




Universitat Autònoma de Barcelona

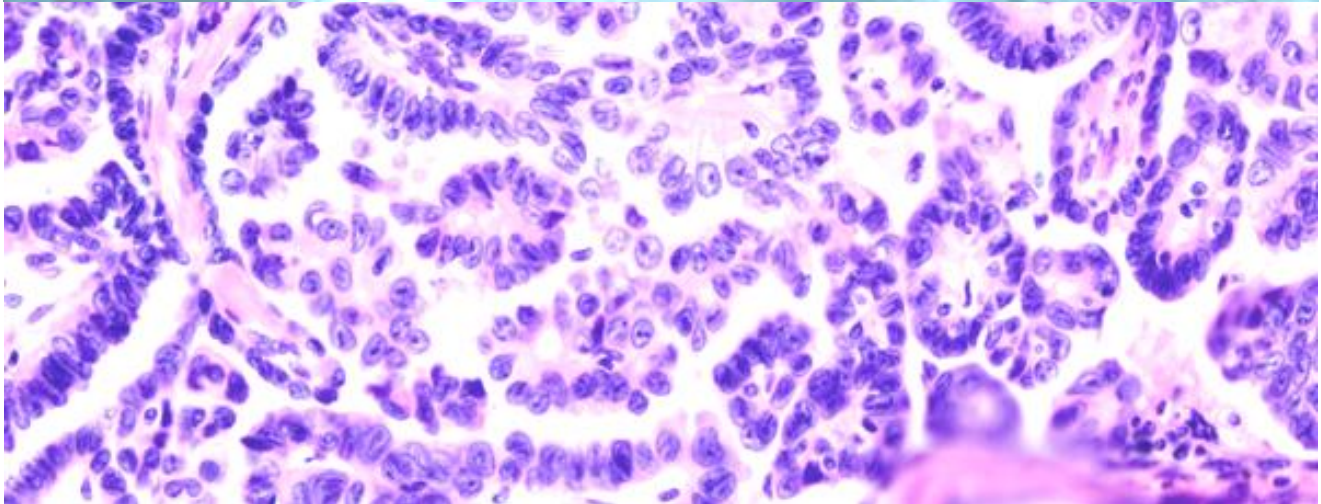
ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**NUEVAS MOLÉCULAS ASOCIADAS AL CÁNCER
DE OVARIO PARA LA MEJORA DE SU
DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO**



Lucia Lanau Angulo





NUEVAS MOLÉCULAS ASOCIADAS AL CÁNCER DE OVARIO PARA LA MEJORA DE SU DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

Tesis doctoral presentada por

Lucia Lanau Angulo

Para obtener el título de

Doctora por la *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB)

Tesis doctoral realizada en el *Grupo de Cáncer de ovario y Ciclo celular* de la *Unidad de Investigación Biomédica en Ginecología*, Vall Hebron Institut de Recerca, bajo la supervisión de los Dres.

Jaume Reventós Puigjaner, Marina Rigau Resina y Anna Santamaria Margalef

Programa de Doctorado en Biología Celular, *Universitat Autònoma de Barcelona*, Facultad de Medicina, *Departamento de Biología celular, Fisiología e Inmunología*, bajo la supervisión de la Dra.

Rosa Miró Ametller

Universitat Autònoma de Barcelona, 2017

Dr. Jaume Reventós Puigjaner Dra. Marina Rigau Resina Dra. Anna Santamaria Margalef

Dra. Rosa Miró Ametller

Lucia Lanau Angulo

AGRADECIMIENTOS

Sembla que fos ahir quan entrava al laboratori disposada a començar una nova etapa plena d'il·lusió i curiositat..., i bé, el temps passa volant. La tesi ja ha acabat, i amb ella queden molts moments i persones que mai oblidaré. Després d'aquests anys a Vall d'Hebron, em quedo amb el més important: l'experiència i les persones que m'han ajudat d'una manera o altra al llarg de tot aquest camí.

Vull donar les gràcies profundament als meus directors de tesi, el Dr. Jaume Reventós, la Dra. Marina Rigau i la Dra. Anna Santamaria. Al Jaume, per haver-me donat l'oportunitat d'estar al laboratori i confiar en la meua aptitud per desenvolupar la tesi. A la Marina, pels seus consells i la seva guia, per donar-me seguretat, per continuar els meus passos en la distància i pel seu interès en què les coses vagin a bon port. A l'Anna, per haver-me acollit en el grup, per haver-me ensenyat la seva recerca, per la seva guia, per haver-me ajudat quan les coses es torcien i per la confiança que ha dipositat en mi. Així mateix, també vull agrair al Dr. Antonio Gil, per la seva responsabilitat i el seu interès en què la recerca biomèdica arribi a la clínica; al Dr. Josep Castellví, al Dr. Jose Luis Sánchez i a la Dra. Assumpció Pérez per la seva col·laboració en el projecte; i, al Dr. Pep Roma i al Dr. Miquel Segura, per les seves recomanacions al llarg del doctorat.

Als compis de laboratori; sense dubte, res hauria estat el mateix sense vosaltres. Al Gabriel, per la seva simpatia, les seves bromes, la seva paciència i la seva ajuda. A la Núria, pel seu somriure, la seva alegria i empatia. A la Blanca, per haver-me ensenyat els primers passos en la recerca del càncer d'ovari, pels seus consells i el seu optimisme. A l'Alfonso, per la seva amistat, per animar-me en els mals moments, per la seva proximitat, per la seva empatia i pels riures que ens hem pegat junts. A la Laura, pel seu somriure, la seva ajuda i predisposició. A l'Eva, per la guia que m'ha donat en l'etapa inicial i el seu optimisme. Al Cristian, per la seva simpatia i per donar aire fresc al laboratori. A la Júlia, per l'alegria que transmet, pel seu optimisme, pels seus ànims i la seva espontaneïtat. A l'Eli, per estar allí sempre que la necessitem, per fer "de tot" al lab, per la seva ajuda i per fer-nos de psicòloga particular quan ho necessitàvem. A la Mireia, pel primer pipeteig al seu costat, pels seus consells i el seu positivisme. A la Tati, "Finner", hem connectat des del primer dia; pels nostres riures, per tots els moments bons que hem viscut i viurem, per la nostra amistat. A la Berti, per la nostra amistat des que vas arribar al laboratori, pel carinyo que ens tenim, per estar sempre al meu costat, en els bons i mals moments, perquè és la meua nena. A la Helen, "Eustaquieta", pels riures i festes que ens hem pegat, per les tardes de compres i de platja, per la seva empatia, per la seva amistat. A la Irene, "=p", per la nostra fusió com a Bola de Drac, perquè encaixem, perquè ens entenem, pels bons moments a la piscina, dinars, sopars, escapades, pel nostre paper, per l'amistat que ens uneix. A la Tamarinda, per haver-me resolt mil dubtes en els inicis, per les nostres quedades i les nostres rialles. A la Iolanda, per transmetre bon ambient al laboratori i per la seva proximitat. A la Marta, per haver apostat per mi i fer-me un lloc al laboratori. A la Núria Pedrola i la Marta Garcia, per haver-me fet sentir com una més dins el grup.

A les meves compis de pis; a la Xexe, per la seva alegria, per les nostres riallades sopant, pel silenci compartit al aixecar-nos zombis, per haver aguantat els mesos d'escriptura i pel seu to de mami donant-me canya per avançar. A la Claudi, per la seva empatia en el món del doctorat, pels nostres riures, per la nostra manera de pensar, pels consells mutus, per estar en els bons i mals moments. I a la Fran, per transmetre'm positivisme, ganes de viure, bon ambient, familiaritat i somriures. Ha estat un plaer compartir la vida dia a dia amb vosaltres. Sou unes cracs!

Als pontarrins, els meus Boks. Per una colla com cap altra, per l'amistat, per tots els moments que passem junts, per les nostres rialles, per la desconnexió conjunta, per recordar-me que la vida no és només treballar... El vostre anell no me'l trec mai. Agraieixo especialment a Tixer, per la seva amistat eterna des de P-3, per haver compartit tot tipus d'experiències, per estar sempre al meu costat ja sigui físicament o a distància, per les nostres trucades telefòniques, per les nostres confidències, pels nostres secrets, per la seguretat que em transmet; ets un amic per tota la vida. A Montsi, per les nostres converses, les nostres rialles, l'empatia mútua amb el que fem, per estar sempre que la necessito. A la Mònica, per estar sempre present, pels seus ànims i consells, per transmetre'm la seva fortalesa, per haver fet de celestina aquella dia en la Festa de la Xirella, perquè et considero part de la família. A la Èlia i la Yoli, pels sopars setmanals que compartim, per les nostres rialles. A l'Anna ("Pijipi"), per tots els moments que hem viscut, perquè sé que allà sempre tindrà una amiga. A l'Albix ("Mogollón"), per les rialles a Anglès, pels sopars i festes que hem viscut, per estar en bons i mals moments, per la nostra complicitat. A l'Alba Saura, pel seu somriure, els nostres cafès, les nostres confidències, per mantenir l'amistat des que érem unes cries.

Als meus Biotecs! Raúl, Nekane, Adrià, Tamara, Toni, Pous i Solé. Pels nostres Room escapes, pels nostres sopars, les nostres birres, per les festes que ens hem pegat, per la desconnexió i l'empatia, per seguir sent amics després d'acabar la carrera i compartir les sensacions del doctorat. Gràcies especialment al Solé, per estar a prop quan l'he necessitat, pel bon rotllo que transmet, per les nostres confidències, per la nostra amistat. Als Biotecs madrilenys, Ivan, Quique i Belén! Se us ha trobat a faltar a Barcelona, però el contacte no es perd encara que passin els anys ;) Als Biotecs de Lleida, Marialbi! Pel nostre viatge a Menorca, per les nostres rialles, les nostres xerrades, les festes, la piscina a 40°C, l'incendi... per la nostra amistat a distància. I com no, al David, pel seu optimisme, la seva simpatia i el seu enviament de papers sempre que els necessitava!

Vull donar les gràcies finalment a les persones més importants, LA MEVA FAMÍLIA: Papa, Mama i Fani. Gràcies per estar sempre al meu costat, per guiar-me pel bon camí, per les vostres paraules, per mimar-me, cuidar-me i animar-me en els mals moments. Tot el que tinc i la persona que sóc és gràcies a vosaltres. Tot us ho dec a vosaltres. Us estimo moltíssim, sou el meu tresor. També vull agrair al Sergio, pels seus consells i els seus ànims; és un plaer que formis part de la família. A la Mari, l'Antonio i el Javi, per haver-me rebut en la família amb tant carinyo des del primer dia, per mimar-me a distància i per fer-me sentir bé en tot moment.

Finalment, agraeixo infinitament a l'Antonio tot el que ha fet i fa per mi. "Gracias por hacerme sentir bien, por todos los buenos momentos que hemos compartido y compartiremos, por ser mi cómplice, por tu empatía, por levantarme cuando me caía, por haber aguantado las frustraciones y la escritura des de lo más cerca, por mimarme, por compartir la vida juntos, por ser mi compañero de vida, por quererme como lo haces, porque eres lo más grande. Te quiero. A ti y a mi familia os dedico esta tesis doctoral".

“Haz lo que puedas, con lo que tengas, estés donde estés”

Theodore Roosevelt

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	15
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. El ovario.....	23
1.1.1. El ovario, órgano sexual femenino.....	23
1.1.2. Desarrollo embrionario, ciclo ovárico y regulación hormonal	24
1.2. Cáncer de ovario	25
1.2.1. Epidemiología del cáncer de ovario	25
1.2.2. Carcinogénesis ovárica	27
1.2.2.1. Teorías tradicionales de la carcinogénesis ovárica	28
1.2.2.2. Teoría dualista.....	29
1.2.3. Factores de riesgo y factores de protección asociados al cáncer de ovario	30
1.2.4. Factores pronóstico del cáncer de ovario	31
1.2.5. Clasificación del cáncer de ovario.....	34
1.2.5.1. Clasificación de los tumores de ovario.....	34
1.2.5.2. El cáncer de ovario epitelial	35
1.2.6. Presentación clínica del cáncer de ovario	40
1.2.7. Diagnóstico del cáncer de ovario	40
1.2.7.1. Mejora del diagnóstico del cáncer de ovario.....	41
1.2.7.2. Exosomas del aspirado uterino como fuente de biomarcadores de cáncer de ovario.....	42
1.2.7.2.1. Exosomas.....	43
1.2.7.2.1.1. Tipos de vesículas extracelulares y definición actual de exosoma	43
1.2.7.2.1.2. Biogénesis de los exosomas.....	46
1.2.7.2.1.3. Secreción de los exosomas al medio extracelular.....	47
1.2.7.2.1.4. Recepción de los exosomas en la célula receptora	48
1.2.7.2.1.5. Composición de los exosomas	49
1.2.7.2.1.6. Aislamiento de los exosomas.....	52
1.2.7.2.1.7. Caracterización de los exosomas	56
1.2.7.2.1.7.1. Marcadores moleculares.....	57

1.2.7.2.1.7.2. Morfología	57
1.2.7.2.1.7.3. Tamaño	57
1.2.7.2.1.8. Funciones de los exosomas.....	59
1.2.7.2.1.8.1. Funciones de los exosomas en el cáncer	60
1.2.7.2.1.9. Aplicaciones clínicas de los exosomas	61
1.2.8. Bases moleculares del cáncer de ovario	64
1.2.9. Tratamiento del cáncer de ovario.....	69
1.2.10. Diseminación del cáncer de ovario	73
2. OBJETIVOS	79
2.1. SECCIÓN I: Optimización del procedimiento de aislamiento de exosomas presentes en el aspirado uterino para la futura identificación de nuevos marcadores asociados al cáncer de ovario	81
2.1.1. Antecedentes	81
2.1.2. Objetivo general	81
2.1.2.1. Objetivos específicos	81
2.2. SECCIÓN II: Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para bloquear la diseminación del cáncer de ovario	82
2.2.1. Antecedentes	82
2.2.2. Objetivo general	82
2.2.2.1. Objetivos específicos	82
3. MATERIALES Y MÉTODOS	83
3.1. SECCIÓN I: Optimización del procedimiento de aislamiento de exosomas presentes en el aspirado uterino para la futura identificación de nuevos marcadores asociados al cáncer de ovario	85
3.1.1. Pacientes incluidas en el estudio	85
3.1.2. Recogida y procesamiento de aspirado uterino.....	86
3.1.3. Aislamiento de exosomas	86
3.1.4. Análisis del tamaño y de la concentración de exosomas	87
3.1.5. Microscopía electrónica	87
3.1.6. Extracción de proteína	88
3.1.7. Inmunoblot.....	88
3.1.8. Extracción de ARN total	88

3.1.9. Transcripción reversa, pre-amplificación y RT-qPCR	89
3.1.10. Análisis estadístico	89
3.2. SECCIÓN II: Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para bloquear la diseminación del cáncer de ovario	90
3.2.1. Pacientes incluidas en el estudio	90
3.2.2. Recogida y procesamiento de tejido	96
3.2.3. Recogida y procesamiento de sangre.....	96
3.2.4. Aislamiento de ARN	96
3.2.5. Análisis de <i>microarray</i>	96
3.2.6. Análisis de vías de señalización	97
3.2.7. Base de datos CSIOVDB	97
3.2.8. Transcripción reversa y RT-qPCR	98
3.2.9. Inmunohistoquímica	98
3.2.10. Extracción de proteína	98
3.2.11. Inmunoblot.....	99
3.2.12. Análisis estadístico.....	99
4. RESULTADOS	101
4.1. SECCIÓN I: Optimización del procedimiento de aislamiento de exosomas presentes en el aspirado uterino para la futura identificación de nuevos marcadores asociados al cáncer de ovario	103
4.1.1. Optimización del procedimiento de aislamiento de exosomas a partir de aspirado uterino.....	103
4.1.2. Optimización del procedimiento de aislamiento de exosomas a partir de aspirado uterino para la posterior extracción de ARN	108
4.2. SECCIÓN II: Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para bloquear la diseminación del cáncer de ovario	116
4.2.1. Análisis de <i>microarray</i>	116
4.2.2. Análisis de vías de señalización	122
4.2.3. Selección de genes sobre-expresados en metástasis respecto a tumores primarios de ovario.....	124
4.2.4. Fase de validación a nivel de ARN mediante análisis de RT-qPCR	127
4.2.5. Fase de validación a nivel de proteína mediante IHQ	130
4.2.6. Presencia de FABP4 y MMP11 en plasma de pacientes con cáncer de ovario.....	137

5. DISCUSIÓN.....	139
5.1. SECCIÓN I: Optimización del procedimiento de aislamiento de exosomas presentes en el aspirado uterino para la futura identificación de nuevos marcadores asociados al cáncer de ovario	141
5.2. SECCIÓN II: Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para bloquear la diseminación del cáncer de ovario	153
6. CONCLUSIONES.....	167
7. ANEXO	171
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	187

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADNmt – ADN mitocondrial

AINEs – Antiinflamatorios no esteroideos

AJCC – *American Joint Committee on Cancer* (Comité colectivo americano del cáncer)

ARNi – ARN de interferencia

ARNm – ARN mensajero

ARNr – ARN ribosomal

ARNt – ARN de transferencia

ATX – Autotaxina fosfodiesterasa

AU – Aspirado uterino

BCL2L11 – *B-cell lymphoma 2 like 11* (Proteína 11 similar a la proteína 2 de células B de linfoma)

BHLHE40 – *Basic helix-loop-helix family member e40* (Miembro e40 de la familia de hélix-loop-hélix básico)

BMPs – *Bone morphogenetic proteins* (Proteínas morfogenéticas de los huesos)

CA125 – *Cancer antigen 125* (Antígeno de cáncer 125 o Antígeno carbohidrato 125)

cADN – ADN complementario

CIE – Carcinoma intraepitelial del endometrio

CO – Cáncer de ovario

CSCs – *Cancer stem cells* (Células madre cancerosas)

dMVBs – *Multivesicular bodies for degradation* (Cuerpos multivesiculares destinados a la degradación)

dNTPs – Desoxirribonucleótidos

EBV – Virus Epstein-Barr

ECM – *Extracellular matrix* (Matriz extracelular)

ESCRT – *Endosomal sorting complex required for transport* (Complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte)

EUROCARE-5 – *European cancer registry study of survival and care of cancer patients 5*

EVs – *Exosome-like vesicles* (Vesículas semejantes a los exosomas)

FABP4 – *Fatty acid binding protein 4* (Proteína de unión de ácidos grasos 4)

FABPs – *Fatty acid binding proteins* (Proteínas de unión a ácidos grasos)

FC – *Fold change* (Cambio de expresión)

FDA – *Food and Drug Administration* (Administración de alimentación y medicamentos)

FIGO – *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia)

FR – Receptor folato

FS – Fracción Soluble

- FSH** – Hormona folículoestimulante
- GnRH** – Hormona liberadora de gonadotropina
- GREM1** – *Gremlin 1, DAN family BMP antagonist* (Gremlin 1)
- HGSOC** – *High-grade serous ovarian carcinoma* (Cáncer de ovario seroso de alto grado)
- HRP** – *Horseadish peroxidase* (Peroxidasa de rábano picante)
- HSPs** – *Heat shock proteins* (Proteínas de choque térmico)
- IHQ** – Inmunohistoquímica
- IL-6** – Interleucina-6
- IL-8** – Interleucina-8
- ILVs** – *Intraluminal vesicles* (Vesículas intraluminales)
- IMC** – Índice de masa corporal
- INHBA** – *Inhibin beta A* (Subunidad beta A de inhibina)
- IPA** – *Ingenuity Pathway Analysis*
- ISEV** – *International Society for Extracellular Vesicles* (Sociedad Internacional para las Vesículas Extracelulares)
- KO** – *Knockout* (Knockout)
- LBPA** – Ácido lisobisfosfatídico
- LH** – Hormona luteinizante
- LPA** – Ácido lisofosfatídico
- M** – Metástasis de cáncer de ovario
- miARN** – microARN
- MMPs** – *Matrix metalloproteinases* (Metaloproteinasas de matriz)
- MMP11** – *Matrix metalloproteinase 11* (Metaloproteinasa de matriz 11)
- MVBs** – *Multivesicular bodies* (Cuerpos multivesiculares)
- MVEs** – *Multivesicular endosomes* (Endosomas multivesiculares)
- MVs** – Microvesículas
- MXRA5** – *Matrix-remodelling associated 5* (Proteína asociada a la remodelación de matriz 5)
- NK** – *Natural Killer*
- NTA** – *Nanoparticle Tracking Analysis* (Análisis de seguimiento de nanopartículas)
- o/n** – *overnight* (durante la noche)
- OMS** – Organización Mundial de la Salud
- PARP** – Poli (ADP-ribosa) polimerasa
- PBS** – *Phosphate buffered saline* (Tampón fosfato salino)
- PCR** – Reacción en cadena de la polimerasa
- PEG** – Polietilenglicol
- PGR** – Receptor de progesterona

- PI3K** – Fosfatidilinositol-3-cinasa
- PLPs** – Proteínas proteolípicas
- PLVAP** – *Plasmalemma vesicle associated protein* (Proteína asociada a vesículas del plasmalema)
- PXDN** – *Peroxidasin* (Peroxidasina)
- RIN** – *RNA Integrity Number* (Índice de integridad del ARN)
- RMA** – *Robust Multi-array Average*
- RNF152** – *Ring finger protein 152* (Proteína de dedo de anillo 152)
- ROMA** – *Risk of ovarian malignancy algorithm* (Algoritmo de riesgo de malignidad ovárica)
- ROS** – *Reactive oxygen species* (Especies reactivas de oxígeno)
- RT-qPCR** – *Real time quantitative PCR* (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real)
- SDS-PAGE** – *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)
- sMVBs** – *Multivesicular bodies for secretion* (Cuerpos multivesiculares destinados a la secreción)
- SN** – Sobrenadante
- SNARE** – *Soluble NSF attachment protein receptor* (Receptor de la proteína de unión al NSF soluble)
- SPSS** – *Statistical Package for Social Science*
- STIC** – *Serous tubal intraepithelial carcinoma*
- T** – Tumor primario de ovario
- TA** – Temperatura ambiente
- TEM** – Transición epitelio-mesénquima
- TF** – Factor de tejido
- TfR** – Receptor de la transferrina
- TGF-β** – *Transforming growth factor beta* (Factor de crecimiento transformante β)
- TME** – Transición mesénquima-epitelio
- TNM** – Tumor, Nódulo linfático, Metástasis
- TRPS** – *Tunable Resistive Pulse Sensing* (Sensor de pulso resistivo sintonizable)
- UICC** – *Union Internationale Contre le Cancer* (Unión Internacional contra el Cáncer)
- VEGF** – *Vascular endothelial growth factor* (Factor de crecimiento endotelial vascular)
- VEGFR** – *Vascular endothelial growth factor receptor* (Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular)
- Vs** – *Versus*

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El ovario

1.1.1. El ovario, órgano sexual femenino

Los ovarios (gónadas femeninas) son los órganos sexuales femeninos. Los ovarios de una mujer sexualmente madura miden de 2,5 a 5 cm de largo, de 1,5 a 3 cm de ancho y de 0,7 a 1,5 cm de espesor, con un peso aproximado de 4 a 8 g. Los ovarios quedan situados cerca de la pared peritoneal, a lado y lado del útero en la pelvis menor, y se encuentran suspendidos por el mesovario, el ligamento suspensorio del ovario (ligamento infundíbulo-pélvico) y los ligamentos ováricos (Figura 1) (1,2).

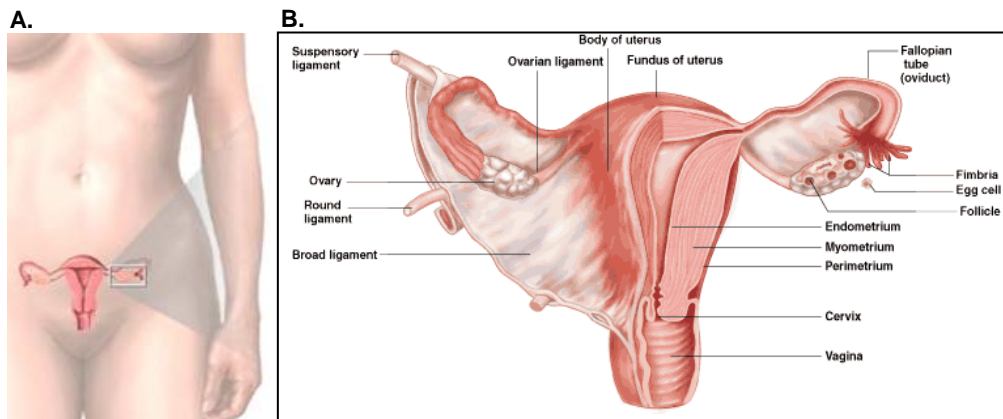


Figura 1. Aparato reproductor femenino. A. Localización de los ovarios. B. Esquema del aparato reproductor femenino. Imagen adaptada de Ref. (1).

El ovario está formado por el epitelio ovárico, la túnica albugínea, la corteza y la médula. El epitelio ovárico (mesovario o superficie epitelial ovárica) es una capa de células cuboides que recubren el ovario. La túnica albugínea es una capa de tejido conjuntivo fibroso y denso con células fusiformes. La corteza está compuesta por el estroma, con múltiples vasos y folículos ováricos, dentro de los cuales se encuentran los oocitos en distintas etapas de maduración. Por último, la médula es la zona más interna del ovario; está formada por tejido conectivo fibroelástico laxo y contiene múltiples vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios (1,2). En el ovario se encuentran los siguientes tipos celulares: las células epiteliales (recubren el ovario); las células estromales (dan soporte estructural al ovario y producen hormonas sexuales femeninas); y las células germinales (células que se desarrollarán hasta oocitos maduros). Cada folículo ovárico está compuesto por un único oocito rodeado de células somáticas (células de la granulosa y células de la teca) (Figura 2) (1,3).

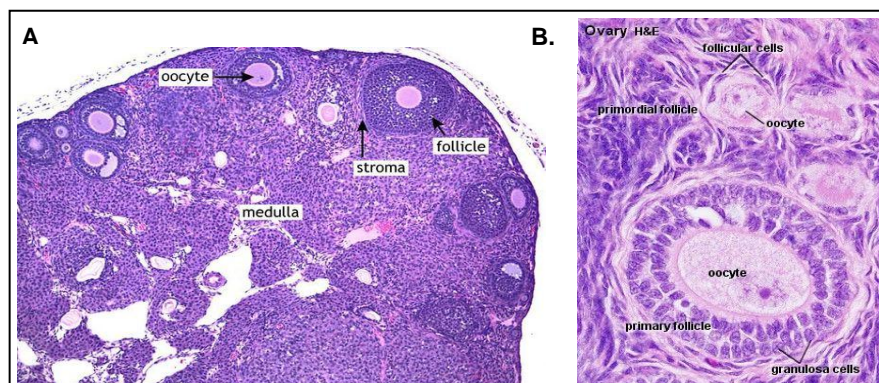


Figura 2. Histología del ovario. Se visualizan la médula, el estroma y los folículos ováricos. A. Sección del ovario (10X). B. Sección del ovario (40X). Imagen adaptada de Ref. (1,3).

Los ovarios producen los gametos femeninos (óvulos) para la reproducción y son la fuente principal de producción de hormonas: estrógenos y progesterona. Por un lado, los estrógenos son producidos principalmente por las células de la granulosa, y su función es promover el desarrollo y mantenimiento de las estructuras reproductoras, de los caracteres sexuales secundarios de la mujer y de las glándulas mamarias. Por otro lado, la progesterona es secretada principalmente por el cuerpo lúteo y actúa sinérgicamente con los estrógenos para promover cambios en el ciclo menstrual; preparar el endometrio para la implantación de un óvulo fecundado y preparar las glándulas mamarias para la producción de leche (1,4).

1.1.2. Desarrollo embrionario, ciclo ovárico y regulación hormonal

Durante el desarrollo embrionario temprano, las células germinales primarias migran a los ovarios para dividirse y dar lugar a los óvulos. La producción de nuevas oogonias (oocitos primordiales) cesa en el quinto mes de embarazo, cuando los ovarios contienen aproximadamente de 6 a 7 millones de oogonias. Hacia el final de la gestación, las oogonias entran en meiosis (oocitos primarios) y son arrestados en la profase I de la primera división meiótica. Estos oocitos son todavía diploides (presentan 46 cromosomas). Aunque el ovario de una recién nacida contiene aproximadamente 2 millones de oocitos, este número declina en la pubertad, de modo que sólo 400 oocitos ovulan a lo largo de la vida reproductiva femenina (1,2,4).

En ausencia de gestación, la mujer en edad reproductiva experimenta una serie de cambios cíclicos en el útero y los ovarios. Cada ciclo ovárico dura aproximadamente 28 días e implica la oogénesis (formación y desarrollo de nuevos gametos femeninos maduros) y la preparación del útero para recibir el óvulo fecundado. Las hormonas GnRH (hormona liberadora de gonadotropina – secretada por el hipotálamo), FSH y LH (hormona folículoestimulante y hormona luteinizante, respectivamente – ambas secretadas por la glándula pituitaria) y, los estrógenos y la progesterona (secretados por los ovarios) controlan los eventos principales del ciclo ovárico. El ciclo ovárico está dividido en tres fases: i) la fase folicular, ii) la fase ovulatoria y iii) la fase luteal (1,2,4).

i) Fase folicular (10-14 días del ciclo). Tiene lugar la formación de folículos en respuesta a la estimulación de GnRH. Los oocitos primarios quedan retenidos en pequeños folículos, denominados folículos primordiales. Eventualmente y bajo la acción de la FSH, estos folículos se desarrollan hasta folículos primarios, secundarios, terciarios y finalmente, folículos De Graaf.

ii) Fase ovulatoria. Bajo la estimulación hormonal de la LH, el folículo se rompe y el oocito liberado es recogido por las fimbrias de la trompa de Falopio. Si el oocito no es fecundado, se desintegra al cabo de dos días. Pero si el espermatozoide alcanza el citosol del oocito secundario (fecundación), éste completa la segunda división meiótica, y se convierte así en un óvulo maduro.

iii) Fase luteal (12-15 días del ciclo). Bajo la influencia de la LH, el folículo vacío se convierte en el cuerpo lúteo. A diferencia de los folículos ováricos que secretan únicamente estrógenos, el cuerpo lúteo produce estrógenos y progesterona. Hacia el final del ciclo no fértil, este cuerpo regresa y se va reemplazando por tejido cicatricial, transformándose en un *corpus albicans* no funcional.

1.2. Cáncer de ovario

1.2.1. Epidemiología del cáncer de ovario

El cáncer es considerado la enfermedad genética humana más común y la principal causa de muerte a escala mundial según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (5). De acuerdo con el estudio GLOBOCAN 2012, se estimaron 14,1 millones de nuevos casos de cáncer y 8,2 millones de muertes a causa de esta enfermedad en todo el mundo en el año 2012 (6). Se calcula que una de cada tres personas puede ser afectada por cáncer a lo largo de su vida, y la probabilidad aumenta a medida que avanza la edad (7).

De acuerdo con el estudio GLOBOCAN 2012, el riesgo estimado de sufrir cáncer de ovario (CO) antes de los 75 años de edad es del 0,7% a nivel mundial. Según este estudio, el CO es el séptimo cáncer más común y la octava causa de muerte por cáncer en mujeres, suponiendo el 3,6% de los nuevos casos de cáncer (con 238.719 casos) y el causante del 4,3% de los fallecimientos (con 151.905 casos) en todo el mundo (6,7). Las tasas de incidencia y mortalidad son más altas si nos focalizamos en los países desarrollados (América del Norte y Europa), donde el CO es el quinto cáncer más incidente y el sexto más mortal (Figura 3) (8). La mayoría de los casos de CO se diagnostican en mujeres posmenopáusicas entre los 45 y los 75 años, con un promedio de 60 años de edad (9). El 40-45% de las pacientes con CO son mayores de 65 años, con mayor incidencia a partir de los 75 años (10).

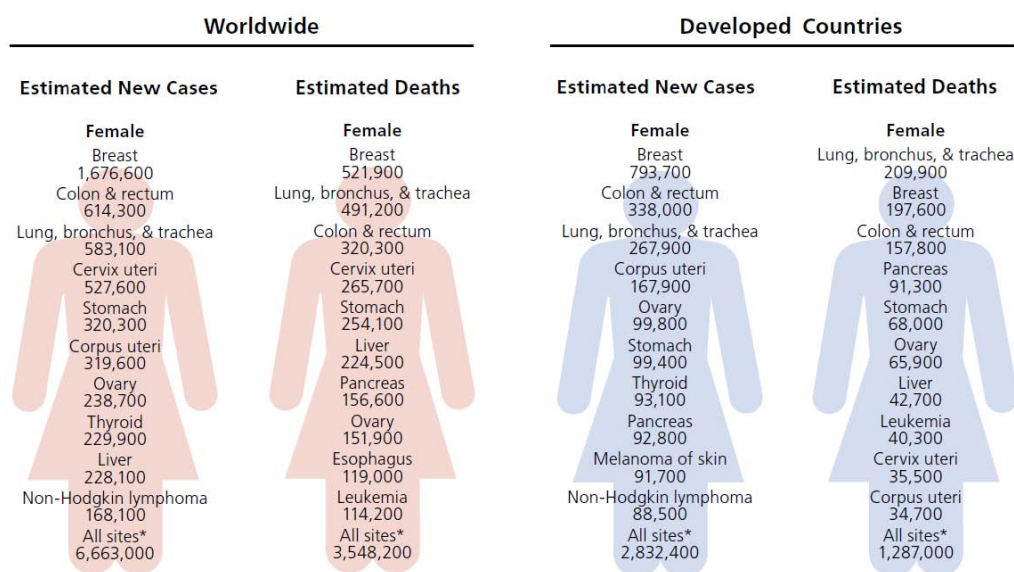


Figura 3. Estimación de los 10 tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial (izquierda) y en los países desarrollados (derecha). Las estimaciones pueden no sumar la totalidad debido al redondeo. Los casos de cáncer de piel (no melanoma) han sido excluidos. Imagen adaptada de Ref. (7).

En EE.UU., el riesgo estimado de sufrir CO a lo largo de la vida es del 1,4%, representando un 3% de los casos de cáncer en mujeres. Se estima que en el 2016 aparecieron 22.280 nuevos casos de CO. Des del 2003 hasta el 2012, la tasa de CO ha disminuido un 0.9% por año, una tendencia que se ha mantenido estable desde mediados de la década de 1980 (11). El CO es la enfermedad ginecológica más letal y la quinta causa de muerte por cáncer en mujeres de Norte América. Se estima que en el año 2016, 14.240 muertes fueron debidas al CO, lo cual representa un 5% de las muertes por cáncer en mujeres (11,12).

A nivel europeo, el riesgo de sufrir CO antes de los 75 años de edad es del 1,1% según estimaciones del GLOBOCAN 2012. El CO ocupa el quinto lugar en términos de incidencia y mortalidad en Europa (Figura 4). En el año 2012 se registraron 65.538 casos y 42.716 muertes. Estas tasas varían a lo largo de todo el continente, pero se aprecia mayor incidencia en los países del norte de Europa, principalmente en los países nórdicos, Reino Unido, Austria y Alemania (8,13).

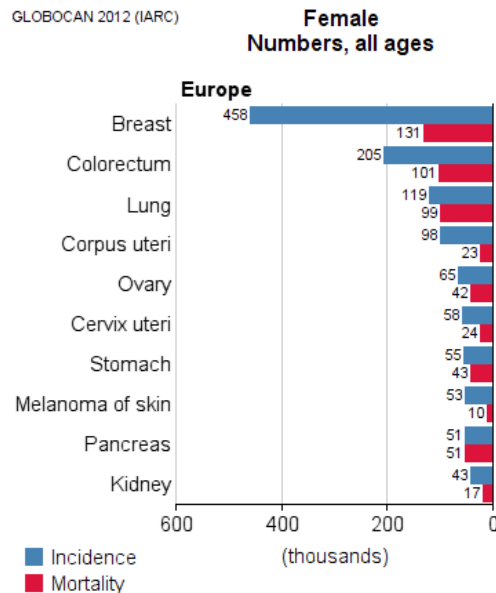


Figura 4. Incidencia y mortalidad de los 10 tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en Europa en el año 2012. Imagen adaptada de Ref. (13).

En España, el CO también es el quinto cáncer más incidente; representa el 5,1% de los casos de cáncer en mujeres. Concretamente, en el año 2012, se registraron 3.236 casos nuevos (8,14). Teniendo en cuenta la tasa mundial ajustada en el 2002 (9,9 casos/100.000 habitantes/año), la incidencia del CO en España se considera alta, con un ascenso lento pero constante desde los años 60 (8). En referencia a la mortalidad, el CO representa la sexta causa de muerte por cáncer en España con 1.878 muertes en el año 2012 (Figura 5).

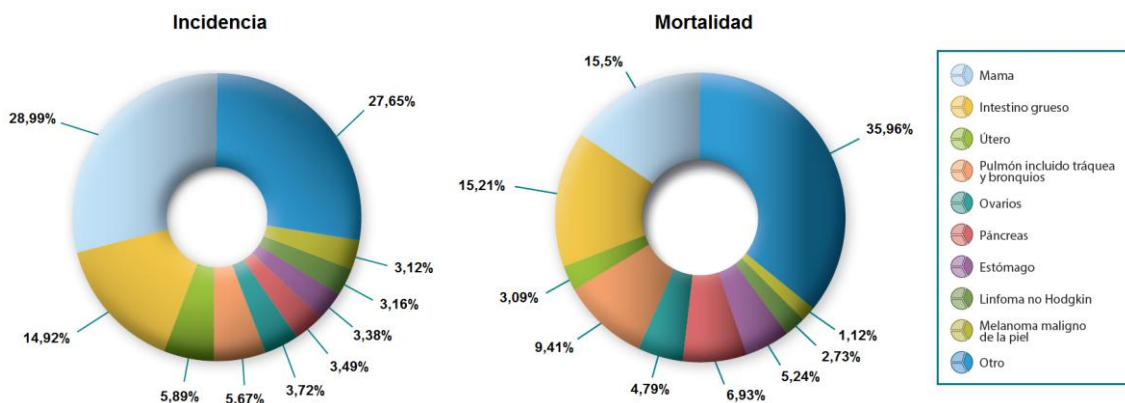


Figura 5. Incidencia y mortalidad estimada por tipo de tumor en mujeres de España en el año 2012. Datos estimados proporcionados por IARC a través del proyecto EUCAN. Imagen adaptada de Ref. (14).

El CO es el cáncer ginecológico con la supervivencia más baja. En general, las tasas de supervivencia relativa a 5 y 10 años de las pacientes con CO son 46% y 35%, respectivamente. Sin embargo, la supervivencia varía sustancialmente según la edad; la supervivencia global a los 5 años de las mujeres menores de 65 años es el doble que la de mujeres mayores de esta edad (58% frente a un 28%) (11). Dado que los síntomas no son específicos en estadios iniciales de la enfermedad (estadios I-II) y no existen pruebas diagnósticas eficaces, el CO es detectado en el 85% de los casos (12) cuando el tumor ya ha metastatizado en la cavidad abdominal (estadios III-IV), resultando en una supervivencia global a los 5 años del 28%. En cambio, la tasa de supervivencia a 5 años aumenta hasta el 92% cuando el diagnóstico tiene lugar en estadios tempranos, cuando el tumor queda confinado en el ovario (sólo un 15% de los casos de CO son diagnosticados en esta fase) (Figura 6) (12).

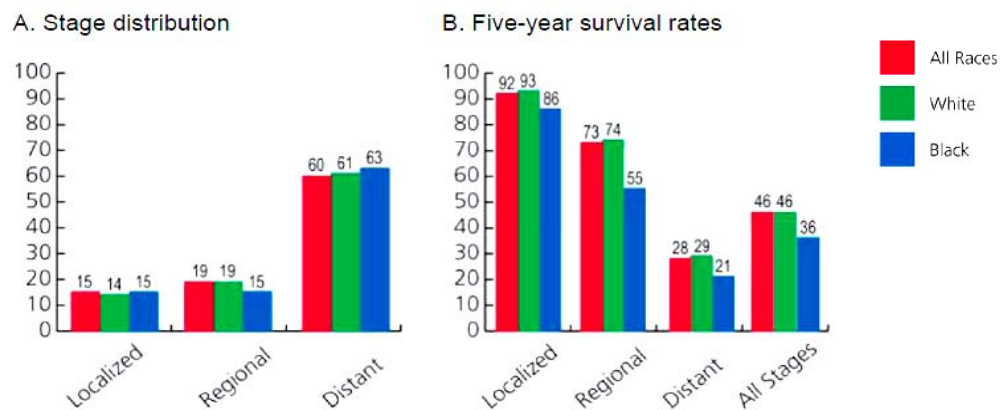


Figura 6. A. Distribución de los estadios de CO por raza humana en EE.UU. (2005-2011). Los estadios no suman el 100% debido a la falta de información. **B. Tasas de supervivencia a los 5 años de CO en EE.UU. (2005-2011), distribuidas según la raza humana y el estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico.** *El error estándar de la tasa de supervivencia es del 5-10%. Imagen adaptada de Ref. (12).

En Europa, el estudio EURO CARE-5 (*European Cancer Registry Study Of Survival and Care of Cancer Patients 5*) – análisis de la supervivencia de CO en el periodo 2000-2007 – reporta una supervivencia global a los 5 años del 37,6%, porcentaje que decrece significativamente a medida que avanza la edad. Esta tasa es variable a nivel geográfico, oscilando desde un 30% en el Reino Unido e Irlanda hasta un 41% en el norte de Europa. Concretamente a nivel español (sur de Europa), la supervivencia a los 5 años es del 36,8% (15).

1.2.2. Carcinogénesis ovárica

El ovario normal es un tejido complejo con distintos componentes (ver apartado 1.1.1. *El ovario, órgano sexual femenino*). Aunque el CO puede desarrollarse a partir de células germinales o células de la granulosa o de la teca, el 90% de los casos de CO son de histología epitelial, siendo el origen del tumor la monocapa de células epiteliales que recubre el ovario o bien la capa sub-superficial de los quistes de inclusión. Aún así, también se ha observado que algunos carcinomas pueden originarse a partir de la capa interna de las trompas de Falopio, de depósitos de endometriosis o de la superficie de la cavidad peritoneal (16).

Los conceptos principales de la carcinogénesis ovárica aceptados globalmente son los siguientes. En primer lugar, aunque existen distintos tipos histológicos, el CO más común es el seroso de alto grado y en consecuencia, se trata el CO como una sola enfermedad. Este tipo de cáncer se origina a partir de la monocapa superficial de células epiteliales (el mesotelio) que invagina en el estroma subyacente, resultando en un quiste de inclusión que sufre

eventualmente una transformación maligna. En segundo lugar, el CO se extiende desde el ovario hacia la pelvis, el abdomen y, en ocasiones, hacia otros órganos distantes (16).

La etiología del CO epitelial es compleja y aún no está totalmente definida. A continuación se presentan las teorías actuales que se consideran al respecto.

1.2.2.1. Teorías tradicionales de la carcinogénesis ovárica

Teoría de la ovulación incesante

La hipótesis de la ovulación incesante fue descrita por Fathallah en 1971. Según Fathallah, la ovulación provoca microtraumas en la superficie del epitelio del ovario, y la acumulación de estas lesiones incrementa el riesgo de desencadenar una neoplasia, ya que favorece la formación de un quiste de inclusión por la internalización del epitelio superficial dentro del estroma del ovario – el cistoadenocarcinoma. De acuerdo con esta hipótesis, la disrupción y reparación mensual de la superficie epitelial del ovario están asociadas al daño estructural, genético y/o inflamatorio, aumentando el riesgo de desarrollar CO (17). Además, los estrógenos inducen la mitosis del epitelio, lo cual hace aumentar la probabilidad de mutagénesis en oncogenes o genes de supresión tumoral (16). Así, la ovulación continuada y los estrógenos son factores que pueden inducir la transformación maligna de las células del ovario y, por lo tanto, la edad de la mujer y el número total de ovulaciones son considerados índices de riesgo individuales para desarrollar el CO. El papel causal de la ovulación incesante ha sido apoyado por el efecto protector de los anticonceptivos hormonales orales o el embarazo, que suprimen la ovulación (18).

El punto débil de esta teoría es que no puede explicar completamente la elevada incidencia del CO epitelial en mujeres posmenopáusicas (85-90% de los casos), que no contraen ciclos de ovulación. En este sentido, se piensa que la acumulación prolongada de posibles alteraciones genéticas tras la rotura y reparación de cada folículo resulta en lesiones pre-neoplásicas y finalmente concluye en la transformación maligna por “envejecimiento ovárico” (19).

Teoría del exceso de las gonadotropinas

Las gonadotropinas (FSH y LH) tienen funciones clave en la regulación de las funciones de las células ováricas controlando su crecimiento normal, pero los niveles elevados pueden proporcionar las condiciones adecuadas para la transformación neoplásica. Concretamente, los picos de gonadotropinas resultan en la producción de esteroides por parte del estroma ovárico, los cuales inducen a su vez la diferenciación, mitosis y transformación del epitelio enquistado. Esta hipótesis está soportada por la presencia de gonadotropinas en el fluido del tumor ovárico y por la presencia de los receptores de estas hormonas en los carcinomas. Esta teoría también explicaría la disminución del riesgo de CO asociado al embarazo y el uso de anticonceptivos orales, ya que se reduce la exposición a las gonadotropinas debido a la retroalimentación de esteroides en la hipófisis (20). Por otro lado, la hipótesis concuerda con el aumento en la incidencia del riesgo de CO tras 10-20 años desde el inicio de la menopausia, cuando ya no hay ovulación pero los niveles de gonadotropinas en suero son elevados (21).

Teoría de la inflamación

La inflamación crónica parece jugar un papel importante en la carcinogénesis ovárica. Durante la ovulación, las gonadotropinas estimulan una reacción inflamatoria mediada por las prostaglandinas. Las citocinas y los enzimas proteolíticos desencadenan la rotura de la superficie epitelial del ovario y la liberación del óvulo. En este punto, las células inflamatorias atraídas por el estigma ovulatorio generan especies reactivas de oxígeno que pueden dañar el

ADN y, en consecuencia, favorecen la transformación maligna. Por lo tanto, los altos niveles de gonadotropinas en mujeres posmenopáusicas fomentan un ambiente inflamatorio que puede contribuir a desarrollar CO. La hipótesis de la inflamación se sustenta por la incidencia aumentada del CO en mujeres con enfermedad inflamatoria pélvica, endometriosis y síndrome de ovario poliquístico, patologías en las que la inflamación crónica es un factor clave para su desarrollo (22).

Teoría de la exposición a carcinógenos exógenos o contaminantes en la pelvis

Esta teoría postula que la exposición a contaminantes y carcinógenos en el área genital y perineal podrían desencadenar la patogénesis del CO por su migración hacia la vagina, y desde aquí a la cavidad abdominal y los ovarios. Existen evidencias de que la exposición a irradiación pélvica (23), talcos (24), asbestos (25) y alcohol (26) en el área genital está asociada a la neoplasia ovárica. Sin embargo, son necesarias más investigaciones al respecto para confirmar el papel de estos compuestos en la patogénesis del CO (24).

1.2.2.2. Teoría dualista

Está tradicionalmente aceptado que los tumores epiteliales de ovario proceden de la monocapa epitelial de superficie y que posteriormente, la transformación maligna evoluciona hacia diferentes tipos celulares (seroso, endometriode, célula clara, mucinoso y transicional), similares al epitelio de las trompas de Falopio, endometrio, gastrointestinal, endocérvix y vejiga urinaria, respectivamente (27). La teoría dualista (28) contrasta la creencia convencional de que el CO se origina en el ovario. Concretamente, esta hipótesis postula que los tumores primarios de ovario se originan en otros órganos pélvicos e implican el ovario de manera secundaria. Se trata de un modelo dualista que distingue entre dos grandes tipos de tumores de ovario en función de sus características morfológicas y moleculares.

Por un lado, el grupo de tumores de tipo I está compuesto por el carcinoma seroso de bajo grado, el endometriode de bajo grado, el mucinoso, el de células claras y el de transición (Brenner). Generalmente, estos tumores quedan confinados en el ovario y son relativamente estables a nivel genético. Normalmente, los tumores de tipo I se diagnostican en estadios iniciales y suelen pasar por un estado intermedio de neoplasia quística benigna, un tumor *borderline*, o un tumor de bajo potencial maligno. En cuanto al origen de los tumores de tipo I, se considera la endometriosis una lesión precursora de los tumores endometrioides y los tumores de células claras, ya que está generalmente aceptado que la endometriosis se desarrolla a partir de tejido endometrial por la menstruación retrógrada. Por otro lado, hay estudios preliminares que sugieren que los tumores mucinosos y de transición (Brenner) surgen de nidos epiteliales transitorios en el cruce de trompas-mesovario mediante un proceso de metaplasia (28).

En contraposición, el grupo de tumores de tipo II incluye los carcinomas altamente agresivos, que evolucionan rápidamente, y que casi siempre son detectados en estadios avanzados de la enfermedad. Los tumores de tipo II incluyen el carcinoma seroso de alto grado convencional, el indiferenciado y tumores mesodérmicos mixtos malignos (carcinosarcomas), presentando un patrón papilar, glandular o sólido. Estos tumores representan el 75% de los carcinomas ováricos epiteliales. Es un grupo homogéneo a nivel morfológico y molecular. En cuanto al origen, se postula que la lesión precursora del CO seroso de alto grado (*High-grade serous ovarian carcinoma*, HGSOC) es el carcinoma intraepitelial tubárico seroso (*Serous tubal intraepithelial carcinoma*, STIC). Concretamente, se cree que el HGSOC surge de la implantación del epitelio de la trompa de Falopio en el ovario (28), ya que las lesiones precursoras en las trompas presentan características morfológicas y moleculares similares a las del HGSOC (18,29). El fluido folicular liberado en el proceso de la ovulación baña la

superficie del ovario y el extremo de las fimbrias de la trompa de Falopio, permitiendo de este modo que las células de la lesión intraepitelial tubárica entren en contacto con el ovario, y desarrollen aquí el tumor (Figura 7). De acuerdo con esta hipótesis, la salpinguectomía (extracción de las trompas de Falopio) electiva sería una estrategia de intervención con gran potencial (18).

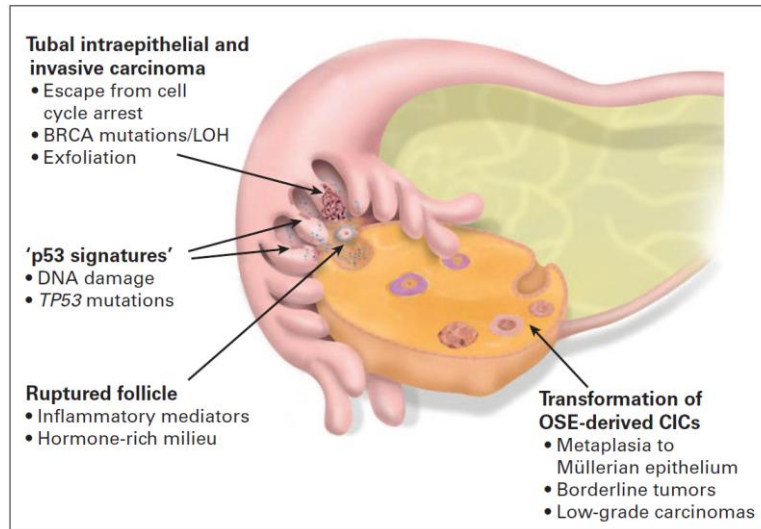


Figura 7. Modelo de la carcinogénesis serosa de alto grado. El modelo integra el desarrollo del carcinoma seroso en las fimbrias de la trompa de Falopio ("Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma", STIC) y en la superficie epitelial ovárica – como consecuencia de los quistes de inclusión ("Cortical Inclusion Cyst", CIC). Se cree que la estimulación hormonal y los mediadores de la inflamación tienen un efecto carcinogénico sobre ambas vías. Imagen adaptada de Ref. (29).

En conjunto, ninguna de las teorías explica todos los aspectos de la carcinogénesis ovárica. Cada una de ellas aporta un aspecto que explica parcialmente el origen del tumor en el ovario, pero ninguna es totalmente definitiva.

1.2.3. Factores de riesgo y factores de protección asociados al cáncer de ovario

El principal factor de riesgo asociado al CO es una fuerte historia familiar de cáncer de mama o de ovario. Entre un 5 y un 10% de los casos de CO son de carácter hereditario, el 89% de los cuales es del tipo histológico seroso papilar (30). Las mujeres que han sufrido cáncer de mama o que son portadoras de mutaciones hereditarias en los genes supresores tumorales BRCA1 (cromosoma 17, locus 17q12-21) o BRCA2 (cromosoma 13, locus 13q12-13) presentan mayor riesgo de contraer la enfermedad (11,30); con un riesgo del 18-56% y del 14-27%, en el caso de las portadoras de BRCA1 y BRCA2, respectivamente – dependiendo de la presencia/ausencia de la enfermedad en la historia familiar. De hecho, las mutaciones germinales en BRCA1/2 son responsables de un 10% de los casos de CO (30). A partir de un meta-análisis que integra múltiples estudios internacionales de penetración de las mutaciones en BRCA1/2, se ha determinado que el riesgo acumulado de CO a los 70 años es del 40% para las portadoras de BRCA1 y, del 18% para las portadoras de BRCA2 (31), con peor supervivencia para las portadoras de BRCA1 en estadios iniciales (32). Por todo ello, actualmente se realizan pruebas genéticas en distintos países para identificar las familias que presentan este tipo de mutaciones. La ooforectomía (extracción de los ovarios) y salpinguectomía profilácticas en estas mujeres reduce el riesgo de desarrollar CO, aunque el riesgo de cáncer peritoneal permanece remanente (33).

Otras condiciones médicas asociadas a un mayor riesgo de CO incluyen la enfermedad pélvica inflamatoria y el síndrome de Lynch (cáncer colorrectal hereditario no polipósico) (11). Éste se desarrolla como consecuencia de mutaciones en genes reparadores del ADN, como MSH2, MLH1 o MSH6. Las familias con estas alteraciones genéticas tienen mayor riesgo de CO (9-12%) (34). El cáncer de colon hereditario no poliploideo supone el 1% de todos los casos de CO (9).

Aparte del riesgo genético asociado al CO, se han descrito otros factores de riesgo y de protección relacionados con esta enfermedad – Tabla 1.

Tabla 1. Factores de riesgo y factores de protección asociados al CO.

Factores de riesgo	Factores de protección
Cáncer hereditario familiar (30,32)	Anexectomía bilateral profiláctica (35), ligadura tubárica e histerectomía (29,36)
Nuliparidad e infertilidad (37–39)	Embarazo, paridad y lactancia materna (40–42)
Terapia hormonal sustitutiva para la menopausia (estrógenos) (43,44)	Anticoncepción hormonal (interrupción de ovulación) (45) y progesterona (41,46)
Dieta (carne, grasas saturadas, alimentos ricos en almidón, lactosa, calcio) (47,48), tabaco (26), alcohol (49) y cafeína (50)	Dieta (aceite de oliva, grasas mono o poliinsaturadas, isoflavonas, vegetales, licopeno, vitaminas A y E, β -carotenos, fibra y té verde) (51)
IMC elevado - sobrepeso y obesidad (52,53)	Actividad física (54)
Edad avanzada (10)	Edad joven (10)
Otros: Endometriosis (en el carcinoma endometriode y el de célula clara) (55,56)	Otros: Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (57)

1.2.4. Factores pronóstico del cáncer de ovario

A continuación se describen los principales factores asociados al pronóstico del CO:

Factores clínicos

El estadio de la enfermedad es el predictor pronóstico de CO más potente y clínicamente aceptado. En la Tabla 2 se muestra la supervivencia a los 2 y 5 años en función del estadio concreto según la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia, FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*) (58).

Tabla 2. Supervivencia global de pacientes con CO en función del estadio de la FIGO. Tabla adaptada de Ref. (58).

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

Los factores clínico-histológicos que se han asociado a supervivencia baja son: los estadios avanzados (III-IV), la edad superior a los 65 años, el grado histológico indiferenciado, el tipo histológico célula clara, el gran tamaño del tumor inicial, la enfermedad residual (tamaño tumoral tras la cirugía superior a 0 cm), la presencia de ascitis preoperatoria y la falta de respuesta serológica al marcador tumoral CA125 – *Cancer antigen 125* (Antígeno de cáncer 125 o Antígeno carbohidrato 125) – tras el tercer ciclo de quimioterapia. De estos factores, los que afectan a la supervivencia de manera más intensa son el estadio, la edad, el grado tumoral y el tumor residual (59).

Por otro lado, los factores que parecen mejorar el pronóstico de las pacientes con CO son: los estadios iniciales (I-II), la edad joven, el buen estado vital, el grado tumoral bien diferenciado, los tipos histológicos no mucinoso ni célula clara, el pequeño tamaño tumoral antes de la cirugía, el tumor residual nulo o muy pequeño tras la cirugía primaria (tamaño tumoral postquirúrgico inferior o igual a 1 cm), y la ausencia de ascitis (59).

La cirugía citoreductora es uno de los factores pronóstico con mayor impacto en la supervivencia a los 5 años de las pacientes en estadios avanzados, pues se ha demostrado que cuanto menor es la enfermedad residual, mayor es la supervivencia (59).

Factores moleculares

A continuación se describen los principales factores moleculares que afectan al pronóstico de las pacientes con CO.

El **marcador CA125** se encuentra elevado (límite establecido: inferior a 35 U/mL) en el suero del 80% de las pacientes con CO. Su valor como marcador pronóstico ha sido estudiado ampliamente. Si los niveles de CA125 son superiores a 35 U/mL, al terminar el tratamiento quimioterápico, la probabilidad de que la enfermedad progrese en los 4 meses siguientes es del 60%. En cambio, si los niveles no superan los 35 U/mL tras la quimioterapia, la probabilidad de progresión cae hasta el 5%. Por otra parte, si los niveles de CA125 disminuyen bajo el límite establecido tras 3 meses de quimioterapia, todas las pacientes alcanzan la respuesta clínica y el 66% de ellas alcanza la respuesta patológica completa en la segunda laparotomía (60).

La **ploidía del ADN** aporta información referente al contenido de ADN. Algunos investigadores proponen la aneuploidía de ADN y la alta fracción de ADN en la fase S del ciclo celular como factores pronóstico en pacientes con CO en estadios iniciales. Por otro lado, los tumores diploides y la baja fracción de ADN en la fase S se han asociado a carcinomas en estadios avanzados, tumores de alto grado, alta frecuencia de tumor residual tras la cirugía y supervivencia más baja. También hay estudios que apuntan que los carcinomas de ovario diploides en estadio III están asociados a buen pronóstico y que los estadios IV tienen muy mal pronóstico, independientemente de la ploidía (61).

Las **alteraciones cromosómicas** también están asociadas al pronóstico del CO. Concretamente, se ha descrito la trisomía 12 en tumores *borderline*, fibromas y tumores de las células granulosa, mientras que en carcinomas malignos, se ha identificado la pérdida del cromosoma X, 8, 13, 17 y 22. También se han observado alteraciones estructurales relacionadas con el estadio y el grado tumoral en los cromosomas 1, 3, 6, 11, 12, 13, 17, 18 y 19 (62).

Los **factores pronóstico moleculares** más estudiados son el gen supresor de tumores TP53, y los oncogenes HER2 y EGFR. Un metaanálisis reciente indica que la tinción inmunohistoquímica (IHQ) de TP53, HER2 y EGFR no tiene una relación directa con la supervivencia, pero las vías moleculares implicadas sí que influyen el pronóstico de las

pacientes. En condiciones normales, el gen supresor tumoral TP53 se activa en respuesta al daño en ADN e induce la apoptosis celular. El 96% de los carcinomas serosos de alto grado presentan mutaciones en TP53 (62). La disfunción de TP53 se ha relacionado sobre todo con el CO seroso recurrente, con los estadios avanzados y con la quimiorresistencia. Es conocido que las pacientes con TP53 mutado responden mejor al paclitaxel combinado con carboplatino en comparación con el paclitaxel combinado con ciclofosfamida. Por otro lado, se ha visto que las pacientes con mutaciones en BRCA1/2 tienen mejor pronóstico; el curso clínico es menos agresivo en comparación con los carcinomas esporádicos sin estas alteraciones genéticas (32). El oncogén HER2 se encuentra sobre-expresado en un 35% de los tumores ováricos, mientras que EGFR lo está en el 62%. La sobre-expresión de HER2 está asociada a mayor mortalidad; sin embargo los estudios en diferentes tipos histológicos no son concluyentes, por lo que no está totalmente definido si HER2 podría ser utilizado como factor pronóstico del CO (63,64).

La **proliferación celular** se determina mediante el recuento de células en mitosis. Los marcadores de actividad proliferativa KI67 o el PCNA – proteínas nucleares – se han asociado a estadios avanzados y baja supervivencia del CO (65).

La **angiogénesis** es primordial para la proliferación y expansión del tumor, por lo que se utiliza como estrategia terapéutica y factor pronóstico en el CO. El factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*, VEGF) es el principal inductor de la angiogénesis y se ha visto que su alta expresión en CO está asociada a baja supervivencia de manera significativa (66).

Finalmente, los **componentes de la matriz extracelular** (*Extracellular matrix*, ECM) también se han relacionado con el pronóstico del CO. Con el objetivo de expandirse, las células tumorales ováricas activan la invasión, destruyendo a su paso la ECM. Para ello, se induce la expresión o activación de metaloproteinasas de matriz (MMPs), como MMP7 y MMP9, cuyos niveles en plasma se han visto aumentados en pacientes con CO recurrente. Esto sugiere que estas proteínas podrían ser utilizadas como factores predictivos de recidiva (67).

En la Tabla 3 se muestra un resumen de los principales marcadores moleculares asociados al pronóstico del CO epitelial y su función (68,69).

Tabla 3. Marcadores con valor pronóstico del CO epitelial a nivel de proteína. Tabla adaptada de Ref. (68,69).

Oncogenes y supresores tumorales	TP53 WT1
Marcadores de proliferación	KI67 PCNA Topoisomerasa II
Reguladores de ciclo celular	Ciclinas E, D1, D3 y A Inhibidores de ciclinas: p21, p27, p57 y p16
Apoptosis	Vía apoptótica extrínseca TRAIL y receptores TRAIL-R1/DR-4 y TRAIL-R2/DR-5 TRAIL-R3/DcR1, TRAIL-R4/DcR2 y TRAIL-R5 FAS y FAS-L Vía apoptótica intrínseca Miembros de la familia BCL-2 (BAX y BCL-2) Caspasas Iniciadora: caspasa-8 Efectora: caspasa-3/CPP32 Inhibidores de apoptosis: Survivina y XIAP
Enzimas reparadores de ADN	BRCA1, BRCA2, PARP-1 y ERCC1
Marcadores de angiogénesis	Marcadores de microdensidad vascular: CD31 y CD34 Proteínas implicadas en angiogénesis: VEGF, HIF, COX-2, MMP7 y MMP9
Factores inmunológicos	Células T, citocinas, moléculas co-estimuladoras e inhibidoras (expresadas por las células inmunes o tumorales)
Receptores tirosina quinasa (TKR)	EGFR, HER2, ERBB3 y ERBB4 Receptores de efrina B y otros TKR EPHB4 HGF/MET y su ligando c-MET Vía de señalización de los receptores TKR: ERK, PI3CA, AKT y NF-κB1
Cadherina epitelial/ β-catenina	

1.2.5. Clasificación del cáncer de ovario

El CO es un grupo heterogéneo de neoplasias con distinta biología y comportamiento clínico, celular y molecular. En la actualidad, los patólogos utilizan el sistema de clasificación basado en la morfología para diferenciar los principales subgrupos de CO de acuerdo con el tipo de diferenciación (tipo histológico) y el grado de diferenciación (grado tumoral) (3,58,70).

1.2.5.1. Clasificación de los tumores de ovario

Los tumores ováricos pueden ser clasificados en distintos subtipos en función del origen celular (3,58,70):

- Tumores epiteliales. El 90% de los casos de CO derivan del epitelio que recubre la superficie del ovario – aunque todavía existe discusión al respecto (ver apartado 1.2.2. *Carcinogénesis ovárica*). Tienen lugar principalmente en mujeres posmenopáusicas.
- Tumores de células germinales. Aproximadamente el 5% de los casos proceden de las células pluripotenciales que migran desde el saco vitelino hasta el ovario. Pueden presentarse a cualquier edad, pero la mayoría afectan a mujeres premenopáusicas.
- Tumores estromales o de los cordones sexuales. El 5% restante lo componen los tumores procedentes de las células estromales. Se desarrollan en el tejido conectivo que mantiene la estructura del ovario. Los dos tipos de tumores estromales más comunes son los tumores de las células de la granulosa y los tumores de las células Sertoli-Leydig. A diferencia del CO epitelial, el 70% de estos tumores se diagnostican en estadio I.

1.2.5.2. El cáncer de ovario epitelial

El CO epitelial puede ser clasificado en distintos subgrupos en función de la malignidad, el grado de diferenciación, la histología y el estadio (3,58,70).

Clasificación del cáncer de ovario epitelial en base a la malignidad

De acuerdo con el grado de proliferación celular y de la presencia/ausencia de invasión estromal, los tumores epiteliales se clasifican en los subtipos morfológicos benigno, de bajo potencial maligno o maligno (3,58,70).

- Tumores benignos. Representan el 60% de los tumores ováricos epiteliales. No tienen la capacidad de invadir otros tejidos. Pueden ser extraídos sin dificultad y rara vez crecen nuevamente. El crecimiento del epitelio no es estratificado y no presentan atipias citológicas. Existen distintos tipos de tumores epiteliales benignos: los adenomas serosos, los adenomas mucinosos y los tumores de Brenner. Estos tumores pueden presentarse a cualquier edad, pero el 60% aparece en edades menores de los 40 años.
- Tumores de bajo potencial maligno o *borderline*. Representan el 10% de los casos de CO epitelial. Son tumores intermedios entre los benignos y los malignos, crecen lentamente y eventualmente (10% de los casos) pueden expandirse e invadir otros tejidos. A nivel histológico, son tumores epiteliales que no parecen ser cancerosos. No crecen en el estroma del ovario, sino que proliferan formando estratos y nudos; tienen una actividad mitótica variable y presentan núcleos atípicos. Cuando se propagan fuera del ovario, crecen sobre la superficie de la cavidad abdominal, sin penetrar en ella. Normalmente afectan a mujeres de edad temprana, con un promedio de edad de 45 años.
- Tumores malignos. Representan el 30% de los tumores epiteliales y el 80-85% de todos los casos de CO. Son tumores que tienen la capacidad de metastatizar otros tejidos, invadir y dañar órganos. Los tumores malignos son los denominados carcinomas. Estos tumores proliferan en el estroma del ovario y presentan núcleos atípicos. Aparecen mayoritariamente en mujeres posmenopáusicas; el promedio de edad es de 60 años.

Clasificación del cáncer de ovario epitelial en base al grado de diferenciación

El grado clasifica el tumor en base a la similitud del carcinoma con el tejido normal de origen en una escala con magnitudes 1 (grado bajo), 2 (grado moderado) y 3 (grado alto). El CO de grado 1 es el que más se parece al tejido normal – contiene muchas células de aspecto sano; está bien diferenciado – y suele tener buen pronóstico. El grado 2 hace referencia a una diferenciación del tejido moderada – la cantidad de células de aspecto anormal es mayor que la

cantidad de células de aspecto sano –; y, el grado 3 indica baja similitud con el tejido normal – todas las células o la mayoría de ellas tienen aspecto anormal; se trata de un tumor poco diferenciado o indiferenciado – y suele tener el peor pronóstico (70). Las pacientes con tumores ováricos de grado 1 tienen una supervivencia global a los 5 años del 57,2%; en las pacientes que presentan tumores de grado 2, la tasa es del 31%; y, en las pacientes con carcinomas de grado 3, la tasa es del 28,5% (58).

Clasificación del cáncer de ovario epitelial en base a la histología

La clasificación del CO epitelial en relación a la histología se refiere al tipo concreto de diferenciación del tumor. Esta clasificación fue originariamente descrita en base a la teoría tradicional de la carcinogénesis ovárica, según la cual, a diferencia de muchos cánceres que están poco diferenciados en las primeras fases de la transformación, el CO epitelial se desarrolla a partir de la monocapa epitelial que recubre el ovario y evoluciona hasta 4 tipos distintos que asemejan células epiteliales normales bien diferenciadas de otros tejidos – el nombre de cada subtipo deriva del tejido al que más se asemeja: el epitelio de la trompa de Falopio en el caso del seroso; el epitelio del endometrio, en el caso del endometriode; el epitelio del endocérvix o del intestino, en el caso del mucinoso; o el epitelio que forma nidos en la vagina, en el caso de células claras (Figura 8) (71,72). Aproximadamente el 75% de los carcinomas ováricos de estirpe epitelial son serosos; el 10%, endometrioides; el 3%, mucinosos; el 5-10%, de células claras; y el 2-7%, indiferenciados u otros (tumores de Brenner o transicionales, tumores escamosos y tumores mixtos) (70,71).

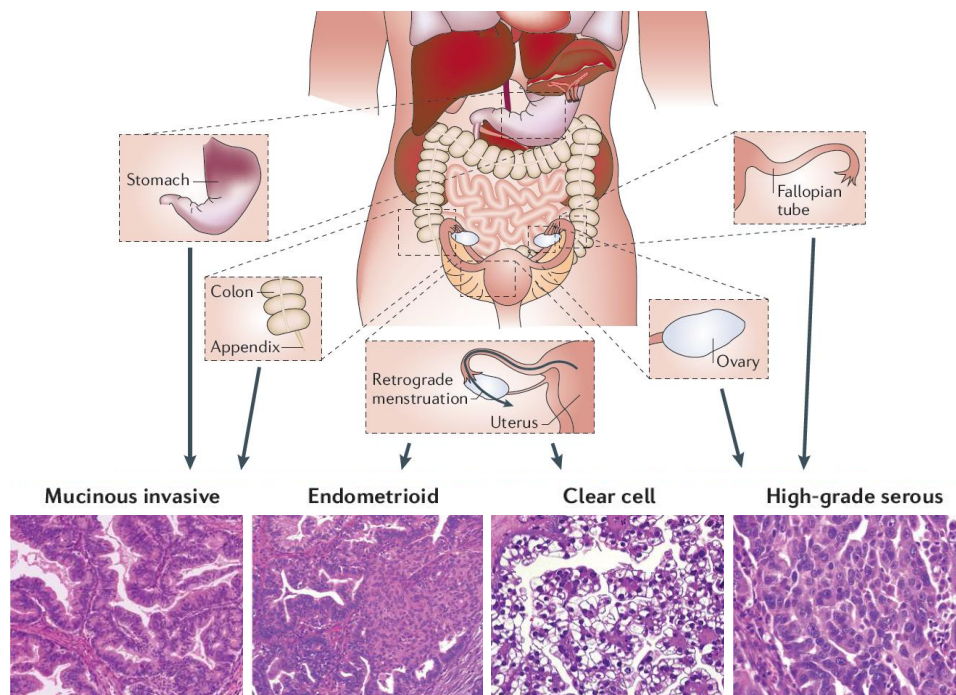


Figura 8. Los orígenes del CO epitelial y la tinción con hematoxilina de los distintos tipos histológicos – se representa el seroso de alto grado, puesto que es más común que el de bajo grado. Imagen adaptada de Ref. (71,72).

- **Carcinoma seroso.** Representan el 80-90% de todos los casos de CO (73,74). La morfología celular es similar a la del carcinoma de las trompas de Falopio y el carcinoma peritoneal seroso. Actualmente está aceptado que este tipo de tumor proviene de la superficie epitelial ovárica (teoría tradicional) y/o de lesiones precursoras en el epitelio de las trompas (teoría dualista). El carcinoma seroso se caracteriza por tener tumoraciones quísticas sólidas con papilas en el interior. En el 50% de los casos es bilateral (el tumor afecta a los dos

ovarios). Este tumor va frecuentemente asociado a la presencia de metástasis peritoneales y presenta valores muy elevados del marcador tumoral CA125 (superiores a 65 U/mL) (73). En base al estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico, la supervivencia a 5 años es del 76%, en estadio I; 56%, en estadio II; 25%, en estadio III; y 9%, en estadio IV (75).

Teniendo en cuenta las diferencias morfológicas, moleculares, de presentación clínica y de pronóstico, se diferencian claramente dos tipos de carcinomas serosos:

i) HGSOC (85-90% de los carcinomas serosos) (70,71). El tumor es bilateral en el 60% de las pacientes y se detecta en estadio avanzado en el 80% de los casos. Este carcinoma suele ser sólido y quístico con áreas de hemorragia y necrosis. Las células forman papilas y masas sólidas con atipia nuclear y suelen observarse más de 12 mitosis en un campo de 10 aumentos.

ii) CO seroso de bajo grado (10-15% de los carcinomas serosos) (70,71). Está compuesto por papilas o micropapilas sin atipia nuclear, y se observa menos proliferación que en el HGSOC (menos de 12 mitosis en un campo de 10 aumentos) (70,74).

- Carcinoma endometriode. Presentan áreas sólidas y quísticas, con patrones glandulares que asemejan las glándulas del endometrio (73). El 42% está asociado a la presencia de endometriosis en el mismo ovario (76) y el 15-30% está asociado al cáncer de endometrio (73). El 15-20% de estos carcinomas son bilaterales. En el 80% de los casos se detectan niveles de CA125 superiores a 35 U/mL. El 31% de los casos se detectan en estadio I; el 20%, en estadio II; el 38%, en estadio III; y el 11%, en estadio IV (77). La supervivencia global a 5 años de las pacientes con tumores endometrioides es del 78% en estadio I; 63%, en estadio II; 24%, en estadio III; y 6%, en estadio IV (75,77).

- Carcinoma mucinoso. Muestran alto contenido de mucina en el citosol de las células epiteliales. Estos tumores se asemejan al epitelio de los carcinomas de endocérvix, estómago o intestino, y suelen ser más diferenciados que los serosos. En el 80-90% de los casos, son unilaterales y pueden llegar a grandes tamaños. A diferencia de los otros carcinomas, no suelen presentar niveles altos del marcador CA125. El 80% de los carcinomas mucinosos se detectan en estadio I. La respuesta al tratamiento quimioterápico con platino de un tumor mucinoso en estadio avanzado es peor que la de otros tipos histológicos (78). La supervivencia también se ve reducida en comparación con el resto de tumores; la supervivencia global a los 5 años es del 83% en estadio I; 55%, en estadio II; 21%, en estadio III; y 9% en estadio IV (79).

- Carcinoma de células claras. Tienen un gran componente fibromatoso. Las células epiteliales presentan un alto contenido en glicógeno (77). Este tipo histológico está asociado a la endometriosis en el 67% de los casos. Los tumores son principalmente sólidos o quísticos. El 15-20% de estos carcinomas son bilaterales (79). En el 50% de los casos, el marcador CA125 presenta valores superiores a 35 U/mL (73). El 33% de los casos se detectan en estadio I; el 19%, en estadio II; el 29%, en estadio III; y el 9%, en estadio IV. La supervivencia a 5 años es del 69% en las pacientes con estadio I; 55%, en estadio II; 14%, en estadio III; y 4%, en estadio IV (77).

En la Tabla 4 se resumen las características más importantes de los principales tipos histológicos del CO epitelial (70,71,73).

Tabla 4. Clasificación fenotípica y genotípica de los principales tipos histológicos de CO epitelial. Recientemente, el CO seroso de alto grado (HGSOC) y el CO seroso de bajo grado se consideran entidades distintas por presentar características significativamente dispares. Tabla adaptada de Ref. (70,71,73).

Clasificación	CO seroso de alto grado (HGSOC)	CO seroso de bajo grado	CO endometriode	CO mucinoso	CO células claras
Incidencia	70%	<5%	10%	3%	5-10%
Edad media (años)	64	43	40-50	45-50	55
Factores de riesgo	BRCA1/2	-	Síndrome de Lynch	-	Síndrome de Lynch
Lesiones precursoras	Lesiones en la trompa de Falopio	Tumor seroso <i>borderline</i>	Endometriosis	Cistoadenoma/tumor <i>borderline</i>	Endometriosis
Alteraciones genéticas	TP53/BRCA	BRAF, KRAS	PTEN, ARID1A	KRAS, HER2	HNF1b, ARID1A, PI3CA, MET
Patrón de diseminación	Transcelómica muy temprana	Transcelómica	Normalmente confinado en la pelvis	Normalmente confinado al ovario	Normalmente confinado en la pelvis
Quimiosensibilidad	Alta	Intermedia	Alta	Baja	Baja
Pronóstico (Supervivencia global a 5 años)	Malo (15-30%)	Intermedio (40-45%)	Favorable (40-60%)	Favorable (50-65%)	Intermedio (35-50%)

Clasificación del cáncer de ovario epitelial en base al estadio

El estadio tumoral aporta información referente al nivel de diseminación que ha experimentado el tumor ovárico. El estadiaje es el indicador pronóstico más importante y determina el tratamiento de las pacientes. Por ello, es indispensable la rigurosidad con la que se lleva a cabo por parte de los patólogos especialistas (80).

De manera tradicional, el estadiaje del CO se realiza de acuerdo con el sistema de la FIGO, según el cual se distinguen 4 estadios en base a la expansión del tumor ovárico (80). El sistema TNM (Tumor, Nódulo linfático, Metástasis) (81) es un tipo de clasificación reciente que aporta información acerca del estadio del tumor (T), de la afectación positiva o negativa de nódulos linfáticos (N) y de la presencia/ausencia de metástasis distantes (M). Este sistema fue desarrollado por el Comité colectivo americano del cáncer, AJCC (*American Joint Committee on Cancer*), en colaboración con la Unión Internacional contra el Cáncer, UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*). En la Tabla 5 se muestra la última clasificación del CO de la FIGO (2013) y la nomenclatura TNM de la AJCC/UICC (80,81).

Tabla 5. Sistema de estadije de cáncer de ovario, de trompa de Falopio y de peritoneo según la FIGO 2013 y la correspondiente clasificación TNM. Tabla adaptada de Ref. (80,81).

Estadio	Descripción	Clasificación T//N/M (Tumor/Nódulo linfático/Metástasis)
I	Tumor confinado a los ovarios o las trompas de Falopio	T1-N0-M0
IA	Tumor limitado a un ovario (cápsula intacta) o a la trompa de Falopio; ausencia de tumor en la superficie del ovario o de la trompa de Falopio; ausencia de células malignas en el líquido ascítico o en los lavados peritoneales	T1a-N0-M0
IB	Tumor limitado a ambos ovarios (cápsulas intactas) o a las trompas de Falopio; ausencia de tumor en la superficie de los ovarios o de la trompas de Falopio; ausencia de células malignas en el líquido ascítico o en los lavados peritoneales	T1b-N0-M0
IC	Tumor limitado a uno o ambos ovarios o a las trompas de Falopio, además de	T1c-N0-M0
IC1	Derrame quirúrgico	T1c1-N0-M0
IC2	Rotura de la cápsula previamente a la cirugía o bien, presencia de tumor en la superficie del ovario o la trompa de Falopio	T1c2-N0-M0
IC3	Presencia de células malignas en el líquido ascítico o en los lavados peritoneales	T1c3-N0-M0
II	Tumor limitado a uno o ambos ovarios, o bien, las trompas de Falopio con extensión pélvica o carcinoma peritoneal primario	T2-N0-M0
IIA	Extensión y/o implantes en el útero y/o las trompas de Falopio y/o los ovarios	T2a-N0-M0
IIB	Extensión a otros tejidos pélvicos intraperitoneales	T2b-N0-M0
III	Tumor limitado a uno o ambos ovarios, o bien, las trompas de Falopio, o carcinoma peritoneal primario, con extensión citológica e histológicamente confirmada en el peritoneo más allá de la pelvis y/o metástasis en los nódulos linfáticos retroperitoneales	T1/T2-N1-M0
IIIA1	Nódulos linfáticos retroperitoneales positivos (citológica o histológicamente comprobado): IIIA1 (i) Metástasis de 10 mm de dimensión máxima IIIA1 (ii) Metástasis de más de 10 mm de dimensión	T3a1-N0/N1-M0
IIIA2	Metástasis peritoneal extrapélvica microscópica con o sin nódulos linfáticos retroperitoneales positivos	T3a2-N0/N1-M0
IIIB	Metástasis peritoneal macroscópica más allá de la pelvis, de 2 cm de dimensión máxima, con o sin metástasis en los nódulos linfáticos retroperitoneales	T3b-N0/N1-M0
IIIC	Metástasis peritoneal macroscópica más allá de la pelvis, de más de 2 cm de dimensión, con o sin metástasis en los nódulos linfáticos retroperitoneales (incluye la extensión del tumor a la cápsula del hígado y el bazo sin implicación del parénquima)	T3c-N0/N1-M0
IV	Metástasis distante excluyendo las metástasis peritoneales	Cualquier T- Cualquier N- M1
IVA	Derrame pleural con citología positiva	
IVB	Metástasis en el parénquima y metástasis en órganos extra-abdominales (incluye los nódulos linfáticos inguinales y los externos a la cavidad abdominal)	

1.2.6. Presentación clínica del cáncer de ovario

Más del 80% de las pacientes tienen síntomas poco específicos, que no pueden ser utilizados para el diagnóstico, ya que aparecen habitualmente en desórdenes gastrointestinales, genitourinarios y ginecológicos (82). A diferencia de otros cánceres ginecológicos, como el cáncer cervical o el uterino, el sangrado vaginal anormal no suele ser un síntoma de CO. Algunas mujeres experimentan síntomas muy inespecíficos de manera persistente, tales como hinchazón, plenitud gástrica, dispepsia, saciedad precoz, dolor pélvico o abdominal, o bien urgencia o frecuencia urinaria. El signo más común de CO es la hinchazón del abdomen, causada por la acumulación de líquido ascítico (11). El 68% de las pacientes consultan esta serie de síntomas al médico de cabecera en lugar de al ginecólogo y aproximadamente el 85% se acaban diagnosticando en estadios avanzados (11,82). El tiempo promedio que transcurre desde el inicio de la sintomatología hasta el diagnóstico es de 3 a 4 meses aproximadamente. El 10-15% de las pacientes en estadios avanzados no presenta síntomas en el momento del diagnóstico, de modo que el cáncer se detecta en las revisiones ginecológicas rutinarias (82).

