se indicó cirugía primaria aún sin estudio patológico, debido a una alta sospecha de CEO por la presentación clínica, analítica y radiológica. En estos casos, para la inclusión de la paciente en el estudio, se revisaron de forma exhaustiva que cumplieran el resto de criterios establecidos. Se admitió este punto para obtener las muestras sanguíneas antes de la cirugía. Para el análisis de resultados solo se han incluido aquellas en donde se confirmó el CEO en el estudio patológico.
4. El paciente debe ser candidato y aceptar tratamiento con quimioterapia.
5. Otorgar el consentimiento informado para participar en el estudio.
6. Mujeres mayores o igual a 18 años de edad.
7. No precisa lesión diana para criterios RECIST.
8. No se determinan límites en los valores de laboratorio necesarios para participar en el estudio dado que no hay medicación a estudio.

#### **CRITERIOS DE EXCLUSION**

1. Tumores no epiteliales de ovario o epiteliales de bajo potencial maligno.
2. Carcinoma de ovario, trompas de Falopio o peritoneal primario, en estadio menor de estadio IIB y que presenten un valor de Ca-125 menor o igual a 350.
3. Paciente en tratamiento actual con quimioterapia para CEO o con recaída platino-resistente.
4. Paciente que no desea recibir o no sea candidata a tratamiento oncológico con quimioterapia.

5. Paciente diagnosticado de otra patología neoplásica de relevancia pronóstica en los dos años anteriores. Se exceptúan el carcinoma *in situ* de cérvix o mama, y carcinoma basocelular o escamoso de piel.
6. Patología no neoplásica con pronóstico vital inferior a 1 año.
7. Incapacidad para cooperar y realizar el protocolo del estudio.

Se han incluido en el presente trabajo 2 grupos controles. Por una parte, un grupo de pacientes con tumores benignos. Se han seleccionado entre las pacientes con patología ovárica sugestiva de benignidad que se programaban para cirugía ginecológica por parte del servicio de ginecología. Tras ser informada de las condiciones del estudio, la paciente ha firmado los dos consentimientos informados (anexos VII y VIII) y se ha realizado extracción sanguínea antes de la intervención, junto a analítica solicitada por indicación médica, para evitar una nueva venopunción a la paciente.

Por otro lado, se ha incluido un grupo de mujeres sanas voluntarias, seleccionados entre familiares y compañeras del centro hospitalario, atendiendo a criterio de edad para hacer la muestra similar al grupo de pacientes. Igual que con el grupo de tumores benignos, tras ser informada de las condiciones del estudio, la paciente ha firmado los dos consentimientos informados (anexos VII y VIII) y se ha realizado extracción sanguínea antes de la intervención. Esta analítica ha sido solicitada expresamente para el presente trabajo, suponiendo una venopunción a la paciente.

En ambos grupos de controles se descartaron aquellas mujeres que presentaban en el momento de la inclusión cualquier proceso agudo que supusiera un aumento de la destrucción celular, tales como un proceso infeccioso o inflamatorio agudo, traumatismo o intervención quirúrgica reciente.

### 4.3. DURACIÓN Y CENTROS DE REALIZACIÓN.

El estudio se planificó para inclusión de pacientes durante un periodo de 3 años, desde noviembre de 2013 hasta octubre de 2016. Se realizará seguimiento posterior de las pacientes incluidas hasta fallecimiento o un periodo mínimo de 5 años.

El estudio se centraliza en el servicio de oncología médica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Desde marzo de 2016 se incorpora en el estudio el servicio de oncología médica del Hospital Universitario Santa Lucia de Cartagena.

### 4.4. VARIABLES DEL ESTUDIO.

#### **VARIABLE PRINCIPAL:**

Para analizar el valor pronóstico de los nuevos BM propuestos que supone nuestro objetivo principal, se han establecido dos variables principales:

- Supervivencia libre de progresión (SLP). Se define como el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento hasta la progresión tumoral o muerte por cualquier causa. Se han censurado aquellas pacientes con pérdida de seguimiento.

Se define progresión tumoral según los criterios del GCIg 2011 (anexo IV).

- Supervivencia global (SG). Se define como el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento hasta el fallecimiento por cualquier causa.

El estudio del valor pronóstico se ha realizado sobre el valor basal de los nuevos BM antes del inicio de tratamiento y sobre la variación entre el valor basal y tras el primer ciclo de quimioterapia en los casos de recibir QT neoadyuvante.

#### VARIABLES SECUNDARIAS:

- Respuesta tumoral tras finalizar el tratamiento.

Hace referencia a la respuesta tras finalizar todo el tratamiento previsto, incluyendo cirugía y quimioterapia. Se considera “*respuesta tumoral*” cuando el paciente haya presentado respuesta completa (RC) o parcial (RP), y “*no respuesta*” cuando presente enfermedad estable (EE) o progresión de enfermedad durante el tratamiento (PE). Se ha establecido la respuesta tumoral según los criterios RECIST 1.1 (anexo III).

- Respuesta a quimioterapia neoadyuvante (QTNA).

Hace referencia a la respuesta tras finalizar el tratamiento con QTNA previsto antes de la cirugía de intervalo (CDI). Al igual que en el punto anterior, se considera *respuesta tumoral* cuando el paciente haya presentado respuesta completa (RC) o parcial (RP), y *no respuesta* cuando presente enfermedad estable (EE) o progresión de enfermedad durante el tratamiento (PE). Se ha establecido la respuesta tumoral según los criterios RECIST 1.1 (anexo III).

- Resultado de cirugía peritoneal.

Hace referencia al resultado del procedimiento quirúrgico. Se considera cirugía cito-reductora óptima a aquella que consigue cito-reducción tumoral completa sin residuo tumoral macroscópico (cirugía R0). Se considera cirugía sub-óptima a aquella con residuo tumoral menor o mayor a 1 cm (cirugía R1 y R2 respectivamente).

- Edad. Se ha analizado como variable continua y como intervalo menor/igual a 65 años y mayor de 65 años.
- Estado general ECOG (anexo II).
- Índice de masa corporal (IMC). Se determina por la fórmula peso en kilogramos dividida por la talla en metros al cuadrado. Se analizará su valor continuo y estratificado por obesidad (IMC mayor o igual a 25).
- Sensibilidad a platino. Se considera paciente sensible a platino a aquel que presenta respuesta tumoral (RC o RP) y no presenta recaída tumoral en los 6

meses siguientes a la finalización de un esquema de quimioterapia basado en platino. Se considera paciente resistente a platino a aquel que presenta progresión durante el tratamiento, estabilización de enfermedad tras finalizar el mismo o a aquel que tras haber alcanzado respuesta, presenta recaída tumoral antes de 6 meses de finalizar un esquema de quimioterapia basado en platino.

- Origen del tumor. Se divide el origen del tumor en dos categorías: enfermedad primaria cuando sin presentar antecedentes de neoplasia ovárica presenta diagnóstico actual de CEO, y recaída tumoral cuando se trata de una paciente tratada anteriormente de un CEO y que presenta actualmente recaída tumoral después de 6 meses de finalizar el tratamiento anterior.
- Estadío tumoral (ver anexo I).
- Histología tumoral. Según se expuso anteriormente en el apartado “Anatomía Patológica” de la introducción.
- Tipo histológico I o II de Kurman según se expuso previamente en el apartado patogenia y carcinomatosis de la introducción<sup>59</sup>.
- Grado histológico. Se establecen 3 grados histológicos: grado 1, también llamado de bajo grado o bien diferenciado; grado 2, también llamado de moderado grado o moderadamente diferenciado; y grado 3, alto grado o indiferenciado.
- Presentación radiológica de adenopatías ilíacas o para-aórticas. Se consideran patológicas aquellas adenopatías con eje menor que sea mayor de 1,5 cm según los criterios RECIST 1.1 (ver anexo III).
- Tamaño de la tumoración ovárica.
- Tamaño de los implantes peritoneales.
- Presencia de ascitis. Se estratifica la presencia de ascitis por TC como ascitis ausente o leve, cuando no hay presencia de ascitis o esta es leve, y ascitis severa, cuando la presencia de ascitis es notoria.
- Presencia de *omental cake*. Término radiológico característico que determina un engrosamiento patológico del mesenterio en la imagen TC. Se codifica en presente o ausente.
- Plan de tratamiento previsto. Se han comparado los pacientes en donde se indica cirugía peritoneal primaria y en los que se indica quimioterapia neoadyuvante y cirugía de intervalo.
- Tipo de cirugía realizada. Se han comparado entre los pacientes que finalmente se han realizado cirugía primaria y cirugía de intervalo.
- Índice de carcinomatosis peritoneal de Sugarbaker (PCI). Valoración quirúrgica de la extensión de carcinomatosis peritoneal mediante una puntuación entre 0 y 3 de 13 regiones en las que se puede valorar la cavidad abdominal. La puntuación hace referencia al volumen del implante tumoral en cada región, correspondiendo 0 a cuando no está afecto, 1 cuando el implante tiene un diámetro menor a 2,5 cm, 2 cuando el diámetro tiene 2,5 – 5 cm, y 3 cuando el diámetro del implante es mayor

de 5 cm o existen implantes confluentes. La suma de todas las puntuaciones de cada región es el valor de PCI, variando entre 1 y 39 (ver anexo V). No hay un punto de corte establecido, variando según las publicaciones. En el presente trabajo hemos analizado los resultados en función del valor de PCI 12<sup>351</sup>.

- Presencia de ganglios linfáticos afectos en el estudio patológico de la linfadenectomía. Se codifica como afectos y no afectos.
- Organos metastásicos afectos en el estadio IV.
- Resección digestiva o visceral en el acto quirúrgico.
- Aplicación de la técnica quirúrgica HIPEC.
- Realización de linfadenectomía.
- Nº de ciclos aplicados de QT neoadyuvante, adyuvante y total.
- Tipo de QT aplicada.
- Valores de niveles sanguíneos de albúmina, lactato deshidrogenasa (LDH), hemoglobina (Hb), polimorfo-neutrófilos (PMN) y plaquetas.

## 4.5. METODOLOGÍA

### 4.5.1. PLAN DE TRABAJO

Durante el presente trabajo se han realizado los siguientes pasos en cada paciente:

#### **Paso 1. Elegibilidad de la paciente**

- Todas las pacientes han sido valoradas por el comité de tumores ginecológicos y carcinomatosis de cada centro hospitalario participante en el estudio.
- Se ha comprobado que la paciente cumplía los criterios de inclusión y no los de exclusión.
- La paciente debía firmar dos consentimientos informados: el consentimiento de BioBanc-Mur de procesamiento de muestras biológicas (ver anexo VII) y el consentimiento de participación en el presente estudio (ver anexo VIII).

#### **Paso 2. Recogida de muestras sanguíneas basales.**

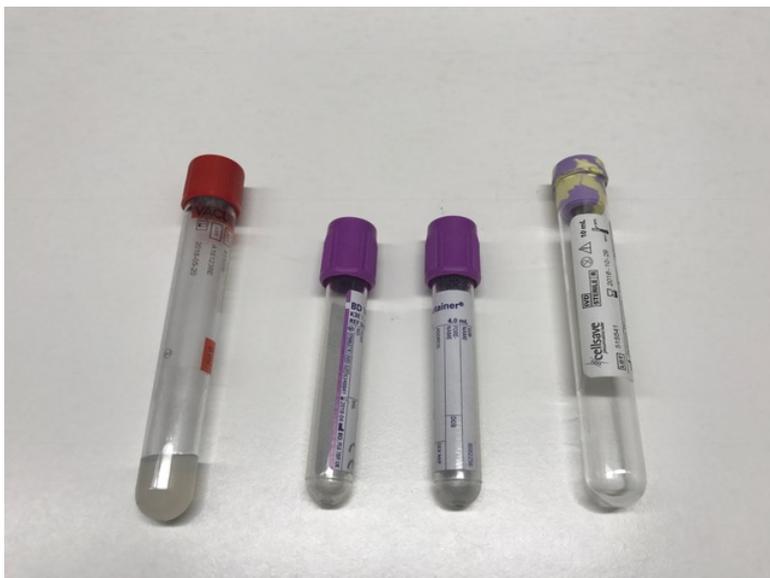
Se han recogido muestras sanguíneas antes del inicio de cualquier tratamiento oncológico. Todas las muestras para el estudio fueron obtenidas mediante punción venosa antecubital y tras 12 h de ayuno y un periodo de reposo de 20 minutos. La extracción se llevó a cabo por personal de enfermería cualificado y realizada en el mismo acto de extracción de la analítica sanguínea indicada por práctica habitual, para que no supusiera ninguna venopunción añadida a la paciente. Se ha realizado en los 7 días previos al inicio del tratamiento.

La determinación basal ha incluido (figura 4.1):

- Tubo de hemograma para determinación de Hb, PMN y plaquetas.

- Tubo seco para estudio bioquímico de albúmina, LDH, Ca-125 y HE4.
- Tubo de EDTA de 5 ml para procesamiento y estudio de cfDNA.
- Tubo *Cellsave*<sup>®</sup> (*Janssen Diagnostics*, LLC, Raritan, NJ, USA) de 10 ml para estudio de CTC.

**FIGURA 4.1. Tubos de extracción sanguínea.**



La muestra sanguínea de bioquímica y hemograma se ha procesado siguiendo el circuito habitual del hospital. La muestra de EDTA para estudio de cfDNA se ha procesado antes de 4 horas tras la extracción en la unidad de BioBanc-Mur (Nodo 1) de nuestro centro (Biobanco en red de Investigación Biosanitaria de la Región de Murcia, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB)). Las muestras se han almacenado en ultracongelación a -80° y nitrógeno vapor.

La enumeración de CTC se ha realizado usando el sistema *CellSearch*<sup>®</sup> dentro de las primeras 48 horas tras su extracción, en la Unidad de Citometría e Inmunología Tumoral, del Servicio de Inmunología del hospital.

### **Paso 3. Inicio de tratamiento oncológico y establecimiento de las recogidas seriadas de BM.**

Con cada paciente, tras ser valorada en comité de tumores, se ha establecido un plan de tratamiento específico, pudiendo ser cirugía peritoneal primaria (CPP) y quimioterapia adyuvante (QTA), quimioterapia neoadyuvante (QTNA) y cirugía de intervalo (CDI) o, en algunos casos, solo se ha indicado quimioterapia (QT) paliativa, sin cirugía.

En función el planteamiento terapéutico de la paciente se ha establecido un plan específico de recogidas seriadas de BM (ver tabla 4.1-3). Como se comentó anteriormente, todas las extracciones se han realizado en el mismo acto de extracción de la analítica sanguínea indicada por práctica habitual, para que no supusiera una venopunción añadida.

**TABLA 4.1. Determinaciones sanguíneas en grupo 1º (CPP y QTA).**

Determinación	BASAL Antes de cirugía		Tras cirugía, en 1º ciclo QTA	En 2º ciclo QTA
Analítica <sup>1</sup>	X	C I R U G I A	X	X
BioBanco (tubo EDTA)	X		X	X
CTC (tubo propio)	X			

**TABLA 4.2. Determinaciones sanguíneas en grupo 2º (QTNA y CDI).**

Determinación	BASAL En 1º ciclo de QTNA		En 2º ciclo QTNA	Antes de cirugía		Un mes tras cirugía
Analítica <sup>1</sup>	X	1º ciclo QTNA	X	X	C I R U G I A	X
BioBanco (tubo EDTA)	X		X	X		X
CTC (tubo propio)	X					

**TABLA 4.3. Determinaciones sanguíneas en grupo 3º (QT paliativa, sin cirugía prevista).**

Determinación	BASAL En 1er ciclo de QT	En 2º ciclo QT
Analítica <sup>1</sup>	X	X
BioBanco (tubo EDTA)	X	X
CTC (tubo propio)	X	

<sup>1</sup> ANALITICA: tubo seco para determinación de Ca-125 y HE4. En el momento basal se ha determinado también albúmina, LDH y CEA, y se ha extraído un tubo de EDTA para hemograma para valoración de Hb, PMN y plaquetas.

**Paso 4. Análisis de las muestras almacenadas para estudio del cfDNA.**

Una vez finalizada la inclusión de pacientes, se ha procedido al análisis de los niveles de cfDNA de las muestras almacenadas en biobanco, siguiendo la metodología expuesta más adelante.

**Paso 6. Recogida de datos clínicos, analíticos y evolutivos.**

Se han recogido los datos planteados en el presente trabajo para su manejo estadístico y elaboración de resultados, discusión y conclusiones.

#### 4.5.2. TRATAMIENTO DE LAS PACIENTES.

El tratamiento de las pacientes se ha realizado según práctica habitual. El esquema de quimioterapia habitual de inicio en el CEO suele ser el esquema formado por la combinación de paclitaxel a dosis de 175 mg/m<sup>2</sup> y de carboplatino con 5-6 AUC cada 21 días. Las pacientes en tratamiento con QTA suelen recibir 6 ciclos de QT tras la CPP. Las pacientes en tratamiento con QTNA suelen recibir 4 ciclos de QT antes de la CDI, y 2 ciclos después, para completar un total de 6-8 ciclos. En función de la tolerancia clínica se puede modificar dosis y esquema según recomendaciones establecidas en las guías. En pacientes con estadio III y resección una opción terapéutica es el uso de quimioterapia intraperitoneal.

En las pacientes con recaída tumoral se suele indicar quimioterapia de combinación basada en carboplatino.

La cirugía peritoneal se ha realizado siguiendo las guías establecidas. En el HCUVA la cirugía se realiza en colaboración del equipo de ginecología oncológica y cirugía peritoneal. En los casos de estadio III con resección óptima suele aplicarse la técnica HIPEC según protocolo: se usa citostático paclitaxel a dosis de 60 mg/m<sup>2</sup> o cisplatino 75 mg/m<sup>2</sup>, en función de las características de las pacientes, diluido para su perfusión en 3.000 cc de líquido para diálisis (*Dialisan*®), manteniéndose en el circuito de perfusión un flujo constante de 0,5 – 0,7 litros/minuto durante 60 minutos, con una temperatura constante de 42-43º.

En las pacientes que reciben QTNA y no presenten progresión de enfermedad, se suele indicar CDI tras el 4º ciclo de QT.

Tras finalizar tratamiento, se realiza seguimiento de las pacientes según protocolo de cada hospital.

#### 4.5.3. VALORACIÓN DE RESPUESTA

En las pacientes que reciben QTNA y QT paliativa, la valoración de respuesta tumoral se realiza mediante prueba de imagen (TC o PET/TC) tras el tercer ciclo de quimioterapia. Los pacientes en donde se indica CPP y QTA se realiza TC tras la cirugía y tras finalizar QTA. Posteriormente se realiza seguimiento de las pacientes según protocolo de cada centro hospitalario.

#### 4.5.4. METODOLOGÍA DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y DE HEMOGRAMA.

Se han analizado los siguientes parámetros, indicando los valores de normalidad de nuestro centro:

- Hemograma: Hb en gr/dL (VN 12 – 16), PMN en cel/mcL (VN 2.000-4.000) y plaquetas en 10<sup>3</sup>/mcL (VN 150 – 350).
- Bioquímica (suero): albúmina en gr/dL (VN 3,5 – 5,5), LDH en U/L (VN 135 – 214), Ca 125 en U/mL (VN ≤ 35) y HE4 en pmol/L (VN 10-60 en premenopáusicas y 10-80 en post-menopáusicas).

Se ha procedido de la siguiente forma:

### **Paso 1. Recogida de las muestras.**

Todas las muestras para el estudio fueron obtenidas mediante punción venosa antecubital y tras 12 h de ayuno y un periodo de reposo de 20 minutos. La extracción se llevó a cabo por personal de enfermería cualificado.

La sangre se recogió en tubos de vacío vacutainer (Becton Dickinson and company, Nueva Jersey, E.E.U.U.) con diferentes aditivos. Se obtuvieron muestras de suero (tubo seco con silicona) y sangre total (tubo con ácido etilendiaminotretacético tripotásico, EDTA K<sub>3</sub>).

La muestra de sangre total previa agitación se utilizó para realizar el hemograma. La muestra de suero tras la retracción del coágulo de fibrina, fue centrifugada a 3500 revoluciones por minuto durante 20 minutos en una centrifuga Kubota 5900 (Kubota Corporation, Osaka, Japón) a 4°C.

### **Paso 2. Procesamiento analítico de las muestras.**

El procesamiento analítico de las muestras se realizó íntegramente en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca y en el Hospital Universitario Santa Lucia de Cartagena.

Los servicios de análisis clínicos y hematología están acreditados por ENAC según la norma UNE-EN-ISO 15189 (nº579/LE1193).

#### *Hemograma*

El tubo de EDTA para la realización del hemograma, se analizó en el equipo Sysmex XE5000 (Roche Diagnostic®). Este autoanalizador utiliza las tecnologías de citometría de flujo fluorescente y enfoque hidrodinámico. En el procesamiento de las muestras se han seguido las recomendaciones del fabricante.

#### *Bioquímica*

Para el análisis bioquímico se utilizaron tres analizadores automatizados, el Cobas 8000 (Roche Diagnostic®), el BN ProSpec (Siemens Healthcare Diagnostics®) y el Advia Centauro CP (Siemens Healthcare Diagnostics®).

#### *Marcador sérico Ca-125*

Se ha determinado el valor sérico de Ca-125 mediante el analizador Cobas 8000 (Roche Diagnostic®) según procedimiento habitual.

Para su análisis se ha utilizado el test *Elecsys Ca-125 II*®, que es un test inmunológico in vitro para la determinación cuantitativa en suero y plasma humanos de los determinantes reactivos del anticuerpo OC 125 en suero y plasma humanos. Emplea un anticuerpo monoclonal OC-125 obtenido de linfocitos de ratón inmunizado con línea celular de carcinoma

de ovario OVCA-433. El test consiste en una técnica de ELISA tipo sándwich con una duración total de 18 minutos y consistente en los siguientes pasos:

- 1a incubación: 20  $\mu$ L de suero se incuban con un anticuerpo biotinilado monoclonal anti-CA 125 y un anticuerpo monoclonal anti-CA 125 marcado con quelato de rutenioa, para formar un complejo sándwich.
- 2a incubación: Después de incorporar las micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina.
- La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con el reactivo ProCell/ProCell M. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide con un fotomultiplicador.
- Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración a 2 puntos y una curva master incluida en el código de barras del reactivo.

Para el control de calidad se usa el PreciControl Tumor Marker.

El analizador calcula automáticamente la concentración de analito de cada muestra en UI/mL. Valor de normalidad  $\leq 35$  UI/mL (percentil 95).

#### *Marcador sérico HE4*

Se ha determinación el valor sérico de HE4 mediante el analizador Cobas 8000 (Roche Diagnostic®) según procedimiento habitual.

Para su análisis se emplea el test *Elecsys HE4*®, que es un test inmunológico para la determinación cuantitativa de la HE4 en suero y plasma humanos. Consiste en una técnica de ELISA tipo sándwich con una duración total del test de 18 minutos:

- 1.a incubación: 6  $\mu$ L de suero se incuban con un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-HE4 y un anticuerpo monoclonal anti-HE4 marcado con quelato de rutenioa para formar un complejo sándwich.
- 2a incubación: Después de incorporar las micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina.
- La mezcla de reacción es trasladada a la célula de medida donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con ProCell II M. Al aplicar una corriente eléctrica controlada se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide con un fotomultiplicador.
- Los resultados se determinan mediante una curva de calibración generada específicamente para el instrumento a partir de una calibración a 2 puntos y una curva master suministrada a través de cobas link.

Para el control de calidad se usa el PreciControl HE4.

El analizador calcula automáticamente la concentración de analito de cada muestra en pmol/L. Valor de normalidad  $\leq 80$  pmol/L en mujeres post-menopáusicas y de  $\leq 60$  pmol/L en mujeres pre-menopáusicas.

#### 4.5.5. METODOLOGÍA DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE CTC.

##### Paso 1. Recogida de las muestras.

La enumeración de CTC en sangre periférica se ha realizado usando la tecnología *CellSearch (Veridex)*<sup>®</sup> a través del analizador *CellTracks Analyzer II*<sup>®</sup> (figura 4.2). La muestra sanguínea se ha recogido en tubos específicos *Cellsave*<sup>®</sup> (*Janssen Diagnostics, LLC, Raritan, NJ, USA*), precisando un mínimo de 7,5 mL de sangre periférica, y procesándose en las primeras 48 horas desde la extracción (las muestras se pueden mantener a temperatura ambiente durante 72 horas sin alterar sus resultados). La extracción de esta muestra se realizó en último lugar, para evitar contaminación por células epiteliales y endoteliales arrastradas en la venopunción, e inmediatamente se mezclaron por inversión suave (6 veces) con el preservante contenido en el tubo de extracción.

FIGURA 4.2. Analizador *CellTracks Analyzer II*<sup>®</sup>.



##### Paso 2. Procesamiento analítico de las muestras.

El procesamiento analítico de las muestras se realizó íntegramente en la Unidad de Citometría e Inmunología Tumoral, del Servicio de Inmunología del hospital. El servicio de Inmunología está acreditado por la *European Federation of Immunogenetics (EFI)* para la realización de estudios serológicos, celulares y moleculares (EFI 09-ES-009.991).

La detección de CTC se realizó íntegramente con el sistema *CellSearch*, consistente en un proceso semiautomatizado que se desarrolla en varias etapas:

1. El primer paso es mezclar 7,5 ml de sangre periférica de la paciente con 6 ml de tampón y se centrifuga a 800g/10 minutos. Después se aspira el plasma y la capa blanca por el instrumento.
2. Después se deben aislar las posibles CTC de entre todas las células presentes en la sangre. Se realiza mediante enriquecimiento inmunomagnético basándose en la expresión del antígeno epitelial de superficie *EpCAM*. El kit CTC de *CellSearch* incorpora anticuerpos acoplados a un ferrofluido que se dirige a una molécula de superficie de las células epiteliales llamada *EpCAM*, con el objetivo de seleccionar las células epiteliales presentes en la sangre y descartar las no epiteliales. Tras un periodo de incubación, se realiza, a través de un campo magnético, el aislamiento de estas células captadas por las partículas férricas unidas al anticuerpo de *EpCAM*. Se obtiene así una muestra enriquecida de células epiteliales candidatas a CTC.
3. Posteriormente, se deben identificar las verdaderas CTC dentro de todas las células epiteliales aisladas. Para ello se añade una mezcla de 3 anticuerpos conjugados con un fluorocromo. Incorpora dos anticuerpos que se unen a las citoqueratinas 8, 18 y 19, un anticuerpo para CD45 y una tinción nuclear 4, 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para marcar fluorescentemente las células con núcleo. Después de la incubación en el sistema, se repite la separación magnética
4. En la etapa final, las células son suspendidas en un dispositivo de presentación de células, que consta de una cámara y dos imanes.
5. Las muestras son leídas en el microscopio robotizado y mostradas en el monitor para interpretación facultativa visual, para informar como células CTC aquellas que cumplan criterios de morfología compatible con CTC, positividad para citoqueratinas y DAPI, y negatividad para CD45, así como una morfología compatible con CTC (tamaño y forma celular y disposición del núcleo).

El facultativo de Inmunología al cargo de la interpretación de los resultados acumula años de experiencia y participa en los programas de formación semestrales que proporciona el fabricante de los reactivos para la correcta interpretación de los resultados. Además, en aquellos casos dudosos se remitieron las imágenes a un evaluador externo para una doble lectura (Dr. José Vidal, Hospital Doctor Peset, Valencia).

#### **4.5.6. METODOLOGÍA DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE cfDNA.**

Para el estudio de cfDNA se ha procedido a la extracción de una muestra sanguínea de 5 ml en un tubo con ácido etilendiaminotretácico tripotásico, EDTA K<sub>3</sub>. La muestra se trasladó a las instalaciones de Biobanco para su procesamiento y almacenamiento antes de las 4 horas siguientes a su extracción. Tras finalizar el periodo de inclusión en el estudio, se ha procedido al análisis simultáneo de todas las muestras por parte de la plataforma de genómica del IMIB.

### **Paso 1. Registro, procesamiento y almacenamiento en Biobanco de muestras biológicas humanas.**

El Biobanco de la Región de Murcia es una de las plataformas de servicio del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca y es un biobanco autorizado según la legislación vigente. Está inscrito en el Registro Nacional de Biobancos con referencia B.0000859 y forma parte de la Plataforma Nacional red de Biobancos del ISCII con número de expediente PT13/0010/0018.

En este biobanco se han gestionado las muestras sanguíneas para estudio de cfDNA de las pacientes reclutadas en el estudio. Todas las pacientes cuyas muestras son gestionadas por el biobanco han firmado un consentimiento informado específico de Biobanco que permita el uso de estas en cualquier proyecto de investigación biomédica aprobados por un comité de ética (anexo VII).

Cuando las muestras son recibidas en el biobanco, se registran en el sistema informático propio de esta plataforma, donde quedan registrados todos los datos relacionados con la donación y con las muestras asociadas de manera codificada, manteniendo la trazabilidad de las muestras en todo momento.

La muestra de sangre EDTA se centrifuga a 1500 rpm durante 15 minutos. El plasma y la capa blanca así obtenidos se alicotan en tubos con codificación QR de 750  $\mu$ l con un volumen final de muestra de 500  $\mu$ l y se almacenan a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Todos los ultracongeladores y tanques de nitrógeno del biobanco se encuentran monitorizados para asegurar el mantenimiento de la cadena de frío.

### **Paso 2. Procesamiento y análisis de cfDNA.**

En una primera fase del proyecto se ha extraído y cuantificado el ADN libre circulante (cfDNA) procedente de las muestras de pacientes de cáncer de ovario y grupo control. Se ha analizado aproximadamente 1 ml de los plasmas procedentes del Biobanco.

Para la extracción de cfDNA se ha utilizado el kit "Qiamp Circulating Nucleic Acid" (Qiagen) según las recomendaciones del fabricante. El volumen final de elución ha sido de 100  $\mu$ L.

La cuantificación del cfDNA se ha determinado mediante PCR en Tiempo Real utilizando el fluorocromo SYBR Green (Takara). Las secuencias Alu (muy abundantes en el genoma humano) se pueden utilizar para la cuantificación sensible del cfDNA. Se amplifican dos amplicones de diferentes tamaños: amplicones cortos (Alu115 de 115 pb) y largos (Alu247 de 247 pb) a partir de repeticiones genómicas de Alu.

Como el cfDNA presenta una estrecha distribución de tamaño alrededor de 165 pb, los resultados Alu115-qPCR detectan con precisión la cantidad total de cfDNA y de ADN genómico de alto peso molecular. Mientras que los resultados Alu247-qPCR indican sólo la presencia de ADN genómico contaminante de alto peso molecular. Por lo tanto, la relación Alu247 / Alu115 indica el Índice de Integridad de ADN de la muestra. Se espera que el ADN de alta calidad tenga un Índice de Integridad de ADN de 1,0, mientras que el ADN de menor calidad tendrá una puntuación entre 1,0 y 0.

Basándose en los resultados de Hao et al<sup>352</sup>, los valores esperados de Integridad del ADN son los expuestos en la tabla 4.4.

**Tabla 4.4. Valores esperados de integridad del ADN**

Muestra	Mediana de los valores de integridad del ADN
cfDNA normal	0,38 (0,29-0,49)
cfDNA en cáncer de colon primario	0,62 (0,51-0,65)
ADN genómico	1,0

La reacción de amplificación para cada muestra se ha realizado por duplicado en un equipo LightCycler 480 (Roche) en las condiciones expuestas en la tabla 4.5.

**TABLA 4.5. Condiciones de reacción en el equipo LightCycler 480 (Roche).**

Reactivo	Volumen
SYBR Green Mix (Takara)	2.5 µl
Primers Alu115 o Alu247	0.4 µl
ADN	1µl
Agua	1.1 µl
Final	5 µl
<b>PRIMERS</b>	
<b>Alu115</b>	Forward: 5'- CCTGAGGTCAGGAGTTCGAG-3' Reverse: 5'-CCCAGTAGCTGGGATTACA-3'
<b>Alu247</b>	Forward: 5'-GTGGCTCACGCCTGTAATC-3' Reverse: 5'-CAGGCTGGAGTGCAGTGG-3'
<b>Programa</b>	
<b>Amplificación:</b>	95°C – 30 seg 95°C – 5 seg 62°C – 30 seg 40 ciclos
<b>Acquisition mode:</b>	single
<b>Read SYBR Green</b>	
<b>Melting curve:</b>	95°C - 5 seg 60°C – 1 min 95°C - acquisition mode continuous (5 acquisitions per °C)

Se aplica el análisis de la curva de disociación (melting curve) para comprobar la amplificación específica de los fragmentos Alu 115 y Alu247.

Para determinar la cantidad de ADN de cada muestra, hay que generar una curva estándar para cada pareja de primers, y a partir de los valores Ct de una dilución seriada de una muestra de concentración conocida (11 ng, 1,1 ng, 0,11 ng, 0,011 ng, 0,0011 ng) determinar la intersección (YIntercept) y la pendiente (Slope) de la curva (figura 4.3 y 4.4).

FIGURA 4.3. Curva estándar Alu115.

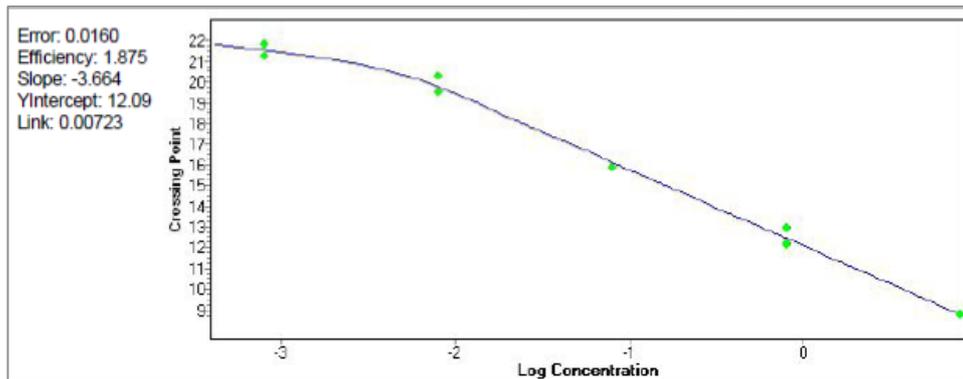
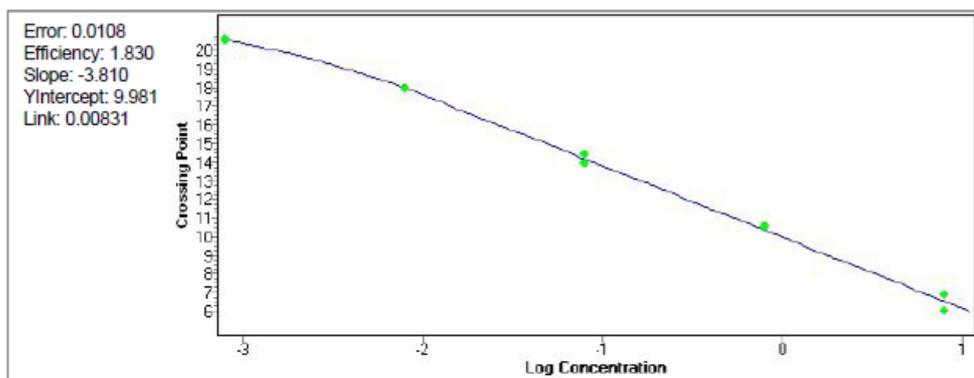


FIGURA 4.4. Curva estándar Alu247.



La fórmula para determinar la concentración es:

$$\text{ng} / \mu\text{l} = 10^{(\text{muestra media Ct} - \text{Yintercept}) / \text{pendiente}}$$

La concentración para el amplicón Alu115 se puede usar para determinar la cantidad total de ADN válido. Las concentraciones de ambos amplicones Alu247 y Alu115 determinan el valor de Integridad de ADN:

$$\text{Valor de Integridad de ADN} = (\text{ng} / \mu\text{l de Alu247}) / (\text{ng} / \mu\text{l de Alu115})$$

NOTA: El valor de Integridad de ADN se utiliza como un indicador de la calidad de la muestra y probabilidad de éxito en posteriores ensayos, como puede ser la construcción de librerías en secuenciación masiva. Las recomendaciones específicas sobre la generación de librerías y las métricas de secuenciación son difíciles de definir en términos de un Índice de Integridad de ADN, debido a la diversidad de tipos de muestras y protocolos que se pueden utilizar. No obstante, debe considerarse la complejidad del genoma y la calidad de la muestra para definir la cantidad de cfDNA necesaria para la generación de librerías<sup>352</sup>.

#### 4.5.7. RECOGIDA DE DATOS.

Se han recogido las variables clínicas de las pacientes en un cuaderno de recogida de datos diseñado específicamente para el estudio (anexo IX), codificándose posteriormente en una tabla tipo Excel. Se ha procedido a la depuración de datos para la detección y corrección de posibles errores, con análisis de los valores fuera de rango o no permitidos. Aquellos

valores que no se han podido obtener o no se realizaron se han codificado como valores perdidos. La identificación de las pacientes ha sido anonimizada.

Finalmente, los datos clínicos se han unido a los valores de los biomarcadores en una base de datos conjunta para su análisis. Todos los BM han sido variables de tipo continuo menos el valor de CTC que ha presentado valores discretos.

El cierre de la base de datos se realizó el 15/02/2017.

#### **4.5.8. PLANIFICACION DEL ANALISIS DE DATOS.**

Primero se han analizado las variables clínicas de nuestra serie. Se han realizado los siguientes apartados:

- Estudio descriptivo de las variables clínicas y de tratamiento de la muestra de pacientes, para conocer las características básicas de nuestra serie.
- Comparación de la edad y ciertas variables analíticas entre la muestra pacientes y los dos grupos control. La elección de estas variables analíticas se ha realizado por ser indicadores del estado general (albúmina y Hb) y otros son considerados reactantes de fase aguda y se relacionan con la situación inflamatoria general de la persona (LDH, poli-morfo neutrófilos (PMN) y plaquetas).
- Análisis univariante de las diferentes características clínicas, con el objeto de estudiar su capacidad predictiva y pronóstica y valorar su posible influencia en los BM estudiados (*objetivo secundario 6 de nuestro trabajo*).

Después se ha realizado el análisis específico de los biomarcadores (BM) planteados en este trabajo. Se ha organizado en los siguientes apartados:

- Estudio descriptivo de los niveles basales de los BM en la muestra pacientes.
- Comparación de los valores entre el grupo pacientes y el grupo control (*objetivo secundario 4*). Se han realizado las siguientes comparaciones:
  - Comparación entre grupo pacientes y grupo control.
  - Comparación entre grupo pacientes, grupo tumores benignos y grupo sujetos sanos.
  - Comparación de CTC entre grupo pacientes y grupo control.
  - Análisis de la capacidad diagnóstica, sensibilidad y especificidad para discriminar entre pacientes y grupo control.
- Análisis de como las características clínicas de las pacientes influyen en el valor de los BM (*objetivo secundario 2*). Correlación con las variables analíticas generales.
- Análisis de como los tratamientos influyen en el valor de los BM, para valorar su posible papel en la monitorización de la terapia (*objetivo secundario 3*). No se han evaluado CTC en este punto. Se han comparado tres aspectos:

- Influencia de la cirugía peritoneal primaria (CPP): hemos comparado el valor de los BM antes y después de la intervención. La determinación previa ha correspondido a la extracción basal dentro de los 7 días antes del inicio del tratamiento, y la posterior se ha realizado al mes del acto quirúrgico, al inicio de la QT adyuvante.
  - Influencia del primer ciclo de QT: hemos comparado los valores de los BM antes del primer ciclo y antes del segundo ciclo de QT. Antes del primer ciclo ha correspondido a la determinación basal antes del inicio del tratamiento, excepto en los pacientes que reciben CPP que corresponde a la determinación tras la cirugía. La determinación en segundo ciclo de QT se ha realizado a los 21 días después de recibir el primer ciclo de QT. El análisis se ha realizado sobre todas las pacientes que han recibido al menos 1 ciclo de QT.
  - Influencia de QTNA: hemos comparado sus valores antes del primer ciclo de QT y la determinación antes de cirugía de intervalo (CDI). Se ha realizado solo en aquellas pacientes en donde el plan terapéutico ha sido QTNA y CDI.
- Análisis de la relación existente entre los diferentes BM (*objetivo secundario 5*).
  - Estudio univariante y multivariante del valor predictivo de los BM (*objetivo secundario 1*). Se ha determinado el valor predictivo respecto a los tres tipos de respuesta que se han propuesto en nuestro objetivo secundario 1, que corresponden a las variables secundarias respuesta tumoral final, respuesta a quimioterapia neoadyuvante y respecto al resultado de cirugía óptima:
    - Respuesta tumoral final. Su análisis se ha realizado sobre el valor basal de los BM antes del inicio de tratamiento. Con cfDNA también se ha analizado el valor tras la cirugía.
    - Respuesta a QTNA. Su análisis se ha realizado sobre el valor basal de los BM antes del inicio de tratamiento. Con cfDNA también se ha realizado sobre el porcentaje de reducción entre el valor basal y tras el primer ciclo de quimioterapia.
    - Resultado de cirugía peritoneal. Su análisis se ha realizado sobre el valor de los BM previo a la cirugía, correspondiendo a la determinación basal previa a la CPP y a la determinación realizada antes de la CDI.

Los resultados se han comparado con los BM de referencia Ca-125 y HE4, para valorar el verdadero beneficio que aportarían en la práctica clínica.

Con cada variable secundaria se ha realizado estudio multivariante con las variables clínicas de la primera parte que resultaron significativas, para determinar así las verdaderas variables predictivas independientes de respuesta de nuestra serie.

- Estudio univariante y multivariante del valor pronóstico de los diferentes BM respecto a la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global de las

pacientes (*objetivo secundario 1 y objetivo principal*). El análisis se ha realizado sobre el valor basal y la reducción de un 50% en el valor del BM tras el primer ciclo de QT.

Respecto a los valores basales de los BM se han calculado por métodos estadísticos el mejor nivel de corte para hacer la agrupación de comparación. Para CTC se han comparado la presencia o ausencia de células circulantes.

Se ha seleccionado el dintel del 50% para valorar la reducción por ser el establecido en el GCIG de valoración de respuesta (anexo IV).

El análisis multivariante de Cox se ha realizado en función de las características clínicas que han presentado valor significativo en el estudio univariante de la primera parte.

#### 4.6. DISEÑO ESTADÍSTICO

Todas las variables han sido incluidas en una base de datos con la identidad de los pacientes anonimizada. Se ha realizado un estudio descriptivo en el que las variables numéricas se han resumido como media, desviación típica, mediana, mínimo y máximo, y las variables cualitativas con frecuencias y porcentajes.

Para la aplicación del contraste de hipótesis en variables continuas, se ha valorado inicialmente la normalidad de la muestra mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff y las condiciones de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. En función de estos resultados, se ha aplicado la comparación de medias de T-Student para dos factores o ANOVA para cuando ha habido más de 2 factores, con aplicación del test de Bonferroni para detectar diferencias entre subgrupos, cuando la distribución de la variable ha sido normal. Cuando no se ha demostrado normalidad en la variable hemos usado el test no paramétrico U de Mann-Whitney para 2 grupos y el test de Kruskal-Wallis para 3 o más grupos. Para la comparación de variables continuas de muestras relacionadas se ha utilizado la prueba T-Student para muestras relacionadas o la prueba de Wilcoxon cuando la distribución no ha sido normal.

Para la comparación de variables cualitativas hemos aplicado el test de la Chi-Cuadrado y pruebas exacta de Fisher en caso de ser necesario.

La magnitud de asociación entre variables cualitativas se ha realizado mediante el cálculo del riesgo relativo y los residuos tipificados corregidos de Haberman. Para el análisis univariante hemos aplicado la estimación de riesgo (odds ratio y riesgo relativo) y para el multivariante la regresión logística binaria multivariante, con valoración de coeficientes de determinación R<sup>2</sup> y pruebas de bondad de ajuste de Hosmer-Lemeshow.

Se han utilizado procedimientos de curva operativa del receptor (ROC) para determinar la capacidad de predicción de los biomarcadores, junto con su sensibilidad y especificidad, y calcular el punto de corte óptimo.

Para estudiar la relación entre variables continuas hemos usado el coeficiente de Pearson y el coeficiente de correlación tau de Kendall.

El análisis de supervivencia se ha realizado mediante el método de estimación de Kaplan-Meier. Se ha realizado análisis univariante de la influencia de las diferentes variables en las curvas de supervivencia mediante el test de Log-Rank (Mantel-Cox) o con el test de Breslow si el factor estudiado acumula casos con poco tiempo de supervivencia censurados en los diferentes grupos definidos. Con el fin de conocer la asociación de los factores estudiados, se ha realizado un análisis multivariante de regresión logística de Cox (riesgos proporcionales) con los factores que en análisis univariante se mostraron asociados de forma estadísticamente significativa. De este análisis multivariante se ha obtenido la Hazard Ratio con su intervalo de confianza del 95%.

Los biomarcadores planteados en este trabajo se han tratado como variable continua, a excepción del estudio de CTC, debido a que se trata de una variable discreta con escasos valores. Para mejorar su poder estadístico, se ha realizado el análisis entre sujetos con positividad para CTC frente a los que no presentan CTC.

Todos los resultados se han considerado significativos para un nivel de  $p < 0.05$ . Los análisis se han llevado a cabo con el programa IBM SPSS Statistics v20 (SPSS Inc., Chicago, IL) con el apoyo estadístico de la Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia. El cierre de la base de datos para el estudio estadístico se realizó el 15-febrero-2017.

#### 4.7. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El proyecto ha sido valorado con dictamen favorable por el Comité Etico de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca el 27 de mayo de 2013 (anexo VI).

#### 4.8. FINANCIACIÓN

El presente proyecto ha sido posible gracias a los siguientes recursos económicos:

- El promotor económico principal ha sido el servicio de oncología médica del HCUVA.
- Aporte económico de la asociación contra el cáncer de Yecla para investigación.
- Colaboración en estudio de CTC con beca del Instituto de Salud Carlos-III, expediente PI13/02297, titulado "Regulación de la respuesta anti-tumoral de células NK y su relación con la susceptibilidad, diseminación y respuesta al tratamiento del cáncer", siendo el investigador principal el Dr. Alfredo Minguela Puras, y duración de 2014 a 2016.

## 5. Resultados

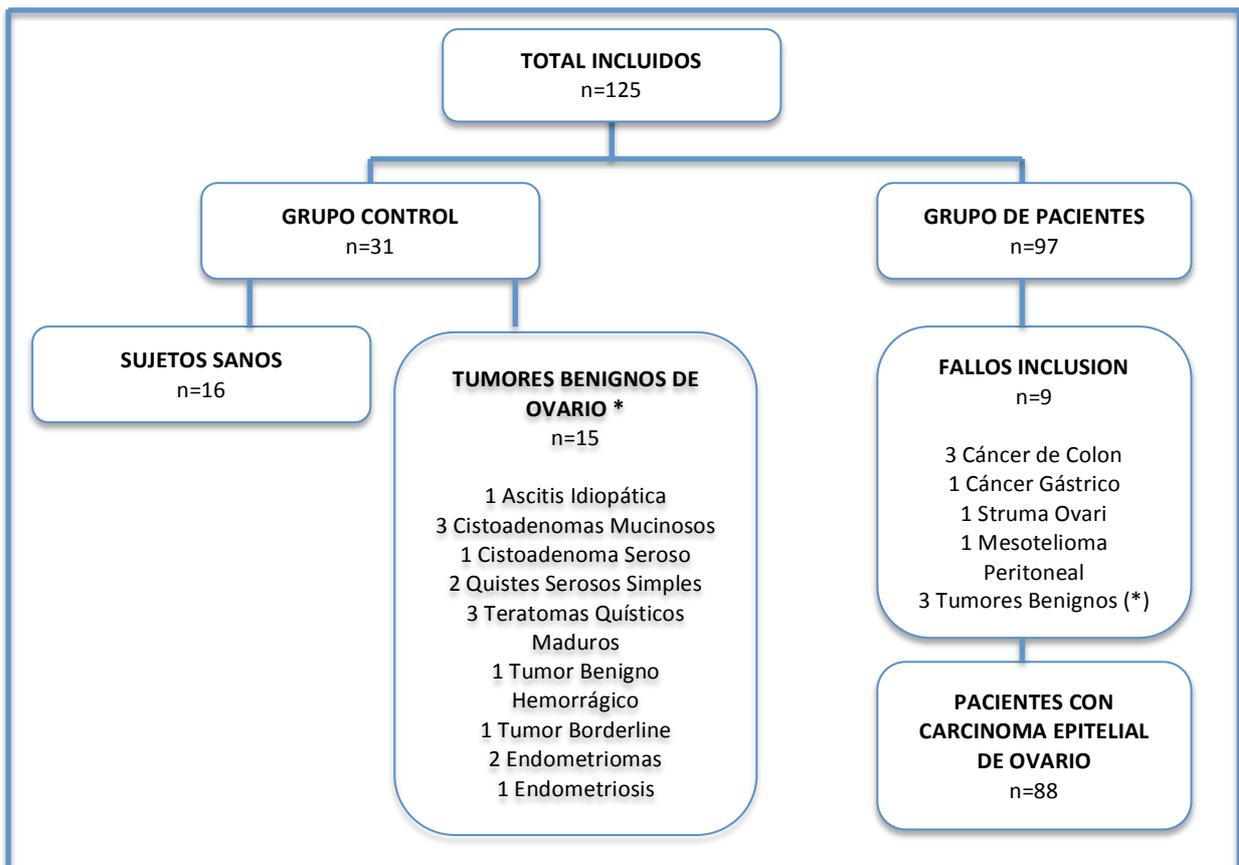
---



## 5.1. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS PACIENTES

El presente trabajo ha tenido una duración de 38 meses, desde noviembre/2013 hasta diciembre/2016. La primera paciente fue incluida el 15/nov/2013 y la última el 28/dic/2016. Han participado un total de 125 mujeres, correspondiendo 97 al grupo de pacientes, 15 al grupo control de tumores ováricos benignos y 16 al grupo de sujetos sanos (figura 5.1).

FIGURA 5.1. Diagrama con las mujeres incluidas en el estudio.



(\*) Los tumores benignos mal incluidos en el grupo de pacientes, se incorporaron al grupo de "Tumores benignos de ovario" para su análisis.

