



Universitat Autònoma de Barcelona

FACULTAT DE MEDICINA

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MORFOLÒGIQUES

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN
CELULAR EN CÁNCER DE OVARIO Y DE
ENDOMETRIO. IMPLICACIONES EN EL
PRONÓSTICO.**

Doctorando:

JOSEP CASTELLVÍ VIVES

Directores:

Dr. SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL AGÜERAS

Dr. ÁNGEL GARCÍA JIMÉNEZ

Barcelona, 2016

Dr Santiago Ramón y Cajal Agüeras, Catedrático de Anatomía Patológica del Departamento de Ciéncias Morfológicas de la Universitat Autònoma de Barcelona y Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron, y

Dr Ángel García Jiménez, profesor asociado de Anatomía Patológica del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Universitat Autònoma de Barcelona y médico adjunto del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall D'Hebron,

Certifican que la tesis:

“Estudio de las vías de señalización en cáncer de ovario y de endometrio. Implicaciones en el pronóstico”

Ha sido realizada por Josep Castellví Vives bajo su dirección y es apta para su defensa para acceder al grado de Doctor.

Dr Santiago Ramón y Cajal Agüeras

Dr Angel García Jiménez

AGRADECIMIENTOS

La realización de una tesis doctoral, como todos los proyectos de larga duración es como una carrera de fondo en la que, además de la capacidad de poder realizarla, es necesario tener disciplina y sobretodo, una resistencia psicológica para mantener el proyecto vivo y no abandonar. Múltiples circunstancias de nuestra vida, hacen que el proyecto avance a rachas. A veces, son razones personales o familiares, a veces laborales y en muchas ocasiones la falta de predisposición personal, o, simplemente, la siempre presente procrastinación. Aquí es donde intervienen algunas personas de nuestro entorno que periódicamente nos recuerdan la necesidad de continuar. En mi caso, esto ha sido así de forma bastante patente, por lo que tengo que agradecer a las diversas personas que me han forzado, sobre todo en las fases finales de la misma, a terminarla. En este sentido, tengo que mencionar a los directores de la tesis, Santiago y Ángel, a algunos compañeros como Inés y, por supuesto, y muy especialmente, a Luisa. Sin su estímulo, seguramente nunca habría terminado esta tesis.

Además, quiero expresar mi agradecimiento a mis compañeros del Servicio de Anatomía Patológica, tanto a los facultativos, técnicos, como administrativos por su ayuda y apoyo en el día a día.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	9
1 CARCINOMAS DE OVARIO	11
1.1 GENERALIDADES	11
1.2 HISTOGÉNESIS	14
1.3 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA.....	18
1.3.1 Tumores serosos	20
1.3.2 Tumores mucinosos.....	24
1.3.3 Tumores endometrioides	26
1.3.4 Tumores de células claras.....	28
1.3.5 Tumores de células transicionales	30
1.3.6 Otros tipos histológicos	31
1.4 ALTERACIONES MOLECULARES EN LOS CARCINOMAS DE OVARIO	31
1.4.1 TP53	31
1.4.2 Vías de señalización	32
1.4.3 Angiogénesis	34
1.4.4 Receptores de factores de crecimiento epidérmico.....	35
1.4.5 BRCA1 y BRCA2	37
1.4.6 Perfiles moleculares en cáncer de ovario.....	38
1.5 FACTORES PRONÓSTICOS	39
1.5.1 Estadío	40
1.5.2 Tipo histológico.....	43
1.5.3 Grado histológico	44
1.5.4 Tumor residual.....	45
1.5.5 Edad y estado general	46
1.5.6 Citometría de flujo.....	46
1.5.7 Oncogenes y genes supresores.....	47

2	CARCINOMAS DE ENDOMETRIO	49
2.1	GENERALIDADES	49
2.2	CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA.....	50
2.2.1	Lesiones precursoras.....	52
2.2.2	Carcinoma endometrioide.....	52
2.2.3	Carcinoma seroso	54
2.2.4	Carcinoma de células claras.....	55
2.2.5	Otros tipos histológicos	56
2.3	ALTERACIONES MOLECULARES EN EL CARCINOMA DE ENDOMETRIO	57
2.3.1	Vías de señalización celular.....	57
2.3.2	Inestabilidad de microsatélites.....	59
2.3.3	Mutaciones de beta-catenina.....	60
2.3.4	Mutaciones de TP53	61
2.3.5	Receptores de factores de crecimiento epidérmico.....	62
2.3.6	Inactivación de p16.....	63
2.3.7	Perfiles moleculares.....	66
2.4	FACTORES PRONÓSTICOS	66
2.4.1	Factores clínicos	66
2.4.2	Tipo histológico.....	67
2.4.3	Grado histológico	68
2.4.4	Estadio	68
2.4.5	Infiltración miometrial.....	71
2.4.6	Invasión vascular	71
2.4.7	Receptores hormonales.....	72
2.4.8	Oncogenes y genes supresores.....	72
3	BASES MOLECULARES DEL CÁNCER.....	74
3.1	PRINCIPALES VÍAS ALTERADAS EN CÁNCER	76
3.2	VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR	84
3.2.1	Receptores de los factores de crecimiento	85
3.2.2	Vía PI3K/AKT/mTOR	88
3.2.3	Vía Ras/Raf/ERK MAPK.....	95

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	101
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	103
HIPÓTESIS.....	104
OBJETIVOS.....	104
III. MATERIAL Y MÉTODOS	107
1 CASOS A ESTUDIO.....	109
2 CONSTRUCCIÓN DE LAS MATRICES DE TEJIDOS (“TISSUE MICROARRAYS” (TMA)).....	111
3 TINCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS.....	112
4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	116
IV. RESULTADOS.....	119
1 RESULTADOS EN TUMORES DE OVARIO	121
1.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	121
1.1.1 Edad.....	121
1.1.2 Tipo histológico.....	122
1.1.3 Grado histológico	122
1.1.4 Estadio	123
1.1.5 Evolución.....	124
1.2 RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS	125
1.2.1 HER2.....	125
1.2.2 EGFR.....	126
1.2.3 AKT fosforilado	128
1.2.4 ERK fosforilado.....	130
1.2.5 4E-BP1 fosforilado	132
1.2.6 p70S6K fosforilada.....	135
1.2.7 Proteína S6 fosforilada	137
1.3 ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS.....	138
1.3.1 Relación de la expresión de los receptores	138
1.3.2 p-AKT en relación a los receptores	139
1.3.3 p-ERK en relación a los receptores.....	141

1.3.4	p-4E-BP1 en relación a la expresión de p-AKT y p-ERK	144
1.3.5	p-p70S6K en relación a p-AKT y p-ERK.....	146
1.3.6	p-S6 en relación con la expresión de p-p70S6K.....	148
1.4	ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA.....	149
1.4.1	Tipo histológico.....	149
1.4.2	Grado histológico	150
1.4.3	Estadio FIGO.....	151
1.4.4	Marcadores inmunohistoquímicos.....	152
1.5	ANÁLISIS MULTIVARIANTE	161
2	RESULTADOS EN CÁNCER DE ENDOMETRIO.....	162
2.1	ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	162
2.1.1	Edad.....	162
2.1.2	Tipo histológico.....	163
2.1.3	Grado histológico	163
2.1.4	Estadio	164
2.1.5	Evolución.....	165
2.2	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS ...	165
2.2.1	HER2	165
2.2.2	EGFR.....	167
2.2.3	AKT fosforilado	169
2.2.4	ERK fosforilado.....	171
2.2.5	4E-BP1 fosforilado	173
2.3	ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS.	176
2.3.1	Relación entre la expresión de los receptores.....	176
2.3.2	p-AKT en relación a los receptores	176
2.3.3	P-ERK en relación a los receptores	179
2.3.4	P-4E-BP1 en relación a la expresión de p-AKT y p-ERK.....	181
2.4	ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA.....	183
2.4.1	Tipo histológico.....	183
2.4.2	Grado de diferenciación.....	184
2.4.3	Estadio FIGO.....	185
2.4.4	Infiltración miometrial.....	185

2.4.5	Marcadores inmunohistoquímicos	186
2.5	ANÁLISIS MULTIVARIANTE	193
V.	DISCUSIÓN.....	195
1	LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	197
2	VARIABLES CLÍNICO PATOLÓGICAS.....	199
2.1	TIPO HISTOLÓGICO.....	199
2.2	GRADO HISTOLÓGICO	200
2.3	ESTADIO	201
3	MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS.....	202
3.1	EXPRESIÓN DE HER2.....	202
3.2	EXPRESIÓN DE EGFR.....	205
3.3	EXPRESIÓN DE AKT FOSFORILADO	209
3.4	EXPRESIÓN DE ERK FOSFORILADO	213
3.5	EXPRESIÓN DE 4E-BP1 FOSFORILADO	215
3.6	EXPRESIÓN DE P70S6K FOSFORILADA	218
3.7	EXPRESIÓN DE S6 FOSFORILADA.....	219
4	RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES	
	INMUNOHISTOQUÍMICOS.....	220
4.1	EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE MEMBRANA	221
4.2	ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS DE AKT Y DE ERK	222
4.3	ACTIVACIÓN DE LOS EFECTORES 4E-BP1 Y P70S6K.....	223
VI.	CONCLUSIONES.....	227
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	231