1.2.7. Diagnóstico del cáncer de ovario

A pesar del esfuerzo invertido en las últimas décadas para desarrollar nuevos tests de cribado, todavía no existe una técnica eficaz, sensible y precisa que permita detectar el CO en estadios iniciales. En pacientes que no presentan síntomas claros, se aplican distintas pruebas clínicas que permiten detectar una masa inusual e indican lo extendido que puede estar el tumor (11):

Examen pélvico abdominal

Este examen forma parte del control ginecológico rutinario. El examen pélvico abdominal es una evaluación física que proporciona información de la parte baja del abdomen, los genitales externos, el ano, el recto, la vagina, el cérvix, el útero y los ovarios. La sensibilidad y especificidad de esta técnica para detectar una masa pélvica es del 40% y 90%, respectivamente. El examen pélvico abdominal no permite diferenciar entre masas anexiales benignas y malignas (83).

Ecografía transvaginal

La ecografía transvaginal se utiliza en el cribado inicial o como prueba secundaria en mujeres con niveles séricos de CA125 superiores a 35 U/mL. La técnica permite detectar cambios en la morfología y el volumen de los ovarios que no se aprecian con el examen clínico. Los criterios que definen la anormalidad incluyen el volumen y la morfología (un volumen mayor de 20 cm³ en mujeres premenopáusicas y, mayor de 10 cm³ en mujeres posmenopáusicas) (84). A pesar de que la ecografía transvaginal es segura y eficiente, no puede diferenciar entre masas anexiales benignas y malignas. Carece de sensibilidad y especificidad cuando es utilizada sin otras pruebas complementarias (85).

Resonancia magnética nuclear y tomografía computarizada

La resonancia magnética nuclear y la tomografía computarizada son técnicas de imagen no invasivas más sensibles y precisas que la ecografía; las tasas de sensibilidad y especificidad alcanzan el 97 - 84% y el 100 - 40%, respectivamente (85). La capacidad de diagnóstico de CO de la resonancia magnética es elevada, llega al 93% (86). Por ello, las mujeres con bajo riesgo de desarrollar CO que presentan una imagen de ecografía compleja, son sometidas a la resonancia, ya que es más útil para determinar el diagnóstico (85).

Marcador tumoral CA125

La glicoproteína CA125 – codificada por el gen MUC16 – juega un papel importante en la carcinogénesis del ovario y la metástasis, mediando la unión de las células tumorales a las células mesoteliales (87). La utilidad del CA125 como marcador tumoral del CO epitelial data de 1981 (88).

Aunque el test no es útil para el cribado de CO a gran escala, en la práctica clínica, los niveles de CA125 superiores a 35 U/mL en una mujer posmenopáusica son indicativos de que deberían aplicarse más pruebas diagnósticas; los niveles superiores a 65 U/mL en mujeres con presencia de masa pélvica tienen una sensibilidad del 98% en la predicción de malignidad en el ovario (89). En mujeres premenopáusicas, el test es menos fiable porque los niveles de CA125 pueden aumentar por causas distintas al cáncer – menstruación, gestación o enfermedad pélvica inflamatoria, entre otras. En cuanto a la sensibilidad, aunque el marcador se encuentra elevado en el 80% de las pacientes con CO epitelial, sólo el 50% de ellas se encuentran en estadios iniciales de la enfermedad – menos del 50% de las células tumorales expresan CA125 (90). Por otro lado, la especificidad es limitada (50-60%), ya que los niveles de CA125 aumentan en otros cánceres ginecológicos (cáncer de endometrio y de trompas de Falopio), en cánceres no ginecológicos (cáncer de páncreas, de mama, de colon y de pulmón), así como en varias condiciones benignas como la endometriosis, los quistes ováricos, los fibroides uterinos, las disfunciones renales y las enfermedades hepáticas (91).

Actualmente, la mejor aplicación clínica del CA125 es la monitorización del CO, ya que la disminución del CA125 durante la quimioterapia es considerada un factor pronóstico independiente. Además, la combinación de los niveles de CA125 con un examen ginecológico aumenta la capacidad de detección de recidiva en un 92% (92). Por otro lado, el CA125 también ayuda en la predicción de una cirugía citorrreductora óptima. Niveles inferiores a 500 U/mL están asociados a mayor resecabilidad; en cambio, niveles superiores se asocian a la dificultad de conseguir la cirugía óptima y a mayor agresividad del carcinoma (93).

En resumen, actualmente no existe una prueba clínica suficientemente precisa para la detección temprana del CO, pues la combinación del examen pélvico, la ecografía transvaginal y el CA125 diagnostican el CO mayoritariamente cuando éste ya se encuentra en estadios avanzados, resultando en una mortalidad elevada (11). Cabe destacar que a diferencia de otros cánceres, no es posible obtener una biopsia del CO sin la cirugía, ya que una toma de muestra de la masa ovárica implicaría la ruptura de la cápsula del mismo, provocando la diseminación de las células tumorales por el peritoneo. Este hecho dificulta todavía más el diagnóstico y complica la decisión terapéutica que debe tomar el especialista. Hoy en día, el diagnóstico definitivo del CO – tipo histológico, grado y estadio – sólo se consigue con la cirugía citorrreductora. Uno de los objetivos principales de la intervención quirúrgica es obtener biopsias para definir el diagnóstico y, posteriormente determinar el tratamiento. Durante la cirugía se extraen y examinan a nivel histopatológico biopsias de distintas zonas del abdomen y la pelvis, como el omento, la pared peritoneal, los ganglios linfáticos, los ganglios para-aórticos, el mesenterio, el hígado y el diafragma, entre otros. Los resultados de este análisis, junto con el estudio de la presencia de células malignas en el líquido ascítico (si está presente y accesible), son imprescindibles para determinar el diagnóstico (94).

1.2.7.1. Mejora del diagnóstico del cáncer de ovario

El bajo porcentaje de detección del CO en estadios iniciales (15%) pone en evidencia la necesidad de mejorar la detección precoz, pues el diagnóstico en estadios avanzados va estrechamente ligado a la elevada mortalidad de esta neoplasia (95). A lo largo de las dos últimas décadas ha evolucionado la lógica de los estudios de descubrimiento de nuevos

biomarcadores y a día de hoy se considera poco probable que un solo biomarcador permita detectar el CO (83). La sensibilidad y especificidad de un marcador, o la combinación de varios marcadores, para detectar la enfermedad en estadios iniciales deberían ser mucho más altas que las del CA125. En concreto, se requiere una sensibilidad de un 75% y una especificidad de un 99,6% para conseguir como mínimo un valor predictivo positivo del 10% (83).

Recientemente, se está introduciendo en la clínica el marcador HE4 (96), que junto con el CA125 y el algoritmo de riesgo de malignidad ovárica ROMA (*Risk of ovarian malignancy algorithm* – que incluye los valores de CA125 y HE4, la edad de la mujer y el estatus menstrual), mejora la sensibilidad en el diagnóstico de las masas sugestivas de malignidad. Si la sensibilidad de detección es de un 79,3% para el HE4 y un 82,9% para el CA125, aumenta hasta un 90,1% cuando se incluyen los dos marcadores y los criterios ROMA (97). Actualmente, el algoritmo ROMA se encuentra aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*; Administración de alimentación y medicamentos) de los EE.UU. para estimar el riesgo de CO en pacientes que presentan una masa pélvica (98). El inconveniente es que HE4 se encuentra sobre-expresado en otras condiciones benignas y malignas aparte del CO, por lo que limita la especificidad (96).

Por otro lado, el test OVA1 – también aprobado por la FDA – se utiliza para predecir el riesgo de CO en las pacientes que presentan una masa pélvica sospechosa de malignidad. Este test consiste en el análisis de un panel de marcadores (CA125, transtiretina, apolipoproteína A1, microglobulina $\beta 2$ y transferrina) y ha demostrado mejorar parcialmente la sensibilidad en la predicción de malignidad en pacientes con masas ováricas (98).

Sin embargo, a pesar del esfuerzo invertido en las últimas tres décadas, la detección del CO en estadio temprano todavía es un desafío, por lo que se requieren nuevas estrategias que permitan detectar el CO cuando todavía se encuentra confinado en el ovario.

1.2.7.2. Exosomas del aspirado uterino como fuente de biomarcadores de cáncer de ovario

La búsqueda de nuevos biomarcadores para mejorar el diagnóstico precoz del CO está focalizada en muestras biológicas de fácil acceso y poco invasivas, que puedan ser tomadas y analizadas sin la necesidad de intervenir quirúrgicamente. El plasma es la muestra principal que se utiliza para identificar nuevas moléculas asociadas al CO, ya que las proteínas asociadas a las células cancerosas pueden ser secretadas y detectadas en la circulación. Sin embargo, presenta inconvenientes relevantes como es el elevado rango dinámico y la dilución de los marcadores tumorales por la presencia de moléculas mayoritarias que circulan a nivel sistémico (99).

Una muestra biológica que emerge con gran potencial para detectar patologías del tracto genital femenino es el aspirado uterino (AU). El AU es una biopsia endometrial que se obtiene por aspiración, y es considerada una muestra biológica compleja que refleja el medio de la cavidad uterina. El AU está formado por los componentes del fluido uterino (secreciones del epitelio y de las glándulas endometriales, moléculas transudadas selectivamente de la sangre, y componentes del fluido de las trompas de Falopio) y la fracción celular (células endometriales, células ováricas, células de las trompas y células sanguíneas) (100). Gracias a su localización y composición, el AU refleja las alteraciones citológicas y moleculares presentes en los tejidos del tracto genital femenino (101,102). En la práctica clínica, tras la ecografía transvaginal, esta muestra se examina histopatológicamente de manera rutinaria para definir el diagnóstico de desórdenes endometriales (103). En concreto, se ha descrito el uso del AU como herramienta diagnóstica en el cáncer de endometrio (101,102,104).

Existen estudios que apoyan el uso de distintas muestras de la cavidad uterina para detectar lesiones extra-uterinas como el CO. Por un lado, se ha podido detectar la presencia de células tumorales procedentes del ovario y las trompas de Falopio en el útero. Por otro lado, el estudio del ADN contenido en citologías cervicales también ha demostrado tener un valor predictivo del CO (105–107). Asimismo, dado que recientemente se cree que el origen del CO seroso podría encontrarse en el útero, el estudio de la cavidad uterina emerge como una nueva aproximación para detectar el CO (108). Aunque actualmente el AU no se extrae en la práctica clínica para diagnosticar el CO, podría ser considerado como una muestra poco invasiva representativa de la enfermedad debido a la proximidad de los ovarios con la cavidad uterina y el contenido de las trompas de Falopio – el cual está asociado al CO seroso según la teoría dualista. Por consiguiente, el AU surge como una nueva muestra poco invasiva con potencial para la búsqueda de nuevos biomarcadores de diagnóstico del CO.

De la misma manera que sucede con otros fluidos biológicos (sangre, líquido ascítico y orina, entre otros), el AU presenta proteínas con un elevado rango dinámico, proteínas de alta abundancia procedentes de la sangre – como la albúmina, las gamma globulinas y la hemoglobina. Estas proteínas pueden enmascarar la detección y el análisis de proteínas menos abundantes, que son normalmente los candidatos más prometedores en el descubrimiento de biomarcadores (109). Para superar esta limitación y a la vez expandir la investigación de nuevos marcadores, los exosomas presentes en el AU emergen como una alternativa muy útil por diversos motivos: reducen la cantidad de proteínas altamente abundantes; enriquecen la muestra en proteínas de baja abundancia con significancia fisiopatológica y otros componentes moleculares (ADN, ARNm y miARN); y presentan estabilidad debido a la membrana lipídica. De hecho, a día de hoy ya hay algunos estudios que han detectado marcadores genéticos y proteómicos de patologías ginecológicas en exosomas derivados del tracto genital femenino (110). Por consiguiente, dado que los exosomas presentes en la fracción fluídica de los AUs representan las células de origen (111), pueden ser considerados una nueva fuente de biomarcadores con gran potencial para mejorar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de alteraciones ginecológicas como el CO.

En el siguiente apartado se describen brevemente los exosomas, su biogénesis, contenido y métodos de aislamiento, así como sus funciones y aplicaciones clínicas.

1.2.7.2.1. Exosomas

1.2.7.2.1.1. Tipos de vesículas extracelulares y definición actual de exosoma

La comunicación intercelular es esencial para el desarrollo celular y el mantenimiento de la homeostasis en los organismos pluricelulares. Dicha comunicación puede tener lugar, entre otras vías, mediante el transporte de moléculas de señalización en vesículas extracelulares. Las vesículas extracelulares están formadas por una bicapa lipídica y se originan en compartimentos intracelulares o en la membrana plasmática. Las células pueden secretar al medio extracelular distintos tipos de vesículas membranosas, que han recibido múltiples nombres a lo largo de la bibliografía debido a la variedad en tamaño, origen, naturaleza y características. Concretamente, en base a: i) su tamaño, se han denominado: micropartículas, microvesículas, nanovesículas o nanopartículas; ii) su origen: prostasomas u oncosomas; iii) sus funciones: vesículas de matriz calcificantes, argosomas o tolerosomas; y finalmente, en base a iv) su presencia dentro o fuera de las células: ectosomas, exosomas, exovesículas o vesículas semejantes a exosomas (112). En consecuencia, para unificar la diversidad en la nomenclatura, la Sociedad Internacional para las Vesículas Extracelulares (*International*

Society for Extracellular Vesicles, ISEV) denomina de manera colectiva **vesículas extracelulares** a todas estas vesículas membranosas secretadas al medio extracelular (113).

El tamaño, contenido y composición de la membrana de las vesículas extracelulares son heterogéneos y dinámicos, pues varía en función de la célula de origen, su estado y las condiciones concretas del medio extracelular donde se encuentra (114). Las vesículas extracelulares se clasifican en dos categorías distintas en base a su origen subcelular: los cuerpos multivesiculares (*Multivesicular bodies*, MVBs) o bien, la membrana plasmática (Figura 9) (115,116).

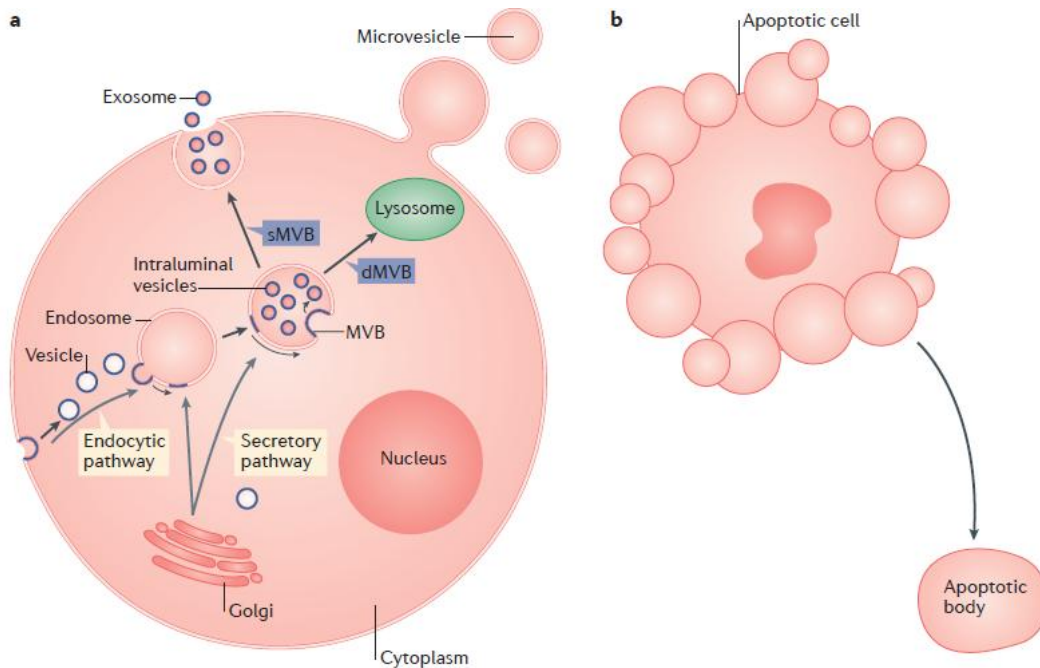


Figura 9. Formación de vesículas extracelulares y liberación al medio extracelular. a) Las vesículas que se originan por endocitosis en la membrana plasmática y las que se generan a partir del aparato de Golgi se fusionan con la membrana de los compartimentos endosomales. Estos compartimentos invaginan hacia el lumen endosomal y forman los cuerpos multivesiculares (“Multivesicular bodies”, MVBs) con vesículas intraluminales (“Intraluminal vesicles”, ILVs) en su interior. Los MVBs pueden seguir la vía de degradación (dMVBs) o la vía secretora (sMVBs). El contenido de los dMVBs es degradado tras fusionarse con los lisosomas. En cambio, los sMVBs son la fuente celular de los exosomas; se fusionan con la membrana plasmática y se liberan al medio las ILVs, que son entonces denominadas exosomas. En contraposición con los exosomas, las microvesículas (MVs) se forman por gemación de la membrana plasmática. **b)** Una célula que sufre apoptosis da lugar a cuerpos apoptóticos que emergen de la membrana plasmática. Imagen adaptada de Ref. (116).

Existen tres tipos de vesículas extracelulares en base a su biogénesis o mecanismo de liberación al medio extracelular: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos.

Los **exosomas** fueron descritos inicialmente en 1983 como vesículas membranosas secretadas durante el proceso de maduración de los reticulocitos hacia eritrocitos. En un principio se creía que la función de los exosomas consistía en la eliminación de moléculas poco útiles para las células maduras (117), lo que llevó a la interrupción de su estudio en los años siguientes. En 1987 se introdujo el término “exosoma” por primera vez, cuando las vesículas secretadas por los reticulocitos fueron aisladas por centrifugación a 100.000 g y se describieron otras proteínas diferentes al TfR en su interior (118). Posteriormente, a partir de 1996, la investigación de los exosomas creció de manera exponencial tras los descubrimientos de Raposo et al., quienes los describieron como importantes mediadores de la comunicación intercelular en la respuesta inmune adaptativa (119). Actualmente, se consideran “exosomas”

las vesículas membranosas esféricas de 20-200 nm (120) que se forman en los compartimentos endosomales y son liberadas al medio tras la fusión de los MVBs con la membrana plasmática (112).

Las **microvesículas** (MVs) son vesículas membranosas de 100-1.000 nm que se liberan directamente de la membrana plasmática por procesos similares a la gemación (112). Las MVs se forman normalmente en los microdominios de las balsas lipídicas presentes en la membrana plasmática. Las MVs presentan en la membrana un núcleo denso en electrones y exponen fosfatidilserina en la cara externa, permitiendo la unión a Anexina V. Su contenido depende en gran medida del origen celular, aunque se ha visto que contienen habitualmente: glicoproteínas (GPIb, GPIIb y GPIIIa), P-selectina e integrinas. A diferencia de los exosomas, están menos enriquecidas en tetraspaninas (121). Las MVs transportan proteínas y lípidos específicos, y las liberan a las células diana, desencadenando así una respuesta celular determinada (114).

Los **cuerpos apoptóticos** son vesículas heterogéneas de tamaño variable entre 50 y 5.000 nm que comparten ciertas características con las MVs (122). La apoptosis y la consiguiente fagocitosis de la célula apoptótica son procesos esenciales durante el desarrollo embrionario, el crecimiento y el mantenimiento de organismos multicelulares. Además, la apoptosis asegura la retirada selectiva de células aberrantes, dañadas o infectadas presentes en tejidos sanos (121). Durante la apoptosis, las células liberan al medio extracelular este tipo de vesículas a partir de la membrana plasmática, que exponen fosfatidilserina en su superficie, y que contienen principalmente ADN, ARN e histonas. Estas vesículas no tienen una función en la comunicación celular, sino que son presentadas a los macrófagos para inducir su fagocitosis y la consecuente retirada del medio (122).

En la Tabla 6 se resumen las características de las principales vesículas extracelulares – exosomas, MVs y cuerpos apoptóticos (123).

Tabla 6. Características físico-químicas y moleculares de las principales vesículas extracelulares – exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Se describe su tamaño, morfología, densidad, velocidad de sedimentación, biogénesis, marcadores moleculares y contenido. ND: No determinado. Tabla adaptada de Ref. (123).

Tipo de vesícula extracelular	Exosoma	Microvesícula	Cuerpo apoptótico
Tamaño	20-200 nm	100-1.000 nm	50-5.000 nm
Morfología	Esférica	Irregular	Heterogénea
Densidad	1,13-1,19 g/mL	ND	1,16-1,28 g/mL
Velocidad de sedimentación	100.000 g	10.000 g	1.200-100.000 g
Biogénesis	Vía endolisosomal; gemación intraluminal de MVBs y fusión de éstos con la membrana plasmática	Membrana plasmática; gemación/fusión de la membrana hacia el exterior	Membrana plasmática; evaginaciones esféricas de la membrana que ocurren previamente a la cariólisis y la separación de fragmentos celulares durante la apoptosis
Marcadores moleculares	Tetraspaninas (CD9, CD63, CD81, CD82), ALIX, TSG101, Flotilina-1, componentes ESCRT, MFGE8, LAMP1 y LAMP2	Integrinas, selectinas y ligando CD40	Grandes cantidades de fosfatidilserina
Contenido	ARNm, miARN, ARN no codificante, proteínas citosólicas y transmembrana (incluyendo receptores y MHC)	ARNm, miARN, ARN no codificante, proteínas citosólicas y proteínas transmembrana (incluyendo receptores)	Citoplasma con orgánulos empaquetados, ARN, ADN e histonas

En la actualidad, no existe consenso en la nomenclatura de las vesículas extracelulares ni en la definición exacta de cada tipo de vesícula debido a que se utilizan distintos métodos de purificación y caracterización a escala mundial (124). En consecuencia, uno de los retos actuales de la ISEV es establecer una serie de directrices que se apliquen internacionalmente para la nomenclatura, la definición y el método de purificación de cada tipo de vesícula. Esto permitirá describir de forma precisa el tipo de vesícula en el cual está enriquecida cada preparación y la función que pueda tener en condiciones fisiológicas.

De ahora en adelante, se describen los exosomas con más profundidad, ya que son las vesículas extracelulares con mayor especificidad en términos de composición y de funciones biológicas (122).

1.2.7.2.1.2. Biogénesis de los exosomas

El origen de los exosomas es intracelular; se forman durante la maduración de los endosomas tempranos hacia endosomas tardíos (115). La gemación de la membrana de los endosomas tempranos hacia su lumen da lugar a las vesículas intraluminales (*Intraluminal vesicles*, ILVs). Durante las invaginaciones endosomales, se engloban moléculas específicas citosólicas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, glúcidos y metabolitos) de manera controlada y dirigida, para posteriormente desempeñar una función determinada en las células receptoras. En este punto, los endosomas son denominados endosomas multivesiculares (*Multivesicular Endosomes*, MVEs) o MVBs. El principal destino de los MVBs es la degradación tras la fusión con los lisosomas – compartimentos ácidos que contienen hidrolasas. Pero en otros casos, los MVBs se fusionan con la membrana plasmática; el contenido de estos compartimentos es liberado al medio extracelular, y las ILVs que estaban contenidas se secretan y son denominadas exosomas (112,125). Por lo tanto, las células contienen distintas subpoblaciones de MVBs, algunos destinados a la vía de degradación (dMVBs) y otros destinados a la secreción (sMVBs) y la subsiguiente comunicación intercelular. La biogénesis de los exosomas resulta en una topología específica de estas vesículas; la orientación de la membrana de los exosomas es idéntica a la de la membrana plasmática y engloba una fracción del citoplasma de la célula de origen (125).

Las ILVs y los MVBs pueden ser formados mediante mecanismos dependientes o independientes del complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) (125).

Mecanismos dependientes de la maquinaria ESCRT

El mecanismo más conocido de formación de las ILVs y los MVBs está dirigido por la maquinaria ESCRT, que está compuesta por 30 proteínas aproximadamente, que forman 4 tipos distintos de complejos ESCRT (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II y ESCRT-III) con proteínas asociadas a dichos complejos (VPS4, VTA1 y ALIX, también llamado PDCD6IP). La maquinaria ESCRT se encarga de la unión, selección y agrupación de receptores y proteínas ubiquitinizadas. Más concretamente, el complejo ESCRT-0 reconoce y secuestra proteínas transmembrana ubiquitinizadas en la membrana endosomal, mientras que los complejos ESCRT-I y ESCRT-II son responsables de la deformación de la membrana y la formación de invaginaciones con carga específica. Finalmente, el complejo ESCRT-III permite el cierre y escisión de las ILVs de la membrana endosomal (126). Este mecanismo de formación de ILVs está conservado desde levaduras hasta mamíferos (125).

Aunque todavía no son bien conocidos los mecanismos de incorporación de proteínas citosólicas en las ILVs, se ha visto que HSC70 tiene un papel importante en este proceso (125). Por otro lado, se ha observado que el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII)

presenta una secuencia de ubiquitinación que permite la incorporación en las ILVs, aunque esta proteína también se engloba en los exosomas aún careciendo de este sitio de ubiquitinación (127). En cuanto a la inclusión de moléculas de ARN en las ILVs, ESCRT-II es un complejo de unión a ARN (128), por lo que puede actuar como punto de anclaje en la incorporación selectiva de este tipo de moléculas.

Mecanismos independientes de la maquinaria ESCRT

Existen evidencias de que las ILVs y los MVBs pueden ser formados en ausencia de la función ESCRT, pues se ha visto que la inactivación o depleción concomitante de 4 proteínas pertenecientes a los 4 complejos ESCRT no suprime la formación de MVBs (129). Las tetraspaninas, las glicoproteínas y los lípidos están implicados en la formación de ILVs al margen de la función de ESCRT. Concretamente, se han descrito diferentes procesos que actúan independientemente de la maquinaria ESCRT y que tienen un papel en la biogénesis de los exosomas: i) La oligomerización de complejos de tetraspaninas permite la formación de vesículas intracelulares. Se ha demostrado que CD63 es esencial para la formación de ILVs de pequeño tamaño (<40 nm), independientemente de HRS en MVBs (130,131). ii) La implicación de microdominios de glicoproteínas como las balsas lipídicas participan en la formación de ILVs (121). iii) La conversión de esfingomielina en ceramida por parte de las esfingomielinasas en la membrana endosomal es clave para la formación de ILVs (130). iv) La formación de ácido fosfatídico tras la hidrólisis de fosfatidilcolina que realiza la fosfolipasa D2 también induce la formación de MVBs (132). v) La ceramida es clave para dirigir los MVBs hacia la ruta secretora en lugar de la vía de degradación lisosomal (130).

Existen varios estudios que reafirman la biogénesis de exosomas mediante mecanismos independientes de ESCRT. Concretamente, la inhibición de esfingomielinasas con inhibidores sintéticos disminuye la secreción de exosomas que contienen proteínas proteolipídicas (PLPs), proteínas exosomales clásicas (CD63, CD81 o TSG101) y miARNs (129). Por otra parte, se ha descrito que la sobre-expresión de CD9 o CD82 (pero no CD63) induce la secreción de exosomas con β -catenina, generados a través de un mecanismo dependiente de ceramida (133). Finalmente, los dominios de membrana enriquecidos en CD81 funcionan como plataformas para proteínas exosomales y facilitan la internalización de moléculas celulares específicas al margen de la función ESCRT (134).

1.2.7.2.1.3. Secreción de los exosomas al medio extracelular

Para la movilización de los MVBs secretores hacia la periferia celular, la unión y fusión con la membrana plasmática, se requiere la actuación de múltiples componentes celulares: el citoesqueleto (actina y microtúbulos), motores moleculares asociados (quinesinas y miosinas), pequeñas GTPasas y la maquinaria de fusión SNARE (*Soluble NSF attachment protein receptor*) (135).

Las tetraspaninas y las GTPasas RAB están implicadas tanto en la biogénesis como en la secreción de exosomas (125). Por un lado, se ha visto que los dominios transmembrana de las tetraspaninas CD63 y CD81 son claves en la selección de la carga de los exosomas para su secreción, independientemente de la maquinaria ESCRT (134,136). Por otro lado, las proteínas RAB son esenciales en la regulación del transporte de vesículas intracelulares. Concretamente, RAB11, RAB27, RAB35 y RAB7 están implicadas en la gemación de vesículas, su movilidad mediante interacción con el citoesqueleto y la unión de las vesículas a las membranas celulares (112); contribuyen a dirigir los MVBs hacia la membrana plasmática (137–139), o bien hacia los lisosomas para su degradación (116) (Figura 10).

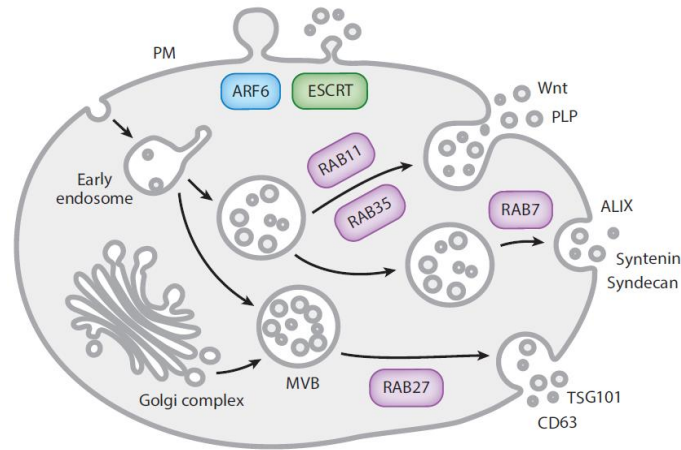


Figura 10. Mecanismos moleculares de secreción de exosomas y otras vesículas extracelulares. Se han descrito múltiples maquinarias de secreción. RAB11, RAB27, RAB35 y RAB7 actúan a lo largo de la vía endocítica uniéndose a los MVBs y promueven su unión con la membrana plasmática, permitiendo así la secreción de exosomas. En el caso de las vesículas derivadas de la membrana plasmática, ARF6 (factor 6 ADP-ribosilación) y componentes de la maquinaria ESCRT (incluyendo ALIX y TSG101, pero ningún componente de ESCRT-0), regulan su liberación hacia el medio extracelular. Imagen adaptada de Ref. (112).

En la actualidad, todavía no está descrito el mecanismo mediante el cual se fusionan los MVBs con la membrana plasmática para liberar los exosomas. Se cree que la maquinaria que dirige esta fusión es el complejo SNARE (formado por VAMP7 y sinaptotagmina VII de unión a Ca^{2+}), el cual está asociado a la exocitosis convencional de los lisosomas regulada por calcio (135). La secreción de exosomas puede ser espontánea o bien, inducida por distintos cambios del entorno celular, como es la presencia de ligandos específicos o condiciones de estrés (112).

1.2.7.2.1.4. Recepción de los exosomas en la célula receptora

Los exosomas se adhieren a las células diana con alta especificidad vía moléculas de adhesión y receptores específicos, y entran principalmente por fusión con la membrana plasmática o por endocitosis (119,140). Las células dendríticas y los macrófagos son los principales tipos de células receptoras de exosomas, probablemente debido a su elevada capacidad fagocítica. De hecho, la fosfatidilserina presente en la superficie exosomal es un punto de anclaje para los fagocitos (141). Otras células que pueden capturar vesículas extracelulares son los linfocitos T activados, que internalizan vesículas procedentes de células dendríticas mediante LFA-1 (142).

En general, las principales moléculas implicadas en la recepción de exosomas son las tetraspaninas, las integrinas, los proteoglicanos y las lectinas (140). Se conoce que la expresión diferencial de tetraspaninas en la superficie de los exosomas pueden influenciar en la selectividad de las células diana, pues estas proteínas están implicadas en la adhesión celular y en la fusión de los MVBs con la membrana plasmática (143). Por otra parte, los heparán sulfato proteoglicanos presentes en la superficie celular también tienen un papel importante en la captación de exosomas, ya que las células con capacidad reducida de producir estas moléculas presentan una tasa baja de internalización de exosomas (144). Finalmente, se ha visto que los receptores de lectinas de superficie celular se unen a MUC1 – presente en la superficie exosomal –, mediando así la entrada de exosomas en las células receptoras (140).

La internalización de exosomas es un proceso específico que depende del estatus de señalización de las células receptoras, así como de las proteínas transmembrana que éstas

presentan y de las proteínas de superficie exosomales. En algunos casos, la unión de las vesículas a la membrana plasmática de las células receptoras no es suficiente, y el contenido debe ser transferido al interior de las células. Dependiendo del tipo de célula diana, la internalización de las vesículas puede ocurrir mediante distintos procesos: i) fagocitosis dependiente de dinamina, PI3K o polimerización de actina, en el caso de macrófagos; ii) endocitosis mediada por receptor; iii) fagocitosis en compartimentos ácidos en células dendríticas; iv) macropinocitosis dependiente de dinamina (pero independiente de receptor) en células microgliales; v) fagocitosis dependiente de dinamina y polimerización de actina, y endocitosis dependiente de clatrina en el caso de neuronas; vi) endocitosis independiente de clatrina, pero dependiente de colesterol y balsas lipídicas en células endoteliales y tumorales; o bien, vii) endocitosis dependiente de caveolas en células epiteliales. Cabe destacar que la entrada de las vesículas en las células receptoras es diferente en función del tamaño de las partículas; las vesículas extracelulares de gran tamaño o los agregados de vesículas pequeñas probablemente inducen la fagocitosis, mientras que las vesículas pequeñas o individuales pueden ser internalizadas mediante fusión de membranas o endocitosis. En la recepción de las vesículas endocitadas participan el citoesqueleto de actina, la actividad PI3KA y la función de dinamina-2. Una vez las vesículas extracelulares entran en la célula diana, las moléculas señal que se transportan desencadenan una respuesta celular y luego, las vesículas pueden ser degradadas vía lisosomas, o bien se reutilizan los componentes para la fisiología celular (140).

Habitualmente, la liberación del contenido exosomal desencadena cambios en la expresión génica, así como la activación y supresión de vías moleculares específicas. Los mensajes transmitidos están asociados a proliferación, división, supervivencia, diferenciación, respuesta a estrés y apoptosis, entre otros procesos celulares (114). Alternativamente, en ciertos casos se ha observado que simplemente el contacto superficial de los exosomas con las células receptoras puede ser suficiente para desencadenar una respuesta fisiológica (140).

1.2.7.2.1.5. Composición de los exosomas

Debido a la heterogeneidad asociada a los métodos de aislamiento, el origen celular y las condiciones fisiológicas, todavía hoy no se conoce con exactitud la composición molecular de los exosomas y el resto de vesículas extracelulares. La información acerca del contenido de los exosomas está recogida en una base de datos de acceso libre denominada “ExoCarta” (145), la cual se ha incorporado recientemente a una base de datos más extensa que incluye datos de otras vesículas extracelulares, “Vesiclepedia” (146). Dichas bases de datos se encuentran en constante actualización y ofrecen información básica de la composición común de los exosomas a nivel de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y glúcidos, que se describe a continuación.

Proteínas

De acuerdo con ExoCarta, en la actualidad se han registrado aproximadamente 9.970 proteínas en los exosomas (145). Los estudios proteómicos iniciales han demostrado que los exosomas contienen un grupo específico de proteínas que se encuentran en la mayoría de este tipo de vesículas independientemente de la célula de origen. La composición básica de los exosomas a nivel de proteínas es similar a la de los endosomas. Concretamente, los exosomas están enriquecidos en tetraspaninas, principalmente CD9, CD63 y CD81 y, de manera secundaria, también contienen CD82, CD55 y CD59 (114). Las tetraspaninas funcionan como punto de anclaje para otras proteínas en la membrana exosomal. Los exosomas también contienen proteínas asociadas a la biogénesis de los MVBs, como ALIX y TSG101, y proteínas RABs (RAB2, RAB5c, RAB10 y RAB7), que están implicadas en el transporte y la fusión de membranas intracelulares juntamente con las anexinas (anexina I, II, IV, V, VI, VII y XI). Además, también contienen proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins*, HSPs)

implicadas en la presentación de antígenos (HSP70 y HSP90), enzimas metabólicas (GAPDH, endolasa-1, peroxidasas, piruvato y lípido quinasas), proteínas ribosomales, proteínas del citoesqueleto (tubulina, actina y proteínas de unión a actina), proteínas ARF (ARF3, ARF5 y ARF6), MHC I, MHC II, proteínas relacionadas con la transducción de señales (proteína quinasas, ATPasas y GTPasas), SNAREs, integrinas ($\alpha 3$, $\alpha 4$, αM , αL , $\beta 1$ y $\beta 2$), lactadherina, ubiquitina, trombospondina, otras proteínas de membrana plasmática y otras proteínas citosólicas (114,147,148).

Existen estudios que han encontrado algunas de las proteínas anteriormente descritas en otros tipos de vesículas extracelulares. En este sentido, parece que TSG101, CHMP2A y RAB11B son proteínas más específicas de exosomas que ALIX, CHMP4B, RAB11A y RAB5, las cuales están presentes en varias subpoblaciones de vesículas extracelulares. Otros estudios también indican que la tetraspanina CD63 es mucho más específica de exosomas que CD9 (149).

Ácidos nucleicos

El ARN de los exosomas es de tamaño inferior a las 700 bases. En el lumen de los exosomas se ha observado ARNm intacto, fragmentos de ARNm, ARN no codificante largo, fragmentos de ARN de transferencia (ARNt), ARN asociado a Piwi, microARN (miARN) y ARN ribosomal (ARNr). La mayoría de estudios reportan ausencia o pequeñas cantidades de ARNr 18S y 28S en los exosomas, aunque estudios recientes han detectado cantidades altas mediante secuenciación de nueva generación (114,150).

Se ha visto que ciertas moléculas de ARNm son preferencialmente secretadas vía exosomas y en cambio, otras son retenidas en el interior de las células de origen. Es decir, sólo viajan aquellas cadenas de ARNm que señalarán de manera específica las células diana. De hecho, varios estudios han descrito que los ARNm que transportan los exosomas son totalmente funcionales, pues pueden ser traducidos a proteína cuando llegan a las células receptoras (150). De manera similar, los miARNs son incorporados selectivamente en los exosomas para modificar de manera controlada la expresión génica de las células receptoras. Se ha descrito que ciertas familias de miARNs – miR-320 y miR-150 – son preferencialmente cargadas en los exosomas (151). También se ha observado que los diferentes tipos de vesículas extracelulares transportan distintos grupos de miARNs, lo cual sugiere que existen diversos sistemas de selección de miARNs. Aunque no se conoce el mecanismo concreto de incorporación de miARNs en los exosomas, recientemente se ha observado que algunas secuencias específicas pueden actuar como elementos *cis* para ser dirigidos a las ILVs. Por otro lado, se ha descrito que en los MVBs se acumula el complejo RISC cargado con miARNs, y que en muchos casos los exosomas se encuentran enriquecidos en GW182 y AGO2, por lo que se postula que estas proteínas podrían estar implicadas en la selección e incorporación selectiva de miARNs en los exosomas. Por ahora se cree que los miARNs son cargados en las ILVs mediante la esfingomielinasa neural 2, ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas sumoiladas y el complejo RISC (128).

A diferencia del ARN exosomal, el ADN ha sido menos estudiado. Aún así, en los exosomas se ha reportado la existencia de ADN de cadena sencilla, ADN mitocondrial (ADNmt) y ADN de doble cadena, representando el ADN genómico. La migración del ADNmt mediante exosomas representa una vía de difusión de distintas patologías (114).

Lípidos

Existen pocos estudios en los que se haya analizado la composición lipídica de los exosomas (130,152,153). Los exosomas se encuentran enriquecidos en lípidos presentes en los endosomas y en la membrana de las células de origen: colesterol, glicofosfolípidos,

fosfoglicéridos, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol, ácidos grasos saturados (y monoinsaturados, minoritariamente) (114,147,154). Los exosomas están enriquecidos en ceramida y sus derivados (130,152), así como también en el gangliósido GM3 y la esfingomielinina, que son responsables del grado de rigidez de la membrana exosomal (152,153). En cambio, el ácido lisobisfosfatídico (LBPA) se encuentra a niveles bajos o casi nulos (153), aunque curiosamente este lípido está presente en las ILVs y es esencial para la formación de las vesículas junto con ALIX (155). La fosfatidilserina se encuentra de manera natural en la parte citosólica de la membrana plasmática y también se expresa en la superficie de los exosomas, donde permite la unión de proteínas externas, la señalización y la unión de las vesículas a la membrana plasmática de las células receptoras (130). De manera similar a la membrana plasmática, los exosomas también contienen balsas lipídicas, que contienen proteínas como las flotilinas (121). Aparte de esta composición basal, se ha visto que en función del estado de la célula de origen, se internalizan distintos lípidos de manera selectiva. En los últimos años ha habido un interés creciente en la metabolómica de lípidos exosomales, ya que desempeñan distintas funciones a nivel celular y fisiológico (114); de acuerdo con ExoCarta, se han registrado 1.115 lípidos en los exosomas (145).

Glúcidos

En la última década se han realizado algunos estudios dirigidos a conocer la composición glucídica y el papel de los glicanos y las proteínas de unión en la biogénesis y recepción de los exosomas (156); no obstante, existen pocos estudios en este campo. Los exosomas contienen distintas glicoproteínas y glicolípidos que normalmente se encuentran presentes en los endosomas. Las modificaciones que presentan en los oligosacáridos también reflejan las células de origen y sus funciones. Se ha descrito que el glicocáliz está especializado en función de las condiciones fisiológicas en que se generan los exosomas y el entorno de las células diana (156). Los oligosacáridos de los exosomas son las moléculas que interactúan de manera directa con los receptores de las células diana. Y a su vez, se ha visto que los carbohidratos de superficie de las células receptoras pueden regular la entrada de las vesículas (144). Algunas de las proteínas celulares glicosiladas que se encuentran en el interior y en la superficie de los exosomas son las tetraspaninas y las proteínas ligadas a grupos glicofosfatidil inositol (156). En el terreno del cáncer, se ha visto que la invasión de las células tumorales inducida por exosomas es dependiente de la glicosilación de CD147 (EMMPRIN) – una glicoproteína presente en la superficie exosomal que activa la síntesis de MMPs. EMMPRIN presenta múltiples puntos susceptibles a la N-glicosilación a lo largo de su secuencia, y se ha observado que la glicosilación aumentada de la proteína induce la interacción con elementos de superficie de las células tumorales, desencadenando su internalización y el subsiguiente desarrollo del fenotipo pro-invasivo (156).

En la Figura 11, se representa el exosoma de manera esquemática con los componentes principales (112).

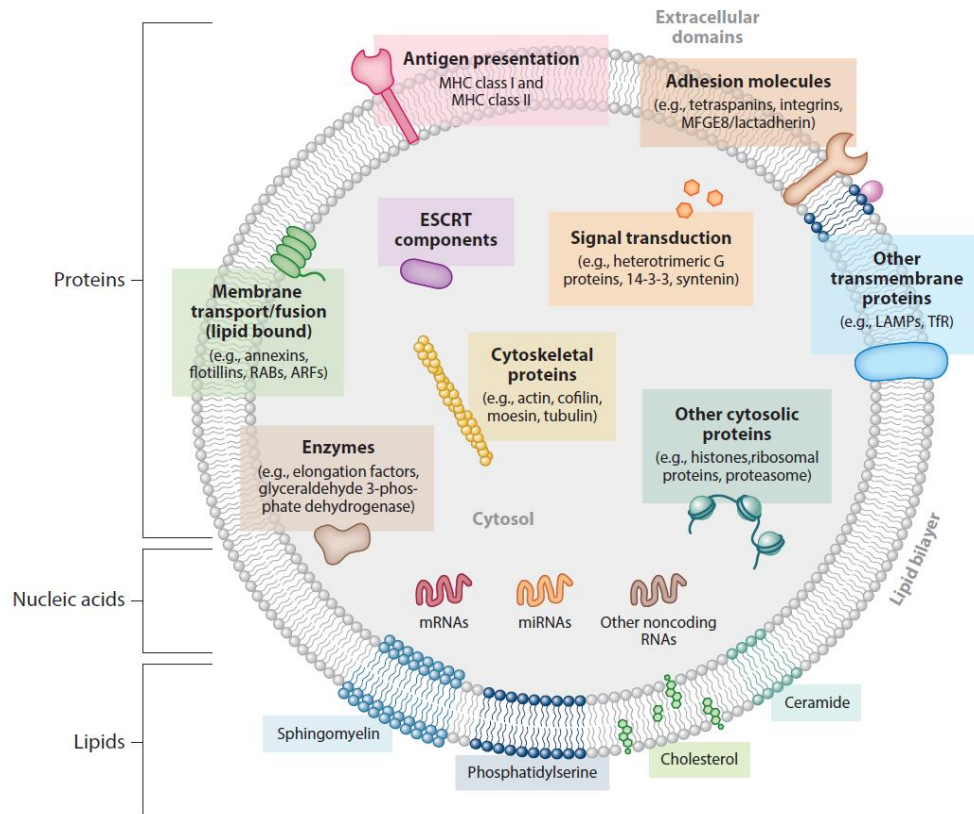


Figura 11. Composición global de las vesículas extracelulares, principalmente exosomas. Representación esquemática de la composición (familias de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) y la orientación de la membrana. Algunas de las proteínas que se representan no se encuentran en exosomas, sino en vesículas derivadas de membrana plasmática y/o cuerpos apoptóticos principalmente (histonas, componentes del proteasoma y de los ribosomas). Imagen adaptada de Ref. (112).

1.2.7.2.1.6. Aislamiento de los exosomas

A día de hoy, todavía no existe un consenso por parte de la comunidad científica en referencia a la metodología de aislamiento de exosomas. De modo que la estandarización de los métodos de aislamiento y caracterización posterior se considera un reto por conseguir en este campo (157). A continuación se describen los principales métodos de aislamiento que pueden ser utilizados para aislar exosomas a partir de biofluidos o medio de cultivo celular. Diferenciamos dos grandes bloques metodológicos: i) métodos basados en la ultracentrifugación y ii) métodos basados en procedimientos diferentes a la ultracentrifugación.

i) Métodos basados en la ultracentrifugación

Ultracentrifugación estándar

La ultracentrifugación es el método mediante el cual se aislaron por primera vez los exosomas procedentes de reticulocitos (118). En este método, la fuerza centrífuga se utiliza para sedimentar las vesículas en solución. La separación de distintos tipos de vesículas presentes en la muestra se basa en la diferencia de tamaño y de densidad; las partículas más grandes y densas migran hacia la parte inferior del eje de la centrifuga, mientras que las más pequeñas y menos densas migran hacia la parte superior. Las vesículas más pequeñas – incluyendo los exosomas – sedimentan por ultracentrifugación a 100.000 g. Para evitar la fragmentación y precipitación de las vesículas de tamaño superior a los exosomas con la ultracentrifugación directa, es esencial aplicar previamente centrifugaciones sucesivas a velocidad creciente.

Normalmente, se realiza una primera centrifugación a 300 g para eliminar células, otra centrifugación a 2.500 g para descartar restos celulares, y una centrifugación a 10.000 g para descartar las MVs. Los parámetros de ultracentrifugación deben ser definidos para cada tipo de muestra de partida, ya que en este tipo de aislamiento afecta el volumen inicial, el volumen de la fracción de vesículas, la viscosidad, la temperatura del fluido, el tiempo de centrifugación y el tipo de rotor utilizado (126,158). Los métodos basados en la ultracentrifugación estándar permiten el enriquecimiento de la muestra en exosomas en base al tamaño, pero hay que tener en cuenta que otras vesículas de tamaño similar y agregados proteicos pueden co-sedimentar (157). Asimismo, los procedimientos basados en la ultracentrifugación no permiten conseguir una separación absoluta de las vesículas extracelulares en base al tamaño porque su sedimentación también depende de su densidad individual y de la carga que transportan. Por otro lado, la agregación de exosomas puede interferir en la separación de las vesículas (158).

La separación de los exosomas y las MVs se considera un gran desafío, pues su tamaño solapa (de 100 a 200 nm aproximadamente), especialmente cuando la muestra de partida es un fluido corporal (122,159). Por ello es necesario caracterizar posteriormente las preparaciones obtenidas con varias técnicas para afirmar que la población de vesículas está compuesta por exosomas en su gran mayoría.

Filtración seguida de ultracentrifugación

La filtración del fluido a través de filtros de 0,2 μm tras la precipitación de MVs a 10.000 g permite eliminar vesículas de gran tamaño ($> 200 \text{ nm}$) antes de iniciar la ultracentrifugación. La filtración reduce la contaminación de otras vesículas, aunque con este paso adicional, los exosomas de gran tamaño no quedan incluidos en el *pellet* final (158).

Ultracentrifugación en colchón de sacarosa y en gradiente de sacarosa

La **ultracentrifugación en colchón de sacarosa al 30%** con agua pesada (óxido de deuterio, D_2O) permite aislar los exosomas en base al tamaño y a la densidad característica de este tipo de vesículas (1,13-1,19 g/mL). Dicho procedimiento se aplica en estudios que requieren una pureza elevada (114,119,127).

En la mayoría de estudios, las vesículas recogidas en el rango de 1,13-1,19 g/mL del colchón de sacarosa se analizan de manera conjunta. Sin embargo, se ha visto que el contenido de esta fracción todavía presenta heterogeneidad, pues contiene cuerpos apoptóticos, fragmentos membranosos y agregados solubles de proteína y de proteína-ARN. Así, en caso de requerir un grado de pureza muy elevado, se puede realizar la **ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa**, con distintos rangos de densidad, en cada uno de los cuales se separan distintos componentes. Se ha visto que los exosomas se encuentran enriquecidos en la fracción de densidad 1,08-1,22 g/mL (157). Cabe destacar que este procedimiento presenta varios inconvenientes: consume mucho tiempo (16 h, y hasta 62-90 h), es tedioso y requiere una gran cantidad de material de partida para obtener un rendimiento mínimo (121,157).

En la Tabla 7, se resumen las principales características de los distintos procedimientos basados en la ultracentrifugación para el aislamiento de exosomas.

Tabla 7. Características principales de los procedimientos basados en la ultracentrifugación para el aislamiento de exosomas: ultracentrifugación estándar; filtración + ultracentrifugación estándar; y, ultracentrifugación estándar + sacarosa. Se describe el principio de separación, la composición de la preparación obtenida, la reproducibilidad, el rendimiento y los inconvenientes de cada procedimiento. Tabla adaptada de Ref. (113,157–162).

	Ultracentrifugación estándar	Filtración + Ultracentrifugación estándar	Ultracentrifugación estándar + Sacarosa
Principio de la separación de los exosomas	Diferencia de tamaño y densidad - Precipitación a 100.000 g	i) Diferencia de tamaño y densidad - Precipitación a 100.000 g ii) Descarte de las vesículas extracelulares de tamaño > 200 nm	i) Diferencia de tamaño y densidad específica de los exosomas (1,13-1,19 g/mL) - Precipitación a 100.000 g ii) Descarte de las vesículas extracelulares de densidad ≠ 1,13-1,19 g/mL
Vesículas contenidas en la preparación	Exosomas principalmente (y otras vesículas, en menor proporción)	Exosomas principalmente (y otras vesículas, en menor proporción)	Exosomas principalmente (y otras vesículas, en menor proporción)
Presencia de contaminantes	MVs, agregados proteicos, cuerpos apoptóticos, fragmentos del secretoma celular y fragmentos nucleosomales	MVs de tamaño pequeño (~200 nm), agregados proteicos, cuerpos apoptóticos, fragmentos del secretoma celular y fragmentos nucleosomales	Agregados proteicos, cuerpos apoptóticos, fragmentos membranosos, lipoproteínas de alta densidad y vesículas que solapan la densidad de los exosomas
Eliminación de contaminantes	No se descartan vesículas/moléculas contaminantes	Se descartan vesículas de tamaño ≥ 200 nm	Se descartan moléculas de alto peso molecular y fragmentos membranosos del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi
Reproducibilidad	Alta	Intermedia	Baja
Rendimiento de extracción	Alto	Intermedio	Bajo
Inconvenientes	No permite conseguir una separación absoluta de los exosomas	i) No permite conseguir una separación absoluta de los exosomas ii) Los poros del filtro pueden quedar bloqueados y la presión positiva puede lisar las vesículas iii) Los exosomas de gran tamaño (~200 nm) y los agregados pueden quedar retenidos en el filtro iv) Consume más tiempo que la ultracentrifugación estándar	i) No permite conseguir una separación absoluta de los exosomas ii) La alteración de la membrana exosomal por parte de la sacarosa induce el desprendimiento de proteínas asociadas a la superficie exosomal – pérdida de funcionalidad biológica y de biomarcadores en potencia iii) Tedioso y consume más tiempo que los otros dos procedimientos

ii) **Métodos basados en procedimientos diferentes a la ultracentrifugación**

Precipitación basada en polímeros de exclusión por volumen

La precipitación basada en polímeros de exclusión por volumen, como el polietilenglicol (PEG), consiste en la separación de las partículas en base al volumen que ocupan. El PEG tiene la habilidad de precipitar las vesículas en pH neutro y concentraciones iónicas elevadas. El precipitado puede ser obtenido mediante centrifugación a velocidad baja, o bien filtración. No obstante, hay que tener en cuenta que con este procedimiento también precipitan macromoléculas no vesiculares y que el polímero utilizado queda remanente en el precipitado (163).

Cromatografía de exclusión por tamaño

En la cromatografía de exclusión por tamaño se utilizan columnas de esferas heteroporosas formadas por un soporte polimérico neutral entrecruzado y empaquetado. Las vesículas atraviesan los poros de las esferas en base a su diámetro hidrodinámico. Un inconveniente de este método es que los componentes de la muestra sólo pueden ser separados si presentan al menos un 10% de diferencia en la masa molecular. Por otro lado, esta técnica consume mucho tiempo, ya que la separación tiene lugar bajo presión reducida, o por gravedad natural (160).

Purificación de inmunoafinidad

La purificación de inmunoafinidad utiliza anticuerpos que reconocen de manera específica antígenos de superficie de los exosomas. Concretamente, se utilizan anticuerpos dirigidos contra proteínas que se encuentran enriquecidas en este tipo de vesículas: CD63, CD81, CD82, CD9, TSG101, ALIX, Flotilina-1, EpCAM y RAB5, entre otras (164). Estos anticuerpos pueden ser utilizados de manera individual, o bien de manera combinada, y pueden ser inmovilizados en gran variedad de medios: esferas magnéticas, matrices de cromatografía, filtros, placas o dispositivos microfluídicos (157). El inconveniente de esta técnica es que quedan excluidas todas las subpoblaciones que no presentan los marcadores utilizados (121).

Kits de aislamiento comerciales

Recientemente, han aparecido métodos comerciales que permiten obtener los exosomas a partir de biofluidos o medio de cultivo celular de manera rápida y sencilla, sin aplicar la ultracentrifugación. Los kits están basados principalmente en filtración, precipitación con polímeros o bien, inmunoaislamiento magnético (121). La desventaja general de estos kits es que juntamente con los exosomas, suelen precipitar otras vesículas extracelulares y agregados proteicos, y/o aíslan únicamente subpoblaciones de exosomas. Por lo tanto, es necesario realizar una comparación exhaustiva que valide estas nuevas herramientas para determinar las vesículas que precipitan y definir su funcionalidad. En la Tabla 8 se describen los kits más destacados.

Tabla 8: Kits de aislamiento de exosomas comerciales. Se presenta su descripción y sus inconvenientes.

	Descripción	Inconvenientes
“ExomiR” de Bioo Scientific	Permite eliminar células y restos celulares con un microfiltro; captura vesículas de tamaño > 30 nm (exosomas) en un segundo microfiltro mediante presión positiva (165)	Los exosomas recogidos en el segundo filtro no se recuperan; son lisados para la extracción de ARN, por lo que no permite analizar su contenido a otros niveles
“ExoQuick” de System Biosciences	Método basado en PEG, que precipita los exosomas al ser añadido a distintos fluidos biológicos (suero, cultivo celular u orina) (166)	No es específico en la precipitación, y el <i>pellet</i> obtenido es difícil de resuspender
“ExoTest” de HansaBioMed	Basado en la inmovilización de anticuerpos anti-CD63, -CD81 ó -CD9 en placas ELISA (167)	Se excluyen de la muestra final aquellos exosomas que no presentan dichas proteínas
“ELLSA” de Aethlon Medical	Basado en el aislamiento de afinidad mediante lectinas (se unen de manera específica a residuos de sacáridos, como la manosa, presentes en la superficie de los exosomas) (168)	No permite el aislamiento de los exosomas que no presentan manosa en su superficie
“Total Exosome Isolation Reagent” de ThermoFisher Scientific	Aislamiento de exosomas para distintos biofluidos o medio de cultivo celular mediante la adición de reactivos de precipitación y posterior centrifugación (169)	No es específico para el tipo de muestra
“Exo-spin” de Cell Guidance Systems	Aislamiento de exosomas a partir de fluidos biológicos o medio de cultivo celular mediante la adición de reactivos de precipitación y posterior centrifugación (170)	No es específico para el tipo de muestra

Actualmente, el método de aislamiento de exosomas aceptado a nivel global y que ha sido aplicado en la mayoría de estudios (90%) es el de la ultracentrifugación (171). Alternativamente, si la aplicación posterior requiere mayor pureza, se utiliza de manera adicional el colchón de sacarosa o gradientes de sacarosa para separar otras partículas membranosas (157,159,160). Ninguno de los métodos de aislamiento descritos en esta sección es perfecto y aunque en la actualidad se están desarrollando nuevas tecnologías que intentan mejorar los procedimientos actuales, todavía no se ha conseguido una mejora significativa. Además, la selección del método de aislamiento debe ser determinada en base al objetivo de estudio o la aplicación posterior. Independientemente del método de purificación de exosomas, cada técnica debe ser validada para cada tipo celular o fluido biológico, pues cada muestra de partida es diferente y la naturaleza intrínseca puede afectar al rendimiento de extracción y a la pureza obtenida. Esto requiere el uso de varios métodos para determinar las propiedades morfológicas, físicas y bioquímicas. Aún así, dado que no es posible afirmar con total fiabilidad que las preparaciones de vesículas que se obtienen de forma experimental contienen únicamente exosomas, por el momento se acepta el término “vesículas semejantes a los exosomas” (*Exosome-like vesicles*, EVs) para referirse a las vesículas extracelulares que presentan los sellos distintivos de los exosomas (112,113,115,124).

1.2.7.2.1.7. Caracterización de los exosomas

Tras el aislamiento de los exosomas es necesario realizar una caracterización exhaustiva de las vesículas proporcionando información acerca de los marcadores moleculares (mediante inmunoblot), la morfología (mediante microscopía electrónica o microscopía de fluorescencia) y el tamaño (mediante análisis de seguimiento de nanopartículas o citometría de flujo) (114).

1.2.7.2.1.7.1. Marcadores moleculares

Para poder asegurar que una preparación de vesículas extracelulares está enriquecida en exosomas, es necesario demostrar la composición que caracteriza este tipo de vesículas. Como se ha descrito en el apartado 1.2.7.2.1.5. *Composición de los exosomas*, la composición básica a nivel de proteínas es similar a la de los endosomas; en cambio, las vesículas derivadas de la membrana plasmática (MVs) presentan componentes de ésta mayoritariamente (112). Actualmente, no existen marcadores proteicos que permitan diferenciar claramente los exosomas de las MVs (124). Aún así, marcadores de los MVBs como las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81; proteínas del complejo ESCRT, como ALIX y TSG101; y otras moléculas que se encuentran normalmente presentes en los endosomas tardíos, como MHCII, son moléculas utilizadas habitualmente para discriminar entre estas dos poblaciones de vesículas extracelulares (112,116). Se ha visto que las tetraspaninas – los marcadores más extendidos de los exosomas – también se encuentran en las MVs, aunque a niveles más bajos (134,143,172). Además, cabe destacar que el complejo ESCRT-III está implicado tanto en la formación de exosomas como en la de MVs y, en consecuencia, algunas proteínas de este complejo se encuentran en ambas poblaciones. Finalmente, hay que tener en cuenta que los exosomas formados mediante mecanismos independientes de ESCRT no presentan los marcadores típicos asociados a esta maquinaria (129).

1.2.7.2.1.7.2. Morfología

A continuación se describen las distintas metodologías que permiten observar la morfología de los exosomas.

Microscopía electrónica

Dado que los exosomas tienen un tamaño por debajo del límite de resolución del microscopio óptico, la microscopía electrónica de transmisión es la técnica de preferencia para la observación directa del tamaño y la morfología (159). Tradicionalmente, en la microscopía electrónica se utiliza la tinción negativa para visualizar las vesículas extracelulares (119), donde los exosomas aparentan tener forma de copa. Aunque esta morfología se ha considerado una característica de los exosomas, hoy en día se conoce que ésta es artefactual y que su morfología natural es esférica (154). No obstante, dicha apariencia todavía se utiliza como una morfología característica para distinguir los exosomas de otras partículas de tamaño pequeño cuando son visualizados mediante microscopía electrónica (122,158). La observación de exosomas derivados de biofluidos con microscopía electrónica demuestra una amplia heterogeneidad en la apariencia de los mismos, en función del tipo de aislamiento y el origen celular. En contraposición, las preparaciones de exosomas procedentes de líneas celulares son más homogéneas y contienen principalmente vesículas de 30-150 nm de diámetro (126,136).

Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia permite visualizar los exosomas directamente sobre portaobjetos de vidrio o tras la internalización por parte de las células diana. Pero dado que el límite de resolución de la microscopía óptica clásica es de 200 nm, con la microscopía de fluorescencia se visualizan agregados de vesículas, o bien agregados de anticuerpos utilizados en el marcaje de las vesículas (158).

1.2.7.2.1.7.3. Tamaño

El tamaño de los exosomas varía en función de la célula de origen y de la carga molecular que transportan. Puesto que los exosomas son de naturaleza vesicular, el tamaño mínimo está

determinado por la estructura de la bicapa lipídica. Ésta tiene un grosor aproximado de 5 nm y, teniendo en cuenta su rigidez, la vesícula más pequeña puede ser de 20 nm de diámetro. Normalmente, el tamaño es superior, pudiendo alcanzar los 200 nm, dependiendo de la carga – se calcula que un exosoma puede llegar a contener alrededor de 100 proteínas y 10.000 nucleótidos (154). A continuación se describen las técnicas principales que se utilizan para analizar el tamaño de las vesículas aisladas.

Nanoparticle Tracking Analysis, Nanosight

El análisis de seguimiento de nanopartículas (*Nanoparticle tracking analysis*, NTA – equipo Nanosight desarrollado por *Malvern*) es el nombre comercial de un método de seguimiento óptico de partículas. Este método se basa en el estudio del movimiento Browniano que presentan los exosomas en solución acuosa en condiciones fisiológicas y permite determinar el tamaño, la concentración y la distribución de las nanopartículas (173) – la distribución es la relación entre el rango de diámetro de las vesículas y su concentración (122). Las ventajas de este método son la simplicidad, la rapidez y la capacidad de analizar simultáneamente un gran número de partículas. Los inconvenientes principales son la incapacidad de diferenciar las vesículas de los agregados de tamaño similar y la baja reproducibilidad entre laboratorios (126,136). Esto es debido a que no existe uniformidad en el ajuste de parámetros del equipo. En este sentido, recientemente se ha publicado un protocolo detallado para el uso extendido de esta técnica donde se indican todos los parámetros que deben ser definidos en cada estudio experimental (113). Algunas versiones más avanzadas del equipo ya permiten la detección de vesículas marcadas con fluoróforos, lo cual permite estudiar la composición bioquímica de las vesículas (174).

Tunable Resistive Pulse Sensing (qNano)

Recientemente, la casa comercial *IZON Science* ha desarrollado el equipo “qNano”, un sensor de pulso resistivo sintonizable (*Tunable Resistive Pulse Sensing*, TRPS) que permite determinar el tamaño, la concentración y la distribución de nanopartículas, así como también el potencial Z. Esta técnica se basa en la medida del cambio de voltaje que provoca cada partícula cuando pasa a través de un nanoporo de diámetro concreto. La concentración de vesículas de la muestra se determina en base a partículas calibradoras de concentración conocida (175). Existen filtros de distintos diámetros para abarcar los diferentes rangos de partículas. Aún así, esta técnica no permite detectar los exosomas de tamaño inferior a 50 nm (154) y otra desventaja es que el canal puede ser obstruido por las partículas más grandes (176).

Citometría de flujo

La citometría de flujo determina el tamaño de los exosomas en base al ángulo de dispersión del haz de láser incidente y la fluorescencia que emiten las vesículas marcadas con fluoróforos; la dispersión de luz es proporcional al tamaño de las vesículas. Aunque esta técnica proporciona información cuantitativa y cualitativa, se utiliza normalmente para establecer el origen celular y el fenotipo de las vesículas, ya que permite detectar poblaciones de exosomas en base a marcadores en los que se encuentran enriquecidos, así como la presencia de ADN de doble cadena. El inconveniente principal de los citómetros de flujo convencionales es que no pueden separar las partículas de tamaño inferior a 200 nm, de modo que no pueden caracterizar los exosomas de tamaño más pequeño. Actualmente se están desarrollando citómetros más sensibles que permiten el análisis directo de vesículas individuales pequeñas, aunque todavía requieren más optimización para poder ser utilizados de manera extendida (177).

1.2.7.2.1.8. Funciones de los exosomas

La función de los exosomas viene determinada por su composición y su origen celular. A lo largo de las tres últimas décadas, se han realizado múltiples estudios al respecto y se han asignado distintas funciones biológicas (178).

Comunicación intercelular

La función principal de los exosomas es la comunicación intercelular mediante el transporte de moléculas de señalización de manera específica; transfieren proteínas, metabolitos, lípidos, glúcidos y material genético desde la célula de origen (célula donadora) a la célula diana (célula receptora) para desencadenar una respuesta determinada (114,127). Tradicionalmente, la comunicación celular se ha clasificado en juxtacrina (dependiente de contacto), paracrina (entre células vecinas), endocrina (entre células distantes) y exocrina o sináptica (comunicación electroquímica entre células nerviosas). Los exosomas representan una nueva forma de comunicación entre células vecinas (paracrina) y distantes (endocrina) que permite transmitir mensajes complejos mediante la liberación de múltiples moléculas (154).

Retirada de material celular

Otra de las funciones de los exosomas es la eliminación de material indeseable para la célula de origen, favoreciendo la homeostasis y el mantenimiento celular (114). Los exosomas son un sistema de eliminación alternativo a la degradación en los lisosomas, una vía de secreción de material innecesario hacia el medio extracelular (122).

Adhesión celular

Los exosomas pueden funcionar como mediadores de adhesión de las células a distintos sustratos presentes en el entorno exterior. Por ejemplo, los exosomas de las células B inducen el anclaje de las células endoteliales a la ECM. Esta función es llevada a cabo mediante la expresión de receptores y moléculas de adhesión como las integrinas, cadherinas y proteínas de adhesión celular (CAM) en la superficie exosomal (179).

Respuesta a estrés

Los exosomas protegen a las células de señales de estrés extracelulares e intracelulares, favoreciendo su supervivencia (122). De forma general, se considera que el fenotipo de los exosomas representa una respuesta celular al estrés, ya que se ha observado que la exposición de células B al choque térmico resulta en un incremento marcado de las HSPs en los exosomas derivados (180).

Coagulación

Los exosomas también participan en la coagulación. Concretamente, se ha detectado que los exosomas derivados de distintos fluidos corporales (sangre, saliva y orina) de pacientes con diversas patologías presentan el factor iniciador de la coagulación TF en su superficie. Posteriormente se ha demostrado que los exosomas portadores de TF dirigen la formación del trombo *in vivo*. Además, los exosomas derivados de monocitos son capaces de transferir este factor a plaquetas activadas, contribuyendo así al desarrollo de la coagulación. En contraposición, los exosomas presentes en la corriente sanguínea de pacientes sanos no exponen el factor TF y están asociados a funciones anticoagulantes (122,127,178).

Función e integridad vascular

Los exosomas que secretan las células endoteliales apoptóticas contribuyen a la reparación vascular dirigiendo el fenotipo anti-apoptótico en las células de músculo liso de la vasculatura. En contraste, las vesículas derivadas de monocitos activados pueden dirigir la apoptosis de células vasculares de tipo músculo liso de manera dependiente de caspasa-1 (122). Por lo tanto, los exosomas pueden tener efectos beneficiosos y adversos en la integridad vascular.

Reparación de tejido

Los exosomas participan en la reparación o regeneración tisular mediante factores de crecimiento, proteínas, miARN, ARNm, ARN no codificante y lípidos. Se ha observado que en el infarto de miocardio y el daño renal, los exosomas derivados de células madre y células progenitoras endoteliales inducen la regeneración del tejido cardíaco y la neovascularización (147).

Diferenciación celular y desarrollo embrionario

Los exosomas apoyan el mantenimiento de las células madre y participan en la diferenciación celular modulando su plasticidad. Además, también contribuyen a la creación de polaridad durante el desarrollo embrionario y favorecen el crecimiento normal (122). Durante la gestación, los exosomas derivados de la placenta actúan evadiendo el sistema inmune materno para permitir que el trofoblasto se desarrolle con normalidad (181).

Mantenimiento del sistema nervioso

Los exosomas dan soporte trófico a los axones y proporcionan factores neuroprotectores. Además, participan en la formación de mielina así como en el crecimiento de neuritas y la supervivencia neuronal (116,127).

Por otro lado, además de tener una función importante en procesos biológicos naturales como los descritos anteriormente, los exosomas también se han visto implicados en algunas enfermedades tales como enfermedades neurológicas, infecciones y cáncer.

1.2.7.2.1.8.1. Funciones de los exosomas en el cáncer

Existen estudios que han demostrado el papel de los exosomas como supresores tumorales, pues éstos participan en la transferencia de antígenos tumorales hacia las células dendríticas para desencadenar una respuesta anti-tumoral eficiente (148).

En contraposición, otros estudios han demostrado el papel de los exosomas como oncogenes. Los exosomas derivados de células tumorales pueden tener un efecto anti-inmune inhibiendo los efectores o activando los inhibidores de las células inmunes, favoreciendo de este modo el mantenimiento del tumor (182). Además, se ha demostrado que los exosomas contribuyen a la transformación maligna de células normales mediante la activación de vías de señalización asociadas a la proliferación, migración e invasión. Entre otras funciones, los exosomas pueden inducir un microambiente pro-tumoral mediante la transferencia de oncogenes (miARNs, ARNm y proteínas, como KRAS y c-MET) a células vecinas o distantes, desencadenando en ellas el crecimiento y la proliferación. Asimismo, también pueden favorecer el potencial oncogénico intrínseco de las células receptoras circundantes (148,183) y dirigir la formación del nicho pre-metastásico (183,184). Concretamente promueven la diseminación metastásica educando las células progenitoras de la médula ósea y promoviendo su migración hacia nuevos nichos

metastásicos – el contenido de los exosomas determina el destino de las células tumorales (184). Por lo general, los exosomas favorecen la siembra de células tumorales en nódulos linfáticos y a su vez, incrementan la motilidad local de las células neoplásicas y su interacción con los fibroblastos estromales para crear una vía de migración (183). Los exosomas tumorales también tienen actividad pro-angiogénica, facilitando la interacción con las células endoteliales. Y finalmente, apoyando la supervivencia celular y la progresión tumoral, los exosomas contribuyen a la quimiorresistencia expulsando los agentes quimioterápicos hacia el medio extracelular (185,186).

Funciones de los exosomas en el cáncer de ovario

Los exosomas juegan un papel importante en el CO. Se ha descrito que las células tumorales del ovario secretan cantidades substanciales de exosomas que pueden ser captados por células vecinas no tumorales, resultando en cambios en la expresión génica que desencadenan la transformación maligna. En las células receptoras, los exosomas inducen la expresión de genes implicados en la adquisición del fenotipo mesenquimal (187,188).

Los exosomas secretados por células de CO contienen proteínas implicadas en la proliferación, adhesión, motilidad, invasión y angiogénesis. El contenido de los exosomas implicado en vías de señalización asociadas al crecimiento tumoral consiste en: integrinas, EGF, FGF, Wnt, PI3K y TP53. En la progresión tumoral, las moléculas exosomales que participan en la adhesión, migración e invasión son: ErbB, PI3K y MAPK (189). En el marco de la angiogénesis tumoral, los exosomas derivados de células de CO inducen la proliferación y migración de las células endoteliales mediante el transporte de VEGF, ATF2, MTA1 y ROCK1/2 (189,190).

Los exosomas derivados de las células de CO tienen la capacidad de modificar el microambiente tumoral a favor del carcinoma. Se ha observado que las MMPs asociadas a los exosomas pueden procesar y activar proteínas transmembrana o moléculas de adhesión, favoreciendo así la motilidad de las células tumorales, la invasión del peritoneo y el crecimiento tumoral (189,191). También se ha descrito que los exosomas interactúan con las células estromales e inducen su conversión a miofibroblastos para favorecer la invasión de las células tumorales ováricas (187,188).

Asimismo, los exosomas suponen un nuevo mecanismo de quimiorresistencia para las células cancerosas del ovario. Se ha descrito que las células de CO utilizan los exosomas para exportar el cisplatino, evadiendo así la muerte celular. Esto indica que estas células tienen sistemas de selección para desviar hacia los exosomas todas aquellas moléculas que comprometan su supervivencia (186). También se ha observado que la expresión elevada de ciertos miARNs (miR-205, miR-200, miR-221, miR-105 y let-7) y proteínas (Anexina A3) en exosomas de células metastásicas de CO está asociada a la quimiorresistencia (189). Además, los exosomas derivados de células resistentes al cisplatino amplifican la quimiorresistencia, induciéndola en las células receptoras mediante las moléculas señal que transportan (186). Por otro lado, los exosomas derivados de CO tienen actividad inmuno-supresora, pues inducen la apoptosis en linfocitos, favoreciendo así el escape de la respuesta inmunológica (192).

1.2.7.2.1.9. Aplicaciones clínicas de los exosomas

Puesto que los exosomas pueden ser aislados a partir de biofluidos y participan en la comunicación intercelular y en mecanismos fisiológicos y patológicos, existen numerosos estudios que proponen su uso en el diagnóstico y el tratamiento de ciertas enfermedades. Además, dado que las moléculas de ARN y proteína que transportan están recubiertas por la bicapa lipídica, el contenido queda protegido de nucleasas y proteasas, favoreciendo la estabilidad en la circulación sanguínea durante largos períodos de tiempo (150,154).

A continuación se describen las principales aplicaciones clínicas de los exosomas.

Diagnóstico

Debido a su tamaño reducido, los exosomas tienen la capacidad de atravesar uniones intercelulares y pueden llegar a alcanzar partes distantes en el cuerpo mediante la corriente sanguínea y otros fluidos corporales. Se ha descrito la presencia de exosomas en prácticamente todos los fluidos biológicos: orina, saliva, fluido bronquioalveolar, fluido seminal, fluido amniótico, fluido ocular, leche materna, efusiones tumorales, fluido cerebrospinal, suero y plasma (193). Los exosomas aislados a partir de biofluidos representan una muestra no/mínimamente invasiva, ya que se obtienen sin la necesidad de intervenir quirúrgicamente. Además, la protección que ejerce la membrana lipídica impide la degradación del material molecular. Por lo tanto, en base a su ubicuidad y a la especificidad del contenido proteico, lipídico y de ARN, los exosomas son considerados una fuente alternativa de marcadores de diagnóstico con gran potencial para distintas enfermedades (111).

En patologías como el cáncer, se ha visto que no todas las vesículas secretadas por el tumor son capturadas por las células circundantes o la ECM, sino que algunas pueden llegar a la circulación sanguínea y a otros biofluidos. Por consiguiente, los exosomas presentes en los fluidos corporales pueden ser utilizados como una fuente estable de biomarcadores tumorales (111,123). El transporte de ADN en exosomas podría ser utilizado para identificar mutaciones presentes en las células tumorales parentales y mejorar así el diagnóstico (114). Asimismo, puesto que los miARNs y las proteínas de exosomas derivados de células cancerosas representan el tumor de origen, estas moléculas también podrían ser utilizadas como herramienta de cribado en el diagnóstico de la enfermedad (111,123).

Existen kits de diagnóstico basados en exosomas en fase de desarrollo y otros que ya han llegado al mercado. Por ejemplo, *Caris Life Sciences* ha comercializado el test “Carisome Prostate cMV 1.0” para la detección del cáncer de próstata en base a proteínas específicas de exosomas presentes en la circulación sanguínea (194). En el terreno de la medicina personalizada, *Exosome diagnostics* también ha desarrollado un test diagnóstico molecular basado en exosomas de biofluidos – “ELLSA” –, que detecta la presencia de exosomas asociados al VIH, la tuberculosis y varios tipos de cáncer (168). Finalmente, *HansaBioMed* también está desarrollando herramientas de diagnóstico basadas en exosomas de biofluidos para detectar el cáncer y enfermedades neurodegenerativas (167).

Inmunoterapia

En base a la capacidad de los exosomas de desencadenar de manera eficiente la respuesta inmune activando los linfocitos T, se está estudiando su uso en la inmunización de los pacientes frente a infecciones y patologías determinadas. La inmunoterapia mediada por exosomas es similar a la terapia celular, ya que son procesos biológicos que ocurren de manera natural. La ventaja de los exosomas frente a la terapia celular es que al ser vesículas metabólicamente inactivas, son más estables y permiten ser almacenadas a -80°C sin perder actividad biológica, pudiendo ser utilizadas directamente como vacunas o en combinación con otros agentes farmacológicos (122,195). Además, los exosomas mantienen la presentación de antígeno en los nódulos linfáticos durante largos periodos de tiempo, que doblan los de las células presentadoras de antígenos, representando una estrategia más potente para inducir la respuesta inmune (196). La limitación actual de la inmunoterapia basada en exosomas es la falta de definición de equivalentes exosomales de alotipos inmunológicos, por lo que se requieren más estudios en relación a los grupos de compatibilidad y al desarrollo de métodos de generación de exosomas sintéticos *de novo*.

Entrega de fármacos

Actualmente, los sistemas de deliberación de fármacos que se utilizan de manera extendida son los liposomas y las nanopartículas poliméricas. Sin embargo, presentan limitaciones importantes: los liposomas están asociados a baja estabilidad en sangre, reacción del sistema inmune y toxicidad (197); las nanopartículas poliméricas son algo más estables, pero presentan problemas de biocompatibilidad (198). Los exosomas o los miméticos exosomales emergen como una alternativa muy prometedora, ya que mejoran los sistemas de deliberación convencionales porque son estables en la circulación sanguínea, tienen especificidad de tejido, son biocompatibles, pueden ser derivados del mismo paciente en que serán administrados y son inherentes en términos de toxicidad (147). Además, debido a la membrana lipídica que presentan, pueden atravesar la mayoría de membranas biológicas, manteniendo el material interno intacto y libre de degradación (122). En la última década, a modo de terapia génica se ha probado la entrega de ARN de interferencia (ARNi) mediante exosomas en ratones y seres humanos y, los resultados han sido muy prometedores (147).

Terapias dirigidas contra exosomas patológicos

En base a la capacidad que tienen los exosomas de expandir moléculas tóxicas y patológicas (199), y de eliminar determinados fármacos (185), se están investigando estrategias terapéuticas dirigidas contra exosomas patológicos para bloquear su biogénesis, secreción e internalización. Asimismo, también se está estudiando la inhibición de componentes específicos de estas vesículas que contribuyen al desarrollo de las enfermedades (123).

En cuanto al bloqueo de la biogénesis, la inhibición de la formación de ceramida, o bien la inhibición del reciclaje de vesículas endocíticas, son aproximaciones que han demostrado reducir la cantidad de vesículas secretadas (130). Por otro lado, la interrupción de la interacción de ALIX con sintenina – esencial para la formación de MVBs – también resulta en una disminución significativa de la biogénesis de exosomas (123).

Otro abordaje es inhibir la secreción de vesículas extracelulares. En este sentido, se ha descrito que la inhibición de RAB27A permite suprimir los neutrófilos que dan soporte al crecimiento tumoral, reduciendo el tamaño tumoral y las metástasis *in vivo* (184). Otra alternativa es inhibir RAB11 y RAB35 para bloquear la unión y/o fusión de los MVBs con la membrana plasmática (137,138).

En cuanto a la inhibición de la internalización de exosomas por parte de las células receptoras, se ha visto que el bloqueo de la fosfatidilserina de la superficie exosomal es eficiente en el caso de las células cancerosas (200). No obstante, esta aplicación podría tener efectos secundarios importantes teniendo en cuenta la función fisiológica de la fosfatidilserina. Por otro lado, se ha visto que la inhibición de ICAM1 (que se encuentra frecuentemente en los exosomas) disminuye la diseminación del VIH-1 previniendo la unión a la integrina $\beta 2$ de la superficie celular (148).