En el grupo de pacientes hubo 9 fallos de inclusión, correspondiendo éstos a 3 cánceres de colon, 1 cáncer gástrico, 1 *struma ovarii*, 1 mesotelioma peritoneal y 3 tumores benignos. Por lo tanto, al final han quedado 88 pacientes válidos con carcinoma epitelial de ovario (CEO). Para el análisis de resultados y con el objetivo de optimizar recursos, estos 3 tumores benignos se han incorporado al grupo de "Tumores benignos de ovario".

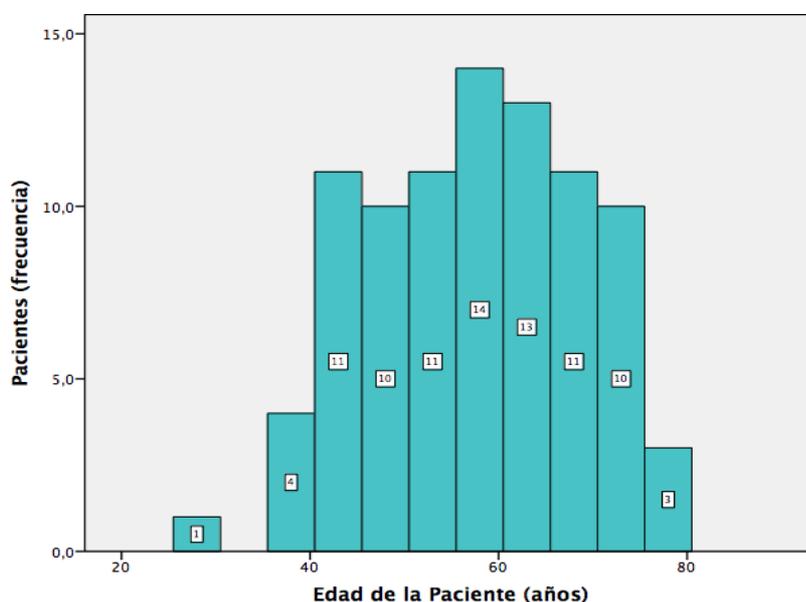
Las mujeres con patología benigna corresponden a 1 paciente con ascitis idiopática, 3 con cistoadenoma mucinoso, 1 cistoadenoma seroso, 2 con quiste seroso simple, 3 con teratoma quístico maduro, 1 tumor benigno hemorrágico, 1 tumor borderline, 2 con endometrioma y 1 paciente con endometriosis.

Los datos mostrados en el presente trabajo corresponden a un seguimiento medio de 14,30 meses (mínimo 0 meses, máximo 38 meses).

### 5.1.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA MUESTRA PACIENTES.

En la tabla 5.1 se muestran las características clínicas principales analizadas sobre las 88 pacientes incluidas. La edad media de la muestra ha sido de 57 años (DT 11,2), con una mediana también de 57 años (mínimo 28 años y máximo de 79 años). El pico de mayor incidencia ha sido entre los 55 y 65 años (figura 5.2).

FIGURA 5.2. Histograma con la distribución de edades por grupos etarios.



El estado general ECOG ha sido de 0-1 en el 77,3%, con un 12,5% ECOG 2 y un 10,2% con ECOG 3. El índice de masa corporal (IMC) medio de nuestra serie fue de 28,06, con una DT de 5,95. La mediana fue de 26,57 (mínimo 18,13 y máximo de 47,56), pero hay que destacar que dos pacientes presentaron IMC mayor de 40.

La histología predominante fue el seroso alto grado con un 68,2%, seguido por el endometrioides con 9,1% y el carcinoma de células claras con el 8%. Agrupándolas según el modelo dualista de Kurman, correspondieron 24 pacientes al tipo I (27,3%) y 64 al tipo II (72,7%). El grado histológico ha sido moderado-alto (grado 2-3) en el 84,1%, y de bajo grado (grado 1) en el 15,9%.

En cuanto al origen del tumor, se incluyeron 71 pacientes con enfermedad de debut (80,7%) y 17 pacientes con recaída (19,3%). Dentro de las pacientes con enfermedad primaria, 57 fueron de origen ovárico (80,3% de entre las pacientes con enfermedad primaria), en 3 pacientes se presentó en trompa y 11 pacientes presentaron carcinomatosis peritoneal primaria (CAPP). Dentro de las pacientes con recaída, en 14 pacientes fue recaída sensible y 3 pacientes fue recaída resistente.

TABLA 5.1. Estudio descriptivo de las características clínicas de la muestra pacientes.

Variable	Frecuencia (%)	Variable	Frecuencia (%)
<b>Edad</b>		<b>ECOG</b>	
Menor de 40	3 (3,4%)	0	17 (19,3%)
40-49	23 (26,1%)	1	51 (58,0%)
50-59	21 (23,9%)	2	11 (12,5%)
60-69	26 (29,5%)	3	9 (10,2%)
Igual o Mayor de 70	15 (17%)		
<b>Histología</b>		<b>Histología el modelo dualista de Kurman</b>	
Seroso Alto Grado	60 (68,2%)	Tipo I	24 (27,3%)
Endometriode	8 (9,1%)	Tipo II	64 (72,7%)
Células Claras	7 (8,0%)		
Seroso Bajo Grado	5 (5,7%)	<b>Grado histológico</b>	
Mucinoso	3 (3,4%)	Grado 1	14 (15,9%)
Otros	5 (5,7%)	Grado 2-3	74 (84,1%)
<b>Origen del tumor primario</b>		<b>Estadio tumoral</b>	
Ovario	57 (64,8%)	Estadio IA-IIA	8 (9,1%)
Trompa	3 (3,4%)	Estadio IIB-IIC	6 (6,8%)
CAPP	11 (12,5%)	Estadio IIIA-IIIIB	11 (12,5%)
Recaída Sensible	14 (15,9%)	Estadio IIIC	49 (55,7%)
Recaída Resistente	3 (3,4%)	Estadio IV	14 (15,9%)
<b>Presencia radiológica de Omental Cake</b>		<b>Presencia de Ascitis</b>	
NO	50 (58,1%)	NO	32 (36,4%)
SI	36 (41,9%)	LEVE	32 (36,4%)
Total	86 (100,0%)	SEVERA	24 (27,3%)
No valorable	2		
<b>Plan de tratamiento previsto (*)</b>		<b>Tipo de cirugía realizada finalmente</b>	
Cirugía primaria y QTA	28 (31,8%)	Cirugía Primaria	28 (32,9%)
QTNA y cirugía intervalo	50 (56,8%)	Cirugía Intervalo	37 (43,5%)
QT paliativa	10 (11,4%)	Cirugía Paliativa	1 (1,2%)
Total	88 (100,0%)	No se realiza Cirugía	19 (22,4%)
		Total	85 (100%)
		Pendientes de CDI	3
<b>Resultado de cirugía (†)</b>		<b>PCI quirúrgico</b>	
R0	51 (77,3%)	Igual o menor a 12	49 (76,6%)
R1	6 (9,1%)	Mayor de 12	15 (23,4%)
R2	9 (13,6%)	Total	64 (100,0%)
Total	66 (100,0%)		
<b>Respuesta Radiológica a quimioterapia neoadyuvante</b>		<b>Situación final tras completar tratamiento de cirugía y quimioterapia</b>	
Respuesta Completa	6 (13,6%)	Respuesta Completa	58 (74,4%)
Respuesta Parcial	29 (65,9%)	Respuesta Parcial	5 (6,4%)
Enfermedad Estable	6 (13,6%)	Enfermedad Estable	3 (3,8%)
Progresión	3 (6,8%)	Progresión	12 (15,4%)
Total	44 (100,0%)	Total	78 (100,0%)
No Valorable	6	No Valorable	10
(todavía en tratamiento)			
Total	50	Total	88

\* Plan de tratamiento tras valoración en comité de tumores ginecológicos y carcinomatosis.

† Se computan las cirugías realizadas, a excepción de una cirugía paliativa

CAPP= Carcinomatosis Peritoneal Primaria; QTA= quimioterapia adyuvante; QTNA= quimioterapia neoadyuvante; QT= quimioterapia

Respecto al estadio tumoral, la mayoría de pacientes incluidas presentaron estadio IIIC (55,7%). La afectación metastásica supuso el segundo grupo en frecuencia, dándose en 14 pacientes (15,9%). En 10 pacientes solo afectó un órgano (71,4%) y en 4 hubo varios órganos afectados. El órgano más afectado fue la pleura y el hígado, ambos con 6 pacientes cada uno (42,9%). Detrás ha quedado la afectación adenopática extra-abdominal en 3 pacientes (21,4%). Hay que destacar que se incluyeron 8 pacientes con estadio precoz I-IIA (9,1%).

En cuanto al tamaño de presentación de las lesiones tumorales, en nuestra serie la mayoría de tumores ováricos han sido mayores de 5 cm (56,8%), con una media de 92,7 mm (DT 50,9) y un tamaño máximo de 270mm. Los implantes peritoneales medibles fueron mayores de 2 cm en el 38,6% de las pacientes y el tamaño medio fue de 25,5 mm (DT 22,3). Hubo un 22,7% de pacientes en donde el tamaño no fue valorable por radiología, principalmente por infiltración difusa peritoneal. Se apreció imagen radiológica de infiltración peritoneal conocida como "*omental cake*" en el 41,9% de los casos. La presencia de ascitis se consideró severa en el 27,3%, siendo leve en el 36,4% y en otro 36,4% no hubo ascitis. La presencia de adenopatías radiológicas se dio en el 29,5% a nivel ilíaco y en el 36,4% a nivel para-aórtico.

En relación al tratamiento indicado en nuestras pacientes, el planteamiento inicial fue indicar cirugía peritoneal primaria (CPP) y quimioterapia adyuvante (QTA) en el 31,8% de los casos (28 pacientes), quimioterapia neoadyuvante (QTNA) y cirugía de intervalo (CDI) en el 56,8%, y sólo QT paliativa en el 11,4% de los pacientes. Finalmente, la CPP se realizó en los 28 pacientes previstos, pero la CDI sólo se ha realizado en 37 de los 50 pacientes previstos (43,5% del total de pacientes). Los motivos de no intervención de estas 13 pacientes asignadas a CDI, fueron en 2 pacientes por pérdida de seguimiento tras inicio de QT, 2 fallecieron durante la quimioterapia, 1 por toxicidad grave por quimioterapia, 1 paciente resistente, 4 refractarias a quimioterapia y 3 pacientes que se encuentran todavía en QTNA y pendientes de CDI al cierre de la base de datos. Se ha realizado cirugía paliativa en 1 pacientes y en 19 no se efectuó ningún gesto quirúrgico.

Respecto a la cirugía, el resultado fue considerado completo sin ningún residuo (R0) en el 77,3%, con residuo menor a un centímetro (R1) en el 9,1% y residuo macroscópico mayor a un cm (R2) en el 13,6% de los pacientes. El índice de carcinomatosis conocido como PCI fue menor o igual a 12 en el 76,6%, con una media de 8,7 (DT 8,8) y una mediana de 6 (mínimo 0 y máximo 36). Durante la intervención, se realizó resección digestiva, exceptuando la apendicectomía, en el 30,8% y se aplicó la técnica de quimioterapia hipertérmica conocida como *HIPEC* en el 32,3%. Se realizó linfadenectomía pélvica y/o para-aórtica en 37 pacientes (56,9%) y en 1 paciente se resecó 1 adenopatía sospechosa sin completar linfadenectomía. La media de ganglios extraídos fue 10,76 y una mediana de 8,50 (mínimo 1 y máximo 38), estando afectados en 15 pacientes (39,5% de los sometidos a resección linfática). La media de ganglios afectados fue de 1,47 ganglios (0-17).

La QT empleada fue en la mayoría de ocasiones la combinación de paclitaxel y carboplatino, en concreto en el 82,9%. El uso total de una combinación con carboplatino se dio en 78 pacientes (88,6%). En 2 pacientes se usó quimioterapia intraperitoneal y en 3 se indicó bevacizumab. En el tratamiento con QTNA, hubo una media y mediana de ciclos fue de 4, con un mínimo de 1 y máximo de 8 ciclos. Lo más frecuente fue el uso de 4-5 ciclos (65%). El

tratamiento global de quimioterapia tuvo una media y mediana de 5,66 y 6 ciclos respectivamente, con un mínimo de 0 y máximo de 22. El número de ciclos más frecuente fue 6 ciclos (38,2%), siendo entre 6 y 8 ciclos lo más habitual (64,5%).

Fijándonos en la respuesta tumoral al tratamiento, tras recibir QTNA hubo respuesta completa (RC) en el 13,6%, respuesta parcial (RP) en el 65,9%, enfermedad estable (EE) en el 13,6% y progresión (PE) en el 6,8%. 6 pacientes no han sido aún valorables por estar aún en tratamiento con QTNA. La respuesta final tras completar todo el tratamiento con cirugía y quimioterapia, fue de RC en el 73,7% y RP en el 6,6%, con PE en el 15,8%.

## VARIABLES DE SEGUIMIENTO

Al cierre de la base de datos solo 32 pacientes presentaron recaída tumoral (44,4% de los valorables). La sensibilidad a compuestos de platino se pudo valorar en 53 pacientes, mostrando ser sensibles el 50,9% de los pacientes, refractarios a tratamiento el 22,6% y el 26,4% resistentes. En 35 pacientes la sensibilidad a platino todavía no ha sido valorada (tabla 5.2).

**Tabla 5.2. Estudio descriptivo de variables de seguimiento.**

Variable	Nº de casos	Porcentaje de casos	
<b>Pacientes con recaída tumoral</b>			
NO	40	55,6 %	
SI	32	44,4 %	
Total	72	100,0 %	
No valorables	16		
<b>Sensibilidad a platino</b>		<b>Causa de Sensibilidad No valorable</b>	
Refractario	12 (22,6%)	Escaso Seguimiento	28 (80,0%)
Resistente	14 (26,4%)	Muerte durante QT	2 (5,7%)
Sensible	27 (50,9%)	Muerte tras cirugía	2 (5,7%)
Total	53 (100,0%)	Perdido	2 (5,7%)
No Valorable	35	Muerte Otra Causa	1 (2,9%)
		Total	35 (100,0%)
<b>Estado del paciente en la última revisión al cierre de la base de datos</b>			
Vivo Sin Enfermedad	44	53,0 %	
Vivo Con Enfermedad	17	20,5 %	
Muerto por Tumor	15	18,1 %	
Muerto por Otra Causa	5	6,0 %	
Perdido	2	2,4 %	
Total	83	100,0 %	
En QT (NA o adyuvante)	5		

QT= quimioterapia; NA= neoadyuvante

En la última valoración clínica, 44 pacientes estaban vivas sin enfermedad (53%), 17 vivas con enfermedad (20,5%), 15 habían fallecido por progresión tumoral (18,1%), 5 habían fallecido por otra causa (6%) y en 2 pacientes se ha perdido el seguimiento (2,4%). Estas dos pacientes corresponden a 2 mujeres no españolas que tras el primer y segundo ciclo no han vuelto a la consulta ni se ha registrado actividad en el centro de salud, ni tampoco ha sido

posible el contacto con ellas. De las pacientes que fallecieron por causa no tumoral, dos fueron por complicaciones graves durante el post-operatorio, otra por episodio de TEP fatal tras el primer ciclo, otra por falleció durante la noche en su domicilio tras el 2º ciclo de quimioterapia por causa no aclarada (causa final de muerte en parte de defunción “parada cardiorespiratoria”) y la última por cuadro de encefalopatía severa que ocasionó el fallecimiento 5 meses después del último ciclo de QT. Al cierre de la base de datos 5 pacientes se encuentran aún en quimioterapia.

Con la limitación de escaso seguimiento, la mediana de SLP se sitúa 7 meses (0-28 meses). La mediana de supervivencia se sitúa en 12 meses (0-38 meses).

### 5.1.2. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EDAD Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS ENTRE LA MUESTRA PACIENTES Y LA MUESTRA CONTROL.

En el análisis de comparación de medias entre el grupo pacientes y el grupo control hemos obtenido diferencias significativas en todas las variables analizadas (tabla 5.3). El grupo pacientes presenta mayor edad que el grupo control (media de 57,4 vs 47,9 años), menor nivel de albúmina (media de 3,9 vs 4,4 gr/dL), mayor nivel de LDH (media de 231 vs 163 U/L), menor nivel de Hb (media de 12,2 vs 13,3 gr/dL), mayor nivel de PMN (media de 6339 vs 3866 cel/uL) y mayor nivel de plaquetas (media de 390 vs 263 x10<sup>3</sup>/uL).

**TABLA 5.3. Comparación de edad y variables analíticas entre pacientes y grupo control.**

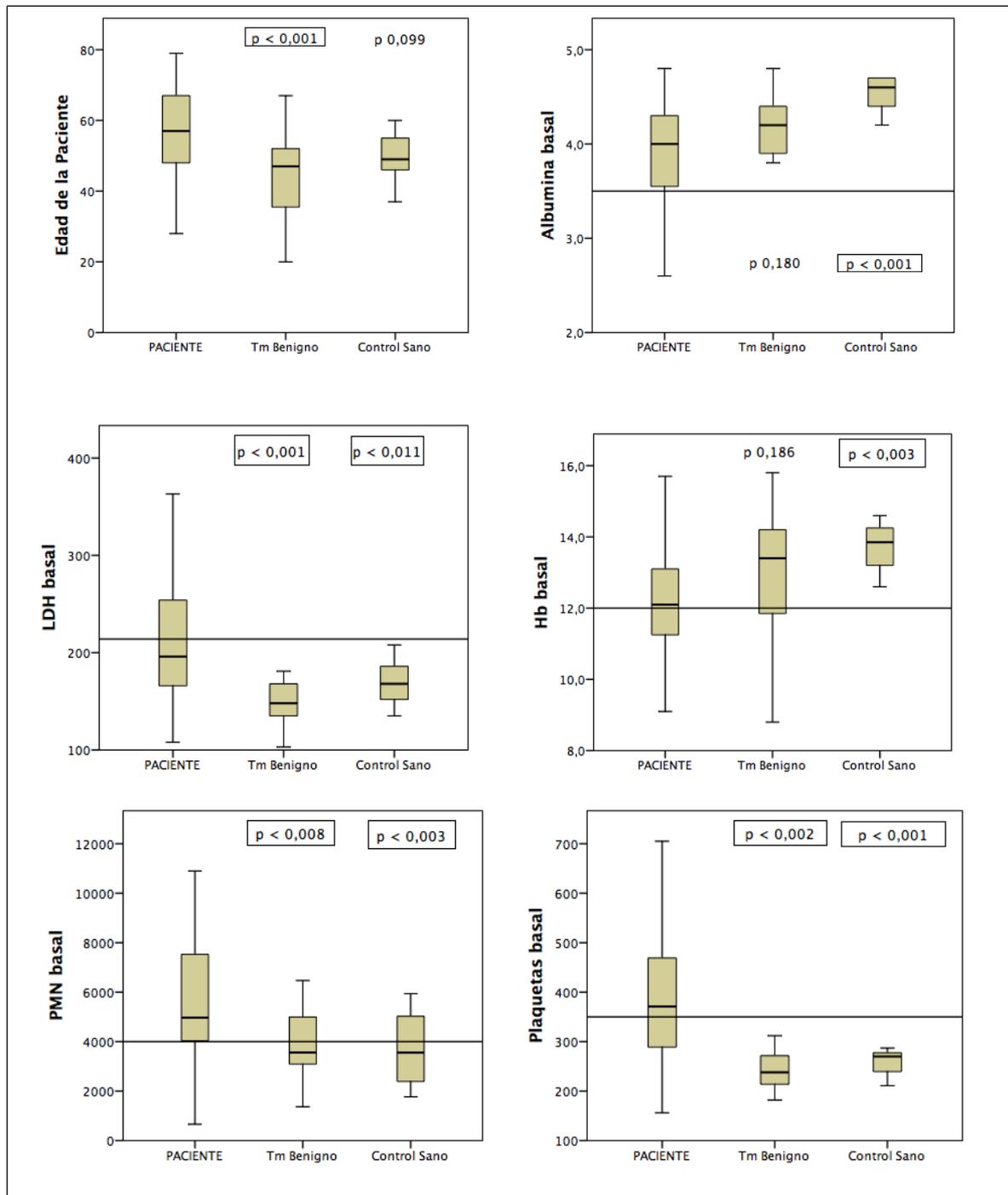
Variable	N	Media ± DT	Mediana (Mín – Máx)	Valor de p
<b>Grupo</b>				
<b>Edad (años)</b>				
Grupo Pacientes	88	57,4 ± 11,2	57,0 (28 – 79)	< 0,001 *
Grupo Control	31	47,9 ± 11,3	48,0 (20 – 74)	
<b>Albúmina (gr/dL)</b>				
Grupo Pacientes	83	3,9 ± 0,5	4,0 (2,1 – 4,8)	< 0,001 *
Grupo Control	30	4,4 ± 0,3	4,4 (3,8 – 5,2)	
<b>LDH (U/L)</b>				
Grupo Pacientes	78	231 ± 111	196 (108 – 804)	< 0,001 **
Grupo Control	27	163 ± 29	160 (103 – 242)	
<b>Hb (gr/dL)</b>				
Grupo Pacientes	87	12,2 ± 1,5	12,1 (9,1 – 15,7)	< 0,001 *
Grupo Control	31	13,3 ± 1,4	13,5 (8,8 – 15,8)	
<b>PMN (cel/uL)</b>				
Grupo Pacientes	87	6339 ± 4498	4970 (660 – 30400)	< 0,001 **
Grupo Control	31	3866 ± 1516	3560 (1370 – 8070)	
<b>Plaquetas (x10<sup>3</sup>/uL)</b>				
Grupo Pacientes	87	390 ± 143	371 (156 – 830)	< 0,001 *
Grupo Control	31	263 ± 67	248 (180 – 468)	

DT= desviación típica; p\*= T-Student; p\*\*= test no paramétrico; Mín= mínimo; Máx= máximo

Para concretar mejor entre que subgrupos había diferencia, se ha realizado comparación entre la muestra pacientes respecto a la de tumores benignos y controles sanos,

obteniendo diferencia significativa para la edad, albúmina, Hb, PMN y plaquetas (figura 5.3). La edad en nuestro estudio ha sido diferente entre el grupo pacientes y el de tumores benignos, con 57 años y 45 años respectivamente, pero sin diferencias entre pacientes y sanos.

**FIGURA 5.3. Diagrama de cajas de las variables cuantitativas entre pacientes y grupo control.**



En el diagrama de cajas se muestra el mínimo, primer cuartil, mediana, tercer cuartil y máximo.

Se ha señalado una línea horizontal con el valor normal del parámetro.

Se ha indicado el valor de p del grupo de tumores benignos y control sano respecto al grupo de pacientes.

Se ha resaltado con recuadro cuando ha sido significativo y sin bordes cuando no ha sido significativo.

La albúmina ha sido diferente entre pacientes y sanos, no habiendo diferencias con tumores benignos. No ha habido diferencias en los niveles de LDH entre los grupos. Respecto a los valores del hemograma, se han visto diferencias en el nivel de Hb y PMN entre pacientes y sanos, pero no con tumores benignos. Finalmente, el nivel de plaquetas ha sido significativamente mayor en el grupo pacientes respecto a los otros dos grupos.

No se han visto diferencias en ninguna variable entre tumores benignos y sujetos sanos.

### 5.1.3. ANÁLISIS UNIVARIANTE DEL VALOR PREDICTIVO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS.

#### 5.1.3.1. VALOR PREDICTIVO DE RESPUESTA TUMORAL A QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE.

Se incluyen las 44 pacientes con enfermedad avanzada (estadio IIB-IV) en donde se ha indicado tratamiento con QTNA y cirugía de intervalo (CDI).

El análisis univariante de las variables clínicas nos muestra que sólo dos variables han influido de forma individual en el resultado a QTNA. Estas variables han sido el tipo histológico II según el modelo de Kurman (RR 2,018;  $p < 0,009$ ) y el grado histológico 2-3 (RR 2,115;  $p < 0,050$ ). La ausencia o leve presencia de ascitis ha estado próxima a la significación (RR 1,410;  $p < 0,057$  con IC-95% de 1,000 – 1,988). El resto de variables no han mostrado diferencias significativas (tabla 5.4).

**TABLA 5.4. Análisis univariante del valor predictivo de respuesta a QTNA.**

Característica clínica	Respuesta*	No respuesta <sup>†</sup>	Total	RR (IC 95%)	Valor de p
<b>Tipo histológico II de Kurman</b>					
Tipo II	32 (86,5%)	5 (13,5%)	37 (100%)	2,018	<b>&lt; 0,009</b>
Tipo I	3 (42,9%)	4 (57,1%)	7 (100%)	(0,850 – 4,792)	
Total	35	9	44		
<b>Grado histológico</b>					
Grado 2-3	33 (84,6%)	6 (15,4%)	39 (100%)	2,115	<b>&lt; 0,050</b>
Grado 1	2 (40,0%)	3 (60,0%)	5 (100%)	(0,717 – 6,241)	
Total	35	9	44		
<b>Ausencia de ascitis o leve</b>					
Ausencia/leve ascitis	22 (91,7%)	2 (8,3%)	24 (100%)	1,410	<b>&lt; 0,057</b>
Ascitis severa	13 (65,0%)	7 (35,0%)	20 (100%)	(1,000 – 1,988)	
Total	35	9	44		
<b>RESTO</b>					
Edad, IMC, ECOG, Origen del tumor					DNS
Presencia radiológica de adenopatías, Tamaño tumor ovárico, Tamaño implante peritoneal					
Presencia de omental cake					
Niveles analíticos (albúmina, LDH, Hb, PMN y plaquetas)					

RR= riesgo relativo; IC 95%=intervalo confianza 95%; DNS= diferencia no significativa

\* Respuesta= respuesta completa + respuesta parcial; <sup>†</sup> No respuesta= enfermedad estable + progresión.

### 5.1.3.2. VALOR PREDICTIVO DE CIRUGÍA ÓPTIMA.

Por último, hemos analizado las variables clínicas que se relacionan con un resultado óptimo de cirugía R0 en las 58 pacientes con enfermedad avanzada (estadio IIB-IV) que fueron intervenidas con intención radical, tanto cirugía primaria como de intervalo.

El análisis univariante de las variables clínicas respecto a un resultado óptimo R0 de cirugía ha mostrado que se relacionan de forma significativa un IMC menor/igual de 25, un ECOG 0-1, la ausencia o leve presencia de ascitis, ausencia de omental cake y un PCI quirúrgico menor/igual a 12 (tabla 5.5).

También el nivel de albúmina se ha relacionado de forma significativa, con un valor de 4,076 gr/dL para R0 y de 3,708 gr/dL para R1-2 ( $p < 0,019$ ).

**TABLA 5.5. Análisis univariante del valor predictivo de resultado quirúrgico óptimo R0.**

Característica clínica	Cirugía R0	Cirugía R1-2	Total	RR (IC 95%)	Valor de p
<b>IMC menor de 25</b>					
Menor/igual a 25	19 (90,5%)	2 (9,5%)	21 (100%)	1,339 (1,030 – 1,742)	< 0,050
Mayor de 25	25 (67,6%)	12 (32,4%)	37 (100%)		
Total	44	14	58		
<b>ECOG 0-1</b>					
ECOG 0-1	38 (82,6%)	8 (17,4%)	46 (100%)	1,652 (0,924 – 2,954)	< 0,019
ECOG 2-3	6 (50,0%)	6 (50,0%)	12 (100%)		
Total	44	14	58		
<b>Ausencia de ascitis o leve</b>					
Ascitis ausente/leve	37 (84,0%)	7 (16,0%)	44 (100%)	1,682 (0,981 – 2,884)	< 0,009
Ascitis Severa	7 (50,0%)	7 (50,0%)	14 (100%)		
Total	44	14	58		
<b>Ausencia de omental cake</b>					
Ausente	29 (87,9%)	4 (12,1%)	33 (100%)	1,506 (1,050 – 2,162)	< 0,011
Presente	14 (58,3%)	10 (41,6%)	24 (100%)		
Total	43	14	57		
<b>Nivel de PCI quirúrgico</b>					
Menor/igual a 12	37 (88,1%)	5 (11,9%)	42 (100%)	1,888 (1,087 – 3,280)	< 0,001
Mayor de 12	7 (46,6%)	8 (53,3%)	15 (100%)		
Total	44	13	57		
<b>Albúmina</b>					
Nivel de albúmina (gr/dL)	4,076	3,708			< 0,019
<b>RESTO</b>					
Edad, Origen del tumor, Tipo histológico de Kurman, Grado histológico Presencia radiológica de adenopatías, Tamaño tumor ovárico, Tamaño implante peritoneal Tipo de cirugía realizada (CPP/CDI), Ganglios afectos en estudio patológico Niveles analíticos (LDH, Hb, PMN y plaquetas)					DNS

CPP=Cirugía peritoneal primaria; CDI= cirugía de intervalo; RR= riesgo relativo; IC 95%=intervalo confianza 95%; DNS= diferencia no significativa

### 5.1.3.3. VALOR PREDICTIVO DE RESPUESTA TUMORAL AL FINALIZAR EL TRATAMIENTO.

En este análisis hemos incluido a 71 pacientes con enfermedad avanzada (estadio IIB-IV) en las que ha sido posible valorar la respuesta final. No se incluyen las pacientes con pérdida de seguimiento, las fallecidas por otra causa en donde no ha podido valorarse la respuesta y las pacientes aún en tratamiento. También se han descartado las pacientes incluidas que han presentado estadio precoz, debido al sesgo que ocasionaría.

En el análisis univariante se ha obtenido un PCI menor/igual a 12, un resultado quirúrgico óptimo R0 y presentar respuesta a QTNA, han sido variables que se relacionan de forma significativa con respuesta parcial/completa al finalizar el tratamiento. La mayor fuerza de asociación la ha presentado la respuesta a QTNA, con un RR 4,359 (1,282 – 14,823;  $p < 0,001$ ), seguido del resultado quirúrgico, con un RR 1,714 (1,063 – 2,765;  $p < 0,001$ ). La presentación primaria frente a recaída tumoral y la ausencia de ascitis o leve presencia se han aproximado a la significación (tabla 5.6).

**TABLA 5.6. Análisis univariante del valor predictivo de respuesta al finalizar el tratamiento.**

Característica clínica	Respuesta*	No respuesta <sup>†</sup>	Total	RR (IC 95%)	Valor de p
<b>Valor de PCI menor/igual a 12</b>					
Menor/igual a 12	40 (97,6%)	1 (2,4%)	41 (100%)	1,330	<b>&lt; 0,015</b>
PCI mayor de 12	11 (73,3%)	4 (26,7%)	15 (100%)	(0,977 – 1,812)	
Total	51	5	56		
<b>Resultado de cirugía R0</b>					
R 0	44 (100,0%)	0 (0,0%)	44 (100%)	1,714	<b>&lt; 0,001</b>
R 1-2	7 (58,3%)	5 (41,7%)	12 (100%)	(1,063 – 2,765)	
Total	51	5	56		
<b>Respuesta a QT neoadyuvante</b>					
Si	31 (96,9%)	1 (3,1%)	32 (100%)	4,359	<b>&lt; 0,001</b>
No	2 (22,2%)	7 (77,8%)	9 (100%)	(1,282 – 14,823)	
Total	33	8	41		
<b>Enfermedad primaria</b>					
Enfermedad primaria	47 (83,9%)	9 (16,1%)	56 (100%)	1,399	<b>&lt; 0,044</b>
Recaída tumoral	9 (60,0%)	6 (40,0%)	15 (100%)	(0,911 – 2,148)	
Total	56	15	71		
<b>Ausencia de ascitis o leve</b>					
Ascitis leve/ausente	44 (84,6%)	8 (15,4%)	52 (100%)	1,340	<b>&lt; 0,050</b>
Ascitis severa	12 (63,2%)	7 (36,8%)	19 (100%)	(0,932 – 1,925)	
Total	56	15	71		
<b>RESTO</b>					
Edad, IMC, ECOG, Tipo histológico de Kurman, Grado histológico					<b>DNS</b>
Presencia radiológica de adenopatías, Tamaño tumor ovárico, Tamaño implante peritoneal					
Presencia de omental cake, Tipo de cirugía realizada, Ganglios afectados en el estudio patológico					
Niveles analíticos (albúmina, LDH, Hb, PMN y plaquetas)					

RR= riesgo relativo; IC 95%=intervalo confianza 95%; DNS= diferencia no significativa; NC=No calculable

\* Respuesta= respuesta completa + respuesta parcial; <sup>†</sup> No respuesta= enfermedad estable + progresión.

## 5.1.4. ANÁLISIS UNIVARIANTE DEL VALOR PRONÓSTICO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS.

### 5.1.4.1. VALOR PRONÓSTICO DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN.

Para el análisis de la SLP se han incluido 86 pacientes, habiendo censurado las 2 pacientes perdidas de seguimiento. En el análisis univariante se ha obtenido que son factores pronósticos negativos de menor SLP una edad mayor de 65 años, la recaída tumoral frente a la enfermedad de debut, un estadio III-IV frente a I-II, presencia de *omental cake*, no presentar respuesta a QTNA, un PCI quirúrgico mayor de 12, un resultado sub-óptimo de cirugía R1-2 y la presencia de ganglios linfáticos afectos en el estudio patológico (tabla 5.7). Los valores con mayor nivel de log-rank han sido la falta de respuesta a QTNA y un PCI mayor de 12. El resto de variables no han mostrado diferencias significativas en la SLP.

En la figura 4 se muestran las gráficas de SLP en relación a las variables clínicas que han resultado significativas en el análisis univariante.

**TABLA 5.7. Análisis univariante del valor pronóstico de las variables clínicas en relación con la supervivencia libre de progresión.**

Característica clínica	N	Nº eventos	Media (estimación)	IC 95%	Log-rank	Valor de p
<b>Edad</b>						
Menor o igual a 65 años	62	21	17,1	13,7 – 20,4	<b>4,471</b>	<b>&lt;0,034</b>
Mayor de 65 años	24	16	11,1	7,7 – 14,4		
Total	86	37	15,5	12,8 – 18,1		
<b>Origen del tumor</b>						
Enfermedad de debut	70	27	16,1	13,1 – 19,1	<b>4,344*</b>	<b>&lt;0,037</b>
Recaída tumoral	16	10	10,9	6,3 – 15,4		
Total	86	32	15,5	12,8 – 18,1		
<b>Estadio tumoral</b>						
Estadio I-II	13	0	NA		<b>6,959</b>	<b>&lt;0,008</b>
Estadio III-IV	73	37	NA			
Total	86	37	NA			
<b>Presencia de omental cake</b>						
Ausencia	49	16	18,7	15,3 – 22,1	<b>7,702</b>	<b>&lt;0,006</b>
Presencia	35	19	10,0	7,9 – 12,2		
Total	84	35	15,8	13,1 – 18,5		
<b>Respuesta a QTNA</b>						
Respuesta	34	14	16,8	13,6 – 20,0	<b>29,718</b>	<b>&lt;0,001</b>
No respuesta	9	8	4,7	3,0 – 6,3		
Total	43	19	14,3	11,3 – 17,4		
<b>PCI quirúrgico</b>						
Menor/igual a 12	49	9	21,7	18,3 – 25,1	<b>27,126</b>	<b>&lt;0,001</b>
PCI mayor de 12	15	14	9,3	7,1 – 11,6		
Total	64	23	17,5	14,6 – 20,4		

\* Test de Breslow

IC 95%= intervalo confianza 95%; QTNA= quimioterapia neoadyuvante; PCI=índice carcinomatosis peritoneal;

NA=no aplica

(continúa)

**TABLA 5.7 (continuación).**

Característica clínica	N	Nº eventos	Media (estimación)	IC 95%	Log-rank	Valor de p
<b>Resultado cirugía</b>						
Cirugía R0	51	15	19,0	15,8 – 22,3	9,796	<0,007
Cirugía R1	6	3	12,7	11,4 – 14,0		
Cirugía R2	8	5	9,6	1,8 – 17,4		
Total	65	23	17,5	14,6 – 20,4		
<b>Ganglios afectados en el estudio patológico</b>						
Ganglios no afectados	23	2	24,7	20,5 – 29,0	7,811	<0,005
Ganglios afectados	15	7	12,6	10,2 – 15,1		
Total	38	9	19,6	15,5 – 23,6		
<b>RESTO</b>						
IMC, ECOG, Histología según modelo Kurman, Grado histológico Presencia adenopatías radiológicas, Presencia ascitis severa, Tamaño tumor ovárico Tamaño implante peritoneal Tipo de cirugía realizada Nivel de albúmina, LDH, Hb, PMN, plaquetas						DNS

IC 95%= intervalo confianza 95%;

NA=no aplica; LDH=lactato deshidrogenasa; Hb=hemoglobina; PMN=polimorfo-neutrófilos

**FIGURA 5.4. Curvas de supervivencia libre de progresión en relación a variables clínicas.**

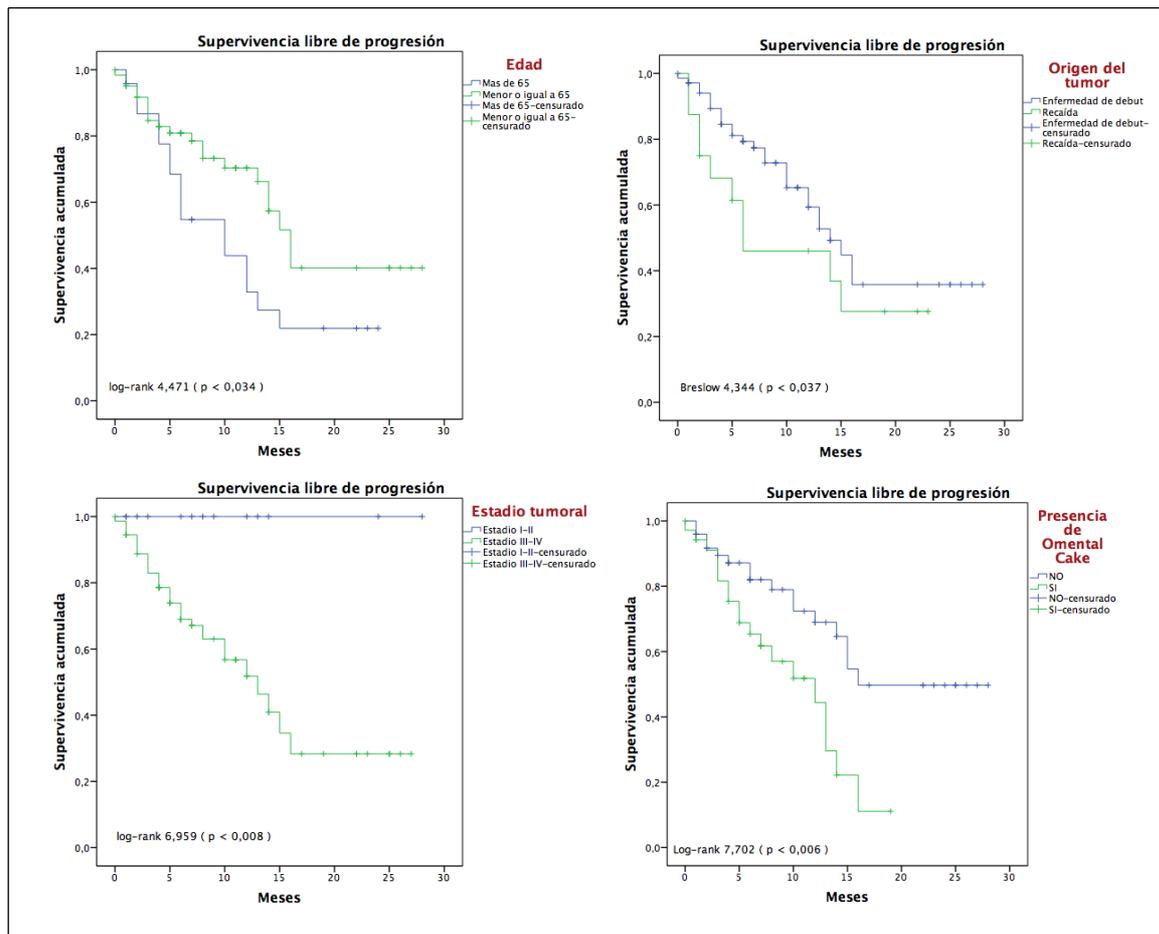
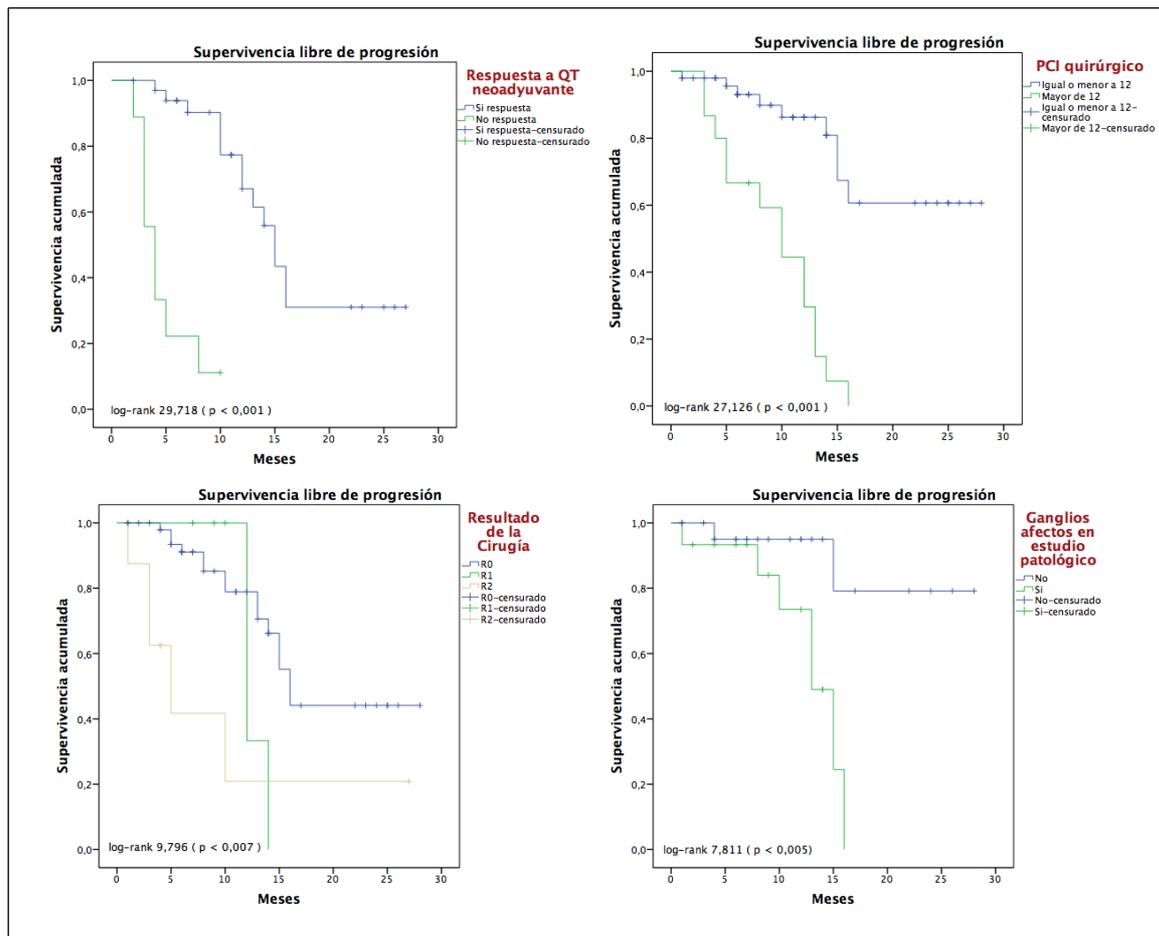


FIGURA 5.4. (continuación)



#### 5.1.4.2. VALOR PRONÓSTICO DE SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG).

Se han valorado un total de 86 pacientes para el estudio de SG, habiendo censurado solo las dos pacientes perdidas de seguimiento. En el análisis univariante se ha obtenido que, de todas las parámetros clínicos registrados, las variables que se han relacionado de forma significativa con peor SG han sido presentar condición resistente a platino, presencia de ascitis severa, presencia de *omental cake*, no presentar respuesta a QTNA, un valor de PCI mayor de 12, no presentar respuesta al finalizar el tratamiento completo y presentar un nivel bajo de albúmina y de hemoglobina (tabla 5.8). El resultado quirúrgico sub-óptimo R1-2 se ha aproximado a la significación ( $p=0,066$ ). El resto de variables no han sido significativas.

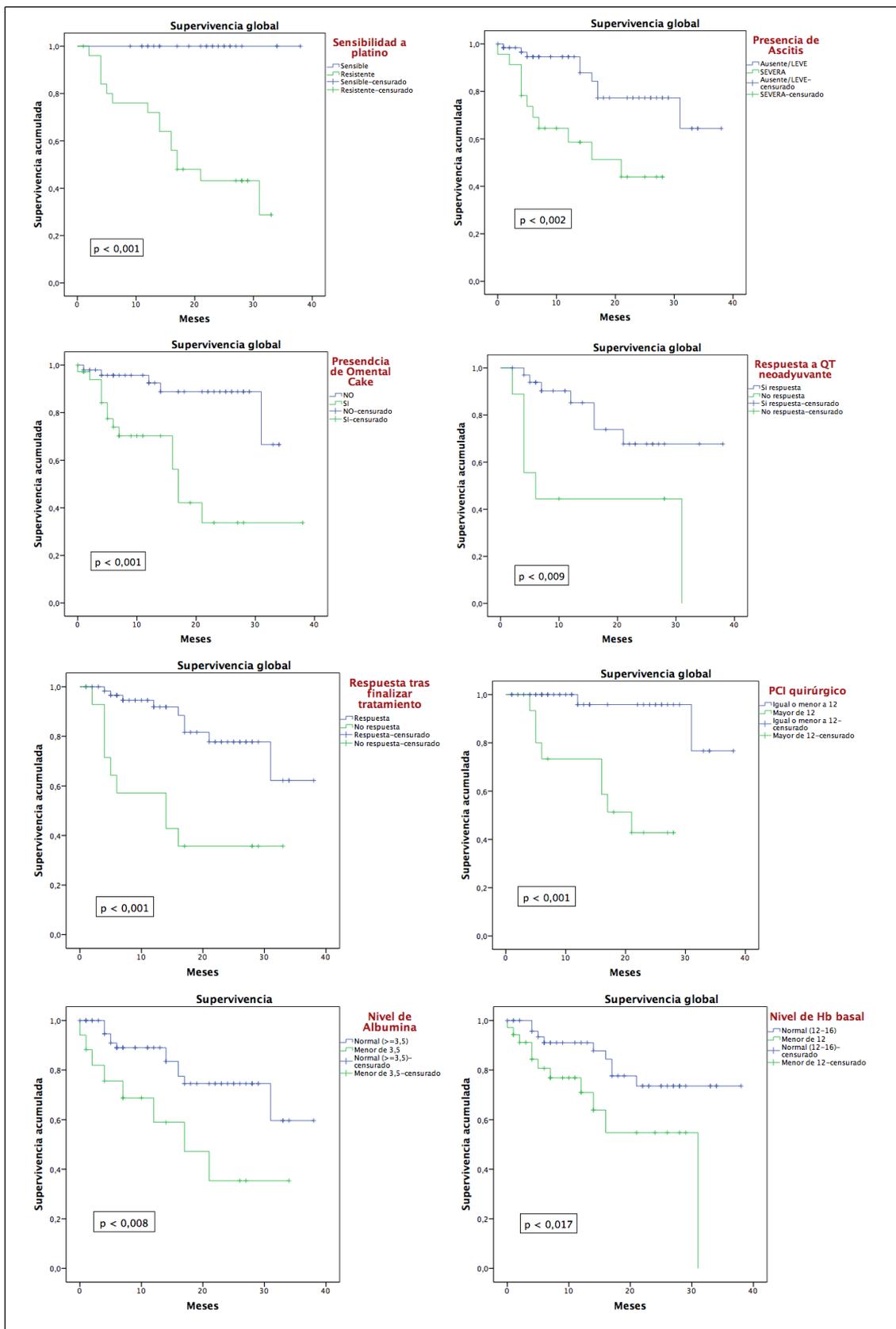
**TABLA 5.8. Análisis univariante del valor pronóstico de supervivencia global de las variables clínicas.**

Característica clínica	N	Nº eventos	Media (estimación)	IC 95%	Log-rank	Valor de p
<b>Sensibilidad a platino</b>						
Pacientes sensibles	25	0	NA		17,184	<0,001
Pacientes resistentes	26	15	NA			
Total	51	15	NA			
<b>Ausencia o leve presencia de ascitis</b>						
Ausencia/leve ascitis	63	9	31,3	27,6 – 35,1	10,050	<0,002
Ascitis severa	23	11	17,1	12,5 – 21,8		
Total	86	20	28,2	24,6 – 31,7		
<b>Ausencia de omental cake</b>						
Ausencia	49	5	30,5	27,8 – 33,3	13,763	<0,001
Presencia	35	14	20,5	14,5 – 26,4		
Total	84	19	28,2	24,5 – 31,9		
<b>Respuesta a QTNA</b>						
Respuesta	34	7	30,0	24,9 – 35,0	6,847	<0,009
No respuesta	9	6	16,0	6,4 – 25,6		
Total	43	13	26,3	21,3 – 31,3		
<b>PCI quirúrgico</b>						
Menor/igual a 12	49	2	35,6	32,5 – 38,6	15,457	<0,001
PCI mayor de 12	15	8	18,7	13,9 – 23,5		
Total	64	10	31,0	27,2 – 34,7		
<b>Respuesta al final del tratamiento</b>						
Respuesta	63	9	31,6	27,9 – 35,2	13,741	<0,001
No respuesta	15	9	16,7	10,0 – 23,4		
Total	78	18	28,8	25,2 – 32,3		
<b>Nivel de albúmina</b>						
Valor normal (>=3,5)	64	12	30,0	26,2 – 33,9	6,952	<0,008
Bajo (<3,5)	17	8	18,6	11,5 – 25,7		
Total	81	18	27,9	24,3 – 31,5		
<b>Nivel de Hb</b>						
Valor normal 12-16)	50	9	31,4	27,6 – 35,2	5,730	<0,017
Bajo (<12)	35	11	20,9	15,7 – 26,2		
Total	85	20	28,1	24,5 – 31,7		
<b>RESTO</b>						
Edad, IMC, ECOG, Origen del tumor, Histología según modelo Kurman, Grado histológico Estadio tumoral, Presencia adenopatías radiológicas, Tamaño tumor ovárico Tamaño implante peritoneal, Tipo de cirugía realizada, Resultado de cirugía (0,066) Ganglios afectos en estudio patológico Nivel de LDH, PMN, plaquetas						DNS

IC 95%= intervalo confianza 95%; QTNA= quimioterapia neoadyuvante; PCI=índice carcinomatosis peritoneal; NA=no aplica; LDH=lactato deshidrogenasa; Hb=hemoglobina; PMN=polimorfo-neutrófilos

En la figura 5.5 se muestran las curvas de SG en relación a las variables relacionadas de forma significativas en el análisis univariante.