ABREVIATURAS

4E-BP1: 4E-binding protein 1 (proteína de unión al factor 4E)

ADN: ácido desoxiribonucleico

AKT/PKB: Protein Kinase B (proteína quinasa B)

ARN: ácido ribonucleico

EGFR: epidermal growth factor receptor (receptor del factor de crecimiento epidérmico)

eIF4E: eucariotic Initiation Factor 4E (factor de iniciación eucariótico 4E)

ERK: Extracellular-Signal Regulated Kinase (quinasa regulada por señales extracelulares)

ESO: epitelio de superficie ovárica

FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia

FISH: Fluorescent In Situ Hybridization (hibridación in situ fluorescente)

HER: Human Epidermal Growth Factor Receptor (receptor del factor de crecimiento epidérmico)

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase (quinasa activada por mitógenos)

mARN: ARN mensajero

mTOR: mammalian Target of Rapamycin (diana de la rapamicina de mamíferos)

OMS: Organización Mundial de la Salud

p70S6K: p70 S6 kinase (quinasa de S6, p70)

PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

STIC: Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma (carcinoma intraepitelial tubárico)

TMA: Tissue microarray (matriz de tejido)

UICC: Unión Internacional contra el Cáncer

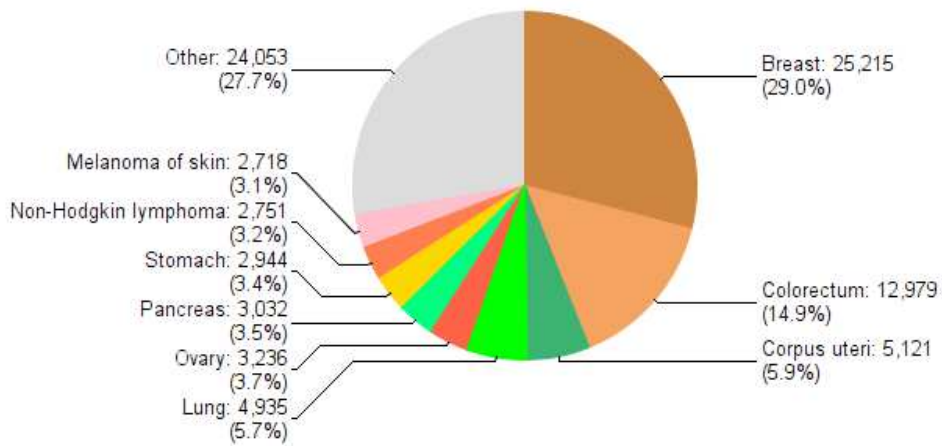
I. INTRODUCCIÓN

1 CARCINOMAS DE OVARIO

1.1 GENERALIDADES

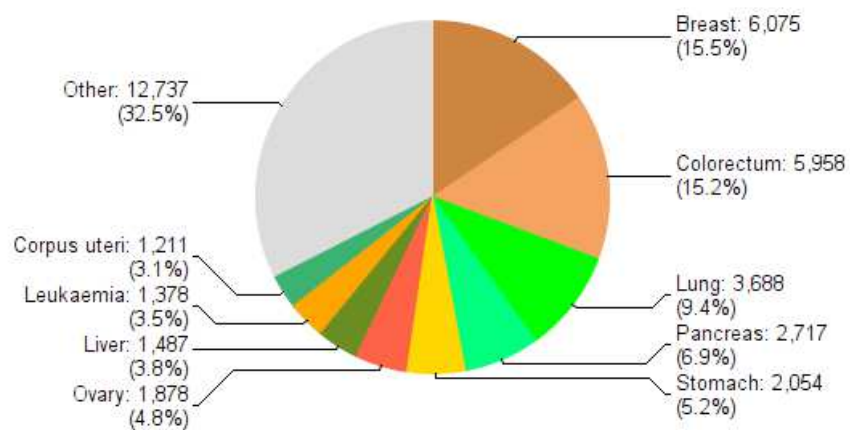
Los carcinomas de ovario representan aproximadamente el 30% de los tumores malignos del aparato genital femenino, representando el segundo tipo de cáncer del aparato genital femenino más frecuente tras los tumores de endometrio (1). Los tumores de ovario representan en España el octavo cáncer en frecuencia en las mujeres mientras que supone la sexta causa de muerte por cáncer, siendo el tumor ginecológico con mayor índice de mortalidad (2, 3). En 2012 se diagnosticaron 3236 nuevos cánceres de ovario en España, representando el 3.7% de los tumores malignos en las mujeres (ver FIGURA 1). Respecto a la mortalidad, supone un 4.8% de las muertes por cáncer en mujeres, produciendo 1878 fallecimientos (3) (ver FIGURA 2). Las estadísticas son similares en otros países desarrollados: en los Estados Unidos representa el octavo cáncer más frecuente en las mujeres, siendo un 3% del total, sin embargo es la quinta neoplasia con mayor mortalidad, representando un 6% del total de muertes por cáncer (4). En Europa, constituye la séptima neoplasia maligna más frecuente y la quinta con mayor mortalidad (5). La supervivencia global a los 5 años es de cerca del 50%, dependiendo de diversos factores que se discutirán más adelante entre los que cabe destacar el estadio de la enfermedad, el tipo histológico o el grado de diferenciación, entre otros.

FIGURA 1. Incidencia de cáncer en mujeres en España



GLOBOCAN 2012 (IARC) - 13.4.2015

FIGURA 2. Mortalidad por cáncer en mujeres en España



GLOBOCAN 2012 (IARC) - 13.4.2015

Clínicamente son tumores que no producen sintomatología en las fases iniciales. Suelen manifestarse por distensión abdominal o sensación de masa abdominal y, en ocasiones, si el tumor es maligno o funcionante, puede cursar con sangrado vaginal (6). Si el crecimiento del tumor es rápido o bien presenta hemorragia, puede cursar con dolor abdominal. Pueden aparecer complicaciones como la torsión, rotura o infección, siendo, en general, poco frecuentes. La ausencia de sintomatología precoz o específica provoca que en el 70% de casos el tumor se haya extendido fuera del ovario en el momento del diagnóstico. En la actualidad no existen sistemas de detección precoz del cáncer de ovario (7).

Se conocen escasos datos referentes a la etiología o factores predisponentes al cáncer de ovario, la mayor parte de ellos epidemiológicos. Los factores más aceptados están en relación al número de ciclos ovuladores de la mujer. De este modo, la multiparidad, la lactancia materna y la toma de anticonceptivos orales reducen el riesgo de desarrollar un carcinoma de ovario (8). La diferente incidencia de neoplasias de ovario en los países desarrollados, parece indicar que el estilo de vida occidental incluye algún factor de riesgo como la obesidad, las dietas ricas en carnes y grasas animales, así como en derivados lácticos, concretamente ricas en galactosa (6). En el 7% de casos se ha podido observar agrupamiento familiar de casos y en un 1-3% se han identificado síndromes genéticos asociados a carcinoma de ovario. El más importante es secundario a mutaciones de los genes supresores BRCA1 y BRCA2 asociados a cáncer de mama. Las mutaciones de BRCA1 se asocian con mayor frecuencia a cáncer de ovario (9). Existe otra asociación genética con cáncer de ovario en el síndrome de cáncer de colon hereditario no originado en pólipos o síndrome de Lynch, en el que las pacientes presentan un riesgo del 8% de padecer un cáncer de ovario. En este síndrome se

observan disfunciones de los genes reparadores del ADN, como el MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2. Otros factores que se han relacionado con el cáncer de ovario pero que no están totalmente aceptados son los tratamientos inductores de la ovulación, los tratamientos estrogénicos y las ooforitis subclínicas por el virus de la parotiditis.

1.2 HISTOGÉNESIS

Hasta hace poco, la hipótesis más aceptada sobre el origen de los tumores epiteliales del ovario es que se originan del epitelio de superficie ovárica o germinal, es decir, el mesotelio especializado que recubre el ovario (10-12). Esto era debido a que el ovario no posee otro elemento epitelial de forma fisiológica del que se puedan originar estos tumores. De hecho, se creía que en su mayor parte, los tumores epiteliales de ovario no se originan directamente del epitelio de superficie, sino de quistes y glándulas producidas por la invaginación del mismo en el estroma ovárico, que se producen tras la ovulación o pequeñas adherencias inflamatorias o tras procesos reparadores. Estos quistes de inclusión sufrirían un proceso de metaplasia de tipo mülleriano, explicado por dos teorías: el epitelio incluido queda expuesto de forma directa a la acción hormonal del estroma ovárico, hecho que no se produce en el epitelio de superficie ya que está separado del mismo por la túnica albugínea. A favor de esta teoría estaba que había una relación epidemiológica entre el número de ciclos ovuladores y la incidencia de cáncer, así como de la presencia de mutaciones de p53 en este epitelio (13). También, el hecho de que de forma experimental se conseguían generar tumores similares a los de ovario a partir de células del epitelio de superficie del ovario. Igualmente, se podía explicar la existencia de los diversos tipos histológicos dado que en el epitelio de superficie se

podían observar focos de metaplasia mülleriana. Asimismo, la observación de lesiones displásicas en el epitelio de superficie adyacente a los tumores apoyaba que pudiera tratarse del lugar de donde se originaban los mismos.