En referencia al bloqueo específico de moléculas de superficie exosomal, los anticuerpos monoclonales dirigidos a FASL1 han demostrado ser eficientes en la reducción del crecimiento tumoral (201). El inconveniente de esta aproximación es que carece de especificidad.

En el terreno del cáncer, *Aethlon Medical* ha desarrollado un dispositivo médico, “Hemopurifier”, que elimina de manera selectiva los exosomas presentes en la circulación sanguínea que son secretados por los tumores. La empresa postula que de esta manera se restaura el sistema inmune de los pacientes con cáncer y planea estudiar próximamente la validez del dispositivo en ensayos clínicos de Fase I (168).

Finalmente, en el marco de la diseminación del CO, se está evaluando en fase preclínica el uso de un dispositivo basado en exosomas ("M-trap"), que promueve la adhesión de las células tumorales presentes en el líquido ascítico, evitando así la extensión de la enfermedad en el peritoneo (202).

Las estrategias anteriormente descritas son atractivas y eficientes, pero hay que tener en cuenta que los efectos colaterales inespecíficos pueden afectar a procesos fisiológicos normales. Por ello son imprescindibles más estudios encaminados al desarrollo de abordajes altamente específicos, para evitar alteraciones indeseadas.

1.2.8. Bases moleculares del cáncer de ovario

En referencia a los tumores de tipo I (ver apartado 1.2.2.2. *Teoría dualista*), dos tercios de los carcinomas serosos de bajo grado se caracterizan por mutaciones en KRAS, BRAF y HER2, mientras que la mayoría no suele tener mutaciones en TP53. Los carcinomas endometrioides de bajo grado presentan aberraciones en la vía de señalización de WNT que implican mutaciones somáticas en CTNNB1, PTEN, ARID1A, MSI y PIK3CA. Los carcinomas mucinosos tienen mutaciones en KRAS y HER2, y gran parte de los carcinomas de células claras tienen mutaciones en PIK3CA, ARID1A y MSI.

En cuanto a los tumores de tipo II – carcinoma seroso de alto grado convencional, el indiferenciado y tumores mesodérmicos mixtos malignos (carcinosarcomas), ver apartado 1.2.2.2. *Teoría dualista* –, presentan mutaciones en TP53, amplificaciones en el gen CCNE1 en más del 80% de los casos y, rara vez albergan mutaciones que se encuentran en los tumores de tipo I.

Al margen de las mutaciones que caracterizan los distintos tipos histológicos de CO, también se han descrito otras alteraciones genéticas y epigenéticas implicadas en la carcinogénesis ovárica. Algunos genes son activados mediante alteraciones como la amplificación, la mutación o la hipometilación; mientras que la inactivación de genes tiene lugar por delección de grandes regiones cromosómicas, pérdida de heterocigosidad en *loci* particulares y metilación de promotores (203). En la Tabla 9, se muestran las principales anomalías genéticas y epigenéticas que tienen lugar en el CO epitelial.

Tabla 9. Anomalías genéticas en el CO epitelial. ND: No Determinado. NA: No Aplicable. Tabla adaptada de Ref. (203).

Evento	Efecto	Cromosoma	Genes
Amplificación	Activación	1q22	RAB25
		3q26	PRKCI, EVI1 y PI3CA
		5q31	FGF1
		8q24	MYC
		19q	PIK3R1 y AKT2
		20p	ND
		20q13.2	AURKA
Mutación	Activación	NA	KRAS (15%), BRAF (12%), CTNNB1 (12%), CDKN2A (10%), APC (9%), PIK3CA (8%), KIT (7%) y SMAD4 (7%)
Hipometilación	Activación	NA	IGF2 y SAT2
Pérdida de heterocigosidad	Inactivación	17p13 y 17q21 (en más del 50% de los casos)	ARHI, PEG3, PLAGL1, RPS6KA2, TP53, BRCA1, BRCA2, PTEN, OPCML y WWOX
		1p, 3p, 5q, 6q, 7q y 8q (en menos del 30% de los casos)	
Delección	Inactivación	4q, 5q, 16q, 17p, 17q, Xp y Xq	ND
Mutación	Inactivación	NA	TP53 (62%), BRCA1 (5%), BRCA2 (<5%) y PTEN (3–8%)
Metilación del promotor	Inactivación	NA	ARHI, DAPK1, CDH13, MLH1, ICAM1, PLAGL1, DNAJC15, MUC2, OPCML, PCSK6, PEF3, CDKN2A, CDKN1A, RASSF1, SOCS1, SOCS2, PYCARD y SFN

En referencia a los **genes supresores tumorales**, la pérdida de función de TP53 es una de las alteraciones genéticas más frecuentes en el CO, pues se ha observado en el 60-80% de los casos de CO, llegando a un 96% en los casos de HGSOC. TP53 se encuentra mutado en el 10-20% de los tumores en estadios iniciales y, en el 40-60% de los carcinomas avanzados. Además se ha visto que la pérdida de su función correlaciona con el potencial metastásico (62). Los genes supresores tumorales BRCA1/2 se encuentran inactivados en el 5-10% de los casos de CO (CO hereditario) (11,30). PTEN también es otro supresor tumoral que se encuentra inactivado en el 3-8% de los casos de CO esporádico, habitualmente en los carcinomas endometrioides de bajo grado (204). Aparte de TP53, BRCA1/2 y PTEN, se han descrito alteraciones en otros genes, cuya pérdida de función está asociada a la carcinogénesis ovárica (Tabla 10) (203,205).

Tabla 10. Genes supresores tumorales, cuya función se ve significativamente reducida en el CO epitelial. Algunos de ellos ya son aceptados como genes supresores tumorales, y otros son supresores tumorales potenciales. Tres de los 26 que se describen son inactivados por impronta genética (ARH1, PLAGL y PEG). ND: No Determinado. Tabla adaptada de Ref. (203,205).

Gen	Cromosoma	Mecanismo de infra-regulación	Porcentaje de casos de CO en los que está infra-regulado
ARHI (DIRAS3)	1p31	Impronta genética; pérdida de heterocigosidad; metilación del promotor; inhibición de la transcripción	60%
RASSF1A	3p21	Hipermetilación	60%
DLEC1	3p22.3	Hipermetilación del promotor e hipoacetilación de histonas	73%
SPARC	5q31	Transcripción	70-90% expresión disminuida; 9% expresión nula
DAB2 (DOC2)	5q13	Transcripción	58-85% expresión nula
PLACL1 (LOT1)	6q25	Impronta genética; pérdida de heterocigosidad; inhibición de la transcripción por parte de EGF y TPA	39%
RPS6KAZ	6q27	Expresión monoalélica en el ovario; pérdida de heterocigosidad	64%
PTEN	10q23	Metilación del promotor; pérdida de heterocigosidad; mutaciones	3-8% mutado; expresión perdida en el 27%
OPCML	11q25	Metilación del promotor; pérdida de heterocigosidad; mutaciones	56-83%
BRCA2	13q12-13	Mutaciones; pérdida de heterocigosidad	3-6%
ARL11	13q14	Metilación del promotor	62%
WWOX	16q23	Pérdida de heterocigosidad; mutaciones	30-49%; particularmente en el carcinoma mucinoso y de célula clara
TP53	17p13.1	Mutaciones	50-70%
DPH1	17p13.3	Pérdida de heterocigosidad	37%
BRCA1	17q21	Mutaciones; pérdida de heterocigosidad	6-8%
PEG3	19q13	Impronta genética; pérdida de heterocigosidad; metilación del promotor; inhibición de la transcripción	75%
CDKN2A (p16)	9p21	Metilación del promotor	30%
CDKN1A (p21)	6p21.2	Hipoacetilación de histonas	25-40%
MLH1	3p21.3	Metilación del promotor	30%
DAK1	11q12.2	Metilación del promotor	ND
CDH1 (E-cadherina)	16q22.1	Metilación del promotor	90-100%
FBXO32	8q24.13	Metilación del promotor	ND
CTGF	6q23.1	Metilación del promotor	ND
ANGPTL2	9q33.3	Metilación del promotor	ND
TES	7q31.2	Pérdida de heterocigosidad; metilación del promotor	ND
MYO18B	22q12.1	Mutaciones; metilación del promotor	ND

A diferencia de la pérdida de función de los genes supresores de tumores, que generalmente requiere la inactivación en ambos alelos, los **oncogenes** suelen ser activados por alteraciones en un único alelo. Por este motivo, es más frecuente la activación de oncogenes durante la tumorigénesis ovárica. En los últimos años se han identificado 22 oncogenes claramente activos en CO (203), así como también alteraciones en el número de copias de ADN en *loci* que contienen miARNs no codificantes (206). El oncogén KRAS se encuentra mutado en más del 20% de los carcinomas de tipo I y las mutaciones en PI3CA son muy comunes en los carcinomas endometriode y de células claras (204). El oncogén RAB25 también se encuentra amplificado en la mayoría de casos de CO, promoviendo la motilidad y agresividad, e impidiendo la apoptosis y la autofagia. En la Tabla 11 se presenta un resumen de los principales oncogenes descritos en el CO epitelial (204,205).

Tabla 11. Oncogenes asociados al CO epitelial. Once de los 22 oncogenes son activados por amplificación (203). ND: No Determinado. Tabla adaptada de Ref. (203,205).

Gen	Cromosoma	Porcentaje de cánceres en que está amplificado	Porcentaje de cánceres en que está sobre-expresado	Porcentaje de cánceres en que está mutado
RAB25	1q22	54%	80–89%	ND
EVI1	3q26	ND	ND	ND
EIF5A2	3q26	ND	ND	ND
PRKCI	3q26	44%	78%	ND
PIK3CA	3q26	9-11%	32%	8-12%
FGF1	5q31	ND	51%	ND
MYC	8q24	20%	41–66%	ND
EGFR	7q12	11-20%	9–28%	<1%
NOTCH3	9p13	20-21%	62%	ND
KRAS	12p11–12	5%	30–52%	2-24%
HER2	17q12–21	6-11%	4–12%	ND
PIK3R1	19q	ND	ND	ND
CCNE1	19q12	12-36%	42–63%	ND
AKT2	19q13.2	12-27%	12%	ND
AURKA	20q13	10-15%	48%	ND
HRAS	11p15.5	ND	ND	ND
HMGA2	12q15	ND	ND	ND
BCL2	18q21.3	ND	ND	ND
BCL3	19q13.1-q13.2	ND	ND	ND
BMI1	10p11.23	ND	ND	ND
NF-κB	4q24	ND	ND	ND
FOLR1	11q13.4	ND	ND	ND

En referencia a las **vías moleculares** alteradas en CO, se conoce que 7 de ellas están activadas en más del 50% de los casos de CO, y las mutaciones implicadas afectan a la proliferación celular, la apoptosis y la autofagia (Tabla 12) (204).

Tabla 12. Vías moleculares activadas en CO. Tabla adaptada de Ref. (204).

Vía molecular	Porcentaje de cánceres en que se observa activación
IL-6, IL-6R; Jak – STAT3	70%
LPA	90%
MEKK3 – IKK – NF-KB	>50%
Receptor de sustancias inhibidoras Müllarianas	>50%
PKC _i	78%
PI3K	70%
Src	>50%
Ras-Mek-Mapk	<50% (activada en la mayoría de carcinomas de tipo I)

La vía de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) está activada en el 70% de los casos de CO aproximadamente, y dicha activación está asociada a la quimiorresistencia tumoral. La activación de esta vía deriva de la amplificación de los genes PI3CA y AKT2, aunque en algunos cánceres la vía se activa por señalización autocrina o paracrina a través de receptores tirosina quinasa de factores de crecimiento. Actualmente, se están desarrollando inhibidores de la vía AKT y se están realizando ensayos clínicos con otros inhibidores específicos de la vía PI3K (207).

La interleucina-6 (IL-6) está sobre-expresada en la mayoría de los casos de CO. La sobre-expresión resulta en la estimulación autocrina de su receptor, que activa la quinasa JAK2, facilitando la fosforilación y translocación nuclear de STAT3, que finalmente activa la expresión de genes inductores de proliferación y angiogénesis, y otros genes que inhiben la apoptosis. La forma fosforilada nuclear de STAT3 está presente en más del 70% de los casos de CO y está asociada a una disminución de la supervivencia global (208). Teniendo en cuenta estas alteraciones moleculares, se ha comenzado a probar el efecto de anticuerpos bloqueantes de IL-6 e inhibidores de JAK2 (209) y STAT3 (210).

El ácido lisofosfatídico (LPA) es producido por la autotaxina fosfodiesterasa (ATX). Los receptores de LPA (LPA_{R2} y LPA_{R3}) se encuentran sobre-expresados durante la transformación maligna de las células epiteliales del ovario. El receptor LPA_{R3} responde a los LPA ligados a ácidos grasos insaturados que produce el tumor. Dado que el LPA cíclico bloquea la ATX, reduce a su vez los niveles de LPA y la subsiguiente metástasis, aunque no reduce el crecimiento de los tumores primarios (211). En base a estos hechos, se han desarrollado anticuerpos neutralizantes de LPA, y también se están probando inhibidores de sus receptores para intentar bloquear la proliferación de las células cancerosas (212).

Los factores de transcripción NF-κB se encuentran constitutivamente activos en más del 50% de los casos de CO a través de la señalización de distintas citocinas (IL-1 y TNF-α) y factores de crecimiento (EGF). TNF-α es activado normalmente por la quinasa IKK, que a su vez es activada por MEKK3, entre otras quinasas. Se ha descrito que la quinasa MEKK3 se encuentra sobre-expresada en más del 50% de los casos de CO. De modo que la sobre-expresión de MEKK3 induce la activación aumentada de TNF-α y NF-κB, resultando así en la sobre-expresión de genes antiapoptóticos, proteínas antioxidantes, citocinas reguladoras del crecimiento y factores angiogénicos (213). Actualmente, la inhibición de NF-κB a través de IKK o MEKK3 se considera una buena aproximación terapéutica para tratar el CO (214).

1.2.9. Tratamiento del cáncer de ovario

El tratamiento del CO está basado en la cirugía y la quimioterapia. Concretamente, la terapia estándar consiste en una cirugía citorreductora y una quimioterapia sistémica basada en platino y taxano (215).

Cirugía

El objetivo principal de la cirugía primaria es extraer la mayor parte posible de masa tumoral antes de iniciar el tratamiento quimioterápico, ya que la máxima extirpación mejora la efectividad de la quimioterapia y prolonga la supervivencia de las pacientes. Actualmente, según el consenso de Vancouver del 2010, la cirugía óptima es aquella en la que se consigue la extracción absoluta de las masas tumorales (tumor residual o enfermedad residual 0) (216).

En ocasiones, si se determina que la invasión está tan extendida que el tumor no será resecable, se decide posponer la cirugía. Se aplican entonces tres ciclos de quimioterapia para reducir el tamaño tumoral y tras esta primera fase de tratamiento neoadyuvante, se realiza la cirugía de intervalo. Posteriormente a esta cirugía se reanuda la quimioterapia hasta completar todo el tratamiento quimioterápico (217).

Por otro lado, la citorreducción secundaria se refiere a la cirugía que se realiza en los casos de recidiva o persistencia, pues un 70% de las pacientes de CO que han sido tratadas con la cirugía y la quimioterapia primarias recaen en la enfermedad a lo largo del transcurso de su vida (215).

Quimioterapia

La quimioterapia convencional utilizada en el tratamiento del CO es habitualmente intravenosa y está compuesta por platino (carboplatino o cisplatino) y taxano (paclitaxel – Taxol –, o docetaxel – Taxotere). Dado que el carboplatino y el cisplatino presentan la misma eficacia, se utiliza carboplatino en la mayoría de los casos porque tiene menos efectos adversos. En el CO epitelial, la quimioterapia se administra normalmente en 6 ciclos, cada uno de los cuales va seguido de un periodo de descanso. La quimioterapia adyuvante consiste en 6 ciclos de tratamiento tras la cirugía primaria, sea cual fuera la citorreducción conseguida. En cambio, la quimioterapia neoadyuvante se aplica como primera opción de tratamiento cuando no se puede realizar una resección completa (tumor residual 0) con la cirugía primaria (217).

El CO es uno de los tumores sólidos más quimiosensibles, pues el 80% de las pacientes responden a la quimioterapia primaria (218). Pero a pesar de la respuesta inicial, sólo el 10-15% adquiere y mantiene una respuesta completa (219), pues la mayoría de tumores desarrollan quimiorresistencia (resistencia *de novo* o resistencia adquirida) (215,220). Las pacientes con carcinomas que recaen tras el tratamiento primario de un único agente quimioterápico análogo al platino desarrollan menos resistencia que las que han sido tratadas con varios agentes (220).

Las pacientes pueden ser clasificadas en tres grupos en función del periodo libre de enfermedad (el periodo de tiempo que pasa entre el último ciclo de quimioterapia y la recaída): las pacientes son platino-sensibles si la recaída tiene lugar posteriormente a los 6 meses des del último ciclo de quimioterapia; son platino-resistentes si recaen en menos de 6 meses; y son platino-refractorias si la enfermedad progresa durante la quimioterapia o no se puede completar el tratamiento. El periodo libre de enfermedad es el indicador más común de quimiorresistencia: cuanto mayor es el periodo, mejor se responde a la quimioterapia de rescate. En términos generales, si las pacientes tardan 6-12 meses en recaer, el 25% responde bien al tratamiento

de rescate; si tardan 12-24 meses, responde el 33%; y si tardan más de 24 meses, responde el 60% (220).

En la quimioterapia de rescate, las pacientes pueden ser tratadas con ciclos adicionales de la misma quimioterapia utilizada en la primera fase (220) o bien, pueden usarse fármacos diferentes al platino, como son: topotecan, antraciclinas como la doxorubicina (Adriamicina) y la doxorubicina liposomal (Doxil), gemcitabina (Gemzar), ciclofosfamida (Cytosan), vinorelbina (Navelbine), hexametilmelamina, ifosfamida y etopósido (VP-16). La elección del fármaco viene determinada habitualmente por el perfil de toxicidad (221,222).

Para algunas mujeres con enfermedad avanzada, se ha visto que la administración de cisplatino o paclitaxel directamente en el abdomen (quimioterapia intraperitoneal) mejora la supervivencia, pues la ventaja principal respecto a la quimioterapia sistémica es que se alcanza la concentración máxima en las células cancerosas presentes en la cavidad abdominal y el efecto es más prolongado. Pero dado que los efectos adversos son muy severos (mayor dolor abdominal, náuseas, vómitos, peritonitis, riesgo de abscesos de la pared abdominal y perforación intestinal, etc.) en comparación con la administración convencional, se aplica en menos del 50% de las pacientes de CO (11).

Nuevas terapias dirigidas para el cáncer de ovario epitelial

Actualmente, los estudios centrados en el desarrollo de nuevas terapias más eficaces para el CO van dirigidos a aumentar la supervivencia global y el periodo libre de enfermedad para mejorar la calidad de vida de las pacientes, ya que la mayor parte de ellas recae en la enfermedad y la posibilidad de curación tras la recidiva es menor al 5% (222).

El estudio de la etiología y la quimiorresistencia del CO ha llevado al desarrollo de terapias moleculares dirigidas. En las últimas décadas se han desarrollado distintos inhibidores y anticuerpos monoclonales que van dirigidos a atacar las células cancerosas por diferentes vías, como la angiogénesis, la supervivencia y el crecimiento celular (223). Debido a la heterogeneidad en la biología del CO, no existe una vía predominante que se encuentre desregulada en la mayoría de las pacientes. De modo que, igual que en otros cánceres, sería esencial la selección individualizada de pacientes para la aplicación de terapias específicas (medicina personalizada). A continuación se describen los principales agentes novedosos para el tratamiento del CO (Tabla 13) (95).

- **Agentes contra la angiogénesis.**

La angiogénesis es un componente clave en la metástasis del CO y el desarrollo de líquido ascítico. VEGF es el principal regulador de la angiogénesis y se ha visto implicado en distintos aspectos de la carcinogénesis ovárica (224). De hecho, la expresión aumentada de VEGF está asociada al mal pronóstico y a la disminución de la supervivencia (95). La terapia anti-angiogénica ha demostrado tener efecto en el CO. Concretamente, Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra VEGF-A, ha demostrado provocar una respuesta del 16-21% en pacientes participantes de ensayos clínicos en Fase II y una mejora de la supervivencia global de 6 meses al ser combinado con la quimioterapia convencional (225). Otros agentes anti-angiogénicos en Fase I y II son: Sunitinib (inhibidor de los receptores PDGF y VEGF), Vatalanib (inhibidor del receptor VEGF), Cedarinib (inhibidor del receptor VEGF que consigue una respuesta del 17%), Motesanib (inhibidor multiquinasa de PDGF, VEGF y c-KIT) y Aflibercept (proteína de fusión de alta afinidad que actúa como bloqueante del receptor de VEGF, consiguiendo una respuesta del 11%) (95).

- Agentes contra la vía PI3K/AKT.

La disregulación de la vía PI3K/AKT es común en el CO y está asociada a mal pronóstico (62,226). Las alteraciones más habituales son la pérdida de PTEN o la amplificación de PI3K o AKT. La activación aumentada de esta vía desencadena un incremento en la proliferación, el crecimiento, el metabolismo, la adhesión celular, así como también induce la transformación maligna (62). Aunque los inhibidores de PI3K y AKT (Temsitrolimus, Everolimus y Ridaforolimus) han entrado recientemente en Fases I y II de ensayos clínicos (95), la utilidad de estas vías para el tratamiento del cáncer queda evidenciada con los estudios de Rapamicina y Deforolimus – inhibidores de mTOR (proteína activada bajo el control de PI3K y AKT) –, pues son agentes que han mostrado ya su eficacia clínica en múltiples tumores (95,207).

- Agentes contra HER2.

La vía de HER2 tiene un papel importante en el crecimiento celular y la supervivencia, por lo que su disregulación se ha visto implicada en la patogénesis de múltiples malignidades, especialmente en el cáncer de mama (95). Debido a la variabilidad de expresión de HER2 en CO, su papel aún no está totalmente determinado en esta enfermedad. Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal que se une al receptor HER2 y bloquea su función, pero en estudios clínicos en Fase II no se ha observado una relación significativa entre la expresión del receptor con la supervivencia o la respuesta de las pacientes a este anticuerpo. La actividad de Trastuzumab en CO se considera limitada (95,227,228). Por otro lado, en ensayos clínicos en Fase II se ha visto que Pertuzumab (otro anticuerpo monoclonal contra HER2) tiene una actividad alta en pacientes con CO que sobre-expresan HER2, aunque el beneficio adicional es limitado, tanto siendo utilizado como agente individual como combinado con la terapia de platino (95,228).

- Agentes contra EGFR.

El receptor tirosina quinasa EGFR, de manera similar a HER2, favorece la proliferación, la supervivencia celular y la angiogénesis. Tras la activación de EGFR, se inducen las vías de PI3K/AKT y MAPK, favoreciendo así el desarrollo y el mantenimiento del tumor. En CO, se ha detectado la sobre-expresión de EGFR y se ha asociado a mal pronóstico. En base a ello, se están evaluando inhibidores de este receptor en ensayos clínicos – Cetuximab, Erlotinib y Lapatinib (229,230) –, pero hasta la fecha, la inhibición de EGFR no ha sido fructífera. La actividad de Cetuximab y Lapatinib es limitada y el estudio en Fase III de Erlotinib no ha demostrado un beneficio adicional en pacientes con alto riesgo de CO tras el tratamiento primario convencional (95).

- Agentes contra PARP.

Los enzimas PARP (Poli (ADP-ribosa) polimerasa) juegan un papel vital en la reparación del ADN, coordinando las vías de reparación de escisión de bases. Los inhibidores de PARP bloquean esta reparación del ADN, provocando la acumulación de roturas de doble cadena durante la replicación. Estos defectos son habitualmente reparados por la recombinación homóloga mediada por BRCA, lo cual permite a la célula continuar con la división celular. Pero en los tumores que carecen de BRCA1/2 funcional debido a mutaciones, la reparación del ADN no es posible. En consecuencia, la inhibición de PARP en estos casos incrementa la selectividad anti-tumoral y mejora la sensibilidad a la quimioterapia (231). En la actualidad, hay dos inhibidores de PARP en ensayos clínicos en Fase II (Olaparib e Iniparib) que muestran actividad en CO recurrente sensible al platino. Notablemente, Olaparib ha demostrado un beneficio clínico del 57% respecto a la terapia convencional. Por otra parte, también se está

probando el efecto de Veliparib en combinación con la ciclofosfamida en pacientes con CO portadoras de mutaciones en BRCA (95).

- Agentes epigenéticos.

Además de mutaciones hereditarias o esporádicas, algunos casos de CO son debidos a alteraciones epigenéticas en el genoma. La hipoacetilación de histonas y la metilación anormal del ADN también contribuyen a la tumorigénesis ovárica y a la quimiorresistencia. Se ha demostrado que la Decitabina, un agente hipometilante de ADN, muestra una respuesta aumentada en CO resistente al platino cuando es aplicada a dosis bajas. También hay otros inhibidores de las deacetilasas de histonas, como Belinostat e inhibidores del proteasoma, como Carfilzomib, que están siendo evaluados en ensayos clínicos en Fase II (95).

- Agentes contra MAPK/BRAF/MEK.

Una de las principales vías que regulan el crecimiento celular es la vía de la quinasa ERK, que dirige una cascada de señalización donde están implicadas las quinasas RAS, RAF y MEK. Las mutaciones en BRAF resultan en una activación constitutiva de las vías MAP/MEK, que desencadenan un aumento en la proliferación de las células cancerosas y una reducción en la supervivencia de las pacientes. La tirosina quinasa MET está implicada en las vías de activación de RAF y MAP, y se ha demostrado que la inhibición por parte de Cabozantinib tiene actividad en el CO avanzado independientemente de la sensibilidad al platino (95).

- Agentes contra receptores alfa-folato.

Los receptores folato (FRs), especialmente FR- α (FOLR1), se encuentran sobre-expresados en más del 80% de los casos de CO no mucinosos. FR- α es clave para el transporte de folato en las células tumorales, facilita la quimiorresistencia y está asociado a mal pronóstico. Farletuzumab es un anticuerpo monoclonal que bloquea este receptor y en un primer ensayo clínico se ha observado que la respuesta de las pacientes alcanza el 75% y que el CA125 sérico disminuye en el 80% de las pacientes participantes del estudio. Actualmente, este anticuerpo se está evaluando en un ensayo clínico en Fase III en combinación con carboplatino-paclitaxel (95,232).

- Agentes contra WEE-1.

La quinasa WEE1 participa en la regulación de la división celular. El inhibidor de WEE1 – MK-1775 – bloquea los procesos de reparación del ADN en células tumorales que presentan mutaciones en TP53 (principalmente en el HGSOE), resultando en la muerte celular. Actualmente, se está evaluando el efecto de MK-1775 en ensayos clínicos en Fase II, en combinación con la quimioterapia convencional (233).

Tabla 13. Agentes inhibidores principales en fases clínicas dirigidos a moléculas alteradas en CO.
Tabla adaptada de Ref. (95).

	Dianas	Inhibidores
Angiogénesis	VEGF	Bevacizumab, Nintedanib
	VEGF TK1	Sunitinib, Vatalanib, Sorafenib, Motesanib, Vandetanib, Cediranib, Pazopanib, Vargatef, AMG706
	VEGF TRAP	Aflibercept
Apoptosis y supervivencia celular	Vía PI3K-PTEN-AKT-mTOR	Temsirolimus, Everolimus, Ridaforolimus
Receptores de factores de crecimiento	HER2	Trastuzumab, Pertuzumab, Lapatinib
	EGFR	Cetuximab, Erlotinib, Lapatinib
Respuesta al daño en ADN	PARP	Olaparib, Iniparib, Veliparib, Rucaparib , Niraparib
Transcripción génica	Epigenéticos	Decitabina, Belinostat
Transducción de señal, Proliferación celular	Vía MAPK/RAF/MEK	Cabozantinib
Transporte de folato	FOLR1	Farletuzumab
División celular	WEE-1	MK-1775

Aunque en las dos últimas décadas se han dedicado esfuerzos para proporcionar un tratamiento efectivo para el CO utilizando distintas clases de agentes quimioterápicos en distintas dosis y combinaciones, las respuestas clínicas siguen siendo de corta duración y únicamente han conducido a pequeñas mejoras en la supervivencia de las pacientes resistentes al platino (95,216). Además, tampoco existe un acuerdo global en la terapia de mantenimiento tras el tratamiento primario convencional. En algunos casos, las terapias dirigidas tras la quimioterapia estándar se aplican para reducir el tamaño tumoral o ralentizar el crecimiento de los CO avanzados (11,95). Por todo ello, es evidente la necesidad de una mayor evolución en las terapias dirigidas contra el CO, tanto en el desarrollo de nuevos agentes activos como en la incorporación de nuevas dianas terapéuticas robustas.

1.2.10. Diseminación del cáncer de ovario

La diseminación del CO tiene un comportamiento biológico único, claramente diferente al patrón clásico de metástasis que tienen los tumores de otros orígenes (234). La metástasis del CO puede tener lugar a través de la vía transcelómica, la vía hematogena o la vía linfática. A diferencia de la mayoría de carcinomas, la difusión del CO a través de la vasculatura no es habitual (235). Sin embargo, la alta frecuencia de afectación de ganglios linfáticos pélvicos y para-aórticos (especialmente en estadios avanzados de la enfermedad), y la correlación de afectación ganglionar con la extensión intraperitoneal, indican que la extensión linfática de CO podría ser más común de lo que generalmente se supone (236).

Tras la extensión directa del tumor, la metástasis transcelómica es la ruta de diseminación más común del CO. De hecho, es la responsable de la alta morbilidad y mortalidad, ya que tiene la capacidad de afectar múltiples órganos vitales en el abdomen, incluyendo el sistema gastrointestinal y el genitourinario. Aproximadamente el 70% de las pacientes presentan metástasis en la cavidad peritoneal en el momento del diagnóstico, afectando particularmente, las trompas de Falopio, el útero, el anejo contralateral, el omento y el peritoneo (237). En ocasiones, también se ven afectados el recto, la vejiga y la pared pélvica (235,238).

En la diseminación transcelómica, las células tumorales exfoliadas del ovario escapan del epitelio de origen y se distribuyen en la cavidad peritoneal formando agregados multicelulares (239), también llamados esferoides. Estos grupos de células tienen la capacidad de crecer en condiciones independientes de anclaje y pueden ser transportadas de forma pasiva por la cavidad abdominal a través del fluido peritoneal (líquido ascítico), el cual aumenta en volumen en presencia de masas anexiales. Se cree que el incremento de ascitis es debido a la obstrucción linfática y la producción aumentada de líquido por parte de las células mesoteliales (240). De hecho, la ascitis es considerada un reservorio de células cancerosas y está asociada a la elevada mortalidad del CO, pues sus factores solubles contribuyen al crecimiento de las células tumorales y a su implantación en el peritoneo. Finalmente, en condiciones favorables, las células cancerosas exfoliadas consiguen adherirse a la cavidad abdominal modificando sus capacidades adhesivas, e invaden el tejido formando nuevos focos tumorales (Figura 12) (238).

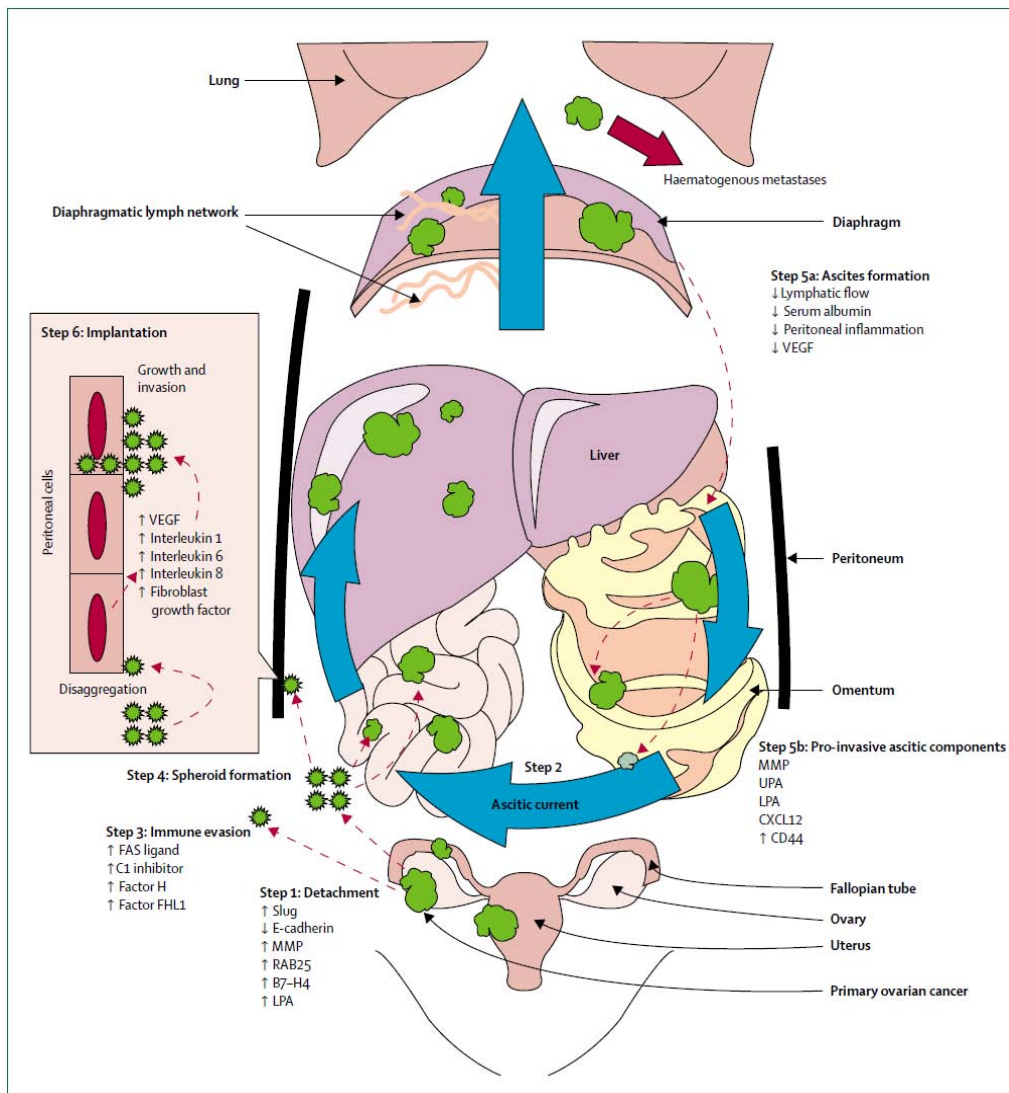


Figura 12. Mecanismos de metástasis transcelómica en CO. Fase 1: las células cancerosas del ovario (verde) se desprenden del órgano tras alterar su expresión génica. Fase 2: el fluido peritoneal o ascítico (flechas azules) facilita la metástasis peritoneal, linfática y hematológica. Fase 3: evasión inmune por inhibición del complemento y secreción del ligando FAS. Fase 4: formación de esferoides. Fase 5: los componentes solubles de la ascitis estimulan la progresión de la metástasis. Fase 6: activación e implantación peritoneal. B7-H4: proteína coestimuladora inmune B7-H4. CXCL12: ligando de quimiocina (motivo CXC) receptor 4 (CXCR4). FHL1: factor H como la proteína 1. LPA: ácido lisofosfatídico. MMP: metaloproteínasa de matriz. VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular. Imagen adaptada de Ref. (238).

Un aspecto característico de la diseminación del CO es la ausencia de penetración por parte de las células tumorales tras su implantación en nichos secundarios. Es decir, a diferencia de otros carcinomas que suelen crecer en el parénquima de los órganos que colonizan, las células cancerosas del ovario se extienden y crecen sobre el mesotelio que recubre los órganos de la cavidad peritoneal, sin penetrar en las capas profundas de los tejidos (241).

Implantación de las células del tumor ovárico en la cavidad peritoneal

Las células tumorales del ovario realizan una adhesión selectiva; se implantan y crecen en sitios específicos de la cavidad peritoneal (242). La implantación inicial tiene lugar en la trompa de Falopio y el ovario contralateral. Luego, la invasión se extiende en el peritoneo y preferentemente en el omento (243).

En el peritoneo, las zonas frecuentemente colonizadas son el peritoneo situado bajo el diafragma derecho y el mesenterio del intestino delgado, ya que son áreas bien vascularizadas (237,242,244). El peritoneo está compuesto por el mesotelio – la monocapa celular que recubre la cavidad peritoneal y funciona como barrera protectora de superficies serosas y órganos internos – y tejido conectivo, formado por fibroblastos, adipocitos, células del sistema inmune y vasos sanguíneos (242). Gracias a la contigüidad anatómica de la superficie ovárica con el peritoneo, las células tumorales se extienden a través del mesotelio creando nuevos focos tumorales. Durante la diseminación de las células cancerosas sobre el mesotelio, las células mesoteliales experimentan la transición mesotelio-mesénquima para convertirse en células mesenquimales (fibroblastos) que secretan moléculas de adhesión, TGF- β (*Transforming growth factor* β ; Factor de crecimiento transformante β) y VEGF – factores que favorecen la implantación e invasión de las células tumorales en la capa submesotelial y la posterior angiogénesis (245–247).

En conjunto, la interacción de las células tumorales del ovario con los componentes del microambiente tumoral (células mesoteliales, fibroblastos, adipocitos, macrófagos y células endoteliales) son claves para la expansión del tumor en la cavidad peritoneal. Concretamente, las células mesoteliales facilitan la colonización inicial permitiendo el paso hacia el submesotelio; los fibroblastos asociados al tumor secretan enzimas y factores que alteran la ECM, promoviendo la invasión; los adipocitos proporcionan energía en forma de lípidos, favoreciendo el crecimiento; los macrófagos participan en la destrucción de la ECM e inducen la angiogénesis; y las células endoteliales promueven el crecimiento a través de la formación de redes capilares (Figura 13) (248).

El omento o epiplón es la zona principal del peritoneo que invaden las células tumorales ováricas. De hecho, el 80% de los casos de CO metastatizan en el omento (241,242,249–251). Éste es una estructura intraperitoneal con unas características anatómicas y patológicas únicas. Consiste principalmente en tejido adiposo, acompañado de otros componentes como vasos sanguíneos, vasos linfáticos y células del sistema inmune. Histológicamente, el omento está compuesto por una doble capa de peritoneo que cubre el estómago, el colon transversal y se extiende retroperitonealmente hasta el páncreas (242).

El omento representa un soporte adecuado para el crecimiento, la supervivencia y la dispersión de las células cancerosas (241). De manera interesante, los adipocitos que lo componen atraen las células tumorales ováricas con mayor intensidad que los adipocitos de otros orígenes. Los adipocitos del omento secretan citocinas, como la interleucina-8 (IL-8), que funcionan como agentes quimioatrayentes para las células cancerosas. En respuesta a estas moléculas, las células tumorales diseminan en la cavidad peritoneal en dirección al omento invadiendo a su paso el mesotelio (252). Cuando las células metastásicas entran en contacto con los adipocitos, éstos les transfieren ácidos grasos y glutamina para favorecer su crecimiento. Por lo

tanto, el tejido adiposo del omento funciona como un gran reservorio de lípidos para el desarrollo de los nuevos focos tumorales (252,253). La proliferación de las células cancerosas necesita lípidos de forma masiva para suplir las necesidades aumentadas de proliferación, ya que estas moléculas son componentes de la membrana celular y además proporcionan energía. La obtención de lípidos exteriores es la manera más rápida, económica y eficiente de obtener energía (253).

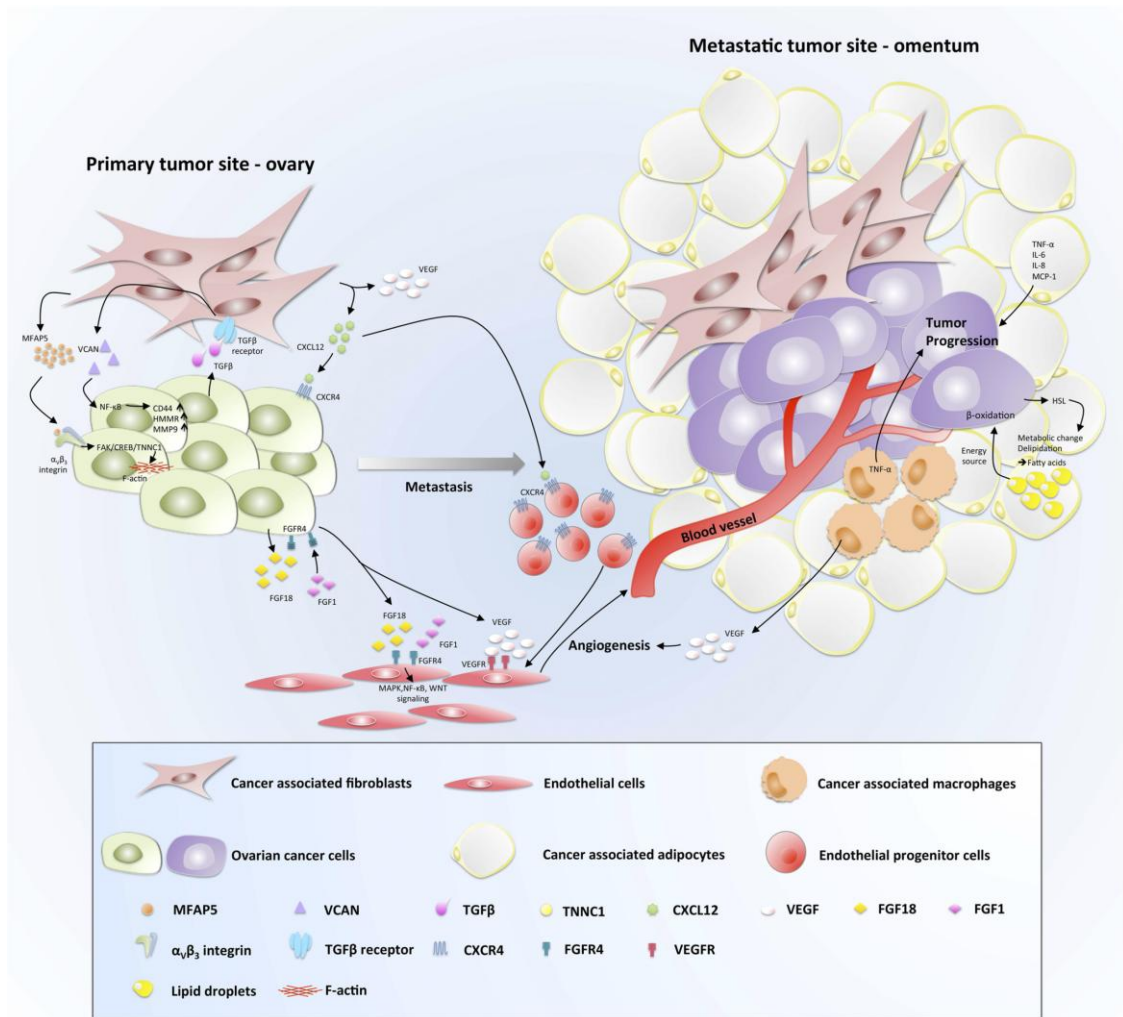


Figura 13. Comunicación celular y señalización en el proceso de diseminación del CO. La progresión y metástasis del CO desde el tumor primario hasta el tumor metastásico en el omento es facilitado por la interacción de las células cancerosas con varios componentes estromales. **En el tumor primario ovárico (izquierda)**, la motilidad de las células tumorales es aumentada por las proteínas que secretan los fibroblastos asociados al cáncer (Cancer associated fibroblasts, CAFs) – VCAN, MFAP5, CXCL12, FGF1 y FGF18. Asimismo, los CAFs secretan factores pro-angiogénicos que, junto con el VEGF que producen las células tumorales, promueven el establecimiento de microvasos tumorales para aumentar el crecimiento a través del aporte de nutrientes. **En el omento (derecha)**, los factores que secretan los adipocitos y los macrófagos contribuyen a la creación de un microambiente apropiado para el desarrollo tumoral. Las interacciones entre los adipocitos del omento y las células tumorales desencadenan la progresión tumoral; los adipocitos secretan citocinas (TNF-α, IL-6 e IL-8) que actúan sobre las células tumorales acelerando la invasión y también les transfieren ácidos grasos para mantener el crecimiento tumoral. Los macrófagos del omento secretan TNF-α y VEGF, que favorecen la invasión y la angiogénesis tumoral. Imagen adaptada de Ref. (248).

Las células metastásicas del ovario suelen invadir de forma preferente los agregados inmunes que se encuentran en el omento, ya que representan una fuente directa de nutrientes y oxígeno; el microambiente de estas áreas favorece intensamente su proliferación y supervivencia. Estos agregados son estructuras que contienen adipocitos, células mesoteliales, células del sistema inmune y una red de capilares sanguíneos (249,250). Las células tumorales se apropian de la vasculatura densa de los agregados y dado que la angiogénesis ya está inducida, la formación de nuevos vasos es rápida y, tiene lugar un crecimiento tumoral agresivo (244). Se ha visto que al menos el 25% de las células mesoteliales que se encuentran en estos agregados son hipóxicas (244) y, tras la activación de TGF- β (254), secretan VEGF, el cual induce mayor vascularización. Asimismo, las células mesoteliales también expresan moléculas de adhesión que permiten la unión de las células tumorales, promoviendo la metástasis (255). El número elevado de plaquetas de este microambiente tumoral también resulta en un incremento de la producción de TGF- β , que juntamente con TP53 mutado favorece la invasión de las células cancerosas activando la transición epitelio-mesénquima (TEM) (Figura 14) (244,256).

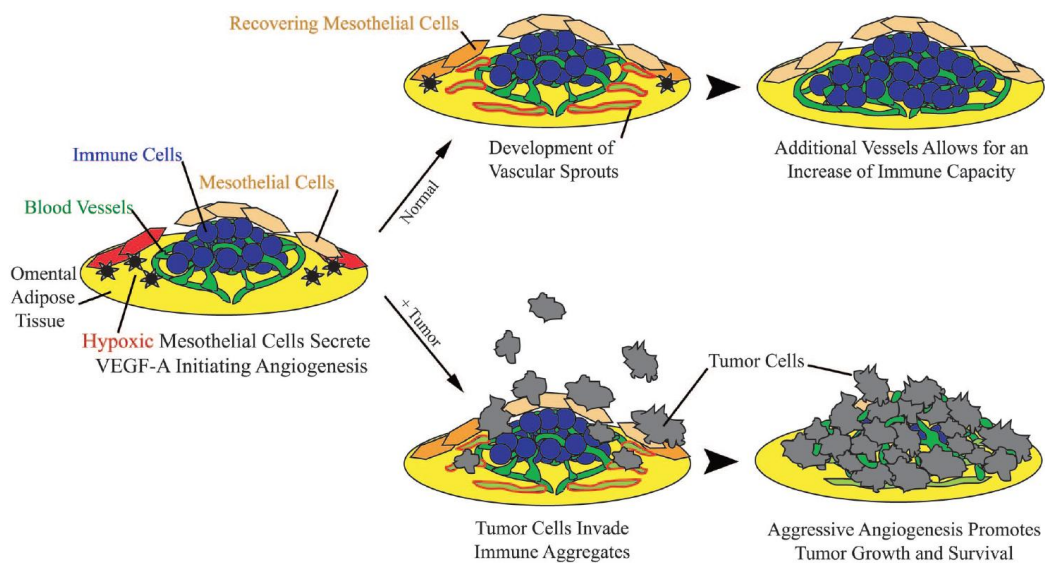


Figura 14. Colonización de los agregados inmunes del omento por parte de las células tumorales del ovario. Los agregados inmunes del omento contienen células mesoteliales, algunas de las cuales son hipóxicas (en rojo), por lo que secretan VEGF-A (asteriscos negros). **En la parte superior** se representa el estado fisiológico normal, en el que la producción de VEGF-A estimula los vasos sanguíneos para producir brotes vasculares (verde delimitado en rojo), resultando en la inducción de angiogénesis y el recubrimiento de células mesoteliales. El incremento de vasos aporta más células inmunes, junto con oxígeno y nutrientes adicionales para soportar la entrada de células. **En la parte inferior** se representa el modelo de metástasis, en el que las células tumorales procedentes del ovario invaden los agregados y se apropian de la vasculatura densa. Dado que la angiogénesis ya está inducida, la formación de nuevos vasos sanguíneos es rápida, resultando en un crecimiento tumoral agresivo. Imagen adaptada de Ref.(244).

Moléculas de adhesión implicadas en la diseminación del cáncer de ovario

El mesovario normal es un mesotelio estacionario que comparte histogénesis y continuidad anatómica con el mesotelio peritoneal, y que además conserva la capacidad de alterar su estado de diferenciación hacia fenotipos epiteliales o estromales en respuesta a determinadas señales ambientales (257). Concretamente, el mesovario expresa un conjunto de citoqueratinas característico de las células epiteliales (las citoqueratinas 7, 8, 18, y 19), moléculas típicas de las células mesoteliales (el antígeno MUC1 y la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa), y expresa de manera constitutiva marcadores mesenquimales (vimentina, N-cadherina, y α -actina de músculo liso). Las células epiteliales del ovario también producen

enzimas proteolíticas (el activador del plasminógeno uroquinasa, MMP2 y MMP9), y colágeno de tipo III – característico de células mesenquimales (258). En conjunto, estas moléculas contribuyen tanto a la rotura y cicatrización del epitelio ovárico durante la ovulación, como a la remodelación de las capacidades adhesivas durante la invasión del carcinoma.

Cabe tener en cuenta que la migración es una propiedad natural del epitelio ovárico, pues éste se rompe y repara cada vez que libera un oocito (259). Por lo tanto, las células cancerosas del ovario difieren mucho de las células tumorales de otros órganos, ya que tienen una alta capacidad de movilidad intrínseca, que debe de provenir del potencial migratorio de su célula precursora (234).

- La transición epitelio-mesénquima y la transición mesénquima-epitelio en el cáncer de ovario.

La conversión de una célula epitelial en una célula mesenquimal, proceso denominado TEM, tiene un papel clave en la metástasis. En general, durante la TEM, las células epiteliales pierden su organización compacta, adquieren una morfología en forma de huso y se transforman en células más móviles e invasoras, adquiriendo un comportamiento migratorio (260). En gran parte de los carcinomas humanos, las células tumorales que experimentan la TEM disminuyen la expresión de E-cadherina y aumentan la expresión de N-cadherina para promover la interacción con las células de la ECM (260,261). En contraposición con la mayoría de cánceres, en los que E-cadherina es un gen supresor tumoral – la reversión de su expresión revierte el fenotipo mesenquimal invasivo hacia el fenotipo epitelial benigno (260)–, en CO, E-cadherina juega el papel opuesto (262). La expresión de esta proteína en células epiteliales de ovario está asociada a la tumorigénesis y a la metástasis, así como también se ha relacionado con el alto grado tumoral y la baja supervivencia global de las pacientes con CO (263).

Los niveles de E-cadherina varían a lo largo de la progresión del CO y su expresión es necesaria tanto para el crecimiento del tumor primario como para el crecimiento del tumor secundario (261). En el modelo de progresión tumoral del CO, la TEM proporciona un mecanismo de escape hacia un nuevo nicho menos adverso, evadiendo la apoptosis y garantizando la supervivencia celular en condiciones de estrés (257). Inicialmente, en el tumor primario, las células cancerosas experimentan una TEM parcial, que les confiere una capacidad móvil adicional para la posterior invasión. Cuando estas células consiguen desprenderse del tumor, experimentan la TEM total, para poder crecer y sobrevivir formando esferoides compactos en el líquido ascítico. Luego, estos agregados multicelulares pasan por el proceso inverso de transición mesénquima-epitelio (TME), para implantarse y formar metástasis sólidas (264). Esta transición permite responder a factores de crecimiento paracrinos y sustentar el crecimiento. Finalmente, tras la colonización de nuevos nichos, los implantes metastásicos atraen vasos sanguíneos para continuar proliferando (241).

En resumen, la diseminación del CO no sigue el modelo clásico de TEM de otros tumores, sino que tiene lugar una TEM parcial para el desprendimiento del tumor primario, seguida de una TEM total para sobrevivir en el fluido peritoneal, y el proceso inverso de TME para la implantación en la cavidad peritoneal.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. SECCIÓN I: Optimización del procedimiento de aislamiento de exosomas presentes en el aspirado uterino para la futura identificación de nuevos marcadores asociados al cáncer de ovario

2.1.1. Antecedentes

El cáncer de ovario es el cáncer ginecológico más letal y la quinta causa de muerte por cáncer en mujeres del mundo occidental. Debido a la inespecificidad de los síntomas y a la falta de un diagnóstico eficaz, el cáncer de ovario es detectado en el 85% de los casos en estadios avanzados, resultando en una tasa de supervivencia a 5 años del 28%. En contraste, la tasa de supervivencia a 5 años aumenta hasta el 92% si el diagnóstico tiene lugar en estadios iniciales de la enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad clínica evidente de identificar nuevos marcadores de diagnóstico que solos, o en combinación con las técnicas diagnósticas actuales, permitan detectar el cáncer de ovario en estadios tempranos, mejorando así la supervivencia global y la calidad de vida de las pacientes.

2.1.2. Objetivo general

El uso de biofluidos para el diagnóstico precoz del cáncer de ovario representa un enfoque ampliamente estudiado. Sin embargo, el uso del aspirado uterino y, en concreto, de los exosomas presentes en la fracción fluida del aspirado uterino, representa un abordaje novedoso como nueva fuente de marcadores asociados al cáncer de ovario. El aspirado uterino es una muestra poco invasiva del tracto genital femenino que no requiere la intervención quirúrgica para su extracción. Los exosomas contenidos en el aspirado uterino son portadores de moléculas específicas de las células de origen, de modo que enriquecen la muestra en moléculas con significancia fisiopatológica. Puesto que actualmente no existe un consenso en los métodos de aislamiento de exosomas a partir de biofluidos complejos, **el primer objetivo de esta tesis doctoral es establecer las bases del aislamiento de exosomas a partir del aspirado uterino** para la futura identificación de marcadores asociados al cáncer de ovario (objetivo no contemplado en el desarrollo de este trabajo).

2.1.2.1. Objetivos específicos

1) Confirmar la presencia de exosomas en la fracción fluida del aspirado uterino y caracterizar las vesículas aisladas en relación a su morfología, tamaño, concentración y marcadores exosomales.

2) Determinar cuál es el procedimiento basado en la ultracentrifugación más adecuado para aislar exosomas a partir del aspirado uterino, que permita la futura identificación de marcadores asociados al cáncer de ovario.

3) Determinar cuál es el procedimiento más adecuado para la extracción de ARN procedente de exosomas de aspirado uterino, que permita la futura identificación de marcadores de ARN asociados al cáncer de ovario.

4) Determinar la presencia de ARNm y miARNs específicos en las preparaciones exosomales de aspirado uterino que se encuentran relacionados con patologías del tracto genital femenino.

2.2. SECCIÓN II: Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para bloquear la diseminación del cáncer de ovario

2.2.1. Antecedentes

El cáncer de ovario metastatiza por extensión directa desde el tumor ovárico hacia órganos vecinos o por desprendimiento de las células cancerosas del ovario, y la subsiguiente dispersión e implantación en el peritoneo. La enfermedad avanzada, caracterizada por el proceso de diseminación metastásica, es la principal causa del fracaso del tratamiento. Actualmente el tratamiento del cáncer de ovario consiste en una cirugía citorreductora radical combinada con quimioterapia basada en platino y taxano. No obstante, aunque inicialmente el 80% de las pacientes de cáncer de ovario responden al tratamiento y el 40-60% adquiere una respuesta completa, el 90% de ellas recaen con un periodo libre de enfermedad de 18 meses. Por consiguiente, es claramente necesario identificar las moléculas que juegan un papel importante en el proceso de metastatización del cáncer de ovario para desarrollar nuevas terapias dirigidas que permitan detener dicho proceso, propiciando así una mejora en la supervivencia global y en la calidad de vida de las pacientes.

2.2.2. Objetivo general

Dado que el proceso de diseminación metastásica del cáncer de ovario es la principal causa del fracaso del tratamiento actual de la enfermedad, la identificación de moléculas clave en dicho proceso podría llevar al desarrollo de nuevas terapias dirigidas contra la diseminación. Para ello, proponemos la caracterización de la expresión génica del tumor primario de ovario y de la metástasis abdominal como el primer paso para determinar las claves del proceso metastásico. Por consiguiente, **el segundo objetivo de esta tesis doctoral es identificar nuevas moléculas asociadas al proceso de diseminación del cáncer de ovario seroso de alto grado**, para poder ser utilizados en un futuro como dianas terapéuticas en el bloqueo de la metástasis.

2.2.2.1. Objetivos específicos

1) Determinar el perfil de expresión génica de muestras pareadas de tumor primario de ovario y metástasis abdominal procedentes de pacientes de cáncer de ovario seroso de alto grado mediante la tecnología del *microarray*.

2) Determinar cuáles son las vías moleculares alteradas entre el tumor primario de ovario y la metástasis abdominal mediante el software *Ingenuity Pathway Analysis*.

3) Determinar cuáles son los candidatos que juegan un papel relevante en la supervivencia de pacientes de cáncer de ovario mediante estudios *in silico*.

4) Validar la sobre-expresión de los candidatos identificados en el objetivo 3 en cohortes independientes de muestras de tumor primario y metástasis abdominal de pacientes de cáncer de ovario, a nivel de ARN, mediante la técnica de PCR cuantitativa, y a nivel de proteína, mediante la técnica de inmunohistoquímica.

5) Determinar la expresión de los candidatos más prometedores (objetivo 4) en muestras de plasma procedentes de una cohorte independiente de pacientes de cáncer de ovario, a nivel de proteína, mediante la técnica de inmunoblot; y validar posteriormente la potencial aplicación de dichas moléculas para la mejora del diagnóstico del cáncer de ovario, comparando su expresión en muestras de plasma de una cohorte independiente de pacientes de cáncer de ovario con la expresión en muestras de plasma de una cohorte de pacientes control, a nivel de proteína, mediante la técnica de inmunoblot.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. SECCIÓN I: Optimización del procedimiento de aislamiento de exosomas presentes en el aspirado uterino para la futura identificación de nuevos marcadores asociados al cáncer de ovario

3.1.1. Pacientes incluidas en el estudio

En este estudio participaron un total de 39 mujeres premenopáusicas; la mayoría de ellas padecían una patología ginecológica benigna, y otras eran mujeres sanas sin ninguna afectación. Las pacientes fueron atendidas en el Hospital Universitario Vall Hebron siguiendo el protocolo de estudio de investigación aprobado por el comité ético (código de aprobación: PR_AMI_50-2012) y habiendo firmado el consentimiento informado correspondiente. En la Tabla 14 se resumen las características clínico-patológicas de las pacientes. El principal criterio de inclusión era la premenopausia. Por el contrario, fueron excluidas del estudio aquellas mujeres que habían sufrido previamente algún cáncer del tracto genital femenino, y las pacientes con VIH o el virus de la hepatitis.

Tabla 14. Características clínico-patológicas de las pacientes incluidas en el estudio. Se detalla la edad, el diagnóstico y el volumen de partida de la fracción fluida de los AUs. Las muestras 1-27 fueron utilizadas para comparar distintos procedimientos de aislamiento de EVs; las muestras 28-33 se analizaron de manera individual para la caracterización de EVs mediante NTA e inmunoblot; y las muestras 34-39 se utilizaron para el análisis de ARN.

Paciente	Edad	Diagnóstico	Volumen fracción fluida AU	Sub-estudio
1	22	Cistoadenoma mucinoso	600 µL	Optimización
2	30	Endometrioma	760 µL	Optimización
3	24	Quiste folicular	550 µL	Optimización
4	36	Cistoadenoma seroso papilar	1000 µL	Optimización
5	39	Endometrioma	1000 µL	Optimización
6	40	Endometrioma	650 µL	Optimización
7	23	Endometrioma	300 µL	Optimización
8	38	Cistoadenoma mucinoso	500 µL	Optimización
9	29	Fibroma ovárico	600 µL	Optimización
10	37	Endometrioma	450 µL	Optimización
11	37	Endometrioma + leiomioma uterino	250 µL	Optimización
12	33	Absceso tubo-ovárico + Endometrioma	120 µL	Optimización
13	44	Cistoadenoma seroso	600 µL	Optimización
14	40	Endometrioma	400 µL	Optimización
15	21	Cistoadenoma seroso	400 µL	Optimización
16	38	Cistoadenoma mucinoso	600 µL	Optimización
17	31	Cistoadenoma mucinoso	100 µL	Optimización
18	51	Endometrio proliferativo	500 µL	Optimización
19	28	Endometrio semi-secretor	500 µL	Optimización
20	47	Pólipo endometriósico	1000 µL	Optimización
21	45	Leiomioma uterino	500 µL	Optimización
22	38	Leiomioma uterino	300 µL	Optimización
23	46	Tejido endocervical normal	600 µL	Optimización
24	50	Endometrio atrófico	350 µL	Optimización
25	42	Pólipo endometriósico	160 µL	Optimización
26	36	Pólipo endometriósico	400 µL	Optimización
27	45	Endometrioma	500 µL	Optimización

28	30	Endometrioma	904 µL	Análisis proteína
29	36	Cistoadenoma seroso papilar	1240 µL	Análisis proteína
30	53	Leiomioma uterino submucoso	434 µL	Análisis proteína
31	28	Tejido endocervical normal	330 µL	Análisis proteína
32	47	Pólipo endometriósico	678 µL	Análisis proteína
33	51	Endometrio secretor	1000 µL	Análisis proteína
34	30	Leiomioma uterino + adenomiosis	730 µL	Análisis ARN
35	39	Hidrosalpinx unilateral	880 µL	Análisis ARN
36	24	Cistoadenoma seroso	760 µL	Análisis ARN
37	33	Endometrio secretor	750 µL	Análisis ARN
38	40	Leiomioma uterino	790 µL	Análisis ARN
39	40	Leiomioma uterino	750 µL	Análisis ARN

3.1.2. Recogida y procesamiento de aspirado uterino

El AU fue obtenido mediante aspiración con una cánula de biopsia endometrial, “Pipelle de Cornier” (*Gynetics Medical Products*) en la consulta ginecológica del Hospital Universitario Vall Hebron. Las muestras fueron colocadas en tubos de 1,5 mL y se mantuvieron en hielo (0°C) hasta su procesamiento en el laboratorio. El procedimiento consiste en la adición de tampón fosfato salino (*Phosphate buffered saline*, PBS) a una relación 1:1 (v/v), mezcla de la muestra mediante pipeteo y centrifugación a 2.500 g (4°C) durante 20 min en un rotor F45-30-11 (Eppendorf Microcentrifuge, 5417R; *Eppendorf*) para retirar la fracción celular. La fracción fluida del AU, de ahora en adelante denominada sobrenadante (SN), fue alícuotada y congelada a -80°C hasta su uso. Para optimizar el protocolo de aislamiento de EVs, se utilizó un grupo de 27 SNs (muestras 1 a 27, ver apartado 3.1.1. *Pacientes incluidas en el estudio*, *Tabla 14*), que fueron mezclados de manera homogénea y divididos posteriormente en 20 alícuotas, cada una de las cuales con 445 µL de volumen.

3.1.3. Aislamiento de exosomas

Para optimizar el aislamiento de EVs, se realizaron por cuadruplicado los protocolos *Estándar* (I); *Filtración* (II) y colchón de *Sacarosa* (III), descritos a continuación (Figura 15). Para la optimización de la extracción de miARN/ARNm, se testaron distintas modificaciones del protocolo *Estándar* por duplicado – sección “IV” (23).

I. Protocolo Estándar

Las EVs fueron aisladas del SN del AU mediante centrifugación diferencial, siguiendo una modificación del protocolo de aislamiento descrito previamente por Théry et al. (157). El SN se descongeló sobre hielo (0°C) y se diluyó con PBS 1X hasta un volumen final de 25 mL. A continuación se realizó una centrifugación a 10.000 g (4°C) durante 30 min en la centrífuga Heraeus MultifugeX3R, rotor FiberLite F15-8x-50c (*Thermo Fisher Scientific*), para retirar restos celulares, macropartículas y cuerpos apoptóticos. El *pellet* resultante enriquecido en MVs se resuspendió en 50 µL de PBS 1X y se congeló a -80°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo de ultracentrifugación (*Beckman Coulter*) y se añadió PBS 1X hasta alcanzar 30 mL de volumen final, para proceder a la primera ultracentrifugación de 2 h a 100.000 g (4°C) en la centrífuga Sorvall WX UltraSeries, rotor AH-629 (*Thermo Fisher Scientific*). El sobrenadante de esta ultracentrifugación es la denominada Fracción Soluble (FS), que se congeló a -80°C. El *pellet* resultante contenía EVs y otros contaminantes, de manera que se resuspendió en PBS 1X y se centrifugó de nuevo durante 1 h a 100.000 g (4°C), a modo de lavado. El *pellet* final, que se encuentra enriquecido en EVs (probablemente junto con algunas MVs y cuerpos apoptóticos remanentes), se resuspendió en 50 µL de PBS 1X. Tras la resuspensión, se

reservaron 5 μL del *pellet* de MVs y del *pellet* de EVs a -80°C para el análisis del tamaño y la concentración de las EVs, mientras que el resto de las muestras se congelaron a -80°C para el análisis proteico.

II. Protocolo de Filtración

El protocolo de *Filtración* consistía en la depleción de estructuras mayores de 200 nm del sobrenadante obtenido tras la primera centrifugación a 10.000 g del protocolo *Estándar*. El fluido se hizo pasar a través de un filtro estéril (*Corning*) que presentaba 0,2 μm de diámetro de poro. El resto del protocolo es igual que el protocolo *Estándar*.

III. Protocolo de Colchón de Sacarosa

Tras la primera ultracentrifugación del protocolo *Estándar*, se realizó una segunda ultracentrifugación a 100.000 g durante 1 h (4°C) en un colchón de *Sacarosa* al 30% (20 mM Tris-HCl, pH 7,4 en D_2O), de densidad 1,13-1,19 g/mL. Las EVs se recogieron punzando el tubo por la parte inferior con una aguja, y se lavaron añadiendo PBS 1X y centrifugando nuevamente 1 h a 100.000 g (4°C). El *pellet* final se resuspendió en 50 μL de PBS 1X y se congelaron las mismas fracciones recogidas en el protocolo *Estándar* a -80°C .

IV. Condiciones experimentales para la extracción de ARN

Se testaron 4 condiciones experimentales (“A”, “B”, “C” y “D”), que incluían la sonicación (aplicación de ultrasonido para agitar las partículas de la muestra y romper las estructuras membranosas) y el tratamiento con ARNasa A (nucleasa que cataliza la hidrólisis de ARN en fragmentos pequeños) en diferentes puntos del protocolo *Estándar* (Figura 23). En el protocolo “A”, el *pellet* final de EVs obtenido con el protocolo de ultracentrifugación se sonicó, se aplicó la ARNasa A y se procedió a la extracción de ARN. En el protocolo “B”, únicamente se aplicó la sonicación en el *pellet* final. En el protocolo “C”, se realizó el tratamiento de ARNasa A tras la primera ultracentrifugación de 2 h. Y finalmente, en el protocolo “D”, no se aplicó ni sonicación ni ARNasa A – era el protocolo *Estándar* sin modificaciones. La sonicación consistía en 5 ciclos de 5 s a una amplitud de 100 (Labsonic M, *Sartorius Stedim Biotech*). Para el tratamiento de ARNasa A, las EVs se incubaron en 500 μL de ARNasa A (0,1 mg/mL, *Qiagen*) durante 1 h a 37°C .

3.1.4. Análisis del tamaño y de la concentración de exosomas

El análisis de seguimiento de nanopartículas se realizó mediante el equipo de Nanosight LM10 (*Malvern Instruments*) – equipado con un láser de 405 nm y una cámara C11440 ORCA-Flash2.8 (*Hamamatsu*). Los datos fueron analizados mediante el software NTA v.2.3. El tamaño y la concentración de las partículas fueron determinados bajo los siguientes parámetros: el nivel de cámara y el límite de detección se fijaron a un máximo de 15 ó 16, y un mínimo de 3 a 5, respectivamente; la ganancia de cámara se estableció a 512; finalmente, el desenfoque, la longitud mínima de pista y el tamaño mínimo esperado se definieron con el modo automático. Las lecturas se realizaron en triplicados, registrando vídeos de 60 s a 18,87 fotogramas por segundo, a temperatura ambiente (TA, $23-25^{\circ}\text{C}$).

3.1.5. Microscopía electrónica

Las MVs y EVs aisladas se analizaron por duplicado mediante microscopía electrónica de transmisión. Las vesículas se fijaron en 50 μL de paraformaldehído al 4%. Las muestras se depositaron sobre rejillas de oro y se incubaron durante 1 min. Tras retirar el exceso de muestra, se realizó la tinción negativa mediante la incubación de 1 min con acetato de uranilo. Seguidamente, se hizo un lavado con agua y se dejaron secar las rejillas durante toda la noche

(*overnight*, o/n) a TA. Las muestras se observaron con el microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010 acoplado a una cámara Orius CCD (*Gatan, Inc.*), que trabajaba con un filamento de tungsteno a 80 kV.

3.1.6. Extracción de proteína

La extracción de proteína de las MVs y EVs se realizó añadiendo tampón RIPA 1X (40 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM EDTA, Triton X-100 al 2%, con inhibidores de proteasas 1:100 – P8340, *Sigma-Aldrich*) a una relación 1:1 (v/v), y se incubaron o/n a -20°C. Los lisados se descongelaron en hielo (0°C) y se sonicaron durante 5 ciclos de 5 s a una amplitud de 100 (Labsonic M, *Sartorius Stedim Biotech*), para asegurar la disrupción de la membrana. La extracción de proteína de la FS recogida tras las 2 h de ultracentrifugación se precipitó mediante la adición de acetonitrilo 100% a una relación 1:5 (v/v). Tras la incubación a -20°C o/n, se realizó una centrifugación a 14.000 g de 30 min (4°C) para sedimentar la proteína. Seguidamente, se realizó un lavado con acetonitrilo, centrifugando a 14.000 g durante 15 min (4°C). Finalmente, el *pellet* se dejó secar a TA y se resuspendió en 500 µL de RIPA 1X. La concentración de proteína se determinó mediante el kit “Bio-Rad DC Protein Assay” (*Bio-Rad Laboratories*) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.1.7. Inmunoblot

En este estudio, se separó una cantidad de 4 µg de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) al 10% y se transfirieron a membranas PVDF. Para el bloqueo, las membranas se incubaron con leche en polvo sin grasa al 5% de PBS 1X con Tween 20 al 0,01%. Las proteínas fueron detectadas mediante el uso de anticuerpos inmunológicos primarios: anti-CD9 de ratón (dilución 1:250; 555370, *BD Biosciences*), anti-CD63 de ratón (dilución 1:1000; OP171, *Calbiochem*), anti-CD81 de ratón (dilución 1:1000; sc-166028, *Santa Cruz*), anti-TSG101 de ratón (dilución 1:500; ab83, *Abcam*), anti-Flotilina-1 de ratón (dilución 1:250; 610821, *BD Biosciences*), anti-Anexina V de conejo (dilución 1:1000; ab108321, *Abcam*) y anti-Haptoglobina de ratón (dilución 1:1000; ab13429, *Abcam*). Tras la incubación de las membranas con los anticuerpos primarios o/n a 4°C en rotación, se lavaron, y se incubaron durante 1 h a TA con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a HRP (*Horseadish peroxidase*): inmunoglobulinas/HRP anti-IgG de ratón producido en conejo (dilución 1:2000; P0260, *Dako*) o inmunoglobulinas/HRP anti-IgG de conejo producido en cabra (dilución 1:2000; P0448, *Dako*). Finalmente, se reveló la señal HRP utilizando el reactivo “Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate” (WBKLS0100; *Merck Millipore*). La intensidad de las bandas se cuantificó de manera densitométrica con el software “Image J v.1.45s”.

3.1.8. Extracción de ARN total

El ARN total, que incluye miARNs y otros ARNs, se aisló con el kit “Qiazol and miRNeasy MiniKit” (*Qiagen*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En este protocolo de extracción de ARN, las muestras fueron inicialmente lisadas y homogeneizadas en presencia de Qiazol, un tampón altamente desnaturizante que inactiva inmediatamente las ARNasas para asegurar el aislamiento del ARN intacto. Durante la extracción de ARN también se aplicó un tratamiento con ADNasa para eliminar las moléculas de ADN con el kit “RNase-free DNase set” (*Qiagen*), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Previamente a la extracción de ARN, a cada lisado de Qiazol se añadieron 25 nanomoles de un miARN sintético de la especie *Caenorhabditis elegans* (cel-mirR-39, 5'-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3'), como control interno para la normalización de los datos de la RT-qPCR (*Real Time quantitative PCR*; Reacción en Cadena de la Polimerasa

cuantitativa a tiempo real) (265). El ARN de las MVs y EVs se eluyó con 20 μ L de agua libre de nucleasas (“Nuclease-free water”, *Ambion*) y se guardó a -80°C hasta análisis posteriores. La concentración e integridad del ARN se determinó mediante electroforesis capilar utilizando el sistema “Agilent RNA6000PicoKit” en el equipo Agilent2100 Bioanalyzer (*Agilent Technologies*).

3.1.9. Transcripción reversa, pre-amplificación y RT-qPCR

En este estudio, el ARN se convirtió a cADN utilizando la transcriptasa reversa comercial “SuperScript III Reverse Transcriptase” (*Invitrogen*), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el análisis de miARN, el ARN se retrotranscribió mediante “TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit” y cebadores de las estructuras de horquilla (tallo-bucle) de miARNs específicos. Previamente a la RT-qPCR, el cADN se pre-amplificó por medio de “TaqMan Preamplification Master Mix Kit” (*Applied Biosystems*), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la RT-qPCR se utilizaron “TaqMan Universal MasterMix II with UNG” (*Applied Biosystems*) y sondas TaqMan dirigidas a transcritos y miARNs específicos. Concretamente, las sondas fueron: 18S (4319413E), TSG101 (Hs00173072), PDCD6IP - ALIX (Hs00183813_m1), GAPDH (Hs99999905_m1), β -Actina (4333762T), CD24 (Hs02379687), MUC16 - CA-125 (Hs01065189), miR-200b (002251), miR-200c (002300), miR-223 (002295), miR-141 (000463), miR-205 (000509), miR-17 (002308), miR-106a (002169), RNU6B (001093), RNU48 (001006), RNU44 (001094), U75 (001219) y miR-39 (000200).

La RT-qPCR tuvo lugar en el equipo ABI7900 Real-Time PCR Systems (*Thermo Fisher Scientific*). Las reacciones se hicieron en triplicado, y sólo se aceptaron los resultados con un valor de desviación estándar inferior a 0,37. El análisis se ejecutó con el software “Expression Suite v1.0”; el umbral de ruido de fondo se estableció en la fase exponencial de la RT-qPCR. El cel-miR-39 sintético se utilizó para la normalización de los datos, ya que se añadió la misma cantidad de oligonucleótido a todas las muestras previamente a la extracción de ARN.

3.1.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software “GraphPad Prism 5”. Para comparar los promedios de la concentración de EVs, la distribución del tamaño de las partículas, y la expresión de tetraspaninas y miARNs, se aplicó el test de la T de Student (T-test). El test de Pearson se utilizó para los análisis de correlación. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando la probabilidad era inferior a 0,05 (p -valor < 0,05).

3.2. SECCIÓN II: Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para bloquear la diseminación del cáncer de ovario

3.2.1. Pacientes incluidas en el estudio

Para este estudio fueron reclutadas un total de 86 mujeres con HGSOC en estadio avanzado (III-IV) – pacientes 1 a 86 – y 5 mujeres que presentaban masas anexiales benignas (pacientes 87 a 91) en el Hospital Universitario Vall Hebron, siguiendo el protocolo aprobado por el comité ético (código PR_AMI_50-2012) y habiendo firmado el consentimiento informado correspondiente. Las pacientes con HGSOC (todas ellas mujeres posmenopáusicas) fueron tratadas principalmente con la combinación de cirugía citorreductora y quimioterapia estándar adyuvante o neoadyuvante – 6 ciclos de carboplatino y taxol. La citorreducción se consideró óptima cuando no había tumor residual a nivel macroscópico. De manera adicional, algunas pacientes fueron tratadas con nuevos fármacos como bevacizumab, pazopanib, velaparib o AMG386. El estadio tumoral fue determinado de acuerdo con la clasificación de la FIGO y el grado tumoral fue definido siguiendo los criterios descritos en (58,70). Las mujeres que habían desarrollado anteriormente otros tipos de carcinomas fueron excluidas del estudio, así como también aquellas que eran positivas para el VIH o el virus de la hepatitis. Las características clínico-patológicas de las pacientes se describen en la Tabla 15.

Tabla 15. Características clínico-patológicas de las pacientes incluidas en el estudio. Se detalla el estadio FIGO, el grado tumoral, el tumor residual tras la cirugía, el tratamiento quimioterápico específico y los niveles séricos pre-operativos de CA125. También se registraron los casos de recaída y la supervivencia libre de enfermedad (intervalo de tiempo comprendido entre el momento de diagnóstico y el primer síntoma de recurrencia). Se describen el tumor primario y los implantes metastásicos, así como el experimento en el que fueron incluidos. ND: No disponible.