FIGURA 5.5. Curvas de supervivencia global en relación a las variables clínicas.



## 5.2. ANÁLISIS DE LOS BIOMARCADORES PLANTEADOS EN ESTE TRABAJO.

### 5.2.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL NIVEL BASAL DE LOS BIOMARCADORES EN EL GRUPO DE PACIENTES.

En el presente trabajo, se han realizado un total de 254 determinaciones de cfDNA y 80 de CTC. En la tabla 5.9 se muestran las características basales de los BM con valores continuos, que corresponden a cfDNA y los BM de referencia Ca-125 y HE4. Los valores relacionados con cfDNA han presentado una distribución de tipo normal. La media de cfDNA115 ha sido 1,635 ng/mcL (rango de 0,185 – 6,365 ng/mcL), de cfDNA247 ha sido 0,585 ng/mcL (rango de 0,109 – 1,637 ng/mcL) y la integridad de cfDNA ha sido 0,430 (rango de 0,120 – 0,990). Los valores de Ca-125 y HE4 han mostrado una gran dispersión, con una distribución de tipo no normal. Ca-125 ha presentado una media de  $917 \pm 1630$  U/mL (rango de 11 – 11.354 U/mL) y HE4 una media de  $822 \pm 1149$  pmol/L (rango de 45 – 4957 pmol/L).

**TABLA 5.9. Descripción cuantitativa de los niveles basales de los biomarcadores.**

Parámetro	Válidos (perdidos)	Media $\pm$ Desviación Típica	Mediana	Mínimo	Máximo
cfDNA-115	86 (2)	1,635 $\pm$ 1,114	1,363	0,185	6,365
cfDNA-247	86 (2)	0,585 $\pm$ 0,272	0,537	0,109	1,637
cfDNA-Int	86 (2)	0,430 $\pm$ 0,176	0,425	0,120	0,990
Ca 125	88 (0)	917 $\pm$ 1630	459	11	11364
HE4	82 (6)	822 $\pm$ 1149	358	45	4957

En la tabla 5.10 hemos calculado la frecuencia y porcentaje de Ca125 y HE4 según su valor normal establecido (parte izquierda de la tabla).

**TABLA 5.10. Descripción de biomarcadores por intervalos de valor.**

Parámetro	Frecuencia	Porcentaje	Parámetro	Frecuencia	Porcentaje
<b>Ca 125</b>			<b>Ca 125</b>		
$\leq 35$	8	9,1	$\leq 35$	8	9,1
$> 35$	80	90,9	<b>36 – 350</b>	29	33,0
<b>Total</b>	88	100,0	<b><math>&gt; 350</math></b>	51	58,0
			<b>Total</b>	88	100,0
<b>HE4 (*)</b>			<b>HE4</b>		
$\leq 80$	7	8,5	$\leq 80$	7	8,5
$> 80$	75	91,5	<b>81 – 400</b>	36	43,9
	82	100,0	<b><math>&gt; 400</math></b>	39	47,6
				82	100,0

\* El límite superior normal de HE4 es 80 en post-menopáusicas y 60 en pre-menopáusicas. Se ha tenido en cuenta este límite.

En la parte derecha de la tabla 5.10, los hemos agrupado según valor normal y su valor de 10 veces el límite superior normal (LSN) en Ca125 y 5 veces el LSN en HE4. Estos límites se han elegido por representar una alta carga del BM. Los valores de CA125 y HE4 están elevados en el 91% de las pacientes, presentando un Ca125 por encima de 10 veces el LSN el 58% y un HE4 por encima de 5 veces el LSN el 48%.

Los tres BM relacionados con el cfDNA no se han mostrado en intervalos al no estar establecidos valores de normalidad previos.

En la tabla 5.11 se exponen los resultados de CTC. La enumeración de CTC muestra que han sido positivas en 19 pacientes de un total de 80 analizadas, lo que supone un 23,8% de nuestra serie. El valor positivo más frecuente ha sido 1 CTC/7,5mL de sangre periférica en 9 pacientes (11,3% del total), siendo mayor de 1 CTC/7,5mL en 10 pacientes (12,5% del total de pacientes). El valor máximo ha sido de 17 CTC/7,5mL en una paciente.

**TABLA 5.11. Estudio descriptivo de los valores de CTC.**

Parámetro	Frecuencia	Porcentaje
<b>CTC</b>		
Negativas	61	76,3
Positivas	19	23,8
<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>100,0</b>
<b>Valor de CTC</b>		
<b>0</b>	61	76,3
<b>1</b>	9	11,3
<b>2</b>	2	2,5
<b>3</b>	1	1,3
<b>6</b>	3	3,8
<b>7</b>	1	1,3
<b>11</b>	1	1,3
<b>14</b>	1	1,3
<b>17</b>	1	1,3
<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>100,0</b>

## 5.2.2. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS BIOMARCADORES ENTRE EL GRUPO PACIENTES Y EL GRUPO CONTROL

### COMPARACIÓN ENTRE GRUPO PACIENTES Y GRUPO CONTROL

La comparación de los BM entre el grupo pacientes y el grupo control sin cáncer (tumores benignos y controles sanos), nos ha mostrado diferencias significativas en todos los BM. En la tabla 5.12 se expone la comparación de medias entre ambos grupos y el valor de significación.

TABLA 5.12. Comparación de BM entre grupo de pacientes y grupo control.

Biomarcador	N	Media $\pm$ DT	Mediana (Mín – Máx)	Valor de p
<b>Grupo</b>				
<b>cfDNA115</b>				
Grupo Pacientes	86	1,635 $\pm$ 1,114	1,363 (0,185 – 6,365)	< 0,001 *
Grupo Control	31	0,849 $\pm$ 0,449	0,788 (0,218 – 2,086)	
<b>cfDNA247</b>				
Grupo Pacientes	86	0,585 $\pm$ 0,272	0,537 (0,109 – 1,637)	< 0,007 *
Grupo Control	31	0,429 $\pm$ 0,255	0,391 (0,000 – 0,992)	
<b>Integridad cfDNA</b>				
Grupo Pacientes	86	0,430 $\pm$ 0,176	0,425 (0,12 – 0,99)	< 0,001 *
Grupo Control	30	0,564 $\pm$ 0,236	0,540 (0,11 – 1,16)	
<b>Ca 125</b>				
Grupo Pacientes	88	917 $\pm$ 1630	459 (11 – 11364)	< 0,001 **
Grupo Control	31	43 $\pm$ 90	12 (4 – 406)	
<b>HE4</b>				
Grupo Pacientes	82	822 $\pm$ 1149	358 (45 – 4957)	< 0,001 **
Grupo Control	29	67 $\pm$ 52	54 (36 – 308)	

DT= desviación típica; p\*= T-Student; p\*\*= test no paramétrico; Mín= mínimo; Máx= máximo

#### COMPARACIÓN ENTRE GRUPO PACIENTES, TUMORES BENIGNOS Y SUJETOS SANOS

La comparación del grupo de pacientes respecto al grupo control de tumores benignos y el grupo de controles sanos nos ha mostrado que cfDNA115 ha presentado mayor valor de forma significativa en las pacientes respecto a los otros dos grupos, pero cfDNA247 solo ha sido diferente entre pacientes y benignos, no llegando a la significancia entre pacientes y sanos (tabla 5.13). La integridad de cfDNA ha sido diferente de forma significativa entre pacientes y sanos, sin embargo no lo ha sido entre pacientes y tumores benignos.

De los BM de referencia, Ca125 ha presenta diferencia significativa en los test no paramétricos ( $p < 0,001$ ), con media de 917 UI/mL en pacientes, de 75 UI/mL en tumores benignos y de 12 UI/mL en controles sanos. El biomarcador HE4 también ha presentado diferencias significativas tanto con tumores benignos como controles sanos, con cifras de 822, 73 y 62 pmol/L respectivamente.

No ha habido diferencias significativas entre los dos grupos controles para ningún BM.

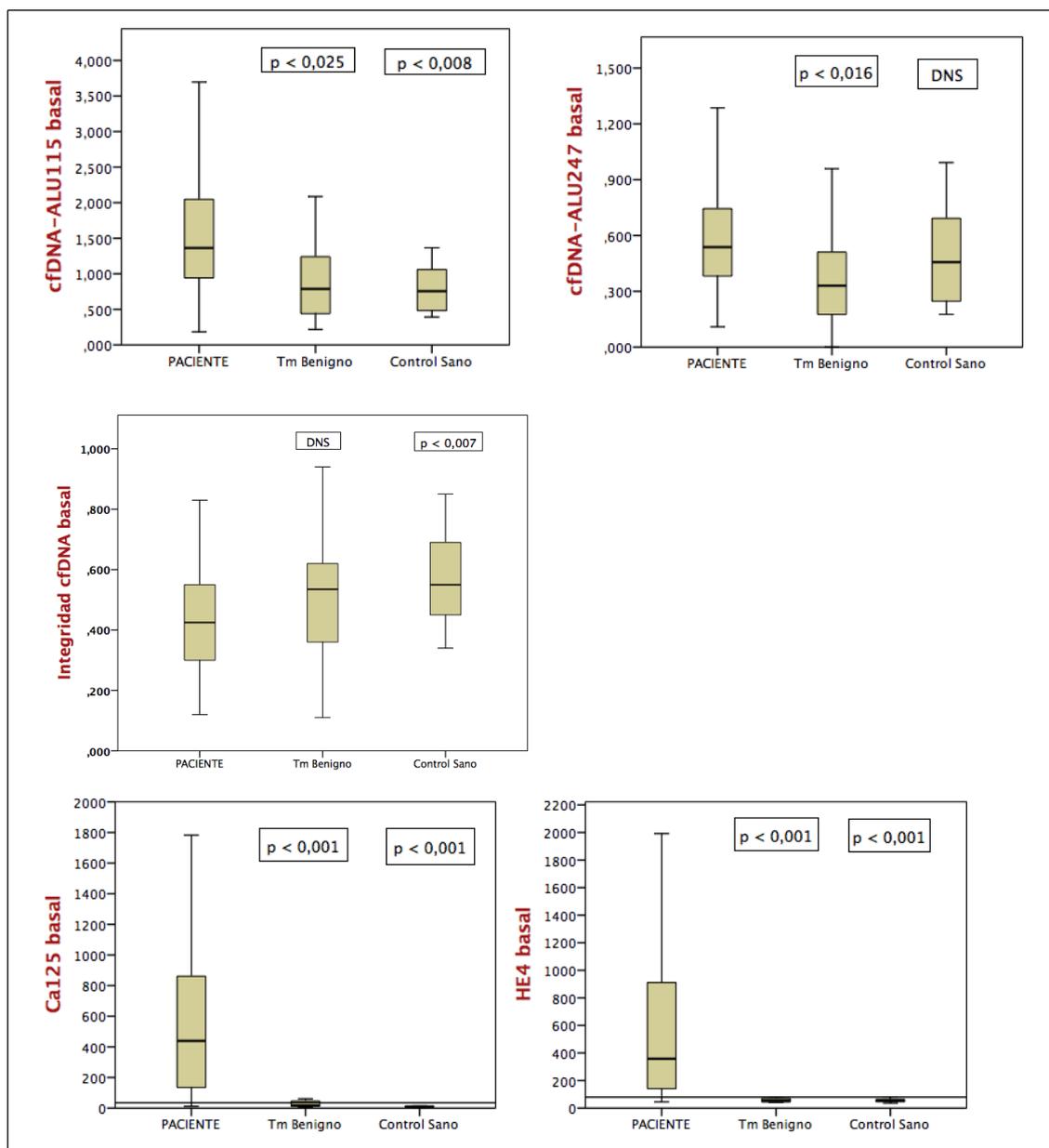
En la figura 5.6 se pueden ver gráficamente las diferencias entre los tres grupos.

TABLA 5.13. Comparación de BM entre pacientes, tumores benignos y controles sanos.

Parámetro Grupo	N	Media ± DT	Mediana (Mín – Máx)	Valor de p
<b>cfDNA115</b>				
Paciente	86	1,635 ± 1,114	1,363 (0,185 – 6,365)	1
Benigno	15	0,894 ± 0,552	0,788 (0,218 – 2,086)	< 0,025 *
Sano	16	0,807 ± 0,339	0,755 (0,392 – 1,365)	< 0,008 *
Total	117	1,427 ± 1,041	1,174 (0,185 – 6,365)	
<b>cfDNA247</b>				
Paciente	86	0,585 ± 0,272	0,537 (0,109 – 1,637)	1
Benigno	15	0,372 ± 0,253	0,330 (0,000 – 0,959)	< 0,016 *
Sano	16	0,483 ± 0,254	0,456 (0,176 – 0,992)	0,498 *
Total	117	0,544 ± 0,275	0,516 (0,000 – 1,637)	
<b>Integridad cfDNA</b>				
Paciente	86	0,430 ± 0,176	0,425 (0,12 – 0,99)	1
Benigno	14	0,529 ± 0,280	0,535 (0,11 – 1,16)	0,230 *
Sano	16	0,594 ± 0,192	0,550 (0,34 – 1,08)	< 0,007 *
Total	116	0,464 ± 0,201	0,440 (0,11 – 1,16)	
<b>Ca 125</b>				
Paciente	88	917 ± 1630	459 (11 - 11364)	1
Benigno	15	75 ± 123	16 (5 - 406)	< 0,001 **
Sano	16	12 ± 9	10 (4 - 34)	< 0,001 **
Total	119	689 ± 1452	238 (4 - 11364)	
<b>HE4</b>				
Paciente	82	822 ± 1149	358 (45 - 4957)	1
Benigno	14	73 ± 69	54 (40 - 308)	< 0,001 **
Sano	15	62 ± 29	54 (36 - 153)	< 0,001 **
Total	111	625 ± 1041	180 (36 - 4957)	

La significación mostrada hace referencia en la comparación de pacientes con los otros dos grupos. p\* ANOVA de un factor. P\*\*= test no paramétrico. DT= desviación típica; Mín= mínimo; Máx= máximo  
IC 95%= Intervalo de confianza para la media al 95%

FIGURA 5.6. Diagrama de cajas con los BM en el grupo pacientes, grupo tumores benignos y grupo de controles sanos.



En el diagrama de cajas se muestra el mínimo, primer cuartil, mediana, tercer cuartil y máximo. Se ha señalado una línea horizontal con el valor normal del parámetro. Se ha indicado el valor de p del grupo de tumores benignos y control sano respecto al grupo de pacientes. Se ha resaltado con recuadro cuando ha sido significativo. DNS= diferencia no significativa.

### COMPARACIÓN DE CTC ENTRE GRUPO PACIENTES Y GRUPO CONTROL

Para el estudio de CTC hemos comparados el grupo pacientes frente al grupo control, obteniendo diferencia significativa (tabla 5.14). Las CTC han sido positivas en 19 personas (23,8%) del grupo pacientes y solo 1 persona (3,3%) del grupo control. Correspondió a una mujer de 67 años con tumor benigno hemorrágico, con CTC 1/7,5 ml y aumento de Ca125 de 238 UI/mL, sin embargo el nivel de cfDNA115, cfDNA247 y cfDNA-Int fueron menores que la mediana. El resto de sujetos del grupo control fueron negativos para CTC. Estos datos nos muestran una sensibilidad de 23,8%, una especificidad del 96,7%, un valor predictivo positivo

de 95,0% y valor predictivo negativo del 32,2%. El cociente de probabilidad positivo ha sido de 7,21.

**TABLA 5.14. Comparación CTC entre pacientes, tumores benignos y controles sanos.**

CTC	Pacientes	Tumor benigno y Sanos	Total	Nivel de p
Positivas	19 (23,8%)	1 (3,3%)	20 (18,2%)	< 0,013
Negativas	61 (76,2%)	29 (96,7%)	90 (81,8%)	
Total	80 (100,0%)	30 (100,0%)	110 (100,0%)	

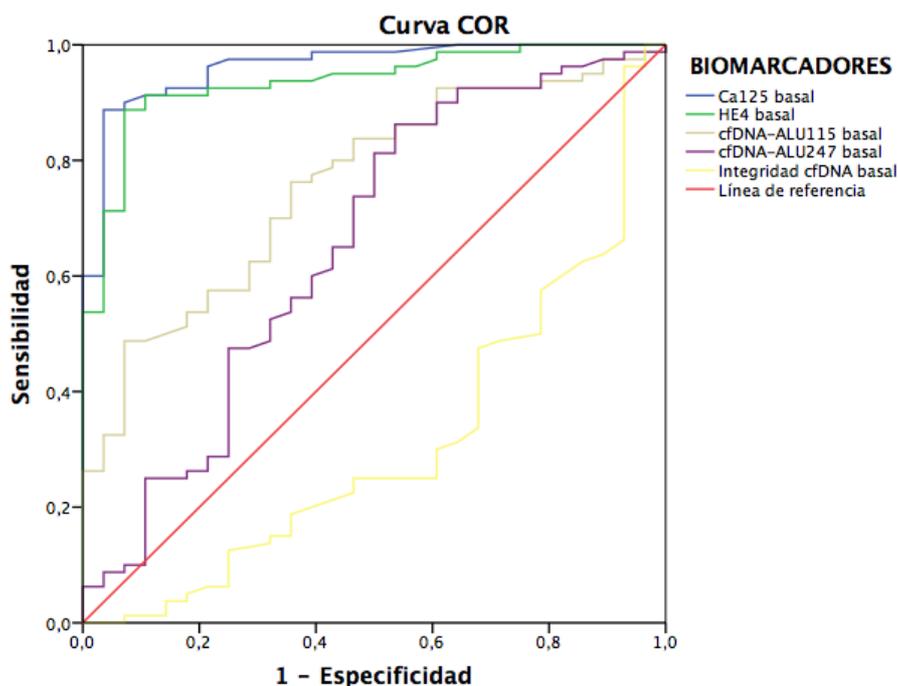
### ANÁLISIS DE CURVA ROC PARA DISCRIMINAR ENTRE PACIENTES Y GRUPO CONTROL

Para analizar la capacidad discriminatoria que presenta cada BM respecto a clasificar a los sujetos en pacientes con cáncer de ovario y sujetos sin cáncer, hemos calculado el área bajo la curva (AUC) de cada uno de los BM. No se ha incluido el valor de CTC al presentar valores discretos aislados y obtener una curva no válida.

Hemos obtenido el valor más alto para Ca-125, con 0,963 (0,928 – 0,998), seguido de HE4 con 0,936 (0,888 – 0,984) (figura 5.7). El valor más alto de AUC entre los nuevos BM a estudio lo ha presentado cfDNA115, con un AUC 0,758 (0,660 – 0,855), discretamente inferior a los BM de referencia.

El valor de cfDNA-Int presenta una relación negativa, debido a que presenta valores menores en la muestra pacientes. El cálculo inverso sobre el valor no cáncer presenta un AUC de 0,677 (0,564 – 0,789).

**FIGURA 5.7. Curva ROC de los BM respecto a la capacidad para diferenciar pacientes y grupo control.**



El valor de corte que maximiza el AUC en nuestra serie se muestra en la tabla 5.15, con los datos de sensibilidad y especificidad. Ca-125 alcanza una sensibilidad de 90,0% y especificidad de 92,9%. Para HE4 se alcanza 91,3% y 89,3%, respectivamente. De los biomarcadores relacionados con cfDNA, los mayores valores los alcanza cfDNA115, con sensibilidad 76,3% y especificidad 64,3%.

**TABLA 5.15. Valores de ROC, sensibilidad y especificidad para los BM.**

Biomarcador	AUC	Valor de corte	Sensibilidad	Especificidad
<b>Ca 125</b>	0,963 (0,928 – 0,998)	38,00	90,0%	92,9%
<b>HE4</b>	0,936 (0,888 – 0,984)	83,50	91,3%	89,3%
<b>cfDNA115</b>	0,758 (0,660 – 0,855)	0,924	76,3%	64,3%
<b>cfDNA247</b>	0,654 (0,527 – 0,781)	0,395	73,8%	53,6%
<b>cfDNA-Int *</b>	0,313 (0,196 – 0,429)			
<b>cfDNA-Int **</b>	0,677 (0,564 – 0,789)	0,485	66,7%	65,1%

\* No se calcula el valor debido a que presenta un AUC menor de 0,5.

\*\* Cálculo de cfDNA-Int para el valor no cáncer.

### 5.2.3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS PACIENTES EN EL VALOR DE LOS BIOMARCADORES.

#### cfDNA

Las variables que han influido de forma significativa en el valor de cfDNA han sido el IMC, el estado general ECOG, origen del tumor, presencia de ascitis y presencia de ganglios afectados (tabla 5.16).

**TABLA 5.16. Influencia de las características clínicas en el valor de cfDNA.**

Variable clínica	N	cfDNA115	cfDNA247	Integridad cfDNA
		Media ± DT Nivel p	Media ± DT Nivel p	Media ± DT Nivel p
<b>ECOG</b>				
ECOG 0-1	67	1,415 ± 1,003	0,539 ± 0,245	0,456 ± 0,182
ECOG 2-3	19	2,410 ± 1,165	0,746 ± 0,308	0,337 ± 0,116
Nivel de p		<b>P &lt; 0,001</b>	<b>P &lt; 0,003</b>	<b>P &lt; 0,001</b>
<b>IMC</b>				
Menor o igual a 25	30		0,506 ± 0,248	
Mayor de 25	56		0,627 ± 0,277	
Nivel de p		DNS	<b>&lt; 0,048</b>	DNS
<b>Origen del tumor</b>				
Enfermedad primaria	69	1,764 ± 1,152	0,615 ± 0,281	
Recaída tumoral	17	1,112 ± 0,770	0,462 ± 0,195	
Nivel de p		<b>P &lt; 0,030</b>	<b>P &lt; 0,036</b>	DNS
<b>Presencia de ascitis</b>				
Ausente/leve	62		0,546 ± 0,243	
Severa	24		0,684 ± 0,321	
Nivel de p		DNS	<b>&lt; 0,034</b>	DNS
<b>Presencia de ganglios afectados en estudio patológico</b>				
NO	21			0,486 ± 0,201
SI	15			0,333 ± 0,112
Nivel de p		DNS	DNS	<b>&lt; 0,007</b>

DT= Desviación Típica; DNS= Diferencia No Significativa

El estado general ECOG se ha relacionado con un mayor nivel de cfDNA115 y cfDNA247, y con un menor nivel de integridad de cfDNA. Un IMC mayor de 25 se ha relacionado con un mayor nivel de cfDNA247, sin presentar diferencia significativa en cfDNA115 ni en la integridad de cfDNA. La presentación como enfermedad primaria se relaciona con mayores niveles de cfDNA tanto 115 como 247, sin influir en la integridad del cfDNA. La presencia de ascitis solo influye de forma significativa en el valor de cfDNA247. El valor de cfDNA115 en ausente o leve ascitis fue de 1,49371 (DT 1,040877) y en ascitis severa fue mayor, de 1,99933 (DT 1,233368), pero esta diferencia no llegó a la significación (p 0,059). La presencia de ganglios afectados en el examen patológico solo influye en una menor integridad del cfDNA.

El resto de variables clínicas analizadas no influyen de forma significativa en el nivel e integridad de cfDNA. Se han evaluado la edad, sensibilidad a platino, tipo histológico de Kurman, grado histológico, estadio tumoral, presencia radiológica de adenopatías ilíacas y/o para-aórticas, tamaño del tumor ovárico y de los implantes peritoneales y presencia de *omental cake*.

## CTC

En nuestra serie, la presencia de *omental cake* ha sido la única variable clínica que ha influido de manera significativa en presentar CTC positivas o negativas (tabla 5.17). El 63,2% de pacientes con CTC positivas presentaban *omental cake*.

El resto de variables no han presentado diferencias significativas. Las características analizadas han sido edad, IMC, ECOG, sensibilidad a platino, presentación primaria o recaída, tipo histológico de Kurman, grado histológico, estadio, presencia radiológica de adenopatías ilíacas y/o para-aórticas, presencia de ascitis, tamaño del tumor ovárico y de los implantes peritoneales y ganglios afectados en el estudio patológico.

**TABLA 5.17. Influencia de las características clínicas en la presencia de CTC.**

Presencia de <i>Omental Cake</i>	SI	NO	Total	Nivel de p
<b>Presencia de CTC</b>				
<b>CTC positivas</b>	12 (35,3%)	7 (15,9%)	19 (24,4%)	< 0,048
<b>CTC negativas</b>	22 (64,7%)	37 (84,1%)	59 (75,6%)	
<b>Total</b>	34 (100,0%)	44 (100,0%)	78 (100,0%)	

## Ca125

El análisis de la influencia de las características clínicas de las pacientes en el valor de Ca-125, ha mostrado que se relaciona de forma significativa con un ECOG 2-3, un IMC>25, presentación del CEO como enfermedad de debut, la presencia de ascitis, un tamaño mayor de 2 cm en los implantes peritoneales y la presencia de *omental cake* (tabla 5.18).

No se ha obtenido diferencia significativa en relación a la edad, sensibilidad a platino, tipo histológico según modelo de Kurman, grado histológico, estadio tumoral, presencia radiológica de adenopatías ilíacas y/o para-aórticas, tamaño ovárico ni ganglios afectos en el estudio patológico. Hemos de resaltar el PCI quirúrgico que ha presentado una media de 850 UI/mL en PCI≤12 y de 1551 UI/mL en PCI>12, pero esta diferencia no ha resultado significativa (p 0,202).

**TABLA 5.18. Influencia de las características clínicas en el valor de Ca125.**

Característica clínica	N	Media	Desviación típica	Valor de p
<b>ECOG</b>				
ECOG 0-1	68	737	1469	< 0,003
ECOG 2-3	20	1528	2011	
<b>IMC</b>				
IMC ≤ 25	30	466	609	< 0,012
IMC > 25	58	1150	1925	
<b>Origen del tumor</b>				
Enfermedad primaria	71	1086	1773	< 0,001
Recaída tumoral	17	211	202	
<b>Ascitis</b>				
Ausente	32	270	358	< 0,001
Leve	32	904	903	
Severa	24	1796	2718	
<b>Tamaño implante peritoneal</b>				
Meno o igual a 2 cm	22	860	1954	< 0,016
Mayor de 2 cm	35	1142	1995	
<b>Presencia de <i>Omental cake</i></b>				
NO	50	708	1379	< 0,001
SI	36	1253	1930	

Análisis realizado mediante test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Hemos analizado el porcentaje de pacientes con Ca-125 mayor de 350 U/mL, dándose en el 76,5% de pacientes con IMC>25, el 80% con ECOG 2-3, el 64,8% de enfermedad de debut, el 87,5% con ascitis severa, el 71,4% con implantes mayores de 2 cm y en el 80% con *omental cake*. Ha sido raro encontrar un valor normal de Ca-125 en los casos de ascitis severa (solo 1 paciente de 24), implante mayor de 2 cm (en solo 2 de 35 pacientes). Ningún paciente con ECOG 2-3 o con presencia de *omental cake* ha presentado un valor normal de Ca-125.

#### HE4

Las variables clínicas que han influido de forma significativa en el valor de HE4 han sido la presentación del CEO como enfermedad primaria, la presencia de ascitis, un tamaño de la tumoración ovárica mayor de 5 cm y la presencia de *omental cake* (tabla 5.19).

No se ha obtenido diferencias en relación a la edad, valor de IMC, sensibilidad a platino, tipo histológico según modelo de Kurman, grado histológico, estadio tumoral, presencia radiológica de adenopatías ilíacas y/o para-aórticas, tamaño de los implantes peritoneales ni la presencia de ganglios afectos en el estudio patológico.

TABLA 5.19. Influencia de las características clínicas en el valor de HE4.

Característica clínica	N	Media	Desviación típica	Valor de p
<b>Origen del tumor</b>				
Enfermedad primaria	66	986	1226	< 0,001
Recaída tumoral	16	147	82	
<b>Ascitis</b>				
Ausente	28	337	454	< 0,001
Leve	32	876	1257	
Severa	22	1362	1368	
<b>Presencia de <i>Omental cake</i></b>				
NO	46	707	1264	< 0,002
SI	34	1017	987	
<b>Tamaño tumor ovárico</b>				
Meno o igual a 5 cm	17	602	936	< 0,033
Mayor de 5 cm	46	1092	1334	

Análisis realizado mediante test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Un valor de HE4 mayor de 400 pmol/L (5 veces el LSN) se ha dado en el 57% de pacientes con enfermedad de debut, el 77,3% con ascitis severa, el 63,9% con *omental cake* y 65,2% con tumor mayor de 5 cm. Ninguna de las pacientes con ascitis, tanto leve como severa, tuvieron un nivel de HE4 normal.

#### CORRELACION DE BIOMARCADORES CON LAS VARIABLES ANALITICAS GENERALES

La cuantificación de cfDNA, tanto cfDNA115 como cfDNA247, han sido los BM que mejor correlación han presentado con las variables analíticas (ver tabla 5.20). El mayor nivel de correlación ha sido con el valor de albúmina y de PMN.

La integridad de cfDNA, sin embargo, no ha presentado correlación con ninguna variable analítica.

Dentro de los BM de referencia, HE4 ha presentado mayor correlación que Ca-125, el cual solo ha presentado relación significativa con albúmina y plaquetas. De las variables analíticas, la albúmina ha sido la que mejor correlación ha presentado con los BM, mientras que hemoglobina no se ha relacionado con ningún BM.

TABLA 5.20. Correlaciones de los biomarcadores con las variables analíticas generales.

	cfDNA115	cfDNA247	Int-cfDNA	Ca125	HE4
<b>Albúmina</b>	- 0,343*	- 0,404*	n.s.	- 0,210**	- 0,279*
<b>Hemoglobina</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>LDH</b>	0,165**	0,171**	n.s.	n.s.	0,269**
<b>PMN</b>	0,194**	0,377*	n.s.	n.s.	0,164**
<b>Plaquetas</b>	n.s.	0,311*	n.s.	0,220**	0,255**

Se muestran las correlaciones que han resultado positivas. \* correlación de Pearson \*\* correlación Tau-b de Kendall Int-cfDNA= integridad cfDNA; n.s.=no significativo; LDH=lactato deshidrogenasa; PMN= polimorfoneutrófilos

En relación a la presencia de CTC, ésta no se ha relacionado con ninguna variable analítica general analizada.

## RESUMEN

Hemos resumido en la tabla 5.21 la influencia de las características clínicas en el valor de los diferentes BM. Un estado general ECOG 2-3 se relaciona con un aumento del valor de los 3 parámetros analizados de cfDNA y de Ca125. La enfermedad de presentación primaria condiciona un mayor cfDNA115, cfDNA247, Ca125 y HE4 que la recaída tumoral. Un valor de IMC mayor de 25 condiciona un valor aumentado de cfDNA247 y de Ca125. La presencia de ascitis se relaciona con aumento de cfDNA247, Ca125 y HE4. La presencia de ganglios positivos en el estudio patológico solo se relaciona con la integridad del cfDNA. La presencia de *omental cake* resulta el único determinante significativo con CTC, influyendo también en el valor de HE4. Un tamaño ovárico mayor de 5 cm solo se relaciona con mayor HE4.

Dentro de las variables analíticas, el valor de albúmina, LDH y PMN han sido los que mejor correlación han mostrado con cfDNA. CTC y la integridad de cfDNA no se han relacionado con ninguna de las variables analíticas analizadas.

**TABLA 5.21. Resumen de la influencia de características clínicas en el valor de los biomarcadores.**

cfDNA115	cfDNA247	Integridad cfDNA	CTC	Ca125	HE4
ECOG 2-3	ECOG 2-3	ECOG 2-3	Omental cake	ECOG 2-3	Enf primaria
Enf primaria	Enf primaria	Ganglios +		Enf primaria	Ascitis
	IMC>25			IMC>25	Omental cake
	Ascitis			Ascitis	Tamaño ovárico
				Implante >2cm	>5cm
				Omental cake	
Albúmina	Albúmina			Albúmina	Albúmina
LDH	LDH			Plaquetas	LDH
PMN	PMN				PMN
	Plaquetas				Plaquetas

Enf=enfermedad; IMC= Índice de masa corporal; LDH= lactato deshidrogenasa; PMN= polimorfo-neutrófilos

#### 5.2.4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS EN EL NIVEL DE LOS BM.

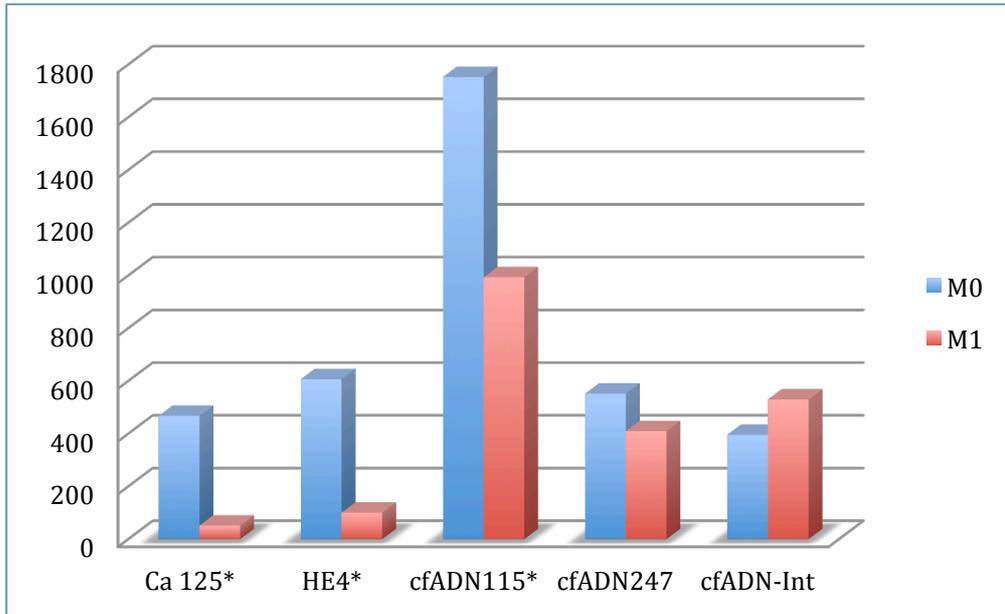
##### VALORACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA CIRUGÍA PERITONEAL PRIMARIA

El estudio de la variación de cfDNA antes y después de la cirugía ha mostrado que el valor de cfDNA115 presentó una disminución significativa, mientras que cfDNA247 y la integridad de cfDNA no presentaron diferencias significativas (tabla 5.22 y figura 5.8). Los BM de referencia Ca-125 y HE4 han presentado reducción significativa con la cirugía.

**TABLA 5.22. Valoración del efecto de la CPP sobre el valor de los BM.**

Biomarcador	N	Antes de cirugía	Después de cirugía	Nivel de p
		Media ± DT	Media ± DT	
Ca 125	20	467 ± 499	51 ± 65	< 0,001*
HE4	13	606 ± 974	100 ± 104	< 0,001*
cfDNA115	14	1,752 ± 1,453	0,993 ± 1,043	< 0,016*
cfDNA247	14	0,551 ± 0,258	0,409 ± 0,233	0,180**
cfDNA-Int	14	0,395 ± 0,184	0,529 ± 0,284	0,119**

\* Prueba no paramétrica de Wilcoxon; \*\* T-Student para muestras relacionadas

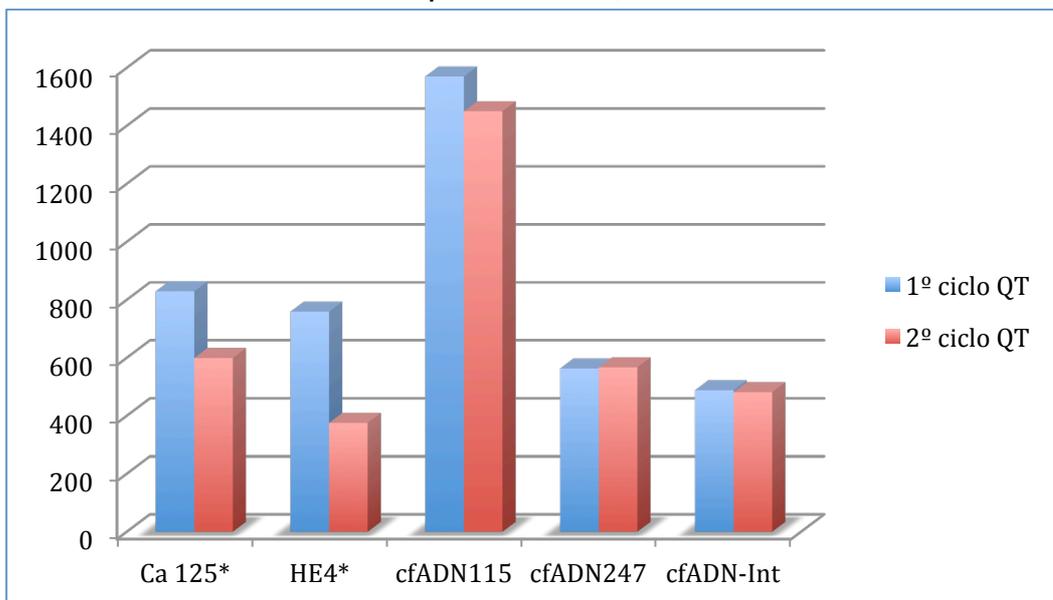
**FIGURA 5.8. Valoración del efecto de la CPP sobre el valor de los BM.**

Los valores de cfDNA se han multiplicado x 1000 para adecuarse a la escala.

\* Valores con diferencias estadísticamente significativas

#### VALORACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL PRIMER CICLO DE QT

La comparación de los valores antes y después del primer ciclo de QT no ha mostrado reducción significativa en ninguno de los valores de cfDNA. Solo presentaron disminución significativa los BM de referencia (figura 5.9 y tabla 5.23).

**FIGURA 5.9. Valoración del efecto del primer ciclo de QT sobre el valor de los BM.**

Los valores de cfDNA se han multiplicado x 1000 para adecuarse a la escala.

\* Valores con diferencias estadísticamente significativas

**TABLA 5.23. Valoración del efecto del primer ciclo de QT sobre el valor de los BM.**

Biomarcador	N	En 1º ciclo QT	En 2º ciclo QT	Nivel de p
		Media ± DT	Media ± DT	
Ca 125	78	829 ± 1725	599 ± 1618	< 0,001*
HE4	66	759 ± 1193	375 ± 657	< 0,001*
cfDNA115	74	1,570 ± 1,149	1,450 ± 1,371	0,116**
cfDNA247	74	0,563 ± 0,265	0,567 ± 0,422	0,938**
cfDNA-Int	74	0,488 ± 0,206	0,481 ± 0,215	0,289**

\* Prueba no paramétrica de Wilcoxon; \*\* T-Student para muestras relacionadas; QT= quimioterapia

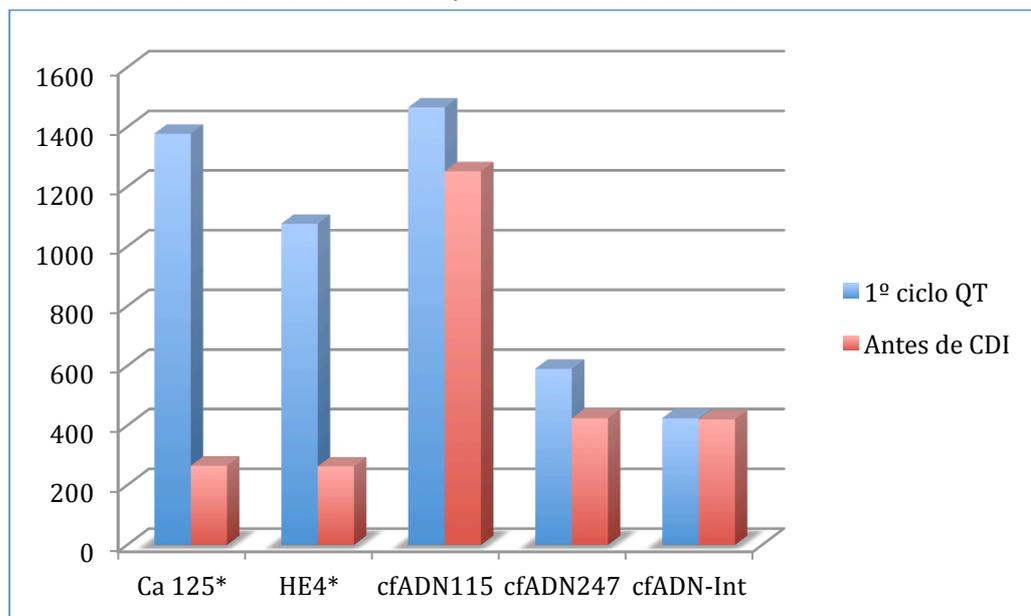
### VALORACIÓN DE LA INFLUENCIA DE QTNA

La comparación de los BM antes del primer ciclo de QT y antes de CDI solo se ha realizado en 9 pacientes, sin presentar diferencias significativas en ninguno de los valores de cfDNA (tabla 5.24 y figura 5.10). Hemos obtenido que la QTNA solo produce una reducción significativa en el nivel de Ca-125 y HE4.

**TABLA 5.24. Valoración del efecto de la QTNA sobre el valor de los BM.**

Biomarcador	N	En 1º ciclo QT (M0)	Antes de CDI (M3)	Nivel de p
		Media ± DT	Media ± DT	
Ca 125	40	1378 ± 2260	265 ± 517	< 0,001*
HE4	39	1076 ± 1380	263 ± 382	< 0,001*
cfDNA115	9	1,466 ± 0,633	1,252 ± 0,851	0,371**
cfDNA247	9	0,590 ± 0,230	0,424 ± 0,198	0,080**
cfDNA-Int	9	0,424 ± 0,114	0,420 ± 0,183	0,951**

\* Prueba no paramétrica de Wilcoxon; \*\* T-Student para muestras relacionadas  
QT= quimioterapia; CDI= cirugía de intervalo

**FIGURA 5.10. Valoración del efecto de QTNA sobre el valor de los BM.**

Los valores de cfDNA se han multiplicado x 1000 para adecuarse a la escala.

\* Valores con diferencias estadísticamente significativas

### 5.2.5. CORRELACIÓN ENTRE LOS DIFERENTES BIOMARCADORES.

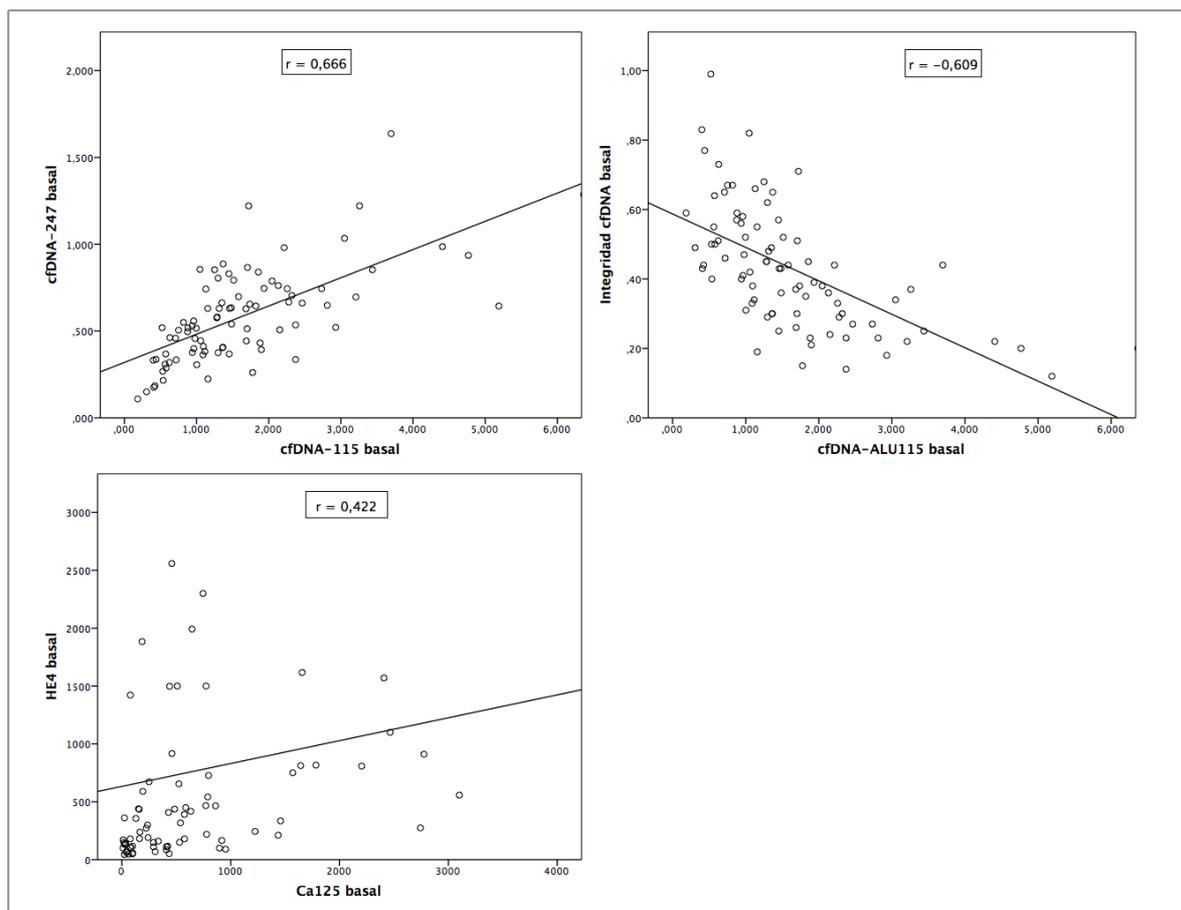
En este apartado, hemos analizado la correlación entre los BM cuantitativos continuos mediante la correlación de Pearson y de Kendall. Se ha encontrado correlación positiva entre cfDNA115 y cfDNA247 ( $r=0,666$ ), y una relación inversa entre cfDNA115 y la integridad de cfDNA ( $r=-0,609$ ). No ha habido correlación de ningún parámetro de cfDNA con los BM de referencia. Ca125 y HE4 han mostrado correlación positiva con un coeficiente  $r=0,42$ . (tabla 5.25). En la figura 5.11 se puede observar un gráfico de dispersión de las correlaciones.

**TABLA 5.25. Correlaciones entre los diferentes biomarcadores.**

	cfDNA115	cfDNA247	Int-cfDNA	Ca125	HE4
cfDNA115	1	0,666*	- 0,609*	n.s.	n.s.
cfDNA247		1	n.s.	n.s.	n.s.
Int-cfDNA			1	n.s.	n.s.
Ca125				1	0,422**
HE4					1

Se muestran las correlaciones que han resultado positivas. \* correlación de Pearson \*\* correlación Tau-b de Kendall  
Int-cfDNA= integridad cfDNA; n.s.=no significativo

**FIGURA 5.11. Gráfico con la correlación entre las variables continuas.**



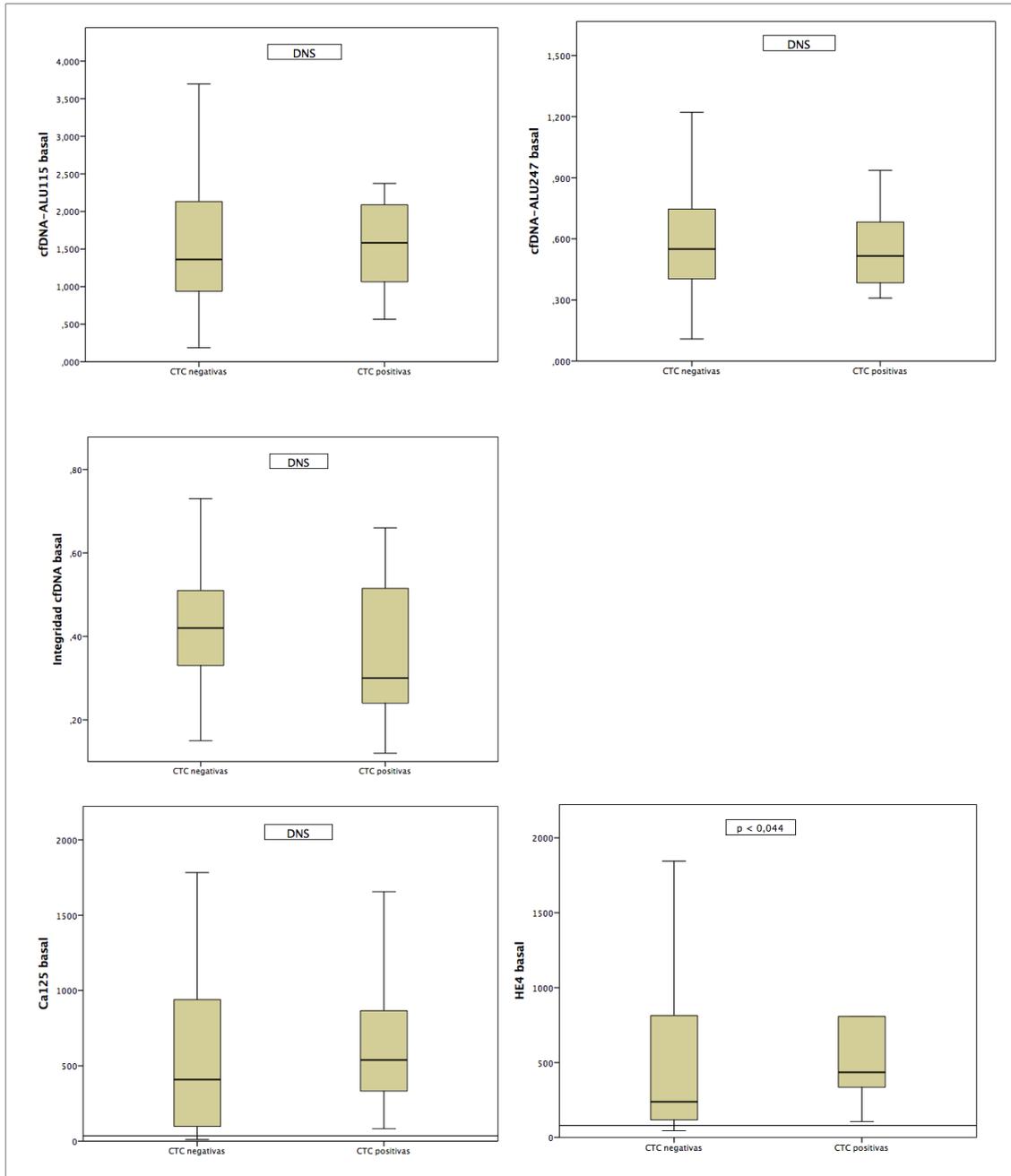
Para el análisis de la relación de CTC con el resto de BM, hemos comparado las medias entre el grupo de CTC negativas y positivas, encontrando relación significativa únicamente con el valor de HE4 (tabla 5.26). La media ha sido  $718 \pm 1123$  pmol/L en el grupo de CTC negativas y  $920 \pm 987$  pmol/L para CTC positivas, con nivel de significación  $p < 0,044$ . El resto de BM no muestra diferencias significativas. En el gráfico 5.12 puede verse la representación gráfica de los valores de los BM en función de positividad o no de CTC.