Sin embargo, en contra de esta teoría estaba el hecho de que dado que el epitelio de superficie del ovario es un mesotelio modificado, los tumores que se originaban en el mismo no se parecían ni morfológicamente ni inmunofenotípicamente a los originados en el mesotelio (14). Por otro lado, la ausencia prácticamente total de lesiones en las piezas de ooforectomía profiláctica de pacientes con riesgo familiar de cáncer de ovario, fundamentalmente carcinomas de tipo seroso, era un factor en contra de esta teoría (15, 16) , si bien puede observarse un aumento en el número de quistes de inclusión o cambios de pseudoestratificación en el epitelio (17). En un estudio se compararon las características morfológicas y algunas alteraciones moleculares recurrentes en los carcinomas de ovario en piezas de ooforectomía de pacientes con mutaciones de BRCA1 y mujeres sanas, y no se observaron diferencias (16). Sin embargo, en el estudio de anexectomías profilácticas, la única lesión que podía tener un papel como precursor estaba en la porción fimbriada de la trompa de Falopio. Se observaron cambios displásicos en el epitelio que, además, presentaban sobreexpresión de p53 que se asociaba a mutaciones de la misma (18). De esta forma, se describió como carcinoma intraepitelial tubárico seroso (STIC) en los casos en los que había lesión morfológica, y como “*p53 signature*” las lesiones que sólo presentaban la alteración de p53 pero no displasia del epitelio (19, 20). Cuando se revisó si la presencia de estas lesiones en la trompa se asociaba con los carcinomas serosos de la zona pélvica (ovario, trompa y peritoneal), se vio que un porcentaje elevado de casos, en alguna serie de hasta el 70%, ésta estaba presente (21). Otra evidencia más a favor de considerar esta lesión como precursora era que la mutación de p53 que se identificaba en la trompa era la misma que

la que se observaba en el tumor, demostrando de esta manera, una relación clonal entre ambas lesiones (22). De esta forma, la teoría actualmente aceptada, es que los carcinomas serosos de ovario se originarían a partir del epitelio tubárico de la zona fimbria, que adquiriría la mutación de p53 y que posteriormente presentaría cambios displásicos hasta convertirse en un carcinoma invasivo. La hipótesis de cómo origina un carcinoma de ovario y no uno tubárico es que durante la ovulación el epitelio tubárico entra en contacto con la zona de rotura del epitelio de superficie ovárico por donde se expulsa el óvulo. Restos de este epitelio pueden quedar en el ovario donde originarían un quiste de inclusión a partir del cual se desarrollaría el carcinoma (23). Esta hipótesis concuerda parcialmente con la observada previamente por Auersperg (10), pero la diferencia es que los quistes de inclusión son de origen tubárico. Este hecho, se ha podido demostrar inmunohistoquímicamente ya que se observan 2 tipos de quistes de inclusión en el ovario. Los primeros, son quistes serosos originados del epitelio de superficie y que expresan calretinina y son negativos para PAX8 y tubulina, y los segundos que muestran el mismo perfil que el epitelio tubárico normal, con expresión de PAX8 y tubulina y ausencia de calretinina (24). Además, este perfil de tipo tubárico es el que se observa en los carcinomas de tipo seroso (25).

Los tipos de tumores que se originan a partir de este epitelio son los de tipo seroso que incluye diversos tipos que tienen vías patogénicas diferentes. Kurman propone 2 vías: la tipo 1 que originaría los carcinomas de bajo grado y la tipo 2 que origina los carcinomas de alto grado (2). En ambas vías estarían implicados mecanismos moleculares diferentes como se tratará más adelante.

No todos los carcinomas de ovario presentan estas características morfológicas ni patrones inmunohistoquímicos, por lo que algunos carcinomas de ovario pueden tener otros orígenes. Se ha visto asociación de algunos carcinomas y la presencia de

endometriosis ovárica. Esta asociación se ha visto con mayor frecuencia en los carcinomas endometrioides y en los de células claras, representando el 42% de carcinomas endometrioides y el 50-90% de los carcinomas de células claras (26-28). Uno de los mecanismos por los que se cree que ocurre la endometriosis ovárica es la menstruación retrógrada y ya desde hace años, se observó que las pacientes que se habían sometido a una histerectomía o a las que se les había realizado una ligadura tubárica presentaban menor riesgo de desarrollar un cáncer ovárico (29). Con el desarrollo de técnicas de biología molecular, se propuso que la mayoría de carcinomas endometrioides y los de células claras se originarían en endometriosis (30) basándose en que todas estas lesiones presentan alteraciones genéticas comunes como son las LOH (pérdidas de heterocigosidad en los cromosomas 9p, 11q y 22q). A pesar de estas evidencias algunos autores cuestionaban esta asociación (31). Recientemente, con la descripción de las mutaciones de ARID1A en las endometriosis y en los carcinomas endometrioides y de células claras se apoya claramente la asociación patogenética de los mismos (32). ARID1A codifica la proteína BAF520a y cuando existe mutación del gen no se produce la proteína. En el estudio realizado por Wiegand se demuestra que la endometriosis asociada al tumor muestra la ausencia de expresión de la proteína igual que el tumor, mientras que los focos de endometriosis no relacionados con el tumor sí que la expresan. Con estos resultados, se apoya la relación entre ambas lesiones y además puede indicar que, el hecho de aparecer la mutación, es un factor de riesgo a desarrollar el carcinoma (32).

Los carcinomas mucinosos y los transicionales son los que tienen un origen patogenético menos evidente. Los primeros, se originan de epitelio de tipo intestinal por lo que no se trata de tumores müllerianos. También cabe destacar la asociación entre tumores mucinosos y tumores de Brenner por lo que podrían tener una relación

patogenética. Se han barajado 2 hipótesis para intentar explicar su origen. La primera es que se podrían originar a partir de teratomas, es decir, a partir de epitelio de tipo intestinal de un teratoma. En este sentido, se han descrito tumores mucinosos de ovario asociados a teratomas quísticos maduros (33), por lo que los carcinomas podrían originarse en teratomas monodérmicos cuando no se identifican elementos de las otras capas embrionarias. La segunda hipótesis es a partir de los nidos de Walthard, que son quistes de inclusión que han sufrido un proceso de metaplasia intestinal y que se encuentran en condiciones normales en la superficie de la trompa. En ocasiones presentan aspecto quístico con metaplasia mucinosa, con células calciformes. De hecho, el 25% de los tumores mucinosos presentan alguna zona de tipo transicional y el 16% de los tumores de Brenner tienen áreas mucinosas (34). Sin embargo, hasta el momento, no se ha demostrado claramente el origen de estos tipos tumorales ni la existencia de lesiones precursoras.

1.3 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA

La clasificación de los tumores de ovario es fundamentalmente morfológica, sin embargo intenta reflejar conceptos referidos a su embriogénesis y a su histogénesis (35). Dado que muchos de estos conceptos siguen sin aclarar, su clasificación está sujeta a modificaciones. La clasificación actual está basada en que el ovario está constituido por 4 tipos principales de tejidos que pueden dar origen a las distintas neoplasias: epiteliales, células germinales, cordones sexuales y estroma ovárico especializado. La clasificación actualmente aceptada es la de la OMS (2014) (1), que se muestra en el CUADRO 1, limitada a los tumores epiteliales-estroma.

CUADRO 1. Clasificación de los tumores epiteliales de ovario (OMS 2014)

Tumores del epitelio de superficie – estroma
Tumores serosos
Benignos
Cistadenoma seroso
Adenofibroma seroso
Papiloma seroso de superficie
Tumores borderline
Tumor seroso borderline / tumor seroso proliferante atípico
Tumor seroso borderline variante micropapilar / Carcinoma seroso de bajo grado no invasivo
Malignos
Carcinoma seroso de bajo grado
Carcinoma seroso de alto grado
Tumores mucinosos
Benignos
Cistadenoma mucinoso
Adenofibroma mucinoso
Tumores borderline
Tumor mucinoso borderline / Tumor mucinoso proliferante atípico
Malignos
Carcinoma mucinoso
Tumores endometrioides
Benignos
Quiste endometriósico
Cistadenoma endometrioide
Adenofibroma endometrioide
Tumores borderline
Tumor endometrioide borderline / tumor endometrioide proliferante atípico.
Malignos
Carcinoma endometrioide
Tumores de células claras
Benignos
Cistadenoma de células claras
Adenofibroma de células claras
Tumores borderline
Tumor de células claras borderline / tumor de células claras proliferante atípico
Malignos
Carcinoma de células claras
Tumores de Brenner
Benigno
Tumor de Brenner
Tumores borderline

<p>Tumor de Brenner borderline / tumor de Brenner proliferante atípico</p> <p>Malignos</p> <p>Tumor de Brenner maligno</p> <p>Tumores seromucinosos</p> <p>Benigno</p> <p>Cistadenoma seromucinoso</p> <p>Adenofibroma seromucinoso</p> <p>Borderline</p> <p>Tumor seromucinoso borderline / tumor seromucinoso proliferante atípico</p> <p>Malignos</p> <p>Carcinoma seromucinoso</p> <p>Carcinoma indiferenciado</p>
--

1.3.1 Tumores serosos

Tumores serosos benignos.