Paciente	Tipo	Estadio	Grado	Tumor residual (cm)	Tratamiento (quimioterapia)	Niveles séricos de CA125 (U/mL)	Recaída	Supervivencia libre de enfermedad (meses)	Tumor primario	Metástasis	Experimento
1	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	< 0,1	Adyuvante, 6 x CP-TX + bevacizumab	2,765	Sí	ND	Ovario	Peritoneo pélvico	Microarray
2	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	> 1	Adyuvante, 6 x CP-TX + pazopanib	4,365	Sí	60	Ovario	Epiplón	Microarray
3	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	< 1	Adyuvante, 6 x CP-TX + bevacizumab	233	Sí	25	Ovario	Peritoneo	Microarray
4	Adenocarcinoma seroso	IIIa	3	0	Adyuvante, 3 x CP-TX	174	No	39	Ovario	Peritoneo	RT-qPCR
5	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante, 6 x CP-TX	223	Sí	26	Ovario	Peritoneo	RT-qPCR
6	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante, 6 x CP-TX	121	Sí	20	Ovario	Omento	RT-qPCR
7	Adenocarcinoma seroso	IV	3	0	Adyuvante, 6 x CP-TX	1,984	No	31	Ovario	Nódulo renal adenopático	RT-qPCR
8	Adenocarcinoma seroso	IV	3	0	Adyuvante, 6 x CP-TX	706	Sí	18	Ovario	Peritoneo	RT-qPCR
9	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	No quimioterapia (Sólo cirugía)	72	Sí	15	Ovario	Nódulo para-aórtico	RT-qPCR
10	Adenocarcinoma seroso	IIIb	3	0	Adyuvante, 6 x CP-TX	2,671	Sí	12	Ovario	Epiplón	RT-qPCR
11	Adenocarcinoma seroso	IIIB	3	0	Adyuvante, 6 x CP-TX	18	No	14	Ovario	Peritoneo	RT-qPCR
12	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	< 1	Adyuvante, 6 x CP-TX + bevacizumab	570	Sí	16	Ovario	Peritoneo	RT-qPCR
13	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0,2	Adyuvante, 6 x CP-TX + bevacizumab	443	Sí	9	Ovario	Epiplón	RT-qPCR
14	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0,2	Neoadyuvante, 6 x CP-TX + bevacizumab	2,181	Sí	19	Ovario	Peritoneo	RT-qPCR
15	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Neoadyuvante, 6 x CP-TX + bevacizumab	19,007	Sí	11	Ovario	Epiplón	RT-qPCR
16	Adenocarcinoma seroso	IV	3	< 0,1	Neoadyuvante, 7 x CP-TX (4+3)	914	Sí	4	Ovario	Omento	RT-qPCR
17	Adenocarcinoma	IIIc	3	0,5	Neoadyuvante, 6 x CP-TX (3+3)	1,344	Sí	0	Ovario	Epiplón	RT-qPCR

Materiales y Métodos SECCIÓN II

	seroso										
18	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Neoadyuvante, 6 x CP-TX (3+3)	1,245	Sí	8	Ovario	Epiplón	RT-qPCR
19	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	< 1	Neoadyuvante, 6 x CP-TX (3+3) + bevacizumab	311	No	9	Ovario	Epiplón	RT-qPCR
20	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Neoadyuvante, 6 x CP-TX (3+3)	1,026	No	9	Ovario	Mesocolon sigmoide	RT-qPCR
21	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Neoadyuvante, 6 x CP-TX (3+3) + bevacizumab	3,418	No	26	Ovario	Peritoneo	RT-qPCR
22	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0,5	Neoadyuvante, 6 x CP-TX (3+3)	8,233	No	14	Ovario	Omento	RT-qPCR
23	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Neoadyuvante, 6 x CP-TX (3+3)	53	No	14	Ovario	Trompa de Falopio	RT-qPCR
24	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante, 6 x CP-TX	1,383	No	98	Ovario	Nódulo Douglas	IHQ
25	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante, 6 x CP-TX	96,4	Sí	21	Ovario	Mesocolon sigmoide	IHQ
26	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante, 6 x CP-TX + pazopanib	612	Sí	18	Ovario	Epiplón	IHQ
27	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	< 0,1	Adyuvante, 6 x CP-TX + bevacizumab	2,77	Sí	ND	Ovario	Peritoneo	IHQ
28	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	> 1	Adyuvante, 6 x CP-TX + pazopanib	4,365	Sí	61	Ovario	Epiplón	IHQ
29	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	> 1	Adyuvante, 6 x CP-TX	476	Sí	76	Ovario	Epiplón	IHQ
30	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante, 6 x CP/TX + bevacizumab	332	Sí	74	Ovario	Sigmoide - recto	IHQ
31	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante, 6 x CP/TX	3,417	Sí	9	Ovario	Ligamento infundíbulo-pélvico	IHQ
32	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	< 0,5	Adyuvante, 6 x CP/TX	155	Sí	12	Ovario	Diagragma pélvico	IHQ
33	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	ND	ND	ND	Sí	ND	Ovario	Mesotelio	IHQ
34	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0,3	Adyuvante, 6 x CP/TX	1,329	No	87	Ovario	Epiplón	IHQ
35	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	< 0,5	Adyuvante, 6 x CP/TX	1,181	Sí	13	Ovario	Colon sigmoide	IHQ
36	Adenocarcinoma seroso	IV	3	> 1	Adyuvante, 11 x CP/TX	332,9	Sí	0	Ovario	Epiplón	IHQ
37	Adenocarcinoma seroso	IV	3	> 2	Adyuvante, 11 x CP/TX	10,49	Sí	0	Ovario	Nódulo Douglas	IHQ

38	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante, 6 x CP/TX	1,028	Sí	22	Ovario	Cúpula diafragmática	IHQ
39	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	< 2	Neoadyuvante, 12 x CP/TX (9+3)	430	Sí	0	Ovario	Nódulo colon sigmoide	IHQ
40	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0,5	ND	673	Sí	ND	Ovario	Epiplón	IHQ
41	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	> 1	Adyuvante, 8 x CP/TX (5+3)	3,162	No	144	Ovario	Nódulo Douglas	IHQ
42	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	ND	ND	ND	Sí	ND	Ovario	Nódulo peritoneo parietal	IHQ
43	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante, 6 x CP/TX	191	Sí	12	Ovario	Peritoneo parietocólico	IHQ
44	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante, 6 x CP/TX	138	Sí	51	Ovario	Nódulo mesentérico	IHQ
45	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0,1	ND	2,232	ND	ND	Ovario	Mesotelio	IHQ
46	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante, 6 x CP/TX	246	No	108	Ovario	Mesocolon sigmoide	IHQ
47	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante, 6 x CP/TX	123	Sí	15	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma
48	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	-	Neoadyuvante 8 x CP/TX (No cirugía)	6,049	Sí	0	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma
49	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0,1	Neoadyuvante 8 x CP/TX	1,708	Sí	12	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma
50	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	-	Neoadyuvante múltiples ciclos CP/TX (No cirugía)	198	Sí	0	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma
51	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	-	Neoadyuvante múltiples ciclos CP/TX (No cirugía)	274	Sí	12	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma
52	Adenocarcinoma seroso	IVa	3	0	Adyuvante 6 x CP/TX	212	Sí	3	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma
53	Adenocarcinoma seroso	IVa	3	0	Neoadyuvante 6 x CP/TX	90	Sí	12	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma
54	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	-	Neoadyuvante múltiples ciclos CP/TX (No cirugía)	285	Sí	12	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma
55	Adenocarcinoma seroso	IVb	3	0	Neoadyuvante 6 x CP/TX	2,368	Sí	13	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma
56	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Neoadyuvante 6 x CP/TX + AMG386	2,181	Sí	14	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma
57	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	-	Neoadyuvante 6 x CP/TX (No cirugía)	8,833	No	-	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma
58	Adenocarcinoma	IIIc	3	0	Adyuvante 6 x CP/TX	112	Sí	2	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma

Materiales y Métodos SECCIÓN II

	seroso											
59	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Neoadyuvante 6 x CP/TX	1,245	Sí	9	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
60	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Neoadyuvante 6 x CP/TX	1,026	No	-	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
61	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	-	Neoadyuvante 6 x CP/TX (No cirugía)	7,02	Sí	0	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
62	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	-	Neoadyuvante 6 x CP/TX (No cirugía)	8,85	No	-	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
63	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	<1	Neoadyuvante 6 x CP/TX + bevacizumab	311	Sí	11	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
64	Adenocarcinoma seroso	IIIb	3	0	Adyuvante 6 x CP/TX	57	No	-	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
65	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Neoadyuvante 6 x CP/TX	2,711	Sí	14	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
66	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante 6 x CP/TX	ND	Sí	14	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
67	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Neoadyuvante 6 x CP/TX	238	No	-	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
68	Adenocarcinoma seroso	IIIb	3	0	Adyuvante 6 x CP/TX	2,671	No	-	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
69	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0,5	Adyuvante 6 x CP/TX	8,233	No	-	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
70	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante 6 x CP/TX	53	No	-	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
71	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Neoadyuvante 6 x CP/TX	1,344	Sí	19	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
72	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Neoadyuvante 6 x CP/TX	1,255	Sí	9	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
73	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Neoadyuvante 6 x CP/TX	1,035	No	-	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
74	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	<1	Neoadyuvante 6 x CP/TX + bevacizumab	320	Sí	11	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
75	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Neoadyuvante 6 x CP/TX	42,956	No	-	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
76	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	No quimioterapia (Sólo cirugía)	560	ND	ND	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
77	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	< 1	Neoadyuvante 6 x CP/TX + bevacizumab	315	Sí	11	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
78	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	No quimioterapia (Sólo cirugía)	570	ND	ND	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	
79	Adenocarcinoma	IIIc	3	0	Adyuvante 6 x CP/TX	19,9	No	-	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma	

seroso											
80	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante 6 x CP/TX + velaparib	3,353	No	-	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma
81	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante 6 x CP/TX	510	No	-	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma
82	Adenocarcinoma seroso	IIIa	3	0	Adyuvante 6 x CP/TX + velaparib	1,189	No	-	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma
83	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante 6 x CP/TX	ND	Sí	14	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma
84	Adenocarcinoma seroso	IIIb	3	0	Neoadyuvante 6 x CP/TX	245	No	-	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma
85	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0	Adyuvante 6 x CP/TX	2,685	No	-	Ovario	Abdominal	Inmunoblot - Plasma
86	Adenocarcinoma seroso	IIIc	3	0,5	Adyuvante 6 x CP/TX	8,245	No	-	Ovario	-	Inmunoblot - Plasma
87	Torsión ovárica	-	-	-	-	-	-	-	Ovario	-	Inmunoblot - Plasma
88	Cistoadenoma seroso	-	-	-	-	-	-	-	Ovario	-	Inmunoblot - Plasma
89	Cistoadenoma seroso paraovárico	-	-	-	-	-	-	-	Ovario	-	Inmunoblot - Plasma
90	Cistoadenoma seroso	-	-	-	-	-	-	-	Ovario	-	Inmunoblot - Plasma
91	Cistoadenoma seroso	-	-	-	-	-	-	-	Ovario	-	Inmunoblot - Plasma

3.2.2. Recogida y procesamiento de tejido

Durante la cirugía citorrreductora se recogieron muestras pareadas de tejido del tumor primario de ovario (T) y la metástasis abdominal (M) de un total de 46 pacientes con HGSOC en el Departamento de Ginecología Oncológica del Hospital Universitario Vall Hebron. Por un lado, de las pacientes 1 a 23 (ver apartado 3.2.1. *Pacientes incluidas en el estudio*, Tabla 15), se recogió una porción de tejido de T y M (con porcentaje de células tumorales superior al 90%), que fue etiquetada y congelada a -80°C para la posterior extracción de ARN. La muestra restante fue fijada en formaldehído al 10% para generar bloques de tejido incluido en parafina para el estudio histopatológico rutinario. Por otro lado, de las pacientes 24 a 46 (ver apartado 3.2.1. *Pacientes incluidas en el estudio*, Tabla 15), se recogió una porción de tejido de T y M, que fueron directamente fijadas en formaldehído al 10% y posteriormente, se realizaron secciones seriadas de cada bloque de parafina para el estudio histopatológico rutinario y para los análisis de IHQ específicos.

3.2.3. Recogida y procesamiento de sangre

Previamente a la cirugía, se recogió una muestra de sangre de un total de 40 pacientes (pacientes 47 a 91, ver apartado 3.2.1. *Pacientes incluidas en el estudio*, Tabla 15) en tubos EDTA (10 mL, *Pulmolab*) y se añadieron inhibidores de proteasa (P8340, *Sigma-Aldrich*) a una relación 1:200 (v/v). Tras la mezcla por inversión (10 veces), la muestra se centrifugó a 1.300 g durante 15 min a TA. El sobrenadante resultante se centrifugó nuevamente a 3.000 g durante 15 min a 4°C y finalmente, este sobrenadante (plasma) se alicuotó y congeló a -80°C hasta el momento de su análisis.

3.2.4. Aislamiento de ARN

Para la extracción de ARN del tejido, se homogeneizaron 50 mg aproximadamente en presencia de un reactivo de lisado (tampón RLT, *Qiagen*), mediante el equipo FastPrep®-24 (116004500, *MP BIOMEDICALS*) – 5 ciclos de 36 s a 6,5 m/s de velocidad. El ARN total se extrajo mediante “RNeasy Mini kit” (*Qiagen*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A lo largo de la extracción de ARN del tejido, también se aplicó el tratamiento de ADNasa en columna con el kit “RNase-free DNase set” (*Qiagen*) para eliminar el ADN de la muestra, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración e integridad del ARN fue determinada con el equipo NanoDrop (ND-2000c, *Thermo Fisher Scientific*). La integridad fue definida con el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (*Agilent Technologies*) en el sistema de “Agilent RNA 6000 Pico kit”. Sólo aquellas muestras con valores de RIN – *RNA Integrity Number*; índice de integridad del ARN – superiores a 6,5 fueron incluidas en el análisis.

3.2.5. Análisis de *microarray*

En este estudio, para determinar los perfiles de expresión génica se extrajo ARN de 3 muestras pareadas de T y M procedentes de pacientes con HGSOC en estadio avanzado que no habían recibido quimioterapia previamente a la cirugía (pacientes 1 a 3, ver apartado 3.2.1. *Pacientes incluidas en el estudio*, Tabla 15). El *microarray* (*Affymetrix*) fue diseñado mediante el algoritmo Tethys, utilizando la base de datos ENSEMBL. El ARN fue amplificado y marcado con los fluoróforos Cy3 y Cy5 mediante el sistema comercial “MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit” (*Ambion*), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La hibridación del *microarray* tuvo lugar a 60°C durante 17 h. Los datos crudos fueron obtenidos con el equipo Agilent DNA Microarray Scanner (G2505B, *Agilent*) y el software Agilent correspondiente (“Feature Extraction Software Agilent”). Para eliminar las desviaciones técnicas, los *arrays* fueron pre-procesados utilizando el método RMA (*Robust Multi-array Average*) (266). Con el objetivo de descartar aquellos genes con señal baja y los genes con variabilidad reducida, se

aplicaron unos pasos de filtración no específicos: se eliminaron las sondas que había proporcionado el fabricante como control de calidad; se descartaron los genes cuya señal por grupo era inferior al percentil 75 de todas las señales detectadas; y finalmente, se eliminaron aquellos genes que presentaban una desviación estándar por debajo del percentil 75 de todas las desviaciones estándar. La selección de los genes diferencialmente expresados se realizó con un modelo lineal para cada gen, seguido de una regularización de la varianza basado en el modelo empírico de Bayes (267). Aquellos genes con log FC (*Fold change*; cambio de expresión) < -1 ; > 1 y p -valor $< 0,05$ fueron considerados diferencialmente expresados entre T y M de manera estadísticamente significativa. Para mostrar los perfiles de expresión génica, se generó un *heatmap* (gráfico con diferentes colores en base a la expresión de los genes, dónde el rojo representa sobre-expresión y el azul representa infra-expresión) que representaba la agrupación jerárquica de los genes con la distancia de correlación (Figura 31).

3.2.6. Análisis de vías de señalización

En este estudio se utilizó el software bioinformático “IPA, v.9.0” (*Ingenuity Pathways Analysis*, de *Ingenuity Systems*) (268) para analizar las vías moleculares de los genes alterados entre T y M, profundizando así en la biología de estas muestras. Concretamente, esta herramienta proporcionó las redes génicas, las vías y los procesos biológicos más significativos asociados a los genes diferencialmente expresados, obtenidos del análisis del *microarray*, con log FC < -1 ; > 1 y un p -valor $< 0,05$. La información asociada a cada gen fue determinada con la base de datos interna de IPA.

3.2.7. Base de datos CSIOVDB

CSIOVDB (269) es una base de datos transcriptómica que contiene información de 3.431 muestras de CO humano – incluyendo el carcinoma ovárico, el de trompas de Falopio y el de peritoneo, y las metástasis en el ovario –, correspondientes a 3.261 pacientes individuales. Las muestras de CO representan el 91,49% del total y más concretamente, el HGSOC representa el 73,75% del total – porcentaje muy similar al de la realidad poblacional (28). Los estadios avanzados III y IV representan el 65,35% del total de la base de datos, que también es comparable a la realidad clínica (12). El promedio de edad de las pacientes es de 58 años. Esta base de datos fue construida en base a estudios públicos de diferentes repositorios, por lo que previamente se corrigió la variabilidad debida a reactivos, protocolos, procedimientos, tiempo transcurrido desde la recogida de las muestras y régimen de terapia, entre otros factores. Los parámetros clínico-patológicos disponibles incluyen el grado tumoral, el tumor residual, la respuesta clínica y la edad. Esta base de datos presenta información acerca del subtipo molecular y el estatus TEM para cada muestra de CO. De manera interesante, contiene información de la tasa de supervivencia global de 1.868 pacientes, y de la tasa de supervivencia libre de enfermedad de 1.516 pacientes (270).

Esta herramienta online y de acceso libre fue utilizada en este estudio para determinar la relación entre la expresión de genes específicos encontrados diferencialmente expresados entre las muestras de T y M analizadas por *microarray* (en concreto para los genes INHBA, GREM1, MMP11, PLVAP, MXRA5, PXDN, RNF152 y BCL2L11) y la supervivencia de las pacientes. El tamaño muestral fue de 934 casos para todos los genes, a excepción de RNF152, para el cual había información de 405 casos. Las pacientes segregaron en dos grupos distintos en función de la expresión baja (Q1) o alta (Q4) de cada gen a nivel de ARNm. Los p -valores fueron generados de manera automática con el test “log-rank”.

3.2.8. Transcripción reversa y RT-qPCR

Para las muestras 4 a 23 (ver apartado 3.2.1. *Pacientes incluidas en el estudio*, Tabla 15), una vez extraído y purificado el ARN de T y M con “RNeasy Mini kit” (Qiagen), se procedió a la retrotranscripción de 1 µg de ARN con la transcriptasa reversa “SuperScript III Reverse Transcriptase” (Invitrogen). El cADN resultante fue utilizado en triplicado para la RT-qPCR, la cual se realizó con “TaqMan Universal MasterMix II with UNG” (Applied Biosystems) y sondas TaqMan específicas contra los transcritos: FABP4 (Hs01086177_m1), INHBA (Hs01081598_m1), GREM1 (Hs00171951_m1), MMP11 (Hs00968295_m1), PLVAP (Hs00229941_m1), MXRA5 (Hs01019147_m1), PXDN (Hs00395488_m1) and GAPDH (Hs99999905_m1). La RT-qPCR tuvo lugar en el equipo ABI7900 Real-Time PCR Systems y el análisis de los datos se realizó con el software “Expression Suite v1.0” bajo los mismos criterios descritos y parámetros establecidos en el apartado 3.1.9. *Transcripción reversa, pre-amplificación y RT-qPCR*. En este caso, se utilizó la expresión de GAPDH como control endógeno para la normalización de los datos, ya que su expresión era constante a lo largo de las distintas muestras analizadas.

3.2.9. Inmunohistoquímica

En el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall Hebron se realizaron secciones de 5 µm de grosor de las muestras de T y M incluidas en parafina, procedentes de 23 pacientes con HGSOE en estadio avanzado (pacientes 24 a 46, ver apartado 3.2.1. *Pacientes incluidas en el estudio*, Tabla 15). Las muestras se desparafinaron mediante la incubación en xileno y la rehidratación con soluciones de etanol de concentración decreciente (100%, 90% y 70%), siguiendo un protocolo estándar para esta técnica. Para la recuperación antigénica, las secciones de tejido desparafinadas se sumergieron en tampón citrato pH 6 (FABP4), pH 7 (MMP11) o pH 9 (INHBA, GREM1 y PLVAP) en un equipo de alta presión a 110°C durante 4 min. A continuación, se inhibió la actividad peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3%. Para la tinción IHQ se incubaron las secciones a TA con anticuerpos secundarios contra FABP4 (dilución 1:200, 2 h; ab13979, *Abcam*), MMP11 (dilución 1:200, 1 h; MS-1035-B, *Thermo Fisher Scientific*), INHBA (dilución 1:20, 2 h; MAB3381, *R&D Systems*), GREM1 (dilución 1:100, 2 h; sc-18274, *Santa Cruz Biotechnology*) y PLVAP (dilución 1:50, 1 h; ab81719, *Abcam*). Seguidamente, las láminas se incubaron durante 30 min a TA con anticuerpos conjugados a peroxidasa: anti-IgG de conejo (FABP4), anti-IgG de ratón (MMP11, INHBA y PLVAP) o anti-IgG de cabra (GREM1) – “Immunoglobulin EnVision Dual System”, *DAKO*. Tras la unión a los anticuerpos secundarios, se lavaron las muestras y se completaron las reacciones con diaminobencidina. Finalmente, se hizo una tinción con hematoxilina para poder visualizar posteriormente los núcleos celulares. Las tinciones fueron examinadas por dos patólogos expertos independientes, que no tenían información previa de los datos clínico-patológicos de las muestras. De cada sección se analizaron de manera detallada tres áreas distintas a 20 aumentos. Los histoscores se calcularon como la suma de (1 x % células positivas con tinción débil) + (2 x % células positivas con tinción moderada) + (3 x % células positivas con tinción fuerte), con un máximo de 300. El porcentaje de células teñidas se evaluó semi-cuantitativamente en células cancerosas, estromales y endoteliales para cada candidato en concreto.

3.2.10. Extracción de proteína

Para extraer la proteína de los tejidos (pacientes 47 a 91, ver apartado 3.2.1. *Pacientes incluidas en el estudio*, Tabla 15), se añadieron a cada biopsia (50 mg) 200 µL de tampón RIPA 1X y se sonicó durante 10 ciclos de 10 s a una amplitud de 100 (Labsonic M, *Sartorius Stedim Biotech*). Seguidamente, los lisados se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min a 4°C y

el sobrenadante que contenía las proteínas solubles se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 mL y se congeló a -20°C hasta su análisis posterior. Para determinar la concentración de proteína se utilizó el kit comercial “Bio-Rad DC Protein Assay” (*Bio-Rad Laboratories*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.11. Inmunoblot

En el caso de tejido (muestras de T: pacientes 5, 7 y 12; muestras de M: pacientes 4, 9 y 13) – ver apartado 3.2.1. *Pacientes incluidas en el estudio*, Tabla 15 –, se separó una cantidad de 10 µg de proteínas mediante SDS-PAGE al 12%. En el caso de muestras de plasma (pacientes 47 a 91), se cargó un volumen constante de 2 µL. El procedimiento es el mismo que el descrito previamente en el apartado 3.1.7. *Inmunoblot*, pero en este caso, las proteínas de interés se detectaron mediante los anticuerpos primarios anti-FABP4 (dilución 1:200; ab13979, *Abcam*) y anti-MMP11 (dilución 1:200; MS-1035-B, *Thermo Fisher Scientific*) – incubación en rotación a 4°C durante la noche. Finalmente, la intensidad de las bandas fue determinada con el software “Image J v.1.45s”.

3.2.12. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa “Statistical Package for Social Science v.17.0” (SPSS, *IBM*). Con el fin de comparar las medias de los niveles de expresión de ARNm y proteína entre T y M, se aplicó el test de la T de Student. El test de Spearman se utilizó para analizar la correlación entre genes. Finalmente, para estudiar la relación entre los datos de RT-qPCR / IHQ y la información clínica (quimioterapia, tumor residual, supervivencia libre de enfermedad y niveles pre-operativos de CA125) se emplearon tests no paramétricos. La probabilidad de p -valor < 0,05 se consideró estadísticamente significativa en todos los casos.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. SECCIÓN I: Optimización del procedimiento de aislamiento de exosomas presentes en el aspirado uterino para la futura identificación de nuevos marcadores asociados al cáncer de ovario

4.1.1. Optimización del procedimiento de aislamiento de exosomas a partir de aspirado uterino

Para optimizar el procedimiento de aislamiento de EVs a partir de AU, se utilizó un *pool* de la fracción fluida de 27 muestras de AU. Se compararon tres protocolos de aislamiento de EVs basados en la ultracentrifugación a 100.000 g – denominados protocolo *Estándar*, *Filtración* y *Sacarosa*. Concretamente, describimos como procedimiento *Estándar* aquel en el que se aíslan las EVs mediante la centrifugación diferencial, que incluye la ultracentrifugación convencional a 100.000 g. En el procedimiento de *Filtración*, se filtra la muestra previamente a la primera ultracentrifugación, para prevenir la precipitación de MVs. Y finalmente, en el procedimiento de *Sacarosa*, los exosomas se ultracentrifugan en un colchón de sacarosa que iguala la densidad de los exosomas (1,13-1,19 g/mL). La fracción enriquecida en MVs y las proteínas de la FS también fueron recogidas y analizadas para determinar la eventual pérdida de exosomas a lo largo de los protocolos. En la Figura 15 se representa el trabajo experimental realizado de manera esquemática.

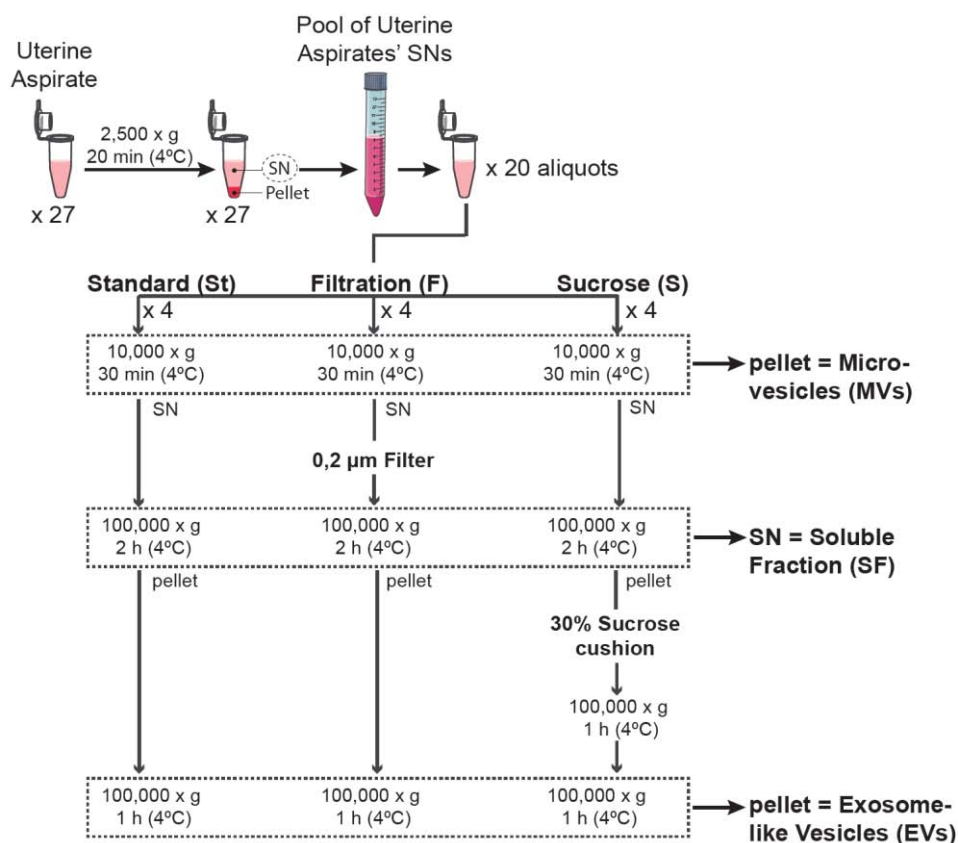


Figura 15. Representación esquemática de los tres protocolos de aislamiento de EVs a partir de AU – protocolo Estándar (St), Filtración (F) y Sacarosa (S).

Tal y como se observa mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 16), los tres protocolos permiten aislar EVs y éstas tienen la forma de copa característica artefactual que resulta de la visualización de EVs mediante esta técnica (112). Tanto en el caso de las EVs como en el de las MVs se podía observar la bicapa bien definida por la que están formadas. Aunque con la microscopía electrónica no se puede determinar el tamaño de las vesículas extracelulares con exactitud, es posible hacer una aproximación. El tamaño de las EVs (100-200 nm) era menor que el de las MVs (200-500 nm), especialmente en el caso del protocolo *Estándar*. Los extractos de FS no fueron considerados para el análisis de microscopía electrónica, ya que era muy poco probable encontrar vesículas en dichas fracciones.

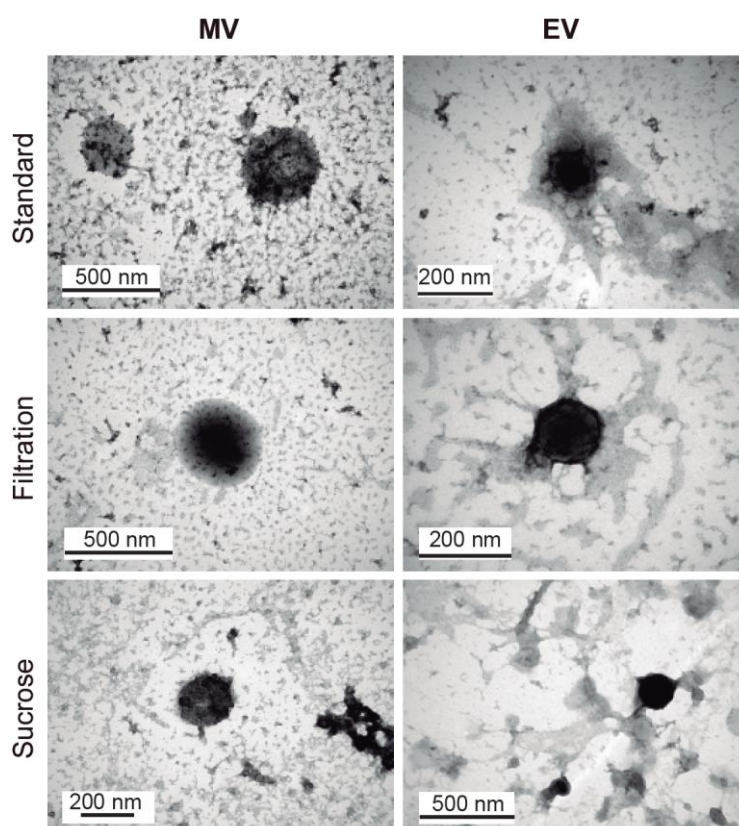


Figura 16. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las vesículas extracelulares (MV y EV) aisladas siguiendo los procedimientos Estándar, Filtración y Sacarosa.

Para determinar de forma precisa el tamaño y la concentración de las vesículas en cada preparación, se realizó el análisis mediante NTA. La distribución del tamaño de las EVs (Figura 17A) seguía una distribución normal, principalmente en los protocolos *Estándar* y *Filtración*, con un único pico correspondiente a una moda de 135 ± 5 nm y 115 ± 3 nm, respectivamente. En el caso del protocolo *Sacarosa*, la distribución de las EVs no era uniforme; aunque presentaba un pico principal con una moda de 135 ± 42 nm, también se observaba un pico adicional alrededor de 300 nm, y una desviación estándar elevada – lo cual indica la baja reproducibilidad de este procedimiento para aislar EVs. A diferencia de las EVs, las preparaciones de MVs (Figura 17B) presentaban una distribución heterogénea y una concentración más baja. Los extractos de FS no fueron considerados para el análisis de NTA, pues era muy poco probable encontrar vesículas en dichas fracciones.

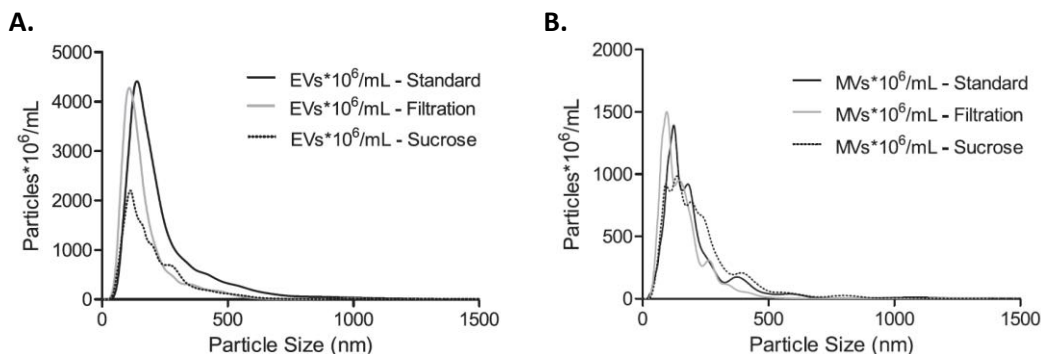


Figura 17. Distribución del tamaño de las vesículas extracelulares (A. EVs y B. MVs) obtenidas con los protocolos Estándar, Filtración y Sacarosa – Análisis de seguimiento de nanopartículas.

La concentración de EVs disminuía a medida que se añadían pasos al procedimiento *Estándar*. Así, la concentración era significativamente más alta en el caso del protocolo *Estándar* ($7,693 \text{ E}^{11}$ partículas/mL) en comparación con el protocolo *Sacarosa* ($3,524 \text{ E}^{11}$ partículas/mL) – p -valor = 0,029. En la comparativa del protocolo *Estándar* con el protocolo *Filtración* ($5,382 \text{ E}^{11}$ partículas/mL) también se observaba esta tendencia, aunque los datos no alcanzaron la significancia estadística (p -valor = 0,218). De manera similar, la concentración de EVs obtenida con el protocolo *Filtración* era superior a la del protocolo *Sacarosa*, pero la diferencia no era estadísticamente significativa (p -valor = 0,244) – Figura 18.

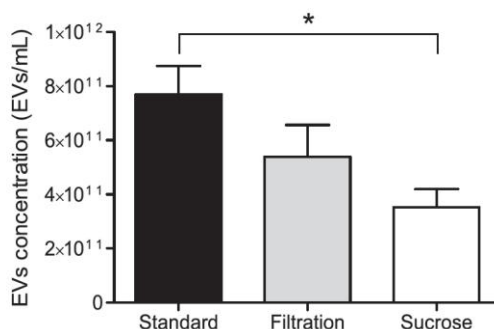


Figura 18. Concentración de EVs aisladas con los protocolos Estándar, Filtración y Sacarosa – Análisis de seguimiento de nanopartículas.

Para evaluar la pureza de las EVs aisladas con cada protocolo, se realizó un inmunoblot cargando la misma cantidad de proteína (4 μg) de cada uno de los extractos obtenidos (EVs, MVs y FS), y se estudió la expresión de marcadores característicos de exosomas (Figura 19A). Las tetraspaninas CD63, CD9 y CD81 – todas ellas relacionadas con los endosomas originarios de los exosomas (134) – fueron detectadas principalmente en las preparaciones de EVs. La expresión de las tetraspaninas en EVs fue significativamente más alta en el caso del protocolo *Estándar* que en el de *Sacarosa* (p -valor = 0,001) (Figura 19B). Esta tendencia también se observó en el caso de TSG101, otro marcador que indica el origen endosomal de los exosomas (112,125), y Flotilina-1, un elemento de las balsas lipídicas de la membrana (271). Cabe destacar que estos dos marcadores eran prácticamente indetectables en las preparaciones de MVs. Anexina 5, un marcador común de las MVs (272), se expresaba de manera intensa en todas las preparaciones de MVs. Aún así, esta proteína también fue detectada en EVs del protocolo *Estándar*. En la FS no se detectó ningún marcador de MVs o EVs, sin embargo se detectó la expresión de Haptoglobina – una proteína muy abundante en sangre.

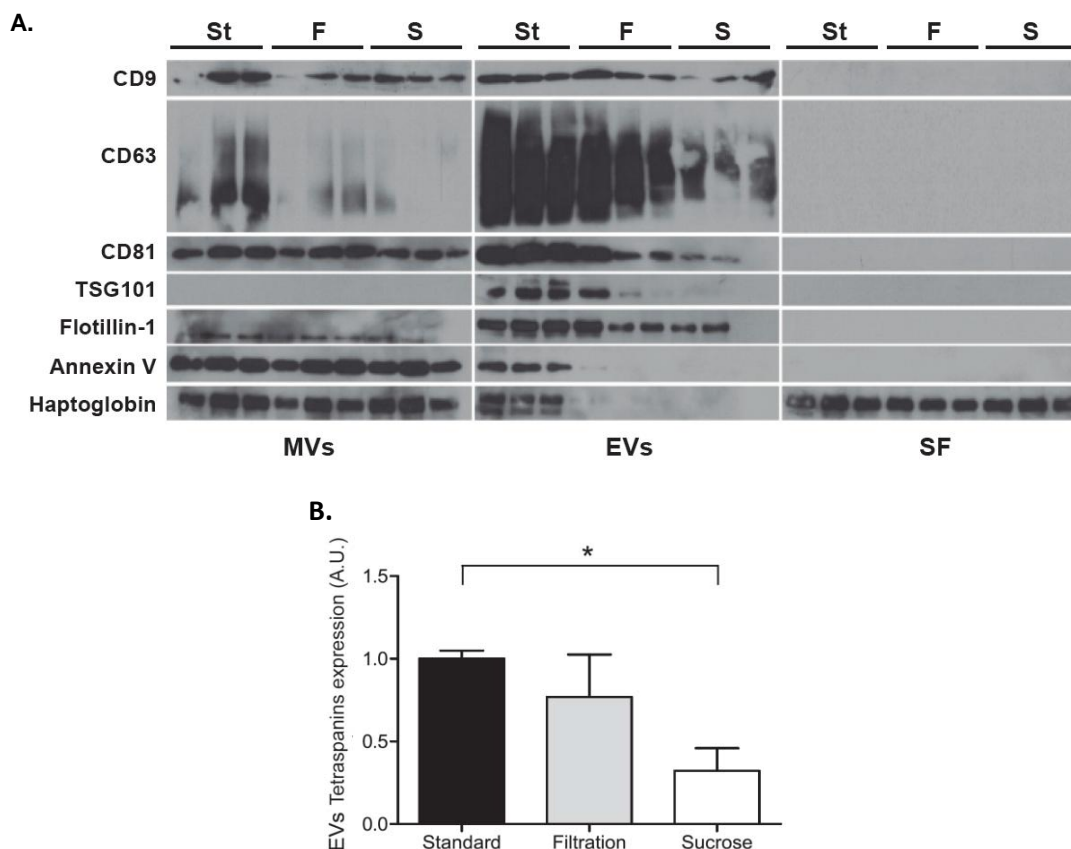


Figura 19. A. Detección de marcadores de EVs/MVs y Haptoglobina mediante inmunoblot de las proteínas de MVs, EVs y FS – obtenidas con los protocolos Estándar, Filtración y Sacarosa, por triplicado. B. Expresión relativa de tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81) por parte de las EVs aisladas con cada procedimiento. El promedio de expresión en cada protocolo fue relativizado con la expresión obtenida en el protocolo Estándar para tener una medida relativa de la pureza de las EVs.

En conclusión, aunque los tres protocolos son capaces de enriquecer la muestra en EVs, finalmente seleccionamos el protocolo *Estándar* para el futuro descubrimiento de biomarcadores, ya que aun presentando contaminación de MVs, dicho protocolo permite obtener altas concentraciones de EVs manteniendo niveles altos de los marcadores asociados a exosomas, y además es el procedimiento que presenta mayor reproducibilidad.

Para confirmar la robustez del protocolo seleccionado – protocolo *Estándar* – procedimos al aislamiento de EVs a partir de la fracción fluida de 6 AUs individuales (muestras 28 a 33, apartado 3.1.1. *Pacientes incluidas en el estudio, Tabla 14*) y a su posterior caracterización. Análogamente a la optimización, se recogieron las fracciones de EVs, MVs y FS. El análisis NTA mostró nuevamente una distribución del tamaño de las EVs con forma gaussiana (Figura 20A), presentando una moda de 120-160 nm (Figura 20B).

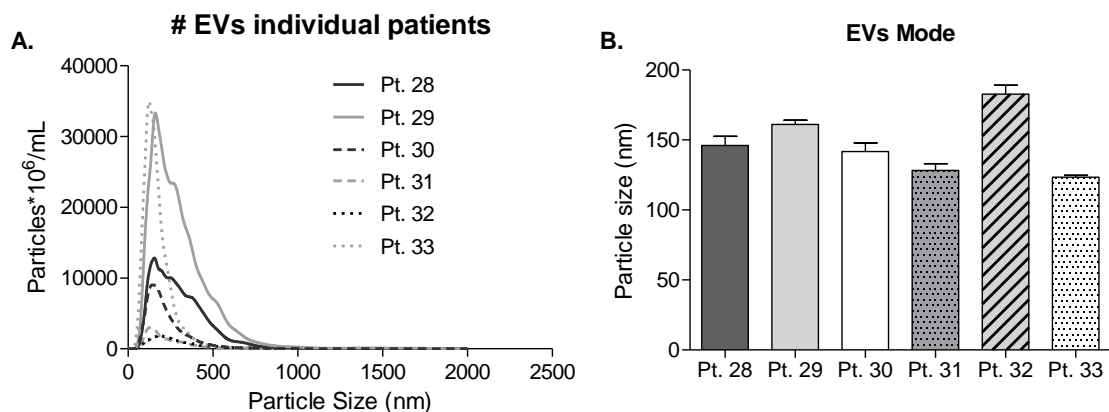


Figura 20. A. Distribución del tamaño de las EVs aisladas a partir de AUs individuales. B. Tamaño (moda) de las EVs – Análisis de seguimiento de nanopartículas.

La concentración de EVs era variable entre las distintas muestras ($5,175 \text{ E}^{11} - 9,04 \text{ E}^{12}$ partículas/mL) (Figura 21A). No obstante, el número total de EVs aisladas correlacionaba significativamente con el volumen inicial de fracción fluida de los AUs ($r = 0,90$, p -valor = $0,02$) (Figura 21B), pero no con la concentración de proteína (Figura 21C). Por otro lado, no se observó correlación entre el número de MVs y el volumen inicial de la fracción fluida de AU (Figura 21D). Nuevamente, no se consideró la FS para el análisis de NTA.

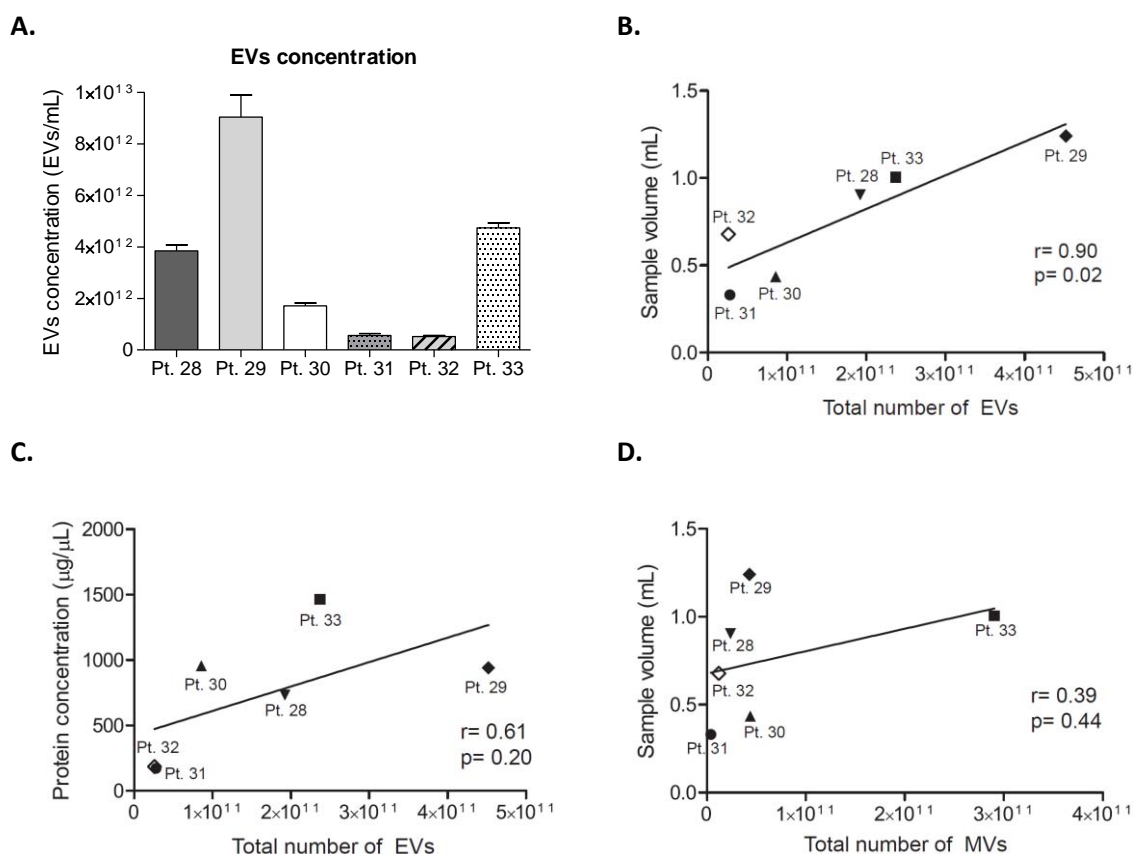


Figura 21. A. Concentración de EVs aisladas de AUs individuales, determinada con el análisis de seguimiento de nanopartículas. B. Gráfico de correlación entre el número total de EVs aisladas y el volumen inicial de fracción fluida de AU. C. Gráfico de correlación entre el número total de EVs aisladas y la concentración de proteína correspondiente. D. Gráfico de correlación entre el número total de MVs aisladas y el volumen inicial de fracción fluida de AU.

Posteriormente, analizamos mediante inmunoblot la expresión de los marcadores representativos de EVs, MVs y FS en las diferentes preparaciones de EVs, MVs y FS de las muestras individuales de AUs (Figura 22). En la mayoría de muestras analizadas, la expresión de las tetraspaninas, TSG101 y Flotilina-1 era más alta en la fracción de EVs que en la de MVs, aunque en algunos casos, dichos marcadores también se expresaban en la fracción de MVs. Esto indica que el protocolo *Estándar* es apropiado para obtener vesículas principalmente enriquecidas en EVs a partir de AUs individuales; sin embargo, existe la posibilidad de que dicha expresión se deba a la presencia de exosomas que pudieran haber precipitado en la fracción de MVs.

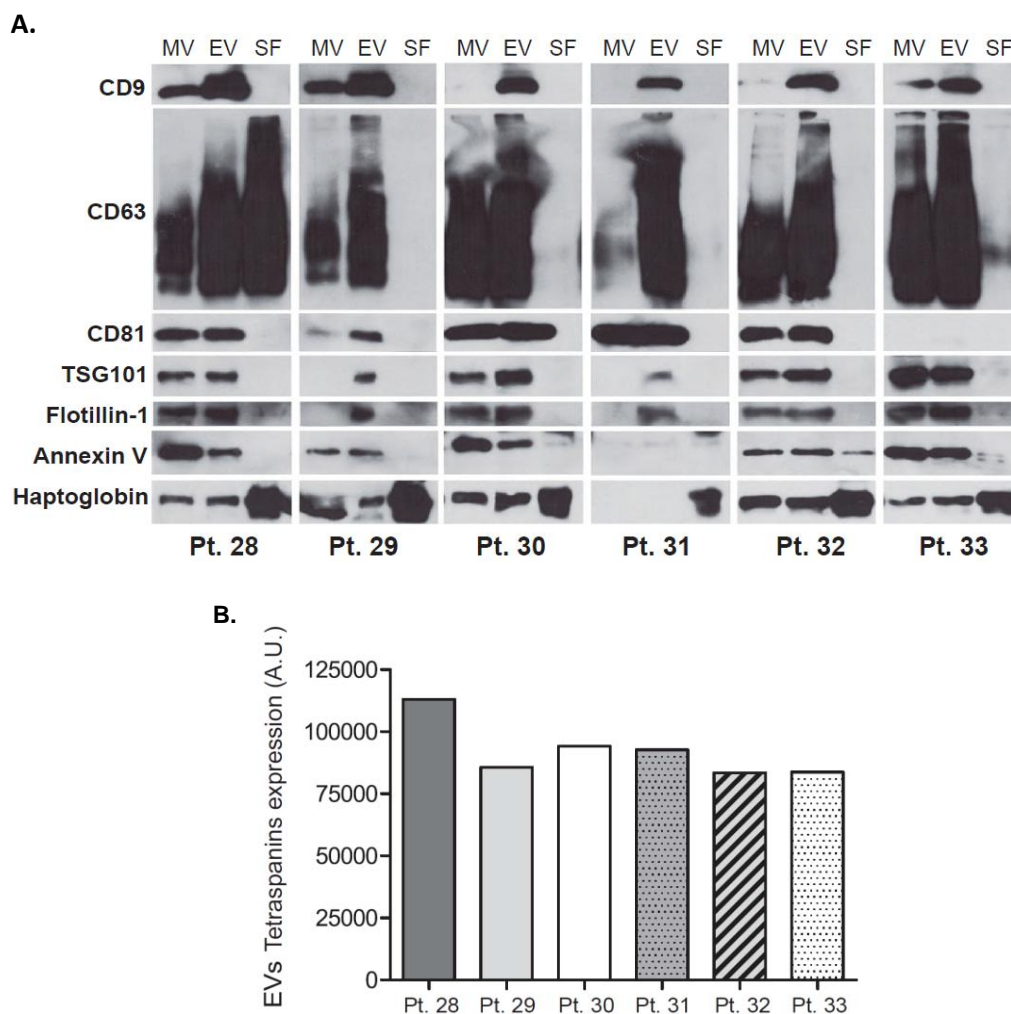


Figura 22. A. Detección de marcadores de EVs/MVs y Haptoglobina mediante inmunoblot de las proteínas de MVs, EVs y FS, a partir de AUs individuales. B. Expresión relativa de tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81) por parte de las EVs aisladas de cada AU individual.

4.1.2. Optimización del procedimiento de aislamiento de exosomas a partir de aspirado uterino para la posterior extracción de ARN

Con el objetivo de profundizar en la optimización del procedimiento *Estándar* para extraer el ARN contenido en las EVs de la forma más eficiente posible, se evaluó en distintos puntos del protocolo *Estándar* el efecto de la sonicación – que favorece la disrupción de la membrana exosomal, promoviendo la liberación de ARN –, y el efecto del tratamiento de ARNasa A – que degrada el material de ARN. Para ello se usó el mismo *pool* de fracciones fluidas de AUs que

fue utilizada en la optimización inicial del método de aislamiento de EVs (ver apartado 4.1.1. *Optimización del procedimiento de aislamiento de exosomas a partir de aspirado uterino*). En la Figura 23 se muestra un esquema de los 4 protocolos que se testaron (“A”, “B”, “C” y “D”).

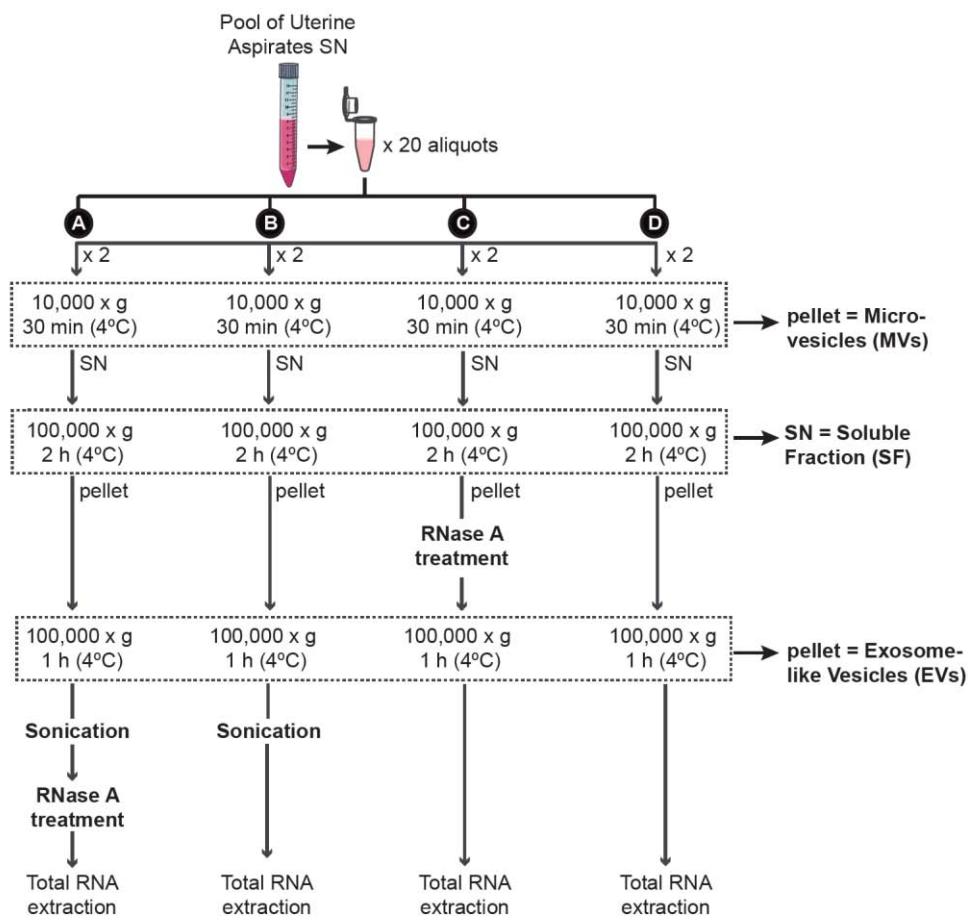


Figura 23. Representación esquemática de las cuatro condiciones que se testaron para obtener ARN de EVs procedentes de los AUs. Los cuatro protocolos representan modificaciones del procedimiento Estándar. Protocolo “A”: Las EVs aisladas se someten a sonicación y posterior tratamiento con ARNasa A. Protocolo “B”: Las EVs aisladas se someten únicamente a la sonicación. Protocolo “C”: Se aplica el tratamiento de ARNasa A a las EVs aisladas. Protocolo “D”: no se incluye ninguna modificación.

Por un lado, la concentración y calidad del ARN extraído se determinó con el equipo Bioanalyzer (Figura 24). Además, se evaluó mediante RT-qPCR la presencia de una serie de miARNs (miR-200b, miR-200c, miR-223, miR-17 y miR-106a) (Figura 25), que fueron seleccionados en base a su expresión en el tracto genital femenino y a su existencia previamente descrita en EVs (145,273–276).

El protocolo “A” es el control negativo del estudio, ya que incluye la sonicación de la preparación de EVs al finalizar el procedimiento *Estándar* (una vez aislada las EVs), seguida del tratamiento con ARNasa A. Esta condición confirmó el efecto de la sonicación (provocando la rotura de la membrana) y la eficiencia de la ARNasa A (degradando el material de ARN), pues el perfil de Bioanalyzer muestra la ausencia de ARN (21 pg/μL) (Figura 24) y la RT-qPCR (Ct > 40) (Figura 25) indica que no hubo amplificación de ninguno de los miARNs testados.

En el protocolo “B”, una vez finalizado el procedimiento *Estándar*, las EVs aisladas se sonicaron previamente a la extracción de ARN. El protocolo “D” es el procedimiento *Estándar* sin tratamientos adicionales. Dado que en los protocolos “B” y “D” no se aplicó el tratamiento de

ARNasa A, el ARN externo a las EVs no estaba degradado, sino que se encontraba adherido a la superficie de las vesículas. Con estos dos protocolos se detectaron perfiles de ARN de cadena corta, y se obtuvo la cantidad más alta de ARN total (protocolo “B”: 7,133 pg/μL; protocolo D: 10,351 pg/μL) (Figura 24), así como la expresión más elevada de miARNs (Figura 25). La introducción de la sonicación en el procedimiento *Estándar* (protocolo “B”) no ofrecía ninguna ventaja adicional en la liberación del contenido de ARN de las vesículas. Por el contrario, se observaron fragmentos de ARN más cortos, indicando que el material genético había sido dañado con la sonicación.

En el protocolo “C” (3,488 pg/μL), el tratamiento con ARNasa A degradó un 52% y un 66% del ARN total obtenido con los protocolos “B” y “D”, respectivamente (Figura 24). Dicha degradación se asoció a la degradación del ARN libre y/o no contenido en las EVs, pero unido a la membrana de las mismas. Esto sugiere que el tratamiento con ARNasa A es necesario para limpiar la muestra de ácidos nucleicos externos a las EVs. Como era de esperar, la expresión de miARNs en el protocolo C (Ct > 30) era inferior a la expresión de miARNs en los protocolos “B” y “D”, pero superior al protocolo “A” (control negativo) (Figura 25).

Así, el protocolo “C” (sin sonicación, pero con tratamiento de ARNasa A antes de la segunda ultracentrifugación) fue finalmente seleccionado como el procedimiento más apropiado para obtener ARN de calidad, procedente del interior de las EVs de AU.

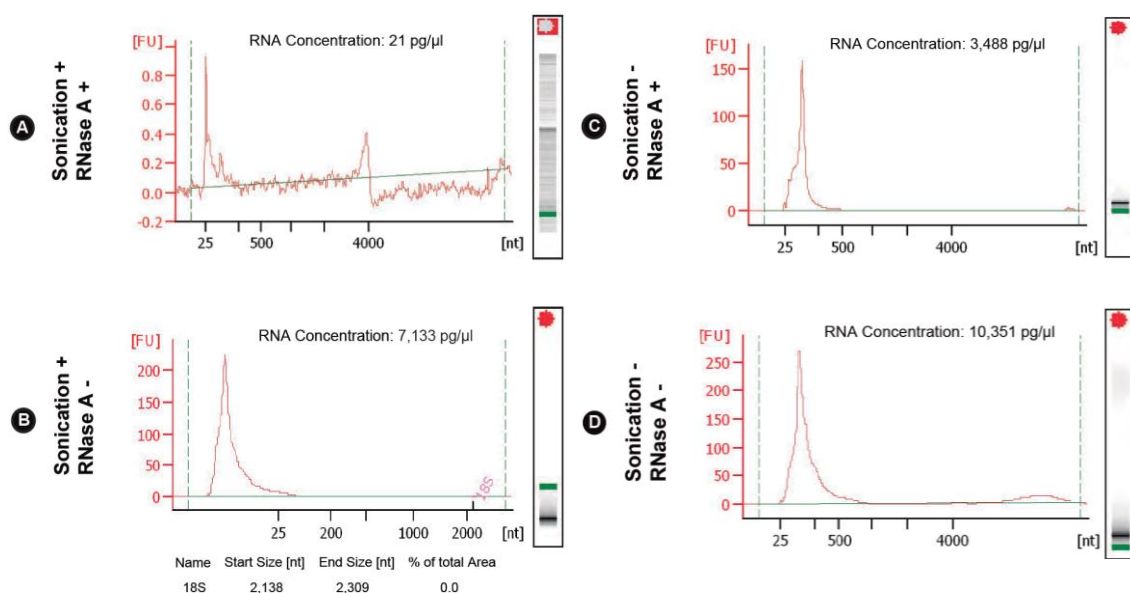


Figura 24. Concentración y calidad del ARN de EVs derivadas de cada condición (“A”, “B”, “C” y “D”) – Análisis mediante Bioanalyzer.

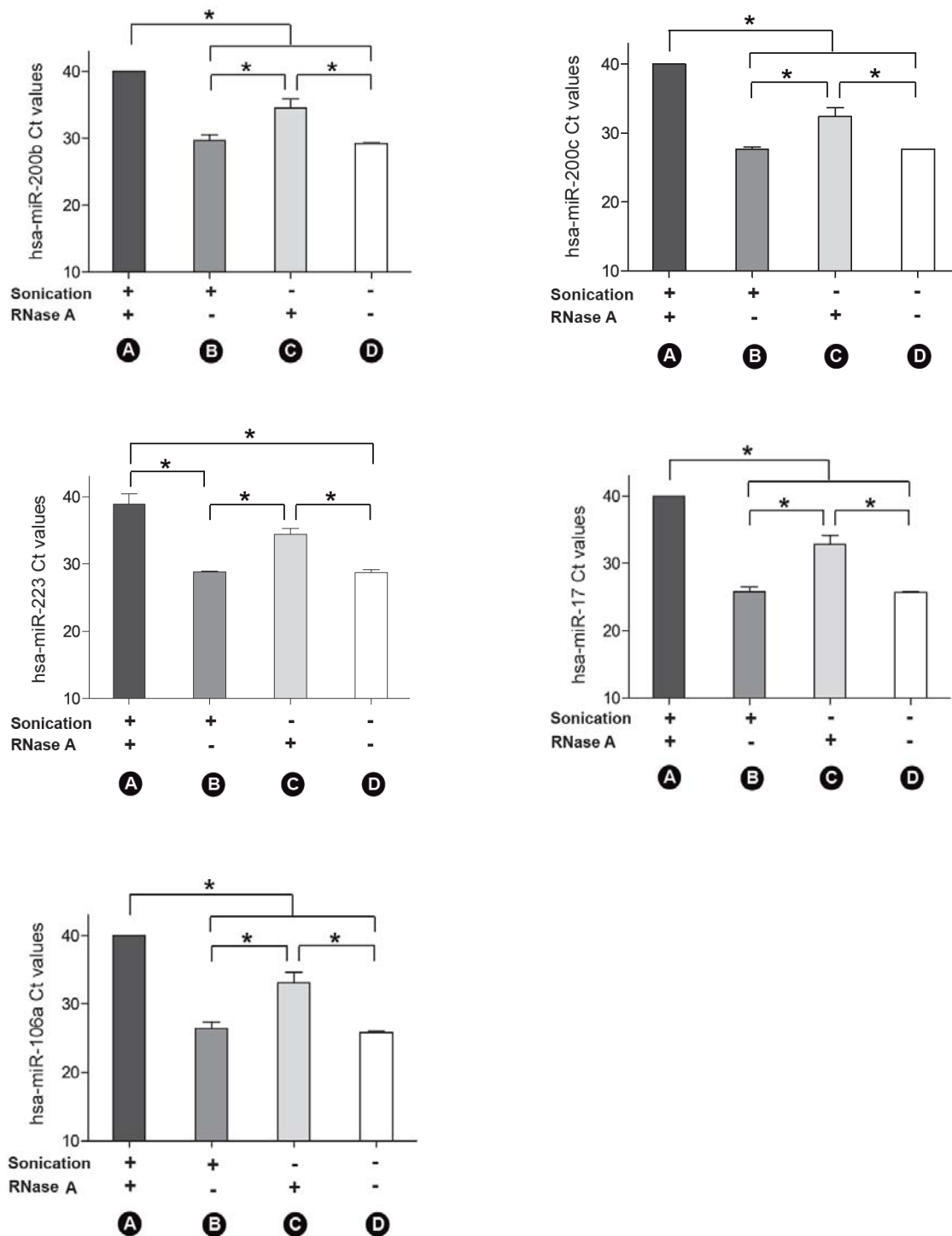


Figura 25. Valores de Ct de miR-200b, miR-200c, miR-223, miR-17 y miR-106a obtenidos con cada condición (“A”, “B”, “C” y “D”) – Análisis de RT-qPCR.

Una vez seleccionado el procedimiento de aislamiento de EVs para la extracción del contenido de ARN, se comprobó su robustez y validez mediante el análisis de 6 muestras individuales de AU (muestras 34 a 39, apartado 3.1.1. *Pacientes incluidas en el estudio, Tabla 14*). Las EVs aisladas fueron analizadas mediante NTA; en la Figura 26A se observa su distribución gaussiana y en la Figura 26B, su tamaño, el cual fue similar al descrito en los experimentos anteriores (120-170 nm).

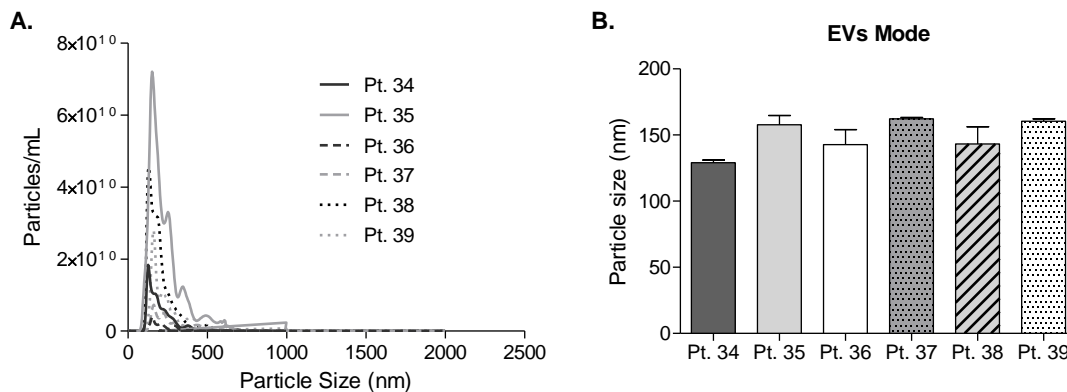


Figura 26. A. Distribución del tamaño de las EVs aisladas a partir de AUs individuales. B. Tamaño (moda) de las EVs – Análisis de seguimiento de nanopartículas.

En la Figura 27 se muestra el perfil de Bioanalyzer del ARN total de cada muestra individual. La concentración de ARN variaba entre pacientes, estando comprendida entre 108 y 851 pg/μL – suficiente para realizar análisis de expresión de ARN mediante RT-qPCR. De manera similar a los resultados obtenidos en la optimización del protocolo, el ARN estaba compuesto principalmente por cadenas cortas de 25-300 nucleótidos.

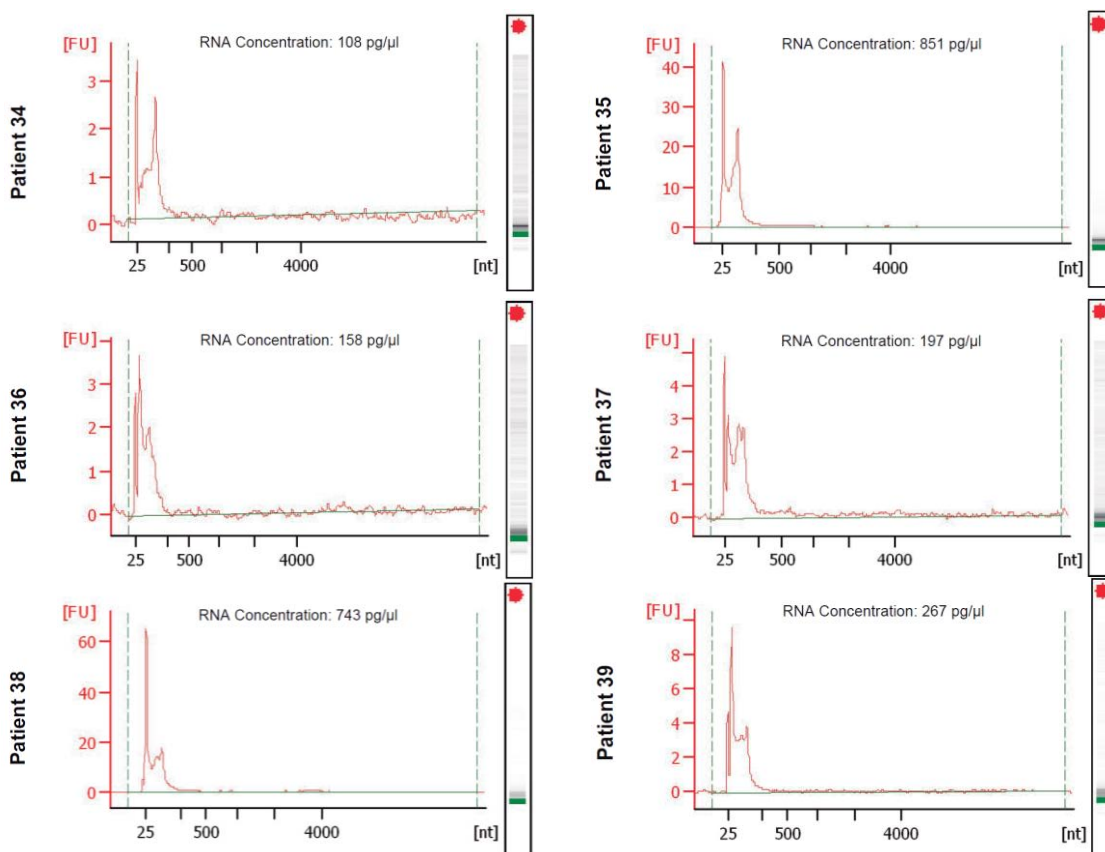


Figura 27. Concentración y calidad del ARN de EVs aisladas a partir de AUs individuales – Análisis mediante Bioanalyzer.

Tal y como se observa en la Figura 28, el volumen inicial de fracción fluida de AU, el número total de EVs y la concentración de ARN correlacionaban de manera significativa en la cohorte de muestras analizadas.

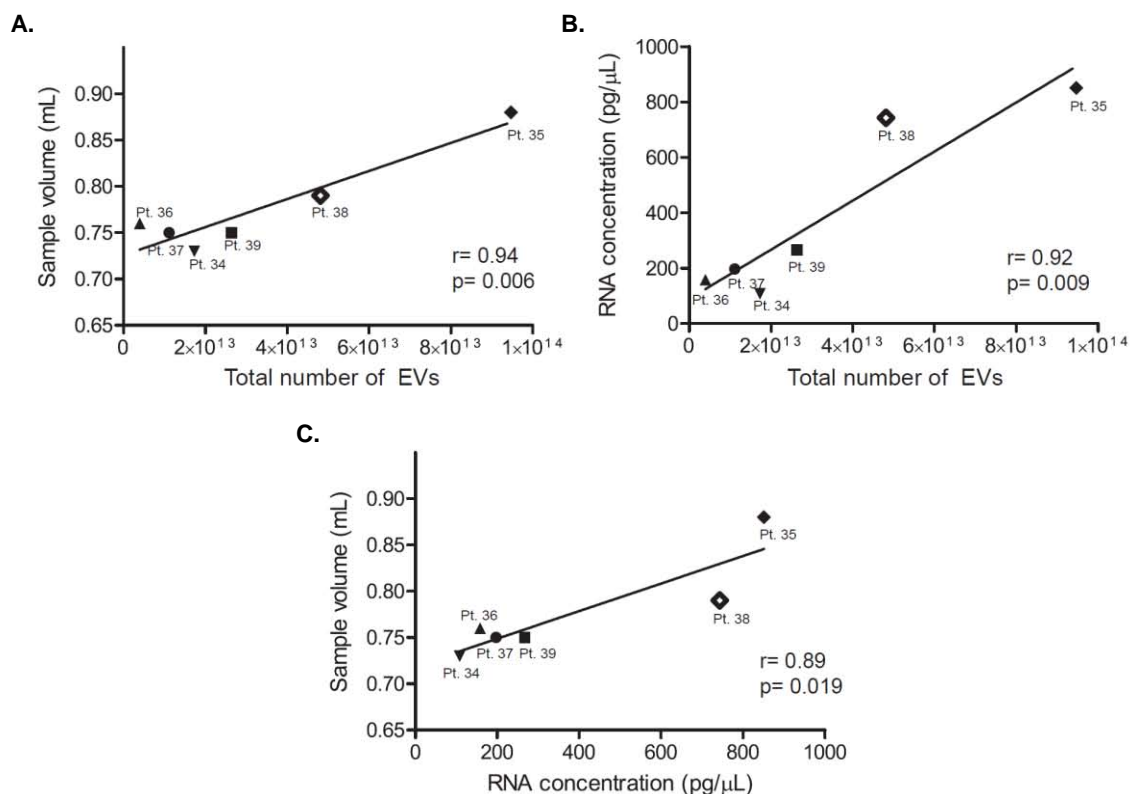


Figura 28. A. Gráfico de correlación entre el número total de EVs aisladas y el volumen inicial de fracción fluida de AU. B. Gráfico de correlación entre el número total de EVs aisladas y la concentración de ARN correspondiente. C. Gráfico de correlación entre la concentración de ARN de cada preparación de EVs aisladas y el volumen inicial de fracción fluida de AU.

Como prueba de concepto, se evaluó mediante RT-qPCR la expresión de 1 ARNr como control positivo (18S), 6 ARNm (ALIX, TSG101, GAPDH y β -actina – moléculas relacionadas con los exosomas –, junto con MUC16 (277) y CD24 (278) – proteínas asociadas a alteraciones ginecológicas) y 11 miARNs que habían sido descritos anteriormente en EVs (145,150). En concreto, se analizaron los 5 miARNs que fueron testados en la fase de optimización del protocolo (miR-200b, miR-200c, miR-223, miR-17 y miR-106a), y también se analizó la expresión de 2 miARNs asociados al tracto genital femenino (273) – miR-141 y miR-205 –, así como 4 miARNs endógenos de tejido (279) – RNU6B, RNU48, RNU44 y U75. A diferencia del procedimiento utilizado durante el proceso de optimización del protocolo, se añadió un paso de pre-amplificación del cADN previamente a la RT-qPCR para facilitar la detección de las moléculas de ARNm, ya que los niveles de éstas en EVs son muy bajos.

Con la finalidad de monitorizar la eficiencia de extracción de ARN y normalizar los datos de RT-qPCR, previamente a la extracción de ARN, se añadió el oligonucleótido cel-miR-39 a las muestras de estudio. Como se observa en la Figura 29, la expresión del cel-miR-39 sintético no variaba entre las muestras, lo cual indica que la eficiencia de extracción de ARN era similar en todos los casos y que los niveles de amplificación detectados eran aptos para poder relativizar la expresión de las moléculas de ARN de interés.

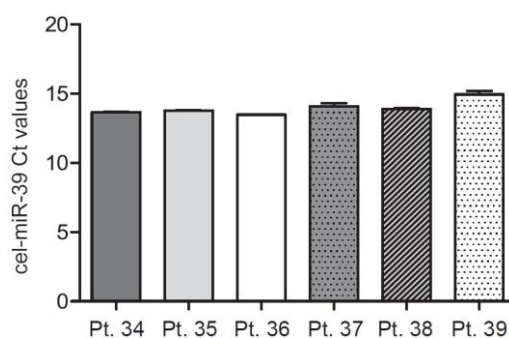


Figura 29. Valores de Ct de cel-miR-39 en cada uno de los AUs – Análisis de RT-qPCR.

En la Figura 30 se representan los valores de delta Ct (Δ Ct) de los ARNr, ARNm y miARNs contenidos en EVs, relativizados con el valor de Ct del cel-miR-39 en cada muestra de AU. Concretamente, observamos que el ARNr 18S presentaba los niveles más altos de expresión. Las moléculas de ARNm fueron detectadas de manera eficiente por RT-qPCR – valores promedio de los Δ Cts: Δ Ct (Alix) = 13,24; Δ Ct (TSG101) = 12,92; Δ Ct (GAPDH) = 9,96; Δ Ct (β -actina) = 11,48; Δ Ct (MUC16) = 13,22; Δ Ct (CD24) = 12,10. En cuanto a la detección de miARNs, la expresión de miR-200b, miR-200c, miR-223, miR-17 y miR-106a resultó ser más alta (valores promedio de los Δ Cts respectivos: Δ Ct = 10,33; Δ Ct = 9,04; Δ Ct = 8,54; Δ Ct = 8,53; Δ Ct = 8,45) que la de miR-141 y miR-205 (valores promedio de los Δ Cts respectivos: Δ Ct = 11,51; Δ Ct = 13,88). De manera interesante, RNU6B, RNU48, RNU44 y U75 fueron detectados a niveles muy bajos (valores promedio de los Δ Cts respectivos: Δ Ct = 16,9; Δ Ct = 14,99; Δ Ct = 16,96; Δ Ct = 18,42).

En conclusión, la detección de ARN asociado al tracto genital femenino en EVs apoya la idea de que la carga de estas vesículas refleja su origen y/o el estatus celular. Aún así, el objetivo de este estudio no era extraer conclusiones específicas en relación a patologías ginecológicas benignas, sino confirmar la robustez del procedimiento en la extracción de ARN contenido en EVs de AUs individuales para futuros análisis con muestras procedentes de pacientes de CO.

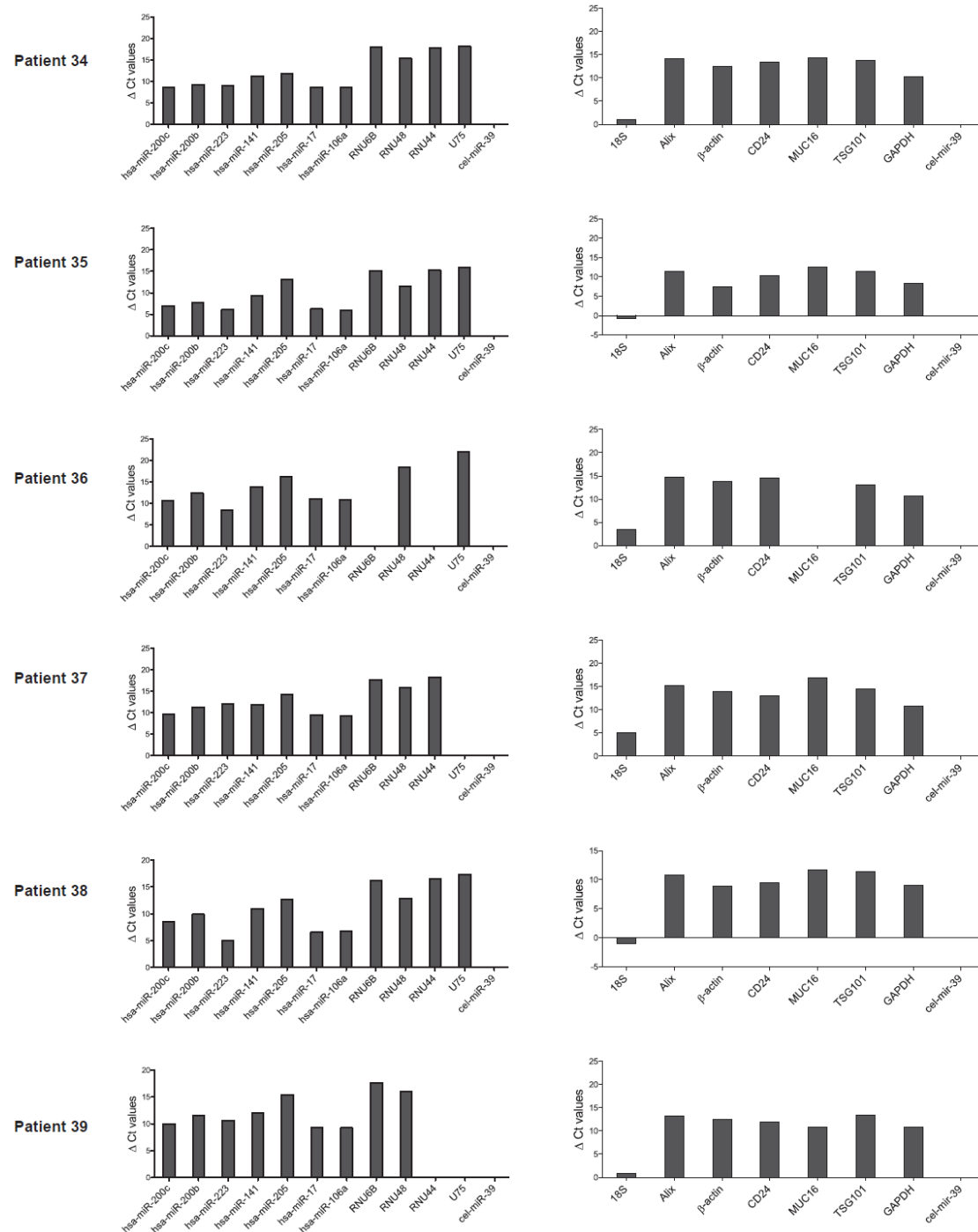


Figura 30. Representación de la expresión (valores de ΔCt) de una serie de miARNs (izquierda), ARN y ARNm (derecha) en las preparaciones de EVs de AUs individuales. La expresión de cada ARN específico fue normalizada con el valor de Ct de cel-miR-39 en cada una de las muestras.

Estos resultados solapan parcialmente con los que aparecen en la tesis de la doctoranda Irene Campoy, en particular lo que corresponde a la optimización inicial del aislamiento de EVs a partir de AU. Este trabajo se ha realizado de forma conjunta y colaborativa, y ha dado lugar a un artículo científico en el cual figuramos como primeras co-autoras: “*Exosome-like vesicles in uterine aspirates: a comparison of ultracentrifugation-based isolation protocols*”, publicado recientemente en la revista “*Journal of Translational Medicine*” (Factor de impacto: 3,694) – Campoy I*, Lanau L* et al. *J Transl Med* (2016) 14:180 (*equally contribution) – ver Anexo.

4.2. SECCIÓN II: Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para bloquear la diseminación del cáncer de ovario

4.2.1. Análisis de *microarray*

Con el objetivo de analizar el patrón diferencial de expresión génica de muestras de T y M, se diseñó un estudio de descubrimiento mediante la tecnología del *microarray*, en el cual se compararon muestras pareadas de T y M procedentes de tres pacientes con HGSOE en estadio avanzado (pacientes 1 a 3, ver apartado 3.2.1. *Pacientes incluidas en el estudio, Tabla 15*).

Una vez obtenidos los perfiles de expresión de cada muestra, los genes diferencialmente expresados se agruparon de manera jerárquica; en la Figura 31 se muestra un *heatmap* en base a la distancia euclídea. Aquellos genes que se expresaban en M a niveles elevados se dispusieron en las filas superiores del mapa, mientras que los genes con expresión baja se unieron en las filas inferiores. La expresión génica de las muestras de T era más heterogénea que la de las muestras de M: dos de los tres T presentaban un patrón similar, y el tercero era claramente diferente.

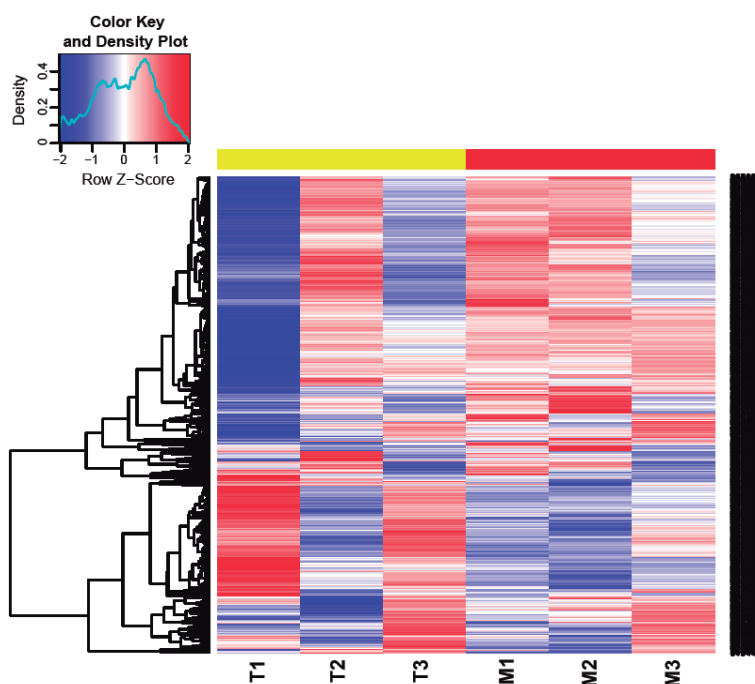


Figura 31. Heatmap que representa la agrupación de los genes en base a su expresión génica en tres muestras pareadas de T y M de pacientes con HGSOE en estadio avanzado.

Partiendo del análisis de 28.869 genes, tras aplicar la normalización RMA y los filtros inespecíficos, 2.557 genes fueron detectados de manera eficiente para el análisis posterior. De estos genes, 196 se encontraban diferencialmente expresados entre T y M ($\log FC < -1$; > 1 y p -valor $< 0,05$); 108 genes estaban sobre-expresados ($\log FC > 1$) (Tabla 16) en M respecto a T, y 88 genes estaban infra-expresados ($\log FC < -1$) (Tabla 17).

Tabla 16. Lista de genes sobre-expresados de manera significativa en M vs T, con $\log FC > 1$ y p -valor $< 0,05$. Los genes están ordenados de acuerdo con los valores de $\log FC$.