**TABLA 5.26. Relación de CTC con el resto de BM.**

Biomarcador	CTC -	CTC +	Valor de p
<b>cfDNA-115</b>			
N	61	19	0,463 *
Media $\pm$ DT	$1,621 \pm 1,112$	$1,843 \pm 1,234$	
Mediana (mín – máx)	1,361 (0,185 – 6,365)	1,690 (0,564 – 5,189)	
<b>cfDNA-247</b>			
N	61	19	0,708 *
Media $\pm$ DT	$0,588 \pm 0,284$	$0,562 \pm 0,210$	
Mediana (mín – máx)	0,550 (0,109 – 1,637)	0,516 (0,309 – 0,936)	
<b>Integridad cfDNA</b>			
N	61	19	0,293 *
Media $\pm$ DT	$0,427 \pm 0,151$	$0,382 \pm 0,191$	
Mediana (mín – máx)	0,420 (0,150 – 0,830)	0,300 (0,120 – 0,820)	
<b>Ca 125</b>			
N	61	19	0,419 **
Media $\pm$ DT	$1001 \pm 1907$	$741 \pm 690$	
Mediana (mín – máx)	409 (11 – 11364)	539 (83 – 2408)	
<b>HE4</b>			
N	56	18	<b>&lt; 0,044 **</b>
Media $\pm$ DT	$718 \pm 1123$	$920 \pm 987$	
Mediana (mín – máx)	238 (45 – 4957)	435 (106 – 3718)	

\* T-Student; \*\* Test no paramétrico; CTC -: CTC con valor negativo; CTC +: CTC con valor positivo

FIGURA 5.12. Gráfico de cajas de los BM en función de CTC.



En el diagrama de cajas se muestra el mínimo, primer cuartil, mediana, tercer cuartil y máximo.

## 5.2.6. VALORACIÓN DEL VALOR PREDICTIVO DE RESPUESTA DE LOS BIOMARCADORES.

### 5.2.6.1. VALOR PREDICTIVO RESPECTO A LA RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE.

Se han incluido las 44 pacientes con enfermedad avanzada (estadio IIB-IV) en donde se ha indicado tratamiento con QTNA y CDI. Se analiza el valor basal y la reducción tras el primer ciclo de QT.

#### Valor predictivo del nivel basal del BM

La comparación de medias de los niveles basales de los BM entre los grupos respuesta y no respuesta nos ha mostrado que sólo el cfDNA115 se relaciona de forma significativa con respuesta a QTNA (tabla 5.27 y figura 5.13). Un valor menor de cfDNA115 es predictivo de respuesta a QTNA ( $p < 0,019$ ).

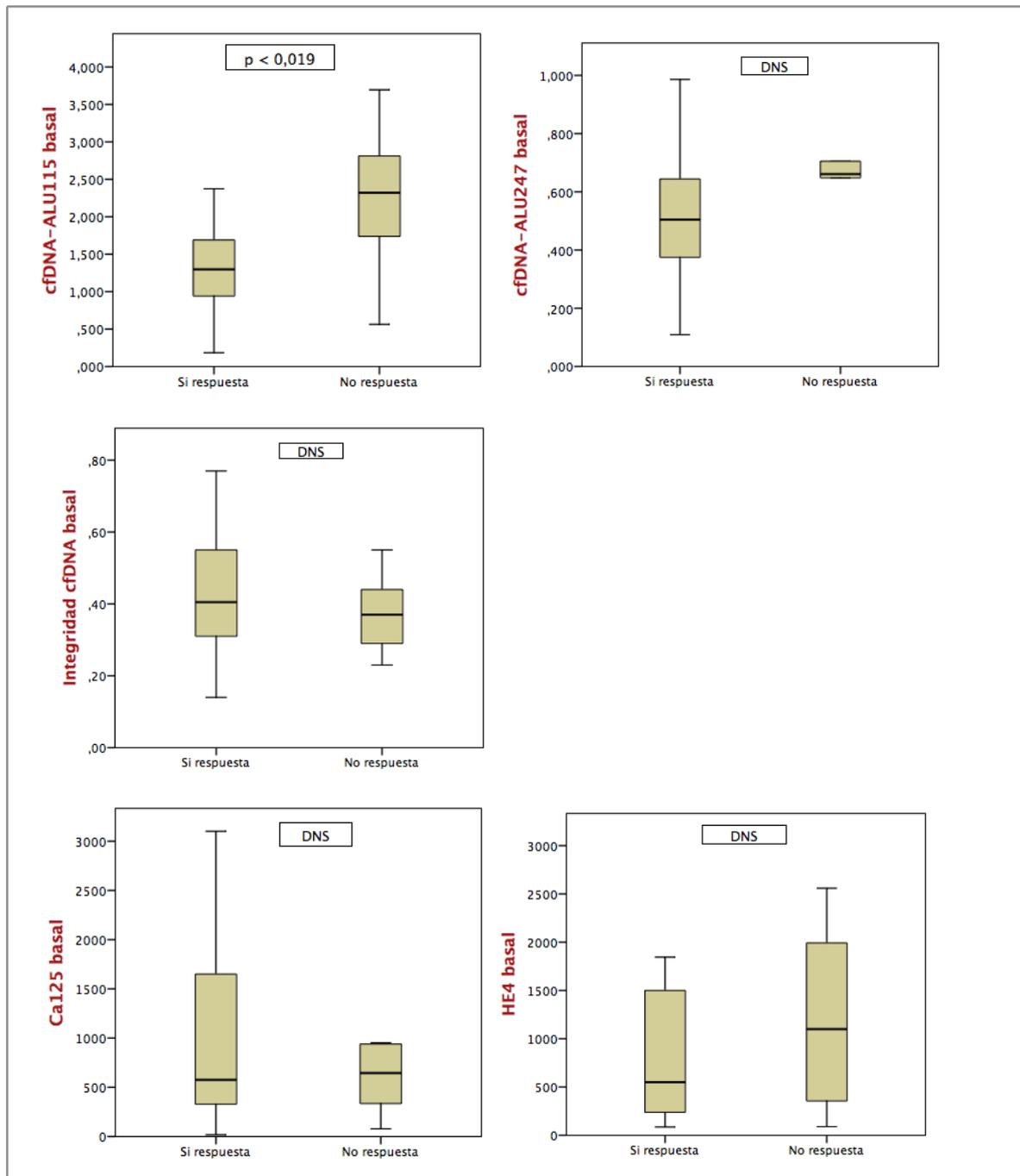
**TABLA 5.27. Valor predictivo del nivel basal de los BM respecto a la respuesta a QTNA.**

Biomarcador	Respuesta <sup>†</sup>	No respuesta <sup>‡</sup>	Valor de p
<b>cfDNA115</b>			
N	34	9	
Media $\pm$ DT	1,398 $\pm$ 0,816	2,195 $\pm$ 1,072	<b>&lt; 0,019 *</b>
Mediana (mín – máx)	1,298 (0,185 – 4,407)	2,321 (0,564 – 3,696)	
<b>cfDNA247</b>			
N	34	9	
Media $\pm$ DT	0,523 $\pm$ 0,212	0,758 $\pm$ 0,422	0,139 *
Mediana (mín – máx)	0,504 (0,109 – 0,986)	0,661 (0,309 – 1,637)	
<b>Integridad cfDNA</b>			
N	34	9	
Media $\pm$ DT	0,424 $\pm$ 0,145	0,371 $\pm$ 0,111	0,313 *
Mediana (mín – máx)	0,405 (0,14 – 0,77)	0,370 (0,23 – 0,55)	
<b>Ca 125</b>			
N	35	9	
Media $\pm$ DT	1509 $\pm$ 2384	763 $\pm$ 719	0,673 **
Mediana (mín – máx)	576 (18 – 11364)	645 (78 – 2465)	
<b>HE4</b>			
N	34	9	
Media $\pm$ DT	1000 $\pm$ 1253	1447 $\pm$ 1545	0,455 **
Mediana (mín – máx)	550 (86 – 4957)	1100 (90 – 4879)	

\* T-Student; \*\* Test no paramétrico

<sup>†</sup> Respuesta= respuesta completa + respuesta parcial; <sup>‡</sup> No respuesta= enfermedad estable + progresión.

FIGURA 5.13. Valor predictivo del nivel basal de los BM respecto a la respuesta a QTNA.



En el diagrama de cajas se muestra el mínimo, primer cuartil, mediana, tercer cuartil y máximo.  
DNS= diferencia no significativa

### Valor predictivo de la reducción del BM tras un ciclo de QT

Se han incluido 41 pacientes para el análisis. Primero se ha estudiado el valor predictivo de la reducción del nivel de cfDNA respecto a un ciclo de QT. La comparación de las medias del porcentaje de reducción no ha mostrado diferencias respecto a ningún cfDNA (tabla 5.28). Un hecho a destacar es que en las pacientes que no han respondido a QTNA la media de cfDNA115 ha aumentado, aunque no alcanza la significación. La media en el caso de cfDNA247 y la integridad de cfDNA ha aumentado en los dos. De los BM de referencia, ambos

han disminuido su valor en los dos grupos, pero solo una mayor reducción de HE4 se ha relacionado de forma significativa con respuesta a QTNA ( $p < 0,38$ ).

**TABLA 5.28. Valor predictivo de la reducción de los BM tras un ciclo de tratamiento respecto a la respuesta a QTNA.**

Biomarcador	N	Respuesta <sup>†</sup>	N	No respuesta <sup>‡</sup>	Nivel de p
		Media reducción ± DT	Media reducción ± DT		
cfDNA115	31	0,14 ± 75	9	-19 ± 114	0,833**
cfDNA247	30	-18 ± 106	9	-30 ± 132	0,973**
cfDNA-Int	31	-23 ± 68	9	-22 ± 43	0,859**
Ca 125	33	36 ± 33	8	32 ± 24	0,599**
HE4	31	45 ± 31	7	13 ± 53	< 0,038*

Se muestra la media del porcentaje de reducción del BM y la desviación típica (DT) entre el valor basal y tras un ciclo de QTNA. \* T-Student; \*\* Test no paramétrico

<sup>†</sup> Respuesta= respuesta completa + respuesta parcial; <sup>‡</sup> No respuesta= enfermedad estable + progresión.

### Valor predictivo de la presencia de CTC

El análisis del valor de la presencia de CTC respecto a la respuesta a QTNA no ha mostrado diferencias significativas ( $p 0,479$ ), es decir, la presencia de CTC no es predictivo de respuesta a QTNA (tabla 5.29).

**TABLA 5.29. Valor predictivo de CTC respecto a la respuesta a QTNA.**

	Respuesta <sup>†</sup>	No respuesta <sup>‡</sup>	Total	RR (IC 95%)	Valor de p
<b>CTC</b>					
CTC negativas	25 (80,6%)	6 (19,4%)	31 (100%)	1,152	0,479
CTC positivas	7 (70,0%)	3 (30,0%)	10 (100%)	(0,741 – 1,790)	
Total	32	9	41		

<sup>†</sup> Respuesta= respuesta completa + respuesta parcial; <sup>‡</sup> No respuesta= enfermedad estable + progresión.

### Análisis multivariante

Para el estudio multivariante hemos valorado la capacidad predictiva del nivel basal de cfDNA115 en función de las variables clínicas que presentaron relación significativa con la respuesta final. Se han incluido un total de 43 pacientes. Tras el análisis multivariante, el tipo histológico II de Kurman y un nivel basal bajo de cfDNA115 son las dos únicas variables con valor predictivo estadísticamente significativo (tabla 5.30).

**TABLA 5.30. Análisis multivariante de los factores relacionados con respuesta a QTNA.**

Característica clínica:	Valor de p	OR (IC 95%)
<b>Respuesta a QT neoadyuvante</b>		
Ausencia o leve presencia de ascitis	0,213	
Grado histológico 2-3	0,548	
<b>Tipo histológico II de Kurman</b>	< 0,026	<b>9,318 (1,309 – 66,353)</b>
<b>Nivel basal de cfDNA115 bajo</b>	< 0,041	<b>2,535 (1,040 – 6,179)</b>

### 5.2.6.2. VALOR PREDICTIVO DE RESULTADO ÓPTIMO DEL VALOR PREVIO A CIRUGÍA.

Se han incluido 52 pacientes con enfermedad avanzada (estadio IIB-IV) que fueron intervenidas con intención radical, tanto cirugía primaria como de intervalo (tabla 5.31 y figura 5.14).

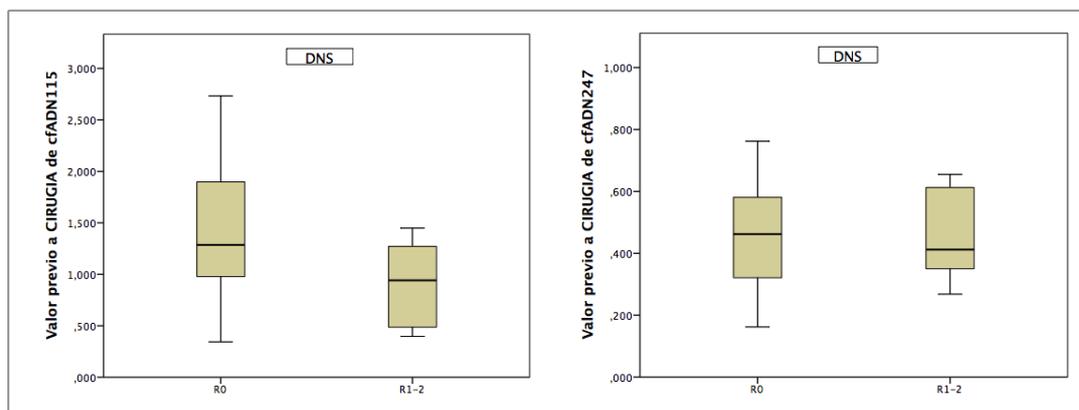
Los resultados obtenidos muestran que el nivel de integridad de cfDNA ha sido el único valor de cfDNA que se ha sido predictivo de resultado óptimo de cirugía peritoneal. De los BM de referencia sólo HE4 ha mostrado relación significativa con cirugía óptima. El valor de Ca-125 muestra diferencia de 564 UI/mL en R1-2 frente a 187 UI/mL en cirugía R0, pero esta diferencia no ha alcanzado la significación en nuestra serie (p 0,094).

**TABLA 5.31. Valor predictivo de resultado óptimo del valor previo a cirugía de los BM.**

Biomarcador	Resultado R0	Resultado R1-2	Valor de p
<b>cfDNA115</b>			
N	21	7	0,254 **
Media ± DT	1,407 ± 0,730	1,603 ± 2,135	
Mediana (mín – máx)	1,286 (0,34 – 2,73)	0,942 (0,40 – 6,36)	
<b>cfDNA247</b>			
N	21	7	0,381 *
Media ± DT	0,467 ± 0,176	0,556 ± 0,349	
Mediana (mín – máx)	0,462 (0,16 – 0,76)	0,412 (0,27 – 1,29)	
<b>Integridad cfDNA</b>			
N	21	7	< 0,050 *
Media ± DT	0,387 ± 0,156	0,544 ± 0,224	
Mediana (mín – máx)	0,420 (0,19 – 0,73)	0,640 (0,20 – 0,83)	
<b>Ca 125</b>			
N	40	12	0,094 **
Media ± DT	187 ± 313	564 ± 721	
Mediana (mín – máx)	55 (10 – 1436)	202 (24 – 1877)	
<b>HE4</b>			
N	36	11	< 0,021 **
Media ± DT	205 ± 326	465 ± 525	
Mediana (mín – máx)	94 (16 – 1884)	331 (69 – 1875)	

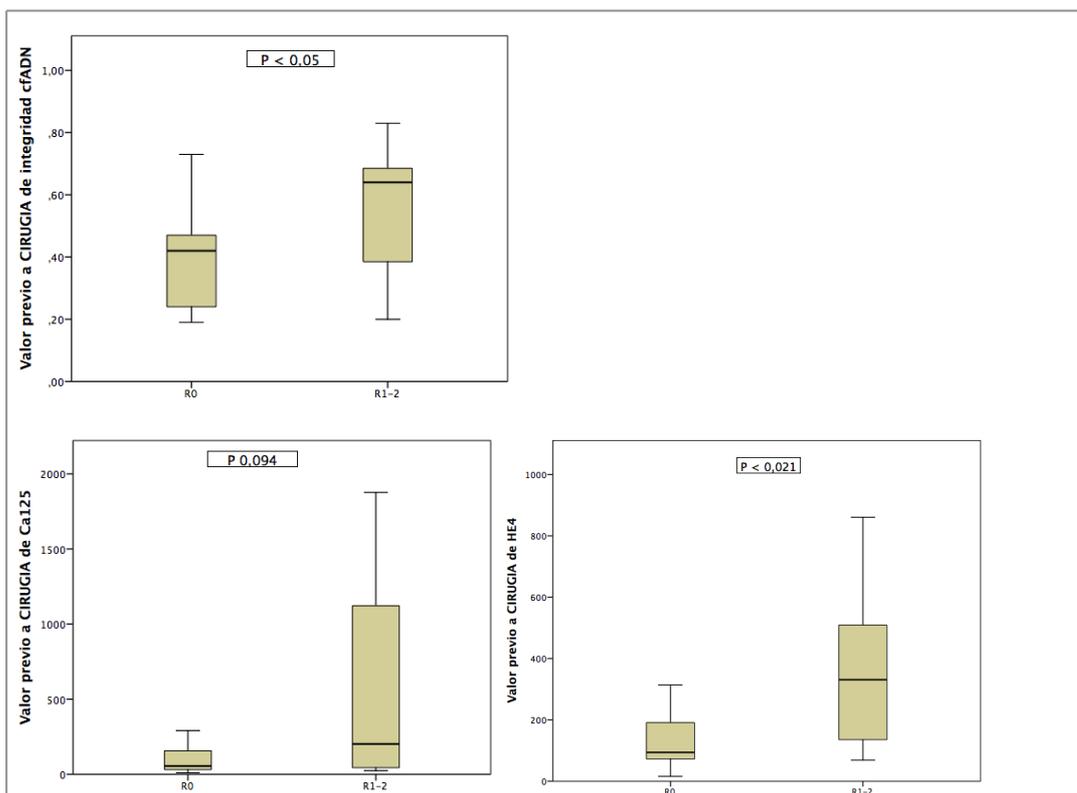
\* T-Student; \*\* Test no paramétrico

**FIGURA 5.14. Valor predictivo del nivel de los BM respecto al resultado óptimo de cirugía.**



(continúa)

FIGURA 5.14. (continuación)



En el diagrama de cajas se muestra el mínimo, primer cuartil, mediana, tercer cuartil y máximo.

Posteriormente, hemos realizado el estudio del valor predictivo de la presencia de CTC respecto de cirugía óptima (tabla 5.32). Hemos analizado a 53 pacientes con estadio avanzado intervenidos de CPP o CDI, mostrando que la presencia de CTC tiene tendencia a predecir un resultado de cirugía óptima R0, pero sin alcanzar la significación (p 0,066).

TABLA 5.32. Valor predictivo de CTC respecto a cirugía óptima R0.

	Cirugía R0	Cirugía R1-2	Total	RR (IC 95%)	Valor de p
CTC positivas	8 (100,0%)	0 (0,0%)	8 (100,0%)	1,452	0,066
CTC negativas	31 (68,9%)	14 (31,1%)	45 (100,0%)	(1,193 – 1,767)	
Total	39	14	53		

### Análisis multivariante

En el análisis multivariante hemos analizado las variables clínicas junto con los BM que han resultado significativos en el univariante. Se han podido analizar 40 pacientes con estadio avanzado en las que se ha realizado CPP o CDI. El resultado muestra las dos únicas variables predictivas de cirugía R0 que se mantienen son un PCI ≤ 12 y un nivel de albúmina mayor o igual de 3,5 gr/dL (tabla 5.33). La mayor asociación la presenta el valor del PCI quirúrgico con una OR de 77,857 (p < 0,002). No se ha incluido el valor de la integridad de cfDNA por el escaso número de eventos resultante.

**TABLA 5.33. Análisis multivariante del valor predictivo de resultado quirúrgico óptimo R0.**

Característica clínica	Valor de p	OR (IC 95%)
IMC menor de 25	0,064	3,838 (0,923 – 15,963)
ECOG 0-1	0,778	
Ausencia de ascitis o leve	0,508	
Ausencia de <i>omental cake</i>	0,735	
<b>PCI ≤ 12</b>	<b>&lt; 0,002</b>	<b>77,857 (4,864 – 1246,164)</b>
<b>Albúmina &lt; 3,5 gr/dL</b>	<b>&lt; 0,042</b>	<b>0,063 (0,004 – 0,903)</b>
Nivel de HE4 antes de la cirugía	0,479	
Presencia de CTC positivas	0,259	

OR= odds ratio; IC 95%=intervalo confianza 95%

### 5.2.6.3. VALOR PREDICTIVO RESPECTO A LA RESPUESTA TUMORAL FINAL.

Se han incluido 71 pacientes con enfermedad avanzada (estadio IIB-IV) en donde es valorable la respuesta final. Se han desestimado las pacientes con pérdida de seguimiento, las fallecidas por otra causa en las que no ha podido valorarse la respuesta y las pacientes que aún están en tratamiento. Se analiza el valor basal y el valor post-quirúrgico del BM.

#### Valor predictivo del nivel basal del BM

La comparación de medias de los niveles basales de los BM entre los grupos respuesta y no respuesta muestra que no hay diferencias significativas en ningún BM (tabla 5.34). Por lo tanto, en nuestra serie el nivel basal de los BM no presenta valor predictivo de la respuesta tumoral al finalizar el tratamiento con quimioterapia y cirugía.

**TABLA 5.34. Valor predictivo del nivel basal de los BM respecto a la respuesta final.**

Biomarcador	Respuesta †	No respuesta ‡	Valor de p
<b>cfDNA115</b>			
N	54	15	
Media ± DT	1,502 ± 0,964	1,733 ± 1,124	0,430 *
Mediana (mín – máx)	1,333 (0,185 – 5,189)	1,738 (0,408 – 3,438)	
<b>cfDNA247</b>			
N	54	15	
Media ± DT	0,539 ± 0,251	0,597 ± 0,290	0,453 *
Mediana (mín – máx)	0,514 (0,109 – 1,637)	0,648 (0,176 – 1,221)	
<b>Integridad cfDNA</b>			
N	54	15	
Media ± DT	0,421 ± 0,158	0,423 ± 0,195	0,967 *
Mediana (mín – máx)	0,425 (0,12 – 0,83)	0,380 (0,23 – 0,99)	
<b>Ca 125</b>			
N	56	15	
Media ± DT	886 ± 2870	1234 ± 2879	0,844 **
Mediana (mín – máx)	415 (11 – 8964)	335 (29 – 11364)	

(continúa)

**TABLA 5.34. (continuación)**

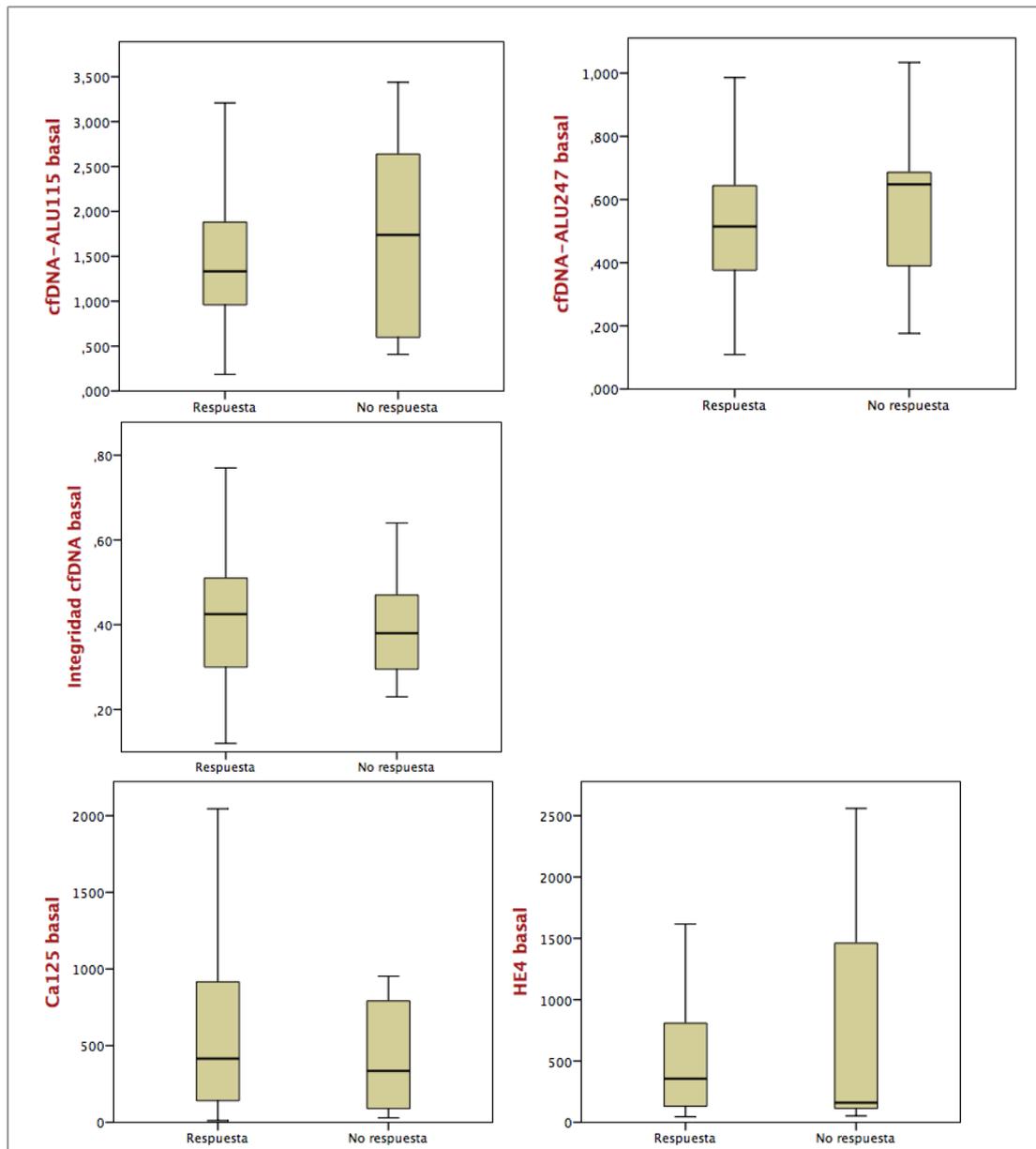
Biomarcador	Respuesta <sup>†</sup>	No respuesta <sup>‡</sup>	Valor de p
<b>HE4</b>			
N	53	15	
Media ± DT	798 ± 1153	966 ± 1361	0,684 **
Mediana (mín – máx)	356 (45 – 4957)	160 (52 – 4879)	

\* T-Student; \*\* Test no paramétrico

<sup>†</sup> Respuesta= respuesta completa + respuesta parcial; <sup>‡</sup> No respuesta= enfermedad estable + progresión.

En la figura 5.15 podemos ver gráficamente en un diagrama de cajas la ausencia de diferencias entre los valores basales de los BM en función de presentar respuesta tumoral o no tras finalizar el tratamiento.

**FIGURA 5.15. Valor predictivo del nivel basal de los BM respecto a la respuesta final.**



En el diagrama de cajas se muestra el mínimo, primer cuartil, mediana, tercer cuartil y máximo.

### Valor predictivo del valor post-quirúrgico de los BM

Ningún valor de cfDNA tras cirugía ha sido predictivo de respuesta final. El único BM que presenta valor predictivo ha sido Ca-125 ( $p < 0,001$ ) (tabla 5.35).

**TABLA 5.35. Valor predictivo del nivel tras cirugía de los BM respecto a la respuesta final.**

Biomarcador	Respuesta <sup>†</sup>	No respuesta <sup>‡</sup>	Valor de p
<b>cfDNA115</b>			
N	45	5	
Media $\pm$ DT	1,187 $\pm$ 0,898	1,610 $\pm$ 1,711	0,370 *
Mediana (mín – máx)	0,882 (0,214 – 4,462)	1,016 (0,607 – 4,648)	
<b>cfDNA247</b>			
N	45	5	
Media $\pm$ DT	0,430 $\pm$ 0,210	0,446 $\pm$ 0,366	0,881 *
Mediana (mín – máx)	0,386 (0,141 – 1,092)	0,306 (0,197 – 1,092)	
<b>Integridad cfDNA</b>			
N	45	5	
Media $\pm$ DT	0,448 $\pm$ 0,214	0,314 $\pm$ 0,058	0,174 *
Mediana (mín – máx)	0,380 (0,17 – 1,18)	0,320 (0,23 – 0,39)	
<b>Ca 125</b>			
N	52	6	
Media $\pm$ DT	51 $\pm$ 62	533 $\pm$ 522	<b>&lt; 0,001 **</b>
Mediana (mín – máx)	31 (5 – 347)	386 (34 – 1534)	
<b>HE4</b>			
N	45	6	
Media $\pm$ DT	84 $\pm$ 65	215 $\pm$ 216	0,128 **
Mediana (mín – máx)	64 (43 – 431)	124 (48 – 594)	

<sup>†</sup> Respuesta= respuesta completa + respuesta parcial; <sup>‡</sup> No respuesta= enfermedad estable + progresión.

El estudio de la relación de la respuesta con una reducción mayor del 50% da similares resultados, siendo significativo sólo con HE4 (RR 1,376,  $p < 0,022$ ). El resto de BM muestran diferencias no significativas.

### Valor predictivo de la presencia de CTC

El análisis de la presencia de CTC respecto a la respuesta final se ha realizado sobre 65 pacientes, no encontrando diferencias significativas en la distribución (tabla 5.36). Por lo tanto, la presencia de CTC no presenta valor predictivo de respuesta al finalizar el tratamiento.

**TABLA 5.36. Valor predictivo de CTC respecto a la respuesta final.**

	Respuesta <sup>†</sup>	No respuesta <sup>‡</sup>	Total	RR (IC 95%)	Valor de p
<b>CTC</b>					
CTC negativas	40 (76,9%)	12 (23,1%)	52 (100%)	0,909	0,546
CTC positivas	11 (84,6%)	2 (15,4%)	13 (100%)	(0,690 – 1,197)	
Total	51	14	65		

<sup>†</sup> Respuesta= respuesta completa + respuesta parcial; <sup>‡</sup> No respuesta= enfermedad estable + progresión.

### Análisis multivariante

Para el análisis multivariante se ha incluido el valor post-quirúrgico de Ca-125 y las variables clínicas enfermedad primaria, ausencia o leve presencia de ascitis, PCI menor o igual a 12 y el resultado óptimo de cirugía (tabla 5.37). El estudio se ha realizado sobre 56 pacientes. Hemos obtenido que solo el valor de Ca-125 post-quirúrgico presenta valor predictivo de respuesta final de forma significativa. El modelo actual explica el resultado en un 82,4% (test de Nagelkerke). No se ha incluido la variable respuesta a QTNA debido a que obtenemos resultados no válidos.

**TABLA 5.37. Análisis multivariante de los factores relacionados con respuesta final.**

Característica clínica:	Valor de p	OR (IC 95%)
<b>Respuesta al finalizar el tratamiento</b>		
Enfermedad primaria	0,884	
Ausencia de ascitis o leve	0,539	
PCI menor/igual a 12	0,598	
Resultado de cirugía R0	0,411	
<b>Ca 125 post-quirúrgico</b>	<b>0,032</b>	<b>1,026 (1,002 – 1,050)</b>

OR= odds ratio; IC95%= intervalo de confianza del 95%

## 5.2.7. VALORACIÓN DEL VALOR PRONÓSTICO DE LOS BIOMARCADORES.

### 5.2.7.1. VALOR PRONÓSTICO DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN (SLP).

Para el análisis de la SLP hemos incluido a todas las pacientes menos los 2 casos de pérdida de seguimiento tras el inicio de QT (tabla 5.38 y figura 5.16-17). Mediante la aplicación de curva ROC se han calculado los niveles de corte de los BM que maximiza la discriminación de recaída (figura 5.16 y tabla 5.38).

FIGURA 5.16. Area bajo la curva de los BM respecto a SLP.

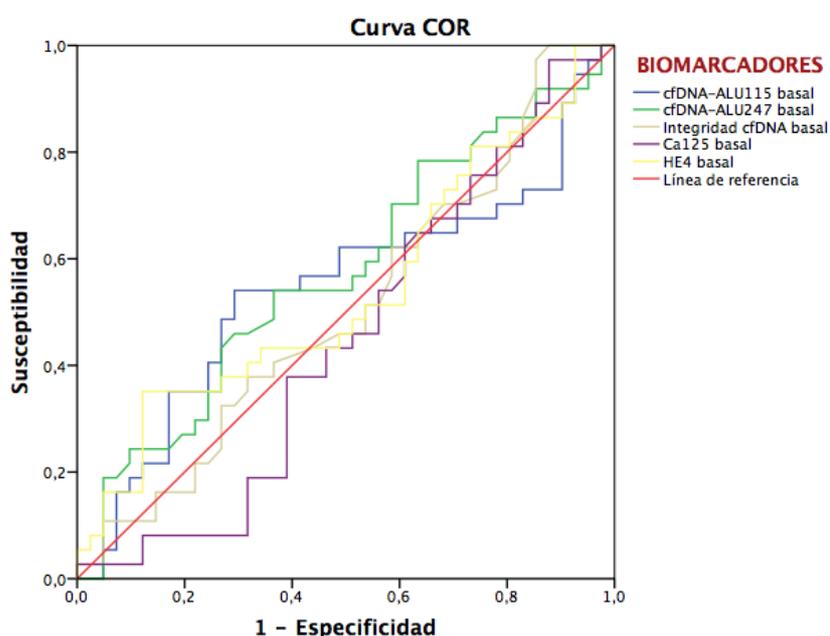


TABLA 5.38. Valores de ROC, sensibilidad y especificidad de los BM para SLP.

Biomarcador	AUC	Valor de corte	Sensibilidad	Especificidad
cfDNA115	0,544 (0,411 – 0,678)	1,633	54,1%	70,7%
cfDNA247	0,575 (0,447 – 0,704)	0,569	54,1%	63,4%
cfDNA-Int	0,509 (0,380 – 0,639)	0,425	45,9%	51,2%
Ca 125	0,451 (0,322 – 0,580)	497,5	45,9%	48,8%
HE4	0,541 (0,410 – 0,671)	376,0	45,9%	51,2%

cfDNA se calcula en ng/mcL; Ca-125 en U/mL, HE4 en pmol/L.

Con estos valores de corte se ha realizado el análisis univariante de los valores basales, que ha mostrado que cfDNA115 y cfDNA247 son factores pronósticos de SLP (tabla 5.39 y figura 5.17). Sin embargo, ni la integridad de cfDNA ni la presencia de CTC han tenido capacidad pronóstica. Respecto a la disminución de BM con el primer ciclo de QT, una reducción de la integridad de cfDNA mayor de 50% ha sido factor de mal pronóstico: 4 de las 5 pacientes que han presentado este valor han progresado.

Respecto a los BM de referencia, los valores basales no han presentado valor pronóstico, pero sí la reducción de un 50% del valor de Ca-125 y HE4.

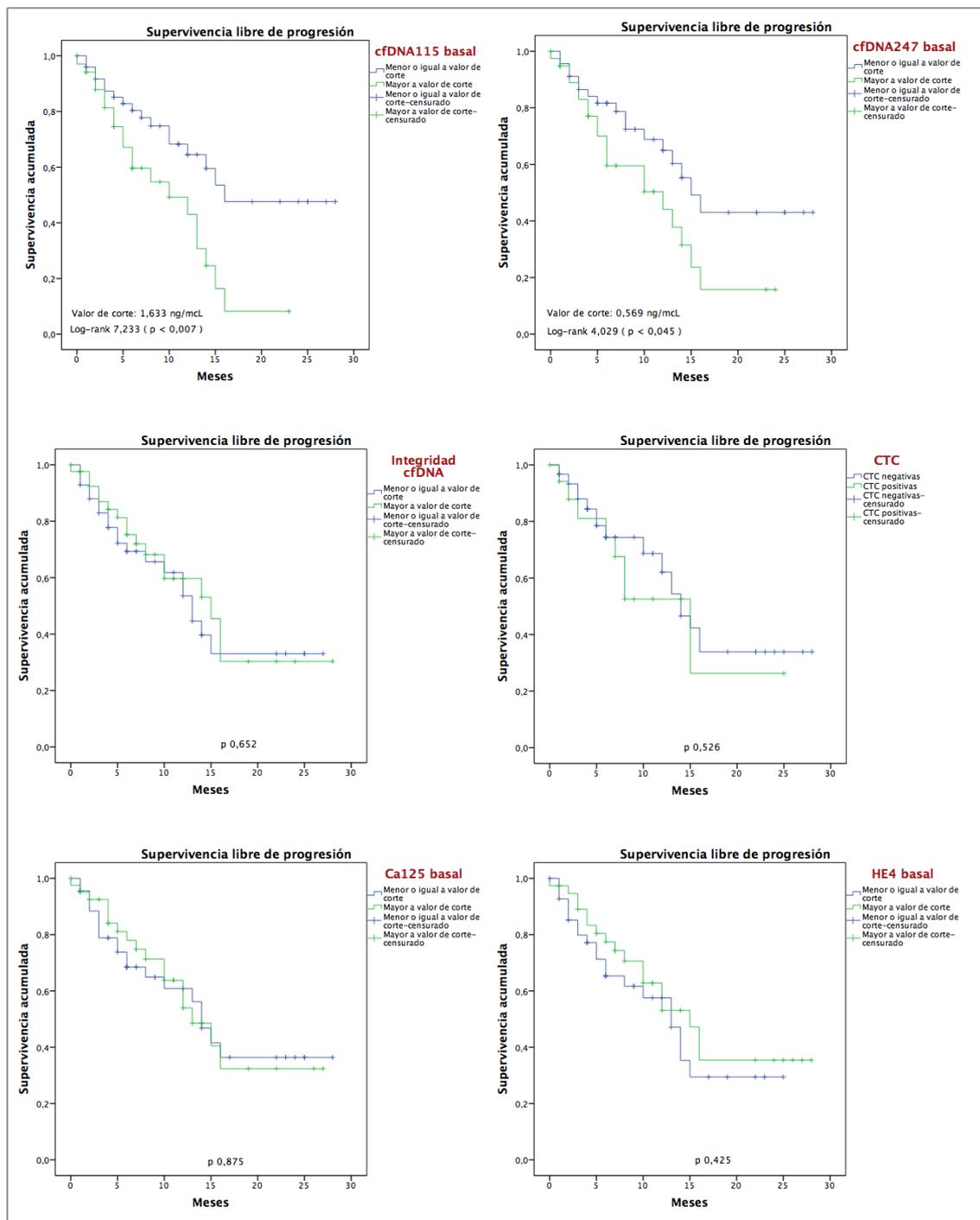
**TABLA 5.39. Valor pronóstico de los BM respecto a la SLP.**

Biomarcador	N	Nº eventos	Media (estimación en meses)	IC 95%	Log-rank	Valor de p
<b>NIVELES BASALES DE BIOMARCADORES</b>						
<b>cfDNA 115</b>						
Menor/igual a valor de corte	50	17	18,0	14,4 – 21,6	<b>7,233</b>	<b>&lt; 0,007</b>
Mayor a valor de corte	34	20	10,0	7,5 – 12,5		
<b>cfDNA 247</b>						
Menor/igual a valor de corte	45	17	17,3	13,6 – 20,9	<b>4,029</b>	<b>&lt; 0,045</b>
Mayor a valor de corte	39	20	11,1	8,2 – 14,0		
<b>Integridad cfDNA</b>						
Menor/igual a valor de corte	42	20	14,4	10,9 – 18,0		
Mayor a valor de corte	42	17	15,2	11,4 – 19,1		0,652
<b>CTC</b>						
CTC negativa	61	25	15,9	12,8 – 19,0		
CTC positiva	18	8	13,0	7,6 – 18,3		0,526
<b>Ca 125</b>						
Menor/igual a valor de corte	45	20	15,5	11,8 – 19,1		
Mayor a valor de corte	41	17	15,1	11,5 – 18,8		0,875
<b>HE4</b>						
Menor/igual a valor de corte	42	20	13,1	9,9 – 16,3		
Mayor a valor de corte	38	17	15,9	12,2 – 19,7		0,425
<b>REDUCCION DEL BIOMARCADOR CON EL TRATAMIENTO</b>						
<b>cfDNA 115</b>						
Reducción mayor a 50%	13	4	17,6	11,7 – 23,5		
Reducción ≤ 50%	60	28	14,9	11,9 – 17,9		0,516
<b>cfDNA 247</b>						
Reducción mayor a 50%	12	3	11,8	9,6 – 13,9		
Reducción ≤ 50%	60	28	15,2	12,1 – 18,3		0,341
<b>Integridad cfDNA</b>						
Reducción mayor a 50%	5	4	6,4	2,8 – 10,0		
Reducción ≤ 50%	68	28	16,0	13,1 – 19,0	<b>3,885</b>	<b>&lt; 0,049</b>
<b>Ca 125</b>						
Reducción mayor a 50%	40	9	20,9	17,0 – 24,7		
Reducción ≤ 50%	38	26	10,8	8,1 – 13,6	<b>11,233</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<b>HE4</b>						
Reducción mayor a 50%	27	8	18,0	13,1 – 22,9		
Reducción ≤ 50%	43	25	12,7	9,5 – 16,0	<b>4,749<sup>†</sup></b>	<b>&lt; 0,029</b>

Los valores de cfDNA se han comparado en función de la mediana. Ca-125 se ha comparado en función del valor 500 U/mL y HE4 respecto al valor 400 pmol/L.

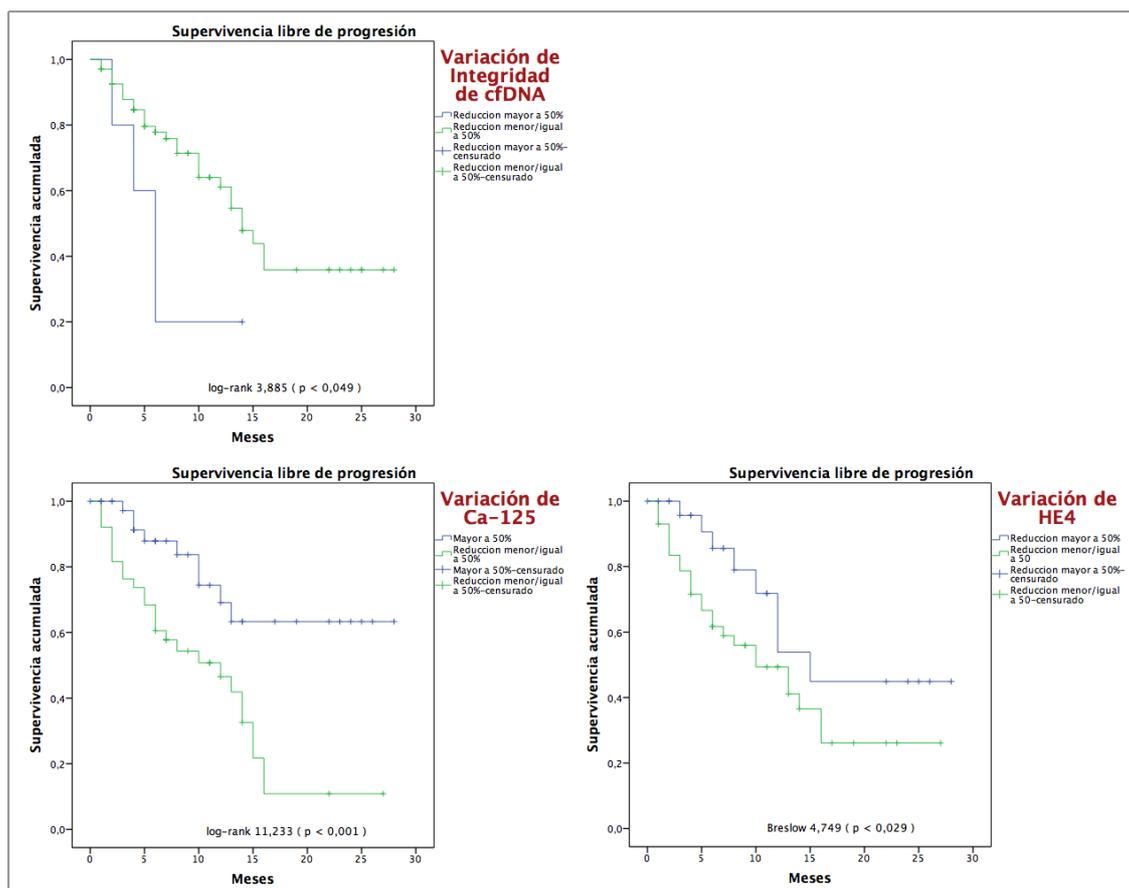
<sup>†</sup> Test de Breslow

FIGURA 5.17. Curvas de SLP en función del valor basal de los BM.



En la figura 5.18 se aprecia la divergencia de las curvas SLP en función de la reducción mayor de un 50% tras un ciclo de QT respecto al valor basal de la integridad de cfDNA, Ca-125 y HE4.

FIGURA 5.18. Curvas de SLP en función de la reducción del valor del BM tras un ciclo de QT.



Solo se muestran las curvas de los BM con diferencias significativas.

### Análisis multivariante

Para el análisis multivariante mediante regresión de Cox se han valorado los nuevos BM que han resultado significativos respecto a las variables clínicas. Al cierre de la base de datos solo han ocurrido 14 recaídas evaluables por todos los parámetros. El resultado muestra que han sido factores pronósticos positivos de forma significativa un PCI menor/igual a 12, la respuesta a QTNA y una disminución de la integridad de cfDNA menor del 50% (tabla 5.40). En nuestra serie hemos obtenido que presentar una disminución de la integridad mayor de 50% supone un 99% de probabilidad de presentar peor SLP. En el análisis no se han incluido los ganglios linfáticos afectados en el estudio patológico debido al bajo número de pacientes resultante.

TABLA 5.40. Análisis multivariante del valor pronóstico de supervivencia libre de progresión.

Característica clínica	Valor de p	HR (IC 95%)
Estadio tumoral	0,213	
Ausencia de <i>omental cake</i>	0,655	
Resultado de cirugía	0,655	
<b>PCI menor/igual de 12</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>8,335 (2,370 – 29,311)</b>
<b>Respuesta a QTNA</b>	<b>&lt; 0,002</b>	<b>16,074 (2,781 – 92,891)</b>
<b>Reducción de la integridad de cfDNA mayor de 50%</b>	<b>&lt; 0,020</b>	<b>0,027 (0,001 – 0,560)</b>
cfDNA115	0,693	
cfDNA247	0,253	

### 5.2.7.2. VALOR PRONÓSTICO DE SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG).

Se han valorado un total de 86 pacientes para el estudio de SG, habiendo censurado solo las dos pacientes perdidas de seguimiento. Primero se ha realizado análisis de curva ROC para establecer el valor de la variable que maximice el área bajo la curva (grafico 5.19 y tabla 5.41).

GRAFICO 5.19. Area bajo la curva de los BM respecto a SG.

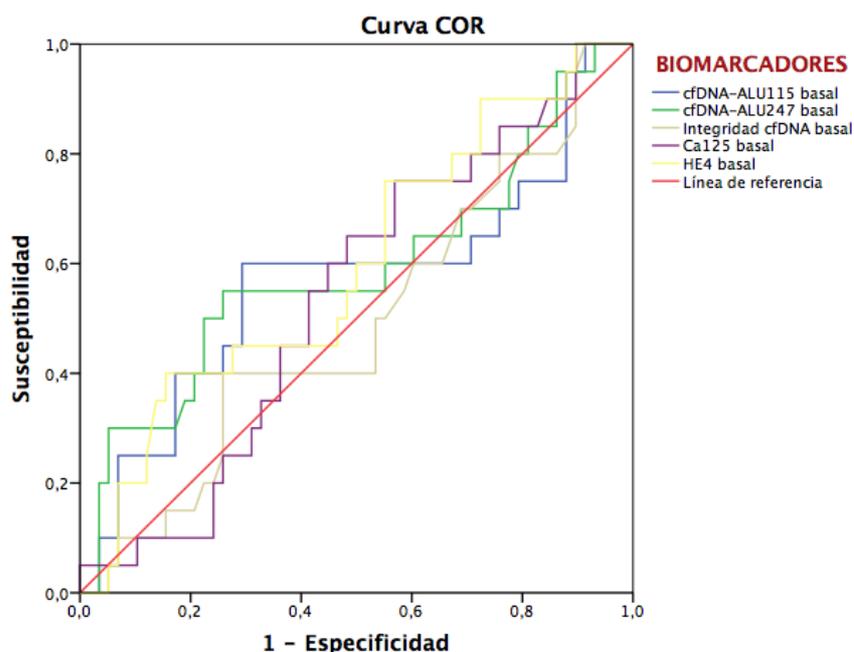


TABLA 5.41. Valores de ROC, sensibilidad y especificidad de los BM para SG.

Biomarcador	AUC	Valor de corte	Sensibilidad	Especificidad
cfDNA115	0,569 (0,406 – 0,732)	1,703	60,0%	70,7%
cfDNA247	0,590 (0,430 – 0,730)	0,651	55,0%	74,1%
cfDNA-Int *	0,492 (0,344 – 0,639)			
cfDNA-Int **	0,517 (0,371 – 0,663)	0,405	56,3%	60,0%
Ca 125	0,540 (0,401 – 0,679)	497,5	60,0%	55,2%
HE4	0,597 (0,452 – 0,742)	309,0	60,0%	50,0%

cfDNA se calcula en ng/mcL; Ca-125 en U/mL, HE4 en pmol/L.

\* No se calcula el valor debido a que presenta un AUC menor de 0,5.