Son los tumores más frecuentes del ovario representando el 25% de los tumores benignos del ovario. Suelen diagnosticarse en la 4ª-5ª década de la vida. Son bilaterales en <20% de los casos. Pueden ser quísticos, papilares y adenofibromatosos. Pueden tener gran tamaño y ser uni o multiloculados, considerándose el tamaño mínimo para llamarlo cistadenoma el de 1cm, La morfología del epitelio es similar al de la trompa de Falopio, pudiendo observarse cilios en la mayoría de casos. Cuando se acompañan de abundante estroma fibroso, se llaman adenofibromas que característicamente son sólidos. Cuando crecen de forma papilar y típicamente de forma exofítica se denominan papilomas serosos de superficie. Son lesiones totalmente benignas aunque pueden recurrir tras la extirpación. Se cree que son tumores que se desarrollan por expansión hiperplásica de los quistes de inclusión.

Tumores serosos borderline.

Son tumores no invasivos que presentan mayor proliferación epitelial y mayor atipia que los cistadenomas. Suelen originarse en mujeres más jóvenes que las de los carcinomas, siendo la edad media de 42 años (36). Suelen tratarse de lesiones quísticas de gran tamaño, que en un 30-50% de los casos es bilateral (37). Habitualmente muestran un crecimiento papilar intraquístico, pero en ocasiones puede también aparecer en la superficie del ovario, asociándose a la presencia de implantes peritoneales con mayor frecuencia. En la clasificación de la OMS previa (38), se definían 2 tipos de tumores borderline según su patrón de crecimiento, con una forma usual o clásica y una forma micropapilar, que en la clasificación actual se han separado en 2 entidades diferentes. Dentro de la categoría borderline, actualmente únicamente se contempla la forma clásica en la que se observan papilas de crecimiento jerárquico, es decir, en papilas que se van subdividiendo en papilas más pequeñas de forma progresiva. Las papilas están revestidas por un epitelio de tipo cilíndrico o cúbico, en el que típicamente se pueden ver cilios. De forma focal y en un área de <5mm puede verse el segundo tipo de patrón de crecimiento que es el micropapilar. Igualmente, pueden identificarse focos de microinvasión del estroma. En ellos, se observan células con mayor citoplasma, de aspecto eosinófilo y con un frecuente artefacto de retracción y que pueden ocupar como máximo un área de 5mm. Estas áreas pueden encontrarse en hasta el 10% de tumores borderline sin tener impacto en el curso clínico de la enfermedad (39). Otras veces, puede detectarse reacción desmoplásica del estroma, pasando a denominarse carcinomas microinvasivos, aunque no se sabe cuál es el impacto pronóstico de este grupo.

En estos tipos tumorales se pueden encontrar implantes peritoneales que pueden ser de 2 tipos: invasivos y no invasivos. Los no invasivos se han subclasificado en implantes de

tipo epitelial cuando forman estructuras papilares y de tipo desmoplásico cuando son grupos de células en un estroma reactivo (40). Los implantes invasivos presentan infiltración destructiva de la zona donde asientan y es importante diferenciarlos de los no invasivos, dado que se asocian a recidivas en un 65% de casos respecto a los no invasivos que lo hacen en un 14% de casos (41).

Los tumores serosos borderline en estadio I tienen un comportamiento como el de un tumor benigno, mientras que los que se asocian a implantes, sobre todo si son invasivos, se asocian a un mayor índice de recurrencias, pero alcanzan una supervivencia del 95% (39). Aproximadamente un 5% de los tumores borderline progresan a carcinomas serosos de bajo grado y van a ser los que van a tener un comportamiento más agresivo, pudiendo matar a las pacientes (37).

El segundo tipo de tumor borderline es la variante micropapilar o carcinoma no invasivo de bajo grado. Se caracteriza por un patrón de crecimiento peculiar en el cual existen unas papilas de mayor calibre que en el convencional, de la que salen múltiples crecimientos papilares de pequeño tamaño, comparándose con la “cabeza de medusa”. También pueden presentar patrón cribiforme. Las células epiteliales presentan atipia moderada. Para hacer este diagnóstico se requiere que uno de estos patrones sea observado en >5mm o en el 10% del tumor. La importancia de este diagnóstico radica en que estos tumores se asocian con más frecuencia a implantes invasivos y tienen peor pronóstico que las formas típicas (42).

Carcinomas serosos.

El carcinoma seroso de bajo grado es un carcinoma invasivo que muestra atipia citológica baja y que representa la progresión de un tumor borderline de tipo micropapilar (2). Son poco frecuentes y representan el 5% de los carcinomas serosos

(43). La edad de aparición es similar a los tumores borderline y unos 10 años menor que los carcinomas de alto grado. En bastantes casos es posible encontrar áreas de tumor borderline aunque el tumor puede presentar patrones diversos, siendo habitual encontrar células aisladas o pequeños nidos de células tumorales infiltrando un estroma reactivo. Con frecuencia se observan cuerpos de psammoma. No se encuentran características que se asocien a agresividad tumoral como necrosis, atipias marcadas o elevado número de mitosis. Estos tumores si están limitados al ovario presentan buen pronóstico, con supervivencias del 95% a los 5 años. Si afectan otras localizaciones el pronóstico es malo dado que no responden a la quimioterapia (44).

A favor de que estos tumores tengan una vía patogénica distinta a los carcinomas de alto grado, está el hecho de que ambos presentan alteraciones moleculares distintas. En el 50-60% de los carcinomas de bajo grado pueden detectarse mutaciones que afectan KRAS o BRAF (45). Además, estas mutaciones también se pueden encontrar en los tumores borderline por lo que apoya molecularmente que estos carcinomas pueden ser la progresión de un tumor borderline.

El carcinoma seroso de alto grado se trata del carcinoma de ovario más frecuente representando el 50% de los mismos. La edad media de presentación es de 63 años siendo más frecuente en países occidentales (1). Suelen presentarse como masa ováricas de tamaños variables, sólido-quísticas y que suelen presentar áreas de necrosis y hemorragia. En la mayoría de casos la enfermedad ya se extiende fuera del ovario en el momento del diagnóstico. Son tumores que pueden mostrar diversos patrones de crecimiento, siendo el papilar el más característico, pero puede ser sólido o glandular, formando hendiduras que típicamente se ramifican. Las células presentan marcada atipia con presencia de núcleos pleomórficos y multinucleados de forma aislada. Son frecuentes las figuras de mitosis y pueden encontrarse cuerpos de psammoma.

Inmunohistoquímicamente expresan WT1 nuclear, CA125 y en la mayor parte de casos p53, traduciendo mutación del gen TP53. A diferencia de los carcinomas de bajo grado, esta es la alteración molecular que caracteriza a estos tumores (46). Por otro lado, es el carcinoma que desarrollan las pacientes portadoras de mutaciones de BRCA1 y BRCA2 de forma hereditaria (47). En general, son tumores de mal pronóstico, sobre todo por el hecho que la mayoría se diagnostica en estadios avanzados.

1.3.2 Tumores mucinosos

Tumores mucinosos benignos.

Suele tratarse de tumores de gran tamaño, unilaterales y que pueden alcanzar los 30 cm de diámetro (1). Se han distinguido 2 tipos de tumores en función del tipo de epitelio. El más frecuente es el tipo intestinal y se caracteriza por presentar células caliciformes y en ocasiones células de Paneth o neuroendocrinas. El segundo tipo, es mucho menos frecuente y es el llamado mülleriano o de tipo endocervical. Este segundo tipo, no está contemplado en la clasificación de la OMS dentro de esta categoría y se considera dentro de los tumores seromucinosos. Son tumores productores de moco y éste, en ocasiones, diseca el tejido fibroso de la cápsula ocasionando el llamado pseudomixoma ovarii que puede verse en el 10% de casos. Como se ha comentado en el apartado histogénesis, en el 10% de casos se asocia a tumor de Brenner. La alteración molecular más característica es la mutación de KRAS que puede observarse hasta en un 58% de casos (48). Su comportamiento es totalmente benigno aunque se han descrito recidivas tras su exéresis.

Tumores mucinosos borderline.

Se trata de tumores que presentan mayor proliferación celular y mayor atipia que los tumores benignos. Como en los cistadenomas, el epitelio puede ser de tipo gastrointestinal o de tipo endocervical, aunque en la clasificación actual de la OMS únicamente incluye la primera dentro de los tumores mucinosos (1). Son tumores que pueden darse en un amplio rango de edad siendo la edad media de presentación los 39 años. Como en los tumores benignos, suelen ser de gran tamaño y unilaterales, habiéndose descrito masas de hasta 50cm de diámetro (49). Estas neoplasias pueden tener áreas tipo cistadenoma junto a áreas borderline y focos de carcinoma, por lo que el muestreo debe ser extenso para realizar un diagnóstico correcto. Característicamente, se trata de tumores multiloculados, repletos de material mucoide, sin identificarse papilas ni crecimientos sólidos. Al estudio microscópico, la proliferación suele verse en forma de proyecciones papilares de pequeño tamaño, de aspecto velloglandular que crecen hacia la luz del quiste,. También puede observarse pseudomixoma ovarii y, como en los tumores serosos, focos de microinvasión. Se define como un área de <5mm de infiltración del estroma, generalmente en forma de células aisladas o grupo pequeños de células. Los tumores mucinosos borderline pueden presentar 2 características particulares. La primera es el llamado carcinoma intraepitelial, que se trata de áreas donde la proliferación se presenta en forma de un aumento en el número de capas de células y que, además, presentan mayor grado de atipia. La segunda son los nódulos murales, en los que se observa proliferación estromal atípica de tipo sarcomatoide o focos de carcinoma anaplásico. Como en los tumores benignos también presentan mutaciones de KRAS (48). La mayoría de casos tienen buen pronóstico, sin poder excluirse totalmente que los de comportamiento más agresivo contengan áreas de carcinoma que no se hayan detectado en el estudio histológico (1).