ID gen	Símbolo	Nombre del gen	Log FC	p-valor
8151532	FABP4	Fatty acid binding protein 4	3,607	0,002
8103254	SFRP2	Secreted frizzled-related protein 2	3,198	0,011
7971077	POSTN	Periostin, osteoblast specific factor	2,743	0,037
8106743	VCAN	Versican	2,732	0,020
7936968	ADAM12	ADAM metallopeptidase domain 12	2,680	0,007
8171172	MXRA5	Matrix-remodelling associated 5	2,666	0,002
8075310	LIF	Leukemia inhibitory factor	2,502	0,008
8130867	THBS2	Thrombospondin 2	2,458	0,026
7995681	MMP2	Matrix metallopeptidase 2	2,450	0,014
8071758	MMP11	Matrix metallopeptidase 11	2,433	0,004
8139207	INHBA	Inhibin beta A	2,344	0,011
8050007	PXDN	Peroxidasin	2,258	0,014
8135069	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1	2,227	0,031
8163637	TNC	Tenascin C	2,200	0,027
8113709	LOX	Lysyl oxidase	2,125	0,032
8056257	FAP	Fibroblast activation protein alpha	2,062	0,044
7968351	C13orf33	Mesenteric estrogen-dependent adipogenesis	2,061	0,038
7997642	CRISPLD2	Cysteine rich secretory protein LCCL domain containing 2	2,053	0,020
8033674	MUC16	Mucin 16, cell surface associated	2,042	0,027
7982377	GREM1	Gremlin 1, DAN family BMP antagonist	2,042	0,002
8095744	AREG	Amphiregulin	2,040	0,039
8043438	IGKC	Immunoglobulin kappa constant	2,023	0,006
7937020	MKI67	Marker of proliferation Ki-67	2,020	0,021
7960340	FOXM1	Forkhead box M1	2,014	0,029
8043433	IGKC	Immunoglobulin kappa constant	2,013	0,006
8088560	ADAMTS9	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 9	1,981	0,019
8023598	RNF152	Ring finger protein 152	1,959	0,010
8151816	GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	1,906	0,026
7985873	C15orf42	TOPBP1 interacting checkpoint and replication regulator	1,905	0,041
8003298	SLC7A5	Solute carrier family 7 member 5	1,888	0,035
8077441	BHLHE40	Basic helix-loop-helix family member e40	1,883	0,015
8016646	COL1A1	Collagen type I alpha 1	1,879	0,022
8076757	CELSR1	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1	1,872	0,010
8061579	TPX2	TPX2, microtubule-associated	1,868	0,040
8025828	LDLR	Low density lipoprotein receptor	1,864	0,009
8095736	AREG	Amphiregulin	1,845	0,020
8041781	EPAS1	Endothelial PAS domain protein 1	1,809	0,010
8122265	TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	1,787	0,038

Resultados SECCIÓN II

8134263	COL1A2	Collagen type I alpha 2	1,777	0,033
7992692	SRRM2	Serine/arginine repetitive matrix 2	1,763	0,021
8046922	COL3A1	Collagen type III alpha 1	1,738	0,046
8108370	EGR1	Early growth response 1	1,725	0,045
7952601	ETS1	ETS proto-oncogene 1, transcription factor	1,722	0,025
7981601	IGHV4-31	Immunoglobulin heavy variable 4-31	1,721	0,028
8073775	FBLN1	Fibulin 1	1,714	0,026
8044499	SLC20A1	Solute carrier family 20 member 1	1,706	0,020
7916282	LRP8	LDL receptor related protein 8	1,700	0,019
8049512	LRRFIP1	Leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	1,679	0,017
7963786	ITGA5	Integrin subunit alpha 5	1,679	0,043
8040113	ASAP2	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 2	1,652	0,034
7954090	EMP1	Epithelial membrane protein 1	1,651	0,018
8118734	ITPR3	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	1,648	0,028
7913357	ECE1	Endothelin converting enzyme 1	1,639	0,028
8076046	TMEM184B	Transmembrane protein 184B	1,633	0,025
7950067	DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	1,632	0,026
7921344	ELL2	Elongation factor RNA for polymerase II 2	1,624	0,030
8022674	CDH2	Cadherin 2	1,615	0,047
7938485	MICAL2	Microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2	1,603	0,033
7981737	IGHA1	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	1,600	0,041
7909708	CENPF	Centromere protein F	1,597	0,049
7970162	ATP11A	ATPase phospholipid transporting 11A	1,580	0,018
8133326	POM121	POM121 transmembrane nucleoporin	1,578	0,041
8043909	NPAS2	Neuronal PAS domain protein 2	1,566	0,038
7973336	MMP14	Matrix metalloproteinase 14	1,563	0,019
8115814	SH3PXD2B	SH3 and PX domains 2B	1,558	0,022
8044375	BCL2L11	BCL2 like 11	1,555	0,012
8049530	LRRFIP1	Leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	1,542	0,042
7977046	TNFAIP2	TNF alpha induced protein 2	1,524	0,038
8035297	PLVAP	Plasmalemma vesicle associated protein	1,508	0,003
8175947	HCFC1	Host cell factor C1	1,498	0,036
7965040	PHLDA1	Pleckstrin homology like domain family A member 1	1,482	0,035
7989501	CA12	Carbonic anhydrase XII	1,480	0,035
7935058	MYOF	Myoferlin	1,461	0,049
8132860	EGFR	Epidermal growth factor receptor	1,459	0,018
8074647	PI4KA	Phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha	1,424	0,019
8071392	MED15	Mediator complex subunit 15	1,420	0,039
8022531	NPC1	Niemann-Pick disease, type C1	1,407	0,014
7981720	IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)	1,388	0,047
7951140	LOC100131541	Unknown	1,384	0,038
7899220	ARID1A	AT-rich interaction domain 1A	1,371	0,050

8164967	VAV2	Vav guanine nucleotide exchange factor 2	1,368	0,028
8119926	TMEM63B	Transmembrane protein 63B	1,345	0,017
8037374	PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	1,344	0,022
8086517	CDCP1	CUB domain containing protein 1	1,337	0,039
8088642	LRIG1	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1	1,322	0,036
8133331	POM121	POM121 transmembrane nucleoporin	1,316	0,045
8055104	SAP130	Sin3A associated protein 130kDa	1,314	0,023
8126839	TNFRSF21	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21	1,294	0,032
7949588	CD248	CD248 molecule	1,283	0,043
7986214	SLCO3A1	Solute carrier organic anion transporter family member 3A1	1,278	0,011
8032871	DPP9	Dipeptidyl peptidase 9	1,252	0,037
8129888	NHSL1	NHS like 1	1,249	0,012
8152867	ASAP1	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1	1,247	0,034
8010061	SPHK1	Sphingosine kinase 1	1,247	0,021
8040753	TMEM214	Transmembrane protein 214	1,244	0,043
7985809	ABHD2	Abhydrolase domain containing 2	1,239	0,036
8073522	SREBF2	Sterol regulatory element binding transcription factor 2	1,239	0,049
8055183	SMPD4	Sphingomyelin phosphodiesterase 4	1,236	0,037
7952116	BCL9L	B-cell CLL/lymphoma 9-like	1,223	0,038
7912157	ERRF1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	1,212	0,026
7928189	UNC5B	Unc-5 netrin receptor B	1,174	0,038
8043945	MAP4K4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	1,158	0,046
7993478	ABCC1	ATP binding cassette subfamily C member 1	1,109	0,048
7999909	GPRC5B	G protein-coupled receptor class C group 5 member B	1,107	0,041
8131844	GPNMB	Glycoprotein nmb	1,079	0,033
7984743	CD276	CD276 molecule	1,075	0,047
8175039	ELF4	E74 like ETS transcription factor 4	1,046	0,042
8095376	MT2A	Metallothionein 2A	1,022	0,035

Tabla 17. Lista de genes infra-expresados de manera significativa en M vs T, con log FC < -1 y p-valor < 0,05. Los genes están ordenados de acuerdo con los valores de log FC.

ID gen	Símbolo	Nombre del gen	Log FC	p-valor
7981947	SNORD109A	Small nucleolar RNA, C/D box 109A	-2,680	0,000
7982098	SNORD109A	Small nucleolar RNA, C/D box 109A	-2,680	0,000
7982006	SNORD116-29	Small nucleolar RNA, C/D box 116-29	-2,561	0,000
7982000	SNORD116-26	Small nucleolar RNA, C/D box 116-26	-2,549	0,003
7981998	SNORD116-25	Small nucleolar RNA, C/D box 116-25	-2,466	0,003
7902400	SNORD45B	Small nucleolar RNA, C/D box 45B	-2,363	0,000
7951030	SNORD6	Small nucleolar RNA, C/D box 6	-2,316	0,000
8062490	SNORA60	Small nucleolar RNA, H/ACA box 60	-2,074	0,004
8081758	GRAMD1C	GRAM domain containing 1C	-2,066	0,008

Resultados SECCIÓN II

7982002	SNORD116-27	Small nucleolar RNA, C/D box 116-27	-2,047	0,002
7989013	RSL24D1	Ribosomal L24 domain containing 1	-1,993	0,005
7920875	SCARNA4	Small Cajal body-specific RNA 4	-1,991	0,013
8120826	IRAK1BP1	Interleukin 1 receptor associated kinase 1 binding protein 1	-1,931	0,011
7961540	RERG	RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor	-1,918	0,039
8101489	FAM175A	Family with sequence similarity 175 member A	-1,869	0,012
8160295	SCARNA8	Small Cajal body-specific RNA 8	-1,867	0,033
8043276	SNORD94	Small nucleolar RNA, C/D box 94	-1,784	0,014
8133688	SNORA14A	Small nucleolar RNA, H/ACA box 14A	-1,768	0,013
8118207	SNORA38	Small nucleolar RNA, H/ACA box 38	-1,763	0,023
8085081	CRBN	Cereblon	-1,758	0,017
7957467	C12orf29	Chromosome 12 open reading frame 29	-1,756	0,023
7981955	SNORD116-4	Small nucleolar RNA, C/D box 116-4	-1,752	0,010
7899392	SCARNA1	Small Cajal body-specific RNA 1	-1,740	0,015
8121031	SLC35A1	Solute carrier family 35 member A1	-1,736	0,024
8175432	SNORD61	Small nucleolar RNA, C/D box 61	-1,726	0,002
8049299	SCARNA6	Small Cajal body-specific RNA 6	-1,714	0,009
7925182	SNORA14B	Small nucleolar RNA, H/ACA box 14B	-1,712	0,016
8108627	VTRNA1-1	Vault RNA 1-1	-1,683	0,011
8146448	MRPL15	Mitochondrial ribosomal protein L15	-1,654	0,041
8082012	SLC15A2	Solute carrier family 15 member 2	-1,651	0,022
8121632	KPNA5	Karyopherin subunit alpha 5	-1,650	0,008
8120378	KIAA1586	KIAA1586	-1,622	0,012
8114653	TAF7	TATA-box binding protein associated factor 7	-1,617	0,015
8139482	SNORA5A	Small nucleolar RNA, H/ACA box 5A	-1,613	0,030
7981960	SNORD116-6	Small nucleolar RNA, C/D box 116-6	-1,605	0,012
7962185	AMN1	Antagonist of mitotic exit network 1 homolog	-1,600	0,037
8169049	TCEAL1	Transcription elongation factor A like 1	-1,591	0,013
8105647	C5orf44	Trafficking protein particle complex 13	-1,583	0,020
8157021	NIPSNAP3A	Nipsnap homolog 3A (C, elegans)	-1,580	0,026
8151436	PEX2	Peroxisomal biogenesis factor 2	-1,563	0,049
7925691	ZNF124	Zinc finger protein 124	-1,562	0,012
8100145	COMMD8	COMM domain containing 8	-1,545	0,037
8143433	MRPS33	Mitochondrial ribosomal protein S33	-1,543	0,026
8078300	OXSM	3-oxoacyl-ACP synthase, mitochondrial	-1,531	0,034
7942592	SNORD15A	Small nucleolar RNA, C/D box 15A	-1,526	0,009
7988414	GATM	Glycine amidinotransferase	-1,499	0,042
7981994	SNORD116-23	Small nucleolar RNA, C/D box 116-23	-1,494	0,016
7917954	FRRS1	Ferric chelate reductase 1	-1,494	0,035
7924388	BPNT1	3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 1	-1,473	0,033
8047356	NIF3L1	NGG1 interacting factor 3 like 1	-1,463	0,027
8151561	ZFAND1	Zinc finger AN1-type containing 1	-1,459	0,036

7998666	SNORA64	Small nucleolar RNA, H/ACA box 64	-1,437	0,016
8146198	POLB	Polymerase (DNA directed), beta	-1,434	0,037
8066402	C20orf111	Oxidative stress responsive serine-rich 1	-1,418	0,031
7940667	SNORA57	Small nucleolar RNA, H/ACA box 57	-1,414	0,016
7998664	SNORA10	Small nucleolar RNA, H/ACA box 10	-1,404	0,013
8041204	SNORA10	Small nucleolar RNA, H/ACA box 10	-1,404	0,013
7981181	SCARNA13	Small Cajal body-specific RNA 13	-1,394	0,028
8023252	RPL17	Ribosomal protein L17	-1,368	0,035
8130578	SNORA20	Small nucleolar RNA, H/ACA box 20	-1,366	0,046
7981958	SNORD116-5	Small nucleolar RNA, C/D box 116-5	-1,364	0,029
7981962	SNORD116-5	Small nucleolar RNA, C/D box 116-5	-1,364	0,029
8059712	SNORD82	Small nucleolar RNA, C/D box 82	-1,337	0,018
7902308	FPGT	Fucose-1-phosphate guanylyltransferase	-1,337	0,022
7957386	ACSS3	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 3	-1,326	0,040
8092000	TERC	Telomerase RNA component	-1,323	0,042
8139456	SNORA9	Small nucleolar RNA, H/ACA box 9	-1,306	0,015
8078916	SNORA6	Small nucleolar RNA, H/ACA box 6	-1,305	0,050
7901048	SNORD46	Small nucleolar RNA, C/D box 46	-1,284	0,014
8142407	TMEM168	Transmembrane protein 168	-1,283	0,020
8083794	MYNN	Myoneurin	-1,280	0,047
8097056	SNORA24	Small nucleolar RNA, H/ACA box 24	-1,276	0,018
7971565	LPAR6	Lysophosphatidic acid receptor 6	-1,257	0,016
8121002	C6orf162	Small integral membrane protein 8	-1,231	0,042
7981949	SNORD116-1	Small nucleolar RNA, C/D box 116-1	-1,219	0,043
7962427	PUS7L	Pseudouridylylase synthase 7-like	-1,213	0,043
8177628	CCDC125	Coiled-coil domain containing 125	-1,205	0,049
7942594	SNORD15B	Small nucleolar RNA, C/D box 15B	-1,203	0,016
7922404	SNORD80	Small nucleolar RNA, C/D box 80	-1,202	0,042
8141872	NAPEPLD	N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D	-1,200	0,041
8090565	SNORA7B	Small nucleolar RNA, H/ACA box 7B	-1,197	0,032
8180324	THAP5	THAP domain containing 5	-1,183	0,050
8093336	ZNF141	Zinc finger protein 141	-1,177	0,035
8112439	CCDC125	Coiled-coil domain containing 125	-1,173	0,046
8160531	C9orf72	Chromosome 9 open reading frame 72	-1,155	0,050
7960052	SNORA49	Small nucleolar RNA, H/ACA box 49	-1,110	0,027
7948894	RNU2-1	RNA, U2 small nuclear 1	-1,040	0,022
7951032	SNORA1	Small nucleolar RNA, H/ACA box 1	-0,982	0,045

Al representar la significancia estadística frente al log FC se muestran de manera gráfica los genes desregulados significativamente entre T y M (Figura 32); los genes sobre-expresados quedan en la parte derecha, y los infra-expresados, en la parte izquierda del gráfico.

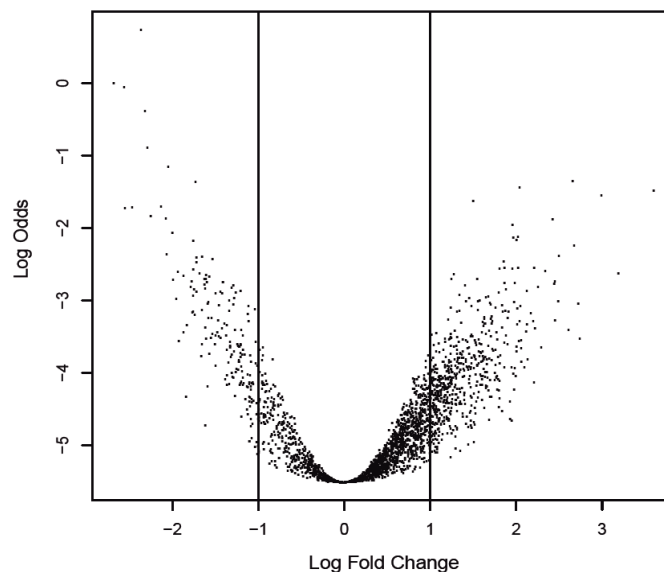


Figura 32. Gráfico que agrupa los genes en base al impacto biológico del cambio de expresión génica (log FC) y la significancia estadística (log p-valor; log odds).

4.2.2. Análisis de vías de señalización

Mediante el uso del software IPA, se analizaron las vías moleculares y las funciones biológicas alteradas, así como las patologías asociadas a los genes desregulados entre T y M.

En primer lugar, se construyeron vías de señalización en base a todos los genes que aparecieron diferencialmente expresados de manera significativa en el *microarray* (sobre-expresados e infra-expresados). La vía biológica más relevante que representaba las diferencias de expresión génica era la de “metaloproteinasas de matriz” (p -valor = $9,23 \text{ E}^{-06}$, Figura 33), lo cual indica que una proporción alta de genes desregulados entre T y M deben de promover el comportamiento invasivo de las células de CO. Por otro lado, las funciones biológicas más significativas relacionadas con los genes desregulados fueron el crecimiento y la proliferación celular (p -valor = $8,38 \text{ E}^{-03} - 3,10 \text{ E}^{-11}$), el movimiento celular (p -valor = $8,64 \text{ E}^{-03} - 6,08 \text{ E}^{-11}$), la muerte celular y la supervivencia (p -valor = $7,95 \text{ E}^{-03} - 7,72 \text{ E}^{-09}$). El regulador activo asociado a los genes diferencialmente expresados resultó ser TGF- β (p -valor = $6,58 \text{ E}^{-09}$), lo cual concuerda con el papel que tiene esta proteína en la promoción del potencial metastásico al inducir la TEM (280,281). En línea con lo anterior, la enfermedad más significativamente asociada a los genes analizados resultó ser el cáncer (p -valor = $8,84 \text{ E}^{-03} - 2,05 \text{ E}^{-09}$).

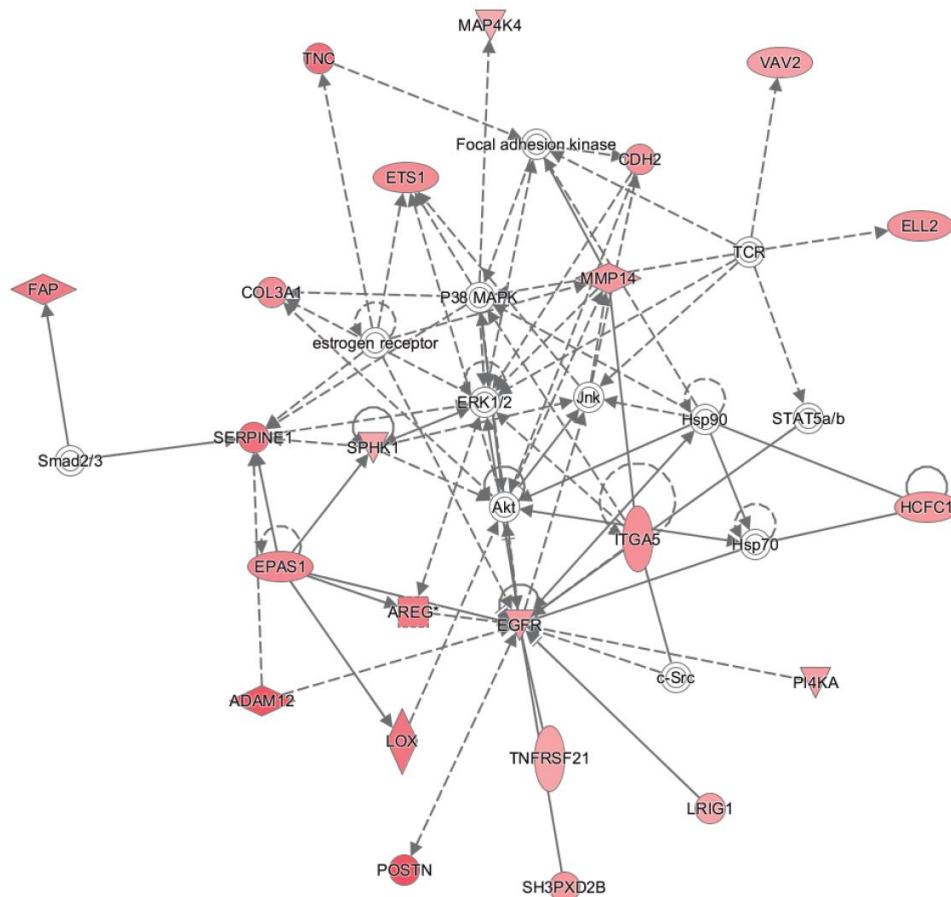


Figura 33. Vía de las metaloproteinasas de matriz construida mediante el software IPA a partir de la lista de genes diferencialmente expresados entre T y M (genes infra-expresados y sobre-expresados, con $\log FC < -1$; > 1 y p -valor $< 0,05$). La intensidad del color rojo indica el nivel de sobre-expresión del gen. El color blanco indica que la molécula ha sido predicha por el software IPA y ha sido incorporada por la base de datos interna del sistema. Las líneas indican la unión entre proteínas, las flechas señalan activación y las líneas discontinuas apuntan una interacción indirecta.

En segundo lugar, se estudiaron los mecanismos biológicos asociados a los genes sobre-expresados e infra-expresados en M respecto a T, por separado. Al analizar la lista de genes sobre-expresados en M respecto a T con el software IPA, la vía biológica más significativamente alterada fue nuevamente la de “metaloproteinasas de matriz” (p -valor = $8,84 E^{-03} - 2,05 E^{-09}$, Figura 34). Las funciones biológicas significativamente alteradas fueron: el movimiento celular, la señalización e interacción intercelular, y el crecimiento y la proliferación celular (p -valores respectivos: p -valor = $8,38 E^{-03} - 3,03 E^{-04}$; p -valor = $8,38 E^{-03} - 6,83 E^{-04}$; p -valor = $1,67 E^{-02} - 2,85 E^{-03}$). Por otro lado, el regulador que activa estos procesos resultó ser VEGF-A (p -valor = $1,91 E^{-04}$), el cual está asociado a la inducción de angiogénesis en varios tipos de tumores, incluyendo el de ovario (66).

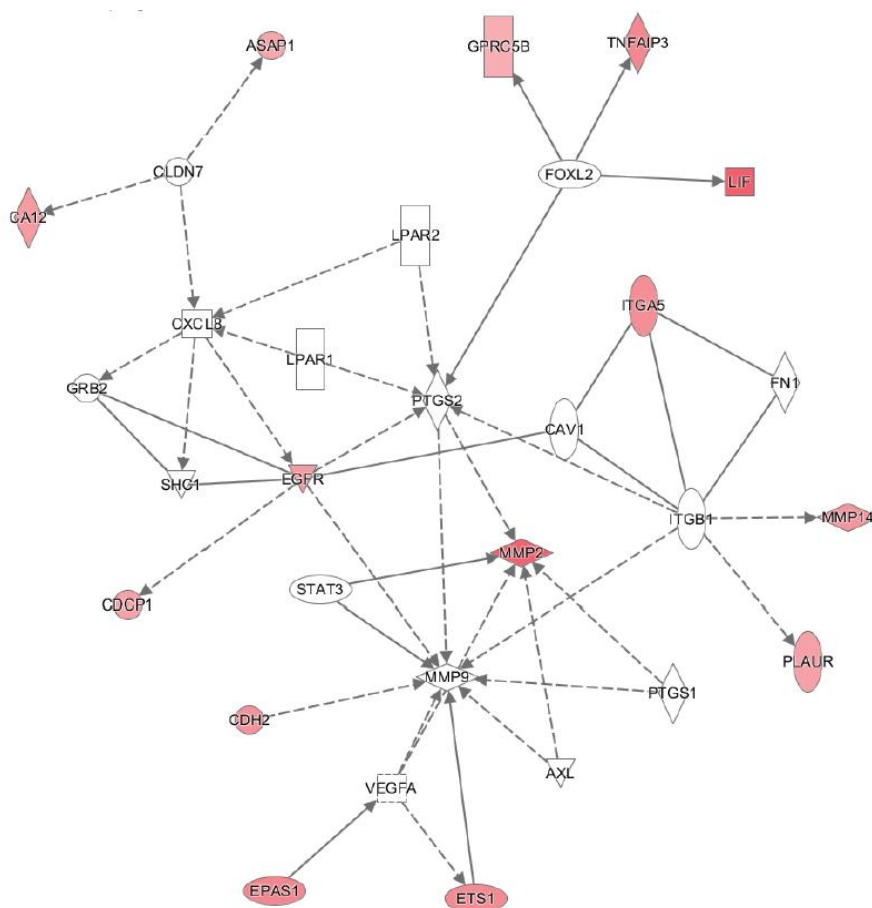


Figura 34. Vía de las metaloproteinasas de matriz construida mediante el software IPA, asociada a los genes significativamente sobre-expresados en M respecto a T ($\log FC > 1$ y p -valor $< 0,05$). La intensidad del color rojo indica el nivel de sobre-expresión del gen. El color blanco indica que la molécula ha sido predicha por el software IPA y ha sido incorporada por la base de datos interna del sistema. Las líneas indican la unión entre proteínas, las flechas señalan activación y las líneas discontinuas apuntan una interacción indirecta.

Finalmente, cuando se analizó la lista de genes infra-expresados en M versus (vs) T con el software IPA, la vía biológica más alterada fue la de “biosíntesis de GDP-L-fucosa II a partir de L-fucosa” ($p = 2,66 \times 10^{-3}$). Sin embargo, el sistema no pudo definir funciones biológicas, interacciones o reguladores asociados a estos genes.

4.2.3. Selección de genes sobre-expresados en metástasis respecto a tumores primarios de ovario

En nuestro estudio, aquellos genes que se encontraban elevados de manera significativa (p -valor $< 0,05$) en M vs T en todas las muestras analizadas en el *microarray* fueron seleccionados para la subsiguiente fase de validación. Inicialmente, se seleccionaron los genes sobre-expresados con $\log FC > 1$ en dos de las tres M y un $\log FC > 0,9$ en la tercera M. Sólo 10 genes cumplían estos criterios: FABP4 (*Fatty acid binding protein 4*; Proteína de unión de ácidos grasos 4), INHBA (*Inhibin beta A*; Subunidad beta A de inhibina), GREM1 (*Gremlin 1, DAN family BMP antagonist*; Gremlin 1), MMP11 (*Matrix metalloproteinase 11*; Metaloproteínasa de matriz 11), PLVAP (*Plasmalemma vesicle associated protein*; Proteína asociada a vesículas del plasmalema), MXRA5 (*Matrix-remodelling associated 5*; Proteína asociada a la remodelación de matriz 5), PXDN (*Peroxidasin*; Peroxidasina), RNF152 (*Ring finger protein 152*; Proteína de dedo de anillo 152), BCL2L11 (*B-cell lymphoma 2 like 11*; Proteína 11 similar

a la proteína 2 de células B de linfoma) y BHLHE40 (*Basic helix-loop-helix family member e40*; Miembro e40 de la familia de hélix-loop-hélix básico).

En este *microarray*, MUC16 – gen que codifica para CA125 –, también se encontraba sobreexpresado de manera significativa en las muestras de M en comparación con las de T. De hecho ya es conocido que CA125 participa en las interacciones intercelulares que permiten a las células tumorales de ovario invadir el mesotelio peritoneal (87). Por consiguiente, MUC16 no fue incluido en la fase de validación.

Para aumentar la robustez de la selección de los candidatos, analizamos la asociación de los 10 genes con la supervivencia global de pacientes con CO. Para ello utilizamos la base de datos transcriptómica CSIOVDB, que incluye información de 3.431 muestras de CO, 73,75% de las cuales son casos de HGSOC (270). Con esta herramienta determinamos el pronóstico de 934 pacientes en base a los niveles de expresión de los genes de interés; en el caso de RNF152 sólo pudieron analizarse 405 casos de CO (Figura 35). Finalmente, seleccionamos aquellos genes que se encontraban asociados a mal pronóstico de manera significativa (log-rank p -valor $< 0,05$), genes cuya expresión a niveles elevados estaban ligados a una supervivencia baja de las pacientes: FABP4, INHBA, GREM1, MMP11, PLVAP, MXRA5 y PXDN. De manera que RNF152 y BCL2L11 fueron descartados porque no había diferencias significativas en el pronóstico según su expresión (log-rank p -valor $> 0,05$); y BHLHE40 fue excluido porque no había información acerca de este gen en la base de datos CSIOVDB.

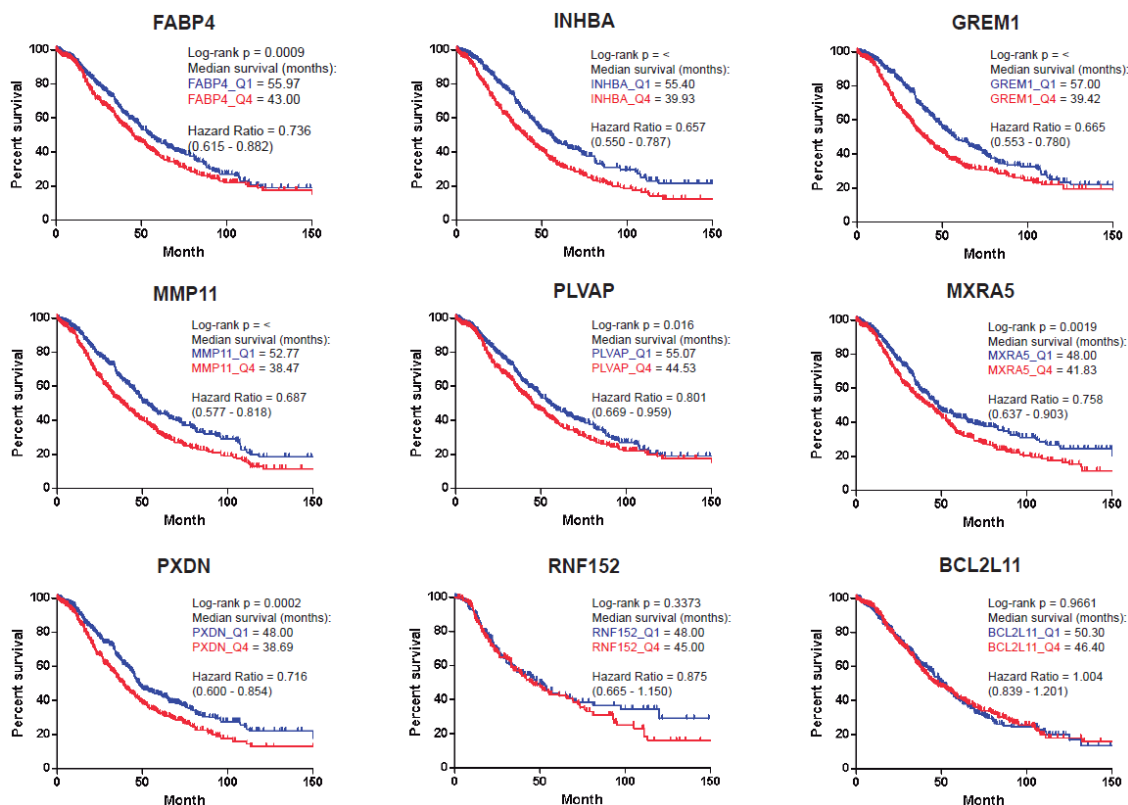


Figura 35. Análisis de supervivencia de pacientes con CO dependiendo de los niveles de expresión de los genes FABP4, INHBA, GREM1, MMP11, PLVAP, MXRA5, PXDN, RNF152 y BCL2L11 – Estudio con la base de datos CSIOVDB. Q1: Pacientes con expresión baja del gen en cuestión. Q4: Pacientes con expresión alta del gen. En cada caso se muestra: log-rank p -valor, el promedio de supervivencia global (meses) y el cociente Hazard. Se considera que hay diferencias significativas en la supervivencia de las pacientes en función de la expresión de los candidatos cuando “log-rank $p < 0,05$ ” y “log-rank $p = <$ ” (p -valor igual a 0).

En la Tabla 18, se muestran los candidatos que pasaron finalmente a la fase de validación, especificando el log FC de la M respecto al T en cada paciente del *microarray*, así como el promedio del log FC y el *p*-valor correspondiente.

Tabla 18. Candidatos seleccionados. Genes sobre-expresados significativamente en M vs T ($\log FC > 1$, p -valor $< 0,05$) de manera consistente en todas las muestras analizadas por *microarray*. Los genes están ordenados de acuerdo con el promedio de log FC.

ID gen	Símbolo	Nombre del gen	Log FC (M vs T)1	Log FC (M vs T)2	Log FC (M vs T)3	Log FC	<i>p</i> - valor
8151532	FABP4	<i>Fatty acid binding protein 4</i>	3,999	5,165	1,658	3,607	0,002
8171172	MXRA5	<i>Matrix-remodelling associated 5</i>	4,811	1,876	1,310	2,666	0,002
8071758	MMP11	<i>Matrix metalloproteinase 11</i>	3.170	3.230	0.900	2.433	0.004
8139207	INHBA	<i>Inhibin beta A</i>	4,074	1,840	1,119	2,344	0,011
8050007	PXDN	<i>Peroxidasin</i>	4,310	1,458	1,005	2,258	0,014
7982377	GREM1	<i>Gremlin 1, DAN family BMP antagonist</i>	1,893	2,852	1,382	2,042	0,002
8035297	PLVAP	<i>Plasmalemma vesicle associated protein</i>	1,432	1,848	1,244	1,508	0,003

El gen FABP4 codifica para un miembro de la familia de las FABPs (*Fatty acid binding proteins*), unas proteínas citosólicas que tienen la capacidad de unir ácidos grasos de cadena larga y otros ligandos hidrofóbicos. Las funciones principales de FABP4 son la absorción, el transporte y el metabolismo de ácidos grasos (252,282).

El gen MXRA5 codifica para un proteoglicano de adhesión extracelular que está implicado en la remodelación de la ECM y la adhesión intercelular (283).

El gen MMP11 codifica para un miembro de las estromelinas (estromelina 3 – familia de las MMPs), implicadas principalmente en la descomposición de la ECM que tiene lugar en procesos fisiológicos de manera natural (el desarrollo embrionario, la angiogénesis, la cicatrización y la ovulación), y en procesos patológicos (invasión y la metástasis) (284,285).

El gen INHBA codifica para un miembro de la familia TGF- β llamado subunidad beta A de inhibina, la cual puede ejercer distintas funciones en base al dímero que conforma – inhibina o activina. En general, las inhibinas y activinas regulan las gonadotropinas, la diferenciación y la proliferación celular (286).

El gen PXDN codifica para una peroxidasa de superficie que se ha visto implicada en la formación de la ECM al ser secretada al medio extracelular (287).

El gen GREM1 codifica para un miembro de la familia antagonista de las BMPs (*Bone morphogenetic proteins*; proteínas morfogenéticas de los huesos), factores de crecimiento que regulan la morfogénesis y la homeostasis tisular (288,289).

El gen PLVAP codifica para un componente estructural de los diafragmas asociados a fenestraciones endoteliales y el sistema caveolar de las membranas, mantiene la integridad de los vasos, induce la permeabilidad vascular, el transporte endotelial y la angiogénesis (290,291).

Para verificar los resultados del *microarray*, se analizó la expresión de los 7 candidatos seleccionados mediante RT-qPCR en la serie de muestras pareadas iniciales (muestras analizadas anteriormente mediante *microarray*). En esta fase de verificación, pudimos confirmar

la sobre-expresión de todos los genes en M vs T en al menos 2 de las 3 pacientes (Figura 36A), lo cual indica que la expresión génica detectada con la tecnología del *microarray* se corresponde con la expresión génica detectada mediante RT-qPCR.

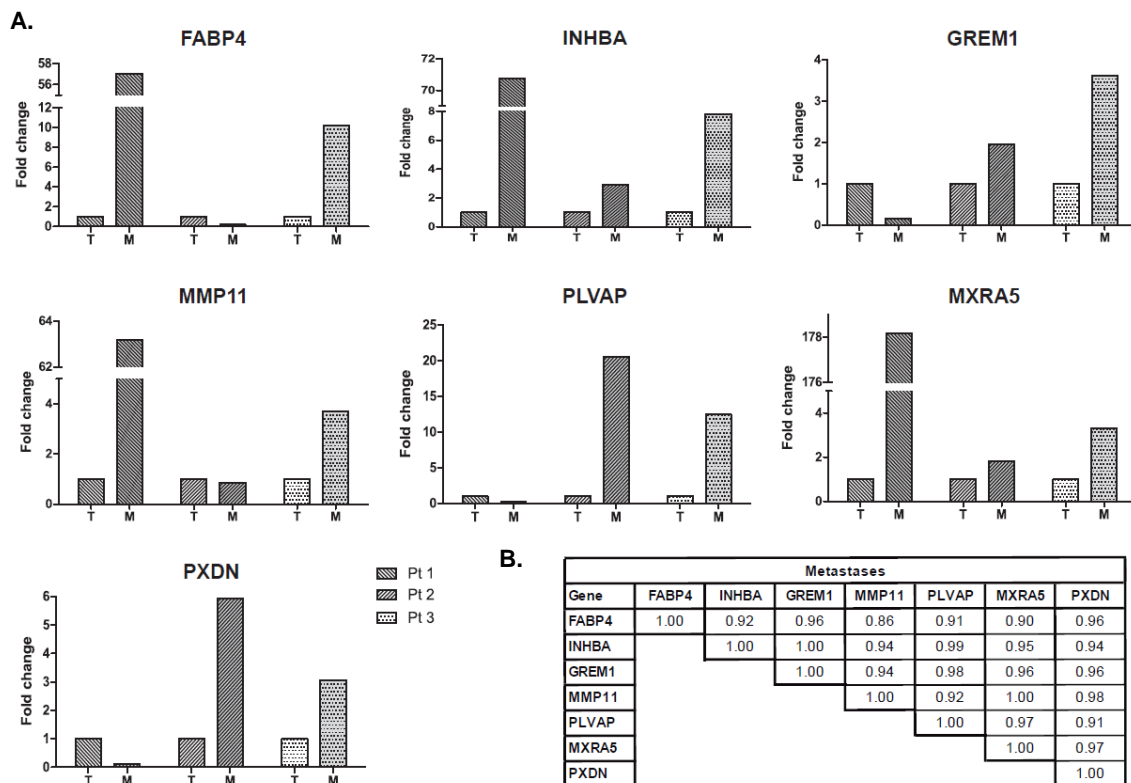


Figura 36. A. Análisis de expresión mediante RT-qPCR de los genes seleccionados (FABP4, INHBA, GREM1, MMP11, PLVAP, MXRA5 y PXDN) en las 3 muestras pareadas de T y M evaluadas inicialmente en el microarray. Los datos fueron normalizados en cada muestra con la expresión del gen endógeno GAPDH. Se representa la expresión relativa en T y M como el promedio del valor de FC ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) – los niveles de expresión en el T fueron utilizados como referencia. **B. Coeficientes de Spearman que indican la correlación entre los genes a nivel de ARNm (valores ΔCt) en M.** Todos los análisis estadísticos se realizaron en base a los valores ΔCt .

Adicionalmente, se realizaron análisis de correlación de la expresión de los 7 candidatos. De manera interesante, la expresión de los candidatos correlacionaba en las muestras de M (p -valor < 0,01), pero no en las de T; en la Figura 36B se muestran los coeficientes de correlación de Spearman en las muestras de M.

4.2.4. Fase de validación a nivel de ARN mediante análisis de RT-qPCR

Para validar los 7 candidatos seleccionados, se procedió a la evaluación de su expresión mediante RT-qPCR en muestras de T y M pareadas de una nueva cohorte de 20 mujeres con HGSOE en estadio avanzado (pacientes 4 a 23, ver apartado 3.2.1. *Pacientes incluidas en el estudio, Tabla 15*). Diez de las 20 pacientes no habían recibido quimioterapia previamente a la cirugía (quimioterapia adyuvante) y las otras 10, habían sido tratadas con tres ciclos de carboplatino/paclitaxel antes de la citorreducción (quimioterapia neoadyuvante).

Puesto que se desconocía si la aplicación de quimioterapia previamente a la cirugía pudiera afectar a la expresión de los candidatos, en primer lugar, se analizó la expresión de los 7 genes en la cohorte de 10 muestras pareadas de T y M sin quimioterapia previa a la cirugía (Figura

37A) y, de forma paralela, se analizó la expresión en la cohorte de las 10 muestras pareadas de T y M con quimioterapia neoadyuvante (Figura 37B).

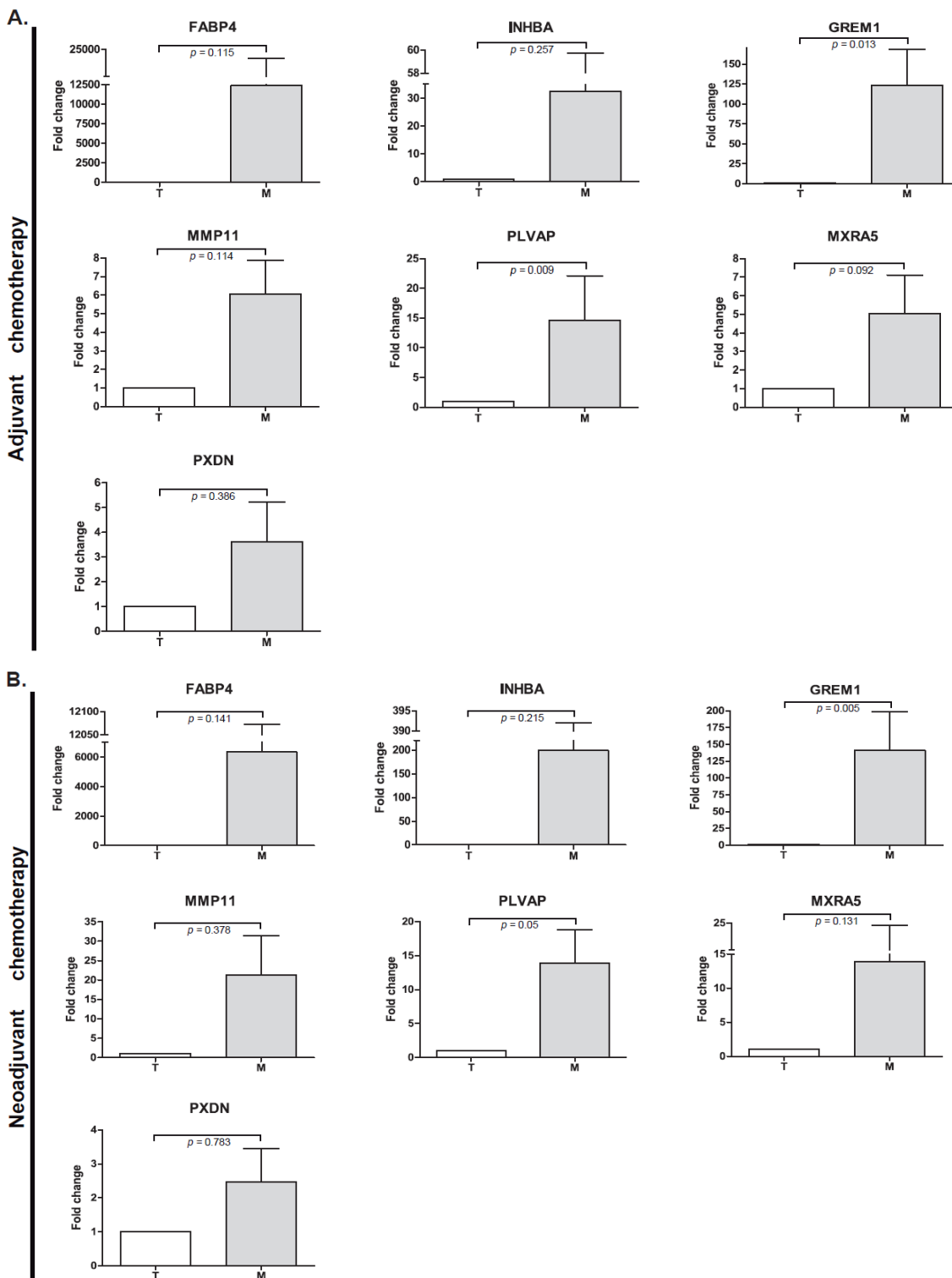
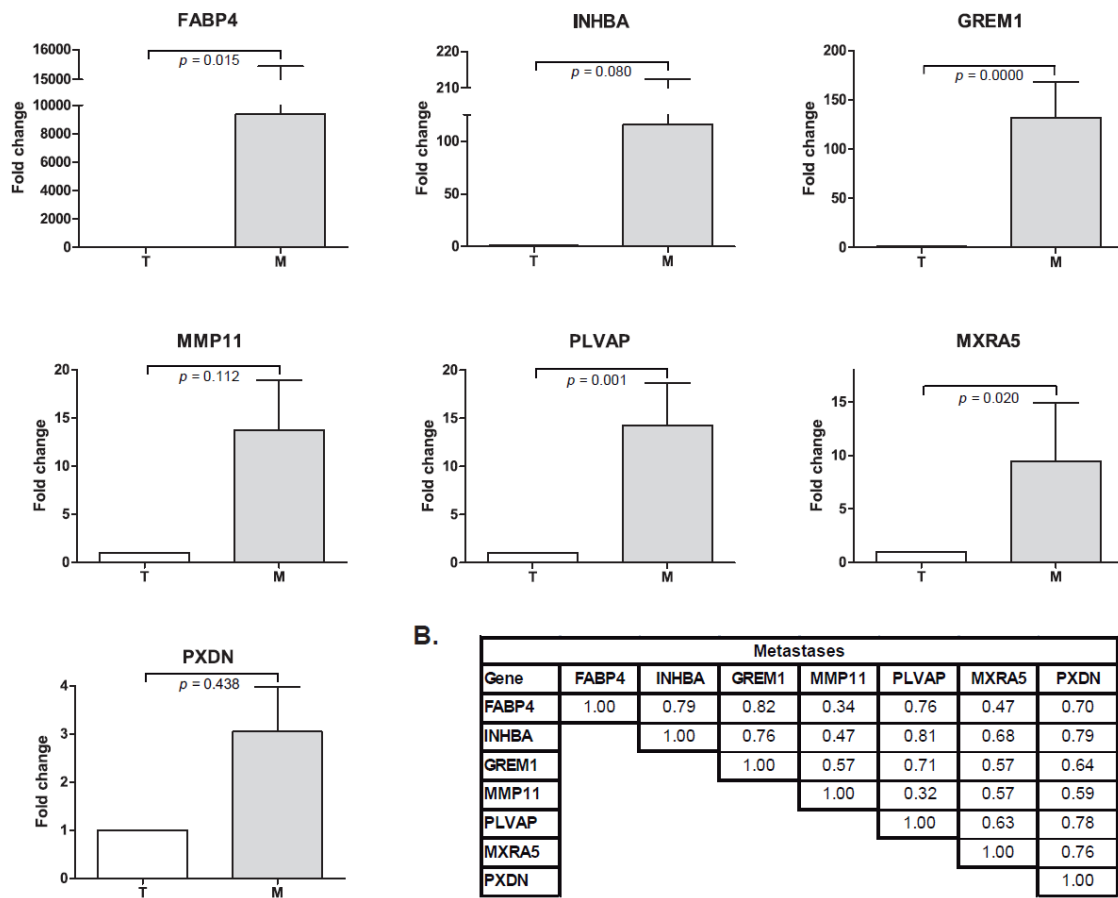


Figura 37. Análisis de expresión mediante RT-qPCR de los genes seleccionados (FABP4, INHBA, GREM1, MMP11, PLVAP, MXRA5 y PXDN) en muestras pareadas de T y M. A. 10 pacientes con HGSOC en estadio avanzado que no habían recibido quimioterapia antes de la cirugía (tratamiento adyuvante) y B. 10 pacientes con HGSOC en estadio avanzado que habían sido tratadas con quimioterapia antes de la cirugía (tratamiento neoadyuvante). Los datos fueron normalizados en cada muestra con la expresión del gen endógeno GAPDH. Se representa la expresión relativa en T y M como el promedio del valor de FC ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) – los niveles de expresión en el T fueron utilizados como referencia. Todos los análisis estadísticos se realizaron en base a los valores ΔCt .

Tras realizar los análisis estadísticos correspondientes, determinamos que no había diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de los candidatos en la cohorte de pacientes sin quimioterapia previa a la cirugía y la cohorte de pacientes con quimioterapia neoadyuvante (p -valor $> 0,05$). Es decir, la quimioterapia neoadyuvante no afectaba a la expresión de los candidatos. Por consiguiente, se procedió al análisis de las dos cohortes (sin quimioterapia y con quimioterapia neoadyuvante) conjuntamente. En la Figura 38A se presenta el promedio de expresión de cada candidato en T y M. Todos los genes se encontraban sobre-expresados en M respecto a T, especialmente en el caso de FABP4, GREM1, PLVAP y MXRA5, donde la diferencia de expresión entre T y M era estadísticamente significativa (p -valor $< 0,05$). Nuevamente, los genes correlacionaban entre sí a nivel de ARN en las M, pero no en los T. En la Figura 38B se muestran los coeficientes de Spearman pertinentes.

A.



B.

Gene	Metastases						
	FABP4	INHBA	GREM1	MMP11	PLVAP	MXRA5	PXDN
FABP4	1.00	0.79	0.82	0.34	0.76	0.47	0.70
INHBA		1.00	0.76	0.47	0.81	0.68	0.79
GREM1			1.00	0.57	0.71	0.57	0.64
MMP11				1.00	0.32	0.57	0.59
PLVAP					1.00	0.63	0.78
MXRA5						1.00	0.76
PXDN							1.00

Figura 38. A. Análisis de expresión mediante RT-qPCR de los genes seleccionados (FABP4, INHBA, GREM1, MMP11, PLVAP, MXRA5 y PXDN) en muestras pareadas de T y M de 20 pacientes con HGSOC en estadio avanzado. Los datos fueron normalizados en cada muestra con la expresión del gen endógeno GAPDH. Se representa la expresión relativa en T y M como el promedio del valor de FC ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) – los niveles de expresión en el T fueron utilizados como referencia. **B. Coeficientes de Spearman que indican la correlación entre los genes a nivel de ARNm (valores ΔCt) en M.** Todos los análisis estadísticos se realizaron en base a los valores ΔCt .

Quando se analizó la relación entre la expresión de los 7 candidatos y los datos clínico-patológicos de las pacientes, segregando las pacientes en dos grupos en función del promedio del valor de expresión de los candidatos en M, se observó que aquellas pacientes que presentaban niveles altos de expresión del candidato también presentaban niveles séricos de CA125 muy elevados, superiores a 500 U/mL – valor que indica diseminación peritoneal altamente agresiva (292). Es decir, la expresión elevada de los genes en las muestras de M se

relaciona con niveles muy elevados de CA125 en suero (Figura 39). Sin embargo, no se observaron asociaciones significativas de la expresión de los candidatos en M con el tumor residual tras la cirugía o la supervivencia libre de enfermedad (p -valor > 0,05).

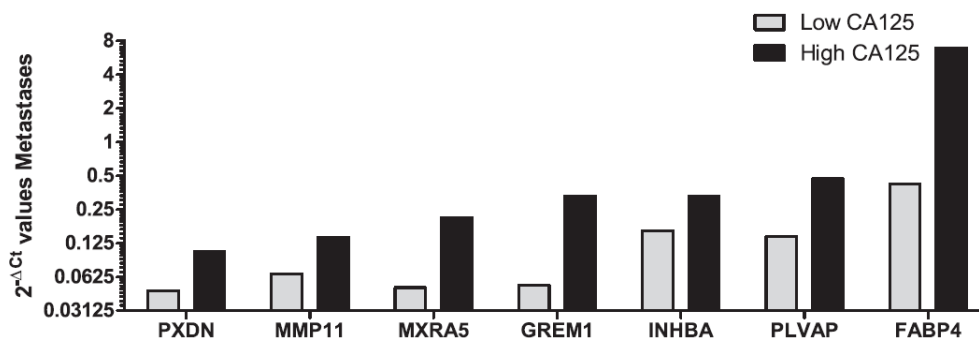


Figura 39. Distribución de la expresión de los genes en M (valores $2^{-\Delta C_t}$) de acuerdo con los niveles pre-operatorios altos o bajos del marcador sérico CA125 de cada paciente.

4.2.5. Fase de validación a nivel de proteína mediante IHQ

Tras la validación de los candidatos a nivel de ARN, se evaluó su expresión a nivel de proteína mediante tinción IHQ en una nueva serie de muestras pareadas de T y M procedentes de 23 pacientes con HGSOE en estadio avanzado (pacientes 24 a 46, ver apartado 3.2.1. *Pacientes incluidas en el estudio, Tabla 15*). Concretamente, se analizó la expresión de GREM1, PLVAP, INHBA, FABP4 y MMP11; la presencia de PXDN y MXRA5 no pudo ser estudiada debido a la falta de disponibilidad de anticuerpos específicos útiles para esta técnica. En la Tabla 19 se presentan los resultados de la evaluación semicuantitativa de la tinción de cada candidato.

Tabla 19. Expresión relativa de los candidatos GREM1, PLVAP, INHBA, FABP4 y MMP11, a nivel de proteína, evaluada por IHQ en muestras pareadas de T y M pareadas de una cohorte independiente de 23 pacientes con HGSO en estadio avanzado. Se muestra el valor promedio del nivel de tinción (histoscore) de cada candidato, calculado a partir de la evaluación del porcentaje de células teñidas y la intensidad de la tinción en 3 áreas distintas de cada sección de tejido. NV: No Valorable.

Paciente	Tejido	GREM1	PLVAP	INHBA	FABP4		MMP11	
		Células CO	Células CO	Células CO	Células CO	Vasos teñidos (%)	Células CO	Fibroblastos
24	T	60	0	140	0	72,9	0	0
	M	0	0	160	20	0	0	10
25	T	30	0	90	10	0	0	10
	M	30	0	100	10	83,3	0	120
26	T	60	0	160	0	83,3	0	40
	M	140	0	300	30	23,5	80	0
27	T	90	0	100	0	23,1	0	0
	M	0	0	0	0	86,4	0	0
28	T	120	0	70	0	7,1	0	0
	M	0	0	80	60	50,0	0	10
29	T	120	0	100	0	30,4	0	0
	M	90	20	90	20	93,9	0	2
30	T	80	0	80	0	80,8	0	0
	M	40	0	100	0	83,3	0	120
31	T	0	0	NV	NV	NV	0	0
	M	0	0	0	0	40,0	0	60
32	T	240	80	300	10	63,6	0	0
	M	90	0	200	0	76,7	0	120
33	T	240	0	200	0	37,5	0	0
	M	140	0	100	0	0	0	60
34	T	0	0	100	90	36,7	0	80
	M	0	0	100	80	43,5	0	10
35	T	0	0	0	0	76,9	0	0
	M	0	0	0	100	82,5	0	0
36	T	0	0	0	0	50,0	0	0
	M	0	0	100	90	59,3	0	0
37	T	20	0	100	60	62,8	0	10
	M	10	80	140	0	64,7	0	40
38	T	0	0	0	0	61,4	0	0
	M	0	0	0	0	77,6	0	0
39	T	60	40	50	0	62,5	0	0
	M	20	0	160	80	82,1	0	10
40	T	20	0	80	90	63,6	0	60
	M	40	30	80	40	61,5	0	100
41	T	0	0	0	0	76,3	0	0
	M	160	10	0	60	84,8	0	120
42	T	140	20	80	90	60,5	0	10
	M	20	0	100	100	93,5	0	100
43	T	60	0	80	30	57,1	0	10
	M	0	0	0	0	83,3	0	0
44	T	240	0	100	0	52,0	0	0
	M	210	5	80	80	68,2	90	0
45	T	140	0	0	0	66,7	0	0
	M	270	0	0	60	58,8	0	10
46	T	80	0	50	0	72,7	0	0
	M	120	0	80	30	75,0	0	0

En la Figura 40 se representa para cada candidato el porcentaje de casos en los que se detectó mayor expresión en M, o en T, o bien una expresión semejante entre T y M.

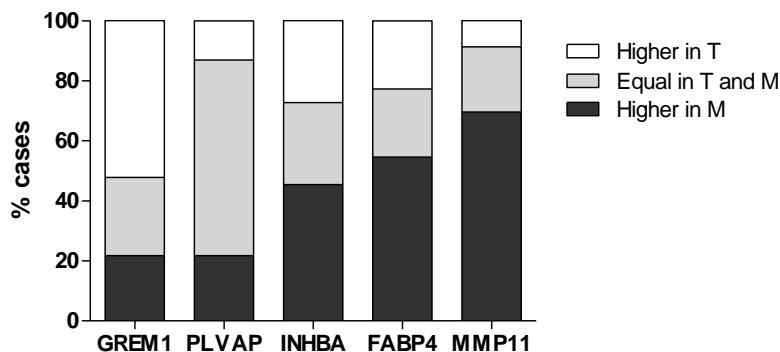


Figura 40. En base a los histoscores, se muestra el porcentaje de casos con niveles de expresión de *GREM1*, *PLVAP*, *INHBA*, *FABP4* y *MMP11* elevados en T, iguales en T y M, o elevados en M. En el caso de *FABP4*, los datos hacen referencia a la expresión en células de CO; y en el caso de *MMP11*, se presentan los datos referentes a la expresión en fibroblastos.

En contraste con los resultados obtenidos a nivel de ARN, *GREM1* se encontró sobre-expresada en el citosol de las células cancerosas de las muestras de T en el 52,17% de los casos; la expresión era igual entre T y M en el 26,09% de los casos; y en el 21,74% restante, había más expresión en las M que en los T (Figura 40 y Figura 41), resultando en una expresión global más elevada en T que en M (no significativa, p -valor = 0,257).

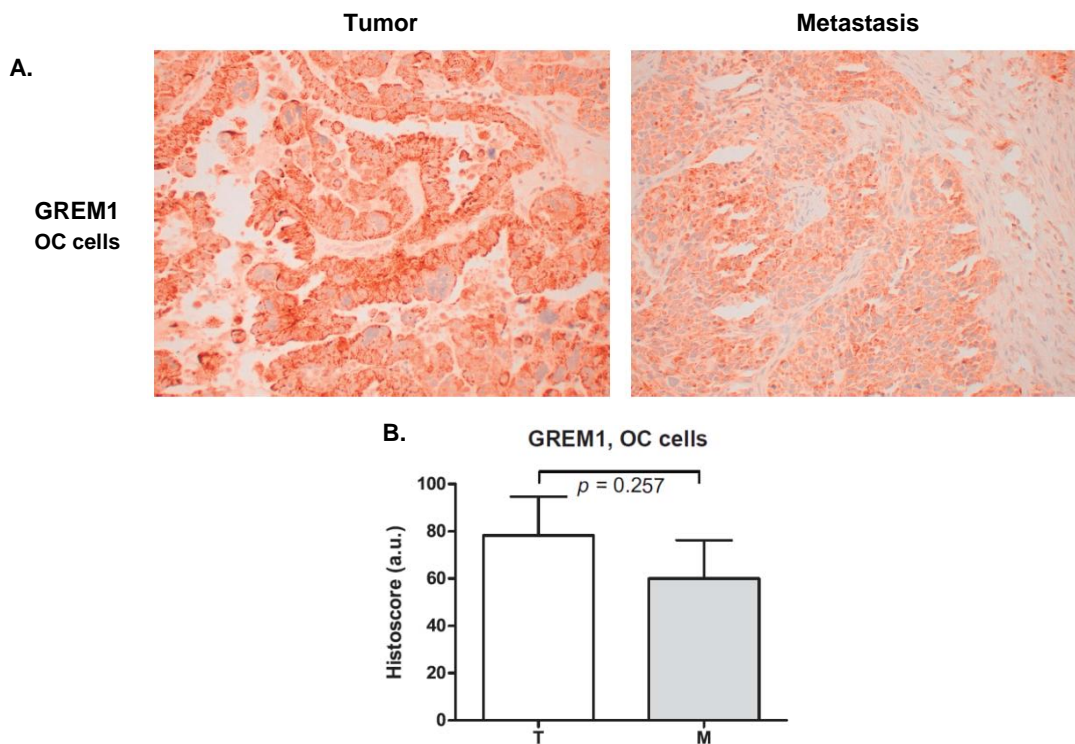


Figura 41. A. Imagen representativa de la tinción IHQ de *GREM1* en una muestra pareada de T y M. *GREM1* se detecta principalmente en el citosol de células tumorales. Aumento original: 20X. B. Representación del promedio de los histoscores de *GREM1* en células de CO de las 23 muestras pareadas de T y M analizadas.

En el caso de PLVAP, no se consiguió obtener una tinción clara pese a varios intentos de optimización de las condiciones de IHQ. Una vez establecidas las condiciones de tinción, únicamente se detectó expresión en 10 de las 46 muestras analizadas. De manera interesante, el patrón de expresión de la proteína era variable, pudiendo ser observada en el citosol y en la membrana (Figura 42A) o en el núcleo celular (Figura 42B). En el 21,74% de los casos se detectó más expresión de PLVAP en las muestras de M, y en el 13,04% de los casos se observó más tinción en las muestras de T, resultando en una expresión global más elevada en M que en T (no significativa, p -valor = 0,969). De todos modos, estos resultados no son representativos, ya que la expresión era nula tanto en T como en M en el 65,22% de los casos (Figura 40). Esto sugiere la necesidad de testar otros anticuerpos para extraer conclusiones robustas acerca de la presencia de PLVAP en HGSOc.

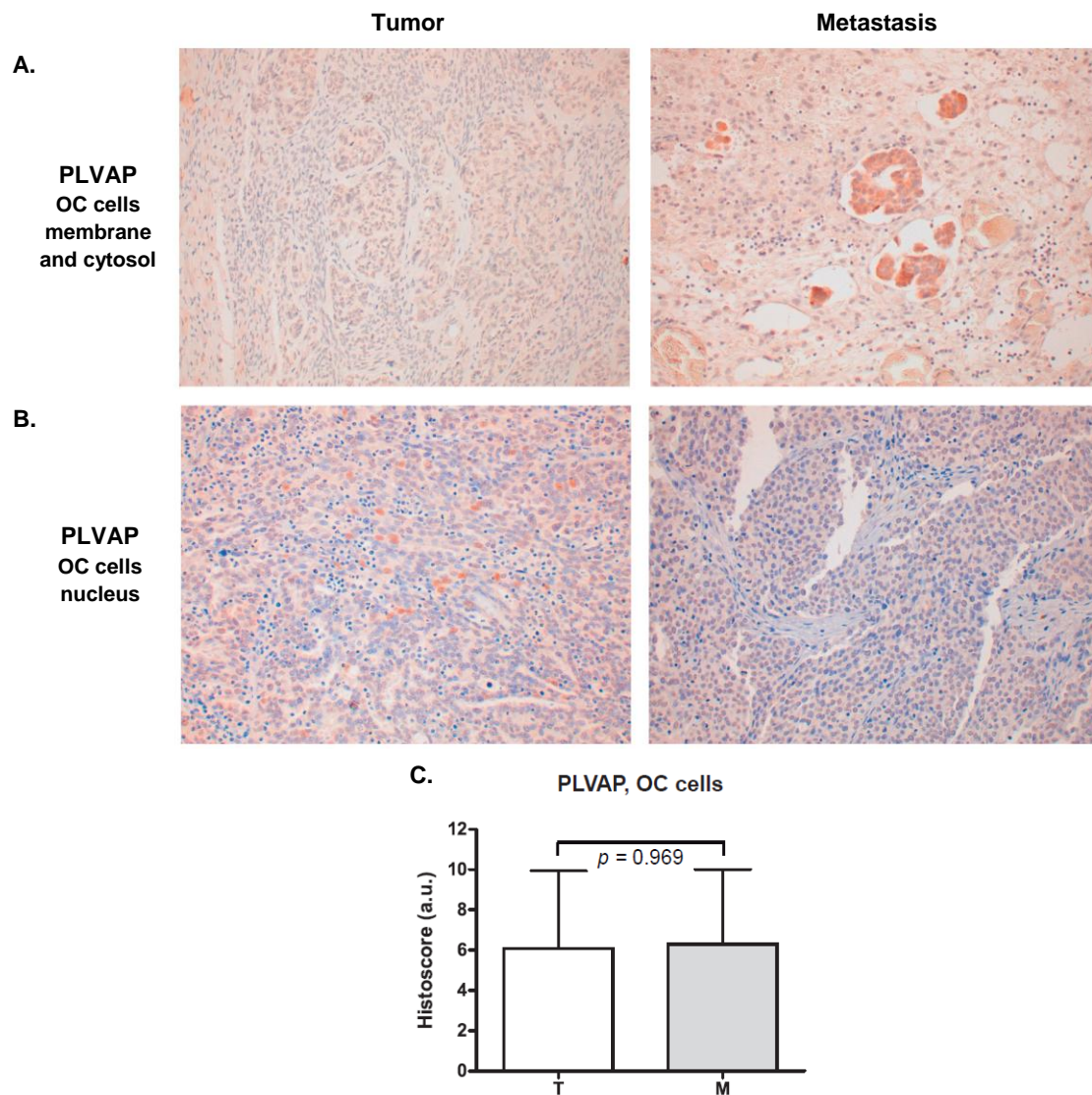


Figura 42. Imagen representativa de la tinción IHQ de PLVAP en una muestra pareada de T y M. PLVAP se detecta en la membrana y el citosol de las células tumorales de la M (A.) y en el núcleo de las células cancerosas del T (B.). Aumento original: 20X. C. Representación del promedio de los histoscores de PLVAP en células de CO de las 23 muestras pareadas de T y M analizadas.

En el caso de INHBA, se observó tinción en el citosol de las células tumorales de las muestras de T y M (Figura 43). Concretamente, en un 43,45% de los casos, la expresión era más alta en las M que en los T; en un 27,27%, la expresión entre T y M era igual; y en el 27,27% restante, la expresión era más alta en los T que en las M (Figura 40), resultando en una expresión global más elevada en M que en T (no significativa, p -valor = 0,762).

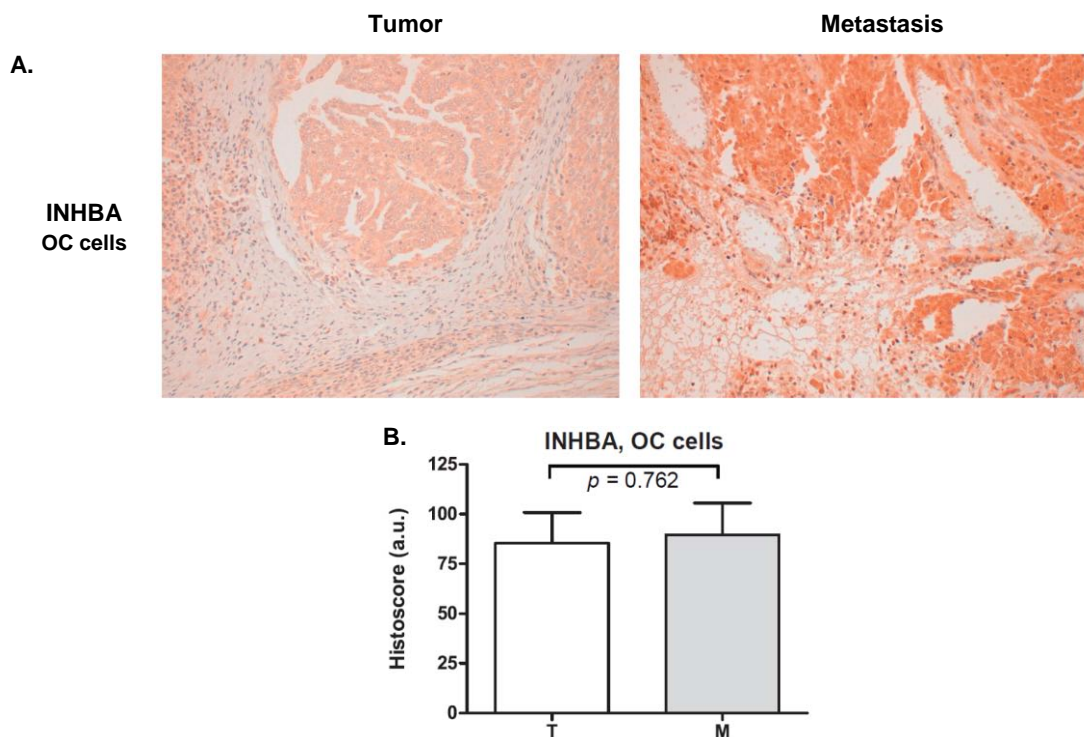


Figura 43. A. Imagen representativa de la tinción IHQ de INHBA en una muestra pareada de T y M. INHBA se detecta con mayor intensidad y extensión en las células tumorales de las M. Aumento original: 20X. **B.** Representación del promedio de los histoscores de INHBA en células de CO de las 23 muestras pareadas de T y M analizadas.

Como se observa en la Figura 44, FABP4 se encontraba significativamente más expresada en el citosol de las células tumorales de las M que en el de las células de los T; p -valor = 0,031. El 54,55% de los casos presentaba una expresión más alta en las células tumorales de M que en las células del T; en el 22,72%, la expresión era igual entre T y M; y en el 22,72% restante, la expresión era mayor en los T que en las M (Figura 40). De manera interesante, el 50% de las M mostraban una tinción del 75-100% de los vasos sanguíneos, mientras que el 50% de los T mostraban tinción en el 50-75% de los vasos (Figura 44). En global, la expresión de FABP4 era más elevada en los vasos de las M que en los vasos de los T en el 77,27% de los casos.

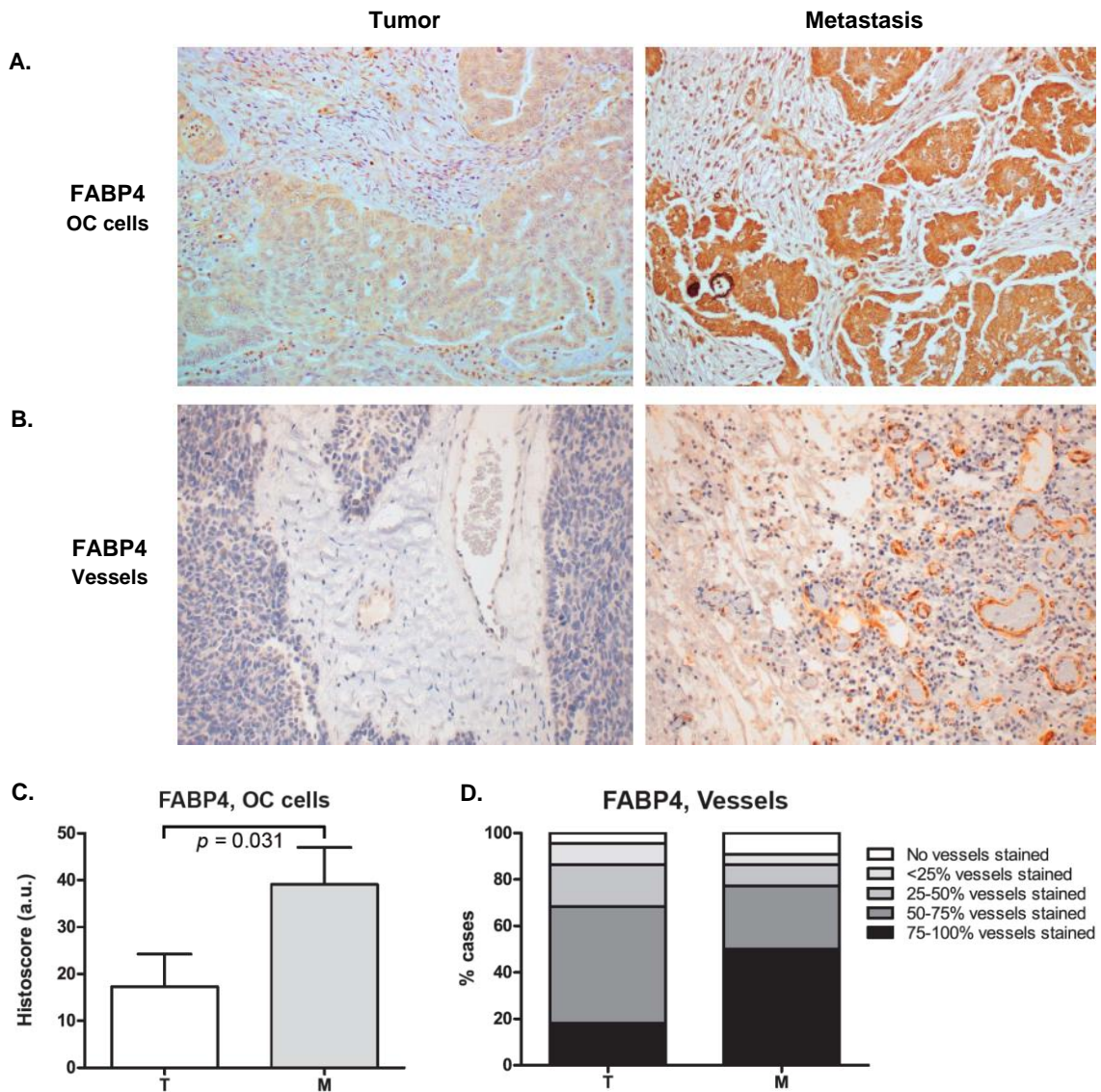


Figura 44. Imagen representativa de la tinción IHQ de FABP4 en una muestra pareada de T y M. FABP4 se detecta principalmente en células tumorales de ovario (A.) y en vasos sanguíneos (B.) de las M. Aumento original: 20X. C. Representación del promedio de los histoscores de FABP4 en células de CO de las 23 muestras pareadas de T y M analizadas. D. Representación del porcentaje de casos en el que se encuentran teñidos el 0% / <25% / 25-50% / 50-75% / 75-100% de los vasos observados en cada sección de tejido.

De los 23 casos analizados por IHQ, se detectó una expresión clara de MMP11 en el citosol de células tumorales en 2 muestras de M (Figura 45A y C), resultando en una expresión global superior en M respecto a T (no significativa, p -valor = 0,162). Sin embargo, MMP11 se encontraba sobre-expresada de manera significativa en el citosol de las células estromales (fibroblastos) de las muestras de M en comparación con el estroma de las muestras de T (p -valor = 0,013) (Figura 45B y D). El 69,57% de los casos presentaba mayor expresión de MMP11 en las células estromales de M que en las células estromales de T; en el 21,74%, la expresión entre T y M era igual; y en el 8,7%, se detectaba mayor expresión en los T que en las M (Figura 40).

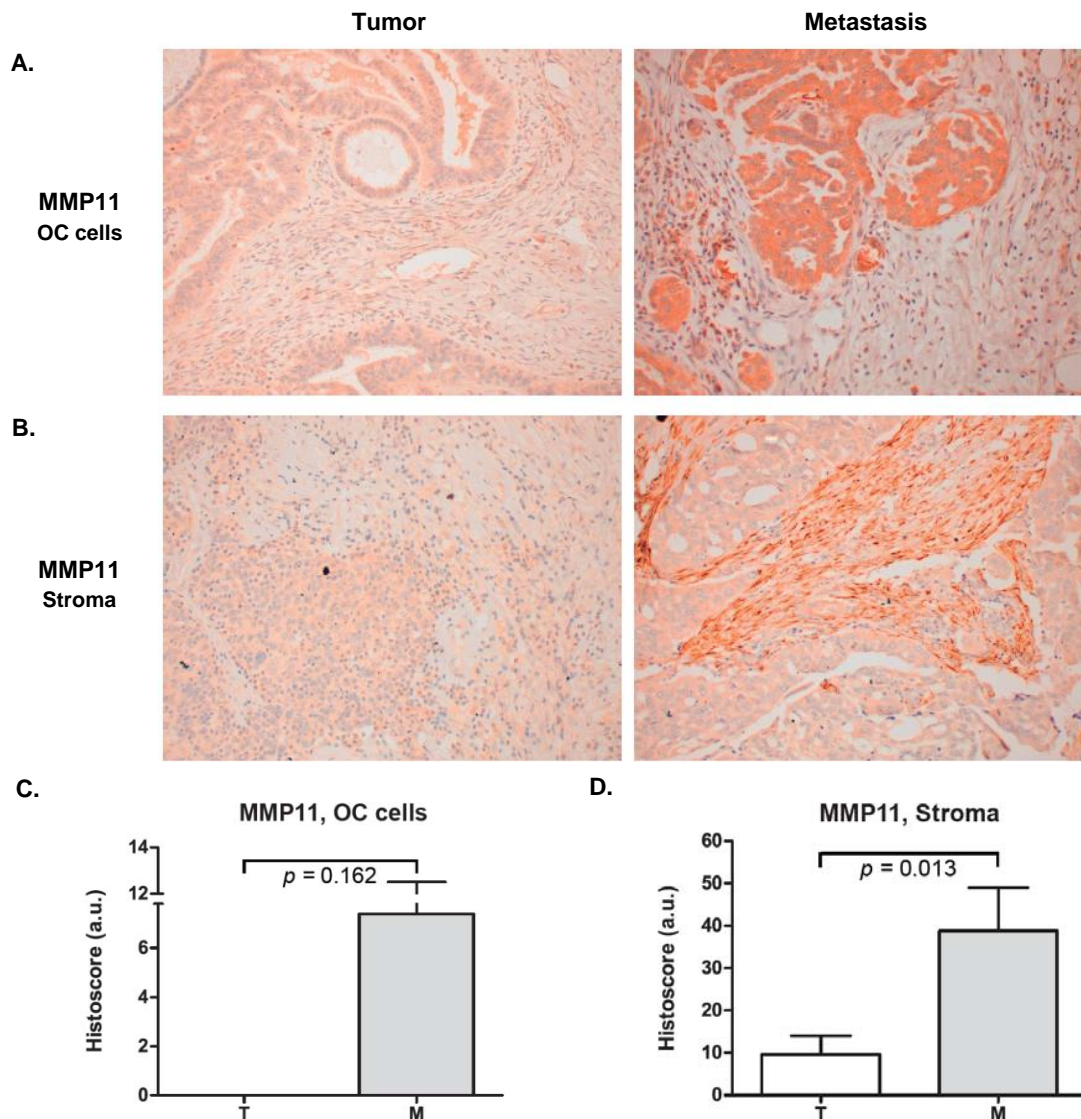


Figura 45. Imagen representativa de la tinción IHQ de MMP11 en una muestra pareada de T y M. MMP11 se detecta principalmente en células tumorales (A.) y en fibroblastos estromales (B.) de las M. Aumento original: 20X. Representación del promedio de los histoscores de MMP11 en células tumorales (C.) y en células estromales (D.) de las 23 muestras pareadas de T y M analizadas.

Tras los resultados positivos de los candidatos FABP4 y MMP11 a nivel de IHQ, y con la finalidad de confirmar la sobre-expresión en M vs T, se llevó a cabo un inmunoblot de 3 muestras independientes de T y M procedentes de pacientes con HGSOC en estadio avanzado (muestras de T: pacientes 5, 7 y 12; muestras de M: pacientes 4, 9 y 13. Ver apartado 3.2.1. *Pacientes incluidas en el estudio, Tabla 15*). Como se observa en la Figura 46, ambas proteínas se encontraban sobre-expresadas en M respecto a T de manera significativa; la expresión en los T era nula o débil, mientras que la expresión en las M era elevada en todas las muestras analizadas. Cabe destacar que la forma activa de MMP11 (47 kDa) se expresaba con mayor intensidad que la forma latente (60 kDa).

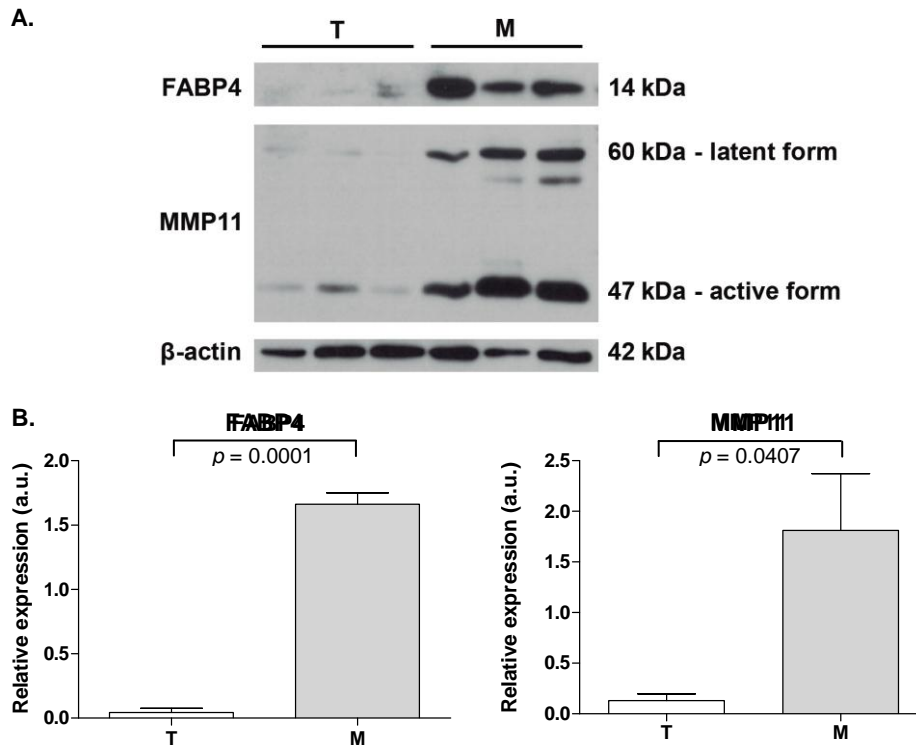


Figura 46. Confirmación mediante inmunoblot de la expresión de FABP4 y MMP11 en 3 muestras no pareadas de tejido de T y M – muestras de T: pacientes 5, 7 y 12; muestras de M: pacientes 4, 9 y 13 – (A.) y cuantificación de los niveles de FABP4 y MMP11 relativizados a la expresión de β -actina (control de carga) – en el caso de MMP11 se representa la suma de la forma activa y la forma latente (B.).