\*\* Calculo de cfDNA-Int para el valor no cáncer.

Con estos valores de corte se ha realizado el análisis univariante de los valores basales, que ha mostrado que cfDNA115 y cfDNA247 son factores pronósticos de SG (tabla 5.42 y figura 5.20). Un nivel mayor que el valor de corte ha supuesto una disminución de la SG de 6 y 7 meses respectivamente. La presencia de CTC también ha presentado valor pronóstico, pasando la SG de 19,8 a 30,4 meses en caso de positividad o ausencia, respectivamente.

Respecto a la disminución de cfDNA con el primer ciclo de QT, ninguno de sus valores ha presentado valor pronóstico. La reducción de la integridad de cfDNA mayor de 50% no ha sido factor de mal pronóstico de SG, pero sólo ha presentado hasta la fecha 2 fallecimientos de las 5 pacientes que presentan ese valor.

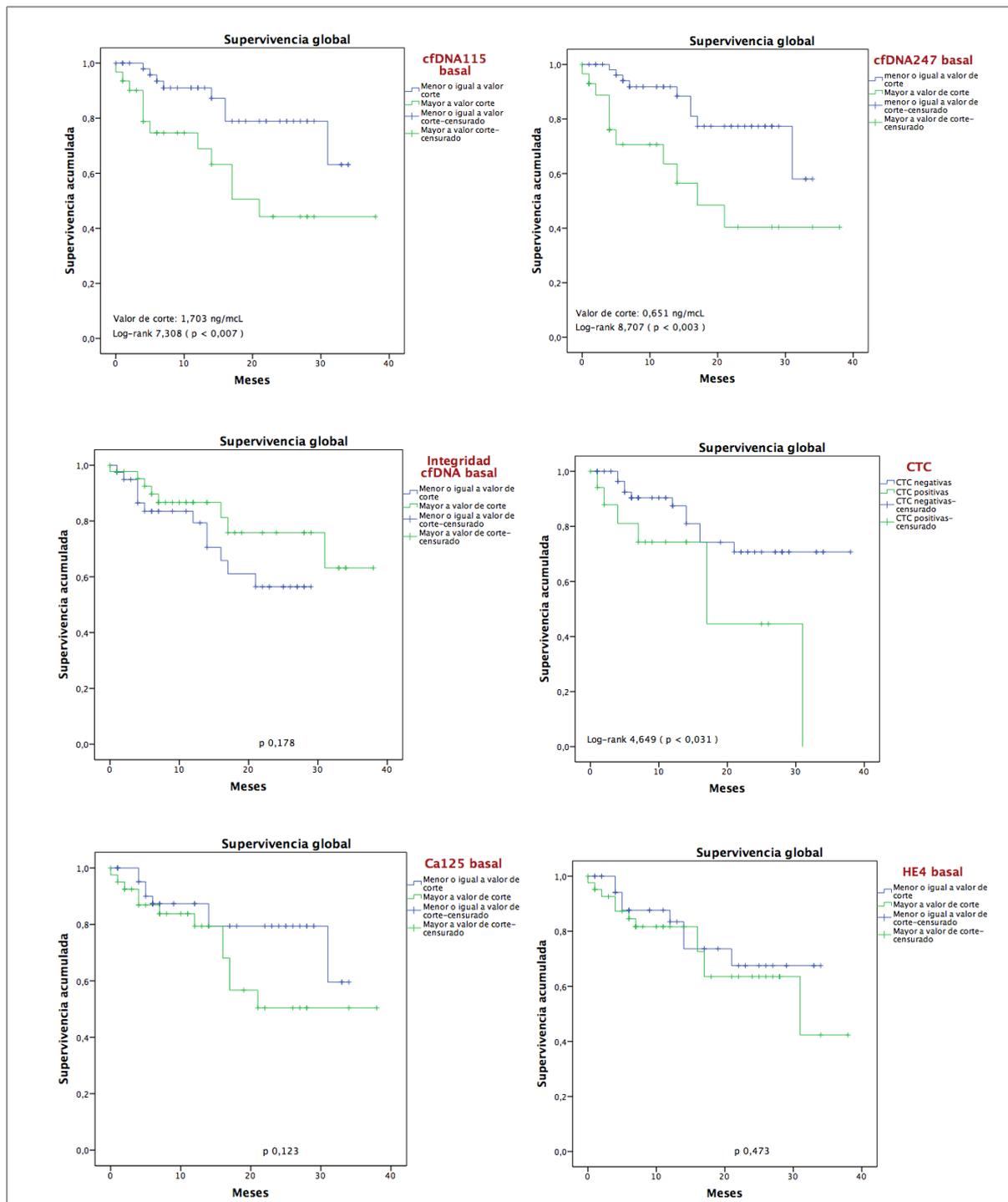
Respecto a los BM de referencia, ninguno de los valores basales ni la reducción con la QT han presentado valor pronóstico.

**TABLA 5.42. Valor pronóstico de los BM respecto a la SG.**

Biomarcador	N	Nº eventos	Media (estimación en meses)	IC 95%	Log-rank	Valor de p
<b>NIVELES BASALES DE BIOMARCADORES</b>						
<b>cfDNA 115</b>						
Menor/igual a valor de corte	53	8	28,7	25,5 – 32,0	<b>7,308</b>	<b>&lt; 0,007</b>
Mayor a valor de corte	31	12	22,5	16,3 – 28,8		
<b>cfDNA 247</b>						
Menor/igual a valor de corte	55	9	28,4	25,3 – 31,6	<b>8,707</b>	<b>&lt; 0,003</b>
Mayor a valor de corte	29	11	21,1	14,2 – 28,0		
<b>Integridad cfDNA</b>						
Menor/igual a valor de corte	40	12	21,2	17,7 – 24,7		0,178
Mayor a valor de corte	44	8	30,3	25,7 – 35,0		
<b>CTC</b>						
CTC negativa	60	10	30,4	26,5 – 34,3	<b>4,649</b>	<b>&lt; 0,031</b>
CTC positiva	17	6	19,8	12,7 – 26,9		
<b>Ca 125</b>						
Menor/igual a valor de corte	45	8	28,1	24,5 – 31,7		0,123
Mayor a valor de corte	41	12	25,3	19,8 – 30,7		
<b>HE4</b>						
Menor/igual a valor de corte	38	8	26,7	22,4 – 31,0		0,473
Mayor a valor de corte	42	12	26,3	21,2 – 31,4		
<b>REDUCCION DEL BIOMARCADOR CON EL TRATAMIENTO</b>						
<b>cfDNA 115</b>						
Reducción mayor a 50%	13	3	19,5	14,3 – 24,8		0,622
Reducción ≤ 50%	60	14	28,9	25,0 – 32,9		
<b>cfDNA 247</b>						
Reducción mayor a 50%	12	2	16,2	14,6 – 17,9		0,436
Reducción ≤ 50%	60	15	26,1	22,7 – 29,4		
<b>Integridad cfDNA</b>						
Reducción mayor a 50%	5	2	20,8	11,8 – 29,8		0,559
Reducción ≤ 50%	68	15	28,9	25,1 – 32,8		
<b>Ca 125</b>						
Reducción mayor a 50%	40	6	27,0	22,9 – 31,1		0,363
Reducción ≤ 50%	38	12	27,2	22,3 – 32,1		
<b>HE4</b>						
Reducción mayor a 50%	27	5	26,7	21,6 – 31,9		0,263
Reducción ≤ 50%	43	13	26,3	21,3 – 31,3		

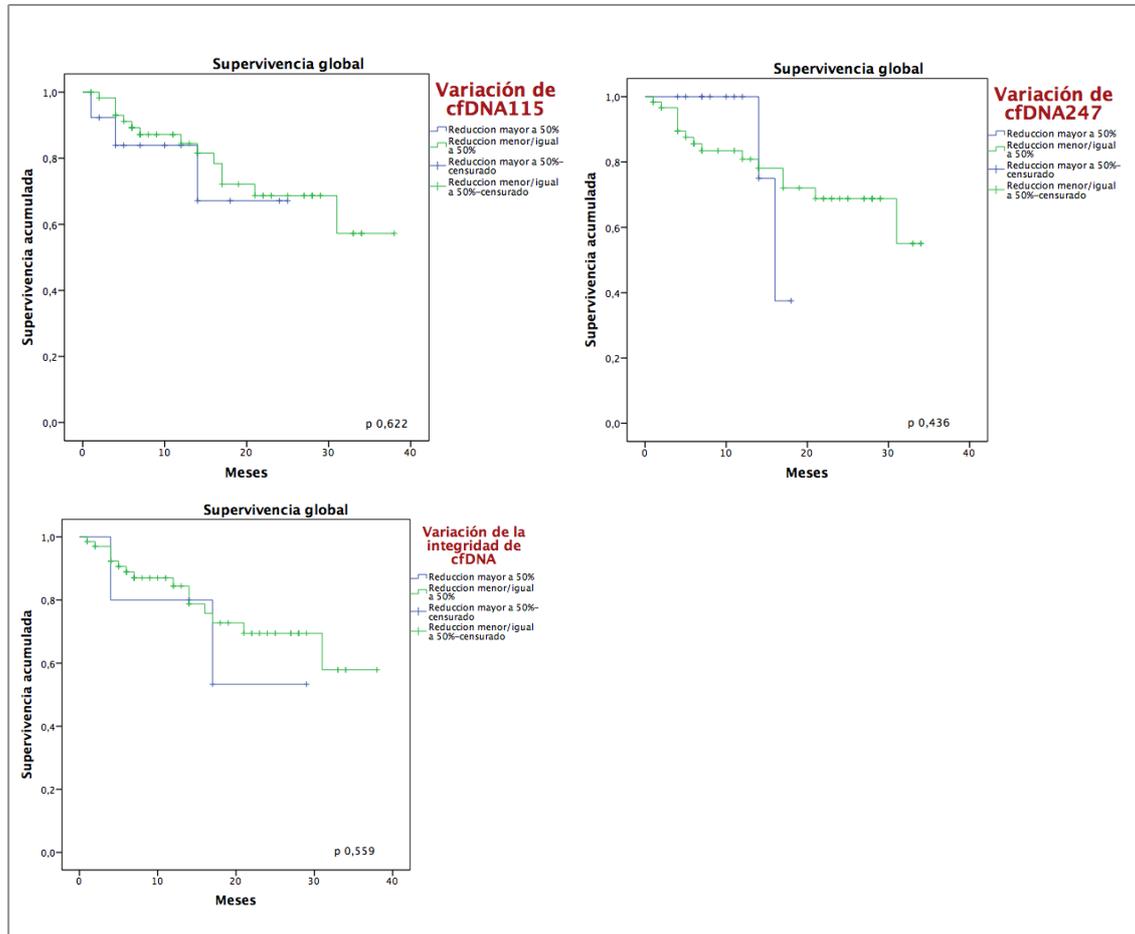
IC95%= intervalo de confianza del 95%

FIGURA 5.20. Curvas de supervivencia global en función del valor basal de los BM.



En la figura 5.21 podemos observar las gráficas de SG de la reducción mayor del 50% sobre los valores de cfDNA. Ninguno ha presentado poder pronóstico de forma significativa.

FIGURA 5.21. Curvas de SG en función de la reducción del valor del BM tras un ciclo de QT.



### Análisis multivariante de supervivencia global

Por último, hemos realizado estudio multivariante mediante regresión de Cox de todos los factores que en nuestra serie han influido sobre la SG en el univariante, incluyendo variables clínicas y de BM. Para la inclusión de todas las variables, el análisis se ha podido realizar sobre 37 pacientes, habiendo ocurrido solo 9 eventos. No se ha incluido la respuesta a QTNA ni la sensibilidad a platino por el bajo numero de eventos resultante.

El resultado nos muestra que sólo un valor de PCI menor/igual a 12 es el que mantiene un valor pronóstico significativo de SG, con HR 0,068 (IC-95% 0,008 – 0,557;  $p < 0,012$ ) (tabla 5.43).

**TABLA 5.43. Análisis multivariante del valor pronóstico de supervivencia global.**

Característica clínica	Valor de p	HR (IC 95%)
Ausencia ascitis o leve	0,253	
Ausencia de <i>omental cake</i>	0,360	
Respuesta al finalizar el tratamiento	0,215	
Nivel de albúmina normal	0,616	
Nivel de hemoglobina normal	0,494	
<b>PCI mayor de 12</b>	<b>&lt; 0,012</b>	<b>0,068 (0,008 – 0,557)</b>
CTC negativas	0,358	
cfDNA115	0,814	
cfDNA247	0,664	



## 6. Discusi3n

---



## 6.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS SUJETOS INCLUIDOS

En los últimos años ha habido un creciente interés en el estudio de células tumorales circulantes (CTC) y ADN libre circulante (cfDNA) como nuevos biomarcadores (BM) en los procesos neoplásicos. En carcinoma epitelial de ovario (CEO) los estudios han sido pequeños y, la mayoría de veces, con resultados contradictorios. Nuestro trabajo pretende aclarar su papel predictivo y pronóstico en esta patología.

El estudio se ha desarrollado en dos centros hospitalarios de la Región de Murcia durante 38 meses, habiendo incluido un total de 88 pacientes. Este tamaño muestral supone el tercer mayor estudio de cfDNA en pacientes con CEO que se ha comunicado, quedando por detrás de Kamat et al<sup>349</sup> con 164 pacientes y Steffensen et al<sup>347</sup> con 144 pacientes. En relación a CTC, correspondería al 8º estudio en orden de tamaño.

### 6.1.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA MUESTRA PACIENTES

El análisis de las características clínicas de nuestra serie nos muestra una población de pacientes similar a otros trabajos publicados<sup>5, 104, 130, 148, 158, 143, 353</sup>, y que refleja la actividad habitual de nuestras consultas. Solo ha habido ciertas diferencias que comentamos a continuación.

El **índice de masa corporal** (IMC) ha sido mayor al de otras series publicadas<sup>158, 353</sup>. En nuestro estudio la mayoría de pacientes ha presentado sobrepeso y hasta un tercio de ellas obesidad, según la definiciones de la Organización Mundial de la Salud<sup>354</sup>. Varios estudios y un meta-análisis han relacionado la obesidad y el sobrepeso con mayor riesgo de CEO<sup>32</sup>. El que hallamos presentado mayor IMC puede estar condicionado por el alto índice de sobrepeso y obesidad que presenta la población de la Región de Murcia<sup>355</sup> y porque un criterio de inclusión de nuestro trabajo fuera el presentar CEO avanzado, que suele conllevar aumento del perímetro abdominal y mayor IMC.

El estado general **ECOG** ha sido globalmente peor que en otras series<sup>104, 148, 158, 347</sup>, con un 22,7% que han presentado un ECOG 2-3. Esto puede deberse a que en nuestro estudio no se exigiera el requisito de presentar un buen estado general, que suele ser habitual para participar en los ensayos clínicos<sup>104, 150</sup>. Se precisaba solo que la paciente fuera candidata a recibir QT. Este aspecto ha conllevado que más pacientes de la práctica clínica habitual pudieran participar en el estudio y, con ello, mayor afectación del estado general.

En relación al **tratamiento de las pacientes** en fases avanzadas, éste suele ser una combinación de cirugía peritoneal completa y quimioterapia basada en compuestos de platino. No obstante, existe controversia en relación a la mejor secuencia de tratamiento<sup>140</sup>. Clásicamente se ha indicado cirugía peritoneal primaria (CPP) y quimioterapia (QT) adyuvante posterior, pero en la última década cuatro estudios prospectivos y un metanálisis, comparando esta secuencia con la de QT neoadyuvante (QTNA) y cirugía de intervalo (CDI), han mostrado similares resultados de eficacia pero con una menor morbilidad en la CDI, por lo que la aplicación de este planteamiento terapéutico está aumentando<sup>134-138</sup>. Pese a estos resultados,

en algunas guías se sigue recomendando CPP y QTA si es factible<sup>118</sup>. En la guía americana conjunta del año 2016 de la Sociedad de Ginecología Oncológica y la Sociedad Americana de Oncología Médica, se sugiere realizar QTNA y CDI en aquellas pacientes con alto riesgo perioperatorio y cuando haya baja probabilidad de alcanzar un resultado óptimo R0; en las situaciones en donde la paciente presente buen estado general y enfermedad potencialmente resecable, la guía recomienda valorar entre ambas opciones, CPP o QTNA, sin predominio de una sobre la otra<sup>133</sup>. En nuestro estudio, tras ser valorada en comité de tumores ginecológicos y carcinomatosis, el plan de tratamiento inicial de las pacientes ha sido principalmente el uso de QTNA y CDI, en un 56,8%. En estos resultados influyen de forma importante el hecho que un 20% de pacientes incluidas fueran por recaída tumoral y que un 22,7% presentaran un estado general ECOG 2-3.

Respecto al **procedimiento quirúrgico**, en las últimas guías se ha considerado cirugía óptima como aquella sin enfermedad residual, llamada cirugía R0<sup>110, 118, 131</sup>. En nuestro estudio fue considerada cirugía R0 en el 77,3% de las pacientes, lo que indica una alta calidad de la cirugía peritoneal realizada en nuestro centro. En otras series publicadas el resultado de cirugía óptima R0 ha sido menor<sup>104, 130, 353</sup>. En este alto porcentaje alcanzado en nuestra serie, influye la alta cualificación de nuestro equipo quirúrgico como lugar de referencia de cirugía peritoneal y el alto porcentaje de CDI realizadas en nuestro centro. Esto está en concordancia con los resultados reportados en el brazo de CDI de los estudios de EORTC-55971<sup>134</sup> y CHORUS<sup>135</sup>, en los que alcanzaron porcentajes mayores de cirugía óptima que en el brazo de CPP.

#### **Variables de seguimiento.**

El acontecimiento de eventos está limitado por el corto seguimiento de nuestra serie al cierre de la base de datos. Atendiendo a las recaídas tumorales presentadas hasta la fecha, hemos obtenido un porcentaje de pacientes resistentes y refractarios a platino más elevado de lo esperado. Esta mayor tasa puede deberse al hecho de haber incluido pacientes en recaída, incluso 3 de ellas ya eran platino-resistentes a su inclusión, y porque en 35 pacientes la sensibilidad todavía no ha sido valorable, debido principalmente a que aún no han pasado 6 meses desde que finalizaron el tratamiento con QT. Un seguimiento más prolongado podría modificar estos resultados.

Hemos tenido 4 muertes durante el tratamiento, un 4,5% de todas las pacientes, siendo 2 de ellas por complicaciones post-quirúrgicas, 1 por episodio de TEP fulminante tras iniciar QTNA y la otra paciente de causa no aclarada mientras recibía QTNA. Este porcentaje ha sido mayor que otras series publicadas, en donde hay descrita una mortalidad de 2,5-6% en el brazo de CPP y de 0,7-1% en el brazo de CDI<sup>134, 135</sup>. Con la intención de hallar factores clínicos que nos expliquen esta alta mortalidad, hemos vuelto a analizar estas pacientes, encontrando relación solo con un estadio IIIC, presente en las 4, y con la presencia de ascitis severa, omental cake e histología tipo II de Kurman que se ha dado en 3 de las pacientes. En las dos pacientes intervenidas se realizó CDI, presentando un índice de carcinomatosis peritoneal (PCI) de 22 y 17, lo que puede influir en su evolución<sup>351</sup>.

### 6.1.2. COMPARACIÓN DE EDAD Y PARÁMETROS ANALÍTICOS ENTRE PACIENTES Y GRUPO CONTROL.

La **edad** de las pacientes ha sido similar a las series publicadas<sup>277, 289, 342, 347, 349</sup>. En la muestra de pacientes ha sido significativamente mayor que en el grupo control, aunque esta diferencia solo fue respecto al grupo de tumores benignos. Los controles sanos han presentado edad similar al grupo pacientes, pues fueron voluntarias seleccionadas bajo ese criterio. En el grupo de tumores benignos ha habido una edad media menor debido a la mayor prevalencia de tumores benignos en pacientes jóvenes.

Respecto a los **parámetros analíticos generales**, la muestra pacientes ha presentado diferentes niveles de forma significativa de todas las variables. Han habido valores más bajos de albúmina y de Hb, y más elevados de LDH, PMN y plaquetas, reflejando la influencia sistémica del CEO con deterioro de parámetros relacionados con el estado general y también considerados como reactantes de fase aguda. Esto indica un mayor estrés inflamatorio general en el grupo de pacientes, justificado por el proceso neoplásico. De hecho, ninguna de estas variables ha presentado diferencias entre el grupo de tumores benignos y el de sujetos sanos. Esto nos sugiere que se podría considerar al CEO como un proceso inflamatorio sistémico y no solo peritoneal.

### 6.1.3. ANÁLISIS UNIVARIANTE DEL VALOR PREDICTIVO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS.

Un aspecto de suma importancia es analizar los factores predictivos de respuesta para seleccionar el tratamiento más adecuado a cada paciente, pues determinará su evolución clínica posterior. En la literatura se han descritos numerosos factores clínicos predictivos, tanto de respuesta a quimioterapia como de cirugía óptima<sup>57, 59, 135, 143, 144, 356</sup>. En la base a una revisión de estas variables, Mark et al<sup>140</sup> establecen 5 categorías de pacientes en estadio III para sugerir CPP o QTNA, en función de la mejor respuesta esperable: en las dos primeras categorías el tumor se localiza en la pelvis, recomendando CPP; en la categoría 3, el tumor se localiza en el abdomen superior pero sin ascitis masiva ni precisar resección digestiva, recomendando CPP; en la categoría 4 es similar a la 3 pero precisando resección digestiva, recomendando CPP pero en caso de bajo ECOG o edad avanzada valorar QTNA; y en la categoría 5 presenta afectación peritoneal importante, recomendando QTNA.

En nuestro estudio hemos obtenido una serie de factores predictivos que pasamos a comentar.

La **respuesta a QTNA** ha sido el factor predictivo que ha presentado la mayor fuerza de asociación con la respuesta tumoral tras completar el tratamiento. Es evidente que en las pacientes que tengan progresión tumoral durante la QTNA se desestimaría la cirugía de intervalo, implicando una enfermedad refractaria a QT con muy mal pronóstico<sup>48, 60</sup>. La limitación a este factor, es que no disponemos de marcadores precoces que nos midan esta respuesta, debiendo esperar a recibir 2-4 ciclos de QT para valorarla. Por ello, numerosos trabajos buscan marcadores que predigan la respuesta tras el inicio del tratamiento.

La **histología tumoral** también ha presentado un importante valor predictivo. La presencia de un tipo histológico II de Kurman o un grado histológico alto se relacionan con mayor respuesta a QT. Es más, estos dos factores han sido los únicos que han determinado

una respuesta significativa a QTNA. El hecho de que ambas variables resulten significativas nos confirma esta relación con la respuesta, pues el tipo histológico II de Kurman son siempre tumores de alto grado histológico. Nuestros datos concuerdan con la diferente sensibilidad a platino descrita en la clasificación de Kurman y Shih para el tipo histológico I y el tipo II<sup>59</sup>. Otros estudios también han confirmado el valor predictivo a QT que presenta el tipo y grado histológico<sup>57, 59, 135</sup>. Por lo tanto, este aspecto es uno de los criterios a tener en cuenta en la indicación del plan de tratamiento a la paciente.

La **extensión de la carcinomatosis peritoneal** ha sido el mayor condicionante para el resultado quirúrgico en nuestro estudio. La ausencia o leve cuantía de ascitis, ausencia de *omental cake* y un PCI menor/igual a 12 han presentado la mayor asociación con un resultado quirúrgico óptimo. Estos datos se han confirmado en otras series publicadas<sup>143, 144, 357</sup>. A su vez, el **resultado de cirugía R0** junto con la extensión de la afectación peritoneal determinan en gran medida la respuesta final al tratamiento. Esto nos indica la importancia de realizar un exhaustivo abordaje de la afectación peritoneal, tanto diagnóstico como quirúrgico, y seleccionar adecuadamente a las pacientes que se pueden beneficiar más del inicio de CPP o de QTNA<sup>133, 140, 143</sup>. En este sentido, el valor de PCI se ha constituido en una herramienta fundamental para valorar la extensión peritoneal de la enfermedad. Inicialmente planteado en el campo operatorio en carcinoma de colon<sup>358</sup>, su uso se ha ido extendiendo a otras patologías con diseminación peritoneal como el CEO<sup>351</sup>.

La **presentación primaria** ha sido otro factor predictivo en nuestra serie. Estas pacientes han presentado mayor porcentaje de respuesta que las pacientes en recaída, debido a la mayor sensibilidad a quimioterapia y a la mayor indicación de cirugía peritoneal<sup>48, 168</sup>.

**Otros factores predictivos** de nuestro estudio han sido un IMC menor o igual de 25, un ECOG 0-1 y presentar un nivel normal de albúmina.

#### 6.1.4. ANÁLISIS UNIVARIANTE DEL VALOR PRONÓSTICO DE VARIABLES CLÍNICAS.

Numerosos trabajos han descrito diversos factores pronósticos en CEO avanzado, siendo los dos más importantes el estadio tumoral y la enfermedad residual tras cirugía<sup>5, 104</sup>. Otras variables con valor pronóstico han sido el grado y el subtipo histológico, la edad, el estado general ECOG y presencia de ascitis severa<sup>5, 104, 105, 106, 107, 359</sup>.

En nuestro estudio hemos obtenido una serie de factores pronósticos que han sido confirmados en la mayoría de series, tales como la sensibilidad al tratamiento con quimioterapia basada en platino<sup>9, 48, 60</sup>, la respuesta a QTNA<sup>48, 60</sup>, extensión de la afectación peritoneal, el estadio tumoral<sup>5, 104, 130</sup>, la enfermedad residual tras la cirugía<sup>5, 104, 130, 353, 359</sup>, la edad<sup>104, 130</sup>, la afectación linfática<sup>115</sup> y alteración de parámetros analíticos como la albúmina y la Hb<sup>233</sup>.

Respecto a la sensibilidad a platino, este ha sido el mayor determinante de supervivencia global (SG). De hecho, hasta la fecha ninguna paciente sensible a platino ha fallecido en comparación de 15 de 26 pacientes resistentes. Está suficientemente demostrado que una recaída precoz o durante el tratamiento implica una enfermedad con resistencia a los tratamientos y precaria evolución<sup>9, 48, 60</sup>.

El estadio tumoral y la enfermedad residual tras la cirugía han sido factor pronóstico de supervivencia libre de progresión (SLP) pero no de SG, mostrando una tendencia pero sin llegar a la significación. Este hecho puede justificarse por el escaso seguimiento de nuestro trabajo, con pocos eventos hasta la fecha para SG.

La extensión de la afectación peritoneal, medida por el valor PCI quirúrgico, ha sido otro importante factor pronóstico de SLP y de SG en nuestra serie, confirmado en otras series<sup>358</sup>. Otros factores relacionados con la diseminación peritoneal como ascitis severa y presencia de *omental cake* también han sido factores pronósticos negativos para SG. Esto ha sido descrito en la mayoría de las series<sup>104, 359</sup> y confirma, como ya dijimos previamente, la gran importancia de la valoración de la afectación peritoneal.

Destacamos también el nivel de **albúmina**, que se sitúa como un importante factor predictivo de respuesta y pronóstico de SG. Este parámetro analítico se relaciona con la afectación del estado general y es considerado un reactante de fase aguda, implicando un mayor estrés inflamatorio general. Su implicación pronóstica también ha sido encontrada en otras series<sup>104, 233</sup>. De hecho, Chi et al<sup>234</sup> desarrollaron un nomograma para predecir la SG a 5 años en CEO tras la cirugía peritoneal primaria, en donde el valor sérico de albúmina es uno de los 7 parámetros incluidos.

## 6.2. BIOMARCADORES PLANTEADOS EN ESTE TRABAJO

Los biomarcadores (BM) Ca-125 y HE4 son los únicos aprobados para su uso clínico en CEO. Para mejorar las limitaciones que presentan, otros marcadores alternativos se están investigando, pero la mayoría no han sido aún validados clínicamente<sup>186</sup>. La elección de los BM propuestos aquí se debe a la aparición en la literatura de numerosos trabajos en diferentes tumores que informan de su papel predictivo y pronóstico, tanto de las células tumorales circulantes (CTC) como del ADN circulante plasmático (cfDNA)<sup>244, 245, 247, 248, 301, 328, 338</sup>. Sin embargo, en CEO hay pocos estudios que analicen estos nuevos BM.

La elección del método de estudio de CTC mediante *CellSearch*® se realizó porque es el único método actualmente aprobado por la *US Food and Drug Administration*. Han surgido variaciones que intentan mejorar la sensibilidad y especificidad<sup>281, 286, 292</sup>, pero hasta ahora no se han estandarizado.

Para el análisis de cfDNA en oncología, actualmente hay una enorme diversidad de procedimientos para su estudio<sup>310, 328, 331, 335, 337</sup>, siendo especialmente variable en CEO en donde cada grupo de investigación ha empleado una metodología diferente<sup>342, 343, 345, 346, 347, 348</sup>. En el presente trabajo, la cuantificación del cfDNA se ha determinado mediante PCR en Tiempo Real utilizando el fluorocromo SYBR Green (Takara). La cuantificación mediante métodos espectrofotométricos (NanoDrop®) o fluorométricos (Qubit®) puede proporcionar una evaluación imprecisa del ADN válido en la muestra. Estos métodos normalmente sobreestiman la concentración de ADN y se limitan a muestras de concentración relativamente alta y de buena calidad como, por ejemplo, sangre, muestras congeladas frescas o células cultivadas, pero tienen un rendimiento bajo con muestras de menor calidad y no pueden distinguir entre ADN circulante y ADN genómico de alto peso molecular. Por lo tanto, para

muestras de baja calidad (p. ej., Muestras fijadas en formalina, parafina) y muestras de cfDNA se recomienda la cuantificación mediante un método cuantitativo (PCR cuantitativa – qPCR), utilizando amplicones cortos y largos para determinar con precisión la concentración y calidad del ADN de la muestra<sup>360</sup>. Se ha decidido usar la determinación mediante las secuencias ALU con qPCR debido a que representa uno de los procedimientos más empleado y aceptado en la mayoría de estudios<sup>328, 332, 333, 334</sup>.

Otro aspecto a destacar, es que con este procedimiento se obtienen tres valores de cfDNA (cfDNA115, cfDNA247 y la integridad de cfDNA). En los trabajos publicados no queda claro cual es el que mejor candidato a BM<sup>328, 333, 334, 336</sup>, por ello en nuestro estudio hemos analizado las tres variables, para determinar cual es la que mejor se relaciona con el CEO y su evolución clínica.

### **6.2.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO DEL NIVEL BASAL DE LOS BIOMARCADORES EN EL GRUPO DE PACIENTES.**

Las variables de cfDNA han presentado una distribución normal de sus valores con escasa dispersión. La comparación de la cuantificación media de cfDNA con respecto a otros tipos tumorales, como cáncer de colon, próstata y cáncer gástrico<sup>332, 334, 336, 361</sup>, nos muestra un valor inferior en nuestra serie. Esto nos indicaría que en el CEO habría una menor expresión sistémica de la destrucción celular tumoral y/o una menor destrucción celular respecto a los otros tipos tumorales. No obstante, esta comparación hay que tomarla con cautela, pues pequeñas diferencias en la metodología usada pueden determinar los resultados. Hay que tener en cuenta que hay muchos factores que pueden influir, desde el tipo de tubos de extracción empleados, procesamiento y congelación de las muestras, extracción y análisis de cfDNA. Por ejemplo, la integridad de cfDNA en cáncer de colon en un estudio obtienen valores menores y en otro valores mayores que en nuestra serie<sup>328, 332</sup>. Una estandarización de los procedimientos sería fundamental para poder realizar una verdadera comparación de resultados entre diferentes tumores.

Respecto a la presencia de CTC, en nuestra serie se han detectado en el 23,8% de las pacientes, considerando un resultado positivo como aquel mayor o igual a 1 CTC/7,5 ml de sangre periférica. Este porcentaje ha sido similar a otras series publicadas, aunque hay que resaltar la gran variabilidad en las comunicaciones, relacionada probablemente con diferencias en la metodología de detección y análisis de CTC<sup>283, 288</sup>. Algunos autores han considerado un resultado positivo como la detección de más de 1 CTC/7,5 ml<sup>282, 289, 290</sup>. En nuestro estudio, la detección de 2 o más CTC/7,5 ml ha sido de 12,5%, en consonancia con el estudio de Poveda et al<sup>289</sup>. Esta presencia de CTC ha sido menor que los comunicados en otros tipos de neoplasias, como cáncer de mama, próstata o colon<sup>244, 247, 250, 278</sup>. Esto puede justificarse debido a la baja diseminación vía hematológica del CEO y a la posible menor expresión de EpCAM que parecen tener las células de CEO<sup>279, 286, 287</sup>.

Los niveles de Ca-125 y HE4 se han encontrado elevados en la mayoría de las pacientes, con un valor medio similar a otros estudios<sup>134, 143, 362, 363</sup>. Es de destacar la gran dispersión que presentan sus valores, que también ha sido pareja a lo publicado en la literatura.

## 6.2.2. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS BIOMARCADORES ENTRE EL GRUPO PACIENTES Y EL GRUPO CONTROL.

### Comparación de BM entre grupo pacientes y grupo control

La comparación entre el grupo pacientes y el grupo control nos ha mostrado diferencias significativas de todos los BM analizados (tabla 5.12 y 5.14). Se han obtenido valores mayores de la cuantificación de cfDNA y mayor presencia de CTC en el grupo de pacientes respecto a los controles, a excepción de la integridad de cfDNA que presenta menor valor. Esto refleja la mayor destrucción celular en la muestra pacientes, propio de una patología neoplásica, que se ha confirmado en todas las series<sup>300, 301, 310, 328, 349, 350</sup>. Entre el grupo de tumores benignos y el de controles sanos no ha habido diferencias significativas para ningún BM, lo que indica que la patología benigna no supone un aumento de la actividad celular que promueva un aumento significativo de BM.

El **biomarcador cfDNA115** cuantifica el cfDNA total circulante, pues mide los fragmentos pequeños y grandes del ácido nucleico circulante<sup>328</sup>. El hecho que sea mayor en pacientes que en controles reflejaría la mayor destrucción celular que ocurre en el grupo de pacientes y que se expresa en la circulación. Esto concuerda con la mayoría de publicaciones en cáncer de ovario<sup>342, 344, 345, 346, 349</sup> y también en otros tipos de neoplasias<sup>328, 332, 337, 338</sup>, en donde las cifras de cfDNA en el grupo con cáncer son mayores al grupo control. Hay que tener en cuenta que el cfDNA de las pacientes esta compuesto por la fracción de cfDNA que se produce en condiciones fisiológicas más la parte específica derivada del tumor. El aumento de sus valores en pacientes implica que en el CEO se produce una cantidad suficiente de cfDNA por parte del tumor que se libera a la circulación para que su valor aumente de forma significativa. Además, cfDNA115 en la muestra pacientes presenta una mayor dispersión de sus valores que entre los otros dos grupos, debido a la mayor actividad celular que se produce en un proceso neoplásico como el CEO, dando lugar a una mayor variabilidad de sus niveles. Por ello, en los otros dos grupos controles la dispersión es menor, con valores más homogéneos debido a que la única fuente de cfDNA es la destrucción celular fisiológica. Diversos procesos inflamatorios como enfermedades sistémicas activas<sup>302</sup>, traumatismos<sup>303</sup>, hemodiálisis<sup>304</sup>, sepsis<sup>305</sup>, infarto agudo de miocardio<sup>306</sup> y otros<sup>300, 301, 307</sup>, se han descrito que inducen un aumento del cfDNA, motivo por el cual estas alteraciones han sido criterio de exclusión en nuestro estudio, para que el único origen del incremento de cfDNA en el grupo de sujetos sanos fuera la actividad fisiológica normal.

El **biomarcador cfDNA247** se relaciona con la cuantificación de fragmentos grandes de cfDNA, los que miden más de 247 pares de bases<sup>328</sup>. En nuestra serie, los valores de cfDNA247 también han sido mayores en pacientes que en controles, aunque en menor medida que cfDNA115 y centrándose esta diferencia sólo entre el grupo pacientes y el de tumores benignos, no hallando diferencias con el grupo de controles sanos. La dispersión de los valores se mantiene similar entre los tres grupos. Esto puede justificarse por una menor producción de fragmentos grandes de ADN (cfDNA247) por parte del CEO.

El valor de **integridad de cfDNA**, que es la relación cfDNA247/cfDNA115, refleja la proporción de fragmentos grandes presentes en el cfDNA<sup>328</sup>. En nuestra serie la integridad ha

sido mayor en el grupo sano, que en el de tumores benignos y que en el grupo pacientes, con diferencia estadísticamente significativa entre sanos y pacientes (tabla 5.12, 5.13 y figura 5.6).

Estos datos son muy importantes a tener en cuenta. El hecho de que este índice sea menor en el grupo pacientes nos indica que, aunque haya mayor expresión periférica de destrucción celular en el CEO, como deducimos del aumento de cfDNA115 y cfDNA247, ésta proporción de aumento es menor para fragmentos grandes de cfDNA y mayor para los fragmentos pequeños (aumenta proporcionalmente más cfDNA115 que cfDNA247). Dado que los fragmentos pequeños de cfDNA se relacionan más con apoptosis celular<sup>300, 322, 324, 325, 328</sup> y los fragmentos grandes de cfDNA se relacionan más con necrosis celular<sup>324, 328</sup>, nos indicaría que el mecanismo principal de destrucción celular en el CEO sería la apoptosis celular, más que la necrosis celular. Derivado de esto y porque es el único que presenta diferencias significativas entre pacientes y los otros dos grupos, el valor de cfDNA115 sería el que mejor reflejara la dinámica de cfDNA en el CEO.

Otras neoplasias como cáncer de colon, mama y próstata presentan mayor integridad de cfDNA en el grupo de pacientes que en el grupo control de forma significativa<sup>328, 334, 340</sup>. Esto indicaría un papel predominante de la necrosis tumoral en la destrucción celular global en estos tipos tumorales.

Por otro lado, se ha comunicado que este aumento de la liberación de cfDNA ocurre incluso desde etapas iniciales de la enfermedad. En el trabajo de Nayouki et al<sup>328</sup> en cáncer de colon se constata un aumento de cfDNA de forma significativa en el estadio precoz respecto al grupo control. El-Gayar et al<sup>332</sup> en cáncer de colon y Sozzi et al<sup>337</sup> en cáncer de pulmón, sugieren un posible papel en el screening en sujetos de alto riesgo. Aunque este no era un objetivo de nuestro trabajo, pues está dirigido al CEO de estadio avanzado, hemos re-analizado a las 8 pacientes que finalmente presentaron un estadio precoz (I-IIA). En este subgrupo hemos obtenido que cfDNA también ha sido estadísticamente mayor que los dos grupos controles, con valor de cfDNA 1,619 vs 0,849 ng/mL, respectivamente ( $p < 0,043$ ). Por ello, podría haber un posible papel diagnóstico en la fase inicial de la enfermedad que debería ser explorado en futuros estudios.

Respecto a la **presencia de CTC**, su comparación entre pacientes y grupo control nos ha mostrado una clara diferencia, pues solo una paciente de tumores benignos presentó 1 CTC/7,5 ml, y ninguno del grupo de sanos. En nuestra serie, la sensibilidad de la pruebas ha sido muy baja, de un 23,8% como ya hemos comentado en el apartado anterior, aunque ha presentado una muy alta especificidad y valor predictivo positivo, del 96,7% y 95% respectivamente. Estos datos son similares a otras series publicadas, mostrando que aunque CTC presente una baja sensibilidad, su especificidad es próxima al 99-100%<sup>277, 278, 289</sup>. Esto nos indica un posible papel en el diagnóstico diferencial de una tumoración ovárica: aunque no podamos descartar a una paciente cuando tenga un resultado negativo de CTC, su presencia nos indicaría con muy alta probabilidad la existencia de patología neoplásica. El inconveniente es su baja sensibilidad, por lo que se deberían promover cambios en la metodología para mejorar las limitaciones de detección de CTC del método *CellSearch*®.

### **Análisis de curva ROC para discriminar entre pacientes y grupo control**

El análisis de la capacidad de discriminación de los BM para el diagnóstico de CEO respecto a no presentar tumor, nos ha mostrado que cfDNA no mejora los resultados de los BM de referencia. Los valores más altos de área bajo la curva (AUC) corresponden a Ca-125 y HE4, con 0,96 y 0,94 respectivamente. Estos valores, al igual que los de sensibilidad y especificidad, han sido similares a los descritos en otras series<sup>86, 209, 211, 220, 223, 362</sup>.

Los valores de AUC de cfDNA en nuestra serie han sido discretos, con el mayor valor alcanzado por cfDNA115 con 0,76. Consecuentemente, la sensibilidad y especificidad de cfDNA115 han sido menores que los BM de referencia (tabla 5.15). Esta baja especificidad ha sido uno de los mayores inconvenientes achacados al análisis de cfDNA, pues en él se agrupa ADN proveniente del tumor y ADN proveniente de células sanas<sup>300, 301</sup>. Dentro de las diversas series publicadas en CEO, algunas han presentado valores de AUC similares a la nuestra<sup>328, 332, 345</sup>, mientras que en otras han alcanzado valores mayores<sup>346, 349</sup>. En el metanálisis de Zhou et al<sup>350</sup>, con 462 pacientes con CEO y 407 controles provenientes de 9 estudios, se alcanza una menor sensibilidad pero una mayor especificidad que en nuestro trabajo, con un AUC de 0,89. No obstante, los estudios fueron pequeños, la mayoría retrospectivos y hubo gran heterogeneidad, por lo que los resultados hay que tomarlos con precaución. Esto nos indica que, aunque los niveles de cfDNA son mayores en pacientes con CEO respecto a tumores benignos y sujetos sanos, este BM tiene una relevancia diagnóstica limitada. Algunos autores indican que, debido a esta falta de especificidad, el cfDNA no sería útil como BM diagnóstico aislado, sugiriendo su combinación con otros BM<sup>301</sup>. En otros tipos tumorales, como cáncer de mama y melanoma, pudiera tener mayor utilidad diagnóstica, con valores de AUC generalmente mayores que en nuestro estudio<sup>338, 339</sup>.

La integridad de cfDNA en nuestro estudio ha mostrado un AUC menor que cfDNA115. En otros tipos tumorales, como cáncer de colon y próstata, la integridad ha mostrado un mejor perfil como BM que la cuantificación de cfDNA<sup>301, 328, 329, 333</sup>. Esto puede deberse a la menor necrosis tumoral que ocurre en el CEO respecto a los otros tipos tumorales, como hemos visto previamente, y por ello, menos influencia sobre cfDNA247 y la integridad de cfDNA, y mayor influencia sobre cfDNA115 que reflejaría mejor la apoptosis celular predominante en CEO.

Por ello, podemos concluir que cfDNA115 no mejora los resultados de los biomarcadores de referencia Ca-125 y HE4 y que, dado su discreto valor de AUC, no tendría utilidad añadida para el diagnóstico diferencial de un tumor ovárico. No obstante, este trabajo está dirigido a las pacientes con estadio avanzado. Un aspecto a evaluar en futuros estudios será el papel de cfDNA en el estadio precoz, como hemos visto anteriormente.

### **6.2.3. INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS PACIENTES EN EL VALOR DE LOS BIOMARCADORES.**

En los estudios publicados se han descrito pocos factores clínicos relacionados con el valor de cfDNA. En el estudio de No et al<sup>343</sup> sólo encontraron asociación con el subtipo histológico seroso, pero no con el resto de variables. En el trabajo de Wimberger et al<sup>342</sup> el nivel de cfDNA se relacionó con el residuo tumoral tras la cirugía. Zachariah et al<sup>345</sup> no encontraron influencia de ninguna variable clínico-patológica. Sin embargo, en el estudio de

Kamat et al<sup>349</sup> encontraron influencia con varios factores, entre ellos el estadio tumoral, grado histológico alto, ganglios linfáticos afectados y de la presencia de ascitis.

En nuestra serie, los factores clínicos relacionados con **cfDNA** han sido el estado general ECOG y el origen primario del tumor frente a recaída tumoral. Otros factores encontrados como un IMC mayor de 25, la presencia de ascitis y la presencia de ganglios linfáticos afectados hay que valorarlos con cautela.

El **estado general ECOG** se ha relacionado con todos los valores de cfDNA, reflejando este hecho el efecto que la carga tumoral tendría sobre la situación clínica de la paciente. Un estado ECOG 2-3 se ha relacionado con mayores valores de cfDNA y menor integridad. Esta relación también ha sido descrita por el trabajo de Steffensen et al<sup>347</sup>, y nos sugiere que cfDNA podría ser un buen indicador de la carga sistémica de la enfermedad, con repercusión en el estado general de la paciente.

La **presentación primaria** también ha determinado un mayor nivel de cfDNA. Quizás esto sea debido al retraso diagnóstico de las pacientes que debutan con la enfermedad respecto a las pacientes en recaída, de las que muchas son diagnosticadas en las pruebas de seguimiento aún en fase asintomática y, por lo tanto, con enfermedad más localizada y menor carga tumoral.

La valoración de la influencia de las **otras tres variables** que han resultado significativas sobre los niveles de cfDNA debe ser cautelosa. Un nivel de IMC mayor de 25 solo conlleva diferencias en cfDNA<sub>247</sub> y no de cfDNA<sub>115</sub>, que es el parámetro que más parece relacionarse con la actividad del CEO. Tampoco se relaciona con diferencias en la integridad de cfDNA. Esto se debería a diferencias mínimas en la expresión sistémica de fragmentos grandes de cfDNA que alcanzan la significación, pero que no llegan a alterar el índice de integridad de cfDNA. Este hecho podría justificarse debido a que la obesidad se ha relacionado con mayores niveles de radicales libres en el organismo con potencial citotóxico. Este aumento del estrés oxidativo conllevaría a mayor destrucción celular mediante mecanismos degenerativos e inflamatorios<sup>364</sup>, que aumentaría solo fragmentos grandes de cfDNA. Este aumento de cfDNA en la obesidad se ha demostrado recientemente en otras patologías<sup>365</sup>. De cualquier forma, la implicación clínica de este hecho es discutible, puesto que aumentaría el cfDNA de origen no tumoral por la propia obesidad.

La presencia de ascitis severa y de ganglios afectados en el estudio patológico solo se han relacionado con uno de los tres valores de cfDNA, y ninguno con cfDNA<sub>115</sub>. Estos dos parámetros clínicos han sido relacionados con cfDNA en el trabajo de Kamat et al<sup>349</sup>, aunque solo en el estudio univariante, no en el multivariante. En otras neoplasias la afectación ganglionar también se ha relacionado con cfDNA<sup>338, 339, 340</sup>. De cualquier forma, no queda claro el motivo de que estos parámetros solo afecten a un valor de cfDNA y no a todos. Según nuestros resultados la ascitis se asociaría a un aumento de fragmentos grandes de cfDNA, quizás debido a una mayor necrosis celular o mayor componente inflamatorio de la afectación peritoneal. Swisher et al<sup>366</sup> encontraron que en la mayoría de CEO con ascitis había DNA libre tumoral en el fluido peritoneal y en la mitad detectaron DNA tumoral en plasma. Esto sugiere que la ascitis se relaciona con una mayor liberación de DNA tumoral a la circulación. La afectación ganglionar se relacionaría con variación en la relación de fragmentos de cfDNA pero sin modificar su cuantificación total. En el trabajo de Naoyuki et al<sup>340</sup> en cáncer de colon, la

afectación ganglionar se relacionó mejor con la integridad que con la cuantificación de cfDNA. Esto podría ser un marcador precoz de afectación ganglionar. De hecho, no se ha relacionado con ningún otro BM, ni siquiera con los BM de referencia. Lo que no queda claro son las causas de este hallazgo.

Por otro lado, hay que señalar que la edad no ha sido un factor que haya determinado diferencias en el nivel de cfDNA. Esto se ha confirmado en la mayoría de las series<sup>343, 344, 347, 349</sup>. Por lo cual, la diferencia de edad que había entre CEO y tumores benignos no influiría en la diferencia de niveles de cfDNA entre las pacientes y el grupo control.

Un aspecto interesante a destacar es que, como acabamos de ver, el valor de cfDNA115 solo se ha visto influido por la situación de debut de la enfermedad frente a la recaída tumoral. Esto nos indica que la liberación sistémica de cfDNA es independiente de las características del tumor y de la paciente, siendo un mecanismo común de todos los subtipos de CEO, como se ha comprobado en otros trabajos<sup>345, 349</sup>.

El análisis de la relación entre cfDNA y las **variables analíticas generales** planteadas nos ha mostrado que cfDNA se relaciona con parámetros de reactantes de fase aguda, tales como albúmina, LDH, PMN y plaquetas, aunque en un grado bajo. Esto se relacionaría con los procesos inflamatorios derivados del proceso neoplásico, conllevando destrucción celular y liberación de cfDNA y citocinas, que aumentarían los niveles de reactantes de fase aguda<sup>300, 301</sup>. Esta relación ha sido mayor con cfDNA que con los BM de referencia, lo que indica que cfDNA reflejaría mejor el daño celular e inflamatorio que ocurre en el tumor. El hecho que la mayor asociación sea con cfDNA247 sería debido a la mayor actividad inflamatoria asociada a la necrosis tumoral frente a la apoptosis celular. Los mayores índices de correlación han sido con el nivel de albúmina, con una relación negativa moderada. Esto, junto con su relación con el valor de ECOG, confirmaría que el nivel de cfDNA podría ser un buen BM de la afectación del estado general. No hemos encontrado ningún otro trabajo en la literatura que haya explorado este aspecto.

Respecto a la **presencia de CTC**, en nuestra serie solo se ha visto influenciado por la presencia de *omental cake* (OC). En estas pacientes las CTC han sido positivas en el 35,3%, frente al 15,9% en las que no presentaban OC. El resto de variables no ha mostrado diferencias significativas. Los estudios publicados han relacionado diferentes parámetros clínicos, como el estado general ECOG<sup>289</sup>, la presencia de ascitis<sup>289, 293, 277</sup> y el estadio tumoral<sup>284, 293</sup>. Sin embargo, en otras series como la de Liu et al<sup>290</sup> no se ha encontrado relación con ninguna característica clínica. No obstante, la relación de nuestro estudio con la presencia de OC y la relación observada en otros trabajos con la presencia de ascitis y el estadio tumoral, sugieren una importante asociación entre la afectación peritoneal y la presencia de CTC.

Las CTC no han presentado relación con las variables analíticas generales, lo que podría justificarse por su diferente origen. Mientras que la presencia de CTC se debería a la liberación de células tumorales viables en la circulación, el aumento de reactantes de fase aguda se debería a la destrucción celular y liberación de citocinas. Esto sugiere que la liberación de CTC no implica mayor destrucción celular.