Carcinomas mucinosos.

Son carcinomas infiltrantes constituidos por células de tipo gastrointestinal, con producción de mucina. Son tumores poco frecuentes, representando el 3-4% de los carcinomas de ovario. Las características clínicas de estos tumores son superponibles a las de los tumores mucinosos borderline. Macroscópicamente, suelen ser también de gran tamaño, unilaterales y multiquísticos y al corte pueden presentar áreas sólidas. Microscópicamente pueden encontrarse 2 patrones de infiltración: el primero es el patrón expansivo, con glándulas densas, con muy escaso estroma, y el segundo es el patrón de infiltración destructivo del estroma, que es menos frecuente y presenta desmoplasia con glándulas irregulares. Suele haber necrosis y actividad mitótica aumentada. Los carcinomas mucinosos no tienen un sistema de gradación específico. Arquitecturalmente suelen ser bien diferenciados por lo que el grado de atipia nuclear es el que marca el grado histológico y habitualmente se evalúa como bien, moderadamente o poco diferenciado. En los carcinomas también pueden haber nódulos murales de tipo sarcomatoide, constituidos por células epiteliales pleomórficas. Los carcinomas suelen presentar mutaciones de KRAS en el 75% de pacientes (50). En cuanto al pronóstico, los tumores en estadios iniciales es bueno, por los avanzados tienen tendencia a recidivar en <3años, siendo peor en aquellos casos que presentan un patrón destructivo del estroma que los que presentan el patrón expansivo (51).

1.3.3 Tumores endometrioides

Tumores endometrioides benignos.

En la actual edición de la OMS (1) se consideran los quistes endometriósicos en el ovario dentro de esta categoría. Esto es debido a que en algunos de ellos se ha detectado

mutaciones de ARID1A y de PIK3CA idénticas a las que se han observado en algunos carcinomas de ovario, demostrando su naturaleza clonal (52). Los quistes endometrioides en los que no se puede demostrar claramente la presencia de estroma endometrial deben clasificarse como cistadenomas endometrioides. La otra forma de presentación de los tumores benignos endometrioides es en forma de adenofibroma, en los que el tumor es predominantemente sólido con abundante componente fibroso. También puede asociarse a focos de endometriosis.

Tumores endometrioides borderline.

Representan un continuo con los adenofibromas endometrioides, mostrando mayor densidad glandular, mayor estratificación nuclear y mayor atipia, con áreas similares a la hiperplasia atípica de endometrio y sin mostrar áreas de invasión destructiva del estroma. Muchos de estos tumores muestran endometriosis y en algunos el endometrio presenta hiperplasia endometrial o bien carcinoma endometrioide (53). Habitualmente son tumores sólidos de tipo adenofibromatoso pero también pueden ser quísticos con la proliferación glandular intraquística, pero en la mayor parte de casos se puede reconocer un área adenofibromatosa. Puede observarse metaplasia escamosa moruliforme como en otros tumores endometrioides. También se ha descrito la microinvasión, definida como en los otros tumores por la existencia de áreas invasivas de <5mm. El comportamiento es el de un tumor benigno, incluso en los escasos casos en los que se han descrito implantes peritoneales (53).

Adenocarcinoma endometrioide.

Se define como un carcinoma de características superponibles al carcinoma endometrioide uterino. Siguiendo este criterio, representan el 10-15% de los carcinomas

de ovario (54). La edad de presentación es algo inferior a la del carcinoma seroso, con una edad media de 55-58 años (54). En el 42% de casos se identifica alguna zona de endometriosis ya sea en el mismo ovario o en alguna otra zona pélvica (55). Macroscópicamente suelen ser masas unilaterales de 10-15cm, sólido-quísticas, que cuando se originan en un quiste endometriósico pueden crecer en forma de nódulo intraquístico. Microscópicamente, están constituidos por glándulas adosadas, áreas cribiformes o áreas papilares de tipo velloglandular. Pueden presentar focos de diferenciación escamosa, cambios secretores, cambios oxifílicos o bien zonas de tipo cordones sexuales o sertoliforme. Para definir el grado de diferenciación se usan los mismos criterios que en el cáncer de endometrio, siendo en el ovario con frecuencia bien diferenciados y los altos grados difíciles de distinguir de los carcinomas serosos. En el 15-20% de casos se asocia a carcinoma de endometrio (56), suelen ser bien diferenciados y la relación o independencia de ambos tumores debe establecerse por criterios clínico-patológicos (57). En general, los carcinomas endometrioides tienen mejor pronóstico que los serosos debido a que se diagnostican con más frecuencia en estadios iniciales. Aunque en alguna serie se ha descrito mejor pronóstico incluso en estadios más avanzados (54)

1.3.4 Tumores de células claras

Tumores benignos.

Son tumores muy poco frecuentes y de morfología adenofibromatosa, con glándulas de tamaños variables que están revestidas por células con citoplasma claro o eosinofílico (58) y que pueden asociarse a endometriosis.

Tumores de células claras borderline.

Son tumores similares al adenofibroma de células claras pero con mayor densidad glandular y con mayor atipia citológica pero en los que no se identifica invasión del estroma. Son muy poco frecuentes (58) y se dan en mujeres de 60-70 años de edad. También pueden presentar focos de endometriosis. En los casos con mucha densidad glandular, el diagnóstico diferencial con el carcinoma de células claras puede ser muy difícil. El comportamiento de estas lesiones es totalmente benigno (58).

Carcinoma de células claras.

Estos tumores se dan en mujeres más jóvenes, con una edad media de 55 años (59) y en más de la mitad de casos se puede encontrar focos de endometriosis asociada. Algunos casos se han descrito asociados a síndrome de Lynch (60). Clínicamente puede cursar con cuadros paraneoplásicos tipo hipercalcemia o fenómenos trombóticos (61). Suelen tratarse de tumores sólidos con múltiples quistes de pequeño tamaño y coloración amarillenta. Microscópicamente puede presentar diversos patrones de crecimiento combinados en el mismo tumor, predominando el túbulo-quístico, el papilar y el sólido. Las células son marcadamente atípicas con citoplasmas amplios o eosinófilos, que típicamente protruyen en las luces glandulares ofreciendo la imagen en “tachuela”. El aspecto claro del citoplasma con acúmulo de glucógeno, aunque también puede detectarse mucina en algunos de ellos. Pueden acompañarse de cuerpos de psammoma. Respecto al pronóstico, hay estudios en que detectan una menor supervivencia en estadios avanzados respecto a otros tipos tumorales (62).

1.3.5 Tumores de células transicionales

Tumor de Brenner.

El tumor de Brenner es el más frecuente de los tumores de células transicionales del ovario representando el 5% de los tumores epiteliales del ovario (1). Suelen ser hallazgos incidentales dado que la mayoría son de tamaño microscópico, pero pueden alcanzar raramente los 10cm. Suelen ser unilaterales y de aspecto sólido y elástico ya que se caracterizan por tener un estroma fibroso que contiene nidos de células transicionales sin atipias, bien delimitados y no es infrecuente encontrar calcificaciones. Algunos de los nidos pueden tener aspecto quístico con contenido mucinoso. En ocasiones, este componente mucinoso es muy marcado constituyendo tumores mixtos Brenner-mucinoso. Clínicamente, tienen un comportamiento totalmente benigno habiéndose descrito casos que el estroma es funcionante y las pacientes presentan síntomas endocrinos como virilización (63).

Tumor de Brenner borderline.

Son tumores similares a los de Brenner benignos pero con mayor proliferación epitelial de la habitual. Suelen ser de mayor tamaño y pueden tener áreas quísticas. En alguna zona del tumor normalmente se identifica alguna área de tumor de Brenner benigno y es frecuente encontrar áreas mucinosas. Su comportamiento es benigno, aunque se han descrito recidivas.

Tumor de Brenner maligno.

Son tumores que morfológicamente son similares a los carcinomas uroteliales y de forma menos frecuente, de tipo escamoso, que está asociado a un tumor de Brenner

benigno o borderline (1). Este hecho es importante ya que muchos tumores poco diferenciados, especialmente los serosos pueden tener áreas de aspecto transicional.

1.3.6 Otros tipos histológicos

Existen otros tipos histológicos poco frecuentes como los seromucinosos, escamosos, mixtos o indiferenciados. De éstos, los últimos son aquellos que no se les identifica ninguna área que permita clasificarlos en los grupos anteriores y suelen presentarse como masas sólidas de células con marcada atipia, necrosis y abundantes mitosis. En estos casos, como en todos los carcinomas de ovario es importante descartar que pueda tratarse de metástasis de tumores de otros orígenes.