4.2.6. Presencia de FABP4 y MMP11 en plasma de pacientes con cáncer de ovario

Para estudiar, además del papel en la diseminación del CO, el potencial uso de FABP4 y MMP11 en el diagnóstico del CO, se evaluó mediante inmunoblot la presencia de dichos candidatos en el plasma derivado de una nueva cohorte de 36 pacientes con HGSOE en estadio avanzado (pacientes 47 a 82, ver apartado 3.2.1. *Pacientes incluidas en el estudio, Tabla 15*). Como se observa en la Figura 47, FABP4 se detectó en 31 de los 36 casos (86,11%), mientras que la forma activa de MMP11 (47 kDa) se observó en la totalidad de los casos analizados (100%).

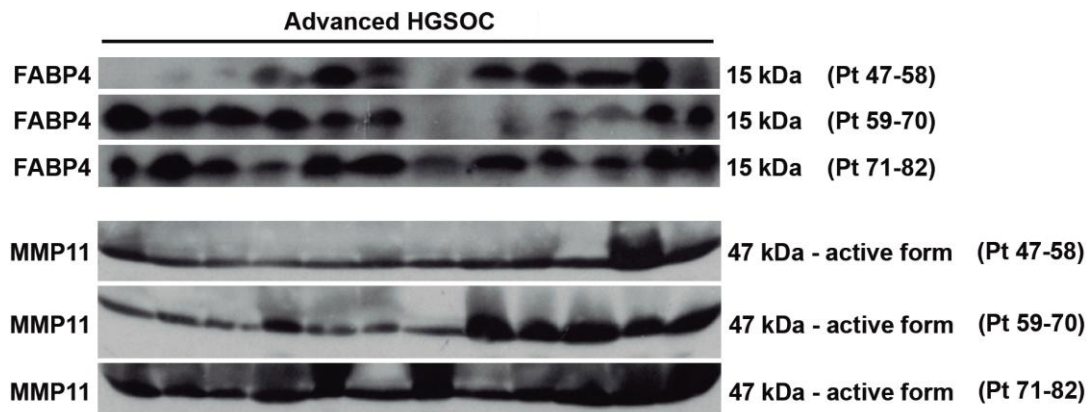


Figura 47: Análisis de la presencia de FABP4 y MMP11 en plasma derivado de 36 pacientes con HGSOE en estadio avanzado mediante inmunoblot.

Tras confirmar que ambos candidatos, FABP4 y MMP11, se detectaban en el plasma de pacientes de HGSOC en estadio avanzado, seguidamente se consideró comparar la expresión con la de plasma de pacientes control. Concretamente, se comparó la expresión de los candidatos en el plasma de 4 pacientes con HGSOC en estadio avanzado (pacientes 83 a 86, ver apartado 3.2.1. *Pacientes incluidas en el estudio, Tabla 15*) con la expresión en plasma de 5 pacientes que presentaban masas ováricas anexiales sospechosas de malignidad – finalmente diagnosticadas como torsión ovárica o cistoadenomas benignos – (pacientes 87 a 91, ver apartado 3.2.1. *Pacientes incluidas en el estudio, Tabla 15*). Como se observa en la Figura 48, tanto FABP4 como MMP11 se sobre-expresaban de manera significativa en el plasma de pacientes con CO en comparación con el plasma de las pacientes control (p -valor = 0,05 y p -valor = 0,0003, respectivamente).

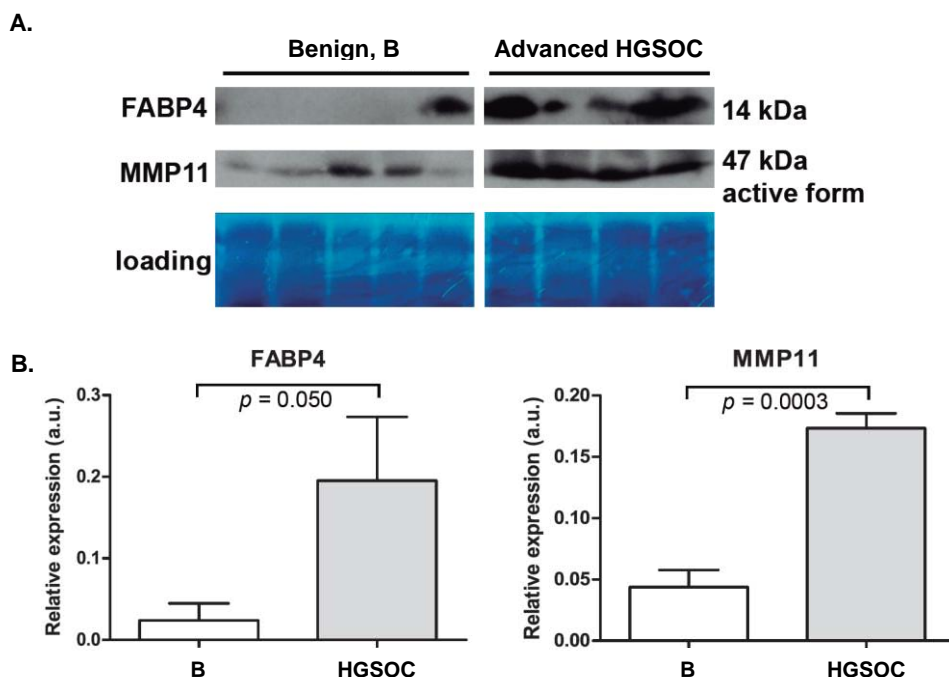


Figura 48. Análisis mediante inmunoblot de la expresión de FABP4 y MMP11 en plasma de 5 pacientes con masas anexiales benignas y plasma de 4 pacientes con HGSOC en estadio avanzado (A.) y cuantificación de los niveles de FABP4 y MMP11 relativizados a la carga de proteína en el inmunoblot (B.).

En resumen, los resultados preliminares obtenidos en una cohorte limitada de pacientes con HGSOC y pacientes control sugieren la utilidad de FABP4 y MMP11 en la práctica clínica para mejorar el diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, es necesario ampliar la cohorte de pacientes analizadas para poder confirmar dichos resultados y ampliarlo a otro tipo de ensayos (ver apartado 5. *Discusión*).

Los resultados de este estudio se han recogido en un manuscrito que será sometido próximamente a una revista científica para ser evaluado y aceptado para su publicación.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. SECCIÓN I: Optimización del procedimiento de aislamiento de exosomas presentes en el aspirado uterino para la futura identificación de nuevos marcadores asociados al cáncer de ovario

Actualmente, el diagnóstico precoz del CO todavía representa un reto debido a la inespecificidad de los síntomas de esta enfermedad y a la falta de técnicas de cribado sensibles y específicas (293). Únicamente el 15% de los casos de CO son detectados en estadios iniciales, cuando el tumor se encuentra confinado en el ovario (12); el sistema de diagnóstico actual detecta la enfermedad mayoritariamente en estadios avanzados, resultando en una supervivencia a 5 años del 28% que sitúa el CO en la quinta causa de muerte por cáncer en mujeres del mundo occidental (11,12,95). Por consiguiente, existe la necesidad clínica de encontrar e incorporar nuevos biomarcadores que solos, o en combinación con las técnicas de diagnóstico actuales, permitan detectar el CO cuando ésta todavía no ha diseminado en el peritoneo, ya que el CA125 sólo se encuentra elevado en el 50% de los casos de CO en estadios iniciales (90). El diagnóstico precoz del CO resultaría en un incremento substancial de la resecabilidad del tumor y procedimientos quirúrgicos menos radicales. En última instancia, esto permitiría mejorar el pronóstico de la enfermedad, mejorando la supervivencia a 5 años hasta un 92% (12).

Actualmente, la sangre es la plataforma más utilizada para la identificación y el desarrollo de marcadores tumorales de manera rutinaria, ya que es una muestra biológica poco invasiva. En las últimas tres décadas, se han desarrollado una gran multitud de estudios que han detectado potenciales biomarcadores de CO en la sangre, pero la gran mayoría de ellos no han sido trasladados a la práctica clínica debido a que no son suficientemente sensibles ni específicos (294,295). La búsqueda de biomarcadores en sangre representa un gran desafío debido al elevado rango dinámico asociado a la concentración de proteínas. El plasma presenta una pequeña proporción de proteínas liberadas específicamente por el tejido tumoral, proteínas resultantes de cambios estructurales en el microambiente tumoral y/o marcadores de la respuesta inmunológica, así como células tumorales en circulación. Estas moléculas y/o células asociadas al tumor quedan diluidas en la corriente sanguínea en comparación con la gran mayoría de moléculas plasmáticas, que no derivan directamente del tumor, sino que son moléculas que representan el estado del organismo a nivel sistémico (99,294,295).

Recientemente, los biofluidos proximales al órgano afectado son considerados muestras con potencial para el descubrimiento de nuevos biomarcadores. En el caso del CO, el líquido ascítico representa una fuente atractiva de biomarcadores para la mejora del diagnóstico del CO en estadio avanzado, ya que se desarrolla y acumula en pacientes con diseminación peritoneal, baña células cancerosas no adherentes y células mesoteliales adyacentes, así como también contiene factores de crecimiento y factores de supervivencia (296). En las últimas dos décadas se han realizado estudios a partir de líquido ascítico que evidencian las diferencias moleculares entre pacientes con CO y pacientes sanas, sugiriendo el potencial del uso de la ascitis para predecir la presencia de CO (297). Sin embargo, de manera similar a la sangre, el líquido ascítico también presenta proteínas que difieren mucho en términos de rango dinámico, por lo que requiere la aplicación de técnicas de fraccionamiento para poder detectar las proteínas de baja abundancia (298). Otro inconveniente asociado al líquido ascítico es que no podría ser utilizado en el diagnóstico precoz del CO – la ascitis maligna se desarrolla principalmente en estadio avanzado –, o en la monitorización de la enfermedad – la extracción de ascitis es invasiva, requiere habitualmente la punción o la intervención quirúrgica (299).

Como alternativa a la sangre y el líquido ascítico, en este estudio proponemos el AU. El AU, biopsia endometrial que refleja el tracto genital femenino, representa una fuente de biomarcadores próxima al tumor ovárico. Debido a su localización, el AU probablemente contiene moléculas más específicas en comparación con la sangre, directamente relacionadas con el carcinoma (101,104). En el AU, se encontrarían ausentes la gran mayoría de moléculas presentes en el flujo sanguíneo que derivan del estado general del organismo – no representativas del tumor (100). A diferencia del líquido ascítico, la obtención del AU es menos invasiva y podría representar estados iniciales del desarrollo de la enfermedad. Por consiguiente, el AU emerge como una nueva muestra biológica más dirigida y poco invasiva para la detección del CO. Asimismo, el hecho de que sea una muestra poco estudiada anteriormente representa un reto y riesgo científico, pero por otro lado, supone una ventaja competitiva frente a la protección inventiva de biomarcadores para ser trasladados a la práctica clínica.

Existen estudios que apoyan el análisis de la cavidad uterina para detectar lesiones malignas extra-uterinas, ya que demuestran que las células cancerosas procedentes del ovario y las trompas de Falopio pueden ser recogidas en el útero. Esto es debido a que la superficie ovárica, las trompas de Falopio y la cavidad uterina conforman un espacio común (300). En el marco del CO seroso, la forma de desarrollo de las papilas puede impulsar a las células tumorales a descamarse del ovario y extenderse hacia la cavidad uterina (106). Seguidamente, el movimiento peristáltico de las trompas de Falopio y la presión negativa de la cavidad uterina hace posible el transporte de las células malignas exfoliadas del ovario (o de la lesión pre-maligna STIC, presente en los oviductos según la teoría dualista) hasta la cavidad uterina (107,301). Por otra parte, teniendo en cuenta la similitud del carcinoma seroso papilar uterino con el CO seroso, recientemente se postula que este último podría provenir de la lesión precursora del carcinoma intraepitelial del endometrio (CIE). Esto indicaría que el origen del CO no se encuentra en la superficie epitelial ovárica, sino en la cavidad uterina (108). En caso de que esta teoría fuera cierta, el estudio de la cavidad uterina y por consiguiente, el uso del AU, estaría más que justificado para detectar el CO.

A día de hoy se han realizado diferentes estudios que acreditan la presencia de células malignas de CO en la cavidad uterina (302). En general, la presencia de células de CO en citologías cervico-vaginales se ha detectado en aproximadamente el 20-30% de los casos de CO analizados (303,304). En cuanto a las citologías endometriales obtenidas con el dispositivo japonés de Masubuchi, la presencia de células de CO se ha observado en el 15-53% de los casos – 15,8%, Fujimoto et al. (303); 23,7%, Saji et al. (106); 26,2%, Jobo et al. (107); 27,7%, Kato et al. (305); 41,9%, Takashina et al. (306); 53,1%, Ohno et al. (304). Estos estudios presentan un poder predictor bajo del CO, ya que sólo se basan en la detección de células malignas del ovario para afirmar la presencia de la enfermedad. Pero de manera interesante, el CO se pudo detectar incluso en ausencia de invasión endometrial (107,303,306), así como en pacientes que no presentaban sintomatología aparente (106). En algunos casos también se observó que el valor positivo de la citología endometrial era mayor en estadios avanzados y en presencia de ascitis maligna (107).

Por otro lado, las investigaciones de Kinde et al. (105) y Maritschnegg et al. (300) se basan en el estudio molecular del ADN contenido en especímenes endometriales para detectar el CO.

En el estudio de Kinde et al., se realizó un análisis mutacional del ADN contenido en muestras cervicales de pacientes con CO obtenidas con el test Papanicolaou (105). Los resultados del estudio demostraban que las células o fragmentos celulares procedentes del CO pueden ser detectados en el cérvix y que el estudio del perfil molecular a nivel genómico puede proporcionar información de interés para mejorar el diagnóstico del CO. En base a las mutaciones detectadas en este tipo de muestra, se pudieron detectar el 41% de los casos de

CO. Kinde et. sugería que el uso de una cánula pequeña que se pudiera introducir en la cavidad uterina – un instrumento como la *Pipelle de Cornier* que utilizamos en nuestro estudio – permitiría recoger una biopsia endometrial que podría aumentar en gran medida la sensibilidad (105), pues la muestra se enriquecería en células procedentes del ovario (307).

De manera similar, el estudio de Maritschnegg et al. apoya el hecho de que es posible detectar los carcinomas derivados de los conductos de Müller – CO y cáncer de endometrio – a través del estudio molecular de la cavidad uterina (300). En este caso se estudió mediante secuenciación masiva la presencia de determinadas mutaciones (AKT1, APC, BRAF, CDKN2A, CTNNB1, EGFR, FBXW7, FGFR2, KRAS, NRAS, PIK3CA, PIK3R1, POLE, PPP2R1A, PTEN y TP53) en el ADN contenido en lavados de la cavidad uterina de pacientes con CO. Con este método se detectó la presencia de CO en el 80% de las pacientes reclutadas en el estudio, incluso se identificó un caso que no había sido detectado con las técnicas de diagnóstico tradicionales (CA125 y ecografía transvaginal) (300).

De manera importante, tanto con el test de Papanicolaou (Kinde et al.) como con el de lavado uterino (Maritschnegg et al.) se han podido detectar estadios iniciales del CO, lo cual indica que esta estrategia es apta para el diagnóstico precoz de la enfermedad. Probablemente, el incremento en la sensibilidad del lavado uterino en comparación con el test de Papanicolaou es debido a que la cavidad uterina contiene mayor número de células malignas procedentes del ovario en comparación con el cérvix (105). El inconveniente del lavado uterino es que la muestra se encuentra diluida por la solución salina que se aplica en el útero con esta técnica. Así, el AU – biopsia endometrial que se obtiene por aspiración y que gracias a su localización, contiene componentes de las trompas de Falopio y del ovario (100) – podría representar las alteraciones moleculares que tienen lugar en el tejido ovárico. Teniendo en cuenta que el perfil de expresión génica del AU correlaciona con el del tejido del cáncer de endometrio (101), creemos que el estudio de los cambios genéticos y proteómicos del CO también podrían verse reflejados en el AU.

Un inconveniente del AU es su complejidad, pues contiene moléculas de alta abundancia procedentes de la sangre y otros componentes que podrían enmascarar potencialmente la detección de moléculas menos abundantes (101,104). Como solución a esta complejidad, en este trabajo proponemos los exosomas presentes en el AU como una nueva fuente de biomarcadores de enfermedades del tracto genital femenino como el CO, ya que enriquecen la muestra en proteínas de baja abundancia con significancia fisiopatológica.

Los exosomas son vesículas extracelulares que son secretadas al medio tras la fusión de los MVBs con la membrana plasmática (112), llegando a los biofluidos proximales. Los exosomas presentan patrones moleculares específicos que reflejan las células de origen (111). Así, los exosomas presentes en fluidos proximales al ovario, como el AU, podrían representar un reservorio de biomarcadores del CO. Los exosomas tienen un gran potencial en el diagnóstico no invasivo del CO por distintos motivos: i) son portadores de información específica derivada de las células tumorales de origen; ii) su producción se encuentra aumentada en pacientes con CO; iii) su contenido puede correlacionar con el estadio tumoral y el pronóstico; y, iv) el contenido exosomal es altamente estable por la bicapa lipídica que los constituye (189,308).

En comparación con los biomarcadores de fluidos biológicos, los biomarcadores procedentes de exosomas presentan mayor estabilidad – debido a la protección de la membrana exosomal –, lo cual se traduciría en una mayor especificidad y sensibilidad (309). Además, se ha descrito que los exosomas procedentes de pacientes de CO presentan una composición molecular (proteína, miARNs y glicanos) diferencial cuando se compara con la de exosomas de pacientes sin enfermedad (195,273). Otros estudios han demostrado la presencia de una gran cantidad de exosomas en líquido ascítico y plasma en comparación con pacientes sanas, y dicha

abundancia se ha asociado a la presencia de metástasis en la cavidad peritoneal (174,273). Asimismo, se ha observado que unos meses antes del aumento de los niveles séricos de CA125, tiene lugar un incremento importante en la producción de exosomas, lo cual sugiere que estas vesículas podrían ser una estrategia apropiada para la detección precoz del CO (310). Inicialmente, los exosomas secretados se encuentran localizados alrededor del tumor ovárico; luego, se extienden progresivamente con el fluido peritoneal, y de aquí pasan al flujo sanguíneo atravesando las barreras endoteliales (311).

Por consiguiente, debido a la proximidad de la cavidad uterina con el ovario, hipotetizamos que el AU puede representar una muestra próxima al tumor ovárico en la cual se pueden detectar exosomas derivados del mismo. Además, teniendo en cuenta que las células malignas del ovario pueden ser recogidas por las trompas de Falopio y llegar hasta la cavidad uterina, los exosomas derivados de las células tumorales también podrían ser transportados hasta este punto. De manera similar a otras superficies mucosas, puesto que la superficie endometrial se encuentra recubierta por un glicocáliz que atrae y une células, factores secretados y moléculas bioactivas (301), es probable que vesículas extracelulares como los exosomas también se adhieran con facilidad.

En el marco del CO, no existen estudios donde se analice la composición molecular de exosomas derivados de muestras de la cavidad uterina para la detección de la enfermedad. Sin embargo, Liu et al. demuestra la utilidad de los exosomas en la identificación de marcadores de patologías del tracto genital femenino (312). En este estudio se observó un incremento significativo del miARN-21 y el miARN-146a en exosomas del lavado cervicovaginal de pacientes con cáncer de cérvix en comparación con exosomas de pacientes sanas.

Aunque la investigación en EVs ha aumentado de manera significativa en la última década, aún no existe un consenso en los métodos de aislamiento de EVs por parte de la comunidad científica. Por otro lado, el rendimiento de extracción y la pureza obtenida pueden variar en función de la muestra de partida; concretamente hay variabilidad dependiendo del origen celular, la composición proteica/lipídica, el contenido intraluminal y el grado de agregación de componentes (149). Por todo ello es necesario adaptar el procedimiento de aislamiento de EVs a cada fluido biológico.

El **objetivo del estudio** presente era **establecer las bases del aislamiento de las EVs a partir del AU** para favorecer el descubrimiento de nuevos marcadores moleculares asociados al CO. Concretamente, comparamos tres procedimientos basados en la ultracentrifugación (los protocolos *Estándar*, *Filtración* y *Sacarosa*), y realizamos una caracterización extensiva de las EVs describiendo su morfología, tamaño y enriquecimiento en marcadores comunes de exosomas para confirmar la utilidad y viabilidad del procedimiento.

El **protocolo Estándar de ultracentrifugación** permite obtener preparaciones de EVs relativamente puras y ha sido ampliamente utilizado para aislar EVs a partir de múltiples fluidos corporales, con modificaciones específicas según la muestra de partida (113,313). El tipo, la cantidad y la calidad de vesículas aisladas con la ultracentrifugación son sensibles a distintos factores que incluyen: la fuerza g, el tipo de rotor (de ángulo fijo o basculante), el ángulo de sedimentación del rotor, el radio de la fuerza centrífuga, la eficiencia en la precipitación (factor de compensación, o factor *k* del rotor) y la viscosidad (158,159). La viscosidad del biofluido es uno de los factores que introduce más variabilidad en el rendimiento de extracción de EVs, pues se ha visto que a mayor viscosidad del fluido de partida, mayor fricción interna de las EVs (314) y, en consecuencia, mayor dificultad de sedimentación y menor es la eficiencia (159,314). Por lo general, la viscosidad de los fluidos biológicos es superior a la del medio de cultivo celular. La fracción fluida del AU presenta viscosidad variable dependiendo del estado del endometrio, el fluido tubárico, las secreciones de la cavidad uterina y la presencia/ausencia de

lesiones en el tracto genital en el momento de recogida de la muestra. Por consiguiente, previamente a la ultracentrifugación, diluimos la fracción fluida de los AUs con PBS 1X hasta un volumen total de 25 mL para corregir las diferencias de viscosidad y obtener una fluidez similar en todos los casos, tal y como recomienda la ISEV (158).

Con la ultracentrifugación precipitan complejos/agregados proteicos, partículas lipoproteicas y otros residuos membranosos, juntamente con las EVs (315). Para retirar parte de estos contaminantes, es necesario resuspender las EVs en PBS tras la ultracentrifugación a 100.000 g y repetir la centrifugación (lavado) (158,315). El inconveniente es que la repetición múltiple de la ultracentrifugación puede llegar a dañar las vesículas aisladas, reduciendo su calidad, y también puede reducir el rendimiento de extracción y la reproducibilidad (158,162). Por este motivo, únicamente realizamos un lavado; no aplicamos más de dos ultracentrifugaciones en todo el procedimiento.

El **segundo protocolo que evaluamos en este estudio fue el de Filtración**, que permite descartar directamente todas aquellas vesículas de tamaño superior a 200 nm. Por último, el **tercer protocolo que estudiamos fue el de Sacarosa**, donde las EVs precipitadas en la ultracentrifugación fueron posteriormente aisladas en base a su densidad característica (1,13-1,19 g/mL) con una solución de sacarosa de dicha densidad (315).

Con la finalidad de confirmar la presencia de EVs, la ISEV recomienda caracterizar las preparaciones de EVs de manera individual mediante al menos dos técnicas analíticas distintas. Para ello, en este estudio utilizamos la microscopía electrónica y el análisis de seguimiento de nanopartículas (113,158).

Está establecido que la **microscopía electrónica de transmisión** proporciona evidencia directa de la presencia de estructuras vesiculares y permite definir su morfología y su tamaño (119). En nuestro estudio podía observarse claramente la bicapa lipídica característica que forma las EVs y la morfología esférica esperada. Además, se podía intuir muy levemente una forma de copa – artefacto característico de esta técnica (154,316). En este estudio, observamos claramente que el tamaño de las EVs era inferior al de las MVs. El material que se encontraba alrededor de las EVs podrían ser complejos proteicos, ya que comparten parámetros biofísicos con las EVs – el tamaño y las propiedades de sedimentación (317) – y sus niveles suelen ser elevados en fluidos corporales (158). De hecho, es conocido que las preparaciones de EVs derivadas de fluidos biológicos presentan mayor cantidad de agregados proteicos en comparación con otras muestras de partida como el cultivo celular (318). Acorde con la bibliografía (159), las preparaciones de EVs de AU obtenidas con el protocolo *Estándar* contenían agregados proteicos más densos que las EVs aisladas con protocolos más refinados como el de *Filtración* o el de *Sacarosa*.

En referencia a la determinación del tamaño, el **análisis de seguimiento de nanopartículas** (NTA) ofrece ventajas frente a la microscopía electrónica: permite tener una visión global de la preparación de EVs porque proporciona la distribución de las vesículas según su tamaño haciendo un análisis múltiple en pocos minutos; y además, puede determinar la concentración de las nanopartículas en la muestra. En el caso del protocolo *Estándar*, la moda de las EVs era ligeramente superior que en los protocolos *Filtración* y *Sacarosa*. En el protocolo *Filtración*, la moda de las vesículas era inferior probablemente por el descarte de MVs pequeñas (~ 200 nm), y porque los agregados de EVs y las EVs de gran tamaño (~ 200 nm) quedaban retenidas en el filtro y/o se lisaban al aplicar presión positiva para atravesarlo (316). En el protocolo *Sacarosa*, la moda de las EVs debía de ser menor porque las vesículas con densidad superior a 1,13-1,19 g/mL – de tamaño mayor al tamaño medio de las EVs – quedaban excluidas de la solución. Por otra parte, la distribución de las EVs en base al tamaño era uniforme en el caso de los protocolos *Estándar* y *Filtración*, pero heterogénea en el caso del protocolo *Sacarosa*.

Esto podría ser explicado por la densidad aumentada de la solución de sacarosa (1,13-1,19 g/mL) utilizada en este procedimiento.

En cuanto a la concentración de vesículas, dado que los procedimientos sencillos proporcionan rendimientos más altos que los protocolos más laboriosos (incluyen más pasos en el protocolo) (162), la concentración de EVs más alta se consiguió con el protocolo *Estándar*, seguida del protocolo *Filtración* y del protocolo *Sacarosa*.

Además de la caracterización de las EVs a nivel de morfología y tamaño, la ISEV también recomienda realizar una caracterización molecular, mostrando la **presencia de al menos tres marcadores** que se encuentren altamente enriquecidos en exosomas a nivel de proteína, como son CD9, CD63, CD81 o TSG101 (113). Para ello, se evaluó mediante inmunoblot la presencia de estos marcadores. Referente a las tetraspaninas (CD9, CD63 y CD81), aunque son unos de los marcadores exosomales más comúnmente aceptados porque indican el origen endosomal (136) y en nuestro estudio las detectamos principalmente en EVs, también observamos su presencia en MVs. Si bien este hecho podría ser debido a la co-precipitación de exosomas de tamaño reducido a 10.000 g, también podría indicar que no todas las tetraspaninas son específicas de EVs – lo cual es apoyado por algunos estudios recientes (149,316). En este estudio, la tetraspanina más inespecífica fue CD81, seguido de CD9. Por el contrario, de acuerdo con la bibliografía (149), CD63 fue la tetraspanina que presentaba mayor especificidad, ya que la detección en EVs era muy intensa y, en MVs, muy leve.

Para tener una idea de la pureza de las preparaciones de EVs obtenidas con cada protocolo, determinamos el promedio de expresión de las tetraspaninas. Aunque teóricamente el aislamiento de EVs en sacarosa permite eliminar algunos contaminantes y, por lo tanto, se esperaría que la pureza de las preparaciones fuera más alta que la obtenida con la ultracentrifugación convencional (162,316), en este estudio, con el colchón de sacarosa detectamos niveles bajos de marcadores típicos de exosomas. Este hecho concuerda con otros estudios que defienden que el procedimiento de sacarosa es útil para obtener preparaciones de EVs puras a partir de cultivos celulares, pero no es apropiado para fluidos biológicos como el plasma (162). En nuestro estudio, la pureza más alta referente a la expresión de tetraspaninas fue conseguida con el protocolo *Estándar*, seguido del de *Filtración* y el de *Sacarosa*.

La expresión de TSG101 y Flotilina-1 refleja las distintas vías de biogénesis de MVs y EVs. De acuerdo con el origen endosomal al que se ha asociado TSG101 (126,133,158), esta proteína se observó únicamente en EVs. Esto permite confirmar de manera contundente que las preparaciones de EVs aisladas de AU con la ultracentrifugación se encuentran principalmente enriquecidas en exosomas. De manera similar, Flotilina-1 era prácticamente indetectable en MVs, apoyando la presencia específica en EVs descrita previamente (319).

Anexina V, un marcador asociado a las MVs (272), también fue detectado en EVs del protocolo *Estándar*. Aunque este hecho podría apoyar la presencia de Anexina V en EVs que han descrito otros grupos (115), también sugiere que las MVs de menor tamaño pudieron precipitar a 100.000 g. Esto explicaría la ausencia de Anexina V en EVs del protocolo de *Filtración*, pues las MVs más pequeñas (~ 200 nm) habrían quedado retenidas en el filtro. Y por otro lado, su ausencia en EVs aisladas con el protocolo *Sacarosa* podría ser explicada por la alteración de la membrana exosomal que provoca la misma sacarosa, pues se ha visto que esta solución puede resultar en la disociación de proteínas que se unen normalmente a componentes de superficie exosomal (320). De ser así, la sacarosa podría impedir la interacción de la Anexina V con la fosfatidilserina presente en la membrana de los exosomas y por ello, no observamos Anexina V en EVs aisladas con este protocolo.

Haptoglobina es una proteína soluble altamente abundante en sangre que suele formar complejos proteicos con otras proteínas sanguíneas (321). Tal y como se esperaba,

observamos su presencia en la FS del AU, pues éste presenta contaminación de sangre. También detectamos Haptoglobina en la fracción de MVs, porque probablemente debía de formar agregados de gran tamaño que sedimentaban a 10.000 g. Este hecho confirma que las preparaciones de este tipo de vesículas extracelulares contiene múltiples moléculas contaminantes como complejos proteicos de gran tamaño (> 200 nm) (115,317). En el caso de la fracción de EVs, Haptoglobina fue detectada solamente en el protocolo *Estándar*, mientras que no se detectó expresión ni en el protocolo de *Filtración* (probablemente los complejos debían de quedar retenidos en el filtro), ni en el protocolo de *Sacarosa* (posiblemente los agregados debían de tener una densidad diferente y quedaban al margen del colchón de sacarosa).

En relación a la reproducibilidad de los protocolos de aislamiento testados, el procedimiento *Estándar* fue el más reproducible, pues la concentración de EVs, y más especialmente la expresión de tetraspaninas, mostraban poca variabilidad en comparación con los otros protocolos. El procedimiento menos reproducible resultó ser el de *Filtración*, pues éste presentaba la mayor desviación estándar en cuanto a concentración de EVs y expresión de tetraspaninas. Finalmente, el protocolo *Sacarosa* presentaba la menor variabilidad en términos de concentración de EVs y una variabilidad intermedia en cuanto a expresión de marcadores exosomales. Por otra parte, el protocolo *Estándar* fue el protocolo con el que se obtuvo mayor rendimiento de extracción de EVs, seguido del protocolo *Filtración* y *Sacarosa*. En conjunto, estos resultados indican que la **reproducibilidad** y el **rendimiento** se encuentran estrechamente ligados al número de pasos de cada protocolo, pues el protocolo *Estándar* es el que presentaba menor número de pasos, y es el que resultó ser más reproducible y productivo.

A pesar de las propiedades que caracterizan los exosomas, cada vez hay más evidencias de que existen distintos tipos de vesículas en los fluidos corporales que comparten algunas de estas características (149), lo cual hace mucho más compleja la separación de los exosomas del resto de componentes de la muestra. A día de hoy, no se ha conseguido obtener una preparación de vesículas que contenga una sola población de vesículas extracelulares; no es posible separar empíricamente de manera absoluta las EVs de otras poblaciones de vesículas extracelulares como las MVs (149,154). Esto es debido al solapamiento parcial de la morfología, el tamaño y la densidad de los exosomas con otras partículas vesiculares, y a que tampoco se conocen marcadores totalmente específicos de cada tipo de población (114,149,158).

Cabe destacar que la **elección del método de aislamiento de EVs** debe ser determinada en función de la meta experimental establecida (113). Nuestro objetivo principal era determinar el método más apropiado de aislamiento de EVs para el futuro descubrimiento de nuevos biomarcadores asociados al CO. En base a lo anterior, aunque los tres procedimientos de aislamiento de EVs evaluados en este estudio permiten extraer EVs a partir de AU, **seleccionamos el protocolo Estándar** como aquel más adecuado porque la expresión de marcadores asociados a exosomas, el rendimiento de extracción de EVs y la reproducibilidad del procedimiento eran más elevados en comparación con los protocolos *Filtración* y *Sacarosa*. Además, como ventaja adicional, el coste y el tiempo empleados en el procedimiento *Estándar* eran menores, lo que permite plantear estudios de descubrimiento de biomarcadores con un número de muestras elevado. No obstante, somos conscientes de que las preparaciones de EVs obtenidas con el protocolo *Estándar* también puedan contener MVs de tamaño pequeño (~ 200 nm) y/u otros contaminantes – agregados proteicos. Aunque su presencia podría afectar a la búsqueda de biomarcadores en etapas de descubrimiento, dichas contaminaciones podrían ser descartadas mediante el uso de controles adecuados o la validación posterior, pues este tipo de estudios permite cierta flexibilidad en la pureza y la calidad de las preparaciones de EVs porque tienen como objetivo final la distinción entre distintos grupos de pacientes a partir del

perfil global de las muestras (322). En este sentido, la pureza de las preparaciones de EVs obtenida con el procedimiento *Estándar* era apropiada, ya que se detectaron los niveles más elevados de marcadores exosomales, así como la morfología esférica característica y el tamaño esperado (20-170 nm).

Tras seleccionar el procedimiento de aislamiento más apropiado para aislar EVs a partir de AU, **confirmamos la robustez del protocolo con 6 muestras de AUs individuales**. El tamaño de las EVs aisladas resultó estar comprendido entre 120 y 160 nm. La concentración de EVs era variable entre las muestras, aunque el número total de EVs aisladas correlacionaba con el volumen inicial de fracción fluida del AU de la que procedían. Curiosamente, esta proporcionalidad no sucedía en el caso de las MVs. Esto puede ser debido al alto contenido de otras moléculas contaminantes de tamaño similar entre 100 y 1.000 nm, lo cual provocaría la detección de falsos positivos en el NTA. Por otro lado, la concentración de proteína de las preparaciones de EVs no correlacionaba con el número total de EVs. Esto puede ser debido a la presencia de agregados proteicos que co-precipitan de manera heterogénea durante la ultracentrifugación de cada muestra. En caso de que el objetivo final de la extracción de EVs a partir de AU fuera analizar únicamente las proteínas contenidas en el interior de las EVs, se podrían deplecionar las proteínas adheridas a la superficie aplicando un tratamiento de tripsina (313) o proteinasa K (323) – enzimas que se utilizan habitualmente para romper las interacciones inter-proteicas. Pero en el marco del descubrimiento de biomarcadores proteicos, puesto que parte de los marcadores en potencia no se encuentran en el interior de las vesículas, sino unidos a proteínas presentes en la superficie de las EVs – tetraspaninas y otras proteínas de anclaje (134,313,323–325) –, descartaríamos esta aproximación porque perderíamos proteínas que podrían ser de interés patológico.

En cuanto al análisis de la presencia de marcadores asociados a exosomas, cabe destacar que se observó variabilidad entre las distintas muestras de AU. Las EVs se encontraban enriquecidas en las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81 en comparación con las MVs. El promedio de expresión de las tres tetraspaninas era similar en todas las muestras, exceptuando el caso de la paciente 28. En base a lo anterior y de acuerdo con estudios recientes, confirmamos que existen distintas sub-poblaciones de EVs que presentan distintos niveles de tetraspaninas (149). Por otro lado, las proteínas TSG101 y Flotilina-1 se encontraban presentes en EVs a niveles más altos que en las MVs, apoyando la conocida asociación con la biogénesis endosomal de los exosomas (112,121,123). De acuerdo con otros estudios (115,272), Anexina V se detectó con mayor intensidad en MVs que en EVs. Finalmente, Haptoglobina se expresaba en la FS a niveles notablemente más altos que en las EVs, hecho que confirma que las EVs representan una fracción de la muestra con una proporción reducida de proteínas de alta abundancia en sangre, facilitando la detección de proteínas de baja abundancia, que son habitualmente las moléculas de importancia clínica.

Respecto al análisis del ARN exosomal, es indispensable aplicar un procedimiento de aislamiento de EVs y un método de extracción de ARN altamente eficaces, ya que la concentración de ARN en EVs es frecuentemente baja y en consecuencia, limita los análisis posteriores (112). En línea con lo anterior, con el objetivo de **determinar el procedimiento más adecuado para obtener ARN exosomal de AU**, estudiamos el efecto de la sonicación y el tratamiento con ARNasa A en distintos puntos del protocolo *Estándar*. La elección de la estrategia se hizo en base al perfil de Bioanalyzer y a la detección de una serie de miARNs que se expresan en el tracto genital femenino y que han sido detectados anteriormente en EVs – miR-200b, miR-200c, miR-223, miR-17 y miR-106a (145,273–276). La sonicación de las EVs una vez aisladas mediante ultracentrifugación tiene como objetivo disruptar la membrana exosomal y mejorar así el rendimiento de extracción del contenido molecular (326). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que para el análisis de ARN, la sonicación de las

EVs contribuye a una mayor fragmentación y degradación del material. Por lo tanto, la sonicación de las EVs no es apropiada para estudios de ARN; el reactivo de lisis es suficiente para romper la membrana exosomal. Existen varios estudios transcriptómicos que no consideran si el ARN de las preparaciones exosomales se encuentra en el interior de las vesículas, o si bien el ARN se encuentra unido a la superficie de las mismas (327). El AU total contiene ácidos nucleicos libres y ácidos nucleicos derivados de las células presentes en la cavidad uterina. En nuestro estudio, una alta proporción del ARN aislado se encontraba unido a la superficie de las EVs (más del 50%). Nuestros resultados sugieren que el material genético externo de las EVs del AU es muy abundante en comparación con el de EVs de cultivo celular (328) u otros biofluidos (329). Dado que nuestro objetivo final es el aislamiento de EVs de AU y el análisis de su contenido para la búsqueda de biomarcadores del CO, consideramos que el ARN circulante y externo a las EVs no debería estar presente. Las moléculas de ARN contenidas en el interior de las EVs son las que se incorporan selectivamente en dichos compartimentos y representan las células de origen. La contaminación de la muestra con ARN externo conllevaría la obtención de resultados artefactuales y por consiguiente, consideramos que es preciso deplecionar el ARN externo contaminante de las EVs aplicando un tratamiento con ARNasa A y analizar únicamente el ARN contenido en el interior de las EVs.

En conclusión, determinamos que el **tratamiento de las EVs con ARNasa A sin aplicar sonicación** era la mejor aproximación para obtener el ARN exosomal preservando su integridad. De acuerdo con la conocida estabilidad y resistencia natural que presentan los exosomas frente a condiciones adversas (147), las EVs aisladas permanecieron intactas tras la digestión con ARNasa A. A diferencia del ARN celular, el ARN contenido en las EVs presenta un perfil diferente, compuesto principalmente por fragmentos cortos (327). En este estudio, las moléculas de ARN de las EVs consistían en secuencias cortas de 25-300 nucleótidos y la concentración era de 3.490 µg/µL aproximadamente – cantidad suficiente para detectar la presencia de ARNm y miARNs mediante RT-qPCR.

Posteriormente, **se confirmó la robustez de este procedimiento con 6 muestras de AU independientes**. El perfil de Bioanalyzer fue similar al que observamos en la optimización (moléculas de 25-300 nucleótidos), pero la concentración de ARN obtenida era inferior en todos los casos (108-851 pg/µL). Dado que las vesículas no contenían ARN externo adicional, la concentración de ARN correlacionaba significativamente con el número total de EVs, y a su vez correlacionaba con el volumen inicial de fracción fluida de AU.

Mediante RT-qPCR analizamos la presencia de 1 ARNr, 6 ARNm y 11 miARNs que habían sido detectados anteriormente en EVs (145,150). Actualmente no se conoce ninguna molécula de ARN endógena que presente niveles de expresión constantes en EVs. Existen distintas estrategias para normalizar los datos de RT-qPCR: relativizando la expresión con el número total de vesículas que contiene cada preparación (330); seleccionando una molécula de ARN específica de la muestra que presenta poca variabilidad (331); normalizando los datos con el promedio del nivel de expresión de todas las moléculas de ARN analizadas (332); o bien, mediante el uso de una molécula de ARN artificial que, añadida a la muestra previamente a la extracción de ARN, permite normalizar los datos de RT-qPCR (333). En este estudio decidimos utilizar el oligonucleótido sintético cel-miR-39 como control interno, ya que añadido justo antes del aislamiento de ARN, permite corregir la variabilidad experimental asociada a la extracción de ARN, la eficiencia de la transcripción reversa y la variabilidad técnica de la RT-qPCR con mayor precisión que los métodos anteriormente descritos (265). Con este sistema cuantificamos la expresión relativa de las moléculas de interés respecto a la expresión basal del ARN sintético.

El ARNr 18S fue la especie de ARN con mayor expresión que se detectó en este estudio, aunque permitía la detección eficiente del resto de especies de ARN – resultados que

concuerdan con otros estudios que han descrito niveles altos del ARNr 18S (114,145,149,150,327). De hecho, en algunos casos el contenido de ARNr era tan alto que era necesario deplecionarlo para poder analizar de manera eficiente el resto de ARN (328). Si bien es conocido que el ARN exosomal está formado básicamente por secuencias cortas (< 200 nucleótidos), en este estudio los fragmentos de ARN pudieron hibridar con las sondas específicas, permitiendo la observación de expresión. TSG101 y ALIX – asociados al origen endosomal (123) – fueron detectados de manera eficiente. Aunque estas moléculas sólo se han observado en EVs a nivel de proteína (145), el estudio presente indica que el ARNm correspondiente también viaja en este tipo de vesículas. Puesto que otros estudios han demostrado que el ARNm exosomal puede ser funcional en las células diana (150), hipotetizamos que tras la entrada del ARNm de TSG101 y ALIX en células receptoras, estas moléculas podrían ser traducidas a proteína fomentando la síntesis de MVBs y su transporte intracelular. GAPDH (un enzima metabólico) y β -actina (un componente del citoesqueleto) – previamente descritos en exosomas a nivel de proteína (145) y ARN en biofluidos y medio de cultivo celular (327) – también fueron detectados en las EVs de AU. Por otro lado, la detección de la expresión de MUC16 y CD24 indica el potencial de las EVs derivadas del AU como una nueva fuente de biomarcadores de patologías ginecológicas, pues ambas proteínas se han asociado al CO (334), cáncer de endometrio (335,336) y endometriosis (277,278). De manera interesante, CD24 también se ha relacionado con leiomiomas (337), y aunque este estudio no pretendía extraer conclusiones acerca del vínculo entre el contenido de ARN de las EVs de AUs y las patologías benignas de las pacientes, pudimos observar que justamente dos de las tres pacientes diagnosticadas con leiomioma presentaban niveles más elevados de CD24 en EVs de AU que las otras muestras analizadas.

Por otra parte, detectamos la expresión de varios miARNs en EVs de AU previamente relacionados con patologías del tracto genital femenino. Concretamente, miR-200b ha sido asociado a la endometriosis (275), y juntamente con miR-200c, se ha visto sobre-expresado en cáncer de endometrio (338), así como también en tejido y suero de pacientes con CO (273,339). Además, ambos se han encontrado sobre-expresados en EVs de suero de pacientes con CO avanzado (273), y miR-200c también se ha detectado en EVs/MVs derivadas de una línea celular de endometrio (274,340). miR-223 se ha asociado a la endometriosis (275) y se ha encontrado sobre-expresado en suero de pacientes con síndrome de ovarios poliquísticos (341); también se ha visto elevado en suero de pacientes con cáncer de endometrio (342), así como en el tejido tumoral (340), y en el tejido de CO recurrentes (343). miR-141 se ha detectado en el tejido endometrial ectópico en condiciones de endometriosis (275) y también se ha visto elevado en suero de pacientes con esta patología (344); además, se ha encontrado sobre-expresado en cáncer de endometrio (338,340) y en suero de pacientes con CO (339). De manera interesante, también se han detectado altos niveles de miR-141 en EVs de pacientes con CO (273). miR-205 se ha visto sobre-expresado en tejido y suero de pacientes con cáncer de endometrio (276,340), y CO (345), y se ha encontrado sobre-expresado en EVs de suero de pacientes con CO (273). miR-17 se ha detectado sobre-expresado en cáncer de endometrio (340) e infra-expresado en plasma de mujeres con endometriosis (346); además se ha observado en EVs/MVs derivadas de una línea celular de endometrio (274). miR-106a se ha encontrado sobre-expresado en CO (347) y cáncer de endometrio (340), y también se ha detectado en EVs/MVs derivadas de una línea celular de endometrio, junto con miR-200c y miR-17 (274).

En conjunto, la detección de expresión de miR-200b, miR-200c, miR-223, miR-141, miR-205, miR-17 y miR-106a en EVs de AU, y la relación de estas moléculas con alteraciones del tracto genital femenino, soportan el hecho de que las EVs representan las células de origen (111). En cierto modo, es coherente que detectemos estos miARNs en estas pacientes, ya que es conocido que algunas de las moléculas que se sobre-expresan en condiciones malignas ya se

encuentran levemente aumentadas en lesiones benignas del aparato genital femenino (348). De todos modos, puesto que el objetivo de este estudio no era comparar la expresión de estas moléculas de ARN en distintas condiciones patológicas, no podemos extraer conclusiones acerca de la relación de estos miARNs con la presencia de las patologías pertinentes. Estos resultados únicamente permiten afirmar la presencia de estos ARNs en EVs de AU, y por ello consideramos la fracción exosomal del AU como una nueva plataforma prometedora para la detección de este tipo de patologías a nivel de ARN.

Paralelamente, evaluamos la expresión de RNU48, U75 y RNU44, que se expresan de manera estable en tejido endometrial y son considerados miARNs endógenos para normalizar los niveles de otras especies de ARN en RT-qPCR (279). También analizamos RNU6B, que ha sido utilizado en muchos casos como control endógeno en la RT-qPCR (333) – aunque recientemente algunos grupos han descrito su variabilidad en tejidos normales y tumorales (279). En este estudio pudimos observar que la expresión de estos miARNs presentes en las EVs era variable entre los diferentes AUs; incluso en algún caso la expresión era nula. Esto concuerda con la conocida incorporación selectiva de determinadas moléculas de ARN en las EVs (114,128,151), ya que aunque los niveles de los miARNs endógenos sean altos y constantes en las células endometriales, en algunos casos las EVs derivadas presentan una expresión diferente.

La alta estabilidad del ARN en los exosomas y la sensibilidad de la RT-qPCR hacen que el análisis de ARN exosomal sea una aproximación atractiva para el descubrimiento de biomarcadores para el CO (150). De todas las especies existentes de ARN, se utilizan mayoritariamente los miARNs por su alta estabilidad y porque su presencia es informativa de los perfiles de ARNm. Además, dado que la desregulación en la expresión de miARNs es un evento precoz en la tumorigénesis ovárica, la medida de los niveles de miARNs exosomales podría mejorar la detección precoz del CO (349). A día de hoy es conocido que las células de CO seleccionan y enriquecen los exosomas en ciertos grupos de miARNs que reflejan las células tumorales (128), indicando su potencial como fuente de nuevas moléculas asociadas a la enfermedad (111,273).

Nuestro estudio abre las puertas al descubrimiento de nuevos biomarcadores para la mejora del diagnóstico del CO – entre otras enfermedades de afectación uterina y tubo-ovárica – a partir del análisis de las EVs presentes en el AU, una muestra poco invasiva pero representativa de la patología, y que además no presenta las dificultades asociadas al análisis de muestras como la sangre.

Para realizar estudios de descubrimiento de biomarcadores del CO a partir de EVs procedentes específicamente de los tumores ováricos, lo más conveniente sería seleccionar y trabajar únicamente con las EVs que sobre-expresan CA125, EpCAM y CD24 (350) – proteínas características que se encuentran elevadas en el tejido tumoral del ovario y que también se han visto altamente expresadas en los exosomas de pacientes de CO (273,350,351). De manera interesante, el CA125 se ha detectado con mayor sensibilidad en las EVs derivadas de líquido ascítico y plasma que en los fluidos directos de pacientes con CO (192,273), lo cual sugiere que la cuantificación del CA125 contenido en los exosomas, en combinación con los biomarcadores potenciales derivados del AU, podría mejorar la detección precoz del CO.

Tras el establecimiento de las bases para el aislamiento de EVs a partir del AU que se ha realizado en este estudio, nos planteamos proceder con la comparación de la expresión génica de EVs de pacientes con HGSOE (en estadios iniciales y avanzados) con la de EVs de AUs derivados de pacientes con patología benigna y/o pacientes sanas. Concretamente nos proponemos la identificación de miARNs diferencialmente expresados entre EVs de AU de pacientes con CO y EVs de pacientes control, mediante el uso de plataformas transcriptómicas.

Una vez se hayan identificado las diferencias moleculares más significativas, será importante confirmar la procedencia de las EVs. Para ello se validará la expresión de los biomarcadores candidatos en muestras de tumores de CO. Además, dado que el procedimiento de aislamiento seleccionado (procedimiento *Estándar*) podría arrastrar un cierto grado de contaminación de MVs, se verificará la ausencia de los candidatos en MVs para confirmar el origen exosomal.

Una vez seleccionados los biomarcadores candidatos, se deberá proceder a su validación, evaluando un gran número de muestras de pacientes con CO y muestras control, lo que permitirá determinar su potencial sensibilidad y especificidad. También será interesante determinar la sensibilidad y especificidad en combinación con los niveles séricos de CA125 y la ecografía transvaginal, esperando poder aumentar la tasa de detección precoz respecto a las técnicas tradicionales.

Idealmente, para que un test pueda ser utilizado en el cribado poblacional del CO, debe ser sencillo, poco invasivo, fiable, económico y viable para ser utilizado a gran escala. Así, la identificación de un biomarcador o panel de biomarcadores en EVs del AU, solos o en combinación con los métodos diagnósticos actuales, podría ser de utilidad como método de cribado poblacional para diagnosticar precozmente el CO, permitiendo derivar a las pacientes a un ginecólogo-oncólogo en caso de presentar un riesgo elevado de CO según el resultado del test. Asimismo, en base a los resultados obtenidos y en función de las muestras analizadas, podrían plantearse nuevos abordajes que permitieran validar el uso de biomarcadores en diferentes estadios de la enfermedad, o en diferentes puntos de la estrategia terapéutica.

Recientemente se han lanzado al mercado kits comerciales de aislamiento de EVs a partir de múltiples muestras biológicas, pero no ofrecen resultados totalmente fiables (154,322). No obstante, en un futuro, una vez se haya mejorado y estandarizado el aislamiento de EVs mediante kits comerciales, será posible trasladar fácilmente dichos resultados a la práctica clínica.

En conclusión, nuestro estudio ha permitido determinar el procedimiento más apropiado para aislar EVs a partir del AU para el análisis posterior de su contenido a nivel de proteína y ARN. Además, ha permitido caracterizar las EVs a nivel de tamaño, concentración, morfología y composición bioquímica. Esta investigación representa una estrategia experimental que impulsa el aislamiento de las EVs del AU y su uso en la búsqueda de biomarcadores con potencial diagnóstico para la mejora de la detección precoz del CO.

5.2. SECCIÓN II: Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para bloquear la diseminación del cáncer de ovario

La sintomatología inespecífica del CO junto con la inexistencia de un cribado de diagnóstico eficaz se traduce en una detección tardía del tumor, cuando éste ya ha metastatizado (85% de los casos), resultando en una tasa de supervivencia a 5 años del 28% (12). La diseminación metastásica del CO es altamente agresiva (238) y por ello está directamente relacionada con el mal pronóstico de la enfermedad (352).

Durante los últimos 40 años se han realizado múltiples pruebas para establecer una terapia estándar contra el CO. Sin embargo, el avance más significativo ha sido la introducción del paclitaxel en combinación con el cisplatino (353). En consecuencia, a día de hoy el tratamiento del CO consiste en una cirugía citorréductora radical combinada con quimioterapia sistémica o intraperitoneal basada en platino-paclitaxel (1,354). Aunque inicialmente el 80% de las pacientes responde al tratamiento y el 40-60% de ellas adquiere una respuesta completa, el 90% recae antes de los 18 meses (12). A pesar de que hay distintos agentes terapéuticos que tienen efecto en la enfermedad recurrente – gemcitabina, doxorubicina y topotecan –, su adición al tratamiento estándar primario no prolonga la supervivencia (355). Además, la introducción de nuevas terapias anti-VEGF o terapias de inhibición de reparación de daños en el ADN mediante inhibidores del PARP, no han demostrado mejoras significativas en la supervivencia de las pacientes (356), pues en ambos casos las terapias son efectivas en nichos de pacientes muy concretos (66,357). Por todo ello, se considera que los avances en el tratamiento del CO y por consiguiente, la mejora de la mortalidad, son prácticamente insignificantes en comparación con los progresos que se han alcanzado en otras malignidades (11,72,356). Así, existe claramente la necesidad clínica de desarrollar nuevas terapias dirigidas al bloqueo del proceso de diseminación metastásica del tumor, lo que debería repercutir en una mejora de la supervivencia global de las pacientes.

Nosotros hipotetizamos que la identificación de genes y vías moleculares desreguladas en el proceso de diseminación metastásica es el primer paso para mejorar el tratamiento del CO. Dado que el cambio genético es un sello distintivo de la progresión tumoral, el conocimiento de las diferencias entre T y M proporciona las claves del proceso metastásico. Por consiguiente, el **objetivo principal** de este estudio era identificar nuevas moléculas asociadas a la diseminación del CO, para poder ser utilizados en un futuro como dianas terapéuticas en el bloqueo de la diseminación de la enfermedad.

Para profundizar en la carcinogénesis ovárica, en los últimos años se han realizado múltiples estudios basados en la tecnología del *microarray* que comparan el perfil génico de tumores ováricos con el de ovarios sanos y ovarios con lesiones benignas (358,359). Estos hallazgos han generado un número sustancial de marcadores potenciales para el diagnóstico y el pronóstico. En otros estudios, los *microarrays* han permitido identificar genes asociados a los diferentes subtipos histológicos (360), así como patrones de expresión génica asociados a supervivencia, recaída (361,362) y respuesta a la quimioterapia (363). A día de hoy, también se han realizado algunos estudios donde se compara la expresión génica de T y M para conocer su biología y los mecanismos moleculares subyacentes (364–366).

En nuestro estudio, comparamos la expresión génica de T y M de pacientes con HGSOE en estadio avanzado mediante *microarray* para determinar las diferencias genéticas que explicarían la progresión tumoral del CO – **fase de descubrimiento**. La agrupación jerárquica de los genes permitió diferenciar claramente la expresión génica entre T y M; el perfil de expresión génica de las M difería notoriamente del de los T. Los genes se separaron en dos grandes grupos en base a su expresión alta o baja. El tumor de la paciente 2 era claramente diferente a los otros dos tumores; su perfil de expresión génica era similar al de las metástasis.

La presencia de un perfil de expresión génica asociado a metástasis ya en el T es indicativo o predictivo de una metástasis de carácter muy agresivo, pues en otros casos se ha relacionado también con el mal pronóstico de la enfermedad (367). Tras el análisis estadístico de los resultados experimentales, se determinó que 108 genes se encontraban significativamente sobre-expresados y 88 se encontraban infra-expresados en M vs T.

A continuación, utilizamos el software IPA (268) para analizar las **vías moleculares alteradas** y dar sentido biológico a los resultados. En primer lugar, analizamos con IPA la significancia biológica de la lista de genes diferencialmente expresados entre T y M. Las redes biológicas más representativas de estos genes – crecimiento y proliferación celular, movimiento celular, muerte celular y supervivencia – coincidían de manera lógica con la enfermedad que se asociaba, el cáncer (223). Teniendo en cuenta que al comparar los genes diferencialmente expresados entre T y M se estaban analizando implícitamente los genes implicados en la progresión del CO, es coherente que la vía de señalización de las MMPs fuera la vía más afectada, ya que una de sus funciones más características es degradar la ECM para permitir que las células cancerosas invadan el peritoneo. La actividad de estas proteínas es clave para que las células del T puedan metastatizar otros tejidos (368). Además, el regulador global de esta lista de genes era TGF- β , un factor de transcripción que regula el crecimiento celular y promueve la progresión tumoral y la metástasis, actuando directamente sobre las células cancerosas y alterando el microambiente tumoral (281). Es conocido que en CO, el TGF- β producido por las células tumorales induce la TEM para permitir el desprendimiento de las células del tumor primario (280,369); contribuye a su motilidad e invasión induciendo la expresión y secreción de las MMPs por parte de los fibroblastos asociados al tumor (369,370); y, promueve la angiogénesis induciendo la expresión de VEGF (281). En el omento, TGF- β permite la adaptación de las células tumorales del ovario al ambiente peritoneal. De manera interesante, un estudio reciente señala que TGF- β y su receptor se encuentran sobre-expresados en muestras de M en comparación con el T de pacientes con CO (371), lo cual explica que algunos de los genes que se encuentran sobre-expresados en nuestro estudio sean miembros de la familia TGF- β o estén regulados por este factor.

En segundo lugar, analizamos con IPA las vías moleculares alteradas asociadas a la lista de genes sobre-expresados en M vs T. La red biológica más representativa resultó ser la de movimiento celular, señalización e interacción inter-celular – procesos claves que permiten a las células metastásicas migrar, invadir y colonizar el mesotelio peritoneal. Por otro lado, la vía molecular asociada a estos genes era de nuevo la de las MMPs, lo cual concuerda con el sello distintivo de las M, la invasión (223). De manera interesante, el análisis predijo que la molécula que regulaba de forma positiva los genes sobre-expresados en M era VEGF-A, el inductor más potente de la angiogénesis. De hecho, es conocido que la producción elevada de este factor de crecimiento correlaciona con la diseminación metastásica y el mal pronóstico de las pacientes con CO (372). Por lo tanto, el ambiente hipóxico del peritoneo promueve la producción de VEGF (373) y los focos metastásicos dirigen su crecimiento y expansión a través de este factor, que impulsa el suministro de nutrientes a través de la circulación sanguínea (223).

Previamente a nuestro estudio, otros investigadores han descrito genes sobre-expresados en muestras de M respecto a T de cohortes independientes de pacientes con CO (Brodsky, Bignotti y Lancaster, et al.) (364–366). Si comparamos nuestra lista de genes sobre-expresados en M con los genes que han identificado estos estudios: los genes comunes entre nuestro análisis y el de Brodsky et al. (364) son 17; los genes compartidos con el de Bignotti et al. (365) son 10; y finalmente, el único gen común con el estudio de Lancaster et al. (366) es FABP4. La detección de algunos de nuestros genes en otros estudios refuerza el sentido de nuestros resultados. Aunque el número de genes que encontramos sobre-expresados en M vs T con $\log FC > 1$ y p -valor $< 0,05$ es limitado (108), nuestro estudio es el que ha detectado el

mayor número de genes elevados en M: Brodsky et al. identificó 61; Bignotti et al., 88; y, Lancaster et al., 21. Una posible causa que explica el bajo número de genes que se identifican en este tipo de estudios es la variabilidad entre pacientes de CO, la heterogeneidad intratumoral y/o la sensibilidad relativamente baja de los *microarrays* (364).

Uno de los motivos por el cual diferentes estudios resultan en conclusiones dispares es el tamaño muestral. Uno podría considerar que el número de sujetos incluidos en nuestro estudio es pequeño ($n = 3$), sin embargo, el tamaño muestral es comparable con el de otros estudios similares. En nuestro estudio, los criterios de inclusión fueron muy restrictivos: las muestras de T y M debían ser pareadas y obtenidas en la misma cirugía; las pacientes debían ser posmenopáusicas, ya que en la realidad clínica, la mayoría de pacientes con CO han superado la menopausia (374); la histología del tumor debía ser HGSOc, ya que es el subtipo de CO más prevalente (70,74); y, las pacientes no debían haber sido tratadas con tratamiento quimioterápico previamente a la cirugía, ya que no se conocía el efecto que podía tener el tratamiento en la expresión génica. Por otro lado, aparte de estos requerimientos, se añadía la baja incidencia del CO (6,11) y los casos no resecables, de los cuales no se extraía el T y solo se obtenía una biopsia de M. No obstante, el tamaño muestral de esta investigación es comparable al de otros estudios. En el estudio de Brodsky et al., se compararon 9 muestras pareadas de T y M, aunque únicamente 5 casos eran HGSOc originados en el propio ovario (364). Por lo tanto, probablemente la inclusión de las otras muestras afectó a los resultados obtenidos. Bignotti et al. comparó la expresión génica de 14 T y 17 M, pero a diferencia de nuestro estudio, las muestras no eran pareadas (365). Esto probablemente introdujo más variabilidad inter-paciente en los resultados. Finalmente, el tamaño muestral en el estudio de Lancaster et al. fue mayor; se analizó la expresión de 18 muestras pareadas de T y M. No obstante, cabe resaltar que el número de T se veía descompensado frente al de M, pues se incluyeron 11 T adicionales (366).

La biología de las metástasis es otro aspecto a tener en cuenta. Mientras que en los estudios de Brodsky, Bignotti y Lancaster et al., todas las M analizadas se encontraban en el omento (364–366), en nuestro estudio procedían de la cavidad peritoneal y el epiplón, lo cual representa más ampliamente la realidad clínica (237,241).

En referencia al procesamiento de las muestras, en nuestro estudio la proporción de células tumorales era superior al 90%; en cambio, en los estudios de Brodsky, Bignotti y Lancaster et al., las células tumorales representaban menos del 70% (364–366).

Finalmente, de manera similar a Brodsky, Bignotti y Lancaster et al., en nuestro estudio se aplicó una plataforma de microarray fiable y bien establecida (*Affymetrix*), pero el modelo utilizado en cada caso era diferente y el procedimiento experimental también era distinto. En este estudio se realizó un análisis estándar de los resultados del *microarray* parecido al que aplicaron Brodsky y Bignotti et al. (364,365). Sin embargo, Lancaster et al., construyó un modelo predictivo diferente (366).

En conjunto, todos estos factores pudieron afectar en mayor o menor medida, y esto explica las diferencias en los resultados obtenidos.

En referencia a la **selección de candidatos** implicados en la metástasis del CO, inicialmente seleccionamos aquellos genes que se encontraban sobre-expresados de manera estadísticamente significativa en M vs T en las 3 muestras analizadas; concretamente, los genes debían encontrarse sobre-expresados en dos de las tres M con $\log FC > 1$ y un $\log FC > 0,9$ en la tercera M (p -valor $< 0,05$). Luego, de estos genes seleccionamos finalmente aquellos genes relacionados con un mal pronóstico a través del estudio con la base de datos CSIOVDB, la herramienta transcriptómica del CO más completa hasta la fecha actual, tanto a nivel de muestras de CO incluidas como a nivel de información proporcionada (270). Los genes que

resultaron estar significativamente asociados a una supervivencia baja cuando se expresaban a niveles elevados fueron: FABP4, INHBA, GREM1, MMP11, PLVAP, MXRA5 y PXDN (log-rank p -valor < 0,05). El resto de genes, RNF152 y BCL2L11, se descartaron porque no había diferencias significativas en la supervivencia de las pacientes en base a su expresión; y por otro lado, BHLHE40 se excluyó porque no había sido estudiado anteriormente y, en consecuencia, no había información en CSIOVDB. Por lo tanto, en base al análisis inicial del *microarray* y a los datos de supervivencia global proporcionados por CSIOVDB, determinamos que los candidatos finalmente seleccionados para la subsiguiente fase de validación eran 7: FABP4, INHBA, GREM1, MMP11, PLVAP, MXRA5 y PXDN. Cabe destacar que estos genes se encontraban sobre-expresados en las M de nuestro estudio con un nivel de significancia estadística inferior o igual a 0,01.

CSIOVDB también proporciona información sobre la expresión de los candidatos en muestras de ovarios sanos, tumores primarios y metástasis de CO; en los diferentes estadios de la enfermedad; y el subtipo molecular asociado (270). Según CSIOVDB (269), todos los genes finalmente seleccionados se encuentran significativamente más expresados en la M que en el T, lo cual concuerda con nuestros resultados del *microarray*. Asimismo, todos los candidatos – exceptuando FABP4 – tienen una expresión más baja en el mesovario normal en comparación con el T. Esto indica que los niveles de los candidatos aumentan durante la progresión tumoral, desde la carcinogénesis ovárica hasta la metástasis peritoneal. En referencia a FABP4, parece expresarse con niveles más altos en el mesovario que en el T, aunque es en la M donde se observa la expresión más alta. Una posible explicación es que en el mesovario, los niveles basales de FABP4 deben de ser elevados para aumentar la incorporación de ácidos grasos y favorecer el crecimiento fisiológico y la reparación de la herida que se genera tras la ovulación periódica (375). Luego, tras la transformación neoplásica, parece que la expresión de esta proteína disminuye y se debe de activar la síntesis *de novo* de ácidos grasos, pues las células cancerosas siguen habitualmente esta vía metabólica para obtener energía a partir de lípidos (376). Finalmente, en las células de la metástasis peritoneal, los niveles de FABP4 probablemente son elevados debido a que los adipocitos del omento inducen su expresión con el fin de incrementar el transporte y la absorción de ácidos grasos para favorecer el crecimiento tumoral con la energía derivada (252).

Por otro lado, CSIOVDB indica que la expresión de los candidatos también aumenta progresivamente a lo largo de los estadios del CO. Es decir, en estadios avanzados de la enfermedad, la expresión de los candidatos es más elevada en comparación con los estadios iniciales. Además, la base de datos señala que niveles elevados de los candidatos están relacionados de manera significativa con un fenotipo mesenquimal C1 (362,377,378) y lógicamente, con la TEM. Todo esto sugiere que los candidatos elegidos están asociados al CO invasivo.

Asimismo, el estudio de Tothill et al. confirma que nuestros candidatos se encuentran elevados en el subtipo molecular C1 de CO (362). Esto concuerda con características biológicas y clínicas del HGSOE en estadio avanzado, ya que se ha visto que está estrechamente ligado a: una reacción estromal desmoplástica; niveles séricos de CA125 elevados (valores superiores a 65 U/mL); recidiva y supervivencia corta de las pacientes (62,362,377). Además, acorde con los resultados del análisis IPA, se ha descrito que los genes altamente expresados en el subtipo molecular C1 del CO están relacionados con la alteración de vías moleculares como la remodelación de la ECM, la adhesión celular, la señalización celular y la angiogénesis (362).

Por otro lado, en un estudio computacional de múltiples carcinomas (379), se ha determinado que la sobre-expresión de algunos de nuestros candidatos está asociada a una reacción estromal desmoplástica (380), según la cual los fibroblastos del estroma tumoral se transforman en miofibroblastos altamente proliferativos que secretan grandes cantidades de

colágeno, fibronectina, proteoglicanos y proteasas como las MMPs, para aumentar la proteólisis de la ECM, promoviendo la invasión y la metástasis. Según este estudio, COL11A1 se encuentra notoriamente presente en múltiples carcinomas en estadio avanzado, por lo que es considerado un gen crucial en el proceso de diseminación metastásica. Y de manera interesante, algunos de los genes validados por los repositorios “TCGA Ovarian Cancer” y “CCR Ovarian Cancer” que resultaron estar asociados consistentemente a COL11A1, y a la subsiguiente metástasis (379), aparecen sobre-expresados en las muestras de M de nuestro estudio (MMP11, INHBA, GREM1, MMP2, POSTN, VCAN, ADAM12, THBS2, LOX, FAP, CRISPLD2, COL1A1, COL1A2 y COL3A1).

Todo lo anterior aporta robustez biológica a nuestro análisis inicial de descubrimiento para proseguir con la fase de validación de los 7 candidatos. En primer lugar, confirmamos la expresión de los candidatos en las muestras originales de T y M analizadas en el *microarray* mediante una técnica transcriptómica diferente, la RT-qPCR (**fase de verificación**). Las diferencias entre el análisis de *microarray* y el de RT-qPCR pueden venir dadas por las sondas utilizadas en cada técnica y por el procedimiento experimental (381). En general, pudimos observar que en todos los casos se observaba sobre-expresión de los candidatos en al menos dos de las tres muestras estudiadas.

Tras confirmar los resultados de la fase de descubrimiento, procedimos a la **fase de validación a nivel de ARN** mediante RT-qPCR en muestras de T y M de una nueva cohorte de 20 pacientes con HGSOV en estadio avanzado – 10 pacientes que no habían sido tratadas con quimioterapia previamente a la cirugía y 10 pacientes tratadas con quimioterapia neoadyuvante. Con este estudio pudimos determinar que la quimioterapia no afectaba a la expresión de los candidatos. Probablemente esto es debido a que no se alteran las vías de señalización correspondientes, pues el tratamiento quimioterápico estándar del CO (platino/paclitaxel) no va dirigido a una diana terapéutica concreta, sino que introduce daños en el ADN y altera la dinámica de los microtúbulos, para inducir la muerte celular en última instancia (382,383).

En esta fase de validación pudimos ver que los 7 candidatos se expresaban a niveles más elevados en las muestras de M que en las de T, sin embargo, solamente alcanzaron la significancia estadística FABP4, GREM1, PLVAP y MXRA5. De manera interesante, tanto en las muestras de la fase de descubrimiento como en las de la fase de validación, se observó que los candidatos correlacionaban de manera significativa en las M. Este hecho sugiere un mecanismo subyacente que debe de resultar en la activación concomitante de las correspondientes vías de señalización durante el proceso de metástasis. Es conocido que los genes situados en regiones cromosómicas que se encuentran amplificadas en CO presentan una expresión elevada (62). En línea con lo anterior, la correlación que observamos entre los candidatos podría ser debida a la amplificación de una región cromosómica concreta si los *loci* de los genes de interés estuvieran situados en la misma. Pero puesto que el *locus* de cada candidato se encuentra en un cromosoma diferente (384), una hipótesis que explicaría la correlación observada sería la regulación conjunta de la expresión de estos genes a través de promotores y/o elementos reguladores comunes (385).

La herramienta DiRE permite determinar los promotores, los elementos reguladores y los factores de transcripción que podrían tener en común los candidatos (385). Una vez introducida la lista de los 7 candidatos que co-expresan en la herramienta (386), y utilizando como material base (*background*) los 2.557 genes que fueron detectados de manera eficiente en el *microarray*, se obtienen una serie de elementos reguladores y factores de transcripción que podrían activar potencialmente la expresión de estos genes de manera conjunta. De manera interesante, FABP4 y MMP11 tienen en común varios sitios de unión a factores de transcripción: NFY, ARNT, STRA13, ATF4, MAF y BACH2. Des de un punto de vista global,

DiRE indica que los 10 factores de transcripción que podrían regular los 7 candidatos de forma simultánea son: PAX9, MYOGENIN, BACH2, EGR3, ATF4, MIF1, HFH1, STRA13, SMEF2, GEN_INI3. Estos resultados permiten plantear futuros estudios para determinar experimentalmente si existe una regulación común de los candidatos a través de estos factores de transcripción.

Puesto que la unidad funcional de la biología es la proteína, tras estudiar los candidatos a nivel de ARN, procedimos a la **fase de validación a nivel de proteína**, analizando la expresión mediante IHQ en muestras pareadas de T y M de una cohorte independiente de 23 pacientes con HGSOC en estadio avanzado. Lamentablemente, no pudimos analizar la expresión de PXDN ni MXRA5 a nivel de proteína por la falta de anticuerpos específicos para esta técnica. Aún así, se continuará con su validación cuando haya anticuerpos disponibles, ya que son candidatos interesantes. Por un lado, se ha descrito que la sobre-expresión de **PXDN** aumenta la plasticidad y la motilidad de células tumorales, y algunos estudios han detectado una expresión aumentada de PXDN en varios carcinomas, incluyendo el CO, el melanoma, el glioma metastásico, el cáncer de mama, de colon y de páncreas (387). PXDN también se ha visto sobre-expresada en metástasis de tumores cerebrales (glioblastoma) en comparación con los tumores primarios. Además, junto a PLVAP, se ha observado una expresión elevada en las células endoteliales que forman la microvasculatura de tumores y metástasis del glioblastoma. PXDN también se ha detectado en estructuras vasculares del carcinoma renal, por lo que esta proteína podría ser potencialmente utilizada como una nueva diana para futuras terapias anti-angiogénicas (388). Por otro lado, la expresión de **MXRA5** – junto con la de GREM1 e INHBA – se ha visto asociada a la reacción desmoplástica estromal, y a la subsiguiente invasión y metástasis de distintos carcinomas, incluyendo el CO (283,379,389). MXRA5 también se ha visto sobre-expresada en otras neoplasias (389,390), y se han identificado mutaciones somáticas en tumores ováricos, pulmonares y cerebrales (391). Cabe destacar que en cáncer de colon y de pulmón, su sobre-expresión correlaciona significativamente con la progresión tumoral, la presencia de metástasis y la corta supervivencia de las pacientes (283,390). Asimismo, en el caso del cáncer de colon, la mayor expresión de MXRA5 se ha correlacionado con mayor estadio y mayor tamaño de las metástasis en el omento (283); en cáncer de mama, la sobre-expresión de esta proteína se ha visto implicada en la TEM (392). Además, MXRA5 presenta actividad del receptor VEGF y se ha observado que TGF- β , molécula clave en la progresión del CO (280), induce activamente su expresión (393). Todo ello en conjunto apunta a que MXRA5 debe de tener un papel importante en la progresión del cáncer, participando en la adhesión celular, la remodelación de la ECM y la vasculatura tumoral, por lo que podría ser una nueva diana terapéutica con potencial.

A diferencia de PXDN y MXRA5, los demás candidatos sí que presentaban anticuerpos disponibles y se pudo proceder a su validación a nivel de proteína. En cuanto a **GREM1**, en contraste con los resultados de la validación a nivel de ARN, los resultados de IHQ indicaban que en el 50% de los casos aproximadamente se observaba más expresión en las muestras de T que en las de M. Por lo tanto, en este caso parece que los niveles de expresión a nivel de ARNm no correlacionan con los de proteína. Recientemente, mediante un análisis *in silico* de datos publicados de expresión génica asociados a T y M desapareadas de pacientes con CO, se ha descrito la sobre-expresión de GREM1 a nivel de ARN en M peritoneales vs T (374). A diferencia de nuestro estudio, cuando después Haiming Xu et al. analizó la presencia de GREM1 en muestras pareadas de T y M mediante IHQ, se observó una sobre-expresión estadísticamente significativa en M respecto a T – aunque en la publicación no se especifican ni los detalles de la tinción ni de la significancia de los datos. Este grupo de investigación utilizó un anticuerpo distinto al que hemos usado en nuestro estudio, lo cual podría explicar las diferencias que se observan en los resultados obtenidos. Por consiguiente, creemos que es necesario analizar mediante IHQ la expresión de GREM1 con el mismo anticuerpo que utilizó

Haiming Xu et al.. De este modo podríamos extraer conclusiones acerca de la expresión de este candidato a nivel de proteína en muestras pareadas de T-M de pacientes con HGSOC en estadio avanzado. En el caso de confirmarse la sobre-expresión en M vs T, sería interesante proceder con su validación funcional. GREM1 es un miembro de la vía de señalización de TGF- β (394). Actualmente no se conoce el papel de GREM1 en la diseminación del CO, pero se cree que esta proteína podría antagonizar la señalización de las BMPs en el frente invasivo tumoral para mantener el nicho mesenquimal (395). Además, la expresión de GREM1 también se ha relacionado directamente con la de COL11A1 en CO y otros carcinomas en estadio avanzado, lo cual sugiere su implicación en la reacción desmoplástica estromal, y la subsiguiente invasión y metástasis (379,395,396). En algunos carcinomas como el de colon, GREM1 facilita la progresión tumoral induciendo la TEM (397). Asimismo, en cáncer de pulmón se ha observado que la sobre-expresión de GREM1 *in vitro* induce un fenotipo mesenquimal y un aumento en la proliferación, migración e invasión; y, la sobre-expresión *in vivo* resulta en un aumento del crecimiento tumoral (398). Aunque todavía no se ha definido el papel de GREM1 en la carcinogénesis ovárica, se ha descrito su sobre-expresión en tumores ováricos en comparación con ovarios benignos (399), así como también en otros carcinomas respecto a los tejidos normales respectivos (395–400). Curiosamente, la sobre-expresión de GREM1 por parte de las células tumorales requiere de la interacción con las células estromales (396). En algunos carcinomas, se ha observado que GREM1 puede ser secretada por células estromales asociadas al tumor, para promover el crecimiento y la expansión de las células tumorales (395,397). Esto pone de manifiesto la importancia del estroma tumoral. Asimismo, en el glioblastoma y el cáncer de cérvix se ha descrito que las células madre cancerosas (*Cancer stem cells*, CSCs) secretan GREM1 para inhibir la diferenciación que inducen de manera natural las BMPs, por lo que GREM1 favorece el mantenimiento de las CSCs y la subsiguiente desdiferenciación del tejido tumoral (400). Finalmente, cabe resaltar que GREM1 es capaz de unirse a VEGFR2 en las células endoteliales y activar la neovascularización tumoral (401–403). Todo ello sugiere que GREM1 puede tener un papel relevante tanto en la carcinogénesis como en la progresión tumoral, favoreciendo la renovación de las células tumorales y la metástasis (397,399). Por lo tanto, GREM1 podría ser una buena diana terapéutica para bloquear la diseminación del CO.

En referencia al análisis IHQ de **PLVAP**, también se requieren más estudios con otros anticuerpos para determinar su expresión en muestras pareadas de T y M de HGSOC en estadio avanzado, ya que la expresión era nula en la gran mayoría de los casos y, en los casos en los que se observaba tinción, ésta era leve y localizada en las células cancerosas, siguiendo un patrón nuclear o citosólico. Anteriormente, Strickland et al. analizó la expresión de PLVAP mediante IHQ en ovarios benignos y ovarios tumorales y, a diferencia de nuestro estudio, únicamente observó expresión en los vasos sanguíneos de las muestras tumorales, mientras que la expresión en las células tumorales era nula (404). Por lo tanto, creemos necesario analizar la expresión de PLVAP con otros anticuerpos, entre ellos, el de Strickland et al., para determinar la presencia de esta proteína en T y M de CO. PLVAP se expresa a niveles elevados en las células endoteliales del tejido normal (290) y también se ha detectado en pequeños capilares de diferentes tumores (404). De hecho, se ha visto implicada en la angiogénesis tumoral, ya que su expresión es inducida tras la unión de VEGF a su receptor, VEGFR2, resultando en un incremento de la permeabilidad vascular y la angiogénesis (388). Relacionado con la función estructural de PLVAP en los diafragmas asociados a fenestraciones endoteliales, VEGF se encuentra altamente expresado a nivel de ARN en los vasos fenestrados y parece que también está implicado en la formación y mantenimiento de estas estructuras (404). Por otro lado, la expresión de PLVAP también es inducida por las vías de señalización de PI3K y MAPK p38, ya que se ha observado que los inhibidores de estas vías moleculares disminuyen su expresión a nivel de ARN y proteína (290,404). Puesto que PLVAP facilita el crecimiento vascular – la expresión elevada está asociada a mayor angiogénesis –,

esta proteína representa una nueva diana para terapias anti-angiogénicas. Y aunque su prevalencia en el endotelio de tejidos normales podría limitar su explotación (404), se ha visto que la inhibición de PLVAP suprime el crecimiento del carcinoma hepatocelular con efectos tóxicos mínimos (405). Por consiguiente, PLVAP tiene potencial como diana para tratamientos anti-angiogénicos y/o como biomarcador de fenestraciones endoteliales para predecir la respuesta a este tipo de terapias (406).

En cuanto a **INHBA**, tras el análisis IHQ, pudimos ver que prácticamente en el 50% de los casos la expresión era más alta en las muestras de M en comparación con las de T, hecho que confirma los resultados de la validación a nivel de ARN. Anteriormente, en otros estudios se había analizado la expresión de INHBA en T de ovario (407–410), pero este es el primer estudio en el que se evalúa la expresión de INHBA en M de CO. Cabe resaltar que INHBA puede formar dos tipos de complejos: la inhibina A (al unirse con la subunidad α) y la activina A (al unirse con otro monómero INHBA). Puesto que en mujeres premenopáusicas, la inhibina es secretada al medio extracelular y circula por la corriente sanguínea con fluctuaciones a lo largo del ciclo menstrual, se han realizado diferentes estudios que examinan su utilidad en el diagnóstico del CO. Concretamente, se ha analizado su expresión sérica y se ha relacionado con la presencia de CO porque en condiciones normales, las mujeres posmenopáusicas presentan niveles plasmáticos muy bajos o indetectables (411). En estos estudios se ha observado que INHBA es expresada y secretada principalmente por los tumores de la granulosa y en menor medida, por los tumores mucinosos, mientras que los tumores serosos expresan y secretan niveles muy bajos o nulos (408,410,412,413). De modo que en combinación con el CA125, el uso de inhibina en el diagnóstico del CO solo mejora la detección de los carcinomas de la granulosa y los carcinomas mucinosos (413). A diferencia de la inhibina, los pocos estudios que analizan la expresión de la activina en suero han detectado niveles más elevados en pacientes con CO epitelial respecto a pacientes con tumores ováricos benignos o *borderline* (414,415).