#### 6.2.4. INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS EN EL NIVEL DE cfDNA.

Varios trabajos han analizado el efecto de los tratamientos en los valores de cfDNA, con resultados sugerentes de un posible papel en la monitorización de la terapia<sup>310, 328, 335, 342, 346</sup>. Incluso en modelo murino se ha visto que también los ácidos nucleicos circulantes se modifican en función de la respuesta al tratamiento<sup>311</sup>.

En nuestra serie, los tratamientos aplicados en el CEO han influido de diferente forma en los niveles de cfDNA. La **cirugía peritoneal primaria** ha producido una reducción significativa del valor de cfDNA115 (ver tabla 5.36 y figura 5.8). Esto refleja la disminución general de la carga tumoral tras la intervención. Se sabe que los valores de cfDNA se mantienen altos hasta 10 días al menos tras la cirugía, pero al mes se han normalizado<sup>346</sup>. En nuestro estudio, el análisis tras la cirugía se realizó a los 30 días de la intervención, por lo que la determinación no reflejaría el componente inflamatorio de la cirugía. Los otros valores de cfDNA no han mostrado diferencias significativas. Este aspecto ha sido poco explorado en la literatura. Capizzi et al<sup>346</sup> analizan el valor de cfDNA en cirugía de intervalo, pero sin encontrar diferencias significativas antes y después de la intervención. Nuestros datos indican que la disminución de cfDNA115 podría servir como BM de la reducción de la carga tumoral tras la cirugía.

Respecto al **efecto de la QT**, hemos obtenido que ésta influye de forma leve en los valores de cfDNA. El nivel de cfDNA115 muestra una tendencia a la disminución pero sin llegar a ser significativa. Es interesante apreciar que la mayor reducción se produce tras el primer ciclo de QT, siendo la disminución tras completar la QTNA más leve (figura 5.9 y 5.10). En el estudio de Capizzi et al<sup>346</sup> realizaron determinaciones de cfDNA en cada ciclo de QT, encontrando diferencias solo de la determinación basal antes del tratamiento con respecto al resto de ciclos, pero no de los valores de los siguientes ciclos entre sí. En el estudio de Wimberger et al<sup>342</sup> determinaron cfDNA antes y después de completar toda la QT, encontrando diferencias significativas, aunque no hicieron determinaciones seriadas durante el tratamiento para poder comprobar esta observación. En otros tipos de neoplasias, como cáncer de colon, se ha visto que los valores seriados durante la QT muestran relación con la evolución clínica, pero con muchas fluctuaciones en sus valores<sup>335</sup>.

Esta ausencia de efecto significativo del tratamiento de QT sobre el nivel de cfDNA, nos indica que no sería un buen biomarcador de la evolución del tratamiento en el CEO. Sin embargo, los BM de referencia Ca-125 y HE4 si han visto influido sus niveles tanto por la cirugía como por la QT, por lo que serían mejores candidatos para monitorizar el tratamiento que cfDNA.

#### 6.2.5. CORRELACIÓN ENTRE LOS DIFERENTES BIOMARCADORES EN EL CEO.

Los **valores de cfDNA** solo han mostrado relación significativa entre ellos. cfDNA115 y cfDNA247 han presentado una relación positiva, alcanzando el mayor coeficiente de correlación de nuestro trabajo, con  $r = 0,666$ , que puede considerarse una correlación alta. Este hecho nos muestra que los dos valores presentan una cinética lineal, debido a la liberación de ambos cfDNA por la destrucción celular en el CEO. Entre cfDNA115 y la integridad de cfDNA (recordemos que es la proporción cfDNA247/cfDNA115) también ha habido una relación

significativa alta, pero mostrando una relación inversa con coeficiente de Pearson  $-0,609$ . Esto nos confirma que el mecanismo principal de destrucción celular en el CEO sería la apoptosis celular, como hemos visto anteriormente, pues el aumento de cfDNA115 es mayor relativamente que cfDNA247, con quién tiene relación positiva. En el estudio de El-Gayar et al<sup>332</sup> en cáncer de colon encuentran una débil relación positiva entre cfDNA115 e índice de integridad ( $r=0,31$ ;  $p 0,006$ ). En este caso, debido a que el mecanismo predominante sería la necrosis celular, con aumento principalmente de fragmentos grandes de cfDNA, el índice de integridad presenta relación lineal positiva con cfDNA115, pues hay mayor aumento relativo de cfDNA247.

Respecto a la posible relación entre **cfDNA y la presencia de CTC**, en nuestro estudio no hemos encontrado asociación significativa (tabla 5.25 y figura 5.12). Esto nos indicaría que la dinámica de ambos BM seguiría un proceso diferente y serían independientes en la evolución tumoral. No obstante, recordemos que dentro del cfDNA está incluido el ADN proveniente del tumor, llamado ADN tumoral circulante (ctDNA) y el derivado de la destrucción fisiológica. En el estudio de Schwarzenbach et al<sup>341</sup> sobre cáncer de próstata, no obtuvieron relación entre CTC y cfDNA, pero sí hubo relación entre CTC e inestabilidad de microsatélites del cfDNA, más relacionado con ctDNA. En el estudio de Dawson et al<sup>367</sup> en cáncer de mama, que comparó la presencia de CTC y ctDNA, sí encontraron relación entre ambos. Por ello, parece que la presencia de CTC solo se relacionaría con ctDNA pero no con el cfDNA total. No obstante, el hecho que no se modifique cfDNA podría deberse o bien a que la variación de ctDNA respecto a CTC sea significativa pero pequeña, no consiguiendo variar la cuantificación del cfDNA total de forma significativa, o bien a que la proporción de ctDNA sobre el total de cfDNA sea baja para que su modificación represente una alteración significativa del global. A pesar de que la proporción de ctDNA es variable, se sabe que en casos de alta actividad tumoral puede llegar a ser predominante<sup>301, 313, 322</sup>, por lo cual la falta de relación con cfDNA se debería más bien al efecto del primer mecanismo propuesto, es decir, que la variación de ctDNA respecto a CTC sea pequeña.

En relación con los BM de referencia, en nuestra serie no hemos encontrado correlación significativa con los valores de cfDNA (tabla 5.25 y figura 5.12). En la literatura ha habido resultados contradictorios al respecto. En la mayoría de estudios no se ha encontrado correlación entre cfDNA y Ca-125<sup>343, 345, 347</sup>, aunque en la serie de Kamat et al<sup>349</sup> si se encontró. El hecho que en la mayoría de trabajos, incluido el nuestro, no se encuentre correlación entre ambos sería debido también a su diferente mecanismo de producción y dinámica tumoral.

Las **CTC** solo han presentado relación significativa con HE4. En la serie de Obermayer et al<sup>277</sup> también confirman una relación con HE4. Sin embargo, no hemos hallado relación con diferencia significativa entre CTC y Ca-125, algo que sí ha sido comunicado en otras series<sup>277, 289, 293, 295</sup> y en el metanálisis de Zhou et al<sup>285</sup>, aunque en otros estudios no lo han confirmado<sup>247</sup>. No encontramos una razón que justifique esta falta de relación en nuestro estudio. Valorando los datos, quizás la gran dispersión de los datos que han presentado las pacientes con CTC negativas en comparación con las pacientes con CTC positiva pueda influir en esta cuestión. De hecho, la media de Ca-125 en las pacientes con CTC negativas ha sido mayor que en aquellas con CTC positivas, mientras que la mediana ha sido al contrario, debido a que esta medida central está menos influida por los valores extremos. Por ello, se repitieron

los cálculos con el logaritmo neperiano de Ca-125 para solventar este problema, pero la diferencia tampoco alcanzó la significación.

#### **6.2.6. ANÁLISIS UNIVARIANTE Y MULTIVARIANTE DEL VALOR PREDICTIVO DE RESPUESTA DE LOS BIOMARCADORES.**

En la literatura podemos encontrar varios trabajos que han obtenido valor predictivo de cfDNA y CTC en diversos tipos neoplásicos, incluido el CEO<sup>230, 284, 310, 328, 333</sup>. En nuestro estudio, los resultados más relevantes han sido que cfDNA115 presenta un importante valor predictivo de respuesta a QTNA y que la integridad de cfDNA es factor predictivo de cirugía óptima. La presencia de CTC no ha sido factor predictivo de respuesta a quimioterapia ni de cirugía óptima.

El **nivel de cfDNA115** ha sido el único valor basal predictivo de respuesta a QTNA. Un mayor valor se ha relacionado con peor respuesta a QTNA. Este hecho puede justificarse debido a que los pacientes con mayor carga tumoral, y con ello mayor destrucción tumoral y mayor cfDNA, presentan peor respuesta clínica<sup>212</sup>. Este resultado es especialmente importante debido a que la respuesta a QTNA ha sido el mayor factor predictivo de respuesta tumoral de la paciente, como vimos anteriormente. Este papel predictivo de respuesta a QTNA se confirma en el análisis multivariante, en donde el presentar un tipo histológico II de Kurman y un nivel basal bajo de cfDNA115, han sido los dos únicos factores predictivos positivos independientes de respuesta a QTNA en nuestra serie. Hay que destacar también el importante concepto del modelo de Kurman, pues refleja dos poblaciones de CEO con un comportamiento y con respuesta a QT diferente<sup>59</sup>, como ya hemos comentado en el punto 6.1.3. Así pues, estas dos variables, el tipo histológico de Kurman y el valor de cfDNA115, podrían ser variables a incluir en el panel de valoración de la paciente antes de decidir un plan terapéutico específico.

Ninguno de los niveles basales del resto de BM han sido predictivos de respuesta a QTNA (tabla 5.26, tabla 5.28 y figura 5.13), lo que remarca la importancia de cfDNA115 como nuevo BM.

Sin embargo, el valor de cfDNA115 no ha presentado valor predictivo del resultado quirúrgico. La diferencia de sus medias no alcanza la significación. El bajo número de eventos de cirugía subóptima de nuestra serie limita la valoración de este resultado. En otras series sí se ha descrito que pudiera ser factor predictivo de cirugía subóptima<sup>342, 346</sup>. En el estudio de Kamat et al<sup>349</sup> el nivel de cfDNA se relacionó con una cirugía sub-óptima, tanto en el análisis univariante como el multivariante.

En un intento de tener una valoración precoz de respuesta, se comparó el valor basal de los BM con el valor tras un ciclo de QT. En el caso de cfDNA115, la reducción no ha sido factor predictivo de respuesta. No hemos encontrado trabajos en CEO que evalúen esta cuestión. Capizzi et al<sup>346</sup> analizan el valor de cfDNA en CEO pero tras finalizar 6 ciclos de QTNA, encontrando valor predictivo de respuesta la determinación en el último ciclo. Por ello, este resultado junto al análisis realizado anteriormente sobre el escaso efecto de un ciclo de QT sobre los niveles de cfDNA, nos indica que no deba recomendarse una determinación precoz

de la variación de su valor en el CEO. Los trabajos sobre otras neoplasias tampoco han realizado determinación precoz de la variación de cfDNA. Delgado et al<sup>333</sup> en cáncer de próstata planteó determinación cada 3 meses, aunque tampoco encontró relación de la respuesta serológica. Schwarzenbach et al<sup>335</sup> en cáncer de colon realizaron determinaciones pero de forma arbitraria separadas por 6-12 semanas, hallando frecuentes fluctuaciones de su valor.

En nuestra serie, el único BM cuya reducción con un ciclo de QT ha presentado valor predictivo de respuesta a QTNA ha sido HE4. Hay pocos trabajos que exploren este aspecto, pero la mayoría también encuentran como factor papel predictivo la variación de HE4 con la QT<sup>368, 369</sup>. La diferencia con nuestro trabajo, es que la mayoría de trabajos han analizado la variación no tras el primer ciclo, sino entre antes y después de QTNA<sup>368, 369</sup>. Nosotros hemos demostrado que con HE4 se puede predecir la respuesta a QTNA de forma precoz tras el primer ciclo de QT.

Por otro lado, un nivel bajo de **integridad de cfDNA** ha sido factor predictivo de cirugía óptima (tabla 5.30 y figura 5.14). Esto puede deberse a que valores altos de integridad se relacionan con la presencia de mayor necrosis tumoral y, por lo tanto, una histología más agresiva, lo que conllevaría a una menor probabilidad de cirugía completa. En CEO, debido a la variedad de metodologías usadas, la integridad no ha sido analizada hasta la fecha actual. En otros tumores utilizando las secuencias ALU para estudio de cfDNA, algunos autores han obtenido que la integridad de cfDNA presenta valor predictivo<sup>329, 333</sup>.

El valor previo a cirugía de HE4 también ha sido factor predictivo del resultado quirúrgico en nuestra serie, al igual que en otros trabajos, pero Ca-125 solo ha mostrado una tendencia no significativa<sup>369, 370</sup>.

El **análisis multivariante de cirugía óptima**, ha mostrado que las dos únicas variables independientes han sido nivel de PCI menor o igual a 12 y presentar una albúmina normal. HE4 perdió la significación en el estudio multivariante. Así pues, queda patente la importancia en el resultado quirúrgico de la valoración de la extensión de la enfermedad a través del PCI. En nuestra serie ha sido el factor predictivo de cirugía óptima más importante. Algunos autores intentan hacer una aproximación del PCI quirúrgico a través de la imagen radiológica, para establecer el llamado "PCI radiológico", que sería una valoración de la extensión de la enfermedad peritoneal siguiendo los mismos criterios de puntuación que el PCI quirúrgico<sup>371, 372</sup>. No obstante, en este análisis multivariante no se ha incluido la integridad de cfDNA, por el bajo número de eventos resultante. Por ello, no hemos podido calcular su grado de independencia de otras variables analizadas. De cualquier modo, con la base de su papel en otras neoplasias y los resultados de nuestro estudio, se podría decir que la integridad de cfDNA presenta un papel predictivo de cirugía en CEO. Su determinación podría ayudar a seleccionar la mejor secuencia de tratamiento inicial de la paciente, entre CPP o QTNA.

En relación a la **presencia de CTC**, en nuestro trabajo no se ha mostrado que sea un factor predictivo de respuesta ni del resultado de cirugía. Su papel predictivo en otros estudios tampoco está claro. Algunos autores sí han encontrado relación significativa entre CTC y una menor respuesta tumoral<sup>277, 296</sup>, incluido el metanálisis de Cui et al<sup>284</sup>, pero otros autores no han confirmado este papel<sup>284, 289, 290, 295</sup>. Respecto al resultado quirúrgico, la presencia de CTC en nuestro trabajo ha estado próxima a la significación estadística pero sin alcanzarla ( $p =$

0,066) (tabla 5.36). No obstante, el bajo número de cirugías realizadas en las pacientes con CTC positivas ha sido una importante limitación de los resultados. En el trabajo de Aktas et al<sup>291</sup> y el de Obermayr et al<sup>298</sup> sí se relacionó con resección quirúrgica óptima. Por ello, dada la tendencia próxima a la significación incluso con bajo número de cirugías y los datos de estos dos trabajos, nos indicaría que la presencia de CTC sí pudiera tener papel predictivo de cirugía. Sin embargo, en el análisis multivariante en relación al resto de variables clínicas, no fue factor independiente significativo del resultado quirúrgico (tabla 5.32). Por lo tanto, en nuestro trabajo no podemos confirmar un valor predictivo de cirugía óptima.

Respecto al valor post-quirúrgico de los BM, ningún valor de cfDNA ha sido factor predictivo de respuesta. Solo el valor de Ca-125 post-quirúrgico ha sido factor predictivo, tanto en el análisis univariante como en el multivariante, siendo el único factor predictivo independiente de respuesta tumoral tras completar el tratamiento con cirugía y QT.

**En conclusión**, con los datos aquí presentados, estas 5 variables (albúmina, tipo histológico de Kurman, nivel de cfDNA115, integridad de cfDNA y PCI radiológico) se debería valorar su inclusión en la valoración inicial de las pacientes, para establecer la estrategia de tratamiento más adecuado.

#### **6.2.7. ANÁLISIS UNIVARIANTE Y MULTIVARIANTE DEL VALOR PRONÓSTICO DE LOS BIOMARCADORES.**

Los principales resultados de nuestro estudio han sido la demostración del papel pronóstico de cfDNA y de la presencia de CTC.

La SLP se ha visto determinada por los valores basales de cfDNA115 y cfDNA247, y por la reducción de un 50% de la integridad de cfDNA, Ca-125 y HE4 (tabla 5.38, figura 5.17 y 5.18). La SG ha estado condicionada por los niveles basales de cfDNA115, cfDNA247 y la presencia de CTC (tabla 5.41, figura 5.20). La variación de los BM tras un ciclo de QT no ha tenido valor pronóstico de SG.

El **nivel basal de cfDNA115** ha presentado un importante valor pronóstico, tanto de SLP como de SG. Un valor de cfDNA115 por encima del valor de corte establecido se relaciona con peor SLP y SG de forma significativa. Esto se debe a la mayor carga tumoral del paciente que refleja cfDNA115, lo que provoca un deterioro del estado general y peor respuesta a QT, como vimos anteriormente, conduciendo al final a una peor evolución clínica. Este valor pronóstico se ha confirmado en otras series de CEO<sup>342, 343, 346, 347, 349</sup> y en otros tipos de neoplasias<sup>301, 335, 373</sup>. En el estudio de Kamat et al<sup>349</sup> encontraron que un nivel por encima de la mediana de cfDNA constituyó un factor pronóstico negativo de SG (3 años vs 4,1 años, para valores por encima y debajo de la mediana respectivamente), que se confirmó en el análisis multivariante. Incluso en pacientes resistentes a platino, Steffensen et al<sup>347</sup> encontraron que cfDNA115 constituía un importante marcador de SLP y SG.

La variación de cfDNA115 con la QT no ha presentado valor pronóstico. Este aspecto en CEO no ha sido explorado, por lo que no tenemos datos para comparar. En el congreso americano de oncología médica (ASCO) de 2016, se comunicó en cáncer de pulmón que la variación de cfDNA tras 2 ciclos de QT tenía valor pronóstico<sup>373</sup>. No obstante, teniendo en cuenta este resultado y que en nuestra serie su reducción con QT tampoco fue factor

predictivo de respuesta, la determinación seriada en CEO de cfDNA115 no parece presentar por ahora utilidad clínica. No obstante, un seguimiento más prolongado de nuestra serie podría modificar estos resultados.

El **valor basal de cfDNA247** también ha sido factor pronóstico tanto de SLP como de SG. Este parámetro no ha sido explorado en CEO. En otros tipos neoplásicos como cáncer de mama se ha visto que este parámetro tiene valor pronóstico<sup>374</sup>. Su valor refleja la presencia de fragmentos grandes de cfDNA relacionados principalmente con mayor necrosis tumoral. En CEO ya hemos visto anteriormente que este mecanismo es un proceso de menor importancia que la apoptosis, pero este resultado pronóstico es muy interesante pues implica que la presencia de CEO con necrosis significativa conllevará un peor pronóstico de supervivencia, no solo de SLP, sino también SG, con una importante separación de las curvas de supervivencia (figura 5.20).

Respecto a la **integridad de cfDNA**, un importante y novedoso hallazgo de este trabajo es que la disminución de un 50% de su valor con un ciclo de QT ha sido factor pronóstico de SLP, tanto en el estudio univariante como en el multivariante. Esta reducción ha supuesto peor SLP, con 4 recaídas en las 5 pacientes que la presentaban. Esto podría justificarse porque esa mayor reducción de la integridad se relacionaría con resistencia al tratamiento debido al mantenimiento de la apoptosis tumoral del CEO a pesar de recibir QT, disminuyendo relativamente más cfDNA247 que cfDNA115 y produciendo un mayor descenso de la integridad. Este hallazgo no ha sido explorado anteriormente y podría representar un marcador precoz de resistencia al tratamiento. No obstante, el bajo número de pacientes que lo presentan nos hace tomar este resultado con cautela. Respecto a la SG, es demasiado pronto para obtener diferencias, pero de las 5 pacientes con ese valor ya han fallecido 2 de ellas, aunque no alcanza la significación (tabla 5.41 y figura 5.21).

Su valor basal no ha presentado valor pronóstico, sin embargo, en otros tipos neoplásicos como cáncer de colon y de próstata sí lo ha presentado<sup>328, 329, 333</sup>. Esto puede ser ocasionado por la menor relevancia que presenta la integridad en el CEO.

En nuestra serie, **la presencia de CTC** en CEO ha sido factor pronóstico de SG, pero no de SLP. En los estudios publicados ha habido resultados contradictorios. En relación a SLP, unos estudios sí han encontrado relación<sup>277, 294, 295, 296</sup> y otros no<sup>288, 289, 291</sup>. Sin embargo, en los dos metanálisis publicados<sup>284, 285</sup>, sí han mostrado que la presencia de CTC tiene valor pronóstico de SLP. Respecto a la SG, el resultado de CTC de nuestro estudio confirma los hallazgos de algunas series<sup>277, 294</sup> y los dos metanálisis<sup>284, 285</sup>. Si bien hay trabajos en donde esta relación no se ha demostrado<sup>281, 283, 288, 289, 290, 295</sup>. Incluso en el metanálisis de Zhou et al<sup>285</sup>, el subgrupo de estudios realizados con *CellSearch* no obtuvo relación con la SG. Uno de los estudios más grandes con CTC fue comunicado por Poveda et al<sup>289</sup>, encontraron valor pronóstico para SG en el análisis univariante, pero no mantuvo la significación en el multivariante. La justificación de que CTC sea factor pronóstico de SG pero no de SLP es difícil de valorar. Por una parte, dado que las CTC no son factor predictivo de respuesta, podría justificar que no halla separación inicial en las curvas de SLP (figura 5.17). Por otra parte, la separación inicial en las curvas de SG (figura 5.20) nos llevó a pensar en la posibilidad de la influencia de las muertes ocurridas durante el tratamiento. Por ello, se analizaron estos 4 fallecimientos, comprobando que en 2 de las pacientes no se determinaron CTC, en una

presentó ausencia de CTC y en la otra sí hubo CTC positivas. Así pues, estas muertes no han supuesto un sesgo en la valoración del valor pronóstico de SG. En el estudio de Aktas et al<sup>291</sup> también la presencia de CTC no se relacionó con SLP pero sí con la SG. Un mayor seguimiento de las pacientes podría modificar estos resultados.

Los **análisis multivariantes** realizados, tanto para SLP como SG, hay que tomarlos con precaución, debido al escaso número de eventos registrados hasta la fecha. Para SLP solo tres variables mantienen valor pronóstico independiente: un valor de PCI menor o igual a 12, la respuesta a QTNA y la reducción de la integridad de cfDNA mayor de un 50% con el primero ciclo de QT. Pierden la significación los valores basales de cfDNA. Respecto a SG, solo el valor de PCI mantiene la significación en el análisis multivariante. Es destacable el importante papel pronóstico independiente que ha presentado en nuestro estudio la valoración del PCI, tanto para SLP como SG, algo que se ha confirmado en otras series<sup>104, 358, 359</sup>. No obstante, estos resultados deberían ser considerados provisionales a falta de un seguimiento más prolongado.

Respecto a los **BM de referencia** en nuestro estudio, solo han sido factores pronóstico de SLP la reducción de un 50% de su valor tras un ciclo de QT, pero no para SG. Tampoco el valor basal de ninguno de los dos fue factor pronóstico. En la literatura hay resultados contradictorios, mientras en unas series sí han encontrado valor pronóstico de SLP y de SG<sup>204, 208, 213, 375, 376</sup>, en otras no se ha confirmado<sup>212, 349</sup>.

Por último, revisando los requisitos que todo BM debe cumplir propuestos por la Academia Nacional de Bioquímica Clínica de Estados Unidos<sup>193</sup> y el Instituto de Salud Americano<sup>194</sup> (ver página 45), podemos comprobar que los nuevos BM analizados en el presente trabajo cumplen con todos los criterios. Hemos demostrado que presentan un significativo e independiente valor pronóstico (a falta de un mayor seguimiento), su determinación es factible y reproducible, con una metodología propuesta en diversos tipos neoplásicos, y sus resultados son datos objetivos fácilmente interpretables.

Además, un aspecto importante a tener en cuenta a la hora de valorar nuevos BM pronósticos, es valorar la utilidad clínica de ese BM, entendida ésta como la capacidad que posee para mejorar la toma de decisiones clínicas y los resultados en el paciente respecto a los BM ya establecidos<sup>192</sup>. Nuestros resultados han mostrado que tanto cfDNA como CTC han presentado mayor valor pronóstico que los BM de referencia, y también con importante papel predictivo. Por ello, creemos que podrían ser incluidos en la práctica clínica habitual.

### 6.3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El presente trabajo ha presentado varias limitaciones que deben tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

Por una parte, la mayor parte del estudio se ha desarrollado en un único centro, el HCUVA, con la participación en el último año del Hospital Universitario Santa Lucía de Cartagena. No obstante, las características clínicas y patológicas han sido similares a otras

series. Los datos han sido recogidos sólo por el doctorando, para homogeneizar la calidad de los datos.

Las técnicas y procedimientos para el análisis de cfDNA y CTC son fundamentales para la interpretación de resultados. En ellos influyen multitud de factores, desde la toma y manipulación de las muestras, el tubo de recolección (EDTA o específico de DNA circulante), procesamiento en plasma o en suero, el tiempo en que se procesa, procedimiento de centrifugado y congelación, método de aislamiento y detección de los BM. Todas estas variables determinarán una mayor o menor calidad de los resultados, que es precisar optimizar. La variación de metodología entre los diferentes estudios es uno de los grandes problemas del análisis de cfDNA y CTC. Para que los resultados puedan ser comparables y poder mejorar los conocimientos sobre estos BM, es necesario estandarizar los procedimientos y que la comunidad científica adopte una única metodología de trabajo.

El tamaño muestral también ha sido una limitación para la obtención de resultados, aunque el presente trabajo representa el tercer mayor estudio de cfDNA en pacientes que se ha comunicado. Un mayor tamaño muestral podría modificar los resultados.

La heterogeneidad del CEO, tanto por sus diferentes escenarios clínicos posibles como por su variedad histológica, puede ser una limitación. En nuestro estudio solo se pusieron como criterios de inclusión el presentar estadio avanzado o recaída sensible, y que fuera susceptible de recibir tratamiento con quimioterapia. No se limitó la inclusión por tipo histológico o esquema de tratamiento indicado.

Pero la mayor limitación de nuestro trabajo ha sido el escaso seguimiento que actualmente presenta, que comporta aún un bajo número de eventos valorables. Se realizará un seguimiento de los pacientes y análisis periódico de resultados que serán comunicados más adelante en congresos nacionales e internacionales y revistas científicas.



## 7. Conclusiones

---



1. Según los resultados de este estudio, los niveles elevados de ADN libre circulante y la presencia de CTC en el carcinoma epitelial de ovario en estadio avanzado son factores deletéreos para la supervivencia libre de progresión tumoral y supervivencia global de las pacientes.
2. La reducción de la integridad de ADN mayor del 50% tras tratamiento con quimioterapia es un marcador precoz de resistencia al mismo, según nuestros datos.
3. El nivel basal de ADN libre circulante y el valor de su integridad podrían ser dos nuevos biomarcadores predictivos de respuesta tumoral. Niveles elevados de ADN libre circulante se relacionan con una menor respuesta a quimioterapia neoadyuvante. Un valor alto de integridad de ADN libre circulante podría predecir una cirugía peritoneal con resultado subóptimo.
4. Los niveles de ADN libre circulante en pacientes con carcinoma epitelial de ovario avanzado son significativamente más elevados que en los controles sanos y patología ovárica benigna. Además, se relacionan con deterioro del estado general de las pacientes. Por otro lado, no mejoran la capacidad diagnóstica de malignidad de los biomarcadores de referencia Ca-125 y HE4.
5. La presencia de CTC podría ser un nuevo biomarcador poco sensible pero muy específico de malignidad.
6. Los nuevos biomarcadores ADN libre circulante y CTC podrían ser útiles e incluirse en los protocolos asistenciales para valoración inicial y tratamiento del CEO, ya que se relacionan mejor con el pronóstico y con la predicción de respuesta al tratamiento que los biomarcadores clásico Ca-125 y HE4, según nuestro estudio.



## **8. Implicaciones clínicas y perspectivas futuras**

---



## **IMPLICACIONES CLINICAS**

Los resultados que aporta este trabajo presentan gran relevancia clínica. Por una parte, confirma el valor pronóstico de cfDNA y CTC en el CEO avanzado. Este hecho ha presentado resultados desiguales en la literatura. Nuestro trabajo apoya su papel en el pronóstico de las pacientes, mejorando la información y valoración de la evolución tumoral.

Además, nos aporta un nuevo BM de valoración precoz de la resistencia a los tratamientos que no había sido descrito anteriormente. Por otro lado, nos aporta dos nuevos biomarcadores predictivos de respuesta. Uno ha presentado valor predictivo independiente para aquellas pacientes que van a recibir quimioterapia neoadyuvante, ayudándonos a la toma de decisiones en la valoración inicial de la paciente. El otro ha presentado valor predictivo del resultado quirúrgico.

También nos podría aportar otro nuevo biomarcador para determinar la carga tumoral residual tras la cirugía peritoneal, en cuanto que los niveles de cfDNA se reducen tras la intervención. Por ello, es un factor a explorar para futuros proyectos. Sin embargo, no hemos hallado utilidad de la monitorización con determinaciones seriadas durante el tratamiento con quimioterapia.

En relación a la fisiopatología de la enfermedad, el presente trabajo mejora nuestro conocimiento sobre las causas que justifican el mayor o menor deterioro del estado general de una paciente, en cuanto que se relaciona con la carga tumoral sistémica medida por los niveles de cfDNA. También, hemos confirmado una situación de mayor destrucción celular en las pacientes con CEO respecto a pacientes con tumores benignos de ovario y sujetos sanos, entre los que no hay diferencias de lisis celular. Además, hemos confirmado que el mecanismo principal de destrucción celular en el CEO ha sido la apoptosis celular.

Por último, hemos demostrado que los valores de cfDNA no mejoran la capacidad diagnóstica de malignidad en el CEO respecto a los BM de referencia, presentando menor sensibilidad y especificidad. No obstante, su posible papel diagnóstico en la fase inicial de la enfermedad debería ser explorado en futuros estudios. Por otro lado, las CTC presentan una elevada especificidad y valor predictivo positivo.

Con estos resultados, los nuevos BM podrían incluirse en los protocolos asistenciales de valoración inicial y tratamiento del CEO, por su papel pronóstico y predictivo de respuesta a QTNA, y CTC podría incluirse en el protocolo de diagnóstico diferencial de la enfermedad, aunque no cfDNA.

El trabajo de tesis doctoral que se propone aquí ha abierto una línea de investigación dentro del servicio de oncología médica de nuestro centro, con orientación y disposición multidisciplinar, colaborando con otros servicios y departamentos en la búsqueda de nuevos conocimientos acerca del desarrollo y evolución carcinoma epitelial de ovario, y sirviendo de base para realizar nuevos proyectos.

## PLAN DE DIFUSION

Se ha remitido comunicación al próximo congreso anual de la Sociedad Americana de Oncología Médica (ASCO) que se celebrará entre el 2 y el 6 de junio de 2017 en Chicago (USA), siendo aceptado como “Poster Session”, con abstract número 5566.

Se enviarán comunicaciones de las actualizaciones del seguimiento a congresos nacionales e internacionales. Posteriormente a la lectura de la presente tesis, se redactará trabajo para su publicación en revista científica.

## RELACION CON OTROS ESTUDIOS

Por una parte estamos participando con el servicio de Inmunología Clínica en el estudio del papel de CTC y células *natural killer* (NK) en la carcinogénesis a través de una beca del Instituto de Salud Carlos-III, expediente PI13/02297, titulado “Regulación de la respuesta anti-tumoral de células NK y su relación con la susceptibilidad, diseminación y respuesta al tratamiento del cáncer”, siendo el investigador principal el Dr. Alfredo Minguela Puras, y duración de 2014 a 2016. Fruto de estas investigaciones han sido las siguientes comunicaciones a congresos:

- Jerónimo Martínez-García, MV Martínez-Sánchez, A. Torroba Caron et al.  
Immunological profile in patients with epithelial ovarian cancer. Data of the RENO project and the FIS-PI13/02297 project. Abstract 6795.  
ESGO 2014, International meeting of the European society of Gynaecological Oncology, October, 2014 Turin (ItaliaFrancia)  
International Journal of Gynecological Cancer: October 2014 - Volume 24, supp 2 - Issue 8 - pag 77doi: 10.1097/01.IGC.0000455561.57987.ea; PMID: 25251322  
Comunicación tipo poster.
- Jeronimo Martínez-García, MV Martínez-Sánchez, A. Torroba Caron et al.  
Immunological profile in patients with epithelial ovarian cancer. Updated data of the RENO project and the FIS-PI13/02297 project. Abstract 0715  
ESGO 2015, International meeting of the European society of Gynaecological Oncology, October 24-27, 2015 Nice (Francia)  
Comunicación tipo poster.
- Jeronimo Martínez-García, M. Victoria Martínez-Sánchez, Pilar Sánchez-Henarejos et al.  
Perfil inmunológico en pacientes con cáncer epitelial de ovario. Datos iniciales del proyecto local RENO y proyecto FIS-PI13/02297. Comunicación oral O-18  
Congreso nacional SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica) 2015, 28-30 octubre, Madrid (España)

Durante el primer año de desarrollo del trabajo también se colaboró con la unidad de investigación traslacional de la Asociación Española contra el Cáncer situada en el HCUVA. El objetivo fue individualizar el tratamiento mediante cultivo celular de células procedentes de excedente del material biológico de biopsia y/o cirugía de las pacientes incluidas en el estudio RENO. Se relacionó con la evolución clínica y posteriormente se relacionaría con los BM a estudio. Fruto de estas investigaciones fueron las siguientes comunicaciones a congresos:

- Jeronimo Martínez-García, María Nela García-Espinosa, Mar Carballo Santana et al.

Individualización del tratamiento en cáncer de ovario mediante cultivo celular. Datos del proyecto local RENO. Comunicación oral O-19

Congreso nacional SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica) 2015, 28-30 octubre, Madrid (España)

- Jeronimo Martinez-García, MN García-Espinosa, Mar Carballo-Santana et al. Cell culture as a tool to individualize chemotherapy in ovarian cancer. Data from the RENO project. Abstract0828  
ESGO 19, International meeting of the European Society of Gynaecological Oncology, October 24-27, 2015 Nice (France)

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Nuestras perspectivas futuras en relación a este proyecto son:

- Seguimiento a largo plazo del estudio. Nuestra principal limitación actual es el escaso tiempo de evolución de la muestra. Haremos un seguimiento a largo plazo con análisis periódico de resultados. Estos se comunicarán a congresos oncológicos y revistas científicas.
- Realización de estudio de mutaciones de tp53 en el cfDNA de nuestro trabajo, para establecer su valor predictivo y pronóstico. Está pendiente de obtener financiación.
- Ampliar el estudio de cfDNA a otros tipos tumorales. Para ello, se está en fase de diseño del proyecto para la búsqueda de colaboración entre otros hospitales y obtener financiación.



## 9. Anexos

---



## ANEXO I. TNM 7ª EDICIÓN DE 2010. FIGO 2014

TNM 7ª ed, FIGO 2014 2010		
T1 N0 M0	I	Limitado a los ovarios o trompa de Falopio
T1a	IA	Limitado a un ovario o trompa de Falopio con cápsula intacta, ausencia de tumor en superficie ovárica o trompa; líquido ascítico negativo
T1b	IB	Limitado a los dos ovarios o trompas de Falopio con cápsula intacta, ausencia de tumor en superficie ovárica o trompa; líquido ascítico negativo
T1c	IC	Uno o ambos ovarios o trompas con alguno de los siguientes:
T1c1	IC1	Derrame quirúrgico, rotura quirúrgica de la cápsula
T1c2	IC2	Cápsula rota antes de la cirugía o tumor en superficie ovárica o trompa
T1c3	IC3	Líquido ascítico positivo o lavado peritoneal positivo
T2 N0 M0	II	Enfermedad con extensión pélvica, afectando a 1 o ambos ovarios o trompas
T2a	IIA	Utero o trompas u ovarios
T2b	IIB	Otros tejidos pélvicos intraperitoneales
T3 y/o N1	III	Enfermedad con diseminación peritoneal extrapélvica y/o afectación ganglionar regional
T1/2 N1	IIIA1	Afectación ganglios retroperitoneales exclusiva (por citología o histología)
	IIIA(i)	Metástasis ganglionar hasta 10 mm en la dimensión mayor
	IIIA(ii)	Metástasis ganglionar más de 10 mm en la dimensión mayor
T3a2 N0/N1	IIIA2	Afectación peritoneal extrapélvica microscópica con o sin afectación ganglionar retroperitoneal
T3b N0/N1	IIIB	Afectación peritoneal extrapélvica macroscópicas hasta 2cm con o sin afectación ganglionar retroperitoneal
T3c N0/N1	IIIC	Afectación peritoneal extrapélvica macroscópica >2 cm con o sin afectación ganglionar retroperitoneal
M1	IV	Metástasis a distancia, excepto las peritoneales (1)
	IVA	Derrame pleural con citología positiva
	IVB	Metástasis parenquimatosas y metástasis a órganos extra-abdominales (incluido adenopatías fuera de la cavidad abdominal)
<p>Ganglios regionales: hipogástricos, íliaco común, íliaco externo, sacro lateral, paraórticos e inguinales.  pN0 precisa 10 ganglios al ser linfadenectomía pélvica  (1) La extensión del tumor a la cápsula hepática y esplénica sin afectación parenquimatosa se considera IIIC, y las metástasis del parénquima hepático, infiltración transmural intestinal y depósito umbilical como M1.</p>		

De: Jaime Prat; for the FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. Int J Gynecol Obstet 2014;124 (1):1-5. PMID 24210074

## ANEXO II. ESCALA ECOG ESTADO GENERAL

GRADO	Valoración
0	Asintomático. No restricción
1	Escasa sintomatología. Limitación en actividades intensas, pero capaz de desarrollar actividad de intensidad leve/moderada
2	Sintomático. Ambulatorio y capaz de cuidados propios, pero incapaz de realizar actividad física alguna Pasa menos del 50% del tiempo sentado o acostado
3	Muy sintomático. Capaz de realizar sólo actividades básicas. Encamado o sentado más del 50% de su tiempo
4	Completamente limitado. Encamado el 100% del tiempo
5	Muerte

De: Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J et al. Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol 1982;5(6):649-655. PMID 7165009

## ANEXO III. CRITERIOS DE RESPUESTA RADIOLÓGICA RECIST 1.1

Lesión Diana (1)	Lesión No Diana (2)	Nueva lesión	Respuesta Global
RC	RC	No	RC
RC	No RC/ No PE	No	RP
RC	No valorable	No	RP
RP	No PE o no valorable	No	RP
EE	No PE o no valorable	No	EE
No valorable	No PE	No	No valorable
PE			PE
	PE		PE
		SI	PE
<p>(1) Lesión Diana:            RC: desaparición de lesiones diana            RP: reducción de al menos un 30% en la suma de diámetros de lesiones diana de referencia            PE: aumento de al menos un 20% en la suma de diámetros de lesiones diana de referencia, tomando como referencia la suma más pequeña en estudio. Debe también aumentar al menos 5 mm.            EE: no cumple criterios ni de RP ni del PE</p>			
<p>(2) Lesión No Diana:            RC: desaparición de lesiones no diana y normalización del marcador tumoral            No RC / No PE: persistencia de una o más lesiones no diana y/o mantenimiento del nivel de marcador tumoral por encima del nivel normal            PE: progresión inequívoca de lesiones no diana o aparición de nuevas lesiones no diana</p>			
<p>Lesiones tumorales medibles se consideran aquellas con al menos una dimensión mínimo de 10 mm por TC.            Los ganglios linfáticos se considerarán patológicos cuando el eje corto sea como mínimo de 15 mm.            Lesiones no medibles serán aquellas lesiones menores de 10 mm y ganglios linfáticos entre 10 y 15 mm, al igual que otras lesiones como ascitis, derrame pleural o pericárdico, afectación leptomenígea, linfangitis pulmonar.</p>			

RC=Respuesta Completa; RP=Respuesta parcial; EE= Enfermedad Estable; PE=Progresión de Enfermedad

De: Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer 2009;45(2):228-247. PMID 19097774

## ANEXO IV. CRITERIOS DE RESPUESTA Y PROGRESION EN CANCER DE OVARIO DEL GCIG 2011

### Evaluación de la mejor respuesta en pacientes sin lesión medible inicial y que son valorados por Ca-125

Ca-125 (1)	Lesiones No Diana (2)	Nueva Lesión	Respuesta Serológica global (3)
Respuesta o Normalización	RC	No	RC
Respuesta	No PE	No	RP
Normalización por no respuesta	No RC / No PE	No	EE
No RP/ No PE	No PE	No	EE
PE	Cualquiera	Cualquiera	PE
Cualquiera	PE	Cualquiera	PE
Cualquiera	Cualquiera	Si	PE
<p>(1) La respuesta de Ca-125 se define por la reducción de al menos un 50% de su valor respecto al valor antes del tratamiento.            La respuesta precisa confirmarla y mantenerla al menos 28 días.            El paciente podrá ser valorado por Ca-125 sólo si presenta un valor en las 2 semanas previas al tratamiento de al menos 2 veces el LSN.            El Ca-125 no será valorable si se realiza un procedimiento invasivo en peritoneo o pleura en los 28 días previos.            La fecha de la respuesta será la fecha cuando el Ca-125 baja por primera vez del 50% del valor antes del tratamiento.</p>			
<p>(2) Lesión No Diana incluye ascitis y derrame pleural, que no son medibles acorde a RECIST.</p>			
<p>(3) La respuesta global precisa confirmarla y mantenerla al menos 28 días</p>			

RC: Respuesta Completa; RP: Respuesta Parcial; EE: Enfermedad Estable; PE: Progresión de Enfermedad  
 LSN: límite superior normal.

### Definición de progresión

RECIST	Ca-125
Comparado con la suma más baja, aumento de un 20% la suma de los diámetros de las lesiones diana	Aumento de Ca-125 dos o más veces el LSN o el valor nadir, comprobado en 2 ocasiones separados al menos una semana
O	
Nueva lesión (medible o no medible)	La fecha de progresión será la fecha del primer aumento de Ca-125 por encima del LSN/nadir
O	
Inequívoca progresión en lesión no diana	
La fecha de la progresión por RECIST será la fecha de documentación del aumento o nuevas lesiones	

Evaluación de la mejor respuesta en pacientes con lesión medible y que son también valorados por Ca-125				
Lesión Diana (1)	Lesión No Diana (2)	Nueva lesión	Ca-125	Respuesta Global (3)
RC	RC	No	Normal	RC
RC	No RC/ No PE	No	No PE	RP
RC	RC	No	RP pero no normal	RP
RC	No valorable	No	RP	RP
RP	No RC/ No PE	No	No PE	RP
No valorable	No PE	No	RP	RP
EE	No PE	No	RP	RP
EE	No PE o no valorable	No	No RP y no PE	EE
PE	Cualquiera	Cualquiera	Cualquiera	PE
	PE			PE
		Si		PE
			PE	PE
<p>(1) Lesión Diana: incluye hasta 5 lesiones medibles (2 por órgano) según RECIST 1.1            RC: desaparición de lesiones diana            RP: reducción de al menos un 30% en la suma de diámetros de lesiones diana de referencia            PE: aumento de al menos un 20% en la suma de diámetros de lesiones diana de referencia, tomando como referencia la suma más pequeña en estudio. Debe también aumentar al menos 5 mm.            EE: no cumple criterios ni de RP ni del PE</p>				
<p>(2) Lesión No Diana: incluye ascitis, carcinomatosis peritoneal según RECIST 1.1            RC: desaparición de lesiones no diana y normalización del marcador tumoral            No RC / No PE: persistencia de una o más lesiones no diana y/o mantenimiento del nivel de marcador tumoral por encima del nivel normal            PE: progresión inequívoca de lesiones no diana o aparición de nuevas lesiones no diana</p>				
<p>(3) Se precisa que se mantenga la respuesta al menos 28 días</p>				

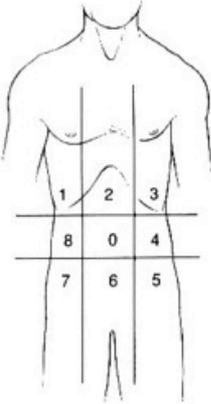
De: Rustin GJS, Vergote I, Eisenhauer E, Pujade-Lauraine E et al. Definitions for Response and Progression in Ovarian Cancer Clinical Trials Incorporating RECIST 1.1 and CA 125 Agreed by the Gynecological Cancer Intergroup (GCIg). Int J Gynecol Cancer 2011;21:419-423. PMID 21270624

## ANEXO V. INDICE DE CARCINOMATOSIS PERITONEAL (PCI) DE SUGARBAKER.

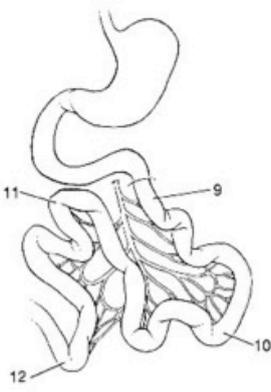
Supone una evaluación cuantitativa de la extensión abdominal de la carcinomatosis peritoneal. Se basa en la distribución tumoral en las diferentes regiones y el tamaño de las lesiones.

Para el cálculo del PCI se divide la cavidad abdominal en 13 regiones anatómicas y se gradúa el tamaño del implante mayor en cada zona (ver imagen).

### Peritoneal Cancer Index

	<u>Regions</u>	<u>Lesion Size</u>	<u>Lesion Size Score</u>
	0 Central	—	LS 0 No tumor seen
	1 Right Upper	—	LS 1 Tumor up to 0.5 cm
	2 Epigastrium	—	LS 2 Tumor up to 5.0 cm
	3 Left Upper	—	LS 3 Tumor > 5.0 cm or confluence
	4 Left Flank	—	
	5 Left Lower	—	
	6 Pelvis	—	
	7 Right Lower	—	
	8 Right Flank	—	
	9 Upper Jejunum	—	
	10 Lower Jejunum	—	
	11 Upper Ileum	—	
	12 Lower Ileum	—	

**PCI**



De: Jacquet P, Sugarbaker PH. Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. In: Sugarbaker PH, editor. Peritoneal carcinomatosis: principles of management. Boston (MA): Kluwer Academic Publishers; 996. p. 359–74.

## ANEXO VI. EVALUACION POR EL CEIC DEL HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO VIRGEN DE LA ARRIXACA

	<p><i>Arrixaca</i> <b>Hospital Universitario "Virgen de la Arrixaca"</b> Ctra. Madrid - Cartagena • Telf. 968 36 95 00 30120 El Palmar (Murcia)</p>
<p>Dr. D. Antonio Piñero Madrona Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca</p>	
<p><b>CERTIFICA</b></p>	
<p>Que el CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 27/05/2013, acta 05/13 ha evaluado la propuesta del investigador <b>Dr. Jerónimo Martínez García</b> referida al estudio:</p>	
<p><b>Título:</b> Comportamiento tumoral y relevancia clínica de la determinación del perfil de resistencia en carcinoma epitelial de ovario, trompa de Falopio y peritoneal primario, en estadio avanzado</p>	
<p><b>1º.</b> Considera que</p>	
<ul style="list-style-type: none"><li>- El ensayo se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.</li><li>- 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.</li><li>- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.</li><li>- La capacidad del <b>Dr. Jerónimo Martínez García</b> y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.</li></ul>	
<p><b>2º.</b> Por lo que este CEIC emite un <b>DICTAMEN FAVORABLE.</b></p>	
<p>Lo que firmo en Murcia, a 27 de mayo de 2013</p>	
<p>Fdo:</p>	
<p>Dr. D. Antonio Piñero Madrona Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca</p>	

## ANEXO VII. CONSENTIMIENTO INFORMADO DE BIOBANC-MUR



**BIOBANC-MUR**  
Biobanco en Red de la Región de Murcia



**DOCUMENTO DE INFORMACIÓN AL DONANTE (v.3)**

**UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO.**

En el **Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca**, igual que en la mayoría de hospitales, además de la asistencia a los pacientes, se realiza investigación biomédica. La finalidad de esta investigación es progresar en el conocimiento de las enfermedades y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Esta investigación biomédica requiere recoger datos clínicos y muestras biológicas de pacientes y donantes sanos para analizarlos y obtener conclusiones con el objetivo de conocer mejor las enfermedades y avanzar su diagnóstico y/o tratamiento.

Las muestras y datos clínicos obtenidos para el diagnóstico o control de las enfermedades, una vez utilizadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para la investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios.

**Solicitamos su autorización para incorporar al Biobanc-Mur Nodo 1 del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca el material biológico sobrante de las pruebas que, como parte del actual proceso asistencial, se le han realizado o se le van a realizar en este centro, con el fin de que puedan ser utilizadas en investigación biomédica.**

Seguendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma, si está de acuerdo en participar en esta propuesta.

**¿Qué es un biobanco? Institución para favorecer la investigación y la salud.**

Un biobanco es una institución, regulada por leyes específicas, que facilita la investigación biomédica, es decir, aquella dirigida a promover la salud de las personas.

Las muestras incluidas en un biobanco pueden ser cedidas para investigación en Medicina, siempre bajo la supervisión de un comité científico y otro de ética. Las muestras se gestionarán de manera independiente a la información personal asociada, aunque a veces podrá ser necesario el acceso a la historia clínica o al resultado de otras pruebas para completar la investigación.

La investigación biomédica es, hoy en día, un fenómeno global por lo que ocasionalmente estas muestras podrán ser cedidas a grupos de investigación fuera de España, siempre que se cumplan los requisitos de la legislación española y lo aprueben los correspondientes comités.

**Muestras biológicas e información asociada: En ningún caso se le practicarán más pruebas de las imprescindibles para su adecuada atención médica.**

Se guardará y dispondrá del material biológico sobrante que se le extraiga durante el proceso asistencial (muestras de sangre, líquidos biológicos y/o tejidos), sin que este hecho le cause molestias adicionales. La donación de muestras excedentes de este proceso asistencial no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles. Las muestras y la información asociada a las mismas se custodiarán y/o guardarán en el Biobanco **Biobanc-Mur Nodo 1 del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca** hasta su extinción. Este Biobanco forma parte de la Plataforma Red Nacional de Biobancos, como nodo de dicha Plataforma del Instituto de Salud Carlos III con la referencia **PT13/0010/0018**, y esta registrado en el Registro Nacional de Biobancos con número de referencia **B.0000859**.