1.4 ALTERACIONES MOLECULARES EN LOS CARCINOMAS DE OVARIO

El cambio de concepto sobre la histogénesis de los carcinomas de ovario, ha permitido ordenar las alteraciones moleculares observadas en los tumores para vislumbrar un modelo de carcinogénesis, en el cual se describen 2 vías o tipos: tipo I que origina carcinomas de bajo grado y la tipo II que daría lugar a los carcinomas de alto grado (2)

1.4.1 TP53

TP53 es un gen supresor tumoral que se ha descrito alterado en múltiples tumores humanos (64, 65). La proteína p53 tiene múltiples funciones entre las que se incluyen la regulación de la transcripción, la reparación del ADN, el ciclo celular, la diferenciación, la senescencia, la inestabilidad genómica, la apoptosis y supervivencia, así como el metabolismo de la glucosa, el estrés oxidativo y la angiogénesis (65). Las células

normales tienen niveles de expresión bajos de la proteína debido a que tiene una vida media corta. La sobreexpresión de la proteína se observa cuando está mutada o cuando se alteran los mecanismos de regulación de la traducción o modificaciones post-traduccionales de la misma (66, 67).

Como se ha comentado en el capítulo de histogénesis, la mutación de TP53 es un evento inicial en el proceso de carcinogénesis de los carcinomas serosos, ya que se detecta en las lesiones precursoras que se describen en las trompas. Ésta es una mutación que ocurre de forma esporádica y que se ha relacionado con mutaciones espontáneas que ocurren durante la proliferación celular (68). La mutación de TP53 se ha descrito tanto en cáncer de ovario esporádico como hereditario y es una de las alteraciones más frecuentes estando presente en el 40-60% de los carcinomas avanzados, sobre todo de tipo seroso (69). Representa la alteración molecular que caracteriza a los carcinomas de tipo II o de alto grado (2)

1.4.2 Vías de señalización

Diversas moléculas implicadas en las vías de señalización se han descrito alteradas en los carcinomas de ovario. KRAS y BRAF representan los oncogenes que con más frecuencia se describen alterados en estos tumores, estando KRAS mutado en más del 20% de casos y BRAF en aproximadamente el 10% de casos. Estas mutaciones se dan fundamentalmente en los carcinomas de tipo I, es decir, en los carcinomas de bajo grado tanto serosos como menos frecuentemente en otros tipos histológicos (70). Las mutaciones de KRAS se dan fundamentalmente en tumores borderline serosos y mucinosos, en una frecuencia del 22% y del 46% respectivamente (70). Las de BRAF se limitan al codón 600 del gen siendo la más frecuente la V600E y se puede identificar hasta en un 30% de los tumores borderline serosos y en el 10% de los carcinomas serosos de bajo grado (71). Las mutaciones de KRAS y BRAF son mutuamente

excluyentes y representan la alteración genética más importante de este modelo carcinogénico. Se han publicado varios estudios en los que se comparan las mutaciones de KRAS y BRAF entre el tumor borderline y sus implantes, con resultados discordantes. Ardighieri *et al* encuentran una correlación clara entre las mutaciones que presenta el tumor primario y los implantes, por lo que concluyen que éstos derivan del primero y no se trata de tumores sincrónicos (72). Sin embargo, este hecho no se demuestra en otros trabajos en los que se observa heterogeneidad genética entre el tumor primario y los implantes peritoneales, indicando la necesidad de tener en cuenta esta variabilidad al elegir la terapia más apropiada o para poder explicar la respuesta parcial de algunos tumores a terapias dirigidas (73). En general, el estado mutacional de KRAS y BRAF tiene poca repercusión clínica dado que no tiene un valor pronóstico destacable. Además, actualmente no existen tratamientos efectivos aunque se están desarrollando nuevos fármacos y existen diversos ensayos dirigidos contra estas vías.

Dentro de las vías de señalización también se han descrito mutaciones en PI3K, concretamente en la subunidad catalítica PIK3CA. Fundamentalmente se detectan en carcinomas de tipo endometriode y de células claras (74, 75). Se pueden detectar mutaciones puntuales en el 4-12% de casos y también se han descrito amplificaciones génicas en el 13-35% de casos que conducen a una activación constitutiva de la molécula y por tanto una activación de la vía de señalización de AKT y mTOR (76). Además, son mutaciones que ocurren de forma temprana en el proceso de carcinogénesis (77)

Otra molécula que actúa en el mismo punto de la vía contrarrestando el efecto de PI3K es PTEN. Se trata de un gen supresor y por tanto la inactivación del mismo es lo que tiene efecto oncogénico. Ésta suele ocurrir por mutación del mismo o por pérdida de heterocigosidad. También se observa en los carcinomas de células claras y

endometrioides en aproximadamente el 22% de casos (76). El interés de la alteración de estas moléculas en estos tipos histológicos está en que apoya la histogénesis de estos tumores en la endometriosis dado que son las alteraciones más habituales en los carcinomas de endometrio. Igualmente, también se han descrito otras mutaciones también presentes en los carcinomas de endometrio como las mutaciones de beta-catenina (74) o la inestabilidad de microsatélites (78). Dentro de este contexto de alteraciones genéticas que se asocian a la endometriosis cabe mencionar ARID1A. Se trata de un gen que codifica la proteína BAF250a que forma parte de un complejo de remodelación de la cromatina y que regula múltiples procesos de la célula (32). Esta alteración se encuentra presente en el 46% de los carcinomas de células claras y en el 30% de los carcinomas endometrioides.

1.4.3 Angiogénesis

Por angiogénesis se conoce el proceso por el que se forman nuevos vasos y que está altamente regulado por múltiples citoquinas. Esta formación de vasos es fundamental para múltiples procesos fisiológicos que van desde la embriogénesis, a la inflamación o reparación (79). Además, representa una de las características asociadas al cáncer, dado que las células tumorales son capaces de generar las citoquinas necesarias para generar nuevos vasos por los que le llegue el oxígeno y los nutrientes (79, 80). Son múltiples las moléculas que intervienen en este proceso y van desde las relacionadas con la hipoxia a los mediadores. Éstos son principalmente de la familia VEGF o PDGF, con sus receptores u otras moléculas relacionadas con la matriz extracelular como las metaloproteasas o los factores de crecimiento fibroblástico (81).

En el cáncer de ovario se han relacionado con el proceso de diseminación. Se ha demostrado que las células mesoteliales pueden secretar factores proangiogénicos

facilitando la implantación en el peritoneo de células tumorales existentes en el líquido ascítico (82, 83). El interés de este proceso en cáncer de ovario ha sido las posibilidades terapéuticas con inhibidores de la angiogénesis como bevacizumab (84, 85), sin embargo, la eficacia del tratamiento no ha sido la esperada.

1.4.4 Receptores de factores de crecimiento epidérmico

Diversos miembros de la familia de los receptores de crecimiento epidérmico se han estudiado en cáncer de ovario. Los cuatro miembros de la familia, EGFR (HER1), HER2, HER3 y HER4 se han relacionado con el proceso de carcinogénesis y con el pronóstico en estos tumores. Son receptores de membrana constituidos por 3 dominios, uno extracelular al que se une el ligando; uno transmembrana o de anclaje, y; uno intracelular que contiene la parte activa que es la tirosina quinasa. El receptor se activa tras su dimerización, es decir, al emparejarse con otra molécula igual u otro miembro de la familia, cuando el ligando se une al dominio extracelular. Al aproximarse los dominios tirosina quinasa de ambos, se fosforilan y como resultado, se activa la cascada de señalización intracelular (86). El interés de estas moléculas es la existencia de fármacos que pueden bloquearlas, por lo que constituyen dianas terapéuticas.

EGFR raramente se encuentra mutado en los carcinomas de ovario a diferencia de lo que ocurre en pulmón (87). Sin embargo, sí se puede encontrar sobreexpresión inmunohistoquímica por lo que éste método ha sido el utilizado en diversos estudios (88). Una tercera parte de los carcinomas de ovario sobreexpresan la proteína sin observarse correlación con otras variables histopatológicas ni clínicas. Tampoco se observan diferencias en el pronóstico ni respuesta a tratamientos. También se ha descrito la amplificación génica en el 35% de casos, estando este hecho relacionado con

menor supervivencia global (87). Además, la presencia de deleciones en el exón 4 se relaciona con menor respuesta a la quimioterapia (89).

HER2 se encuentra sobreexpresando en el 10-20% de los carcinomas de ovario aunque sólo en el 5% de los casos se observa amplificación genética (70, 90-92). Como ocurre con EGFR, no correlaciona con tipo histológico, grado o estadio. Respecto al valor pronóstico, los resultados son muy variables en la literatura y en gran parte es explicable por las diferencias metodológicas entre los estudios, en los que se usan anticuerpos primarios con actividad diferente y criterios de valoración distintos (93). En la mayoría de estudios no se observan diferencias en la supervivencia entre los casos positivos y los negativos excepto en un estudio en que, únicamente si coexiste la sobreexpresión de HER2 con la positividad de p53, tienen peor supervivencia de forma significativa (93) y un trabajo en el que la sobreexpresión de HER2 es un factor de mal pronóstico en cáncer avanzado de ovario por su relación con quimiorresistencia (94).

HER3 se ha estudiado en carcinomas de ovario y se ha descrito sobreexpresado en el 53% de los mismos (95). En este trabajo se estudiaron 116 casos y no se observaron correlación con las diferentes variables clínico-patológicas como el tipo histológico, grado o estadio. Además, no observaron correlación con la expresión de HER2 ya que encontraron pocos casos positivos. Sin embargo, se encontró que la expresión de HER3 tenía un valor pronóstico importante.