Existe un debate considerable acerca del papel de las inhibinas, las activinas y las gonadotropinas en la tumorigénesis ovárica (416). Se ha observado que las inhibinas antagonizan la acción de las activinas, ya que por su homología estructural se unen a ligandos de las activinas y bloquean su efecto – lo cual se ha asociado a la tumorigénesis ovárica (411). De hecho, se cree que la activina debe de promover el crecimiento de los tumores epiteliales de ovario mediante un bucle autocrino: la pérdida de inhibina en combinación con la sobreproducción de activina lleva a la proliferación celular descontrolada y a la subsiguiente formación del tumor (414). Respecto al estudio del papel de la activina A en la carcinogénesis ovárica, se ha observado que activa la secreción de FSH para incrementar la síntesis de ADN y estimula la proliferación de las células neoplásicas regulando la vía Akt/GSK (417). Todavía no existen estudios acerca del papel de activina A en la progresión del CO, pero muy recientemente Basu et al. ha determinado que la sobre-expresión dirigida de INHBA en células de CO resulta en un aumento significativo de la migración y la invasión, lo cual concuerda con la naturaleza de esta hormona – miembro de la familia de TGF- β . Según este estudio, la activina A induce la TEM, la plasticidad celular, y la subsiguiente invasión (280). En relación a lo anterior, se ha descrito que INHBA – junto a COL11A1 y THBS2 – está directamente asociada a la reacción estromal desmoplástica, la invasión y metástasis del CO (379). Todo ello en conjunto indica que activina A podría ser una buena diana terapéutica para detener el CO metastásico. Además, se ha observado que este complejo tiene induce la expresión de VEGF y la subsiguiente neovascularización en procesos biológicos como la formación del trofoblasto o la inflamación de la córnea (418). De acuerdo con el efecto pro-angiogénico de la familia de TGF- β en CO, sería interesante estudiar si activina A también activa la vía de VEGF en el marco del CO, ya que si fuera así, su inhibición podría bloquear la angiogénesis tumoral.

Respecto a **FABP4**, confirmando los resultados de la fase de validación a nivel de ARN, en el análisis de IHQ de FABP4 observamos una sobre-expresión estadísticamente significativa en las células tumorales de las muestras de M en comparación con las de T, confirmando así los resultados de la fase de validación a nivel de ARN. Además, también detectamos una tinción más extendida en los vasos de nueva formación de las muestras de M que en las de T. Relacionado con nuestros resultados, Nieman et al. detectó que FABP4 se encontraba sobre-expresada en las M de omento en comparación con los T de pacientes con HGSOC en estadio avanzado (252). Posteriormente, confirmaron esta sobre-expresión mediante inmunoblot e IHQ y, a diferencia de nuestro estudio – donde observamos una sobre-expresión homogénea en células tumorales de las M en comparación con las del T –, detectaron que únicamente expresaban FABP4 las células cancerosas que se encontraban en contacto directo con los adipocitos del omento de las muestras de M.

El tejido adiposo del omento funciona como una fuente directa de energía para las células tumorales, y puesto que los adipocitos son las células que sobre-expresan FABP4 de forma natural, utilizan esta proteína transportadora para transferir los ácidos grasos a las células tumorales, favoreciendo su crecimiento. Por otro lado, Nieman et al. observó que las ratonas knockout (*Knock Out*, KO) de FABP4 a las que se les inducía la formación de tumores ováricos presentaban menor número de metástasis abdominales en comparación con ratonas que expresaban FABP4. Este hecho fue atribuido a la falta de expresión de FABP4 en adipocitos y a la subsiguiente reducción en el metabolismo de ácidos grasos en las células cancerosas adyacentes (252). Otra explicación a la reducción de focos tumorales que se observó deplecionando FABP4 podría ser que dicha proteína también favorece la migración e invasión de las células metastásicas. Aunque todavía no se conoce en detalle el mecanismo de transferencia de ácidos grasos mediante FABP4, se cree que esta proteína unida a ácidos grasos es secretada por los adipocitos, penetra en las células metastásicas y libera los lípidos, que serán oxidados aquí para la obtención de energía (252). Además, también se ha sugerido que las células cancerosas podrían incrementar la expresión génica de FABP4 tras el contacto directo con los adipocitos. Teniendo en cuenta que TP53 se encuentra frecuentemente mutado en el HGSOC (253), se cree que una vez las células tumorales se han implantado en el omento, el mutante TP53 junto con la IL-8 derivada de adipocitos inducen la sobre-expresión de FABP4. El aumento de expresión de FABP4 en las células metastásicas funcionaría como un mecanismo de adaptación al nuevo microambiente, ya que permitiría aumentar la absorción de ácidos grasos para mantener el crecimiento tumoral (252,419). De hecho, se ha observado que la expresión de FABP4 es proporcional a los niveles de lípidos a los que están expuestas las células (375). La expresión de FABP4 que inducen los adipocitos del omento en las células metastásicas refleja la importancia del microambiente tumoral en el proceso de diseminación y metástasis del CO. Cabe destacar que gran parte de las pacientes con CO presentan sobrepeso (420), de modo que la interacción entre las células tumorales y los adipocitos de la cavidad abdominal se ve aumentada y esto contribuye a una mayor diseminación y progresión tumoral (419). Este hecho explica la relación entre la carcinogénesis y la obesidad (421), pues se ha visto que las pacientes que padecen obesidad tienen un riesgo aumentado de desarrollar cáncer (422), sobre todo carcinomas ligados a un microambiente tumoral rico en adipocitos, como es el omento en el caso del CO. De hecho, se ha descrito que la obesidad está asociada a una reducción en la supervivencia de las pacientes con CO (423).

Volviendo al análisis IHQ de nuestro estudio, la extensa expresión de FABP4 que detectamos en los vasos sanguíneos de las muestras de M indica que esta proteína podría ser un buen marcador de angiogénesis, asociada al crecimiento metastásico. Curiosamente, Nieman et al. no detectó FABP4 en los vasos sanguíneos tumorales, pero sí observó una disminución en la densidad vascular en los tumores ováricos de ratonas KO de FABP4 (252). Por otro lado, muy recientemente se ha publicado un estudio en el sí se ha detectado tinción de FABP4 en vasos

sanguíneos de CO y se hace mención del papel de esta proteína en la angiogénesis (424). De acuerdo con las observaciones preliminares de Nieman et al. (252), los resultados de Harjes et al. indican que el silenciamiento de FABP4 en los vasos tumorales lleva a una pérdida substancial de capilares, y a una reducción en el crecimiento tumoral y en el número de nódulos tumorales (424). Además, este estudio remarca que la expresión de FABP4 en las células endoteliales es necesaria para que tenga lugar la angiogénesis, y para prevenir la producción de especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species*, ROS), pues se ha observado que la pérdida de FABP4 genera ROS por el incremento en los niveles de ácidos grasos libres en el citosol. El aumento de ROS reduce la habilidad de las células endoteliales de proliferar, migrar y formar redes de vasos sanguíneos. Por lo tanto, FABP4 juega un papel importante en el tráfico de ácidos grasos en ambientes ricos en lípidos – como es el omento –, en la formación de nuevos vasos sanguíneos y en el control de la formación de ROS (424). Asimismo, es conocido que FABP4 favorece la proliferación, la supervivencia, la migración y la invasión de las células endoteliales, por lo que es considerado un factor pro-angiogénico (425). La señalización de VEGF-A está implicada en la progresión de la angiogénesis de tumores ováricos (426) y, de manera interesante, VEGF-A activa la expresión de FABP4 mediante distintas vías de señalización: la de mTORC1 (425) y la de DLL4/NOTCH1 (427). Por un lado, la unión de VEGF-A a VEGFR2 activa a mTORC1, que a su vez activa la expresión de FABP4 (425). Por otra parte, VEGF-A induce la expresión de DLL4, el cual activa NOTCH1, que culmina en la activación de la expresión de FABP4 (427). Cabe destacar que el aumento de la señalización de DLL4-NOTCH1, a la cual va ligada la sobre-expresión de FABP4, puede contribuir a la resistencia a las terapias anti-VEGF-A, pues el aumento de activación de DLL4-NOTCH1 contrarresta la inhibición de VEGF-A en el tejido tumoral (428). Por lo tanto, una terapia combinada contra VEGF-A y FABP4 ofrecería efectos terapéuticos adicionales frente a la terapia anti-VEGF-A convencional.

En conjunto, FABP4 parece ser un elemento clave en la interacción entre adipocitos y células tumorales que actúa aumentando la disponibilidad de lípidos, favoreciendo la proliferación tumoral y la angiogénesis. Pero aunque se ha descrito el papel de FABP4 en la angiogénesis de tumores ováricos (424), todavía queda pendiente determinar si la sobre-expresión de FABP4 en células de CO incrementa su capacidad migratoria e invasiva. De ser así, además de la reducción en la angiogénesis, la inhibición de FABP4 bloquearía la diseminación peritoneal.

En referencia a **MMP11**, los resultados del análisis de IHQ validaron la sobre-expresión de MMP11 en la M respecto al T que habíamos observado en la fase de validación a nivel de ARN. Concretamente observamos una sobre-expresión estadísticamente significativa en M vs T (tanto a nivel de intensidad como a nivel de porcentaje de células teñidas) en los fibroblastos de las muestras de M en comparación con las de T. En contraste con nuestro estudio, Mueller et al. observó el mismo porcentaje de casos teñidos de T y de M de CO (83%) (429); en nuestro estudio, la gran mayoría de tumores analizados no expresaban MMP11. Por otro lado, Périgny et al. detectó tinción en un 33% de los T y en un 60% de las M de CO (430). No obstante, nuestro estudio es aquel con el que se ha detectado mayor intensidad de sobre-expresión de MMP11 en M respecto a T, por lo que nuestros resultados confirman algunas observaciones previas e indican que la sobre-expresión de MMP11 en M vs T de CO debe de tener un papel importante en la diseminación metastásica del HGSOE. En concordancia con nuestros resultados, se ha descrito que la expresión de MMP11 tiene lugar primordialmente en el citosol de los fibroblastos adyacentes a las células tumorales invasivas (429,430). Esto sugiere que las células cancerosas deben de secretar moléculas que inducen la síntesis de proteasas por parte de los fibroblastos anexos para favorecer la implantación en el peritoneo. De hecho, se ha observado que cuando las células tumorales interactúan con adipocitos peritumorales, inducen la expresión y secreción de MMPs (284). En línea con lo anterior,

probablemente las células tumorales del ovario inducen la expresión de MMP11 por parte de los adipocitos del omento, para favorecer su infiltración. Aparte de tener un papel importante en la implantación tumoral en el peritoneo, MMP11 modifica la ECM para permitir la invasión y diseminación de las células tumorales mediante la remodelación de la ECM (431). Concretamente, aumenta la biodisponibilidad de moléculas de superficie, y activa otras proteasas, factores de crecimiento y citocinas que se encuentran latentes en la ECM (432). La importante producción de MMP11 por parte de los fibroblastos tumorales pone de manifiesto nuevamente la importancia del microambiente tumoral. Las células estromales del tumor tienen un papel vital para el establecimiento y crecimiento de nuevos focos metastásicos (223); participan en la evolución y la progresión tumoral (419). Concretamente, se ha visto que los fibroblastos asociados al tumor secretan factores de crecimiento y citocinas que llevan a un incremento en la angiogénesis, la proliferación, la TEM, la invasión y la metástasis, contribuyendo al mal pronóstico de las pacientes con cáncer (396). Aunque todavía no se conoce el mecanismo de acción de MMP11 en CO, recientemente se ha descrito que la co-expresión de MMP11 con la de COL11A1 en CO y otros carcinomas en estadio avanzado está asociada a la reacción desmoplástica, la invasión y la metástasis agresiva (379). De manera interesante, el clivaje del colágeno VI que realiza MMP11 es clave para desencadenar la reacción desmoplástica del estroma peritumoral (433).

MMP11 presenta múltiples diferencias respecto al resto de MMPs: i) no degrada los sustratos extracelulares clásicos (gelatina, caseína, colágeno, laminina, fibronectina y elastina) (434), sino que procesa sustratos únicos (alfa1-antitripsina, inhibidor de proteinasa alfa-1, IGF-1, IGFBP-1, macroglobulina alfa-2 y colágeno VI) (433,434); ii) puede ser activada intracelularmente y ser secretada como proteasa madura, mientras que el resto de MMPs son siempre secretadas como zimógenos inactivos (435); iii) la regulación de su expresión (436), la actividad proteolítica y sus propiedades enzimáticas son inusuales (434); y, iv) el patrón de expresión se concentra en los fibroblastos asociados al tumor en lugar de las células tumorales (437). Estas peculiaridades sugieren que MMP11 debe de tener un papel único entre el resto de MMPs. Por ello, MMP11 emerge como una nueva diana terapéutica con gran potencial que podría detener la invasión peritoneal asociada al CO.

En resumen, en este estudio hemos identificado y validado unas moléculas que se encuentran sobre-expresadas en M y que apuntan ser prometedoras como nuevas dianas terapéuticas para detener la diseminación del CO. Concretamente, FABP4 y MMP11 han resultado ser los candidatos más robustos que se encuentran altamente expresados en M, y por ello consideramos que es necesario continuar su investigación. En este punto, para determinar la funcionalidad de estos candidatos como dianas terapéuticas, en el laboratorio estamos realizando una serie de ensayos funcionales. Concretamente estamos inhibiendo la expresión de FABP4 y MMP11 a nivel de ARNm en líneas celulares de CO, esperando observar un bloqueo en la migración e invasión de las células tumorales. Posteriormente, si los resultados son prometedores, procederemos a construir líneas celulares de CO que expresen de manera estable las secuencias sh pertinentes para realizar ensayos *in vivo*. De este modo determinaremos si la reducción de la migración e invasión que provoca la inhibición de los candidatos *in vitro* también tiene lugar y se mantiene en un modelo *in vivo*.

La inestabilidad genética del HGSOE (438) es el principal factor que contribuye al desarrollo de la quimiorresistencia, la cual tiene lugar en el 75% de las pacientes de CO (439). En consecuencia, puesto que los componentes del microambiente tumoral son homogéneos a nivel genético y son esenciales para la progresión y la metástasis (440), las terapias dirigidas a componentes estromales – como los fibroblastos y las células endoteliales – se consideran **nuevas estrategias terapéuticas** muy atractivas y prometedoras (441). Actualmente está aceptado que las terapias futuras contra el cáncer no irán únicamente dirigidas a las células

malignas, sino también a las células estromales, ya que pueden ayudar a reducir la quimiorresistencia (442). De hecho, puesto que los niveles elevados de VEGF favorecen el crecimiento y el mantenimiento de los tumores ováricos mediante la inducción de la angiogénesis (241), y se ha visto que este factor pro-angiogénico juega un papel importante en distintos estadios del desarrollo y la metástasis del CO, a día de hoy la principal terapia dirigida que se ha desarrollado y aprobado para tratar el CO en la práctica clínica va dirigida a esta molécula y a su vía de señalización (66,352). No obstante, existe la necesidad de identificar nuevas dianas anti-angiogénicas, ya que las terapias anti-VEGF no son específicas; inhiben otras quinasas de manera inespecífica y desencadenan efectos adversos como la hipertensión arterial, la toxicidad gastrointestinal, el hipotiroidismo, los desórdenes en la coagulación y la neurotoxicidad (443). Además, las terapias anti-VEGF sólo son efectivas en una pequeña proporción de pacientes, pues en la mayoría de los casos, se desarrolla la quimiorresistencia – el tratamiento no es efectivo por la sobre-expresión de VEGF mediante vías alternativas (66). En consecuencia, las terapias anti-VEGF sólo han mejorado levemente la supervivencia de las pacientes de CO (425).

Teniendo en cuenta que 5 de los 7 de los candidatos que seleccionamos inicialmente están asociados de una manera u otra a la angiogénesis – FABP4, PLVAP, GREM1, PXDN y MXRA5 –, éstos podrían ser utilizados como nuevas dianas para desarrollar futuras terapias anti-angiogénicas contra el CO metastásico. Probablemente, la inhibición de estos candidatos serían estrategias más selectivas que compensarían la quimiorresistencia a las terapias anti-VEGF. En este sentido, MMP11 también emerge como una buena diana terapéutica, ya que aunque no se ha descrito una asociación directa con la angiogénesis, la remodelación de la ECM que ejerce MMP11 es vital para la activación y migración de las células endoteliales (432), por lo que MMP11 también podría contribuir a la angiogénesis de manera indirecta. En cualquier caso, el bloqueo de MMP11 sería muy valioso para impedir la implantación y diseminación de las células tumorales en el peritoneo.

Además, consideramos que la aplicación directa en la cavidad abdominal de anticuerpos neutralizantes o inhibidores sintéticos de nuestros candidatos (especialmente FABP4 y MMP11) podría mejorar el curso clínico de las pacientes, ya que esto evitaría la proliferación y diseminación de células tumorales que quedan remanentes a nivel microscópico tras la cirugía. Esto ayudaría a impedir la recidiva y podría mejorar la supervivencia de las pacientes de CO. Actualmente se conocen algunos inhibidores sintéticos que pueden bloquear de manera efectiva la actividad de FABP4 (444,445). En cuanto a MMP11, aunque existen algunos inhibidores sintéticos como el marimastato que neutralizan su actividad, no lo hacen de forma específica (446,447). Por ello, es necesario invertir esfuerzos en el diseño de moléculas que compartan total homología con sus substratos y/o desarrollar anticuerpos altamente específicos para poder neutralizar su actividad biológica de manera selectiva.

En el marco de la medicina personalizada, una estrategia que podría mejorar el **asesoramiento del tratamiento** de las pacientes de CO sería analizar la expresión de los candidatos en la biopsia peritoneal que se extrae en la laparoscopia exploradora y posteriormente, administrar los inhibidores correspondientes a las moléculas alteradas. Dado que nuestros candidatos están asociados a la diseminación agresiva, los niveles elevados indicarían la necesidad de aplicar terapias dirigidas contra estas proteínas. De este modo, el tratamiento se ajustaría a la biología intrínseca del tumor. La combinación de terapias dirigidas a estas proteínas junto con la quimioterapia convencional podría mejorar la supervivencia de las pacientes de CO. Teniendo en cuenta la información que nos proporcionó la base de datos CSIOVDB, nuestros candidatos están asociados al mal pronóstico de la enfermedad a nivel de ARN. Por consiguiente, este estudio anima a explorar en profundidad la utilidad de estos marcadores en la predicción de la supervivencia de las pacientes con HGSOC, pues los

marcadores con valor pronóstico pueden ayudar a identificar los grupos de pacientes que podrían beneficiarse de tratamientos más personalizados en lugar de ser tratados con la quimioterapia estándar.

Cabe destacar que el hecho de haber detectado MUC16 sobre-expresado en nuestro análisis proporciona robustez a nuestros resultados, ya que la proteína CA125, para la cual codifica este gen, es el principal marcador tumoral del CO y es conocido que permite a las células tumorales del ovario expandirse sobre el peritoneo favoreciendo las interacciones con el mesotelio. Además, en este estudio las pacientes con mayor expresión de los candidatos en las M presentaban también los niveles séricos de CA125 más elevados (superiores a 500 U/mL), los cuales están asociados a la dificultad de conseguir la cirugía óptima (92,93). Esto anima a explorar el potencial uso de nuestros candidatos, en combinación con el CA125, como **indicadores de difícil reseccabilidad**, de metástasis peritoneal agresiva.

Respecto al **diagnóstico del CO**, el marcador tumoral CA125 presenta una sensibilidad y especificidad limitadas (89–91), por lo que es evidente la necesidad de incorporar nuevos biomarcadores que permitan mejorar el diagnóstico de la enfermedad. De forma adicional, la incorporación de biomarcadores que permitieran ayudar a definir el abordaje terapéutico (*Companion diagnostics*) sería de gran valor añadido. Teniendo en cuenta que la expresión de FABP4 y MMP11 en ovarios sanos es baja en comparación con la de las metástasis del CO seroso (269) y que ambas proteínas se secretan al medio extracelular y son solubles en fluidos biológicos (448,449), sería probable detectarlas en el plasma de pacientes con HGSOE en estadio avanzado, pero no en el de pacientes sanas. De ser así, la potencial introducción del análisis plasmático de FABP4 y MMP11 en la práctica clínica podría ayudar a mejorar el diagnóstico del CO.

Para estudiar la utilidad de FABP4 y MMP11 como marcadores en el diagnóstico del CO, evaluamos su expresión a nivel de proteína en plasma de 36 pacientes con HGSOE avanzado mediante inmunoblot. Tras observar que su expresión era claramente intensa, comparamos la expresión de los candidatos en plasma de 4 pacientes de HGSOE avanzado con la expresión en plasma de 5 pacientes sanas que no presentaban patología maligna – con masas anexiales sospechosas de malignidad, pero finalmente diagnosticadas como benignas. Esta prueba preliminar indicaba que los niveles de FABP4 y MMP11 eran más elevados en condiciones de CO; la expresión de los candidatos en el plasma de las pacientes control era muy baja o nula. Para confirmar estos resultados, actualmente se está realizando una comparativa a mayor escala, con un mayor número de muestras de cada grupo de pacientes. En este caso, la expresión a nivel de proteína se evalúa mediante una técnica más adecuada para el cribado poblacional, la técnica de ELISA (450). Además, estamos evaluando la expresión de FABP4 y MMP11 en plasma de pacientes de CO en estadios iniciales (I y II) para poder determinar si los niveles ya son detectables en fases tempranas de la enfermedad. La detección de FABP4 y MMP11 ya en este nivel indicaría la presencia de enfermedad, lo cual permitiría mejorar el diagnóstico precoz, en combinación con el CA125 – ya que este marcador sólo es capaz de detectar el 50% de los estadios iniciales (90). Análogamente, también sería interesante estudiar la utilidad de estas proteínas en la monitorización del CO, particularmente en aquellas pacientes que no expresan el marcador CA125.

En conclusión, con este estudio hemos conseguido identificar moléculas que se encuentran altamente expresadas en metástasis de pacientes con HGSOE, indicando un papel importante en la diseminación peritoneal y la angiogénesis. Por consiguiente, esta investigación propone FABP4 y MMP11 como nuevas dianas terapéuticas para bloquear la metástasis del CO y abre las puertas a la mejora del tratamiento de esta enfermedad. De manera adicional, este proyecto también inspira futuros estudios para evaluar el potencial uso de FABP4 y MMP11 en el diagnóstico del CO.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

SECCIÓN I

1. En el marco del descubrimiento de marcadores del cáncer de ovario a partir de muestras poco invasivas, el procedimiento de ultracentrifugación *Estándar* es el protocolo más apropiado para aislar exosomas de la fracción fluida del aspirado uterino, pues permite obtener la mayor concentración de exosomas, la mayor expresión de los marcadores característicos de exosomas (CD63, CD81, CD9, TSG101 y Flotilina-1) y la mayor reproducibilidad.
2. La estrategia más apropiada para aislar exosomas del aspirado uterino para la posterior extracción del ARN exosomal es el procedimiento *Estándar* con la aplicación de ARNasa A tras la ultracentrifugación, sin aplicar la sonicación (procedimiento C).
3. Los exosomas del aspirado uterino presentan ARNm y miARNs específicos relacionados con patologías del tracto genital femenino que pueden ser detectados y cuantificados mediante RT-qPCR.
4. Los exosomas del aspirado uterino emergen como una estrategia prometedora en el descubrimiento de nuevos marcadores a nivel de ARN para mejorar el diagnóstico precoz del cáncer de ovario.

SECCIÓN II

5. En el marco del descubrimiento de moléculas asociadas a la diseminación del cáncer de ovario, los genes que se encuentran sobre-expresados en la metástasis respecto al tumor primario de pacientes de cáncer de ovario están relacionados con el movimiento celular, la señalización y la interacción celular; la vía molecular más representativa es la de las MMPs.
6. En base a la herramienta CSIOVDB, la expresión elevada de 7 candidatos (FABP4, MMP11, INHBA, GREM1, MXRA5, PLVAP y PDXN) está asociada al fenotipo mesenquimal (reacción estromal desmoplástica), a estadios avanzados del cáncer de ovario y a corta supervivencia de las pacientes de cáncer de ovario.
7. Los 7 candidatos se encuentran sobre-expresados a nivel de ARN en la metástasis respecto al tumor primario de pacientes de cáncer de ovario.
8. Las pacientes de cáncer de ovario con los niveles séricos más elevados de CA125 (superiores a 500 U/mL) presentan los niveles más elevados de los candidatos a nivel de ARN, lo cual sugiere su potencial uso como indicadores de difícil reseccabilidad.
9. La expresión de los 7 candidatos correlaciona a nivel de ARN en las muestras de metástasis, pero no en las muestras de tumor primario de pacientes de cáncer de ovario, indicando un mecanismo subyacente que debe de resultar en la activación concomitante de las correspondientes vías de señalización durante el proceso de metástasis.
10. FABP4 y MMP11 emergen como dianas terapéuticas prometedoras para bloquear la metástasis del cáncer de ovario, pues se encuentran sobre-expresados a nivel de proteína en más del 50% de las metástasis respecto al tumor primario de pacientes de cáncer de ovario.
11. FABP4 se encuentra sobre-expresada a nivel de proteína de manera homogénea en el citosol de las células tumorales de las muestras de metástasis en comparación con las muestras de tumor primario de pacientes de cáncer de ovario. Asimismo, se encuentra

Conclusiones

sobre-expresada en las células endoteliales de los vasos tumorales, y su presencia es más extendida en las muestras de metástasis que en las muestras de tumor primario de pacientes de cáncer de ovario.

12.MMP11 se encuentra sobre-expresada a nivel de proteína en el citosol de los fibroblastos tumorales de las muestras de metástasis en comparación con las muestras de tumor primario de pacientes de cáncer de ovario.

13.FABP4 y MMP11 son detectables de manera intensa a nivel de proteína en el plasma de pacientes de cáncer de ovario en comparación con pacientes que presentan masas anexiales benignas, lo cual sugiere su potencial uso en el diagnóstico del cáncer de ovario.

7. ANEXO

7. ANEXO


A continuación se presenta el artículo científico que recoge el trabajo realizado en la Sección I de esta tesis doctoral (*Optimización del procedimiento de aislamiento de exosomas presentes en el aspirado uterino para la futura identificación de nuevos marcadores asociados al cáncer de ovario*), que ha sido publicado en la revista “Journal of Translational Medicine” (Factor de impacto: 3,694) con el título de “*Exosome-like vesicles in uterine aspirates: a comparison of ultracentrifugation-based isolation protocols*” – Campoy, Lanau et al. *J Transl Med* (2016) 14:180.

RESEARCH

Open Access



Exosome-like vesicles in uterine aspirates: a comparison of ultracentrifugation-based isolation protocols

Irene Campoy^{1†}, Lucia Lanau^{1†}, Tatiana Altadill¹, Tamara Sequeiros², Silvia Cabrera³, Montserrat Cubo-Abert³, Assumpció Pérez-Benavente³, Angel Garcia⁴, Salvador Borrós⁵, Anna Santamaria¹, Jordi Ponce⁶, Xavier Matias-Guiu⁷, Jaume Reventós^{1,8,9}, Antonio Gil-Moreno^{1,3‡}, Marina Rigau^{1‡} and Eva Colas^{1,7*†} 

Abstract

Background: Uterine aspirates are used in the diagnostic process of endometrial disorders, yet further applications could emerge if its complex milieu was simplified. Exosome-like vesicles isolated from uterine aspirates could become an attractive source of biomarkers, but there is a need to standardize isolation protocols. The objective of the study was to determine whether exosome-like vesicles exist in the fluid fraction of uterine aspirates and to compare protocols for their isolation, characterization, and analysis.

Methods: We collected uterine aspirates from 39 pre-menopausal women suffering from benign gynecological diseases. The fluid fraction of 27 of those aspirates were pooled and split into equal volumes to evaluate three differential centrifugation-based procedures: (1) a standard protocol, (2) a filtration protocol, and (3) a sucrose cushion protocol. Characterization of isolated vesicles was assessed by electron microscopy, nanoparticle tracking analysis and immunoblot. Specifically for RNA material, we evaluate the effect of sonication and RNase A treatment at different steps of the protocol. We finally confirmed the efficiency of the selected methods in non-pooled samples.

Results: All protocols were useful to isolate exosome-like vesicles. However, the Standard procedure was the best performing protocol to isolate exosome-like vesicles from uterine aspirates: nanoparticle tracking analysis revealed a higher concentration of vesicles with a mode of 135 ± 5 nm, and immunoblot showed a higher expression of exosome-related markers (CD9, CD63, and CD81) thus verifying an enrichment in this type of vesicles. RNA contained in exosome-like vesicles was successfully extracted with no sonication treatment and exogenous nucleic acids digestion with RNaseA, allowing the analysis of the specific inner cargo by Real-Time qPCR.

Conclusion: We confirmed the existence of exosome-like vesicles in the fluid fraction of uterine aspirates. They were successfully isolated by differential centrifugation giving sufficient proteomic and transcriptomic material for further analyses. The Standard protocol was the best performing procedure since the other two tested protocols did not ameliorate neither yield nor purity of exosome-like vesicles. This study contributes to establishing the basis for future comparative studies to foster the field of biomarker research in gynecology.

Keywords: Biomarker, Endometrial biopsy, Exosomes, Exosomes isolation protocols, Exosome-like vesicles, Extracellular vesicles, Gynecological disorders, Microvesicles, RNA, Uterine aspirates

*Correspondence: ecolas@irbllleida.cat

[†]Irene Campoy and Lucia Lanau contributed equally to this work

[‡]Antonio Gil-Moreno, Marina Rigau and Eva Colas are co-senior authors

⁷ Department of Pathology and Molecular Genetics/Oncologic Pathology Group, University Hospital Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRBLleida, Lleida, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 The Author(s). This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Uterine aspirates (UAs), which are endometrial biopsies obtained by aspiration, are considered a very complex biological sample that highly represents the uterine cavity milieu. It combines the components of the uterine fluid (secretions from the luminal epithelium and glands, proteins selectively transferred from blood, and likely contributors from tubal fluid) with a cellular fraction (endometrial and blood cells) [1]. Thanks to its location and composition, UAs reflect cytological and molecular alterations present in tissues from the female genital tract [2, 3]. Therefore, this sample is currently used for histopathological examination, performed after the transvaginal ultrasonography, to diagnose endometrial disorders [4, 5]. Biomedical research on UAs is limited. However, although few molecular studies have been performed, those have significantly contributed to improving sensitivity and negative predictive value of UAs as a diagnostic tool for endometrial cancer [2, 3, 6]. To expand research in the field of biomarker discovery for gynecological pathologies using UAs, exosome-like vesicles (EVs) arise as a promising source of biomarkers.

EVs are 20–200 nm round membrane vesicles [7–9] released by multivesicular bodies fusing with the cell membrane [10, 11]. These lipid bilayer entities bear well-protected proteins, lipids, and RNAs, mediating intercellular communication between different cell types [12–15]. Specific sorted information is horizontally transferred from the cells of origin to other cells, influencing the recipient cell functions [16]. EVs are constantly released by cells in circulation or proximal body fluids, and therefore, they have been described in blood [17], urine [18], saliva, and breast milk [19], among other body fluids. Differently, microvesicles (MVs) are 100–1000 nm vesicles originated by budding/shedding of the plasma membrane [20]; their size range overlaps partially with that of EVs, hence hindering a complete size-discrimination between these two populations of extracellular vesicles [21, 22]. The features of EVs have fostered biomarker research in many diseases [16, 23–25]. However, a major bottleneck when performing EVs-based studies is the lack of standardization for already challenging techniques to isolate and characterize EVs. Since EVs reflect the status of the originating cell [23], we propose the UAs' fluid fraction as a promising source of EVs to find molecules that could improve the diagnosis, prognosis, and treatment of gynecological alterations. Here, we aim to determine whether EVs exist in UAs and to compare protocols for their isolation, characterization, and further RNA analysis.

Methods

Sample collection and processing

A total of 39 pre-menopausal patients with benign gynecological diseases or healthy donors who came to

the Unit of Gynecology at Vall Hebron University Hospital were recruited following the ethically approved protocol for this study (approval number: PR_AMI_50-2012). All patients signed the informed consent. A description of the clinic-pathological features of all participating patients is detailed in Additional file 1: Table S1. An inclusion criterion was pre-menopause. Women who had been treated previously for gynecological pelvic cancer, as well as patients positive for the human immunodeficiency virus and/or the hepatitis virus were excluded.

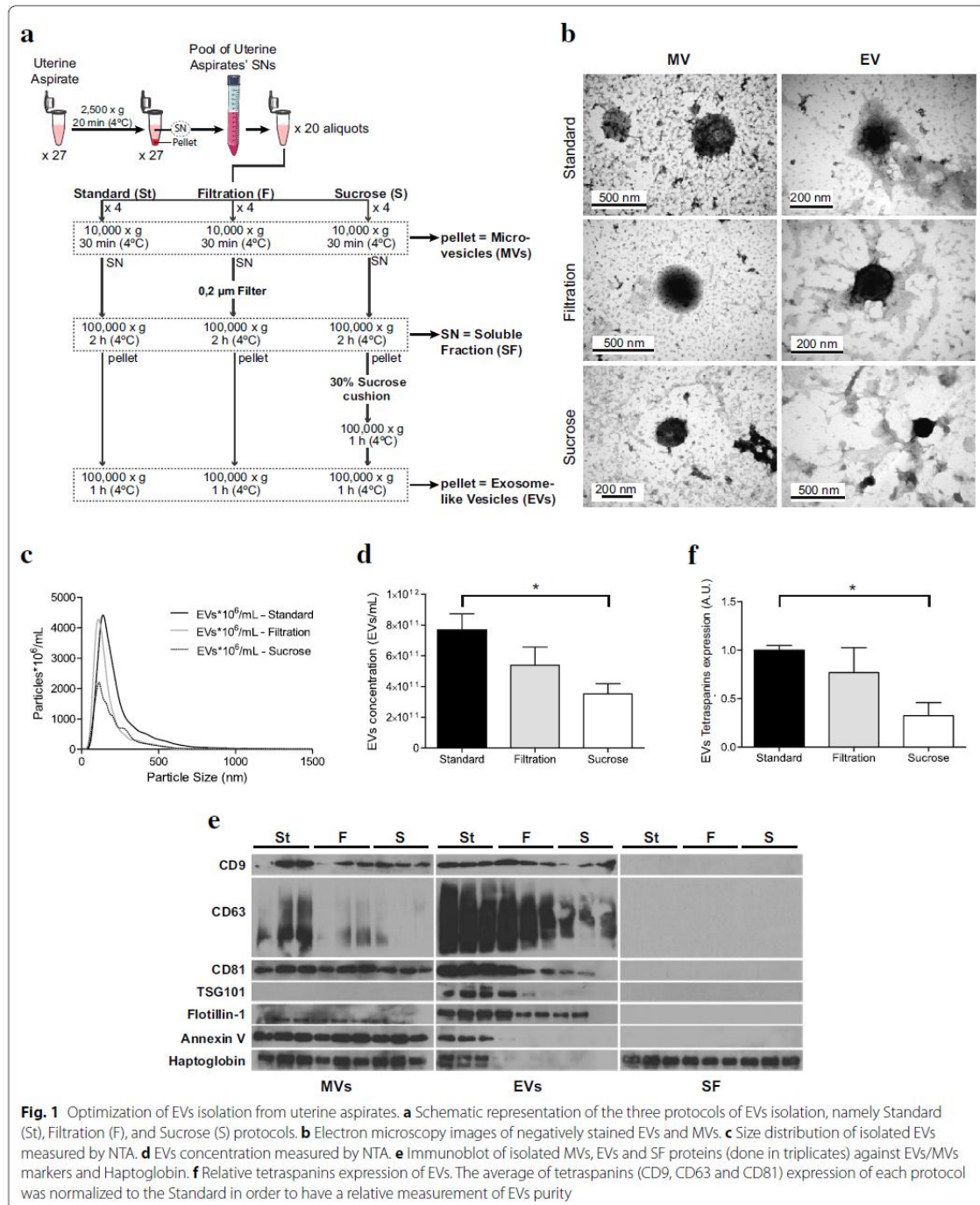
UAs were obtained by aspiration with a Cornier Pipelle (Gynetics Medical Products). Samples were placed in 1.5 mL tubes and kept on ice through all the processing which included addition of phosphate buffered saline (PBS) in a 1:1 ratio (v/v), gently pipetting of the sample and centrifugation at 2500g (4 °C) in a F45-30-11 rotor (Eppendorf Microcentrifuge 5417R) for 20 min to remove the cellular fraction. The remaining fluid fraction of the UA, from now on referred to as Supernatant (SN) fraction, was then aliquoted and frozen at –80 °C until needed. To compare isolation protocols, a pool of 27 SNs (samples 1–27; Additional file 1: Table S1) were mixed and divided into 20 aliquots containing 445 µL.

Isolation of EVs

Protocols described in sections “I”, “II”, and “III” (Fig. 1a) were performed in quadruplicates to optimize EVs isolation. To optimize miRNA/mRNA extraction, modifications of the Standard protocol were tested in duplicates—section “IV” (Fig. 3a).

Standard protocol

EVs were obtained from the SNs of UAs by differential centrifugation, following a modification of a previously described EVs isolation protocol by They et al. [26]. Briefly, SNs were thawed and diluted in PBS to a final volume of 25 mL. A centrifugation step at 10,000g (4 °C) for 30 min was performed on a Thermo Scientific Heraeus MultifugeX3R Centrifuge (FiberLite rotor F15-8x-50c) to remove cell debris, macroparticles and apoptotic bodies. The resulting pellet enriched in MVs was resuspended in 50 µL of PBS and frozen at –80 °C. Then, the supernatant was transferred to ultracentrifuge tubes (Beckman Coulter) and filled with PBS to perform a first ultracentrifugation step at 100,000g (4 °C) for 2 h on a Thermo Scientific Sorvall WX UltraSeries Centrifuge with an AH-629 rotor. The supernatant of this second centrifugation was the soluble fraction and was frozen at –80 °C. This first pellet was resuspended in PBS and again centrifuged at 100,000g (4 °C) for 1 h. The final pellet enriched in EVs (possibly along with MVs and some remaining apoptotic bodies) was resuspended in 50 µL of PBS. Five microliters from MVs and EVs pellets were reserved at –80 °C for



particle size distribution and quantification by nanoparticle tracking analysis (NTA) while the rest of the sample was frozen at -80°C for protein extraction.

Filtration protocol

The Filtration protocol consisted in depleting the supernatant obtained after the 10,000g centrifugation of structures bigger than 200 nm using a sterile filter (Corning). The rest of the protocol remains the same as for the Standard.

Sucrose cushion protocol

A 30 % sucrose cushion (20 mM Tris-HCl, pH 7.4 in D_2O)—density from 1.13–1.19 g/mL—was introduced to the Standard protocol following the first ultracentrifugation at 100,000g. The sucrose cushion was then centrifuged for 1 h at 100,000g (4°C). EVs were recovered by poling the tube with a needle and were then washed with PBS for 1 h at 100,000g (4°C). The final pellet was resuspended in 50 μL of PBS and the same fractions as in Section “I” were stored at -80°C .

Experimental conditions for RNA extraction

Four experimental conditions (“A”, “B”, “C” and “D”) derived from the Standard protocol were tested, including sonication and RNase A treatment at different points, as shown in Fig. 3a. EVs were sonicated five cycles of 5 s at 100 Amplitude (Sartorius). For RNase A treatment, EVs were incubated with 500 μL of 0.1 mg/mL RNase A (Qiagen) for 1 h at 37°C .

Particle size distribution and quantification

NTA was performed using a NanoSight LM10 system (Malvern Instruments) equipped with a 405 nm laser and a Hamamatsu C11440 ORCA-Flash2.8 camera (Hamamatsu). Data was analyzed with the NTA software 2.3. Size and concentration of particles were determined by the following settings: camera level and detection threshold were set to maximum (15 or 16) and minimum (3–5), respectively; camera gain was set to 512; blur, minimum track length, and minimum expected size were set to “auto.” Readings were taken in triplicates during 60 s at 18.87 frames/s, at room temperature ranging from 23–25 $^{\circ}\text{C}$.

Electron microscopy

Isolated MVs and EVs were analyzed per duplicate by transmission electron microscopy (TEM). Vesicles were fixed in 50 μL of 4 % paraformaldehyde. Gold grids were incubated with samples for 1 min. After removing sample excess, negative staining was performed by incubation with uranyl acetate for 1 min. After washing, grids were dried overnight at room temperature. Samples were

observed with a transmission electron microscope JEOL 1010 coupled to an Orius CCD camera (Gatan, Inc.), working at 80 kV with a tungsten filament.

Protein extraction

Protein extraction of EVs and MVs was performed by adding RIPA buffer (40 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2 % Triton X-100, 1:100 protease inhibitors (#P8340 Sigma-Aldrich) in 1:1 ratio (v/v) to isolated vesicles and incubating at -20°C overnight. Lysates were thawed on ice and sonicated five cycles of 5 s at amplitude 100 (Labsonic M, Sartorius Stedim Biotech) to ensure membrane disruption. Protein extraction of the soluble fraction collected after the 2 h ultracentrifugation step was performed by precipitation with 100 % stock solution of acetonitrile at a ratio of 1:5 (v/v) after incubation at -20°C overnight, and sequential centrifugations at $14,000\times g$ 4°C for 30 and 15 min, respectively. Finally, the pellet was dried and resuspended in 500 μL of RIPA. Protein concentration was determined by Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) following manufacturer’s recommendations.

Immunoblot

Proteins were separated by 10 % SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. For blocking, membranes were soaked in 5 % non-fat dried milk in TBS-Tween20 (0.01 %). Proteins were immunodetected using primary antibodies. Then the membranes were washed and incubated with a secondary HRP-coupled antibody. Finally, HRP signal was revealed using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (ref. WBKLS0100; Merck Millipore). The intensity of the bands was densitometrically quantified using the Image J software (v. 1.45s).

Primary antibodies: mouse anti-CD9 (1:250; ref. 555370, BD Biosciences), mouse anti-CD63 (1:1000; ref. OP171, Calbiochem), mouse anti-CD81 (1:1000; ref. sc-166028, Santa Cruz), mouse anti-TSG101 (1:500; ref. Ab83, Abcam), mouse anti-Flotillin-1 (1:250; ref. 610821, BD Biosciences), rabbit anti-Annexin V (1:1000; ref. ab108321, Abcam) and mouse anti-Haptoglobin (1:1000; ref. ab13429, Abcam). Secondary antibodies: rabbit anti-mouse Immunoglobulins/HRP, 1:2000, ref. P0260, Dako; and goat anti-rabbit Immunoglobulins/HRP, 1:2000, ref. P0448, Dako. Bands’ intensity was quantified using the Image J software (v. 1.45s).

Total RNA extraction

Total RNA, including miRNAs and other RNAs, was isolated using Qiazol and miRNeasy MiniKit (Qiagen) according to manufacturers’ protocol. DNase I treatment (Qiagen) was used. RNA from EVs and MVs was eluted with 20 μL of Nuclease-free water (Ambion) and stored at

–80 °C until further analysis. In all RNA extractions performed, 25 nmol of synthetic nonhuman miRNA-39 from *Caenorhabditis elegans* (cel-mir-39, 5'-UCACCGGGUG UAAAUCAGCUUG-3') was added to each Qiazol lysate as a spike-in control for normalization in quantitative Real-Time qPCR (RT-qPCR) analysis [27–29]. RNA concentration and integrity were determined by capillary electrophoresis using the Agilent RNA6000PicoKit on an Agilent2100 Bioanalyzer (AgilentTechnologies).

Reverse transcription, pre-amplification, and RT-qPCR

For mRNA analysis, RNA was converted to cDNA using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). For miRNA analysis, RNA was reverse-transcribed using TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit and miRNA-specific stem-loop primers. All cDNA was pre-amplified with TaqMan Preamp Master Mix Kit (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions.

RT-qPCR was performed using TaqMan Universal MasterMix II, with UNG on an ABI7900 Real-Time PCR Systems with TaqMan probes against specific transcripts and miRNAs. Reactions were performed in triplicate, and only results with a standard deviation value <0.37 were accepted. Data analysis was done with Expression Suite Software v1.0; the same baseline and threshold were set for each plate to generate threshold cycle (Ct) values for all the targets in each sample. Threshold levels were set into the exponential phase of the RT-qPCR. Synthetic cel-mir-39 was used for data normalization since the same amount of the oligonucleotide was added to each sample before the addition of the lysis reagent for RNA isolation.

Real-Time qPCR TaqMan probes

All probes were purchased from LifeTechnologies. TSG101 (Hs00173072), PDCD6IP-ALIX (Hs00183813_m1), CD24 (Hs02379687), MUC16-CA-125 (Hs01065189), MUC1 (Cf02626759_m1), 18S (4319413E), β -Actin (4333762T), GAPDH (Hs99999905_m1), miR-200b (002251), miR-200c (002300), miR-223 (002295), miR-141 (000463), miR-205 (000509), miR-17 (002308), miR-106a (002169), RNU48 (001006), RNU6B (001093), RNU44 (001094), U75 (001219), and miR-39 (000200).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software. The Student's t test was applied to compare means of EVs concentration, particle size distribution, and expression of tetraspanins and miRNAs. The Pearson's Rho test was used to analyze correlation. The probability of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

EVs are present in the fluid fraction of uterine aspirates and can be isolated by differential centrifugation-based protocols

A pool of 27 UAs' fluid fractions was used to compare three EVs isolation protocols based on differential centrifugation—Standard, Filtration and Sucrose. In addition to EVs, we collected fractions corresponding to MVs and proteins from the soluble fraction to monitor differences in the enrichment in EVs. A schematic representation of the experimental work is depicted in Fig. 1a.

All three protocols permitted the isolation of EVs of the expected round cup shape [30], as observed by TEM (Fig. 1b). Both EVs and MVs appeared as well-defined bilayer vesicles but notably, the size of all EVs was smaller than that for MVs, especially in the case of Standard protocol. To further investigate EVs concentration and size distribution, samples were analyzed by NTA (Fig. 1c, d). The population of EVs isolated by the Standard and Filtration protocols followed a uniform size distribution with a unique peak corresponding to a mode of 135 ± 5 and 115 ± 3 nm, respectively. For the Sucrose protocol, the distribution was not uniform; the mode was 135 ± 42 nm but presented an additional peak around 300 nm, and a high standard deviation was observed indicating less reproducibility of this isolation protocol. Differently, all MVs preparations presented a heterogeneous distribution, and a lower concentration than that for EVs (Additional file 2: Figure S1).

A reduction in EVs concentration was seen as more steps were added to the isolation protocol; significant differences were observed between Standard and Sucrose protocols ($p = 0.029$), and the same tendency was observed when comparing the Standard and Filtration protocols (Fig. 1d). To evaluate the purity of EVs obtained from each isolation protocol, we performed an immunoblot loading equal amounts of protein, and demonstrated that the expression of the tetraspanins CD63, CD9, and CD81—all considered late endosomal markers enriched in EVs [22, 31, 32]—was significantly higher in the Standard compared to the Sucrose protocol ($p = 0.001$) (Fig. 1e, f). The same tendency was observed for TSG101, a known endosomal origin marker [33], and Flotillin-1, an element of the membrane lipid rafts [34, 35]. These two markers were practically undetectable in MVs preparations, indicating a different biogenesis of these vesicles. As expected, Annexin V, a marker of MVs [36], was highly expressed in all MVs preparations; however, it was also detected in EVs derived from the Standard protocol suggesting that the smallest MVs populations might have precipitated at 100,000g or that specificity of this marker is arguably. None of the MVs or EVs markers were detected in the soluble fraction, but

haptoglobin—an abundant protein found in blood—was highly expressed (Fig. 1e).

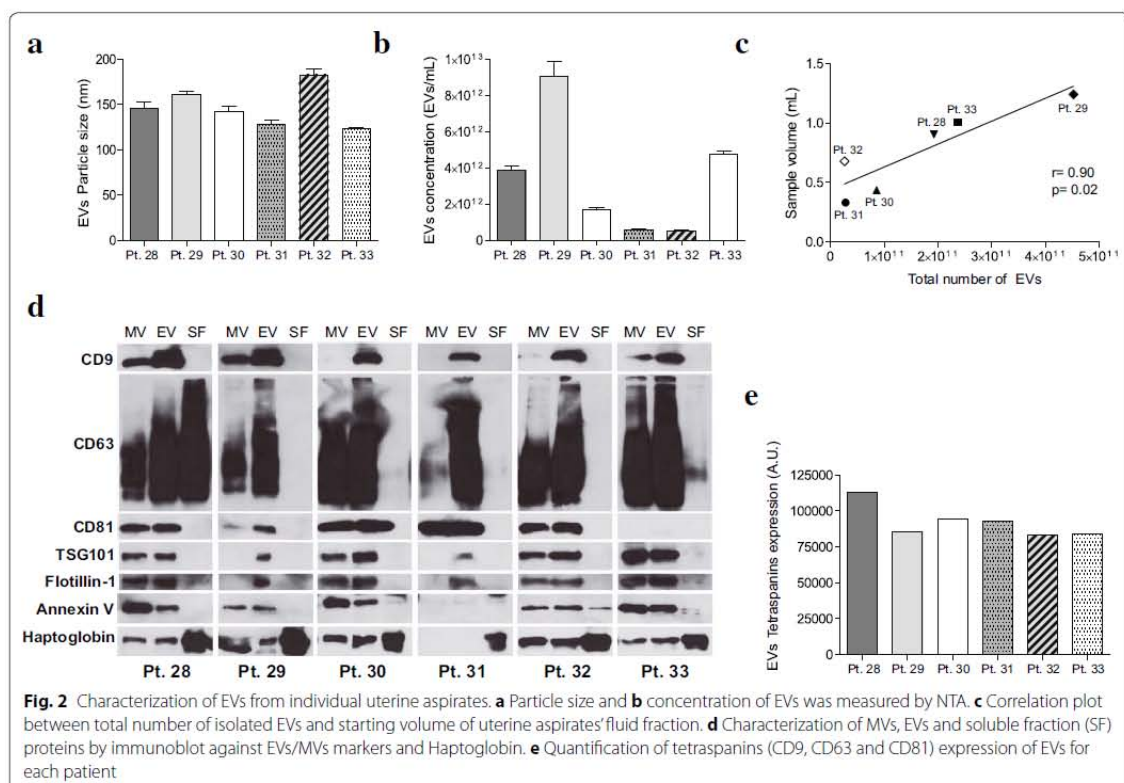
Altogether, we demonstrated that all protocols were able to enrich the sample in EVs. Nevertheless, we selected the Standard protocol for further applications since it allowed to obtain a higher EVs concentration, while maintained higher EVs-related markers and better reproducibility than the other tested protocols.

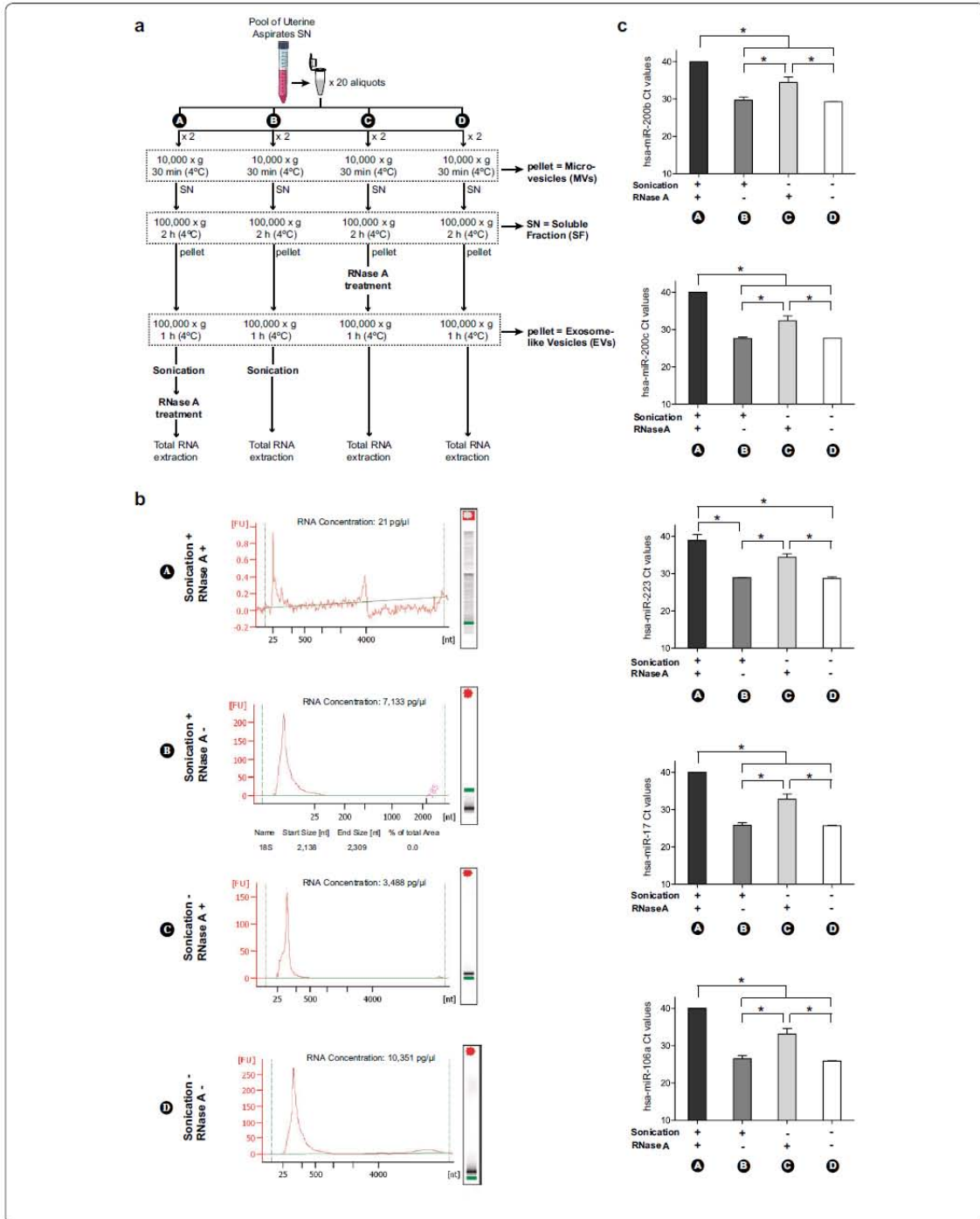
To confirm that the enrichment in EVs following the Standard protocol holds when analyzing individual samples, we recovered EVs, MVs and soluble proteins from the fluid fraction of 6 non-pooled UAs (samples 28–33, Additional file 1: Table S1). Concomitant to our previous observations in the pooled analysis, we observed that all EVs preparations from individual UAs had a similar size distribution, presenting a mode of 120–160 nm (Fig. 2a). The particles concentration differed clearly between patients but a total number of isolated EVs significantly correlated with the initial volume of UAs fluid fraction ($r = 0.90$, $p = 0.02$) (Fig. 2b, c), but not with protein concentration (Additional file 3: Figure S2). On the other hand, no correlation was observed between a number of MVs and sample volume (Additional file 4: Figure S3).

EVs markers were expressed in both EVs and MVs preparations from all patients (Fig. 2d, e). As seen previously, tetraspanins expression was higher in EVs than in MVs, indicating that we isolated a population of vesicles enriched in EVs. Altogether, these results indicate that the Standard protocol is suitable to obtain EVs from individual UAs.

Optimization of EVs isolation protocols for RNA analysis

To further optimize the Standard protocol to extract RNA specifically contained in EVs, we evaluated the effect of sonication and RNase treatment, which enhances membrane disruption and promotes RNA release, and degrades RNA material, respectively (Fig. 3a). Concentration and quality of extracted RNA was determined by Bioanalyzer and RT-qPCR amplification of a set of miRNAs (miR-200b, miR-200c, miR-223, miR-17 and miR-106a), which were selected based on their expression in the female genital tract and their reported existence in EVs [22, 37–40]. Protocol “A”, which includes sonication before RNase A treatment, was used as negative control. This condition confirmed the successful breakage of EVs due to sonication and the successful degradation





(See figure on previous page.)

Fig. 3 Optimization of EVs isolation from uterine aspirates for RNA analysis. **a** Schematic representation of the four conditions tested to isolate EVs from uterine aspirates in order to purify their RNA content. Modifications were introduced to the standard protocol of ultracentrifugation. Protocol "A": Sonication prior to RNase A treatment was applied to isolated EVs. Protocol "B": Sonication of isolated EVs. Protocol "C": RNase A treatment of isolated EVs. Protocol "D": No modifications were included. **b** Concentration and quality of RNA derived from each condition was analyzed with an Agilent Bioanalyzer. **c** Ct values of miR-200b, miR-200c, miR-223, miR-205, miR-17 and miR-106a are plotted for each Protocol

of RNA due to RNase A treatment, not obtaining RNA content nor amplification of any of the tested miRNAs (Fig. 3b, c). Protocols "B" and "D" did not deplete external RNA since RNase A was not applied; both protocols resulted in small size RNA profiles, yielding the highest amount of total RNA (Fig. 3b) and the highest expression of miRNAs (Fig. 3c). Importantly, the introduction of a sonication step did not report any advantage to enhance the release of EVs RNA content; conversely, we observed smaller RNA fragments, which are susceptible of RNA damage. In protocol "C", RNase A was able to degrade 52 and 66 % of total RNA from treatment "B" and "D" respectively, suggesting that RNase A treatment is necessary to clean up the external nucleic acids that bind to EVs surface. This protocol (no sonication but RNase A treatment) was selected as the most appropriate to analyze RNA specifically contained within EVs.

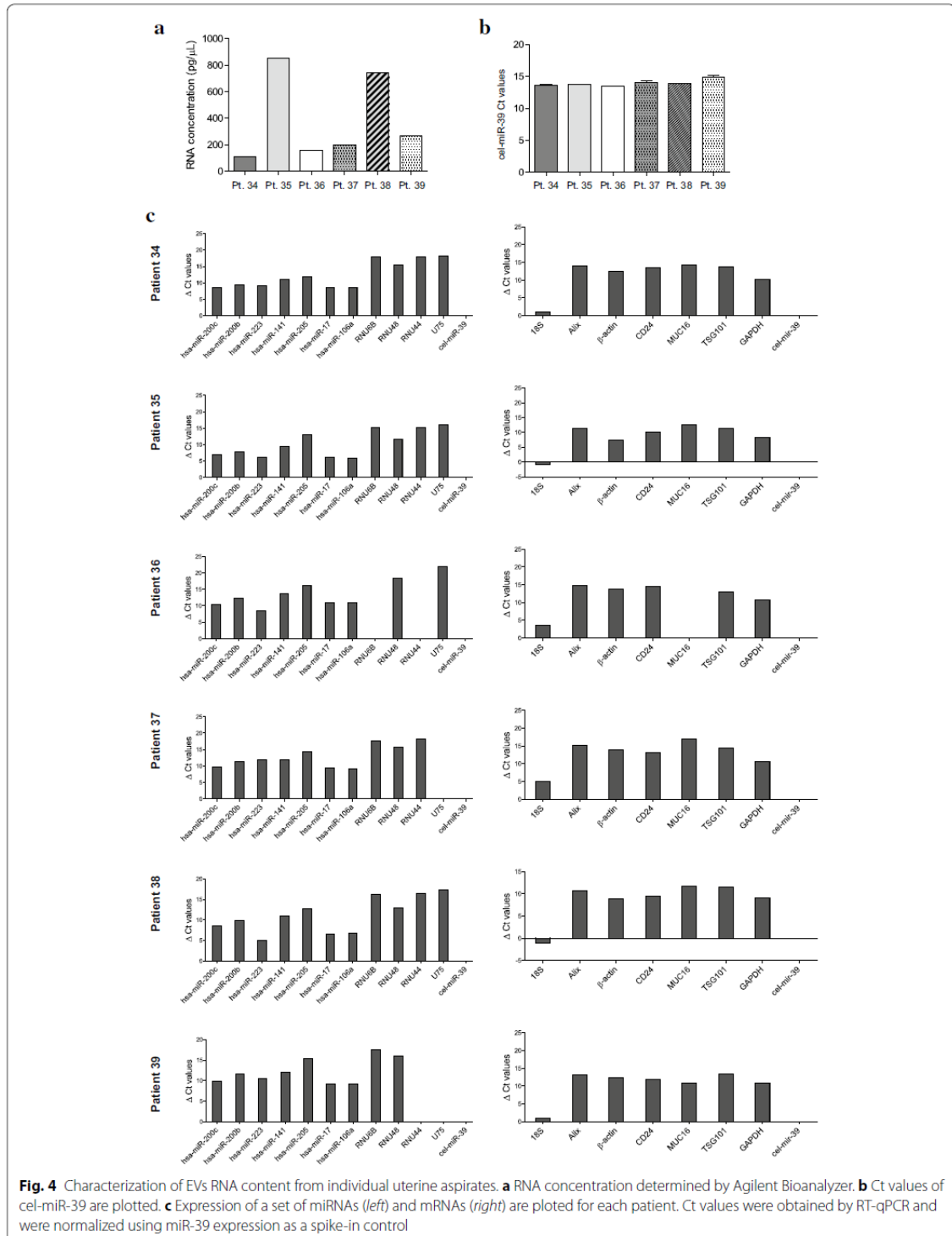
Next, we confirmed the efficiency of the selected protocol for RNA analysis in 6 additional non-pooled samples (Samples 34–39; Additional file 1: Table S1). Isolated EVs were similar in size, presenting a mode of 120–170 nm and contained RNA fragments from 25–300 nucleotides (Additional file 5: Figure S4). RNA concentration ranged from 108–851 pg/ μ L (Fig. 4a), which was sufficient to perform expression analysis by RT-qPCR. Sample volume, the total number of EVs and RNA concentration significantly correlated (Additional file 6: Figure S5A–C). Before RNA extraction, we added cel-miR-39 as a spike-in control for data normalization purposes. As seen in Fig. 4b, its expression did not vary across different samples, indicating similar RNA extraction efficiency. Afterward, we tested the amplification of a set of 11 miRNAs and 8 mRNAs by RT-qPCR, all of them previously reported in EVs [41, 42] (Fig. 4c). Delta Ct (dCt) values were relativized to the cel-miR-39 expression in each sample. We observed that 18S RNA presented the highest expression. Alix, TSG101, GAPDH and β -actin, EVs-related markers, along with MUC16 [43] and CD24 [44–46], proteins related to some gynecological alterations, were detected at RNA level. In addition to those tested for the optimization, we also analyzed the expression of other female genital tract-related miRNAs [38], miR-141 and miR-205, plus a set of tissue endogenous miRNAs [47], RNU6B, RNU48, RNU44, and U75. Expression of miR-200b, miR-200c, miR-223, miR-17, and miR-106a was higher compared

to miR-205 and miR-141. Interestingly, RNU6B, RNU48, RNU44, and U75 were expressed at very low level in EVs. Detection of female genital tract associated RNA in EVs from UAs supported the idea that EVs cargo might reflect the cell status and/or its origin. However, this study was designed to confirm the appropriate extraction of RNA material to pursue further RNA analysis on EVs isolated from UAs, and is not intended to draw any disease-specific conclusion.

Discussion

Here, we demonstrated that EVs exist in the fluid fraction of UAs by comparing three protocols of isolation, all of them based on ultracentrifugation, as this has been the method of choice for concentrating and isolating EVs in several body fluids [48]. Moreover, we carried out an extensive characterization describing their morphology, size and enrichment in well-known EV markers. When comparing the Standard, Filtration, and Sucrose protocols, we observed that all of them were capable of isolating EVs; but in particular, the Standard protocol permitted not only a higher recovery of EVs, but also a higher enrichment in tetraspanins. Furthermore, this protocol was the simplest, most reproducible and less costly protocol investigated here.

Many studies did not consider whether identified RNAs were contained in EVs or adhered externally to their outer membrane and, consequently, co-precipitated with EVs during the isolation protocol [49–51]. Here, we also established the optimal conditions to extract EVs RNA content treating isolated vesicles with RNase A and not applying sonication. Even though sonication was applied to successfully disrupt EVs membrane to improve protein yield [52], when this step was performed for RNA extraction, far from obtaining higher RNA concentration, we detected fragmentation and degradation. Thus, sonication of EVs is not appropriate for RNA studies; lysis reagent is efficient enough to break EVs membranes. Noteworthy, treatment with RNase A was critical to eliminate the exogenous material while preserving the inner genomic content. We found that more than half of the RNA isolated from EVs preparations was exogenous. This abundant contamination should be considered, and if possible depleted when conducting transcriptomic studies. In line with this, a treatment to clean up EVs membranes from extraneous adhered



proteins could have been tested. Trypsin is often used to break protein interactions; this property could be applied to analyze those proteins specifically contained in EVs. However, considering that the main EVs markers and possibly other proteins of interest are transmembrane structures, this digestion could affect the extracellular domains compromising protein structure, function and interaction with other proteins.

A wide range of different uterine specimens collected by various procedures is described in the literature [53–57]. Concomitant with our observation that female genital tract RNAs are detected in EVs from UAs, Vilella et al. proved that EVs isolated from endometrial fluids are certainly secreted by the endometrial epithelium cells, and consequently, their content may reflect the physiologic state of the uterine cavity. Importantly, these findings promote the use of EVs in UAs to search for those alterations that may originate from anomalous cells in the female genital tract, as the same rationale has been performed in other body fluids, such as bronchoalveolar lavage fluid of asthmatic patients [58] and urine of prostate cancer patients [59].

Conclusions

We confirmed the existence of exosome-like vesicles in the fluid fraction of uterine aspirates. They were successfully isolated by differential centrifugation giving sufficient proteomic and transcriptomic material for further analyses. The Standard protocol was the best performing procedure since the other two tested protocols did not ameliorate neither yield nor purity of exosome-like vesicles. Certainly, our study contributes to standardize protocols and opens the door to conduct reliable and reproducible comparative studies using EVs isolated from UAs to foster the field of biomarker research in gynecology shortly.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Clinical and pathological features of patients. Age, diagnosis and starting volume of uterine aspirates' fluid fraction are detailed. Samples 1–27 were pooled to compare EVs isolation protocols; samples 28–33 were individually used for EVs characterization by NTA and immunoblot; and samples 34–39, for the analysis of RNA content.

Additional file 2: Figure S1. Size distribution of isolated MVs, all of them collected at the same point in each protocol.

Additional file 3: Figure S2. Correlation plot between total number of isolated EVs and EVs protein concentration.

Additional file 4: Figure S3. Correlation plot between total number of isolated MVs and starting volume of uterine aspirates' fluid fraction.

Additional file 5: Figure S4. (A) Correlation plot between total number of EVs and sample volume. (B) Correlation plot between total number of EVs and EVs RNA concentration. (C) Correlation plot between EVs RNA concentration and sample volume.

Additional file 6: Figure S5. Concentration and quality of RNA derived from each individual uterine aspirate was analyzed with an Agilent Bioanalyzer.

Abbreviations

UAs: uterine aspirates; EVs: exosome-like vesicles; RNA: ribonucleic acid; MVs: microvesicles; PBS: phosphate buffered saline; SN: supernatant; miRNA: micro ribonucleic acid; mRNA: messenger ribonucleic acid; NTA: nanoparticle tracking analysis; RNase: ribonuclease; TEM: transmission electron microscopy; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; PVDF: polyvinylidene fluoride; TBS: tris-Buffered Saline; HRP: horseradish peroxidase; DNase: deoxyribonuclease; qPCR: quantitative polymerase chain reaction; cDNA: complementary DNA; Ct: threshold cycle; dCt: delta threshold cycle.

Authors' contributions

IC, LL, AGM, MR and EC designed the study. SC, MC, XMG, JP and AP obtained the endometrial biopsies. IC, LL and TA collected and processed the uterine aspirates. IC, LL and TS optimized protocols for exosome's isolation. TA performed RTqPCRs. IC and LL performed all the experiments. LL did the data analysis. SB monitored Nanosight experiments. IC, LL and EC wrote the paper. MR, AS, SC and AGM critically revised the manuscript. AG and JR financed the study. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Biomedical Research Group in Gynecology, Vall Hebron Institute of Research (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ² Biomedical Research Group in Urology, Vall Hebron Institute of Research (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ³ Department of Gynecology, Vall Hebron University Hospital, Barcelona, Spain. ⁴ Pathology Department, Vall Hebron University Hospital, Barcelona, Spain. ⁵ Grup d'Enginyeria de Materials (GEMAT), Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, Barcelona, Spain. ⁶ Department of Gynecology, Bellvitge Teaching Hospital, Barcelona, Spain. ⁷ Department of Pathology and Molecular Genetics/Oncologic Pathology Group, University Hospital Arnau de Vilanova, University of Lleida, IRBLeida, Lleida, Spain. ⁸ Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Hospital de Llobregat, Barcelona, Spain. ⁹ Basic Sciences Department, International University of Catalonia, Barcelona, Spain.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the work that has been done by all clinicians that have participated in the recruitment of clinical samples. We thank the patients for their willingness to participate in the study.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval and consent to participate

A total of 39 pre-menopausal patients with benign gynecological diseases or healthy donors who came to the Unit of Gynecology at Vall Hebron University Hospital were recruited following the ethically approved protocol for this study (approval number: PR_AMI_50-2012). All patients signed the informed consent.

Funding

This work was supported by the Spanish Ministry of Health (RD12/0036/0035), the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (PI14/02043), the "Fondo Europeo de Desarrollo Regional" FEDER (RTC-2014-3110-1), the AECC (Grupos Estables de Investigación 2011 - AECC- GCB 110333 REVE), the Fundació La Marató TV3 (2/C/2013), the CIRIT Generalitat de Catalunya (2014 SGR 1330) and the European Commission, 7th Framework Programme, IRSES (PROTBIOFLUID –269285)—Belgium. AGAUR (2014F1_B1 00014) granted Ms. Lanau, the Instituto Carlos III (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness) supported Dr. Santamaria (CP13/00158) by the Miguel Servet program, and the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (FPDI-2013-18322) granted Dr. Colás.

Received: 28 March 2016 Accepted: 2 June 2016

Published online: 18 June 2016

References

1. Salamsen LA, Edgell T, Rombauts LJF, Stephens AN, Robertson DM, Rainczuk A, Nie G, Hannan NJ. Proteomics of the human endometrium and uterine fluid: a pathway to biomarker discovery. *Fertil Steril*. 2013;99(4):1086–92.

2. Colas E, Perez C, Cabrera S, Pedrola N, Monge M, Castellvi J, Eyzaguirre F, Gregorio J, Ruiz A, Llaurodo M, Rigau M, Garcia M, Ertekin T, Montes M, Lopez-Lopez R, Carreras R, Xercavins J, Ortega A, Maes T, Rosell E, Doll A, Abal M, Reventos J, Gil-Moreno A. Molecular markers of endometrial carcinoma detected in uterine aspirates. *Int J Cancer*. 2011;129(10):2435–44.
3. Esteller M, Garcia A, Martínez-Palones JM, Xercavins J, Reventós J. Detection of clonality and genetic alterations in endometrial pipelle biopsy and its surgical specimen counterpart. *Lab Invest*. 1997;76(1):109–16.
4. Rodolakis A, Biliatis I, Morice P, Reed N, Mangler M, Kesic V, Denschlag D. European society of gynecological oncology task force for fertility preservation: clinical recommendations for fertility-sparing management in young endometrial cancer patients. *Int J Gynecol Cancer*. 2015;25(7):1258–65.
5. Colombo N, Preti E, Landoni F, Carinelli S, Colombo A, Marini C, Sessa C. Endometrial cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24(SUPPL):6.
6. Perez-Sanchez C, Colas E, Cabrera S, Falcon O, Sanchez-del-Río A, García E, Fernández-de-Castillo L, Muruzabal JC, Alvarez E, Fiol G, González C, Torrejón R, Moral E, Campos M, Repollés M, Carreras R, Jiménez-López J, Xercavins J, Aibar E, Perdones-Montero A, Lalanne E, Palicio M, Maes T, Rosell-Vives E, Nieto C, Ortega A, Pedrola N, Llaurodo M, Rigau M, Doll A, Abal M, Ponce J, Gil-Moreno A, Reventós J. Molecular diagnosis of endometrial cancer from uterine aspirates. *Int J Cancer*. 2013;133(10):2383–91.
7. Chen CY, Hogan MC, Ward CJ. Purification of exosome-like vesicles from urine. *Methods Enzymol*. 2013;524:225–41.
8. Koturbash I, Tolleson WH, Guo L, Yu D, Chen S, Hong H, Mattes W, Ning B. microRNAs as pharmacogenomic biomarkers for drug efficacy and drug safety assessment. *Biomark Med*. 2015;9(11):1153–76.
9. Kosaka N, Yoshioka Y, Tominaga N, Hagiwara K, Katsuda T, Ochiya T. Dark side of the exosome: the role of the exosome in cancer metastasis and targeting the exosome as a strategy for cancer therapy. *Future Oncol*. 2014;10(4):671–81.
10. Harding C, Stahl P. Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983;113(2):650–8.
11. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983;33(3):967–78.
12. Simons M, Raposo G. Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(4):575–81.
13. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 1987;262(19):9412–20.
14. Bang C, Thum T. Exosomes: new players in cell–cell communication. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(11):2060–4.
15. Ludwig A-K, Giebel B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(1):11–5.
16. Miller IV, Grunewald TGP. Tumour-derived exosomes: tiny envelopes for big stories. *Biol Cell*. 2015;107(9):287–305.
17. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*. 2010;101(10):2087–92.
18. Gámez-Valero A, Lozano-Ramos SI, Bancu I, Lauzurica-Valdemoros R, Borrás FE. Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases. *Front Immunol*. 2015;6:6.
19. Lässer C, Alikhani VS, Ekström K, Eldh M, Paredes PT, Bossios A, Sjöstrand M, Gabrielsson S, Lötvall J, Valadi H. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med*. 2011;9:9.
20. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):581–93.
21. Samsonov R, Shtam T, Burdakov V, Glotov A, Tsyrlina E, Berstein L, Nosov A, Evtushenko V, Filatov M, Malek A. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: application for prostate cancer diagnostic. *Prostate*. 2015;76(1):68–79.
22. Ng YH, Rome S, Jalabert A, Forterre A, Singh H, Hincks CL, Salamonsen LA. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e58502.
23. Properzi F, Logozzi M, Fais S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomark Med*. 2013;7(5):769–78.
24. Franzen CA, Blackwell RH, Foreman KE, Kuo PC, Gupta GN. Urinary exosomes: the potential for biomarker utility, intercellular signaling and therapeutics in urological malignancy. *J Urol*. 2015.
25. Sadovska L, Eglitis J, Liné A. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets in breast cancer. *Anticancer Res*. 2015;35(12):6379–90.
26. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. Editor. board, Juan S Bonifacino et al. 2006; vol. Chapter 3. p. Unit 3.22.
27. McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, Grebe SK, Algeciras-Schmich A. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem*. 2011;57(6):833–40.
28. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(16):7223–33.
29. Gourzones C, Ferrand F-R, Amiel C, Verrillaud B, Barat A, Guérin M, Gattoliat C-H, Gelin A, Klibi J, Ben Chaaben A, Schneider V, Guemira F, Guigay J, Lang P, Jimenez-Pailhes A-S, Busson P. Consistent high concentration of the viral microRNA BART17 in plasma samples from nasopharyngeal carcinoma patients—evidence of non-exosomal transport. *Virology*. 2013;10:119.
30. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30(1):255–89.
31. Donker RB, Mouillet JF, Chu T, Hubel CA, Stolz DB, Morelli AE, Sadovsky Y. The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. *Mol Hum Reprod*. 2012;18(8):417–24.
32. Salomon C, Torres MJ, Kobayashi M, Scholz-Romero K, Sobrevia L, Dobierzewska A, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE. A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. *PLoS ONE*. 2014;9(6):e98667.
33. Mitchell MD, Peiris HN, Kobayashi M, Koh YQ, Duncombe G, Illanes SE, Rice GE, Salomon C. Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213(4):S173–81.
34. Ge M, Ke R, Cai T, Yang J, Mu X. Identification and proteomic analysis of osteoblast-derived exosomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;467(1):27–32.
35. Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. *Cell Cycle*. 2009;8(13):2014–8.
36. Dachary-Prigent J, Freyssinet JM, Pasquet JM, Carron JC, Nurden AT. Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. *Blood*. 1993;81(10):2554–65.
37. Ohlsson Teague EMC, Van der Hoek KH, Van der Hoek MB, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson SA, Print CG, Hull LM. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol Endocrinol*. 2009;23(2):265–75.
38. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2008;110(1):13–21.
39. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, Samuel M, Pathan M, Jois M, Chilamkurti N, Gangoda L, Mathivanan S. ExoCarta: a web-based compendium of exosomal cargo. *J Mol Biol*. 2015.
40. Devor EJ, Hovey AM, Goodheart MJ, Ramachandran S, Leslie KK. microRNA expression profiling of endometrial endometrioid adenocarcinomas and serous adenocarcinomas reveals profiles containing shared, unique and differentiating groups of microRNAs. *Oncol Rep*. 2011;26(4):995–1002.
41. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654–9.
42. Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins. RNA and lipids. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):1241–4.
43. Dharmaraj N, Chapela PJ, Morgado M, Hawkins SM, Lessey BA, Young SL, Carson DD. Expression of the transmembrane mucins, MUC1, MUC4 and MUC16, in normal endometrium and in endometriosis. *Hum Reprod*. 2014;29(8):1730–8.