Este biobanco recoge colecciones organizadas de muestras biológicas e información asociada en las condiciones y garantías de calidad y seguridad que exige la legislación anteriormente referida y los códigos de conducta aprobados.



**Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia**  
Plataforma Red Nacional de Biobancos - ISCIII. Versión 3 02/06/2014

1



**BIOBANC-MUR**  
Biobanco en Red de la Región de Murcia



por los Comités de Ética. Dichas muestras y su información asociada quedan disponibles para aquellos investigadores que lo soliciten al biobanco.

Cualquier estudio de investigación para el que se solicite la utilización de estos datos o muestras deberá disponer siempre de la aprobación del Comité de Ética de la Investigación (CEI) competente, que velará para que los investigadores desarrollen sus estudios siguiendo siempre las más estrictas normas éticas y legales. Además, el Comité Científico del biobanco garantizará que los proyectos sean de excelencia científica.

A partir de las muestras donadas, en los casos en que la investigación lo requiera, se realizarán estudios genéticos, y a partir de ellos se puede obtener información acerca de su salud y la de sus familiares. Siempre se actuará velando por la protección de esta información (ver apartado de protección de datos y confidencialidad).

Por este consentimiento, los responsables del Biobanco del Hospital podrán consultar su historial clínico, solamente en el caso de que ello sea imprescindible para la realización del proyecto para el que se soliciten las muestras y previa autorización por parte del Comité de Ética correspondiente.

En caso de ser necesaria alguna muestra adicional, la institución sanitaria se podría poner en contacto con usted para solicitarle nuevamente su colaboración. En este caso se le informará de los motivos y se le solicitará de nuevo su consentimiento.

**Protección de datos y confidencialidad: Las muestras se conservarán codificadas.**

Los datos personales que se recolan serán obtenidos, tratados y almacenados cumpliendo en todo momento el deber de secreto, de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de datos de carácter personal.

La identificación de las muestras biológicas del Biobanco será sometida a un proceso de codificación. A cada muestra se le asigna un código de identificación, que será el utilizado por los investigadores. Únicamente el personal autorizado por el biobanco podrá relacionar su identidad con los citados códigos. Mediante este proceso los investigadores que soliciten muestras al biobanco no podrán conocer ningún dato que revele su identidad. Asimismo, aunque los resultados obtenidos de la investigación realizada con sus muestras se publiquen en revistas científicas, su identidad no será facilitada. En aquellos estudios en los que no se prevean resultados potencialmente útiles para su salud, y de acuerdo con el correspondiente Comité de Ética, las muestras y datos podrán ser anonimizados, es decir, no habrá ninguna posibilidad de volver a asociar la muestra con su identidad.

Sus muestras y los datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del fichero del Biobanco, inscrito en la Agencia de Protección de datos.

**Responsable del fichero: Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia.**  
Dirección Postal: Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia

Listed podrá ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y objeción, así como obtener información sobre el uso de sus muestras y datos asociados, dirigiéndose a:

Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia  
Calle Luis Fontes Pagan, 9-1, 30003 Murcia  
Tel.: 968359757 E-mail: jaemp.serra@cam.es

**Carácter altruista de la donación. La cesión de muestras biológicas que usted realiza al Biobanco del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca es gratuita.**

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación biomédica. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.



**Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia**  
Plataforma Red Nacional de Biobancos - ISCIII. Versión 3 02/06/2014

2



**BIOBANC-MUR**  
Biobanco en Red de la Región de Murcia



**Participación voluntaria. Su negativa NO repercutirá en su asistencia médica, presente o futura**

Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos y esto no repercutirá negativamente en su asistencia médica, presente o futura.

**Revocación del consentimiento: si usted decide firmar este consentimiento, podrá también cancelarlo libremente.**

Si en un futuro usted quisiera anular su consentimiento, sus muestras biológicas serían destruidas y los datos asociados a las mismas serían retirados del biobanco. También podría solicitar la anonimización de las muestras, en cuyo caso se eliminaría la relación entre sus datos personales (que revelan su identidad) y sus muestras biológicas y datos clínicos asociados. Los efectos de esta cancelación o anonimización no se podrían extender a la investigación que ya se hubiera llevado a cabo.

Si desea anular su consentimiento, deberá solicitarlo por escrito al Titular del Biobanco, en la dirección anteriormente indicada.

**Información sobre los resultados de la investigación: se le proporcionará información si usted desea recibirla**

En el caso de que usted lo solicite expresamente, el Biobanco podrá proporcionarle información acerca de cuáles son las investigaciones en que se han utilizado sus muestras y de los resultados globales de dichas investigaciones, salvo en el caso de cancelación o anonimización.

Los métodos utilizados en investigación Biomédica suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para usted. Sin embargo, en el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser clínicamente relevantes para usted e interesar a su salud o a la de su familia, le serán comunicados si así lo estima oportuno. Asimismo, podría darse el caso de obtenerse información relevante para su familia, le corresponderá a usted decidir si quiere o no comunicárselo. Si Ud. quiere que se le comunique dicha información relevante debe consignarlo en la casilla que aparece al final de este documento.

Si usted no desea recibir esta información, tenga en cuenta que la ley establece que, cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir si es conveniente informar a los afectados o a sus representantes legales.

**Por favor, pregunte al personal sanitario que le ha comunicado esta información sobre cualquier duda que pueda tener, ahora o en el futuro, en relación con este consentimiento. Asimismo, puede contactar sus dudas con su médico, quien le pondrá en contacto con el personal sanitario autorizado.**

*Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina. De esta forma está usted colaborando a vencer las enfermedades y ayudar a multitud de enfermos actuales y futuros.*



**Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia**  
Plataforma Red Nacional de Biobancos - ISCIII. Versión 3 02/06/2014

3



**BIOBANC-MUR**  
Biobanco en Red de la Región de Murcia



**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**UTILIZACIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y MATERIAL BIOLÓGICO EXCEDENTE DEL PROCESO ASISTENCIAL PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y SU CONSERVACIÓN EN UN BIOBANCO**

Nombre y Apellidos (donante) _____ Etiqueta Identificativa Paciente _____ Edad: _____ Sexo: _____ DNI: _____	Persona del centro que informa _____ DNI: _____
--	--

**Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resultado cualquier duda que pudiese tener y desea colaborar con Biobanc-Mur Nodo 1 en los términos antes explicados, por favor, lea, complete y firme a continuación este bojo**

El abajo firmante autoriza al **Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca** a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el Biobanco **Biobanc-Mur Nodo 1**, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

**Confirmo que:**

- Autoriza al **Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca** a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del actual proceso asistencial sean incorporadas en el **Biobanc-Mur Nodo 1**, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.  
 SI  NO
- Desa que se le comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para su salud o la de su familia  SI  NO Teléfono o E-mail de contacto: \_\_\_\_\_
- Autoriza a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales  SI  NO Teléfono o E-mail de contacto: \_\_\_\_\_
- He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones: \_\_\_\_\_

<b>DONANTE</b> _____ Firma	<b>PERSONA QUE INFORMA</b> _____ Firma
----------------------------------	--

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_



**Biobanc-Mur. Biobanco en Red de la Región de Murcia**  
Plataforma Red Nacional de Biobancos - ISCIII. Versión 3 02/06/2014

4

## ANEXO VIII. CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ESTUDIO.

## GRUPO CONTROL

*Jerónimo Martínez García*  
*Comportamiento tumoral y relevancia clínica*  
*de la determinación del perfil de resistencia en CEO*

Jerónimo Martínez García  
Tesis Doctoral – Universidad de Murcia  
Servicio Oncología Médica – HCUVA

**CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PARTICIPACION EN EL ESTUDIO  
PARA LA PERSONA SANA**

**Título del proyecto:** "COMPORTAMIENTO TUMORAL Y RELEVANCIA CLÍNICA DE LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE RESISTENCIA EN CARCINOMA EPITELIAL DE OVARIO, TROMPA DE FALOPPIO Y PERITONEAL PRIMARIO, EN ESTADIO AVANZADO"

**Investigador Principal:** Dr. Jerónimo Martínez García  
Médico Adjunto del Servicio de Oncología Médica

**Centro de realización:** Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia (HCUVA)

**1.- DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO**  
El carcinoma epitelial de ovario, trompa de Falopio y peritoneal primario supone un importante problema de salud en el sexo femenino, siendo la segunda neoplasia ginecológica más frecuente. Gracias a los avances en la investigación tanto de su biología, como su diagnóstico y tratamiento, se va logrando mejorar la calidad de vida de las pacientes y el pronóstico de la enfermedad.

En el presente trabajo queremos buscar nuevos biomarcadores que nos ayuden a clasificar mejor esta neoplasia y, así, poder planificar un mejor tratamiento a las pacientes. Pero para extraer conclusiones en este estudio necesitamos un grupo control de personas sanas, para determinar los valores normales de los biomarcadores estudiados en la población sana, y así valorar los resultados de las pacientes.

Por ello, se le solicita participar en este proyecto de investigación como sujeto sano. Se precisaría una extracción sanguínea para hacer una determinación de los nuevos biomarcadores plasmáticos que queremos estudiar.

Las muestras serán almacenadas en las instalaciones del Biobanco del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, que se encargará de procesarlas de acuerdo con las diferentes necesidades del proyecto y siguiendo la normativa sobre su manipulación.

**2.- OBJETIVO**  
La finalidad del estudio es buscar que factores determinan la evolución del cáncer de ovario, trompa de Falopio y peritoneal primario, y su respuesta al tratamiento. Con estos resultados podremos identificar diferentes subtipos tumorales y, así, plantear esquemas de tratamiento específicos dirigidos a cada paciente, con probable beneficio en eficacia de la terapia oncológica y supervivencia para el paciente.

**3.- CONDICIONES DE LA DONACIÓN**  
Usted no recibirá ninguna compensación económica ni otros beneficios materiales por donar su sangre. Sin embargo, si las investigaciones que se realicen tuvieran éxito, se podrían mejorar los tratamientos de este tumor y así, podría ayudar en el futuro a otras pacientes con esta neoplasia. La manipulación de las muestras se realizará de acuerdo a la normativa vigente en Biobanco y de la que se le proporciona un consentimiento informado propio.

**5.- DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO**  
La decisión de donar su sangre es totalmente voluntaria. Usted puede negarse a donarlas e incluso puede revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión para usted. Si revoca el consentimiento que ahora presta, los efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo antes de la revocación de su consentimiento.

**6.- RIESGOS**  
El presente trabajo no implica ningún riesgo para usted, salvo las molestias derivadas de una extracción sanguínea.

1 / 2

*Jerónimo Martínez García*  
*Comportamiento tumoral y relevancia clínica*  
*de la determinación del perfil de resistencia en CEO*

Jerónimo Martínez García  
Tesis Doctoral – Universidad de Murcia  
Servicio Oncología Médica – HCUVA

**7.- PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD**  
El investigador se compromete a asegurar la intimidad y confidencialidad de los datos de carácter personal de los sujetos incluidos en el estudio, de conformidad a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la misma, así como la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica y documentos contenidos en el archivo.

La información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación. La cesión a otros centros de investigación, públicos o privados, de sus muestras o de sus derivados, así como de la información contenida en las bases de datos vinculada a las mismas y a su estado de salud, se realizará mediante un procedimiento de disociación, esto es, suprimiendo la información personal que la identifica y sustituyéndola por un código.

**8.- DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO**  
Don/Dña....., con DNI..... y teléfono.....

**DECLARO**  
He leído la hoja de información que se me ha entregado.  
He sido informado por el Dr. .... sobre el proyecto de investigación "comportamiento tumoral y relevancia clínica de la determinación del perfil de resistencia en carcinoma epitelial de ovario, trompa de Falopio y peritoneal primario, en estadio avanzado" y su procedimiento.  
He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo.  
He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas que he planteado.  
He comprendido que la participación es voluntaria y puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto tenga repercusión para mí.  
Que libre y voluntariamente acepto la participación en este proyecto de investigación.

**CONSENTIO**  
Que el investigador principal u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información.

Fdo.:  
Nombre Paciente:..... Fecha:.....

Fdo.:  
Nombre Médico: ..... Fecha:.....

---

**9.- REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO**  
Revoco el consentimiento prestado en fecha..... de..... de 20..... y no deseo proseguir la participación en el presente estudio que doy con esta fecha por finalizada

Fdo.:  
Nombre Paciente:..... DNI..... Fecha:.....

Fdo.:  
Dña/..... DNI..... Fecha:.....

2 / 2

## GRUPO PACIENTES

*Comportamiento tumoral y relevancia clínica de la determinación del perfil de resistencia en CEO*

*Jerónimo Martínez García  
Tesis Doctoral – Universidad de Murcia  
Servicio Oncología Médica – HCUVA*

### CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PARTICIPACION EN EL ESTUDIO PARA EL PACIENTE

**Título del proyecto:** "COMPORTAMIENTO TUMORAL Y RELEVANCIA CLÍNICA DE LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE RESISTENCIA EN CARCINOMA EPITELIAL DE OVARIO, TROMPA DE FALOPIO Y PERITONEAL PRIMARIO, EN ESTADIO AVANZADO"

**Investigador Principal:** Dr. Jerónimo Martínez García  
Médico Adjunto del Servicio de Oncología Médica

**Centro de realización:** Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia (HCUVA)

**1.- DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO**  
El carcinoma epitelial de ovario, trompa de Falopio y peritoneal primario supone un importante problema de salud en el sexo femenino, siendo la segunda neoplasia ginecológica más frecuente. Gracias a los avances en la investigación tanto de su biología, como su diagnóstico y tratamiento, se va logrando mejorar la calidad de vida de las pacientes y el pronóstico de la enfermedad.

En el presente trabajo queremos buscar nuevos biomarcadores que nos ayuden a clasificar mejor la enfermedad, y así, poder planificar un mejor tratamiento a las pacientes. Se le solicita acceder a la muestra tumoral al diagnóstico en la biopsia o en la cirugía, así como a la determinación de ciertos biomarcadores en las muestras sanguíneas que se realiza de rutina en la práctica asistencial.

Posteriormente, realizaremos un seguimiento de su evolución clínica y la respuesta al tratamiento oncológico, con el objetivo de analizar que determinantes se relacionan con un mejor o peor pronóstico.

El estudio no supondrá para usted la realización de nuevas pruebas, puesto que se realizarán sobre la muestra de tejido extraído al diagnóstico en la biopsia o en la cirugía, y de la muestra sanguínea que se realiza habitualmente en las consultas antes de la cirugía y antes del primer y segundo ciclo de quimioterapia. Solo será necesario extraer un cilindro de muestra más en el mismo acto de la biopsia y dos tubos más de analítica sanguínea.

Se realizará una última determinación sanguínea a los 2 meses de finalizar el tratamiento con quimioterapia, que se hará coincidir con el análisis solicitado por su oncólogo en su visita habitual.

No se precisarán nuevas muestras durante el tratamiento.

Las muestras serán almacenadas en las instalaciones del Biobanco del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, que se encargará de procesarlas de acuerdo con las diferentes necesidades del proyecto y siguiendo la normativa sobre su manipulación.

**2.- OBJETIVO**  
La finalidad del estudio es buscar que factores determinan la evolución del cáncer de ovario, trompa de Falopio y peritoneal primario, y su respuesta al tratamiento.

Con estos resultados podremos identificar diferentes subtipos tumorales y, así, plantear esquemas de tratamiento específicos dirigidos a cada paciente, con probable beneficio en eficacia de la terapia oncológica y supervivencia para el paciente.

**3.- CONDICIONES DE LA DONACIÓN**  
Usted no recibirá ninguna compensación económica ni otros beneficios materiales por donar sus muestras. Sin embargo, si las investigaciones que se realicen tuvieran éxito, se podrían mejorar los tratamientos y, así, podría ayudar en el futuro a otras pacientes con su mismo tumor.

La manipulación de las muestras se realizará de acuerdo a la normativa vigente en Biobanco y de la que se le proporciona un consentimiento informado propio.

**4.- OTROS CONDICIONES DURANTE EL SEGUIMIENTO**

1 / 3

*Comportamiento tumoral y relevancia clínica de la determinación del perfil de resistencia en CEO*

*Jerónimo Martínez García  
Tesis Doctoral – Universidad de Murcia  
Servicio Oncología Médica – HCUVA*

Durante el seguimiento podría ser contactada con el fin de recabar información sobre su situación clínica, de cara a completar datos en el proyecto de seguimiento, y así relacionarlo con los factores estudiados en las muestras al diagnóstico. Por tal motivo, es importante que comunique al servicio de oncología si cambiara de domicilio y número de teléfono.

**5.- DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO**  
La decisión de donar sus muestras es totalmente voluntaria. Usted puede negarse a donarlas e incluso puede revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si revoca el consentimiento que ahora presta, los efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo antes de la revocación de su consentimiento.

**6.- RIESGOS**  
El presente trabajo supone un estudio observacional, en ningún caso influirá en su tratamiento oncológico habitual ni se usará nueva medicación experimental.

El estudio se basa en la determinación de factores en la muestra de tejido extraído al diagnóstico y en las muestras sanguíneas durante los dos primeros tratamientos, que son práctica habitual solicitada por su médico. Su participación no supondrá para usted la realización de nuevas pruebas o extracciones.

Por lo cual, el procedimiento no implica ningún riesgo para usted.

**7.- PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD**  
El investigador se compromete a asegurar la intimidad y confidencialidad de los datos de carácter personal de los sujetos incluidos en el estudio, de conformidad a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la misma, así como la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica y documentos contenidos en el archivo.

La información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación.

La cesión a otros centros de investigación, públicos o privados, de sus muestras o de sus derivados, así como de la información contenida en las bases de datos vinculada a las mismas y a su estado de salud, se realizará mediante un procedimiento de disociación, esto es, suprimiendo la información personal que la identifica y sustituyéndola por un código.

2 / 3

*Comportamiento tumoral y relevancia clínica de la determinación del perfil de resistencia en CEO*

*Jerónimo Martínez García  
Tesis Doctoral – Universidad de Murcia  
Servicio Oncología Médica – HCUVA*

**8. DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO**

Don/Dña..... con DNI..... y teléfono.....

Don/Dña..... con DNI..... y teléfono....., en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente....., con DNI.....

**DECLARO**  
He leído la hoja de información que se me ha entregado.  
He sido informado por el Dr. .... sobre el proyecto de investigación "comportamiento tumoral y relevancia clínica de la determinación del perfil de resistencia en carcinoma epitelial de ovario, trompa de Falopio y peritoneal primario, en estadio avanzado" y su procedimiento.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo.  
He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas que he planteado.  
He comprendido que la participación es voluntaria y puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.  
Que libre y voluntariamente acepto la participación en este proyecto de investigación.

**CONSENTO**  
Que el investigador principal u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información.

Fdo.:  
Nombre Paciente:.....  
En..... a..... de..... de 20..

Fdo.:  
Nombre Médico: .....  
En..... a..... de..... de 20..

---

**9. REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO**  
Revoco el consentimiento prestado en fecha..... de ..... de 20..... y no deseo proseguir la participación en el presente estudio que doy con esta fecha por finalizada

Fdo.:  
Nombre Paciente:..... DNI .....  
En..... a..... de..... de 20.....

Fdo.:  
Dr/a..... DNI.....  
En..... a..... de..... de 20.....

3 / 3

## **6. Referencias bibliográficas**

---



- <sup>1</sup> Kong CS, Longacre TA and Hendrickson MR. Pathology. En: Berek & Hacker's. Gynecologic Oncology. Sixth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2015. p. 123-219.
- <sup>2</sup> Siegel RL, Miller KD and Jemal A. Cancer Statistics, 2016. CA Cancer J Clin 2016; 66: 7-30. PMID: 26742998
- <sup>2</sup> Siegel RL, Miller KD and Jemal A. Cancer Statistics, 2016. CA Cancer J Clin 2016; 66: 7-30. PMID: 26742998
- <sup>3</sup> World Health Organization. International Agency for Research on Cancer 2016. Cancer today. [Internet]. Lyon. (citado 15 sep 2016). Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/home>
- <sup>4</sup> Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, et al: SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007. Based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2010. Bethesda, MD, National Cancer Institute. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2007](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007)
- <sup>5</sup> Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA et al. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. International journal of gynaecology and obstetrics 2006;95 Suppl 1: S161-92. PMID: 17161157.
- <sup>6</sup> REDECAN: Red Española de Registros en Cáncer. Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa [Internet]. Octubre 2014 (citado 15 sep 2016). Disponible en: <http://redecana.org/es/page.cfm?id=196&title=estimaciones-de-la-incidencia-y-la-supervivencia-del-cancer-en-espana-y-su-situacion-en-europa>
- <sup>7</sup> Chirlaque MD, Tortosa J, Valera I, Párraga E et al. Incidencia de cáncer en la Región de Murcia. Periodo 2008-2009. Boletín Epidemiológico de Murcia. [Internet]. Noviembre 2014. Vol 34 (Num. 782). Murcia: Dirección General de Salud Pública. (citado 15 sep 2016). Disponible en: <https://www.murciasalud.es/pagina.php?id=283269&idsec=1074>
- <sup>8</sup> Chirlaque MD, Salmerón D, Pérez-Romero SB, Valera I et al. Cáncer de ovario en la Región de Murcia. Boletín Epidemiológico de Murcia. [Internet]. Abril 2014. Vol 34 (Num. 775). Murcia: Dirección General de Salud Pública. (citado 15 sep 2016). Disponible en: <https://www.murciasalud.es/pagina.php?id=283316&idsec=1074>
- <sup>9</sup> Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC and Ledermann JA. Ovarian cancer. Lancet 2014; 384(9951): 1376–88. PMID: 24767708
- <sup>10</sup> Goff BA, Mandel L, Muntz HG and Melancon CH. Ovarian carcinoma diagnosis. Cancer 2000; 89: 2068-2075. PMID 11066047
- <sup>11</sup> World Health Organization. International Agency for Research on Cancer 2016. Cancer today. [Internet]. Lyon. (citado 15 sep 2016). Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/home>
- <sup>12</sup> REDECAN: Red Española de Registros en Cáncer. Mortalidad por cáncer y otras causas en España años 2014. [Internet]. (citado 15 sep 2016). Disponible en: <http://redecana.org/es/page.cfm?id=24&title=mortalidad>
- <sup>13</sup> Oberaigner W, Minicozzi P, Bielska-Lasota M, Allemanni C et al. Survival for Ovarian Cancer in Europe: The across-country variation did not shrink in the past decade. Acta Oncologica 2012; 51: 441-453. PMID 22313338
- <sup>14</sup> Berek JS, Friedlander ML and Hacker NF. Epithelial Ovarian, Fallopian Tube, and Peritoneal Cancer. En: Berek & Hacker's. Gynecologic Oncology. Sixth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2015. p. 464-529.
- <sup>15</sup> Celeste Leigh Pearce, Karine Chung, Malcolm CP and Anna H Wu. Increased Ovarian Cancer Risk Associated With Menopausal Estrogen Therapy Is Reduced by Adding a Progestin. Cancer 2009;115(3):531-539. PMID: 19127543
- <sup>16</sup> Nicolas Wentzensen, Elizabeth M. Poole, Britton Trabert, Emily White . Ovarian Cancer Risk Factors by Histologic Subtype: An Analysis From the Ovarian Cancer Cohort Consortium. J Clin Oncol 2016;34:2888-2898. PMID: 27325851
- <sup>17</sup> Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies. Am J Hum Genet 2003;72:1117-1130. PMID: 12677558
- <sup>18</sup> Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, et al. Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: a kin-cohort study in Ontario, Canada. J Natl Cancer Inst 2006; 98: 1694–706. PMID: 17148771
- <sup>19</sup> Watson P, Vasen HF, Mecklin J-PP, et al. The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. Int J Cancer 2008;123(2):444–9. PMID: 18398828
- <sup>20</sup> Nakamura K, Banno K, Yanokura M, et al. Features of ovarian cancer in Lynch syndrome (Review). Mol Clin Oncol 2014;2(6):909–16. PMID: 25279173

- <sup>21</sup> Pennington KP, Swisher EM. Hereditary ovarian cancer: beyond the usual suspects. *Gynecol Oncol* 2012;124(2):347-353. PMID 22264603
- <sup>22</sup> Tworoger SS, Fairfield KM, Colditz GA, Rosner BA and Hankinson SE. Association of oral contraceptive use, other contraceptive methods, and infertility with ovarian cancer risk. *Am J Epidemiol* 2007;166(8):894-901. PMID 17656616
- <sup>23</sup> Ness RB, Cramer DW, Goodman MT, Kjaer SK et al. Infertility, fertility drugs, and ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Am J Epidemiol* 2002; 155 (3): 217-224. PMID 11821246
- <sup>24</sup> Kim HS, Kim TH, Chung HH and Song YS. Risk and prognosis of ovarian cancer in women with endometriosis: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2014; 110:1878-1890. PMID: 24518590
- <sup>25</sup> Chittenden BG, Fullerton G, Maheshwari A, Bhattacharya S. Polycystic ovary syndrome and the risk of gynaecological cancer: a systematic review. *Reprod Biomed Online* 2009;19(3):398-405. PMID 19778486
- <sup>26</sup> Negri E, Franceschi S, Tzonou A, Booth M et al. Pooled analysis of 3 European case-control studies: I. Reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 1991;49(1):50-6. PMID 1874569
- <sup>27</sup> Franceschi S, La Vecchia C, Booth M, Tzonou A et al. Pooled analysis of 3 European case-control studies of ovarian cancer: II. Age at menarche and at menopause. *Int J Cancer* 1991; 49(1):57-60. PMID: 1874570
- <sup>28</sup> Yang HP, Murphy KR, Pfeiffer RM, George N et al. Lifetime Number of Ovulatory Cycles and Risks of Ovarian and Endometrial Cancer Among Postmenopausal Women. *Am J Epidemiol* 2016;183(9):800-814. PMID: 27190045
- <sup>29</sup> Sit AS, Modugno F, Weissfeld JL, Berga SK and Ness RB. Hormone replacement therapy formulations and risk of epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2002;86(2):118-123. PMID: 12144815
- <sup>30</sup> Lacey JV, Mink PJ, Lubin JH, Sherman ME et al. Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer. *JAMA* 2002;288(3):334-341. PMID: 12117398
- <sup>31</sup> Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn M et al. Carcinoma of the Ovary. *Int J Gynaecol Obstet* 2003;83 Suppl 1:135-166. PMID 14763172
- <sup>32</sup> Olsen CM, Green AC, Whiteman DC, Sadeghi S et al. Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2007;43(4):690-709. PMID: 17223544
- <sup>33</sup> Blank MM, Wentzensen N, Murphy MA, Hollenbeck A, Park Y. Dietary fat intake and risk of ovarian cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Br J Cancer* 2012 Jan;106(3):596-602. PMID 22223086.
- <sup>34</sup> Huncharek M, Geschwind JF, Kupelnick B. Perineal application of cosmetic talc and risk of invasive epithelial ovarian cancer: a meta-analysis of 11,933 subjects from sixteen observational studies. *Anticancer Res* 2003 Mar;23(2C):1955-60. PMID 12820486.
- <sup>35</sup> Nan-Nan Luan, Qi-Jun Wu, Ting-Ting Gong, Emily Vogtmann et al. Breastfeeding and ovarian cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 2013;98:1020–31. PMID: 23966430
- <sup>36</sup> Li DP, Du C, Zhang ZM, Li GX et al. Breastfeeding and ovarian cancer risk: a systematic review and meta-analysis of 40 epidemiological studies. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(12):4829-4837. PMID: 24998548
- <sup>37</sup> Cramer DW, Hutchison GB, Welch WR, Scully RE and Knapp RC. Factors affecting the association of oral contraceptives and ovarian cancer. *N Engl J Med* 1982;307(17):1047-1051. PMID 7121514
- <sup>38</sup> Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, Beral V, Doll R, et al: Ovarian cancer and oral contraceptives: Collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet* 2008 ; 371:303-314. PMID 18294997
- <sup>39</sup> Breast cancer and hormonal contraceptives: Collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies—Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* 1996; 347:1713-1727. PMID 8656904
- <sup>40</sup> Beaber EF, Buist DS, Barlow WE, Malone KE et al. Recent oral contraceptive use by formulation and breast cancer risk among women 20 to 49 years of age. *Cancer Res* 2014; 74(15): 4078-4089. PMID 25085875
- <sup>41</sup> Hankinson SE, Hunter DJ, Colditz GA, et al. Tubal ligation, hysterectomy, and risk of ovarian cancer. *JAMA* 1993;270: 2813–18. PMID 8133619
- <sup>42</sup> Risch HA, Marret LD and Howe GR. Parity, contraception, infertility, and the risk of epithelial ovarian cancer. *Am J Epidemiol* 1994; 140(7):585-597. PMID 7942759
- <sup>43</sup> Rebbeck TR, Kauff ND and Domchek SM: Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101:80- 87. PMID 19141781

- <sup>44</sup> Atsma F, Bartelink ML, Grobbee DE, et al: Postmenopausal status and early menopause as independent risk factors for cardiovascular disease: A meta-analysis. *Menopause* 13:265-279, 2006. PMID 16645540
- <sup>45</sup> Qin B, Moorman PG, Alberg AJ, Barnholtz-Sloan JS et al. Dairy, calcium, vitamin D and ovarian cancer risk in African-American women. *Br J Cancer* 2016 Sep 15 (advance online) [Internet] (citado 17 sep 2016). Disponible en: [www.bjcancer.com](http://www.bjcancer.com). PMID: 27632371
- <sup>46</sup> Myung SK, Ju W, Choi HJ, Kim SC et al. Soy intake and risk of endocrine-related gynaecological cancer: a meta-analysis. *BJOG*. 2009 Dec;116(13):1697-705. PMID 19775307.
- <sup>47</sup> Cook LS, Leung AC, Swenerton K, Gallagher RP et al. Adult lifetime alcohol consumption and invasive epithelial ovarian cancer risk in a population-based case-control study. *Gynecol Oncol* 2016;140(2):277-86. PMID: 26691218
- <sup>48</sup> Hennessy BT, Coleman RL and Markman M. Ovarian cancer. *Lancet* 2009; 374: 1371–82. PMID: 19793610
- <sup>49</sup> Landen CN, Birrer MJ and Sood AK. Early Events in the Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:995-1005. PMID: 18195328
- <sup>50</sup> Fathalla MF. Incessant ovulation—a factor in ovarian neoplasia?. *Lancet* 1971;2(7716):163. PMID 4104488.
- <sup>51</sup> Cramer DW and Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1983;71(4):717-721. PMID 6578367
- <sup>52</sup> Ness RB, Cottreau C: Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 91:1459-1467, 1999. PMID 10469746
- <sup>53</sup> Cramer DW and Terry RL. Epidemiology and Biostatistics. En: Berek & Hacker's. *Gynecologic Oncology*. Sixth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2015. p. 220-240.
- <sup>54</sup> Yeung TL, Leung CS, Yip KP, Au Yeung CL et al. Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015;309(7):C444-456. PMID 26224579
- <sup>55</sup> Kurman RJ and Shih IM. The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer- a Proposed Unifying Theory. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(3):433-443. PMID: 20154587
- <sup>56</sup> Shih IM and Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004;164:1511–8. PMID 15111296
- <sup>57</sup> Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch* 2012;460(3):237-249. PMID 22322322
- <sup>58</sup> Devouassoux-Shisheboran M, Genestie C, Ray-Coquard I. La classification histo-moléculaire des cancers épithéliaux ovariens en 2 types est-elle pertinente?. *Bull Cancer* 2016; 103(3): 252–258. PMID 26853278
- <sup>59</sup> Kurman RJ and Shih IM. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis. Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol* 2016;186(4):733-747. PMID 27012190
- <sup>60</sup> Jelovac D and Armstrong DK. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA Cancer J Clin* 2011;61:183-203. PMID 21521830
- <sup>61</sup> Kurman RJ and Shih IM. Seromucinous Tumors of the Ovary. What's in a Name? *Int J Gynecol Pathol* 2016;35(1):78-81. PMID 26598986
- <sup>62</sup> The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011;474:609-615. PMID 21720365
- <sup>63</sup> Gaillard S, Maxwell GL, Sood AK and Berchuck A. Biology and Genetics. En: Berek & Hacker's. *Gynecologic Oncology*. Sixth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2015. p. 2-38.
- <sup>64</sup> Tothill RW, Tinker AV, George J, Brown R, et al. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2008;14(16):5198-5208 . PMID 18698038
- <sup>65</sup> Mackenzie R, Kommoss S, Winterhoff BJ, Kipp BR et al. Targeted deep sequencing of mucinous ovarian tumors reveals multiple overlapping RAS-pathway activating mutations in borderline and cancerous neoplasms. *BMC Cancer* 2015;15:415-424. PMID 25986173
- <sup>66</sup> Storey DJ, Rush R, Stewart M, et al. Endometrioid epithelial ovarian cancer: 20 years of prospectively collected data from a single center. *Cancer*. 2008;112:2211-2220. PMID 18344211
- <sup>67</sup> Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y et al. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med* 2010;363(16):1532-1543. PMID: 20942669
- <sup>68</sup> Behbakht K, Randall TC, Benjamin I, Morgan MA, King S, Rubin SC. Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol*. 1998;70:255-258. PMID 9740700

- <sup>69</sup> Kuo KT, Mao TL, Jones S, Veras E et al. Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol* 2009;174(5):1597-1601. PMID 19349352
- <sup>70</sup> Mackenzie R, Talhouk A, Eshragh S, Lau S et al. Morphologic and molecular characteristics of mixed epithelial ovarian cancers. *Am J Surg Pathol* 2015, 39:1548-1557. PMID 26099008
- <sup>71</sup> Gao B, Lindemann K, Anderson L, Fereday S et al. Serous ovarian and primary peritoneal cancers: A comparative analysis of clinico-pathological features, molecular subtypes and treatment outcome. *Gynecol Oncol* 2016;142(3):458-464. PMID 27444035
- <sup>72</sup> Stewart SL, Wike JM, Foster SL, Michaud F. The incidence of primary fallopian tube cancer in the United States. *Gynecol Oncol* 2007;107(3):392-397. PMID 17961642.
- <sup>73</sup> Lataifeh I, Marsden DE, Robertson G, Gebiski V and Hacker NF. Presenting symptoms of epithelial ovarian cancer. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2005;45(3):211-214. PMID 15904446
- <sup>74</sup> Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med.* 1993;329(21):1550-1559. PMID 8155119
- <sup>75</sup> Vine MF, Calingaert B, Berchuck A and Schildkraut JM. Characterization of prediagnostic symptoms among primary epithelial ovarian cancer cases and controls. *Gynecol Oncol* 2003;90(1):75-82. PMID 12821345
- <sup>76</sup> Goff BA, Mandel LS, Drescher CW, et al. Development of an ovarian cancer symptom index: possibilities for earlier detection. *Cancer.* 2007;109:221-227. PMID 17154394
- <sup>77</sup> Morice P, Joulie F, Camatte S, Atallah D et al. Lymph node involvement in epithelial ovarian cancer: analysis of 276 pelvic and paraaortic lymphadenectomies and surgical implications. *J Am Coll Surg* 2003;197(2):198-205. PMID 12892797
- <sup>78</sup> Euscher ED, Silva EG, Deavers MT, Elishaev E, Gershenson DM, Malpica A. Serous carcinoma of the ovary, fallopian tube, or peritoneum presenting as lymphadenopathy. *Am J Surg Pathol* 2004;28(9):1217-23. PMID 15316322
- <sup>79</sup> Dauplat J, Hacker NF, Nieberg RK, Berek JS et al. Distant Metastases in Epithelial Ovarian Carcinoma. *Cancer* 1987;60:1561-1566. PMID 3621129
- <sup>80</sup> Güth U, Huang DJ, Bauer G, Stieger M et al. Metastatic Patterns at Autopsy in Patients With Ovarian Carcinoma. *Cancer* 2007;110:1272-80. PMID 17634950
- <sup>81</sup> Yedema CA, Kenemans P, Wobbes T, Thomas CM et al. Use of serum tumor markers in the differential diagnosis between ovarian and colorectal adenocarcinomas. *Tumour Biol* 1992;13(1-2):18-26. PMID 1589694
- <sup>82</sup> Karlsen MA, Sandhu N, Hogdall C, Christensen IJ et al. Evaluation of HE4, CA125, risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) and risk of malignancy index (RMI) as diagnostic tools of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2012;127:379-383. PMID 22835718
- <sup>83</sup> Dayyani F, Uhlig S, Colson B, Simon K et al. Diagnostic Performance of Risk of Ovarian Malignancy Algorithm Against CA125 and HE4 in Connection With Ovarian Cancer: A Meta-analysis. *Int J Gynecol Cancer.* 2016;26(9):1586-1593. PMID: 27540691
- <sup>84</sup> Oncoguía SEGO: Cancer Epitelial de ovario, trompa y peritoneo 2014. [Internet]. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. Publicaciones SEGO, Octubre 2014. Disponible en: [http://www.sego.es/Content/pdf/oncoguias/Ovario\\_2014.pdf](http://www.sego.es/Content/pdf/oncoguias/Ovario_2014.pdf)
- <sup>85</sup> Timmerman D, Testa AC, Bourne T, et al. Logistic regression model to distinguish between the benign and malignant adnexal mass before surgery: a multicenter study by the International Ovarian Tumor Analysis Group. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8794-801. PMID 16314639
- <sup>86</sup> Jacobs I, Oram D, Fairbanks J, Turner J et al. A risk of malignancy index incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol* 1990;97(10):922-929. PMID 2223684
- <sup>87</sup> Van Calster B, Van Hoorde K, Valentin L, Testa AC et al. Evaluating the risk of ovarian cancer before surgery using the ADNEX model to differentiate between benign, borderline, early and advanced stage invasive, and secondary metastatic tumours: prospective multicentre diagnostic study. *BMJ* 2014;349:g5920. PMID 25320247
- <sup>88</sup> Sahdev A. CT in ovarian cancer staging: how to review and report with emphasis on abdominal and pelvic disease for surgical planning. *Cancer Imagin* 2016;16(1):19. PMID 27484100
- <sup>89</sup> De Bree E, Koops W, Kroger R, van Tuth S et al. Peritoneal carcinomatosis from colorectal or appendiceal origin: correlation of preoperative CT with intraoperative findings and evaluation of interobserver agreement. *J Surg Oncol* 2004;86(2):64-73. PMID 15112247
- <sup>90</sup> Thomassin-Naggara I, Aubert E, Rockall A, et al. Adnexal masses: development and preliminary validation of an MR imaging scoring system. *Radiology.* 2013; 267:432-443 . PMID 23468574

- <sup>91</sup> Michielsen K, Vergote I, Op de Beeck K, Amant F et al. Whole-body MRI with diffusion-weighted sequence for staging of patients with suspected ovarian cancer: a clinical feasibility study in comparison to CT and FDG-PET/CT. *Eur Radiol* 2014;24(4):889-901. PMID 24322510
- <sup>92</sup> Sharma SK, Nemieboka B, Sala E, Lewis JS. Molecular Imaging of Ovarian Cancer. *J Nucl Med* 2016; 57(6):827–833. PMID 27127223
- <sup>93</sup> Nam EJ, Yun MJ, Oh YT, et al. Diagnosis and staging of primary ovarian cancer: correlation between PET/ CT, Doppler US, and CT or MRI. *Gynecol Oncol* 2010;116(3):389-94. PMID 19926121
- <sup>94</sup> Thrall MM, DeLoia JA, Gallion H, Avril N. Clinical use of combined positron emission tomography and computed tomography (FDG-PET/CT) in recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2007;105(1):17–22. PMID 17208284
- <sup>95</sup> Lopez-Lopez V, Cascales-Campos PA, Gil J, Frutos L et al. Use of (18)F-FDG PET/CT in the preoperative evaluation of patients diagnosed with peritoneal carcinomatosis of ovarian origin, candidates to cytoreduction and hipec. A pending issue. *Eur J Radiol* 2016;85(10):1824-1828. PMID 27666623
- <sup>96</sup> Ponisio MR, Fowler KJ, Dehdashti F. The Emerging Role of PET/MR Imaging in Gynecologic Cancers. *PET Clin* 2016;11(4): 425-440. PMID 27593247
- <sup>97</sup> Jaime Prat; for the FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynecol Obstet* 2014;124 (1):1–5. PMID 24210074
- <sup>98</sup> du Bois A, Quinn M, Thigpen T, et al. 2004 consensus statements on the management of ovarian cancer: final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GFIG OCCC 2004). *Ann Oncol* 2005; 16 (suppl 8): viii7–12. PMID 16239238
- <sup>99</sup> Vergote I, De Brabanter J, Fyles A, Bertelsen K et al. Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma. *Lancet.* 2001 Jan 20;357(9251):176-82. PMID: 11213094
- <sup>100</sup> Tognon G, Carnazza M, Ragnoli M, Calza S et al. Prognostic factors in early-stage ovarian cancer. *Ecancermedicallscience* 2013;7:325- PMID 23781280
- <sup>101</sup> Paramasivam S, Tripcony L, Crandon A, Quinn M et al. Prognostic importance of preoperative CA-125 in International Federation of Gynecology and Obstetrics stage I epithelial ovarian cancer: an Australian multicenter study. *J Clin Oncol* 2005;23(25):5938-5942. PMID 16087942
- <sup>102</sup> Nagale F, Petru E, Medl M, Kainz C et al. Preoperative CA 125: an independent prognostic factor in patients with stage I epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1995;86(2):259-264. PMID 7617357
- <sup>103</sup> Tropé C and Kaern J. Adjuvant chemotherapy for early-stage ovarian cancer: review of the literature. *J Clin Oncol* 2007;25(20):2909-2920. PMID 17617522
- <sup>104</sup> Du Bois A et al. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials. *Cancer* 2009;115(6):1234-44. PMID: 19189349
- <sup>105</sup> Polverino G, Parazzini F, Stellato G, Scarfone G et al. Survival and prognostic factors of women with advanced ovarian cancer and complete response after a carboplatin–paclitaxel chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2005; 99: 343–47. PMID 16051334
- <sup>106</sup> Winter WE, Maxwell GL, Tian C, Carlson JW et al. Prognostic Factors for Stage III Epithelial Ovarian Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2007;25:3621-3627. PMID 17704411
- <sup>107</sup> Mackay HJ, Brady MF, Oza AM, Reuss A et al. Prognostic relevance of uncommon ovarian histology in women with stage III/IV epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2010;20(6):945-952. PMID 20683400
- <sup>108</sup> Ferrero JM, Largillier R, Ramaioli A, Heudier P et al. Prognostic value of early normalization of CA 125 during chemotherapy in stages III and IV ovarian tumors. *Bull Cancer* 1997;84(7):722-728. PMID 9339198
- <sup>109</sup> Rocconi RP, Matthews KS, Kemper MK, Hoskins KE et al. The timing of normalization of CA-125 levels during primary chemotherapy is predictive of survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2009;114(2):242-245. PMID 19447480
- <sup>110</sup> Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, Gonzalez A et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013;24(suppl 6):vi24-vi32. PMID 24078660
- <sup>111</sup> Morgan RJ, Armstrong DK, Alvarez RD, Bakkum-Gamez JN et al. Ovarian Cancer, Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Retw* 2016 Sep;14(9):1134-1163. PMID 27587625

- <sup>112</sup> Young RC, Decker DG, Wharton JT, Piver MS et al. Staging laparotomy in early ovarian cancer. *JAMA* 1983;250(22):3072-3076. PMID 6358558
- <sup>113</sup> Koo YJ, Kim JE, Kim YH, Hahn HS et al. Comparison of laparoscopy and laparotomy for the management of early-stage ovarian cancer: surgical and oncological outcomes. *J Gynecol Oncol* 2014;25(2):111-117. PMID 24761214
- <sup>114</sup> Powless CA, Aletti GD, Bakkum-Gamez JN and Cliby WA. Risk factors for lymph node metastasis in apparent early-stage epithelial ovarian cancer: implications for surgical staging. *Gynecol Oncol* 2011;122(3):536-540. PMID 21636114
- <sup>115</sup> Maggioni A, Benedetti PP, Dell'Anna T, Landoni F et al. Randomised study of systematic lymphadenectomy in patients with epithelial ovarian cancer macroscopically confined to the pelvis. *Br J Cancer* 2006; 95: 699–704. PMID 16940979
- <sup>116</sup> Lago V, Minig L and Fotopoulou C. Incidence of Lymph Node Metastases in Apparent Early-Stage Low-Grade Epithelial Ovarian Cancer: A Comprehensive Review. *Int J Gynecol Cancer* 2016;26(8):1407-1414. PMID 27465900
- <sup>117</sup> Hoogendam JP, Vlek CA, Witteveen PO, Verheijen R and Zweemer RP. Surgical lymph node assessment in mucinous ovarian carcinoma staging: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* 2016 Jul 22. PMID 27444115
- <sup>118</sup> Santaballa A, Barretina P, Casado A, García Y et al. SEOM Clinical Guideline in ovarian cancer (2016). *Clin Transl Oncol* 2016;18:1206-1212. PMID 27905052
- <sup>119</sup> Young RC, Walton LA, Ellenberg SS, Homesley HD et al. Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer. Results of two prospective randomized trials. *N Engl J Med* 1990;322(15):1021-1027. PMID 2181310
- <sup>120</sup> Vergote IB, Vergote-De Vos LN, Abeler VM, Aas M et al. Randomized Trial Comparing Cisplatin With Radioactive Phosphorus or Whole-Abdomen Irradiation as Adjuvant Treatment of Ovarian Cancer. *Cancer* 1992;69(3):741-749. PMID 1730124
- <sup>121</sup> Bolis G, Colombo N, Pecorelli S, Torri V et al. Adjuvant treatment for early epithelial ovarian cancer: results of two randomised clinical trials comparing cisplatin to no further treatment or chronic phosphate (32P). G.I.C.O.G.: Gruppo Interregionale Collaborativo in Ginecologia Oncologica. *Ann Oncol* 1995;6(9):887-893. PMID 8624291
- <sup>122</sup> Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, Vermoken JB et al. Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant Chemotherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(2):113-125. PMID: 12529344
- <sup>123</sup> Colombo N, Guthrie D, Chiari S, Parmar M et al. International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1: a randomized trial of adjuvant chemotherapy in women with early-stage ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003 Jan 15;95(2):125-132. PMID: 12529345
- <sup>124</sup> Trimbos JB et al. International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1 and Adjuvant Chemotherapy in Ovarian Neoplasm trial: two parallel randomized phase III trials of adjuvant chemotherapy in patients with early-stage ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(2):105-112. PMID: 12529343
- <sup>125</sup> Winter-Roach BA, Kitchener HC, Lawrie TA. Adjuvant (post-surgery) chemotherapy for early stage epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Mar 14; 3: CD004706. PMID: 22419298
- <sup>126</sup> Lawrie TA, Winter-Roach BA, Heus P and Kitchener HC. Adjuvant (post-surgery) chemotherapy for early stage epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Dec 17;(12):CD004706. PMID 26676202
- <sup>127</sup> Vergote I and Amant F. Time to include high-risk early ovarian cancer in randomized phase III trials of advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006;102:415-417. PMID 16979430
- <sup>128</sup> Bell J, Brady MF, Young RC, Lage J et al. Randomized phase III trial of three versus six cycles of adjuvant carboplatin and paclitaxel in early stage epithelial ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2006;102(3):432-439. PMID 16860852
- <sup>129</sup> Chan JK, Tian C, Fleming GF, Monk BJ et al. The potential benefit of 6 vs. 3 cycles of chemotherapy in subsets of women with early-stage high-risk epithelial ovarian cancer: an exploratory analysis of a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2010;116(3):301-306. PMID 19945740
- <sup>130</sup> Bookman MA, Brady MF, McGuire WP, Harper PG et al. Evaluation of new platinum-based treatment regimens in advanced-stage ovarian cancer: a Phase III Trial of the Gynecologic Cancer Intergroup. *J Clin Oncol* 2009;27(9):1419-25. PMID 19224846

- <sup>131</sup> Stuart GC, Kitchener H, Bacon M, duBois et al. 2010 Gynecologic Cancer InterGroup (GCIG) consensus statement on clinical trials in ovarian cancer: report from the Fourth Ovarian Cancer Consensus Conference. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21(4):750-755. PMID 21543936
- <sup>132</sup> Kusamura S et al. Multidimensional analysis of the learning curve for cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in peritoneal surface malignancies. *Ann Surg* 255, 2: 348-56, 2012. PMID 22202584
- <sup>133</sup> Wright AA, Bohlke K, Armstrong DK, Bookman MA et al. Neoadjuvant Chemotherapy for Newly Diagnosed, Advanced Ovarian Cancer: Society of Gynecologic Oncology and American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* 2016;34(28):3460-3473. PMID 27502591
- <sup>134</sup> Vergote I, Tropé CG, Amant F, Kristensen GB et al. Neoadjuvant Chemotherapy or Primary Surgery in Stage IIIC or IV Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2010;363(10):943-953. PMID 20818904
- <sup>135</sup> Kehoe S, Hook J, Nankivell M, Jayson GC et al. Primary chemotherapy versus primary surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer (CHORUS): an open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial. *Lancet* 2015;386(9990):249-257. PMID 26002111
- <sup>136</sup> Fagotti A, Ferrandina G, Vizzielli G, Fanfani F et al. Phase III randomised clinical trial comparing primary surgery versus neoadjuvant chemotherapy in advanced epithelial ovarian cancer with high tumour load (SCORPION trial): Final analysis of peri-operative outcome. *Eur J Cancer* 2016;59:22-33. PMID 26998845
- <sup>137</sup> Onda T, Yoshikawa H, Shibata T, et al. Comparison of treatment invasiveness between upfront debulking surgery versus interval debulking surgery following neoadjuvant chemotherapy for stage III/IV ovarian, tubal, and peritoneal cancers in phase III randomized trial: JCOG0602. *J Clin Oncol* 2014;32:353s (suppl; abstr 5508)
- <sup>138</sup> Tangjitgamol S, Manusirivithaya S, Laopaiboon M, Lumbiganon P and Bryant A. Interval debulking surgery for advanced epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016 Jan 9;(1):CD006014. PMID 26747297
- <sup>139</sup> van Meurs HS, Tajik P, Hof MH, Vergote I et al: Which patients benefit most from primary surgery or neoadjuvant chemotherapy in stage IIIC or IV ovarian cancer? An exploratory analysis of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer 55971 randomised trial. *Eur J Cancer* 2013;49(15):3191-3201. PMID 23850170
- <sup>140</sup> Makar AP, Tropé CG, Tummers P, Denys H et al. Advanced Ovarian Cancer: Primary or Interval Debulking? Five Categories of Patients in View of the Results of Randomized Trials and Tumor Biology: Primary Debulking Surgery and Interval Debulking Surgery for Advanced Ovarian Cancer. *Oncologist* 2016;21(6):745-754. PMID 27009938
- <sup>141</sup> Cocolini F, Campanati L, Catena F, Ceni V et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with cisplatin and paclitaxel in advanced ovarian cancer: a multicenter prospective observational study. *J Gynecol Oncol* 2015;26(1):54-61. PMID 25376916
- <sup>142</sup> Winter WE et al. Tumor residual after surgical cytoreduction in prediction of clinical outcome in stage IV epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2008 Jan 1;26(1):83-9. PMID: 18025437
- <sup>143</sup> Suidan RS, Ramirez PT, Sarasohn DM, Teicher JB et al. A multicenter prospective trial evaluating the ability of preoperative computed tomography scan and serum CA-125 to predict suboptimal cytoreduction at primary debulking surgery for advanced ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer. *Gynecol Oncol* 2014;134(3): 455-461. PMID 25019568
- <sup>144</sup> Gerestein CG, Eijkemans MJ, Bakker J, Elgersma OE et al: Nomogram for suboptimal cytoreduction at primary surgery for advanced stage ovarian cancer. *Anticancer Res* 2011;31(11):4043-4049. PMID 22110240
- <sup>145</sup> Kang S, Kim TJ, Nam BH, Seo SS et al: Preoperative serum CA-125 levels and risk of suboptimal cytoreduction in ovarian cancer: a meta-analysis. *J Surg Oncol* 2010;101(1):13-17. PMID 20025071
- <sup>146</sup> Fagotti A, Vizzielli G, Fanfani F, Costantini B et al. Introduction of staging laparoscopy in the management of advanced epithelial ovarian, tubal and peritoneal cancer: impact on prognosis in a single institution experience. *Gynecol Oncol* 2013;131(2):341-346. PMID 23938372
- <sup>147</sup> Vergote I, Marquette S, Amant F, Bertelot P, Veven P. Port-site metastases after open laparoscopy: a study in 173 patients with advanced ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15(5):776-779. PMID 16174223