HER4 ha sido el menos estudiado de los miembros de esta familia y hay escasos trabajos que estudien su papel en cáncer. En ovario se observó sobreexpresión inmunohistoquímica del receptor en más del 80% de los carcinomas, usando anticuerpos dirigidos contra dominios distintos de la proteína. Se sobreexpresa más frecuentemente en carcinomas serosos y en estadios avanzados (96). En este mismo

trabajo, se vio que bloqueando el receptor con un anticuerpo específico no se bloqueaba la señalización estimulada por neuregulina.

1.4.5 BRCA1 y BRCA2

BRCA1 y BRCA2 se describieron inicialmente en el estudio de factores relacionados con el cáncer hereditario de mama y de ovario. Codifican proteínas de gran tamaño que están implicadas en la reparación del ADN y por tanto evitan la inestabilidad cromosómica (97). En estos síndromes hereditarios existe mutación germinal que los inactiva y, por lo tanto, se comportan como genes supresores tumorales. Estos tumores originados de síndromes hereditarios muestran mejor evolución que los carcinomas de ovario esporádicos aunque ha habido algunos trabajos con resultados contradictorios. Existen algunas diferencias clínicas como el hecho que los carcinomas hereditarios se dan en mujer más jóvenes, pero las características clínico-patológicas son similares. En ambos casos predominan los estadios avanzados y el tipo histológico más frecuente es el carcinoma seroso (98). Estos genes también pueden encontrarse inactivados en cánceres de ovario esporádicos (99). Cerca del 70% de los carcinomas esporádicos pueden presentar pérdida de expresión de BRCA1 a diferencia de los tumores borderline en los que se observa pérdida en un 38% o los tumores benignos que ocurre en el 15% (100). Esta pérdida de BRCA puede producirse por diversos mecanismos. La mutación puede detectarse en el 10% de los carcinomas esporádicos y suele producir una proteína truncada inactiva (99). El mecanismo más frecuente de inactivación de estos genes es la pérdida de heterocigosidad que puede encontrarse en el 31-40% de los carcinomas y los mecanismos epigenéticos como la metilación del promotor del gen que ocurre en el 5-31% de los mismos (101, 102).

Todas estas alteraciones moleculares predominan en unos tipos histológicos y en los carcinomas seroso con el grado histológico. De esta manera, la clasificación dualística de Kurman en tipo I y II también se asocia a alteraciones moleculares (2, 23, 103, 104) como se muestra en el CUADRO 2.

CUADRO 2. Clasificación de los carcinomas de ovario según las características moleculares.

Tipo	Tipo histológico	Alteraciones moleculares
I	Carcinoma seroso de bajo grado	Mutaciones de KRAS y BRAF
	Carcinoma endometrioide de bajo grado	Mutaciones de CTNNB1, PTEN, PIK3CA, inestabilidad de microsátélites
	Carcinoma mucinoso	Mutaciones de KRAS
	Carcinoma de célula clara	Mutaciones de PTEN, PI3K, ARID1A
II	Carcinoma seroso de alto grado	Mutaciones de TP53 y alteraciones de BRCA1
	Carcinoma endometrioide de alto grado	Mutaciones de TP53 y PI3K. Disfunción de BRCA1

1.4.6 Perfiles moleculares en cáncer de ovario

Más recientemente y con la aplicación de técnicas de análisis masivo, se han propuesto diversas clasificaciones moleculares. Entre estos trabajos cabe destacar el realizado por *The Cancer Genome Atlas Research network* (105) en el que se analizan casi 500 carcinomas serosos de alto grado de ovario aplicando diversas técnicas de análisis masivo en las que analizan mutaciones, alteraciones en el número de copias de genes somáticos, expresión de mRNA y alteraciones epigenéticas relacionadas tanto con los

microARNs como la metilación del ADN. Del análisis mutacional se confirma que la alteración más frecuente es la de TP53, que está presente en el 96% de casos, seguida de BRCA1 y 2 que lo están en el 22%. Además describen 6 alteraciones recurrentes en otros genes, presentes de forma menos frecuente. Del análisis de expresión se desprende una clasificación molecular en la que se definen 4 subtipos tumorales: el inmunorreactivo, el diferenciado, el proliferativo y el mesenquimal. Además, de los perfiles de microARNs se obtienen 4 subtipos de valor pronóstico, que correlacionan con los subtipos obtenidos del análisis de expresión. Sin embargo, el valor pronóstico de los cuatro tipos definidos no se ha demostrado en el trabajo ni en otros posteriores (106, 107).

1.5 FACTORES PRONÓSTICOS

Actualmente la supervivencia global de las pacientes con cáncer de ovario se sitúa sobre el 46.4% a los 5 años, mientras que en los tumores borderline se sitúa en un 91.4% (108). Las causas más frecuentes de muerte en estas pacientes son la carcinomatosis, las infecciones y el tromboembolismo pulmonar. La toxicidad de la quimioterapia contribuye a estas causas, siendo ocasionalmente la causa principal de muerte (109).

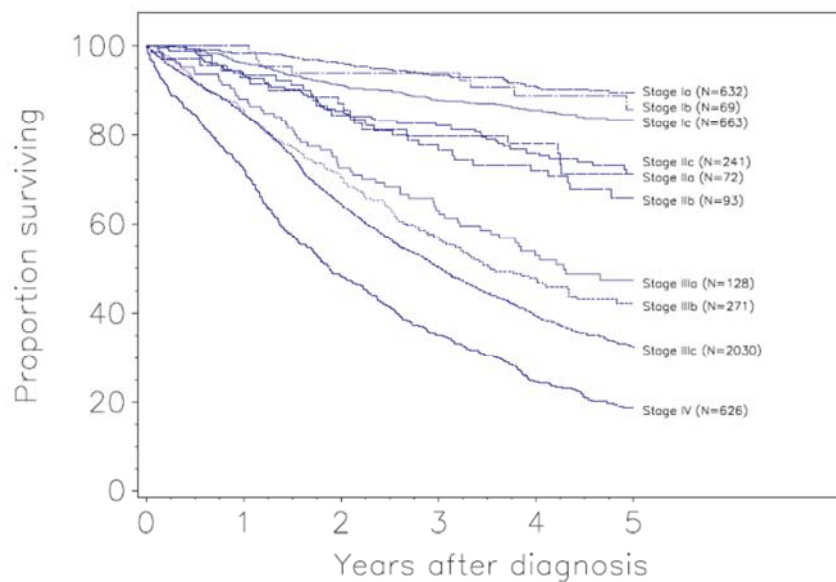
Los factores pronósticos mejor caracterizados en el cáncer de ovario son el estadio clínico y el tipo y grado histológicos. En los últimos años y coincidiendo con el desarrollo de nuevas tecnologías, se están estudiando nuevos parámetros biológicos, que permitan evaluar de forma más precisa el comportamiento de estos tumores, para así poder determinar con mayor precisión el pronóstico de cada uno de ellos. De esta forma, se han aplicado técnicas de biología molecular, inmunohistoquímica o citometría de flujo, para estudiar estos tumores. Los resultados obtenidos son en algunos casos poco definitorios e incluso contradictorios. Sin embargo, otros trabajos han demostrado ser

válidos como herramienta adicional al estudio morfológico para establecer nuevos grupos pronósticos.

1.5.1 Estadio

El estadio clínico se basa en el resultado de las exploraciones clínicas, de la laparotomía y del estudio anatomopatológico reglado. El procedimiento usado para determinar el estadio es el de la Federación Internacional de Obstetricia y Ginecología (FIGO) y el sistema TNM de la UICC, que se muestra en el CUADRO 3 (110). Representa uno de los parámetros más importantes para establecer el pronóstico de estos carcinomas y condiciona el tratamiento que va a recibir la paciente (ver FIGURA 3) (111)

FIGURA 3. Curvas de supervivencia en función del estadio según el Annual Report de la FIGO.



Está basado en el grado de diseminación del tumor, la presencia de metástasis ganglionares, de células tumorales en la citología del líquido peritoneal y de metástasis a distancia. Este sistema está basado en la historia natural de los carcinomas de ovario

que pueden diseminar siguiendo tres posibles vías: peritoneal, linfática y hemática. Inicialmente, los tumores de ovario crecen dentro de la cápsula ovárica formando una masa anexial (estadio I), que posteriormente sobrepasa la cápsula y se extiende a órganos pélvicos (estadio II). A través del líquido peritoneal se puede extender fuera de la pelvis en forma de implantes peritoneales (estadio III). En esta fase pueden aparecer las metástasis en ganglios linfáticos regionales (estadio IIIC) y posteriormente metástasis por vía hemática (estadio IV). Las ganglios de drenaje de estos tumores son por la vía linfática del ligamento ancho hacia los ganglios pélvicos (iliacos, obturadores e hipogástricos) o la vía linfática del ligamento infundíbulo pélvico hacia los ganglios paraaórticos (6). El 24% de los carcinomas de ovario se diagnostican en estadio I (13% en estadio IA, 3% en estadio IB, 3% en estadio IC), el 13% en estadio II (3% en estadio IIA y 10% en estadios IIB-C) , el 47% en estadio III y el 16% en estadio IV (108).