44. Sundqvist J, Andersson KL, Scarselli G, Gemzell-Danielsson K, Lalitkumar PGL. Expression of adhesion, attachment and invasion markers in eutopic and ectopic endometrium: a link to the aetiology of endometriosis. *Hum Reprod*. 2012;27(9):2737–46.
45. Wei J-J, Chiriboga L, Arslan AA, Melamed J, Yee H, Mittal K. Ethnic differences in expression of the dysregulated proteins in uterine leiomyomata. *Hum Reprod*. 2006;21(1):57–67.
46. Drosch M, Schmidt N, Markowski DN, Zollner TM, Koch M, Bullerdiek J. The CD24hi smooth muscle subpopulation is the predominant fraction in uterine fibroids. *Mol Hum Reprod*. 2014;20(7):664–76.
47. Torres A, Torres K, Wdowiak P, Paszkowski T, Maciejewski R. Selection and validation of endogenous controls for microRNA expression studies in endometrioid endometrial cancer tissues. *Gynecol Oncol*. 2013;130(3):588–94.
48. Peterson MF, Otoc N, Sethi JK, Gupta A, Antes TJ. Integrated systems for exosome investigation. *Methods*. 2015;87:31.
49. Zeringer E, Li M, Barta T, Schageman J, Pedersen KW, Neurauter A, Magdaleno S, Setterquist R, Vlassov AV. Methods for the extraction and RNA profiling of exosomes. *World J Methodol*. 2013;3(1):11–8.
50. Schageman J, Zeringer E, Li M, Barta T, Lea K, Gu J, Magdaleno S, Setterquist R, Vlassov AV. The complete exosome workflow solution: from isolation to characterization of RNA cargo. *Biomed Res Int*. 2013;2013:253957.
51. Vaksman O, Tropé C, Davidson B, Reich R. Exosome-derived miRNAs and ovarian carcinoma progression. *Carcinogenesis*. 2014;35(9):2113–20.
52. Salomon C, Yee S, Scholz-Romero K, Kobayashi M, Vaswani K, Kvaskoff D, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE. Extravillous trophoblast cells-derived exosomes promote vascular smooth muscle cell migration. *Front Pharmacol*. 2014;5:175.
53. Hannan NJ, Stephens AN, Rainczuk A, Hincks C, Rombauts LJJ, Salamonsen LA. 2D-DiGE analysis of the human endometrial secretome reveals differences between receptive and nonreceptive states in fertile and infertile women. *J Proteome Res*. 2010;9(12):6256–64.
54. Scotchie JG, Fritz MA, Mocanu M, Lessey BA, Young SL. Proteomic analysis of the luteal endometrial secretome. *Reprod Sci*. 2009;16(9):883–93.
55. Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJC, Lentjes EG, Fauser BCJM, Heijnen CJ, Macklon NS. Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF. *Hum Reprod*. 2009;24(6):1427–35.
56. Vilella F, Moreno-Moya JM, Balaguer N, Grasso A, Herrero M, Martínez S, Marcilla A, Simón C. Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development*. 2015;142(18):3210–21.
57. Ametzazurra A, Matorras R, Garcia-Velasco JA, Prieto B, Simón L, Martínez A, Nagore D. Endometrial fluid is a specific and non-invasive biological sample for protein biomarker identification in endometriosis. *Hum Reprod*. 2009;24(4):954–65.
58. Levänen B, Bhakta NR, Torregrosa Paredes P, Barbeau R, Hiltbrunner S, Pollack JL, Sköld CM, Svartengren M, Grunewald J, Gabrielsson S, Eklund A, Larsson B-M, Woodruff PG, Erle DJ, Wheelock ÁM. Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(3):894–903.
59. Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, Baranov V, Mincheva-Nilsson L, Breakefield XO, Widmark A. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer*. 2009;100(10):1603–7.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Decherney A.H., Goodwin T.M., Nathan L. LN. Current diagnosis & treatment, obstetrics and gynecology. New york, U.S.A.: McGraw-Hill.; 2007.
2. Botella Llusia J. El ovario. Fisiología y patología. Díaz de Santos, S.A.; 1995.
3. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG practice bulletin, clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists, number 65, August 2005: management of endometrial cancer. *Obs Gynecol.* 106(2):413–25.
4. Richards JS PS. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest.* 2010;120(4):963–72.
5. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
6. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359–86.
7. American Cancer Society. Global cancer facts & figures 3rd Edition. Am Cancer Soc. 2015;(800):1–64.
8. <https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/CANCERPORLOCALIZACION/CANCERDEOVARIO/Paginas/incidencia.aspx>.
9. SA C. Cancer of the ovary. *N Engl J Med.* 351(24):2519–29.
10. Tew WP, Lichtman SM. Ovarian cancer in older women. *Semin Oncol.* 2008 Dec;35(6):582–9.
11. American Cancer Society. Cancer facts & figures 2016. 2016. 2016;1–9.
12. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):7–30.
13. <http://eco.iarc.fr/eucan/CancerOne.aspx?Cancer=27&Gender=2>.
14. Médica SE de O. Las cifras del cáncer en España. 2016;
15. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EUROCARE-5-a population-based study. *Lancet Oncol.* Elsevier Ltd; 2013;2045(13):1–12.
16. Bast Jr. RC, Hennesy B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer.* Nature Publishing Group; 2009;9(6):415–28.
17. Fathalla MF. Incessant ovulation and ovarian cancer - a hypothesis re-visited. *Facts, views Vis ObGyn.* 2013;5(4):292–7.
18. Fathalla MF. Non-hormonal interruption of incessant ovulation as a potential approach for ovarian cancer prevention. *Int J Gynaecol Obstet.* 2016 Mar;132(3):356–8.
19. Finn CA. Reproductive ageing and the menopause. *Int J Dev Biol.* 2001;45(3):613–7.
20. Choi JH, Wong AST, Huang HF, Leung PCK. Gonadotropins and ovarian cancer. *Endocr Rev.* 2007;28(4):440–61.
21. Smith ER, Daly MB, Xu X-X. A mechanism for cox-2 inhibitor anti-inflammatory activity in chemoprevention of epithelial cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Jan;13(1):144–5.
22. Kisielewski R, Tolwińska A, Mazurek A, Laudański P. Inflammation and ovarian cancer--current views. *Ginekol Pol.* 2013 Apr;84(4):293–7.
23. Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 1983 Oct;71(4):717–21.
24. Chang S, Risch HA. Perineal talc exposure and risk of ovarian carcinoma. *Cancer.* 1997 Jun 15;79(12):2396–401.
25. Ness RB, Cottreau C. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Sep 1;91(17):1459–67.
26. Tworoger SS, Gertig DM, Gates MA, Hecht JL, Hankinson SE. Caffeine, alcohol, smoking, and the risk of incident epithelial ovarian cancer. *Cancer.* 2008 Mar 1;112(5):1169–77.
27. Cheng W, Liu J, Yoshida H, Rosen D, Naora H. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. *Nat Med.* 2005 May;11(5):531–7.
28. Kurman R, Shih I. The Origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer-a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(3):433–43.
29. Levanon K, Crum C, Drapkin R. New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact. *J Clin Oncol.* 2008;26(32):5284–93.
30. Petrucelli N, Daly MB, Feldman GL. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genet Med.* 2010;12(5):245–59.
31. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol.* 2007 Apr 10;25(11):1329–33.
32. Hyman DM, Zhou Q, Iasonos A, Grisham RN, Arnold AG, Phillips MF, et al. Improved survival for BRCA2-associated serous ovarian cancer compared with both BRCA-negative and BRCA1-associated serous ovarian cancer. *Cancer.* 2012 Aug 1;118(15):3703–9.
33. Yoon S-H, Kim S-N, Shim S-H, Kang S-B, Lee S-J. Bilateral salpingectomy can reduce the risk of ovarian cancer in the general population: A meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2016 Mar;55:38–46.
34. Chung DC, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical

- implications. *Ann Intern Med.* 2003 Apr 1;138(7):560–70.
35. Finch A, Beiner M, Lubinski J, Lynch HT, Moller P, Rosen B, Murphy J, Ghadirian P, Friedman E, Foulkes WD, Kim-Sing C, Wagner T, Tung N, Couch F, Stoppa-Lyonnet D, Ainsworth P, Daly M, Pasini B, Gershoni-Baruch R, Eng C, Olopade OI, McLennan J, Karlan B, NSHOCCSG. Salpingo-oophorectomy and the risk of ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancers in women with a BRCA1 or BRCA2 Mutation. *JAMA* 2006 Jul 12;296(2):185-92.
 36. Chiapparino F, Parazzini F, Decarli A, Franceschi S, Talamini R, Montella M LVC. Hysterectomy with or without unilateral oophorectomy and risk of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005 May;97(2):318-22.
 37. Brinton L. Long-term effects of ovulation-stimulating drugs on cancer risk. *Reprod Biomed Online.* 2007 Jul;15(1):38–44.
 38. Jensen A, Sharif H, Frederiksen K, Kjaer SK. Use of fertility drugs and risk of ovarian cancer: Danish Population Based Cohort Study. *BMJ.* 2009 Feb 5;338:b249.
 39. Rossing MA, Tang M-TC, Flagg EW, Weiss LK, Wicklund KG. A case-control study of ovarian cancer in relation to infertility and the use of ovulation-inducing drugs. *Am J Epidemiol.* 2004 Dec 1;160(11):1070–8.
 40. La Vecchia C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *Eur J Cancer Prev.* 2017 Jan;26(1):55–62.
 41. Yang CY, Kuo HW CH. Age at first birth, parity, and risk of death from ovarian cancer in Taiwan: a country of low incidence of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2007 Jan-Feb;17(1):32-6.
 42. Danforth KN, Tworoger SS, Hecht JL, Rosner BA, Colditz GA HS. Breastfeeding and risk of ovarian cancer in two prospective cohorts. *Cancer Causes Control* 2007 Jun;18(5):517-23.
 43. Zhou B, Sun Q, Cong R, Gu H, Tang N, Yang L, et al. Hormone replacement therapy and ovarian cancer risk: a meta-analysis. *Gynecol Oncol.* 2008 Mar;108(3):641–51.
 44. Lukanova A, Kaaks R. Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Jan;14(1):98–107.
 45. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer¹, Beral V, Doll R, Hermon C, Peto R RG. 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 Jan 26;371(9609):303-14.
 46. Han KH, Kim M-K, Kim HS, Chung HH, Song YS. Protective effect of progesterone during pregnancy against ovarian cancer. *J Cancer Prev.* 2013;18(2):113–22.
 47. Edefonti V, Randi G, Decarli A, La Vecchia C, Bosetti C, Franceschi S, Dal Maso L FM. Clustering dietary habits and the risk of breast and ovarian cancers. *Ann Oncol* 2009 Mar;20(3):581-90.
 48. Larsson SC, Orsini N WA. Milk, milk products and lactose intake and ovarian cancer risk: a meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006 Jan 15;118(2):431-41.
 49. Rota M, Pasquali E, Scotti L, Pelucchi C, Tramacere I, Islami F, et al. Alcohol drinking and epithelial ovarian cancer risk. a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol.* 2012 Jun;125(3):758–63.
 50. Silvera SA, Jain M, Howe GR, Miller AB RT. Intake of coffee and tea and risk of ovarian cancer: a prospective cohort study. *Nutr Cancer* 2007;58(1):22-7.
 51. La Vecchia C. Association between Mediterranean dietary patterns and cancer risk. *Nutr Rev* 2009 May;67 Suppl 1S126-9.
 52. Fairfield KM, Willett WC, Rosner BA, Manson JE, Speizer FE HS. Obesity, weight gain, and ovarian cancer. *Obs Gynecol* 2002 Aug;100(2):288-96.
 53. Schouten LJ, Rivera C, Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Arslan A, Beeson WL, van den Brandt PA, Buring JE, Folsom AR, Fraser GE, Freudenheim JL, Goldbohm RA, Hankinson SE, Lacey JV Jr, Leitzmann M, Lukanova A, Marshall JR, Miller AB, Patel AV, Rodriguez S-WS. Height, body mass index, and ovarian cancer: a pooled analysis of 12 cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008 Apr;17(4):902-12.
 54. Tavani A, Gallus S, La Vecchia C, Dal Maso L, Negri E, Pelucchi C, Montella M, Conti E, Carbone A FS. Physical activity and risk of ovarian cancer: an Italian case-control study. *Int J Cancer* 2001 Feb 1;91(3):407-11.
 55. Brinton LA, Sakoda LC, Sherman ME, Frederiksen K, Kjaer SK, Graubard BI, et al. Relationship of benign gynecologic diseases to subsequent risk of ovarian and uterine tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Dec;14(12):2929–35.
 56. Yoshikawa H, Jimbo H, Okada S, Matsumoto K, Onda T, Yasugi T TY. Prevalence of endometriosis in ovarian cancer. *Gynecol Obs Invest.* 2000;50 Suppl 1:11–7.
 57. Harris RE, Beebe-Donk J, Doss H BDD. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade (review). *Oncol Rep* 2005 Apr;13(4):559-83.
 58. Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, Ngan HY, Pecorelli S BU. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obs* 2006 Nov;95 Suppl 1S161-92.
 59. Sánchez Muñoz A, González Martín A MFC. Factores pronósticos en el carcinoma epitelial de ovario. In: Gonzalez Baron M et al. Factores Pronósticos en Oncología. Ed 2th, editor. Spain: McGraw Hill; 2005. 140-141. p.

60. Osman N, O'Leary N, Mulcahy E, Barrett N, Wallis F, Hickey K GR. Correlation of serum CA125 with stage, grade and survival of patients with epithelial ovarian cancer at a single centre. *Ir Med J* 2008 Sep;101(8)245-7.
61. Gajewski WH, Fuller AF Jr, Pastel-Ley C, Flotte TJ BD. Prognostic significance of DNA content in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1994 Apr;53(1)5-12.
62. Network. CGAR. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011 Jun 29;474(7353)609-15.
63. Vermeij J, Teugels E, Bourgain C, Xiangming J, in 't Veld P, Ghislain V, Neyns B DGJ. Genomic activation of the EGFR and HER2-neu genes in a significant proportion of invasive epithelial ovarian cancers. *BMC Cancer* 2008 Jan 8;83.
64. Sueblinvong T, Manchana T, Khemapech N, Triratanachat S, Termrungruanglert W TD. Lack of prognostic significance of HER-2/neu in early epithelial ovarian cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2007 Oct-Dec;8(4)502-6.
65. Isola J, Kallioniemi OP, Korte JM, Wahlström T, Aine R, Helle M HH. Steroid receptors and Ki-67 reactivity in ovarian cancer and in normal ovary: correlation with DNA flow cytometry, biochemical receptor assay, and patient survival. *J Pathol* 1990 Dec;162(4)295-301.
66. Choi H-J, Armaiz Pena GN, Pradeep S, Cho MS, Coleman RL, Sood AK. Anti-vascular therapies in ovarian cancer: moving beyond anti-VEGF approaches. *Cancer Metastasis Rev.* 2015 Mar;34(1):19–40.
67. Demeter A, Várkonyi T, Csapó Z, Szánthó A, Oláh J PZ. Assessment of prognostic factors in common ovarian tumors of varying malignancy. *Magy Onkol* 2004;48(3)259-65.
68. Le Page C, Huntsman DG, Provencher DM M-MA. Predictive and prognostic protein biomarkers in epithelial ovarian cancer: recommendation for future studies. *Cancers (Basel)* 2010 May 26;2(2)913-54.
69. Ezzati M, Abdullah A, Shariftabrizi A, Hou J, Kopf M, Stedman JK, Samuelson R SS. Recent Advancements in Prognostic Factors of Epithelial Ovarian Carcinoma. *Int Sch Res Not* 2014 Oct 29;2014953509.
70. Devouassoux-Shisheboran M GC. Pathobiology of ovarian carcinomas. *Chin J Cancer* 2015 Jan; 34(1) 50–55.
71. Prat J. New insights into ovarian cancer pathology. *Ann Oncol.* 2012;23(SUPPL. 10).
72. Vaughan S, Coward JI, Bast RC Jr, Berchuck A, Berek JS, Brenton JD, Coukos G, Crum CC, Drapkin R, Etemadmoghadam D, Friedlander M, Gabra H, Kaye SB, Lord CJ, Lengyel E, Levine DA, McNeish IA, Menon U, Mills GB, Nephew KP, Oza AM, Sood AK, Stronach EA, Wal BF. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer* 2011 Sep 23;11(10)719-25.
73. Christopher P. Crum. *Tracto genital femenino en Patología estructural y funcional.* 7a ed. Masson; 2005. 1063-1121. p.
74. Malpica A, Deavers MT, Lu K, Bodurka DC, Atkinson EN, Gershenson DM SE. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *Am J Surg Pathol* 2004 Apr;28(4)496-504.
75. Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, Coté TR, Wu XC, Correa CN. Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer.* 2003;97(S10):2631–42.
76. Ness RB. Endometriosis and ovarian cancer: thoughts on shared pathophysiology. *Am J Obstet Gynecol.* 2003 Jul;189(1):280–94.
77. Wilkinson N. Tumors of the ovary and peritoneum. In: *Pathology of the ovary, fallopian tube and peritoneum.* Springer; 2014. 113-202 p.
78. Hess V, A'Hern R, Nasiri N, King DM, Blake PR, Barton DP, Shepherd JH, Ind T, Bridges J, Harrington K, Kaye SB GM. Mucinous epithelial ovarian cancer: a separate entity requiring specific treatment. *J Clin Oncol* 2004 Mar 15;22(6)1040-4.
79. F. P. Annual report of the results of treatment in gynecological cancer. Stockholm: International Federation of Gynecology and Obstetrics, 1991.
80. Prat J for the FC on GO. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obs.* 2014;2014:1–2.
81. <http://www.uicc.org/resources/tnm>.
82. Chan YM, Ng TY, Lee PW, Ngan HY WL. Symptoms, coping strategies, and timing of presentations in patients with newly diagnosed ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003 Sep;90(3)651-6.
83. Nguyen L, Cardenas-Goicoechea SJ, Gordon P, Curtin C, Momeni M, Chuang L FD. Biomarkers for early detection of ovarian cancer. *Womens Heal (Lond)* 2013 Mar;9(2)171-85.
84. van Nagell JR Jr HJ. Transvaginal ultrasonography in ovarian cancer screening: current perspectives. *Int J Womens Heal* 2013 Dec 20;625-33.
85. Sohaib SA, Mills TD, Sahdev A, Webb JA, Vantrappen PO, Jacobs IJ RR. The role of magnetic resonance imaging and ultrasound in patients with adnexal masses. *Clin Radiol* 2005 Mar;60(3)340-8.
86. Togashi K. Ovarian cancer: the clinical role of US, CT, and MRI. *Eur Radiol* 2003 Dec;13 Suppl 4L87-104.
87. Gubbels JA, Belisle J, Onda M, Rancourt C, Migneault M, Ho M, Bera TK, Connor J, Sathyanarayana BK, Lee B, Pastan I PM. Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction

- that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors. *Mol Cancer*. 5(1):50.
88. Kulasingam V, Pavlou MP DE. Integrating high-throughput technologies in the quest for effective biomarkers for ovarian cancer. *Nat Rev Cancer* 2010 May;10(5):371-8.
 89. O'Connell GJ, Ryan E, Murphy KJ PM. Predictive value of CA 125 for ovarian carcinoma in patients presenting with pelvic masses. *Obs Gynecol* 1987 Dec;70(6):930-2.
 90. Zurawski VR Jr, Knapp RC, Einhorn N, Kenemans P, Mortel R, Ohmi K, Bast RC Jr, Ritts RE Jr MG. An initial analysis of preoperative serum CA 125 levels in patients with early stage ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1988 May;30(1):7-14.
 91. Sjövall K, Nilsson B EN. The significance of serum CA 125 elevation in malignant and nonmalignant diseases. *Gynecol Oncol* 2002 Apr;85(1):175-8.
 92. van Altena AM, Kolwijck E, Spanjer MJ, Hendriks JC, Massuger LF de HJ. CA125 nadir concentration is an independent predictor of tumor recurrence in patients with ovarian cancer: a population-based study. *Gynecol Oncol* 2010 Nov;119(2):265-9.
 93. Gemer O, Lurian M, Gdalevich M, Kapustian V, Piura E, Schneider D, Lavie O, Levy T, Fishman A, Dgani R, Levavi H BU. A multicenter study of CA 125 level as a predictor of non-optimal primary cytoreduction of advanced epithelial ovarian cancer. *Eur J Surg Oncol* 2005 Nov;31(9):1006-10.
 94. Vitale SG, Marilli I, Lodato M, Tropea A, Cianci A. The role of cytoreductive surgery in advanced-stage ovarian cancer: A systematic review. *Updates Surg*. 2013;65(4):265-70.
 95. Lokadasan Rajitha, James Francis V, Narayanan Geetha PPK. Targeted agents in epithelial ovarian cancer: review on emerging therapies and future developments. *E cancer Med Sci* 2016; 10 626.
 96. Ghasemi N, Ghobadzadeh S, Zahraei M, Mohammadpour H, Bahrami S, Ganje MB, et al. HE4 combined with CA125: favorable screening tool for ovarian cancer. *Med Oncol*. 2014 Jan;31(1):808.
 97. Molina R, Escudero JM, Augé JM, Filella X, Foj L, Torné A, Lejarcegui J PJ. HE4 a novel tumour marker for ovarian cancer: comparison with CA 125 and ROMA algorithm in patients with gynaecological diseases. *Tumour Biol* 2011 Dec;32(6):1087-95.
 98. El Bairi K, Kandhro AH, Gouri A, Mahfoud W, Louanjli N, Saadani B, et al. Emerging diagnostic, prognostic and therapeutic biomarkers for ovarian cancer. *Cell Oncol (Dordr)*. 2017 Apr;40(2):105-18.
 99. Hanash SM, Pitteri SJ FV. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature* 2008 Apr 3;452(7187):571-9.
 100. Salamonsen L a., Edgell T, Rombauts LJF, Stephens AN, Robertson DM, Rainczuk A, et al. Proteomics of the human endometrium and uterine fluid: A pathway to biomarker discovery. *Fertil Steril*. Elsevier Inc.; 2013;99(4):1086-92.
 101. Colas E, Perez C, Cabrera S, Pedrola N, Monge M, Castellvi J, et al. Molecular markers of endometrial carcinoma detected in uterine aspirates. *Int J Cancer*. 2011;129(10):2435-44.
 102. M, Esteller, García A, Martínez-Palones JM, Xercavins J RJ. Detection of clonality and genetic alterations in endometrial pipelle biopsy and its surgical specimen counterpart. *Lab Invest* 1997 Jan;76(1):109-16.
 103. Colombo N, Preti E, Landoni F, Carinelli S, Colombo A, Marini C SCEGWG. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013 Oct;24 Suppl 6vi33-8.
 104. Perez-Sanchez C, Colas E, Cabrera S, Falcon O, Sanchez-Del-Rio A, Garcia E, et al. Molecular diagnosis of endometrial cancer from uterine aspirates. *Int J Cancer*. 2013;133(10):2383-91.
 105. Kinde I, Bettgowda C, Wang Y, Wu J, Agrawal N, Shih I-M, et al. Evaluation of DNA from the Papanicolaou test to detect ovarian and endometrial cancers. *Sci Transl Med*. 2013;5(167):167ra4.
 106. Saji H, Kurose K, Sugiura K, Miyagi E, Onose R, Kato H, et al. Endometrial aspiration cytology for diagnosis of peritoneal lesions in extrauterine malignancies. *Acta Cytol*. 2007;51(July 2007):533-40.
 107. Jobo T, Arai M, Iwaya H, Kato Y, Ohno E, Kuramoto H. Usefulness of endometrial aspiration cytology for the preoperative diagnosis of ovarian carcinoma. *Acta Cytol*. 43(2):104-9.
 108. Massuger L, Roelofsen T, Ham M van, Bulten J. The origin of serous ovarian cancer may be found in the uterus: A novel hypothesis. *Med Hypotheses*. Elsevier Ltd; 2010;74(5):859-61.
 109. Hannan NJ, Stoikos CJ, Stephens AN, Salamonsen LA. Depletion of high-abundance serum proteins from human uterine lavages enhances detection of lower-abundance proteins. *J Proteome Res*. 2009;8(2):1099-103.
 110. Liu J, Sun H, Wang X, Yu Q, Li S, Yu X, et al. Increased exosomal microRNA-21 and microRNA-146a levels in the cervicovaginal lavage specimens of patients with cervical cancer. *Int J Mol Sci*. 2014;15(1):758-73.
 111. Lin J, Li J, Huang B, Liu J, Chen X, Chen X-M, et al. Exosomes: Novel biomarkers for clinical diagnosis. *Sci World J*. 2015;2015:1-8.
 112. Colombo M, Raposo G TC. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014;30:255-89.
 113. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell vesicles*. 2014;3:26913.
 114. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell vesicles*. 2015;4:27066.

115. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(16):2667–88.
116. Budnik V, Ruiz-Cañada C, Wendler F. Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17(3):160–72.
117. Harding C, Heuser J SP. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 1983 Aug;97(2):329-39.
118. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L TC. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 1987 Jul 5;262(19):9412-20.
119. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ GH. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996 Mar 1;183(3):1161-72.
120. Chen CY, Hogan MC WC. Purification of exosome-like vesicles from urine. *Methods Enzym* 2013;524:225-41.
121. Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2).
122. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A NR. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev* 2012 Jul;64(3):676-705.
123. El Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ a, Andaloussi S EL, Mäger I, et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. Nature Publishing Group; 2013;12(5):347–57.
124. Gould SJ RG. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2013 Feb 15;2.
125. Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol*. 2014;29(1):116–25.
126. Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, Ivarsson Y, Depoortere F, Coomans C, Vermeiren E, Zimmermann P DG. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 2012 Jun 3;14(7):677-85.
127. van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S RG. Exosomes: A common pathway for a specialized function. *J Biochem* 2006 Jul;140(1):13-21.
128. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: Trafficking, sorting, and function. *Genomics, Proteomics Bioinforma*. 2015;13(1):17–24.
129. Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H BA. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic* 2009 Jul;10(7):925-37.
130. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. 2008;319(April):1244–7.
131. Edgar JR, Eden ER FC. Hrs- and CD63-dependent competing mechanisms make different sized endosomal intraluminal vesicles. *Traffic* 2014 Feb;15(2):197-211.
132. Ghossoub R, Lembo F, Rubio A, Gaillard CB, Bouchet J, Vitale N, Slavík J, Machala M ZP. Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat Commun* 2014 Mar 18;5:3477.
133. Chairoungdua A, Smith DL, Pocharat P, Hull M CM. Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol* 2010 Sep 20;190(6):1079-91.
134. Perez-Hernandez D, Gutiérrez-Vázquez C, Jorge I, López-Martín S, Ursa A, Sánchez-Madrid F, Vázquez J Y-MM. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem* 2013 Apr 26;288(17):11649-61.
135. Cai H, Reinisch K F-NS. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell* 2007 May;12(5):671-82.
136. Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 24):5553–65.
137. Savina A, Fader CM, Damiani MT CM. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* 2005 Feb;6(2):131-43.
138. Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S, Manrique-Hoyos N, Jung S, Lauterbach MA, Bakhti M, Grønborg M, Möbius W, Rhee J, Barr FA SM. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol* 2010 Apr 19;189(2):223-32.
139. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanger I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohen N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF TC. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 2010 Jan;12(1):19-30; sup pp 1-13.
140. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:1–14.
141. Feng D, Zhao WL, Ye YY, Bai XC, Liu RQ, Chang LF, Zhou Q SS. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* 2010 May;11(5):675-87.
142. Nolte-t Hoen EN, Buschow SI, Anderton SM, Stoorvogel W WM. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood* 2009 Feb 26;113(9):1977-81.
143. Rana S, Yue S, Stadel D ZM. Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes

- to target cell selection. *Int J Biochem Cell Biol* 2012 Sep;44(9):1574-84.
144. Christianson HC, Svensson KJ, van Kuppevelt TH, Li JP BM. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 Oct 22;110(43):17380-5.
 145. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, et al. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol.* 2016 Feb 22;428(4):688–92.
 146. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, Bond VC, Borràs FE, Breakefield X, Budnik V, Buzas E, Camussi G, Clayton A, Cocucci E, Falcon-Perez JM, Gabriëlsson S, Gho YS, Gupta D, Harsha HC, Hendrix A, Hill AF, Inal JM, Jenster G, Krämer MS. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol* 2012;10(12):e1001450.
 147. Ha D, Yang N, Nadiithe V, Pharmaceutica Sinica AB. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin B. Elsevier;* 2016;6(4):287–96.
 148. Chaput N TC. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol* 2011 Sep;33(5):419-40.
 149. Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G TC. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles* 2012 Apr 16;1.
 150. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ LJ. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007 Jun;9(6):654-9.
 151. Squadrito ML, Baer C, Burdet F, Maderna C, Gilfillan GD, Lyle R, Ibberson M DPM. Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells. *Cell Rep* 2014 Sep 11;8(5):1432-46.
 152. Llorente A, Skotland T, Sylvänne T, Kauhanen D, Róg T, Orłowski A, Vattulainen I, Ekroos K SK. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2013 Jul;1831(7):1302-9.
 153. Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Möbius W, Hoernschemeyer J, Slot JW, Geuze HJ SW. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 2003 Mar 28;278(13):10963-72.
 154. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373–83.
 155. Matsuo H, Chevallier J, Mayran N, Le Blanc I, Ferguson C, Fauré J, Blanc NS, Matile S, Dubochet J, Sadoul R, Parton RG, Vilbois F GJ. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Sci* 2004 Jan 23;303(5657):531-4.
 156. Gerlach JQ, Griffin MD. Getting to know the extracellular vesicle glycome. *Mol Biosyst. Royal Society of Chemistry;* 2016;12(4):1071–81.
 157. Théry C, Clayton A, Amigorena S, Raposo G. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants. *Cell Biol.* 2006;1–29.
 158. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötval J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell vesicles.* 2013;2:1–25.
 159. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Mantel PY, Halleck AE, Trachtenberg AJ, et al. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol Chem.* 2013;394(10):1253–62.
 160. Taylor DD SS. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods* 2015 Oct 1;873-10.
 161. Yuana Y, Levels J, Grootemaat A, Sturk A NR. Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles* 2014 Jul 8;3.
 162. Webber J, Clayton A. How pure are your vesicles? *J Extracell vesicles.* 2013;2(7):1–6.
 163. Weng Y, Sui Z, Shan Y, Hu Y, Chen Y, Zhang L, et al. Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. *Analyst.* 2016 Aug 7;141(15):4640–6.
 164. Clayton A, Court J, Navabi H, Adams M, Mason MD, Hobot JA, Newman GR JB. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J Immunol Methods* 2001 Jan 1;247(1-2):163-74.
 165. www.BioScientific.com.
 166. www.SystemBio.com.
 167. www.HansaBioMed.eu.
 168. www.AethlonMedical.com.
 169. <http://www.thermofisher.com/search/results?query=cell+lysis+%26+organelle+isolation+reagents&persona=Catalog&navId=10419%2B4294956432>.
 170. <http://www.cellgs.com/Shop/Exosomes/Exosome-Purification-Kits/1507-Exo-spin-Columns.html>.
 171. Gudbergsson JM, Johnsen KB, Skov MN, Duroux M. Systematic review of factors influencing

- extracellular vesicle yield from cell cultures. *Cytotechnology*. Springer Netherlands; 2016;68(4):579–92.
172. Pols MS KJ. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res* 2009 May 15;315(9):1584–92.
 173. <http://www.malvern.com/en/products/product-range/nanosight-range/nanosight-lm10/>.
 174. Gercel-Taylor C, Atay S, Tullis RH, Kesimer M, Taylor DD. Nanoparticle analysis of circulating cell-derived vesicles in ovarian cancer patients. *Anal Biochem*. Elsevier Inc.; 2012;428(1):44–53.
 175. <http://www.izon.com/products/qnano/>.
 176. Maas SL, de Vrij J, van der Vlist EJ, Geragousian B, van Bloois L, Mastrobattista E, Schiffelers RM, Wauben MH, Broekman ML N-'t HE. Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics. *J Control Release* 2015 Feb 28;20087–96.
 177. Robert S, Lacroix R, Poncelet P, Harhour K, Bouriche T, Judicone C, Wischhusen J, Arnaud L D-GF. High-sensitivity flow cytometry provides access to standardized measurement of small-size microparticles--brief report. *Arter Thromb Vasc Biol* 2012 Apr;32(4):1054–8.
 178. Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome function: From tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*. 2008;9(6):871–81.
 179. Clayton A, Turkes A, Dewitt S, Steadman R, Mason MD HM. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB J* 2004 Jun;18(9):977–9.
 180. Clayton A, Turkes A, Navabi H, Mason MD TZ. Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J Cell Sci* 2005 Aug 15;118(Pt 16):3631–8.
 181. Hedlund M, Stenqvist AC, Nagaeva O, Kjellberg L, Wulff M, Baranov V M-NL. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function. *J Immunol* 2009 Jul 1;183(1):340–51.
 182. Filipazzi P, Bürdek M, Villa A, Rivoltini L H V. Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression. *Semin Cancer Biol* 2012 Aug;22(4):342–9.
 183. Rak J GA. Extracellular vesicles--vehicles that spread cancer genes. *Bioessays* 2012 Jun;34(6):489–97.
 184. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolc LD. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012 Jun;18(6):883–91.
 185. Safaei R, Larson BJ, Cheng TC, Gibson MA, Otani S, Naerdemann W HS. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Mol Cancer Ther* 2005 Oct;4(10):1595–604.
 186. Crow J, Atay S, Banskota S, Artale B, Schmitt S, Godwin AK. Exosomes as mediators of platinum resistance in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017;
 187. Enriquez VA, Cleys ER2, Da Silveira JC3, Spillman MA4, Winger QA2 BG. High LIN28A Expressing Ovarian Cancer Cells Secrete Exosomes That induce invasion and migration in HEK293 cells. *Biomed Res Int* 2015;2015701390.
 188. Cho JA, Park H, Lim EH, Kim KH, Choi JS, Lee JH, et al. Exosomes from ovarian cancer cells induce adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to acquire the physical and functional characteristics of tumor-supporting myofibroblasts. *Gynecol Oncol*. Elsevier Inc.; 2011;123(2):379–86.
 189. Liang B, Peng P, Chen S, Li L, Zhang M, Cao D, et al. Characterization and proteomic analysis of ovarian cancer-derived exosomes. *J Proteomics*. Elsevier B.V.; 2013;80:171–82.
 190. Yi H, Ye J, Yang XM, Zhang LW, Zhang ZG CY. High-grade ovarian cancer secreting effective exosomes in tumor angiogenesis. *Int J Clin Exp Pathol* 2015 May 1;8(5):5062–70.
 191. Yokoi A, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ishikawa M, Ikeda S, Kato T, et al. Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer. *Nat Commun*. 2017 Mar 6;8:14470.
 192. Peng P, Yan Y, Keng S. Exosomes in the ascites of ovarian cancer patients: Origin and effects on anti-tumor immunity. *Oncol Rep*. 2011;25(3):749–62.
 193. Raimondo F, Morosi L, Chinello C, Magni F, Pitto M. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomics*. 2011;11(4):709–20.
 194. <http://www.carislifeosciences.com/>.
 195. Muhammad Nawaz, Giovanni Camussi, Hadi Valadi, Irina Nazarenko, Karin Ekström, Xiaoqin Wang, Simona Principe, Neelam Shah, Naeem M Ashraf, Farah Fatima, Luciano Neder TK. Extracellular vesicles in ovarian cancer: applications to tumor biology, immunotherapy and biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics*. 2016;13(4):395–409.
 196. Luketic L, Delanghe J, Sobol PT, Yang P, Frotten E, Mossman KL, Gauldie J, Bramson J WY. Antigen presentation by exosomes released from peptide-pulsed dendritic cells is not suppressed by the presence of active CTL. *J Immunol* 2007 Oct 15;179(8):5024–32.
 197. Raemdonck K, Braeckmans K, Demeester J DSS. Merging the best of both worlds: hybrid lipid-enveloped matrix nanocomposites in drug delivery. *Chem Soc Rev* 2014 Jan 7;43(1):444–72.

198. Li C, Zhang J, Zu YJ, Nie SF, Cao J, Wang Q, Nie SP, Deng ZY, Xie MY WS. Biocompatible and biodegradable nanoparticles for enhancement of anti-cancer activities of phytochemicals. *Chin J Nat Med* 2015 Sep;13(9):641-52.
199. Vlassov A V., Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. Elsevier B.V.; 2012;1820(7):940–8.
200. Lima LG, Chammas R, Monteiro RQ, Moreira ME BM. Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. *Cancer Lett* 2009 Oct 8;283(2):168-75.
201. Cai Z, Yang F, Yu L, Yu Z, Jiang L, Wang Q, Yang Y, Wang L, Cao X WJ. Activated T cell exosomes promote tumor invasion via Fas signaling pathway. *J Immunol* 2012 Jun 15;188(12):5954-61.
202. de la Fuente A, Alonso-Alconada L, Costa C, Cueva J, Garcia-Caballero T, Lopez-Lopez R, et al. M-Trap: Exosome-based capture of tumor cells as a new technology in peritoneal metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Sep;107(9).
203. Bast, RC., Jr; Mills G. *The Molecular Basis of Cancer*. 3rd ed. Mendelsohn, J.; Howley P. I, M.; Gray, J.; Thompson C, editors. 2008. 441-455 p.
204. Bast R, Hennessy B, Mills G. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(6):1–28.
205. Kwon MJ, Shin YK. Epigenetic regulation of cancer-associated genes in ovarian cancer. *Int J Mol Sci*. 2011;12(2):983–1008.
206. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, O'brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL CG. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Jun 13;103(24):9136-41.
207. Hu L, Hofmann J, Lu Y, Mills GB JR. Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase increases efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *Cancer Res* 2002 Feb 15;62(4):1087-92.
208. Rosen DG, Mercado-Urbe I, Yang G, Bast RC Jr, Amin HM, Lai R LJ. The role of constitutively active signal transducer and activator of transcription 3 in ovarian tumorigenesis and prognosis. *Cancer* 2006 Dec 1;107(11):2730-40.
209. Duan Z, Bradner J, Greenberg E, Mazitschek R, Foster R, Mahoney J SM. 8-benzyl-4-oxo-8-azabicyclo[3.2.1]oct-2-ene-6,7-dicarboxylic acid (SD-1008), a novel janus kinase 2 inhibitor, increases chemotherapy sensitivity in human ovarian cancer cells. *Mol Pharmacol* 2007 Nov;72(5):1137-45.
210. McMurray JS. A new small-molecule Stat3 inhibitor. *Chem Biol* 2006 Nov;13(11):1123-4.
211. Murph M, Tanaka T, Liu S MG. Of spiders and crabs: the emergence of lysophospholipids and their metabolic pathways as targets for therapy in cancer. *Clin Cancer Res* 2006 Nov 15;12(22):6598-602.
212. Beck HP, Kohn T, Rubenstein S, Hedberg C, Schwandner R, Hasslinger K, Dai K, Li C, Liang L, Wesche H, Frank B, An S, Wickramasinghe D, Jaen J, Medina J, Hungate R SW. Discovery of potent LPA2 (EDG4) antagonists as potential anticancer agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2008 Feb 1;18(3):1037-41.
213. Lin YG, Kunnumakkara AB, Nair A, Merritt WM, Han LY, Armaiz-Pena GN, Kamat AA, Spannuth WA, Gershenson DM, Lutgendorf SK, Aggarwal BB SA. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor-kappaB pathway. *Clin Cancer Res* 2007 Jun 1;13(11):3423-30.
214. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):431–6.
215. du Bois A, Quinn M, Thigpen T, Vermorken J, Avall-Lundqvist E, Bookman M, et al. 2004 consensus statements on the management of ovarian cancer: Final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GCIG OCC 2004). *Ann Oncol*. 2005;16(SUPPL. 8):7–12.
216. Stuart GC, Kitchener H, Bacon M, RN, Du Bois A, Friedlander M, Ledermann J, Marth C, Thigpen T TE. 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;21 750-755.
217. Silva A, León E SA. Quimioterapia neoadyuvante en cancer de ovario epitelial. *Cancerol* 2; Supl 1 (2007); s49-s50.
218. Aletti GD, Gallenberg MM, Cliby WA, Jatoi A HL. Current management strategies for ovarian cancer. *Mayo Clin Proc* 2007 Jun;82(6):751-70.
219. Ozols RF, Schwartz PE EP. Ovarian cancer, fallopian tube carcinoma, and peritoneal carcinoma. In: DeVita Jr. VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and practice of oncology*, Sixth Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001;2:1597–1632.
220. Agarwal R, Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(7):502–16.
221. Lorusso D, Pietragalla A, Mainenti S, Di Legge A, Amadio G, Scambia G. Emerging drugs for ovarian cancer. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2010;15(4):635–52.
222. Sessa C MS. Randomized single-agents trials in recurrent epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol*

- Cancer 2005 Nov-Dec;15 Suppl 3247-51.
223. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
 224. Hefler LA, Mustea A, Könsgen D, Concin N, Tanner B, Strick R, Heinze G, Grimm C, Schuster E, Tempfer C, Reinthaller A ZR. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2007 Feb 1;13(3):898-901.
 225. Burger RA, Sill MW, Monk BJ, Greer BE SJ. Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2007 Nov 20;25(33):5165-71.
 226. Hanrahan AJ, Schultz N, Westfal ML, Sakr RA, Giri DD, Scarperi S, Janakiraman M, Olvera N, Stevens EV, She QB, Aghajanian C, King TA, Stanchina Ed, Spriggs DR, Heguy A, Taylor BS, Sander C, Rosen N, Levine DA SD. Genomic complexity and AKT dependence in serous ovarian cancer. *Cancer Discov* 2012 Jan;2(1):56-67.
 227. Bookman MA, Darcy KM, Clarke-Pearson D, Boothby RA HI. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol* 2003 Jan 15;21(2):283-90.
 228. Gordon MS, Matei D, Aghajanian C, Matulonis UA, Brewer M, Fleming GF, Hainsworth JD, Garcia AA, Pegram MD, Schilder RJ, Cohn DE, Roman L, Derynck MK, Ng K, Lyons B, Allison DE, Eberhard DA, Pham TQ, Dere RC KB. Clinical activity of pertuzumab (rhuMAb 2C4), a HER dimerization inhibitor, in advanced ovarian cancer: potential predictive relationship with tumor HER2 activation status. *J Clin Oncol* 2006 Sep 10;24(26):4324-32.
 229. Konner J1, Schilder RJ, DeRosa FA, Gerst SR, Tew WP, Sabbatini PJ, Hensley ML, Spriggs DR AC. A phase II study of cetuximab/paclitaxel/carboplatin for the initial treatment of advanced-stage ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *Gynecol Oncol* 2008 Aug;110(2):140-5.
 230. Vasey PA, Gore M, Wilson R, Rustin G, Gabra H, Guastalla JP, Lauraine EP, Paul J, Carty K KSSGCTG. A phase Ib trial of docetaxel, carboplatin and erlotinib in ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancers. *Br J Cancer* 2008 Jun 3;98(11):1774-80.
 231. Virág L SC. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002 Sep;54(3):375-429.
 232. Armstrong DK, White AJ, Weil SC, Phillips M CR. Farletuzumab (a monoclonal antibody against folate receptor alpha) in relapsed platinum-sensitive ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2013 Jun;129(3):452-8.
 233. Elit Laurie HH. Novel Targeted Therapies in Ovarian Cancer. *J Cancer Sci Ther*. 2014;6(9):350–62.
 234. Naora H MD. Ovarian cancer metastasis: Integrating insights from disparate model organisms. *Nat Rev Cancer* 2005 May;5(5):355-66.
 235. Amadori D, Sansoni E AA. Ovarian cancer: Natural history and metastatic pattern. *Front Biosci* 1997 Jan 1;2g8-10.
 236. Eisenkop SM SN. The clinical significance of occult macroscopically positive retroperitoneal nodes in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2001 Jul;82(1):143-9.
 237. Sehoul J, Senyuva F, Fotopoulou C, Neumann U, Denkert C, Werner L GO. Intra-abdominal tumor dissemination pattern and surgical outcome in 214 patients with primary ovarian cancer. *J Surg Oncol* 2009 Jun 1;99(7):424-7.
 238. Tan DS, Agarwal R, Kaye SB. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *Lancet Oncol*. 2006;7(11):925–34.
 239. Burleson KM, Casey RC, Skubitz KM, Pambuccian SE, Oegema TR, Skubitz APN. Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers. *Gynecol Oncol*. 2004;93(1):170–81.
 240. Feldman GB, Knapp RC, Order SE HS. The role of lymphatic obstruction in the formation of ascites in a murine ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1972 Aug;32(8):1663-6.
 241. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol* 2010 Sep;177(3):1053-64.
 242. Healy JC RR. The peritoneum, mesenteries and omenta: normal anatomy and pathological processes. *Eur Radiol* 1998;8(6):886-900.
 243. Halkia E, Spiliotis J, Sugarbaker P. Diagnosis and management of peritoneal metastases from ovarian cancer. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012.
 244. Gerber SA, Rybalko VY, Bigelow CE, Lugade AA, Foster TH, Frelinger JG, et al. Preferential attachment of peritoneal tumor metastases to omental immune aggregates and possible role of a unique vascular microenvironment in metastatic survival and growth. *Am J Pathol*. 2006;169(5):1739–52.
 245. Rynne-Vidal A, Au-Yeung CL, Jiménez-Heffernan JA, Pérez-Lozano ML, Cremades-Jimeno L, Bárcena C, et al. Mesothelial-to-mesenchymal transition as a possible therapeutic target in peritoneal metastasis of ovarian cancer. *J Pathol*. 2017;
 246. Sako A, Kitayama J, Yamaguchi H, Kaisaki S, Suzuki H, Fukatsu K, Fujii S NH. Vascular endothelial growth factor synthesis by human omental mesothelial cells is augmented by fibroblast growth factor-2: possible role of mesothelial cell on the development of peritoneal metastasis. *J Surg Res* 2003 Nov;115(1):113-20.

247. Abendstein B, Stadlmann S, Knabbe C, Buck M, Müller-Holzner E, Zeimet AG, Marth C, Obrist P, Krugmann J OF. Regulation of transforming growth factor-beta secretion by human peritoneal mesothelial and ovarian carcinoma cells. *Cytokine* 2000 Jul;12(7):1115-9.
248. Yeung T-L, Leung CS, Yip K-P, Au Yeung CL, Wong STC, Mok SC. 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 Oct 1;309(7):C444-56.
249. Lawrance RJ, Loizidou M, Cooper AJ, Alexander P TI. Importance of the omentum in the development of intra-abdominal metastases. *Br J Surg* 1991 Jan;78(1):117-9.
250. Krist LF, Kerremans M, Broekhuis-Fluitsma DM, Eestermans IL, Meyer S BR. Milky spots in the greater omentum are predominant sites of local tumour cell proliferation and accumulation in the peritoneal cavity. *Cancer Immunol Immunother* 1998 Dec;47(4):205-12.
251. Hagiwara A, Takahashi T, Sawai K, Taniguchi H, Shimotsuma M, Okano S, Sakakura C, Tsujimoto H, Osaki K, Sasaki S et al. Milky spots as the implantation site for malignant cells in peritoneal dissemination in mice. *Cancer Res* 1993 Feb 1;53(3):687-92.
252. Nieman KM, Kenny HA, Penicka C V, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med*. 2011;17(11):1498–503.
253. Hu J, Liu Z, Wang X. Does TP53 mutation promote ovarian cancer metastasis to omentum by regulating lipid metabolism? *Med Hypotheses*. Elsevier Ltd; 2013;81(4):515–20.
254. Gary Lee YC, Melkerneker D, Thompson PJ, Light RW LK. Transforming growth factor beta induces vascular endothelial growth factor elaboration from pleural mesothelial cells in vivo and in vitro. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 Jan 1;165(1):88-94.
255. Lessan K, Aguiar DJ, Oegema T, Siebenson L SA. CD44 and beta1 integrin mediate ovarian carcinoma cell adhesion to peritoneal mesothelial cells. *Am J Pathol* 1999 May;154(5):1525-37.
256. Labelle M, Begum S HR. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 2011 Nov 15;20(5):576-90.
257. Ahmed N, Thompson EW, Quinn MA. Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *J Cell Physiol*. 2007 Dec;213(3):581–8.
258. Ahmed N, Maines-Bandiera S, Quinn MA, Unger WG, Dedhar S AN. Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006 Jun;290(6):C1532-42.
259. Mutsaers SE. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology* 2002 Sep;7(3):171-91.
260. Cavallaro U CG. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004 Feb;4(2):118-32.
261. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*. 2006 Sep 1;66(17):8319–26.
262. Auersperg N, Pan J, Grove BD, Peterson T, Fisher J, Maines-Bandiera S, Somasiri A RC. E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 May 25;96(11):6249-54.
263. Cho EY, Choi Y, Chae SW, Sohn JH, Ahn GH. Immunohistochemical study of the expression of adhesion molecules in ovarian serous neoplasms. *Pathol Int*. 2006 Feb;56(2):62–70.
264. Elloul S, Vaksman O, Stavnes HT, Trope CG, Davidson B, Reich R. Mesenchymal-to-epithelial transition determinants as characteristics of ovarian carcinoma effusions. *Clin Exp Metastasis*. 2010 Mar;27(3):161–72.
265. McDonald JS, Milosevic D, Reddi H V., Grebe SK, Algeciras-Schimnich A. Analysis of circulating microRNA: Preatalytical and analytical challenges. *Clin Chem*. 2011;57(6):833–40.
266. R. A. Irizarry, B. Hobbs, F. Collin, Y. D. Beazer-Barclay KJA, U. Scherf TPS. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4:249–264.
267. Robert Gentleman, Vince Carey, Wolfgang Huber, Rafael Irizarry and SD. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Springer.
268. <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis/>.
269. <http://csibio.nus.edu.sg/CSIOVDB/CSIOVDB.html>.
270. Tan TZ, Yang H, Ye J, Low J, Choolani M, Peng Tan DS, et al. CSIOVDB: A microarray gene expression database of epithelial ovarian cancer subtype. *Oncotarget*. 2015;6(41).
271. Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. *Cell Cycle*. 2009 Jul 1;8(13):2014–8.
272. Dachary-Prigent J, Freyssinet JM, Pasquet JM, Carron JC, Nurden AT. Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. *Blood*. 1993 May 15;81(10):2554–65.
273. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2008;110(1):13–21.
274. Ng YH, Rome S, Jalabert A, Forterre A, Singh H, Hincks CL, et al. Endometrial Exosomes/Microvesicles in the Uterine Microenvironment: A New Paradigm for Embryo-Endometrial

- Cross Talk at Implantation. *PLoS One*. 2013;8(3).
275. Ohlsson Teague EMC, Van der Hoek KH, Van der Hoek MB, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson SA, et al. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol Endocrinol*. 2009 Feb;23(2):265–75.
 276. Devor EJ, Hovey AM, Goodheart MJ, Ramachandran S, Leslie KK. microRNA expression profiling of endometrial endometrioid adenocarcinomas and serous adenocarcinomas reveals profiles containing shared, unique and differentiating groups of microRNAs. *Oncol Rep*. 2011 Oct;26(4):995–1002.
 277. Dharmaraj N, Chapela PJ, Morgado M, Hawkins SM, Lessey BA, Young SL, et al. Expression of the transmembrane mucins, MUC1, MUC4 and MUC16, in normal endometrium and in endometriosis. *Hum Reprod*. 2014 Aug;29(8):1730–8.
 278. Sundqvist J, Andersson KL, Scarselli G, Gemzell-Danielsson K, Lalitkumar PGL. Expression of adhesion, attachment and invasion markers in eutopic and ectopic endometrium: a link to the aetiology of endometriosis. *Hum Reprod*. 2012 Sep;27(9):2737–46.
 279. Torres A, Torres K, Wdowiak P, Paszkowski T, Maciejewski R. Selection and validation of endogenous controls for microRNA expression studies in endometrioid endometrial cancer tissues. *Gynecol Oncol*. 2013 Sep;130(3):588–94.
 280. Basu M, Bhattacharya R, Ray U, Mukhopadhyay S, Chatterjee U RS. Invasion of ovarian cancer cells is induced byPITX2-mediated activation of TGF- β and Activin-A. *Mol Cancer*. 14:162.
 281. Padua D, Massagué J. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res*. 2009 Jan;19(1):89–102.
 282. Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev*. 2008;7(6):489–503.
 283. Wang GH, Yao L, Xu HW, Tang WT, Fu JH, Hu XF, et al. Identification of MXRA5 as a novel biomarker in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2013;5(2):544–8.
 284. Motrescu ER, Rio MC. Cancer cells, adipocytes and matrix metalloproteinase 11: A vicious tumor progression cycle. *Biol Chem*. 2008;389(8):1037–41.
 285. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Mar;8(3):221–33.
 286. Ying SY, Zhang Z, Furst B, Batres Y, Huang G, Li G. Activins and activin receptors in cell growth. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1997 Feb;214(2):114–22.
 287. Gueron G, De Siervi A, Ferrando M, Salierno M, De Luca P, Elguero B, et al. Critical role of endogenous heme oxygenase 1 as a tuner of the invasive potential of prostate cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2009 Nov;7(11):1745–55.
 288. Sun J, Zhuang F-F, Mullersman JE, Chen H, Robertson EJ, Warburton D, et al. BMP4 activation and secretion are negatively regulated by an intracellular gremlin-BMP4 interaction. *J Biol Chem*. 2006 Sep 29;281(39):29349–56.
 289. Khokha MK, Hsu D, Brunet LJ, Dionne MS, Harland RM. Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nat Genet*. 2003 Jul;34(3):303–7.
 290. Stan R V, Tkachenko E, Niesman IR. PV1 is a key structural component for the formation of the stomatal and fenestral diaphragms. *Mol Biol Cell*. 2004 Aug;15(8):3615–30.
 291. Predescu SA, Predescu DN, Palade GE. Plasmalemmal vesicles function as transcytotic carriers for small proteins in the continuous endothelium. *Am J Physiol*. 1997 Feb;272(2 Pt 2):H937–49.
 292. Chi DS, Venkatraman ES, Masson V, Hoskins WJ. The ability of preoperative serum CA-125 to predict optimal primary tumor cytoreduction in stage III epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2000 May;77(2):227–31.
 293. Zhang B, Cai FF, Zhong XY. An overview of biomarkers for the ovarian cancer diagnosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. Elsevier Ireland Ltd; 2011;158(2):119–23.
 294. Diamandis EP. The failure of protein cancer biomarkers to reach the clinic: why, and what can be done to address the problem? *BMC Med*. 2012 Aug 9;10:87.
 295. Mai PL, Wentzensen N, Greene MH. Challenges related to developing serum-based biomarkers for early ovarian cancer detection. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011 Mar;4(3):303–6.
 296. Davidson B, Espina V, Steinberg SM, Flørenes VA, Liotta LA, Kristensen GB, et al. Proteomic analysis of malignant ovarian cancer effusions as a tool for biologic and prognostic profiling. *Clin Cancer Res*. 2006 Feb 1;12(3 Pt 1):791–9.
 297. Kipps E, Tan DSP, Kaye SB. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group; 2013;13(4):273–82.
 298. Gortzak-Uzan L, Ignatchenko A, Evangelou AI, Agochiya M, Brown KA, St-Onge P, et al. A proteome resource of ovarian cancer ascites: Integrated proteomic and bioinformatic analyses to identify putative biomarkers. *J Proteome Res*. 2008;7(1):339–51.
 299. Funkhouser JW, Hunter KK, Thompson NJ. The diagnostic value of cul-de-sac aspiration in the detection of ovarian carcinoma. *Acta Cytol*. 19(6):538–41.
 300. Maritschnegg E, Wang Y, Pecha N, Horvat R, Van Nieuwenhuysen E, Vergote I, et al. Lavage of the uterine cavity for molecular detection of Mullerian duct carcinomas: A proof-of-concept study. *J Clin Oncol*. 2015;33(36):4293–300.
 301. Hannan NJ, Nie G, Rainczuk a, Rombauts L J F, Salamonsen L a. Uterine lavage or aspirate: which view of the intrauterine environment? *Reprod Sci*. 2012;19(10):1125–32.
 302. Baergen RN, Warren CD, Isacson C, Ellenson LH. Early uterine serous carcinoma: clonal origin of

- extrauterine disease. *Int J Gynecol Pathol.* 2001 Jul;20(3):214–9.
303. Fujimoto I, Han S, Fukuda K, Yamauchi K, Masubuchi K S. A: A study on cytological diagnosis of ovarian serous cystadenocarcinoma (in Japanese). *J Jpn Soc Clin Cytol* 1986;2594–100.
304. Ohno M, Yamamoto H, Kanda Y, Sato T, Tanaka S, Tsumura N, Fujii M, Takashina T KR. Cervicovaginal and endometrial smear of ovarian cancer (in Japanese). *J Jpn Soc Cytol* 1986;2587–93.
305. Kato Y, Jyobo T KH. Diagnosis of ovarian carcinoma with endometrial aspiration cytology (in Japanese). *J Jpn Soc Clin Cytol* 1983;24696–702.
306. Takashina T, Ono M, Kanda Y, Sagae S, Hayakawa O IE. Cervicovaginal and endometrial cytology in ovarian cancer. *Acta Cytol* 1988;32159–162.
307. Cooper J. M. EML. Endometrial sampling techniques in the diagnosis of abnormal uterine bleeding. *Obs Gynecol Clin North Am* 27, 235–244 (2000).
308. Tang MKS, Wong AST. Exosomes: Emerging biomarkers and targets for ovarian cancer. *Cancer Lett.* 2015;367(1):26–33.
309. Zhang W, Peng P, Kuang Y, Yang J, Cao D, You Y, et al. Characterization of exosomes derived from ovarian cancer cells and normal ovarian epithelial cells by nanoparticle tracking analysis. *Tumor Biol.* 2016;37(3):4213–21.
310. Giusti I, D’Ascenzo S, Dolo V. Microvesicles as potential ovarian cancer biomarkers. *Biomed Res Int.* 2013;2013:703048.
311. Keller S, Konig AK, Marme F, Runz S, Wolterink S, Koensgen D, et al. Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes. *Cancer Lett. Elsevier Ireland Ltd;* 2009;278(1):73–81.
312. Liu J, Sun H, Wang X, Yu Q, Li S, Yu X GW. Increased exosomal microRNA-21 and microRNA-146a levels in the cervicovaginal lavage specimens of patients with cervical cancer. *Int J Mol Sci* 2014 Jan 8;15(1)758-73.
313. Peterson MF, Otoc N, Sethi JK, Gupta A, Antes TJ. Integrated systems for exosome investigation. *Methods.* 2015 Oct 1;87:31–45.
314. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Trachtenberg AJ, Hochberg FH, Skog J, et al. Impact of biofluid viscosity on size and sedimentation efficiency of the isolated microvesicles. *Front Physiol.* 2012;3 MAY(May):1–6.
315. Théry C, Clayton A, Amigorena S, Raposo G. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006;3.22.1-3.22.29.
316. Taylor DD, Shah S. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods. Elsevier Inc.;* 2015;87:3–10.
317. György B, Módos K, Pállinger É, Pálóczi K, Pásztoi M, Misják P, et al. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood.* 2011;117(4):39–49.
318. Runz S, Keller S, Rupp C, Stoeck A, Issa Y, Koensgen D, et al. Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM. *Gynecol Oncol.* 2007;107(3):563–71.
319. de Gassart A, Geminard C, Fevrier B, Raposo G, Vidal M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood.* 2003 Dec 15;102(13):4336–44.
320. First Symposium of “Grupo Español de Investigación en Vesículas Extracelulares (GEIVEX)”, Segovia, 89 November 2012.
321. KAPLAN L.A., PESCE A.J., KAZAMIERCZAK S.C. O-CJ. Hemoglobina, porfirina y metabolismo del hierro. En: *Química clínica: Teoría, Análisis y Correlación.* Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1992. 721-73. p.
322. Engineering G. Four Considerations for Enriching Extracellular Vesicles | Exosome RNA. 2016;1–5.
323. Smyth TJ, Redzic JS, Graner MW, Anchordoquy TJ. Examination of the specificity of tumor cell derived exosomes with tumor cells in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Nov;1838(11):2954–65.
324. Barrès C, Blanc L, Bette-Bobillo P, André S, Mamoun R, Gabius HJ VM. Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood* 2010 Jan 21;115(3)696-705.
325. Belov L, Matic KJ, Hallal S, Best OG, Mulligan SP, Christopherson RI. Extensive surface protein profiles of extracellular vesicles from cancer cells may provide diagnostic signatures from blood samples. *J Extracell vesicles.* 2016;5:25355.
326. Salomon C, Yee S, Scholz-Romero K, Kobayashi M, Vaswani K, Kvaskoff D, et al. Extravillous trophoblast cells-derived exosomes promote vascular smooth muscle cell migration. *Front Pharmacol.* 2014;5:175.
327. Emily Zeringer, Mu Li, Tim Barta, Jeffrey Schageman, Ketil Winther Pedersen, Axl Neurauter, Susan Magdaleno RS and AVV. Methods for the extraction and RNA profiling of exosomes. *World J Methodol.* 2013;3(1):11–8.
328. Jenjaroenpun P, Kremenska Y, Nair VM, Kremensky M, Joseph B, Kurochkin I V. Characterization of RNA in exosomes secreted by human breast cancer cell lines using next-generation sequencing. *PeerJ.* 2013;1:e201.
329. Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, Hill AF. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J Extracell vesicles.*

- 2014;3.
330. Akers JC, Ramakrishnan V, Kim R, Skog J, Nakano I, Pingle S, et al. miR-21 in the Extracellular Vesicles (EVs) of Cerebrospinal Fluid (CSF): A platform for glioblastoma biomarker development. *PLoS One*. 2013;8(10):1–13.
 331. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*. 2008;3(11).
 332. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol*. 2009;10(6):R64.
 333. Schwarzenbach H, Da Silva AM, Calin G, Pantel K. Data normalization strategies for microRNA quantification. *Clin Chem*. 2015;61(11):1333–42.
 334. Zhao T, Hu W. CA125 and HE4: Measurement tools for ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest*. 2016;81(5):430–5.
 335. Atguden Z, Yildiz A, Aksut H, Yalcin SE, Yalcin Y, Uysal D, et al. The value of preoperative CA 125 levels in prediction of myometrial invasion in patients with early-stage endometrioid-type endometrial cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(2):497–501.
 336. Kim KH, Choi J-S, Kim JM, Choi Y-L, Shin YK, Lee H, et al. Enhanced CD24 expression in endometrial carcinoma and its expression pattern in normal and hyperplastic endometrium. *Histol Histopathol*. 2009;24(3):309–16.
 337. Arslan AA, Gold LI, Mittal K, Suen T-C, Belitskaya-Levy I, Tang M-S, et al. Gene expression studies provide clues to the pathogenesis of uterine leiomyoma: new evidence and a systematic review. *Hum Reprod*. 2005 Apr;20(4):852–63.
 338. Snowdon J, Zhang X, Childs T, Tron VA, Feilotter H. The microRNA-200 family is upregulated in endometrial carcinoma. *PLoS One*. 2011;6(8):e22828.
 339. Gao Y-C, Wu J. MicroRNA-200c and microRNA-141 as potential diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer. *Tumour Biol*. 2015 Jun;36(6):4843–50.
 340. Chung TKH, Cheung TH, Huen NY, Wong KWY, Lo KWK, Yim SF, et al. Dysregulated microRNAs and their predicted targets associated with endometrioid endometrial adenocarcinoma in Hong Kong women. *Int J Cancer*. 2009;124(6):1358–65.
 341. Sathyapalan T, David R, Gooderham NJ, Atkin SL. Increased expression of circulating miRNA-93 in women with polycystic ovary syndrome may represent a novel, non-invasive biomarker for diagnosis. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2015;5(November):16890.
 342. Jia W, Wu Y, Zhang Q, Gao G, Zhang C, Xiang Y. Identification of four serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as potential non-invasive biomarkers for endometrioid endometrial cancer. *Oncol Lett*. 2013;6(1):261–7.
 343. Laios A, O'Toole S, Flavin R, Martin C, Kelly L, Ring M, et al. Potential role of miR-9 and miR-223 in recurrent ovarian cancer. *Mol Cancer*. 2008 Apr 28;7:35.
 344. Rekker K, Saare M, Roost AM, Kaart T, Sõritsa D, Karro H, et al. Circulating miR-200-family microRNAs have altered plasma levels in patients with endometriosis and vary with blood collection time. *Fertil Steril*. 2015 Oct;104(4):938–946.e2.
 345. Gadducci A, Sergiampietri C, Lanfredini N, Guiggi I. Micro-RNAs and ovarian cancer: the state of art and perspectives of clinical research. *Gynecol Endocrinol*. 2014 Apr;30(4):266–71.
 346. Jia S-Z, Yang Y, Lang J, Sun P, Leng J. Plasma miR-17-5p, miR-20a and miR-22 are down-regulated in women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2013 Feb;28(2):322–30.
 347. Chen L, Zhang F, Sheng X-G, Zhang S-Q, Chen Y-T, Liu B-W. MicroRNA-106a regulates phosphatase and tensin homologue expression and promotes the proliferation and invasion of ovarian cancer cells. *Oncol Rep*. 2016 Oct;36(4):2135–41.
 348. Hull ML, Nisenblat V. Tissue and circulating microRNA influence reproductive function in endometrial disease. *Reprod Biomed Online*. 2013 Nov;27(5):515–29.
 349. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 Jun 7;8(8):467–77.
 350. Zhao Z, Yang Y, Zeng Y, He M. A microfluidic ExoSearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis. *Lab Chip*. 2016 Feb 7;16(3):489–96.
 351. Keller S, König AK, Marmé F, Runz S, Wolterink S, Koensgen D, Mustea A, Sehouli J AP. Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes. *Cancer Lett* 2009 Jun 8;278(1)73-81.
 352. Lokadasan R, James F V., Narayanan G, Prabhakaran PK. Targeted agents in epithelial ovarian cancer: Review on emerging therapies and future developments. *Ecancermedalscience*. 2016;10:1–20.
 353. Neijt JP, Engelholm SA, Tuxen MK, Sorensen PG, Hansen M, Sessa C, et al. Exploratory phase III study of paclitaxel and cisplatin versus paclitaxel and carboplatin in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2000 Sep;18(17):3084–92.
 354. Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, Ngan HY, Pecorelli S BU. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obs* 2006 Nov;95 Suppl 1S161-92.
 355. Bookman MA, Brady MF, McGuire WP, Harper PG, Alberts DS, Friedlander M, 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 Mar 20;27(9):1419–25.
356. Coward JI, Middleton K MF. New perspectives on targeted therapy in ovarian cancer. *Int J Womens Heal* 2015 Feb 4;7:189–203.
 357. Dancey J. Targeted therapies and clinical trials in ovarian cancer. *Ann Oncol*. 2013;24(SUPPL.10).
 358. Schaner ME, Ross DT, Ciaravino G, Sorlie T, Troyanskaya O, Diehn M, et al. Gene expression patterns in ovarian carcinomas. *Mol Biol Cell*. 2003 Nov;14(11):4376–86.
 359. Adib TR, Henderson S, Perrett C, Hewitt D, Bourmpoulia D, Ledermann J, et al. Predicting biomarkers for ovarian cancer using gene-expression microarrays. *Br J Cancer*. 2004;90(3):686–92.
 360. Bonome T, Lee J-Y, Park D-C, Radonovich M, Pise-Masison C, Brady J, et al. Expression profiling of serous low malignant potential, low-grade, and high-grade tumors of the ovary. *Cancer Res*. 2005 Nov 15;65(22):10602–12.
 361. Berchuck A, Iversen ES, Lancaster JM, Pittman J, Luo J, Lee P, et al. Patterns of gene expression that characterize long-term survival in advanced stage serous ovarian cancers. *Clin Cancer Res*. 2005 May 15;11(10):3686–96.
 362. Tothill RW, Tinker A V., George J, Brown R, Fox SB, Lade S, et al. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2008;14(16):5198–208.
 363. Jazaeri AA, Awtrey CS, Chandramouli GVR, Chuang YE, Khan J, Sotiriou C, et al. Gene expression profiles associated with chemotherapy in epithelial ovarian cancers. *Clin Cancer Res*. 2005 Sep 1;11(17):6300–10.
 364. Brodsky AS, Fischer A, Miller DH, Vang S, MacLaughlan S, Wu HT, et al. Expression profiling of primary and metastatic ovarian tumors reveals differences indicative of aggressive disease. *PLoS One*. 2014;9(4):1–9.
 365. Bignotti E, Tassi RA, Calza S, Ravaggi A, Bandiera E, Rossi E, et al. Gene expression profile of ovarian serous papillary carcinomas: identification of metastasis-associated genes. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(3).
 366. Lancaster JM, Dressman HK, Clarke JP, Sayer RA, Martino MA, Cragun JM, et al. Identification of genes associated with ovarian cancer metastasis using microarray expression analysis. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16(5):1733–45.
 367. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*. 2003 Jan;33(1):49–54.
 368. Al-Alem L, Curry TE. Ovarian cancer: Involvement of the matrix metalloproteinases. *Reproduction*. 2015;150(2):R55–64.
 369. Rodriguez GC, Haisley C, Hurteau J, Moser TL, Whitaker R, Bast RC, et al. Regulation of invasion of epithelial ovarian cancer by transforming growth factor-beta. *Gynecol Oncol*. 2001 Feb;80(2):245–53.
 370. Yeung TL, Leung CS, Wong KK, Samimi G, Thompson MS, Liu J, et al. TGF- β Modulates ovarian cancer invasion by upregulating CAF-Derived versican in the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2013;73(16):5016–28.
 371. Yamamura S, Matsumura N, Mandai M, Huang Z, Oura T, Baba T, et al. The activated transforming growth factor-beta signaling pathway in peritoneal metastases is a potential therapeutic target in ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2012;130(1):20–8.
 372. Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Cannon MJ, Pecorelli S, Parham GP. Secretion of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*. 1999;20(3):177–81.
 373. Cowin PA, George J, Fereday S, Loehrer E, Van Loo P, Cullinane C, et al. LRP1B deletion in high-grade serous ovarian cancers is associated with acquired chemotherapy resistance to liposomal doxorubicin. *Cancer Res*. 2012;72(16):4060–73.
 374. Xu H, Ma Y, Zhang Y, Pan Z, Lu Y, Liu P, et al. Identification of cathepsin K in the peritoneal metastasis of ovarian carcinoma using in-silico, gene expression analysis. *J Cancer*. 2016;7(6):722–9.
 375. Veerkamp JH, van Moerkerk HT. Fatty acid-binding protein and its relation to fatty acid oxidation. *Mol Cell Biochem*. 123(1–2):101–6.
 376. Zimmerman AW, Veerkamp JH. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Jul;59(7):1096–116.
 377. Tan TZ, Miow QH, Huang RY-J, Wong MK, Ye J, Lau JA, et al. Functional genomics identifies five distinct molecular subtypes with clinical relevance and pathways for growth control in epithelial ovarian cancer. *EMBO Mol Med*. 2013 Jul;5(7):1051–66.
 378. Leong HS, Galletta L, Etemadmoghadam D, George J, Australian Ovarian Cancer Study, Köbel M, et al. Efficient molecular subtype classification of high-grade serous ovarian cancer. *J Pathol*. 2015 Jul;236(3):272–7.
 379. Kim H, Watkinson J, Varadan V, Anastassiou D. Multi-cancer computational analysis reveals invasion-associated variant of desmoplastic reaction involving INHBA, THBS2 and COL11A1. *BMC Med Genomics*. BioMed Central Ltd; 2010;3(1):51.
 380. Desmoulière A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol*. 2004;48(5–6):509–17.
 381. Etienne W, Meyer MH, Peppers J, Meyer RA. Comparison of mRNA gene expression by RT-PCR and DNA microarray. *Biotechniques*. 2004 Apr;36(4):618–20, 622, 624–6.

382. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014 Oct 5;740:364–78.
383. Hamel E, del Campo AA, Lowe MC, Lin CM. Interactions of taxol, microtubule-associated proteins, and guanine nucleotides in tubulin polymerization. *J Biol Chem.* 1981 Nov 25;256(22):11887–94.
384. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>.
385. Gotea V, Ovcharenko I. DiRE: identifying distant regulatory elements of co-expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Web Server issue):133–9.
386. <http://dire.dcode.org>.
387. Tauber S, Jais A, Jeitler M, Haider S, Husa J, Lindroos J, et al. Transcriptome analysis of human cancer reveals a functional role of heme oxygenase-1 in tumor cell adhesion. *Mol Cancer.* 2010;9:200.
388. Liu Y, Carson-Walter EB, Cooper A, Winans BN, Johnson MD, Walter KA. Vascular gene expression patterns are conserved in primary and metastatic brain tumors. *J Neurooncol.* 2010;99(1):13–24.
389. Buckanovich RJ, Sasaroli D, O'Brien-Jenkins A, Botbyl J, Hammond R, Katsaros D, et al. Tumor vascular proteins as biomarkers in ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(7):852–61.
390. He Y, Chen X, Liu H, Xiao H, Kwapong WR, Mei J. Matrix-remodeling associated 5 as a novel tissue biomarker predicts poor prognosis in non-small cell lung cancers. *Cancer Biomarkers.* 2015;15(5):645–51.
391. Xiong D, Li G, Li K, Xu Q, Pan Z, Ding F, et al. Exome sequencing identifies MXRA5 as a novel cancer gene frequently mutated in non-small cell lung carcinoma from Chinese patients. *Carcinogenesis.* 2012 Sep;33(9):1797–805.
392. Minafra L, Bravatà V, Forte GI, Cammarata FP, Gilardi MC, Messa C. Gene expression profiling of epithelial-mesenchymal transition in primary breast cancer cell culture. *Anticancer Res.* 2014 May;34(5):2173–83.
393. Poveda J, Sanz AB, Fernandez-Fernandez B, Carrasco S, Ruiz-Ortega M, Cannata-Ortiz P, et al. MXRA5 is a TGF- β 1-regulated human protein with anti-inflammatory and anti-fibrotic properties. *J Cell Mol Med.* 2017 Jan;21(1):154–64.
394. Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell.* 2000 Oct 13;103(2):295–309.
395. Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K, van de Rijn M, Tward AD, West R, et al. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(40):14842–7.
396. Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE, Kirsch R, Riddell RH, Diamandis EP. Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Mol Cancer Res.* 2012 Nov;10(11):1403–18.
397. Karagiannis GS, Musrap N, Saraon P, Treacy A, Schaeffer DF, Kirsch R, et al. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin-1 regulates colon cancer progression. *Biol Chem.* 2015;396(2):163–83.
398. Kim M, Yoon S, Lee S, Ha SA, Kim HK, Kim JW, et al. Gremlin-1 induces BMP-independent tumor cell proliferation, migration, and invasion. *PLoS One.* 2012;7(4).
399. Namkoong H, Shin SM, Kim HK, Ha S-A, Cho GW, Hur SY, et al. The bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is overexpressed in human cancers and interacts with YWHAH protein. *BMC Cancer.* 2006 Mar 18;6:74.
400. Sato M, Kawana K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, Nishida H, et al. Clinical significance of Gremlin 1 in cervical cancer and its effects on cancer stem cell maintenance. *Oncol Rep.* 2016;35(1):391–7.
401. Mitola S, Ravelli C, Moroni E, Salvi V, Leali D, Ballmer-Hofer K, et al. Gremlin is a novel agonist of the major proangiogenic receptor VEGFR2. *Blood.* 2010;116(18):3677–80.
402. Tatsinkam AJ, Mulloy B, Rider CC. Mapping the heparin-binding site of the BMP antagonist gremlin by site-directed mutagenesis based on predictive modelling. *Biochem J.* 2015 Aug 15;470(1):53–64.
403. Grillo E, Ravelli C, Corsini M, Ballmer-Hofer K, Zammataro L, Oreste P, et al. Monomeric gremlin is a novel vascular endothelial growth factor receptor-2 antagonist. *Oncotarget.* 2016;7(23).
404. Strickland LA, Jubbs AM, Hongo JA, Zhong F, Burwick J, Fu L, et al. Plasmalemmal vesicle-associated protein (PLVAP) is expressed by tumour endothelium and is upregulated by vascular endothelial growth factor-A (VEGF). *J Pathol.* 2005;206(4):466–75.
405. Wang Y-H, Cheng T-Y, Chen T-Y, Chang K-M, Chuang VP, Kao K-J. Plasmalemmal Vesicle Associated Protein (PLVAP) as a therapeutic target for treatment of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2014;14(1):815.
406. Inai T, Mancuso M, Hashizume H, Baffert F, Haskell A, Baluk P, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am J Pathol.* 2004 Jul;165(1):35–52.
407. Zheng W, Luo MP, Welt C, Lambert-Messerlian G, Sung CJ, Zhang Z, et al. Imbalanced expression of inhibin and activin subunits in primary epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 1998;69(1):23–31.
408. Ala-Fossi SL, Mäenpää J, Bläuer M, Tuohimaa P, Punnonen R. Inhibin A, B and pro-alphaC in serum and peritoneal fluid in postmenopausal patients with ovarian tumors. *Eur J Endocrinol.* 2000 Apr;142(4):334–9.

409. Zheng W, Lu JJ, Luo F, Hsieh J, Wang CY, Zhang C, et al. Tumor stroma as the main source of inhibin production in ovarian epithelial tumors. *Am J Reprod Immunol.* 2000;44(2):104–13.
410. Choi YL, Kim HS, Ahn G. Immunoexpression of inhibin alpha subunit, inhibin/activin betaA subunit and CD99 in ovarian tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Apr;124(4):563–9.
411. Burger HG, Baillie A, Drummond AE, Healy DL, Jobling T, Mamers P, et al. Inhibin and ovarian cancer. *J Reprod Immunol.* 1998 Aug;39(1–2):77–87.
412. Jobling T, Mamers P, Healy DL, MacLachlan V, Burger HG, Quinn M, et al. A prospective study of inhibin in granulosa cell tumors of the ovary. *Gynecol Oncol.* 1994 Nov;55(2):285–9.
413. Robertson DM, Pruyers E, Jobling T. Inhibin as a diagnostic marker for ovarian cancer. *Cancer Lett.* 2007;249(1):14–7.
414. Welt CK, Lambert-Messerlian G, Zheng W, Sluss P, Crowley WF S AL. Activin, inhibin and follis follistatin in epithelial ovarian carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3720–3727.
415. Walentowicz P, Krintus M, Sadlecki P, Grabiec M, Mankowska-Cyl A, Sokup A, et al. Serum inhibin A and inhibin B levels in epithelial ovarian cancer patients. *PLoS One.* 2014;9(3):e90575.
416. Zheng W LS. Inhibin and activin: Their roles in ovarian tumorigenesis and their diagnostic utility in surgical pathology practice. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 1999; 7:29–38.
417. Do T-V, Kubba LA, Antenos M, Rademaker AW, Sturgis CD, Woodruff TK. The role of activin A and Akt/GSK signaling in ovarian tumor biology. *Endocrinology.* 2008 Aug;149(8):3809–16.
418. Li Y, Zhu H, Klausen C, Peng B, Leung PCK. Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) mediates activin a-induced human trophoblast endothelial-like tube formation. *Endocrinology.* 2015;156(11):4257–68.
419. Guaita-Esteruelas S, Gumà J, Masana L, Borràs J. The peritumoural adipose tissue microenvironment and cancer. The roles of fatty acid binding protein 4 and fatty acid binding protein 5. *Molecular and Cellular Endocrinology.* Elsevier Ireland Ltd; 2016.
420. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. Ovarian cancer and body size: individual participant meta-analysis including 25,157 women with ovarian cancer from 47 epidemiological studies. *PLoS Med.* 2012;9(4):e1001200.
421. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese R V. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab.* Elsevier Inc.; 2013;18(2):153–61.
422. Wang J, Yang D-L, Chen Z-Z, Gou B-F. Associations of body mass index with cancer incidence among populations, genders, and menopausal status: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol.* 2016;42:1–8.
423. Liu Y, Metzinger MN, Lewellen KA, Cripps SN, Carey KD, Harper EI, et al. Obesity Contributes to Ovarian Cancer Metastatic Success through Increased Lipogenesis, Enhanced Vascularity, and Decreased Infiltration of M1 Macrophages. *Cancer Res.* 2015 Dec 1;75(23):5046–57.
424. Harjes U, Bridges E, Gharpure KM, Roxanis I, Sheldon H, Miranda F, et al. Antiangiogenic and tumour inhibitory effects of downregulating tumour endothelial FABP4. *Oncogene.* Nature Publishing Group; 2016;(January):1–10.
425. Elmasri H, Ghelfi E, Yu C, Traphagen S, Cernadas M, Cao H, et al. Endothelial cell-fatty acid binding protein 4 promotes angiogenesis: role of stem cell factor/c-kit pathway. *Angiogenesis.* 2012 Sep;15(3):457–68.
426. Wang H, Huang X, Zhang J, Shao N, Chen LO, Ma D, et al. The expression of VEGF and Dll4/Notch pathway molecules in ovarian cancer. *Clin Chim Acta.* 2014 Sep 25;436:243–8.
427. Harjes U, Bridges E, McIntyre A, Fielding BA, Harris AL. Fatty acid-binding protein 4, a point of convergence for angiogenic and metabolic signaling pathways in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2014 Aug 15;289(33):23168–76.
428. Li J-L, Sainson RCA, Oon CE, Turley H, Leek R, Sheldon H, et al. DLL4-Notch signaling mediates tumor resistance to anti-VEGF therapy in vivo. *Cancer Res.* 2011 Sep 15;71(18):6073–83.
429. Mueller J, Brebeck B, Schmalfeldt B, Kuhn W, Graeff H, Höfler H. Stromelysin-3 expression in invasive ovarian carcinomas and tumours of low malignant potential. *Virchows Arch.* 2000;437(6):618–24.
430. Périgny M, Bairati I, Harvey I, Beauchemin M, Harel F, Plante M, et al. Role of immunohistochemical overexpression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-11 in the prognosis of death by ovarian cancer. *Am J Clin Pathol.* 2008;129(2):226–31.
431. Rio MC. Stromelysin-3, a particular member of the matrix metalloproteinase family.
432. Noël A, Boulay A, Kebers F, Kannan R, Hajitou A, Calberg-Bacq CM, et al. Demonstration in vivo that stromelysin-3 functions through its proteolytic activity. *Oncogene.* 2000 Mar 16;19(12):1605–12.
433. Motrescu ER, Blaise S, Etique N, Messaddeq N, Chenard M-P, Stoll I, et al. Matrix metalloproteinase-11/stromelysin-3 exhibits collagenolytic function against collagen VI under normal and malignant conditions. *Oncogene.* 2008 Oct 23;27(49):6347–55.
434. Pei D, Majmudar G, Weiss SJ. Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3. *J Biol Chem.* 1994 Oct 14;269(41):25849–55.
435. Luo D, Mari B, Stoll I, Anglard P. Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. *J Biol Chem.* 2002;277(28):25527–36.
436. Anglard P, Melot T, Guérin E, Thomas G, Basset P. Structure and promoter characterization of the

- human stromelysin-3 gene. *J Biol Chem*. 1995 Sep 1;270(35):20337–44.
437. Noël A, Hajitou A, L'Hoir C, Maquoi E, Baramova E, Lewalle JM, et al. Inhibition of stromal matrix metalloproteases: effects on breast-tumor promotion by fibroblasts. *Int J cancer*. 1998 Apr 13;76(2):267–73.
438. Bowtell DDL. The genesis and evolution of high-grade serous ovarian cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(11):803–8.
439. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, 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 Jan 4;334(1):1–6.
440. Parrott JA, Nilsson E, Mosher R, Magrane G, Albertson D, Pinkel D, et al. Stromal-epithelial interactions in the progression of ovarian cancer: influence and source of tumor stromal cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 Apr 25;175(1–2):29–39.
441. Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2005 Jun;7(6):513–20.
442. Kerbel RS. A cancer therapy resistant to resistance. *Nature*. 1997 Nov 27;390(6658):335–6.
443. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011 May 19;473(7347):298–307.
444. Wang Y, Law W-K, Hu J-S, Lin H-Q, Ip T-M, Wan DC-C. Discovery of FDA-approved drugs as inhibitors of fatty acid binding protein 4 using molecular docking screening. *J Chem Inf Model*. 2014;54(11):3046–50.
445. Wang Y-T, Liu C-H, Zhu H-L. Fatty acid binding protein (FABP) inhibitors: a patent review (2012-2015). *Expert Opin Ther Pat*. 2016;26(7):767–76.
446. Angosto MC, Álvarez-Gómez JÁ. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An la Real Acad Nac Farm*. 2010;76(1):59–84.
447. Matziari M, Dive V, Yiotakis A. Matrix metalloproteinase 11 (MMP-11; stromelysin-3) and synthetic inhibitors. *Med Res Rev*. 2007;27(4):528–52.
448. Burak MF, Inouye KE, White A, Lee A, Tuncman G, Calay ES, et al. Development of a therapeutic monoclonal antibody that targets secreted fatty acid-binding protein aP2 to treat type 2 diabetes. *Sci Transl Med*. 2015 Dec 23;7(319):319ra205.
449. Pang L, Wang D-W, Zhang N, Xu D-H, Meng X-W. Elevated serum levels of MMP-11 correlate with poor prognosis in colon cancer patients. *Cancer Biomark*. 2016 Mar 11;16(4):599–607.
450. Cohen L, Walt DR. Single-Molecule Arrays for Protein and Nucleic Acid Analysis. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 2017 Mar 15.