- <sup>148</sup> McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 1996;334(1):1-6. PMID 7494563
- <sup>149</sup> du Bois A, Lück HJ, Meier W, Adams HP et al: A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(17):1320-1329. PMID 12953086
- <sup>150</sup> Katsumata N, Yasuda M, Isonishi S, Takahashi F et al. Long-term results of dose-dense paclitaxel and carboplatin versus conventional paclitaxel and carboplatin for treatment of advanced epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer (JGOG 3016): a randomised, controlled, open-label trial. *Lancet Oncol* 2013;14(10):1020-1026. PMID 23948349
- <sup>151</sup> Pignata S, Scambia G, Katsaros D, Gallo C et al. Carboplatin plus paclitaxel once a week versus every 3 weeks in patients with advanced ovarian cancer (MITO-7): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15(4):396-405. PMID 24582486
- <sup>152</sup> Chan JK, Brady MF, Penson RT, Huang H et al. Weekly vs. every-3-week paclitaxel and carboplatin for ovarian cancer. *N Engl J Med* 2016;374(8):738-748. PMID 26933849
- <sup>153</sup> Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Juang HQ et al. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2006;354(1):34-43. PMID: 16394300
- <sup>154</sup> Alberts DS, Liu PY, Hannigan EW, O'Toole R et al. Intraperitoneal cisplatin plus intravenous cyclophosphamide Versus intravenous cisplatin plus intravenous cyclophosphamide for stage III ovarian cancer. *N Engl J Med* 1996;335: 1950-5. PMID 8960474
- <sup>155</sup> Markman M, Bundy BN, Alberts DS, Fowler JM et al. Phase III trial of standard-dose intravenous cisplatin plus paclitaxel versus moderately high-dose carboplatin followed by intravenous paclitaxel and intraperitoneal cisplatin in small-volume stage III ovarian carcinoma: an intergroup study of the Gynecologic Oncology Group, Southwestern Oncology Group, and Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2001;19(4):1001-7. PMID 11181662
- <sup>156</sup> Jaaback K and Johnson N. Intraperitoneal chemotherapy for the initial management of primary epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Jan 25;(1):CD005340. PMID 16437527
- <sup>157</sup> Jaaback K, Johnson N and Lawrie TA. Intraperitoneal chemotherapy for the initial management of primary epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Jan 12;(1):CD005340. PMID 26755441
- <sup>158</sup> Tewari D, Java JJ, Salani R, Armstrong DK et al. Long-term survival advantage and prognostic factors associated with intraperitoneal chemotherapy treatment in advanced ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* 2015;33(13):1460-1466. PMID 25800756
- <sup>159</sup> Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA et al. A Phase 3 Trial of Bevacizumab in Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2011;365(26):2484-96. PMID 22204725
- <sup>160</sup> Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med* 2011;365(26):2473-2483. PMID 22204724
- <sup>161</sup> Oza AM, Cook AD, Pfisterer J, Embleton A et al. Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* 2015;16(8):928-936. PMID 26115797
- <sup>162</sup> Mei L, Chen ML, We DM, Fang F et al. Maintenance chemotherapy for ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2013 Jun 29;(6):CD007414. PMID 23813336
- <sup>163</sup> Safra T, Menczer J, Bernstein RM, Shpigel S et al. Combined weekly carboplatin and paclitaxel as primary treatment of advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2009;114(2):215-8. PMID 19446318
- <sup>164</sup> Rustin GJ, van der Burg ME, Griffin CL, Guthrie D et al. Early versus delayed treatment of relapsed ovarian cancer (MRC OV05/EORTC 55955): a randomised trial. *Lancet* 2010;376(9747):1155-1163. PMID 20888993
- <sup>165</sup> Fulham MJ, Carter J, Baldey A, Hicks RJ et al. The impact of PET-CT in suspected recurrent ovarian cancer: A prospective multi-centre study as part of the Australian PET Data Collection Project. *Gynecol Oncol* 2009 Mar;112(3):462-8. PMID 19150121
- <sup>166</sup> Fung-Kee-Fung M, Oliver T, Elit L, Oza A et al. Optimal chemotherapy treatment for women with recurrent ovarian cancer. *Curr Oncol* 2007;14(5):195-208. PMID 17938703
- <sup>167</sup> Eisenhauer EA, Vemorken JB and van Glabbeke M. Predictors of response to subsequent chemotherapy in platinum pretreated ovarian cancer: a multivariate analysis of 704 patients. *Ann Oncol* 1997;8(10):963-968. PMID 9402168

- <sup>168</sup> Markman M, Rothman R, Hakes T, Reichman B et al. Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J Clin Oncol* 1991;9(3):389-393. PMID 1999708
- <sup>169</sup> Thigpen JT, Vance RB and Khansur T. Second-line chemotherapy for recurrent carcinoma of the ovary. *Cancer* 1993;71(4 Suppl):1559-1564. PMID 8094320
- <sup>170</sup> Gordon AN, Fleagle JT, Guthrie D, Parkin DE et al. Recurrent Epithelial Ovarian Carcinoma: A Randomized Phase III Study of Pegylated Liposomal Doxorubicin Versus Topotecan. *J Clin Oncol* 2001;19:3312-3322. PMID: 11454878
- <sup>171</sup> Parmar MK, Ledermann JA, Colombo N, du Bois A et al. Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. *Lancet*. 2003;361:2099–106. PMID: 12826431
- <sup>172</sup> Markman M, Markman J, Webster K, Zanotti K et al. Duration of response to second-line, platinum-based chemotherapy for ovarian cancer: implications for patient management and clinical trial design. *J Clin Oncol* 2004;22(15):3120-3125. PMID 15284263
- <sup>173</sup> Harter P, du Bois A, Hahmann M, Hasenburg A et al. Surgery in recurrent ovarian cancer: the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) DESKTOP OVAR trial. *Ann Surg Oncol* 2006;13(12):1702-1710. PMID 17009163
- <sup>174</sup> Harter P, Sehouli J, Reuss A, Hasenburg A et al. Prospective validation study of a predictive score for operability of recurrent ovarian cancer: the Multicenter Intergroup Study DESKTOP II. A project of the AGO Kommission OVAR, AGO Study Group, NOGGO, AGO-Austria, and MITO. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21(2):289-295. PMID 21270612
- <sup>175</sup> Chi DS, McCaughy K, Diaz JP, Huh J et al. Guidelines and Selection Criteria for Secondary Cytoreductive Surgery in Patients with Recurrent, Platinum-Sensitive Epithelial Ovarian Carcinoma. *Cancer* 2006;106:1933–1939. PMID 16572412
- <sup>176</sup> Gonzalez-Martin AJ, Calvo E, Bover I, Rubio MJ et al. Randomized phase II trial of carboplatin versus paclitaxel and carboplatin in platinum-sensitive recurrent advanced ovarian carcinoma: a GEICO (Grupo Espanol de Investigacion en Cancer de Ovario) study. *Ann Oncol*. 2005;16: 749–55. PMID: 15817604
- <sup>177</sup> Pfisterer J, Plante M, Vergote I, du Bois A et al. Gemcitabine plus carboplatin compared with carboplatin in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: an intergroup trial of the AGO-OVAR, the NCIC CTG, and the EORTC GCG. *J Clin Oncol*. 2006;24:4699–707. PMID: 16966687
- <sup>178</sup> Pujade-Lauraine E, Wagner U, Aavall-Lundqvist E, GebSKI V et al. Pegylated liposomal doxorubicin and carboplatin compared with paclitaxel and carboplatin for patients with platinum-sensitive ovarian cancer in late relapse. *J Clin Oncol*. 2010;28:3323–9. PMID: 20498395
- <sup>179</sup> Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, Judson PL et al. OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30:2039–45. PMID: 22529265
- <sup>180</sup> Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:852-861. PMID: 24882434
- <sup>181</sup> Mirza M, Monk B, Herrstedt J, Oza AM et al. Niraparib maintenance therapy in platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *N Engl J Med* 2016 Oct 7 [Epub ahead of print]. PMID 27717299
- <sup>182</sup> Poveda A, Vergote I, Tjulandin S, Kong B et al. Trabectedin plus pegylated liposomal doxorubicin in relapsed ovarian cancer: outcomes in the partially platinum-sensitive (platinum-free interval 6–12 months) subpopulation of OVA-301 phase III randomized trial. *Ann Oncol*. 2011;22(1):39–48. PMID: 20643862
- <sup>183</sup> Pignata S, Scambia G, Raspagliesi F, Murgia V et al. The MITO8 phase III international multicenter randomized study testing the effect on survival of prolonging platinum-free interval (PFI) in patients with ovarian cancer (OC) recurring between 6 and 12 months after previous platinum-based chemotherapy: A collaboration of MITO, MANGO, AGO, BGOG, ENGOT, and GCIg. *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl; abstr 5505)
- <sup>184</sup> Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber B, Reuss A et al. Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2014;32(13):1302-1308. PMID 24637997
- <sup>185</sup> Stockler MR, Hilpert F, Friedlander M, King MT et al. Patient-reported outcome results from the open-label phase III AURELIA trial evaluating bevacizumab-containing therapy for platinum-resistant ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2014;32(13):1309-1316. PMID 24687829

- <sup>186</sup> Gentry-Maharaj, Jacobs I and Menon U. Ovarian Cancer-Tumor Markers and Screening. En: Berek & Hacker's. Gynecologic Oncology. Sixth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2015. p. 443-463.
- <sup>187</sup> Sturgeon CM, Lai LC and Duffy MJ. Serum tumour markers: how to order and interpret them. *BMJ* 2009;339:b3527. PMID 19773328
- <sup>188</sup> Vandembroucke JP, von Elm E, Altman DG, Gøtzsche PC et al. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): Explanation and Elaboration. *PLoS Med* 2007 Oct 16;4(10):e297. PMID 17941715
- <sup>189</sup> McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst* 2005;97(16):1180-1184. PMID 16106022
- <sup>190</sup> Altman DG, McShane LM, Sauerbrei W and Taube S. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): Explanation and Elaboration . *BMC Med* 2012;10:51. PMID 22642691
- <sup>191</sup> Pepe MS, Feng Z, Janes H, Bossuyt PM and Potter JD. Pivotal evaluation of the accuracy of a biomarker used for classification or prediction: standards for study design. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(29):1432-1438. PMID 18840817
- <sup>192</sup> Febbo PG, Ladanyi M, Aldape KD, De Marzo AM et al. NCCN Task Force report: Evaluating the clinical utility of tumor markers in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2011 Nov;9 Suppl 5:S1-32. PMID 22138009
- <sup>193</sup> Sturgeon CM, Hoffman BR, Chan DW, Ch'ng SL et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for use of tumor markers in clinical practice: quality requirements. *Clin Chem* 2008;54(8):e1-e10. PMID 18606634
- <sup>194</sup> NIH consensus conference. Treatment of early-stage breast cancer. *JAMA* 1991;265(3):391-5. PMID 1984541
- <sup>195</sup> Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche HJ et al. Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst* 1996;88(20):1456-1466. PMID 8841020
- <sup>196</sup> Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM et al. ASCO 2006 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:5313-5327. PMID 17060676
- <sup>197</sup> Tsai PL, Su WJ, Leung WH, Lai CT and Liu CK. Neutrophil-lymphocyte ratio and CEA level as prognostic and predictive factors in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Cancer Res Ther* 2016;12(2):582-589. PMID 27461614
- <sup>198</sup> Sagi-Dain L, Lavie O, Auslander R and Sagi S. CEA in evaluation of adnexal mass: retrospective cohort analysis and review of the literature. *Int J Biol Markers* 2015;30(4):e394-400. PMID 26109367
- <sup>199</sup> Bast RC Jr, Feeney M, Lazarus H, Nadler LM et al. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* 1981;68(5):1331-1337. PMID 7028788
- <sup>200</sup> Menon U and Jacobs I. Tumor markers. In: Principles and Practice of Gynecologic Oncology, Hoskins W, Perez C, Young R (Eds), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2000. p.165.
- <sup>201</sup> Del Villano BC, Brennan S, Brock P, Bucher C et al. Radioimmunometric assay for a monoclonal antibody-defined tumor marker, CA 19-9. *Clin Chem* 1983;29(3):549-552. PMID 6825270
- <sup>202</sup> Canney PA, Wilkinson PM, James RD, Moore M. CA19-9 as a marker for ovarian cancer: alone and in comparison with CA125. *Br J Cancer*. 1985;52(1):131-133. PMID 2410004
- <sup>203</sup> Kabawat SE, Bast RC Jr, Bhan AK, Welch WR et al. Tissue distribution of a coelomic-epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody OC125. *Int J Gynecol Pathol* 1983;2(3):275-285. PMID 6196309
- <sup>204</sup> Jacobs I and Bast RC Jr. The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum Reprod* 1989;4(1):1-12. PMID 2651469.
- <sup>205</sup> Beck EP, Moldenhauer A, Merkle E, Kiesewetter F et al. CA 125 production and release by ovarian cancer cells in vitro. *Int J Biol Markers* 1998;13(4):200-206. PMID 10228901
- <sup>206</sup> Fleuren GJ, Nap M, Aalders JG, Trimbos JB and de Bruijn HW. Explanation of the limited correlation between tumor CA 125 content and serum CA 125 antigen levels in patients with ovarian tumors. *Cancer* 1987;60(10):2437-2442. PMID 3478118
- <sup>207</sup> Vergote IB, Borner OP and Abeler VM. Evaluation of serum CA 125 levels in the monitoring of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1987;157(1):88-92. PMID 2440307
- <sup>208</sup> Morales-Vásquez F, Pedernera E, Reynaga-Obregón J, López-Basave HN et al. High levels of pretreatment CA125 are associated to improved survival in high grade serous ovarian carcinoma. *J Ovarian Res* 2016;9(1):41. PMID 27388275
- <sup>209</sup> Bast RC Jr, Klug TL, St John E, Jenison E et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 1983;309(15):883-887. PMID 6310399

- <sup>210</sup> Menon U, Gentry-Maharaj A, Hallett R, Ryan A et al. Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of detected cancers: results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS). *Lancet Oncol* 2009;10(4):327-340. PMID 19282241
- <sup>211</sup> Schutter EM, Sohn C, Westermann R, Kaufmann M et al. Diagnostic Value of Pelvic Examination, Ultrasound, and Serum CA 125 in Postmenopausal Women with a Pelvic Mass. *Cancer* 1994;74(4):1398-1406. PMID 8055463
- <sup>212</sup> Gaducci A, Zola P, Landoni F, Maggino T et al. Serum half-life of CA 125 during early chemotherapy as an independent prognostic variable for patients with advanced epithelial ovarian cancer: results of a multicentric Italian study. *Gynecol Oncol* 1995;58(1):42-47. PMID 7789889
- <sup>213</sup> Riedlinger JM, Wafflart J, Ricolleau G, Eche N et al. CA 125 half-life and CA 125 nadir during induction chemotherapy are independent predictors of epithelial ovarian cancer outcome: results of a French multicentric study. *Ann Oncol* 2006;17(8):1234-1238. PMID 16766592
- <sup>214</sup> Makar AP, Kristensen GB, Kaern J, Bormer OP et al. Prognostic value of pre- and postoperative serum CA 125 levels in ovarian cancer: new aspects and multivariate analysis. *Obstet Gynecol* 1992;79(6):1002-1010. PMID 1579296
- <sup>215</sup> Crawford SM and Peace J. Does the nadir CA125 concentration predict a long-term outcome after chemotherapy for carcinoma of the ovary? *Ann Oncol* 2005;16(1):47-50. PMID 15598937
- <sup>216</sup> Gadducci A, Cosio S, Fanucchi A, Negri S et al. The predictive and prognostic value of serum CA 125 half-life during paclitaxel/platinum-based chemotherapy in patients with advanced ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;93(1):131-136. PMID 15047226
- <sup>217</sup> Niloff JM, Bast RC Jr, Schaetzl EM and Knapp RC. Predictive value of CA 125 antigen levels in second-look procedures for ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1985;151(7):981-986. PMID 3157319
- <sup>218</sup> Bouchard D, Morisset D, Bourbonnais Y and Tremblay GM. Proteins with whey- acidic-protein motifs and cancer. *Lancet Oncol* 2006;7(2):167-174. PMID 16455481
- <sup>219</sup> Calgano MT, Hampton GM and Frierson HF Jr. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol* 2006;19(6):847-853. PMID 16607372
- <sup>220</sup> Hellstrom I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, Ledbetter JA et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:3695-3700. PMID 12839961
- <sup>221</sup> Havrilesky LJ, Whitehead CM, Rubatt JM, Cheek RL et al. Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian cancer detection and monitoring for disease recurrence. *Gynecol Oncol* 2008;110(3):374-382. PMID 18584856
- <sup>222</sup> Moore RG, Miller MC, Steinhoff MM, Skates SJ et al. Serum HE4 levels are less frequently elevated than CA125 in women with benign gynecologic disorders. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206(4):351.e1-8. PMID 22284961
- <sup>223</sup> Ferraro S, Braga F, Lanzoni M, Boracchi P et al. Serum human epididymis protein 4 vs carbohydrate antigen 125 for ovarian cancer diagnosis: a systematic review. *J Clin Pathol* 2013;66(4):273-281. PMID 23426716
- <sup>224</sup> Schummer M, Drescher C, Forrest R, Gough S et al. Evaluation of ovarian cancer remission markers HE4, MMP7 and Mesothelin by comparison to the established marker CA125. *Gynecol Oncol* 2012;125(1):65-69. PMID 22155417
- <sup>225</sup> Steffensen KD, Waldstrom M, Brandslund I, Lund B et al. Identification of high-risk patients by human epididymis protein 4 levels during follow-up of ovarian cancer. *Onco Lett* 2016;11(6):3967-3974. PMID 27313725
- <sup>226</sup> Dadducci A, Cosio S, Tana R and Genazzani AR. Serum and tissue biomarkers as predictive and prognostic variables in epithelial ovarian cancer. *Crit Rev Oncol hematol* 2009;69(1):12-27. PMID 18595727
- <sup>227</sup> Cozzi GD, Samuel JM, Fromal JT, Keene S et al. Thresholds and timing of pre-operative thrombocytosis and ovarian cancer survival: analysis of laboratory measures from electronic medical records. *BMC Cancer* 2016;16:612. PMID: 27502272
- <sup>228</sup> Li AJ, Madden AC, Cass I, Leuchter RS et al. The prognostic significance of thrombocytosis in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;92(1):211-214. PMID 14751160
- <sup>229</sup> Chen Z, Shao Y, Wang K, Cao W et al. Prognostic role of pretreatment serum albumin in renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Onco Targets Ther* 2016;9:6701-6710. PMID 27822073

- <sup>230</sup> Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, et al: Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1999;17:2530-2540. PMID 10561319
- <sup>231</sup> Shen J, chen Z, Zhuang Q, Fan M et al. Prognostic Value of Serum Lactate Dehydrogenase in Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2016;11(11): e0166482. PMID 27861542
- <sup>232</sup> Deebe F, Khatun S, Alam MM and Shahida SM. Serum LDH and CA-125: Markers for Diagnosis of Ovarian Malignancy. *Mymensingh Med J* 2015;24(2):334-340. PMID 26007262
- <sup>233</sup> Ataseven B, du Bois A, Reinthaller A, Traut A et al. Pre-operative serum albumin is associated with post-operative complication rate and overall survival in patients with epithelial ovarian cancer undergoing cytoreductive surgery. *Gynecol Oncol* 2015;138(3):560-565. PMID 26163893
- <sup>234</sup> Chi D, Zivanovic O, Kolev V, Yu C et al. Nomogram for predicting 5-year survival after primary surgery for epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(16\_suppl):5523. PMID 27962481
- <sup>235</sup> Miao Y, Li S, Yan Q, Li B, Feng Y. Prognostic Significance of Preoperative Prognostic Nutritional Index in Epithelial Ovarian Cancer Patients Treated with Platinum-Based Chemotherapy. *Oncol Res Treat* 2016;39(11):712-719. PMID 27855385
- <sup>236</sup> Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Ohtani h et al. The prognostic significance of the postoperative prognostic nutritional index in patients with colorectal cancer. *BMC Cancer* 2015;15:521. PMID 26177820
- <sup>237</sup> Sun KY, Xu JB, Chen SL, Yuan YJ et al. Novel immunological and nutritional-based prognostic index for gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2015;21(19):5961-5971. PMID 26019461
- <sup>238</sup> Pantel K and Brakenho RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004;4(6):448–56. PMID 15170447
- <sup>239</sup> Minn AJ, Massagué J. Invasion and Metastasis. In: DeVita, Hellman and Rosenberg's. *Principles & Practice of Oncology*. 8th edition. Philadelphia: Lippincott, 2008, pp 117-34.
- <sup>240</sup> Pantel K, Cote RJ and Fodstad O. Detection and Clinical Importance of Micrometastatic Disease. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1113-24. PMID 10393719
- <sup>241</sup> Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(8):793–802. PMID 16120859
- <sup>242</sup> Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5287–5312. PMID 17954709
- <sup>243</sup> Mavroudis D. Circulating cancer cells. *Ann Oncol* 2010 Oct;21 Suppl 7:vii95-100. PMID 20943650
- <sup>244</sup> Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:781–791. PMID 15317891
- <sup>245</sup> Zhang L, Riethdorf S, Wu G, Wang T et al. Meta-analysis of the Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 5701-5710. PMID 22908097
- <sup>246</sup> Lv Q, Gong L, Zhang T, Ye J et al. Prognostic value of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: a systemic review and meta-analysis. *Clin Transl Oncol* 2016;18(3):322-330. PMID 26260915
- <sup>247</sup> Goldkorn A, Ely B, Quinn DI, Tangen CM et al. Circulating Tumor Cell Counts Are Prognostic of Overall Survival in SWOG S0421: A Phase III Trial of Docetaxel With or Without Atrasentan for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Clin Oncol* 2014;32:1136-1142. PMID 24616308
- <sup>248</sup> Hiltermann TJ, Pore MM, van den Berg A, Timens W et al. Circulating tumor cells in small-cell lung cancer: a predictive and prognostic factor. *Ann Oncol* 2012;23: 2937-2942. PMID 22689177
- <sup>249</sup> Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L et al. Evaluation and Prognostic Significance of Circulating Tumor Cells in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1556-1563. PMID 21422424
- <sup>250</sup> Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH et al. Relationship of circulating Tumor Cells to Tumor Response, Progression-Free Survival, and Overall Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3213-3221. PMID 18591556
- <sup>251</sup> Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression free and overall survival. *Clin Cancer Res* 2006;12: 4218–4224. PMID 16857794
- <sup>252</sup> Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S et al. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol* 2008;26(8):1208-1215. PMID 18323545
- <sup>253</sup> Rack B, Andergassen U, Janni W, Neugebauer J. CTCs in primary breast cancer (I). Recent results *Cancer Res* 2012;195:179-185. PMID 22527505

- <sup>254</sup> Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, Brain E et al. Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. *Clin Cancer Res* 2008;14(21):7004-7010. PMID 18980996
- <sup>255</sup> Rack B, Schindlbeck C, Jückstock J, Andergassen U et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2014;106(5). PMID 24832787
- <sup>256</sup> Gazzaniga P, Naso G, Gradilone A, Cortesi E et al. Chemosensitivity profile assay of circulating cancer cells (CTCs): prognostic and predictive value in epithelial tumors. *Int J Cancer* 2010;126 (10): 2437-2447. PMID 19821489
- <sup>257</sup> Gradilone A, Naso G, Raimondi C, Cortesi E et al. Circulating tumor cells (CTCs) in metastatic breast cancer (MBC): prognosis, drug resistance and phenotypic characterization. *Ann Oncol* 2011;22(1):86-92. PMID 20603432
- <sup>258</sup> Ybarrondo B, Bruckner S, Hornyak S, Webster E et al. Comparative analysis of pathway proteins in cancer cells in primary and metastatic tumors and circulating tumor cells. *J Clin Oncol* 2011;29(15\_suppl):e11132. PMID 28023837
- <sup>259</sup> Agelaki S, Dragolia M, Markonanolaki H, Alkahtani S et al. Phenotypic characterization of circulating tumor cells in triple negative breast cancer patients. *Oncotarget* 2016 Dec 24. PMID 28029660
- <sup>260</sup> Banys-Paluchowski M, Krawczyk N and Fehm T. Potential Role of Circulating Tumor Cell Detection and Monitoring in Breast Cancer: A Review of Current Evidence. *Front Oncol* 2016;6:255. PMID 27990412
- <sup>261</sup> Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, Winer EP et al. Circulating Tumor Cells and Response to Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer: SWOG S0500. *J Clin Oncol* 2014;32:3483-3489. PMID 24888818
- <sup>262</sup> Baker MK, Mikhitarian K, Osta W, Callahan K et al. Molecular detection of breast cancer cells in the peripheral blood of advanced-stage breast cancer patients using multimarker real-time reverse transcription-polymerase chain reaction and a novel porous barrier density gradient centrifugation technology. *Clin Cancer Res* 2003;9(13):4865-4871. PMID 14581359
- <sup>263</sup> Sabbatini R, Federico M, Morselli M, Depenni R et al. Detection of circulating tumor cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction of maspin in patients with breast cancer undergoing conventional-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000;18(9):1914-1920. PMID 10784632
- <sup>264</sup> Pinzani P, Salvadori B, Simi L, Bianchi S et al. Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection. *Hum Pathol* 2006; 37(6): 711-718. PMID 16733212
- <sup>265</sup> Kim SJ, Ikeda N, Shiba E, Takamura Y and Noguchi S. Detection of breast cancer micrometastases in peripheral blood using immunomagnetic separation and immunocytochemistry. *Breast Cancer* 2001;8(1):63-69. PMID 11180768
- <sup>266</sup> Demel U, Tilz GP, Foeldes-Papp Z, Gutierrez B et al. Detection of tumour cells in the peripheral blood of patients with breast cancer: Development of a new sensitive and specific immunomolecular assay. *J Exp Clin Cancer Res* 2004;23(3):465-468. PMID 15595637
- <sup>267</sup> Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M et al. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 2004;35(1):122-128. PMID 14745734
- <sup>268</sup> Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ and Litvinov SV. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med (Nerl)* 1999;77(10):699-712. PMID 10606205
- <sup>269</sup> Riethdorf S, Frischie H, Müller V, Rau T et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: A validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 2007;13:920-928. PMID 17289886
- <sup>270</sup> Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, van der Spoel P et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(1):61-66. PMID 19116383
- <sup>271</sup> Rao CG, Chianese D, Doyle GV, Miller MC et al. Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. *Int J Oncol* 2005;27(1):49-57. PMID 15942643
- <sup>272</sup> Willipinski-Stapelfeldt B, Riethdorf S, Assmann V, Woelfle U et al. Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2005;11(22):8006-8014. PMID 16299229

- <sup>273</sup> Hughes AD, Mattison J, Western LT, Powderly JD et al. Microtube Device for Selectin-Mediated Capture of Viable Circulating Tumor Cells from Blood. *Clinical Chemistry* 2012;58(5):846-853. PMID 22344286
- <sup>274</sup> Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, Becker S et al. Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells. *Breast Cancer Res* 2009;11(4):R59. PMID 19664291
- <sup>275</sup> Wu J, Chen Q and Lin JM. Microfluidic technologies in cell isolation and analysis for biomedical applications. *Analyst* 2016 Nov 30. [Epub ahead of print]. PMID 27900377
- <sup>276</sup> Ghazani AA, Castro CM, Gorbatov R, Lee H and Weissleder R. Sensitive and Direct Detection of Circulating Tumor Cells by Multimarker mu-Nuclear Magnetic Resonance. *Neoplasia* 2012;14 (5): 388-395. PMID 22745585
- <sup>277</sup> Obermayr E, Sanchez-Cabo F, Tea MK, Singer CF et al. Assessment of a six gene panel for the molecular detection of circulating tumor cells in the blood of female cancer patients. *BMC Cancer* 2010;10:666. PMID 21129172
- <sup>278</sup> Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004;10(20):6897-6904. PMID 15501967
- <sup>279</sup> Gasparri ML, Savone D, Besharat RA, Farooqi AA et al. Circulating tumor cells as trigger to hematogenous spreads and potential biomarkers to predict the prognosis in ovarian cancer. *Tumour Biol* 2016;37(1):71-75. PMID 26500096
- <sup>280</sup> Fehm T, Banys M, Rack B, Janni W et al. Pooled analysis of the prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2013;23(5):839-845. PMID 23694981
- <sup>281</sup> Wimberger P, Heubner M, Otterbach F, Fehm T et al. Influence of platinum-based chemotherapy on disseminated tumor cells in blood and bone marrow of patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2007; 107(2): 331-338. PMID 17764727
- <sup>282</sup> Marth C, Kistic J, Kaern J, trope C and Fodstad O. Circulating tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with ovarian carcinoma do not predict prognosis. *Cancer* 2002;94(3):707-712. PMID 11857303
- <sup>283</sup> Judson PL, Geller MA, Bliss RL, Boente MP et al. Preoperative detection of peripherally circulating cancer cells and its prognostic significance in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003;91(2):389-394. PMID 14599871
- <sup>284</sup> Cui L, Kwong J and Wang CC. Prognostic value of circulating tumor cells and disseminated tumor cells in patients with ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Ovarian Res* 2015;8:38. PMID 26077676
- <sup>285</sup> Zhou Y, Bian B, Yuan X, Xie G et al. Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One* 2015;10(6):e0130873. PMID 26098665
- <sup>286</sup> Van Berckelaer C, Brouwers AJ, Peeters DJE, Tjalma W et al. Current and future role of circulating tumor cells in patients with epithelial ovarian cancer. *Eur J Surg Oncol* 2016;42(12):1772-1779. PMID 27265041
- <sup>287</sup> Kolostova K, Pinkas M, Jakabova A, Pospisilova E et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in ovarian cancer. *Am J Cancer Res* 2016;6(5):973-980. PMID 27293992
- <sup>288</sup> Behbakht K, Sill MW, Darcy KM, Rubin SC et al. Phase II trial of the mTOR inhibitor, temsirolimus and evaluation of circulating tumor cells and tumor biomarkers in persistent and recurrent epithelial ovarian and primary peritoneal malignancies: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2011;123(1):19-26. PMID 21752435
- <sup>289</sup> Poveda A, Kaye SB, McCormack R, Wang S et al. Circulating tumor cells predict progression free survival and overall survival in patients with relapsed/recurrent advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2011;122(3):567-572. PMID 21664658
- <sup>290</sup> Liu JF, Kindelberger D, Doyle C, Lowe A et al. Predictive value of circulating tumor cells (CTCs) in newly-diagnosed and recurrent ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* 2013;131(2):352-356. PMID 23954902
- <sup>291</sup> Aktas B, Kasimir-Bauer S, Heubner M, Kimmig R and Wimberger P. Molecular profiling and prognostic relevance of circulating tumor cells in the blood of ovarian cancer patients at primary diagnosis and after platinum-based chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21(5):822-830. PMID 21613958

- <sup>292</sup> Kolostova K, Spicka J, Matkowski R and Bobek V. Isolation, primary culture, morphological and molecular characterization of circulating tumor cells in gynecological cancers. *Am J Transl Res* 2015;7(7):1203-1213. PMID 26328005
- <sup>293</sup> Kolostova K, Matkowski R, Jedryka M, Soter K et al. The added value of circulating tumor cells examination in ovarian cancer staging. *Am J Cancer Res* 2015;5(11):3363-3375. PMID 26807317
- <sup>294</sup> Pearl ML, Zhao Q, Yang J, Dong H et al. Prognostic analysis of invasive circulating tumor cells (iCTCs) in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2014;134(3):581-590. PMID 24972191
- <sup>295</sup> Fan T, Zhao Q, Chen JJ, Chen WT and Pearl ML. Clinical Significance of Circulating Tumor Cells detected by an invasion assay in peripheral blood of patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2009;112(1):185-191. PMID 18954898
- <sup>296</sup> Pearl ML, Dong H, Tulley S, Zhao et al. Treatment monitoring of patients with epithelial ovarian cancer using invasive circulating tumor cells (iCTCs). *Gynecol Oncol* 2015;137(2):229-238. PMID 25769657
- <sup>297</sup> Kuhlmann JD, Wimberger P, Bankfalvi A, Keller T et al. ERCC1-positive circulating tumor cells in the blood of ovarian cancer patients as a predictive biomarker for platinum resistance. *Clin Chem* 2014;60(10):1282-1289. PMID 25015375
- <sup>298</sup> Obermayr E, Castillo-Tong DC, Pils D, Speiser P et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in patients with ovarian cancer improves their prognostic significance – A study of the OVCAD consortium. *Gynecol Oncol* 2013;128(1):15-21. PMID 23017820
- <sup>299</sup> Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P and Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev* 2016;35(3):347-376. PMID 27392603
- <sup>300</sup> Diaz LA Jr and Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 2014;32(6):579-586. PMID 24449238
- <sup>301</sup> Schwarzenbach H, Hoon D and Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011;11(6):426-437. PMID 21562580
- <sup>302</sup> Li JZ and Steinman CR. Plasma DNA in systemic lupus erythematosus. Characterization of cloned base sequences. *Arthritis Rheum* 1989;32(6):726-733. PMID 2544184
- <sup>303</sup> Macher H, Egea-Guerrero JJ, Revuelto-Rey J, gordillo-Escobar E et al. Role of early cell-free DNA levels decrease as a predictive marker of fatal outcome after severe traumatic brain injury. *Clin Chim Acta* 2012;414:12-17. PMID 22902808
- <sup>304</sup> Atamaniuk J, Kopecky C, Skoupy S, Säemann MD and Weichhart T. Apoptotic cell-free DNA promotes inflammation in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27(3):902-905. PMID 22167588
- <sup>305</sup> Avriel A, Paryente Wiessman M, Almog Y, Perl Y et al. Admission cell free DNA levels predict 28-day mortality in patients with severe sepsis in intensive care. *PLoS One* 2014;9(6):e100514. PMID 24955978
- <sup>306</sup> Chang CP, Chia RH, Wu TL, Tsao KC et al. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 2003;327(1-2):95-101. PMID 12482623
- <sup>307</sup> Tsai NW, Lin TK, Chen SD, Chang WN et al. The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients with acute ischemic stroke. *Clin Chim Acta* 2011;412(5-6):476-479. PMID 21130757
- <sup>308</sup> Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350(9076):485-487. PMID 9274585
- <sup>309</sup> Tsui DW, Lam YM, Lee WS, Leung TY et al. Systematic identification of placental epigenetic signatures for the noninvasive prenatal detection of Edwards syndrome. *PLoS One* 2010;5(11):e15069. PMID 21152411
- <sup>310</sup> Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM and Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37(3):646-650. PMID 837366
- <sup>311</sup> Kamat AA, Bischoff FZ, Dang D, Baldwin MF et al. Circulating Cell-Free DNA. A novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2006;5(10):1369-1374. PMID 16969071
- <sup>312</sup> Jin D, Xie S, Mo Z, Liang Y, Guo B, et al. Circulating DNA-Important Biomarker of Cancer. *J Mol Biomarkers Diagn* 2012;S2:009. doi:10.4172/2155-9929.S2-009
- <sup>313</sup> Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008;14(9):985-990. PMID 18670422
- <sup>314</sup> Bartels CL and Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clin Chem* 2009;55(4):623-631. PMID 19246618
- <sup>315</sup> Nakamura K, Sawada K, Yoshimura A, Kinose Y et al. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in ovarian cancer. *Mol Cancer* 2016;15(1):48. PMID 27343009

- <sup>316</sup> Garcia V, Garcia JM, Peña C, Silva J et al. Free circulating mRNA in plasma from breast cancer patients and clinical outcome. *Cancer Lett* 2008;263(2):312-320. PMID 18280643
- <sup>317</sup> Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(10):1721-1726. PMID 20194856
- <sup>318</sup> Boac BM, Xiong Y, Marchion DC, Abbasi F et al. Micro-RNAs associated with the evolution of ovarian cancer cisplatin resistance. *Gynecol Oncol* 2016;140(2):259-263. PMID 26731723
- <sup>319</sup> Ward TH, Cummings J, Dean E, Greystoke A et al. Biomarkers of apoptosis. *Br J Cancer* 2008;99(6):841-846. PMID 19238626
- <sup>320</sup> Leung SF, Zee B, Ma BB, Hui EP et al. Plasma Epstein-Barr viral deoxyribonucleic acid quantitation complements tumor-node-metastasis staging prognostication in nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24(34):5414-5418. PMID 17135642
- <sup>321</sup> Brock G, Castellanos-Rizaldos E, Hu Lan, Coticchia C and Skog J. Liquid biopsy for cancer screening, patient stratification and monitoring. *Transl Cancer Res* 2015;4(3):280-290. doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2015.06.05
- <sup>322</sup> Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001;61(4):1659-1665. PMID 11245480
- <sup>323</sup> Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F and Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10(8):472-478. PMID 23836314
- <sup>324</sup> Mouliere F, Robert B, Arnau-Peyrotte E, Del Rio M et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One* 2011;6(9):e23418. PMID 21909401
- <sup>325</sup> Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A and Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 2001;313(1-2):139-142. PMID 11694251
- <sup>326</sup> Elshimali YI, Khaddour H, Sarkissyan M, Wu Y and Vadgama JV. The clinical utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer patients. *Int J Mol Sci* 2013;14(9):18925-18958. PMID 24065096
- <sup>327</sup> Korabecna M, Opatma S, wirth J, Rulcova K et al. Cell-free plasma DNA during peritoneal dialysis and hemodialysis and in patients with chronic kidney disease. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1137:296-301. PMID 18837963
- <sup>328</sup> Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin chem* 2006;52(6):1062-1069. PMID 16723681
- <sup>329</sup> Gu Z, Wang H, Nekrutenko A and Li WH. Densities, length proportions, and other distributional features of repetitive sequences in the human genome estimated from 430 megabases of genomic sequence. *Gene* 2000;259(1-2):81-88. PMID 11163965
- <sup>330</sup> Cree IA, Deans Z, Ligtenberg MJ, Normanno N et al. Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. *J Clin Pathol* 2014;67(11):923-931. PMID 25012948
- <sup>331</sup> Herrera LJ, Raja S, Gooding WE, El-Hefnawy T et al. Quantitative analysis of circulating plasma DNA as a tumor marker in thoracic malignancies. *Clin Chem* 2005;51(1):113-118. PMID 15539466
- <sup>332</sup> El-Gayar D, El-Abd N, Hassan N and Ali R. Increased Free Circulating DNA Integrity Index as a Serum Biomarker in Patients with Colorectal Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016;17(3):939-944. PMID 27039817
- <sup>333</sup> Delgado PO, Alves BC, Gehrke Fde S Kuniyoshi RK et al. Characterization of cell-free circulating DNA in plasma in patients with prostate cancer. *Tumour Biol* 2013;34(2):983-986. PMID 23269609
- <sup>334</sup> Fawzy A, Sweify KM, El-Fayoumy HM and Nofal N. Quantitative analysis of plasma cell-free DNA and its DNA integrity in patients with metastatic prostate cancer using ALU sequence. *J Egypt Natl Canc Inst* 2016;28(4):235-242. PMID 27634416
- <sup>335</sup> Schwarzenbach H, Stoehlmacher J, Pantel K and Goekkurt E. Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1137:190-196. PMID 18837946
- <sup>336</sup> Park JO, Kim HJ, Choi BY, Lee HC et al. Quantitative analysis of cell-free DNA in the plasma of gastric cancer patients. *Oncol Lett* 2012;3(4):921-926. PMID 22741019
- <sup>337</sup> Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(21):3902-3908. PMID 14507943

- <sup>338</sup> Hashad D, Sorour A, Ghazal A and Tallat I. Free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *J Clin Lab anal* 2012;26(6):467-472. PMID 23143630
- <sup>339</sup> Salvianti F, Pinzani P, Verderio P, Ciniselli CM et al. Multiparametric analysis of cell-free DNA in melanoma patients. *PLoS One* 2012;7(11):e49843. PMID 23209607
- <sup>340</sup> Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F et al. Prediction of Breast Tumor Progression by Integrity of Free Circulating DNA in Serum. *J Clin Oncol* 2006;24(26):4270-4276. PMID 16963729
- <sup>341</sup> Schwarzenbach H, Aliz-Panabières C, Müller I, Letang N et al. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15(3):1032-1038. PMID 19188176
- <sup>342</sup> Wimberger P, Roth C, Pantel K, Kasimir-Bauer S et al. Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 2011;128(11):2572-2580. PMID 20715113
- <sup>343</sup> No JH, Kim K, Park KH and Kim YB. Cell-free DNA level as a prognostic biomarker for epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res* 2012;32(8):3467-3471. PMID 22843932
- <sup>344</sup> Kamat AA, Sood AK, Dang D, Gershenson DM et al. Quantification of total plasma cell-free DNA in ovarian cancer using real-time PCR. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:230-234. PMID 17108216
- <sup>345</sup> Zachariah RR, Schmid S, Buerki N, Radpour R et al. Levels of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA in benign and malignant ovarian tumors. *Obstet Gynecol* 2008;112(4):843-850. PMID 18827127
- <sup>346</sup> Capizzi E, Gabusi E, Grigioni AD, De Laco P et al. Quantification of free plasma DNA before and after chemotherapy in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Diagn Mol Pathol* 2008;17(1):34-38. PMID 18303408
- <sup>347</sup> Steffensen KD, Madsen CV, Andersen RF, Waldstrom M et al. Prognostic importance of cell-free DNA in chemotherapy resistant ovarian cancer treated with bevacizumab. *Eur J Cancer* 2014;50(15):2611-2618. PMID 25087181
- <sup>348</sup> Schilder RJ, Brady WE, Lankes HA, Fiorica JV et al. Phase II evaluation of dasatinib in the treatment of recurrent or persistent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol oncol* 2012; 127 (1): 70-74. PMID 22710075
- <sup>349</sup> Kamat AA, Baldwin M, Urbauer D, Dang D et al. Plasma cell-free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker. *Cancer* 2010;116(8):1918-1925. PMID 20166213
- <sup>350</sup> Zhou Q, Li W, Leng B, Zheng W et al. Circulating Cell Free DNA as the Diagnostic Marker for Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS* 2016;11(6):e0155495. PMID 27253331
- <sup>351</sup> Cascales-Campos P, Gil J and Parrilla P. Morbidity and mortality outcomes of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with primary and recurrent advanced ovarian cancer. *Eur J Surg Oncol* 2014; 40(8):970-975. PMID 24035502
- <sup>352</sup> Hao TB, Shi W, Shen XJ, Qi J et al. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2014;111(8):1482-9. PMID 25157833
- <sup>353</sup> Klar M, Hasenburg A, Hasanov M, Hilpert F et al. Prognostic factors in young ovarian cancer patients: An analysis of four prospective phase III intergroup trials of the AGO Study Group, GINECO and NSGO. *Eur J Cancer*. 2016 Aug;66:114-124. PMID 27561452
- <sup>354</sup> Organización Mundial de la Salud [Internet] [citado el 19 marzo de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- <sup>355</sup> Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad [Internet]. Madrid: 2011 [citado 14 abril 2017]. Disponible en: [https://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuestaNac2011/2DeterminantesSalud\\_DistribucionPorcentual.pdf](https://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuestaNac2011/2DeterminantesSalud_DistribucionPorcentual.pdf)
- <sup>356</sup> Van Meurs HS, Tajik P, Hof MH, vergote I et al. Which patients benefit most from primary surgery or neoadjuvant chemotherapy in stage IIIC or IV ovarian cancer? An exploratory analysis of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer 55971 randomised trial. *Eur J Cancer* 2013;49(15):3191-3201. PMID 23850170
- <sup>357</sup> Aletti GD, Gostout BS, Podratz KC and Cliby WA. Ovarian cancer surgical resectability: relative impact of disease, patient status, and surgeon. *Gynecol Oncol*. 2006;100(1):33. PMID 16153692
- <sup>358</sup> Sugarbaker PH. Successful management of microscopic residual disease in large bowel cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;43 Suppl:S15-25. PMID 10357554

- <sup>359</sup> Hoskins WJ, Bundy BN, Thigpen JT and Omura GA. The influence of cytoreductive surgery on recurrence-free interval and survival in small-volume stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 1992;47(2):159. PMID 1468693
- <sup>360</sup> Simbolo M, Gottardi M, Corbo V, Fassan M et al. DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples. *PLoS ONE* 2013;8(6):e62692. PMID 23762227
- <sup>361</sup> Pucciarelli S, Enzo M, Agostini M, Pizzini S et al. Cell-free circulating DNA as a promising marker of colorectal cancer detection and progression. Abstract 11059. *J Clin Oncol* 2009;27:no.15S:11059-11059. DOI: 10.1200/jco.2009.27.15s.11059
- <sup>362</sup> Molina R, Escudero JM, Augé JM, Filella X et al. HE4 a novel tumour marker for ovarian cancer: comparison with CA 125 and ROMA algorithm in patients with gynaecological diseases. *Tumour Biol* 2011;32(6):1087-1095. PMID 21863264
- <sup>363</sup> Vallius T, Hynninen J, Auranen A, Matomäki J et al. Postoperative human epididymis protein 4 predicts primary therapy outcome in advanced epithelial ovarian cancer. *Tumour Biol* 2017;39(2):1010428317691189. PMID 28218038
- <sup>364</sup> Cerda C, Sanchez C, Clinet B, Vazquez A et al. Oxidative stress and DNA damage in obesity-related tumorigenesis. *Adv Exp Med Biol* 2014;824:5-17. PMID 25038989
- <sup>365</sup> Ale A, Zhang Y, Han C and Cai D. Obesity-associated extracellular mtDNA activates central TGFβ pathway to cause blood pressure increase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2017;312(3):E161-E174. PMID 27894066
- <sup>366</sup> Swisher EM, Wollan M, Mahtani SM, Willner JB et al. Tumor-specific p53 sequences in blood and peritoneal fluid of women with epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193(3 Pt 1):662-667. PMID 16150257.
- <sup>367</sup> Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H et al. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* 2013;368(13):1199-1209. PMID 23484797
- <sup>368</sup> Angioli R, Capriglione S, Aloisi A, Guzzo F et al. Can HE4 predict platinum response during first-line chemotherapy in ovarian cancer? *Tumour Biol* 2014;35(7):7009-7015. PMID 24748235
- <sup>369</sup> Shen Y and Li I. Serum HE4 superior to CA125 in predicting poorer surgical outcome of epithelial ovarian cancer. *Tumour Biol* 2016;37(11):14765-14772. PMID 27629144
- <sup>370</sup> Plotti F, Scaletta G, Capriglione S, Montera R et al. The Role of HE4, a Novel Biomarker, in Predicting Optimal Cytoreduction After Neoadjuvant Chemotherapy in Advanced Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2017 Apr 13 [Epub ahead of print]. PMID 28406844
- <sup>371</sup> Low RN, Barone RM and Lucero J. Comparison of MRI and CT for predicting the Peritoneal Cancer Index (PCI) preoperatively in patients being considered for cytoreductive surgical procedures. *Ann Surg Oncol* 2015;22(5):1708-1715. PMID 25201499
- <sup>372</sup> Lopez-Lopez V, Cascales-Campos PA, Gil J, Frutos L et al. Use of (18)F-FDG PET/CT in the preoperative evaluation of patients diagnosed with peritoneal carcinomatosis of ovarian origin, candidates to cytoreduction and hipec. A pending issue. *Eur J Radiol* 2016;85(10):1824-1828. PMID 27666623
- <sup>373</sup> Genova C, Truini A, Rijavec E, Barletta G et al. The role of circulating free DNA (cfDNA) and circulating tumor cells (CTC) in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients receiving platinum-based chemotherapy (CHT). *Journal of Clinical Oncology* 33, no. 15\_suppl, abstract e19090. DOI: 10.1200/jco.2015.33.15\_suppl.e19090
- <sup>374</sup> Iqbal S, Vishnubhatla S, Raina V, Sharma S et al. Circulating cell-free DNA and its integrity as a prognostic marker for breast cancer. *Springerplus* 2015;4:265. PMID 26090312.
- <sup>375</sup> Zivanovic O, Sima CS, Iasonos A, Bell-McGuinn KM et al. Exploratory analysis of serum CA-125 response to surgery and the risk of relapse in patients with FIGO stage IIIC ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2009;115(2):209214. PMID 19664812.
- <sup>376</sup> Vallius T, Hynninen J, Auranen A, Carpen O et al. Serum HE4 and CA125 as predictors of response and outcome during neoadjuvant chemotherapy of advanced high-grade serous ovarian cancer. *Tumour Biol* 2014;35(12):12389-12395. PMID 25190018