CUADRO 3. Clasificación TNM y FIGO de los tumores de ovario

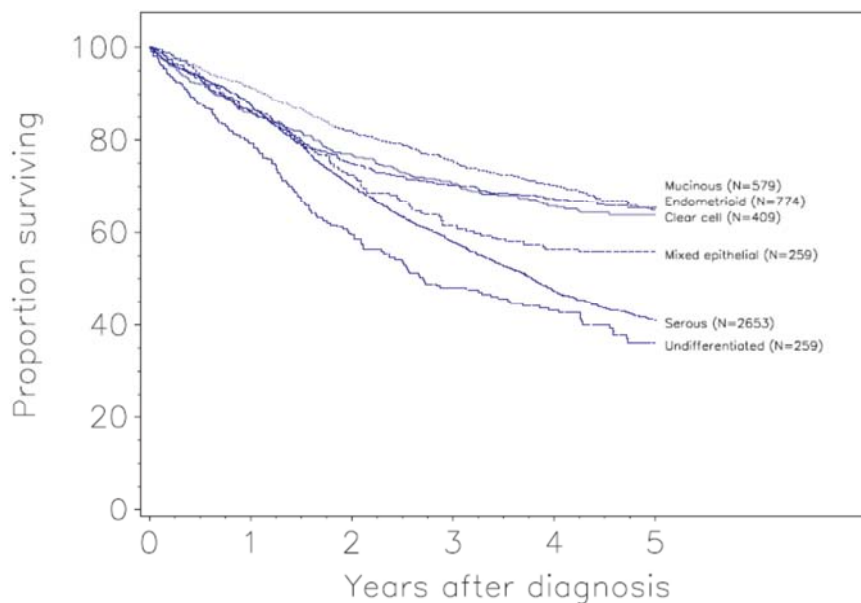
Categoría TNM	Estadio FIGO	Descripción
T		Tumor primario
TX		No puede determinarse el tumor primario
T0		No hay evidencia de tumor primario
T1	I	Tumor limitado a los ovarios
T1a	IA	Tumor limitado a un ovario; cápsula intacta, no tumor en la superficie ovárica; ausencia de células malignas en el lavado peritoneal o ascitis.
T1b	IB	Tumor limitado a ambos ovarios; cápsula intacta, no tumor en la superficie ovárica; ausencia de células malignas en el lavado peritoneal o ascitis.

T1c	IC	Tumor limitado a uno o ambos ovarios con cualquiera de las siguientes opciones: cápsula rota, tumor en la superficie ovárica, células malignas en el lavado peritoneal o ascitis.
T2	II	Tumor en uno o ambos ovarios, con extensión pélvica
T2a	IIA	Extensión y/o implantes en el útero y/o trompa(s); ausencia de células malignas en el lavado peritoneal o ascitis.
T2b	IIB	Extensión a otros tejidos pélvicos; ausencia de células malignas en el lavado peritoneal o ascitis.
T2c	IIC	Extensión pélvica (2a o 2b) con células malignas en el lavado peritoneal o ascitis.
T3 y/o N1	III	Tumor en uno o ambos ovarios con metástasis peritoneales confirmadas microscópicamente fuera de la pelvis y/o metástasis en ganglios linfáticos regionales
T3a	IIIA	Metástasis peritoneales microscópicas fuera de la pelvis
T3b	IIIB	Metástasis peritoneales macroscópicas fuera de la pelvis ≤ 2 cm de diámetro máximo
T3c y/o N1	IIIC	Metástasis peritoneales macroscópicas fuera de la pelvis ≥ 2 cm de diámetro máximo y/o metástasis en ganglios linfáticos regionales
M1	IV	Metástasis a distancia (excluye las metástasis peritoneales)
N		Ganglios linfáticos regionales (ganglios obturadores, ilíaca común, ilíaca externa, sacra lateral, paraaórticos e inguinales)
NX		No pueden determinarse
N0		Ausencia de metástasis ganglionares
N1		Metástasis en ganglios regionales
M		Metástasis a distancia
MX		No puede determinarse
M0		Ausencia de metástasis a distancia
M1		Presencia de metástasis a distancia

1.5.2 Tipo histológico

Los carcinomas de ovario más agresivos son los carcinomas indiferenciados incluyendo el carcinoma de células pequeñas. Ello es debido a que la mayoría se diagnostican en estadios avanzados, si bien el tipo histológico ha sido demostrado como factor pronóstico independiente (ver FIGURA 4). Los carcinomas serosos junto con los carcinomas indiferenciados son los tumores más agresivos, con una supervivencia del 20-35% a los 5 años. Los carcinomas mucinosos, endometrioides y de células claras presentan una mejor supervivencia y, además, se diagnostican más precozmente que los anteriores, en la mayoría de las ocasiones. Los carcinomas de células transicionales así como los tumores de Brenner malignos son los que presentan mejor pronóstico.

FIGURA 4. Curvas de supervivencia en función del tipo histológico (FIGO Annual Report)



Cierta controversia existe en los carcinomas mixtos ya que algunos autores no han encontrado diferencias pronósticas con las formas puras, sin embargo en otros trabajos

se han visto diferencias pronósticas entre las formas puras de carcinomas endometrioides y las formas mixtas con carcinoma seroso y con carcinoma indiferenciado. En éstos últimos el pronóstico viene marcado por el componente más agresivo aunque sea muy minoritario (112).

1.5.3 Grado histológico

Está basado fundamentalmente en los cambios arquitecturales, siendo los mejor diferenciados aquellos que conservan la capacidad de producir glándulas o papilas. Los carcinomas de alto grado presentan cambios citológicos de actividad proliferativa elevada, incluyendo elevado índice mitótico, atipia nuclear y relación núcleo/citoplasma disminuida. Se han realizado múltiples trabajos para intentar establecer criterios que permitan unificar todos estos parámetros para crear un sistema de gradación de los carcinomas que sea reproducible y sensible para predecir la agresividad del tumor. De este modo diversos métodos diferentes han sido recomendados en la literatura.

En el método recomendado por Czernobilsky (1977) los tumores se gradan según la proporción de las áreas papilares y/o glandulares frente las de crecimiento sólido.

El método de Russell (1979) es un método simplificado de la clasificación de Broders. Los tumores se gradan según el patrón papilar/glandular frente al sólido, la uniformidad de la celularidad, la regularidad o la falta de regularidad de los núcleos, la relación núcleo/citoplasma, el número y tamaño de los nucléolos y el número de figuras de mitosis por 10 campos de gran aumento. De esta forma se establecen 4 grados de diferenciación.

El método de Baak (1986) está basado en medidas morfométricas con las que se calcula el índice de actividad mitótica que representa el número de figuras de mitosis en 25

campos de gran aumento (40x y de 450 μm de diámetro) y el porcentaje de volumen epitelial medido con técnicas de contaje por puntos. Baak estableció 3 grados según los valores obtenidos.

Más recientemente, Silverberg (113) propuso un nuevo sistema de gradación de los tumores de ovario, aplicando los criterios usados habitualmente para la gradación de los carcinomas de mama. Tenía en cuenta la atipia nuclear, el número de mitosis y el patrón de crecimiento del tumor. Este sistema de gradación parece predecir mejor la agresividad del tumor que los anteriormente mencionados.

En la práctica diaria y siguiendo las recomendaciones de la OMS (1), la mayor parte de carcinomas serosos y de células claras son grado 3, los endometrioides se gradan siguiendo las indicaciones de la OMS para el carcinoma de endometrio y los carcinomas mucinosos en función de la atipia nuclear. En general, cuanto mayor es el grado del tumor, es decir, menos diferenciado, más agresivo va a ser su comportamiento y la supervivencia será menor. De todas formas, el grado histológico no ha podido demostrarse como un factor pronóstico independiente en un modelo multivariante.

1.5.4 Tumor residual

Representa el volumen de tumor que queda tras el tratamiento quirúrgico citorreductor, que se realiza sin fines curativos, en casos en estadios avanzados. La citorreducción óptima se define como la existencia de tumor residual igual o menor de 2cm de diámetro máximo (114). La citorreducción óptima mejora el estado general de las pacientes e incrementa la respuesta a los tratamientos complementarios, mejorando la supervivencia global.

1.5.5 Edad y estado general

La influencia real de la edad y estado general ha sido controvertida, ya que su probable papel en la supervivencia de las pacientes parece condicionado la limitación que supone para la aplicación de terapias más agresivas.

1.5.6 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite medir la cantidad de ADN presente en las células, analizar las fases del ciclo celular o medir la presencia de varios antígenos (115). La aplicación fundamental de la citometría de flujo en los carcinomas de ovario es el estudio del valor pronóstico y diagnóstico de la ploidía de ADN así como de la fracción de células en fase S del ciclo celular (116).

Los estudios realizados demuestran que el 50-80% de los carcinomas de ovario son aneuploides, existiendo relación entre la frecuencia de aneuploidía y el estadio, siendo del 50-80% en los estadios III y IV y del 8-80% en los estadios I y II (117-120). La mayoría de trabajos también demuestran asociación entre aneuploidía y la cantidad de tumor residual. Sin embargo no existe relación con el tipo histológico, con resultados muy variables según el trabajo. También resultan conflictivos los resultados de los estudios sobre la relación entre ploidía y el tiempo de recurrencia de la enfermedad. Se ha postulado que el estudio de la ploidía podría identificar qué pacientes con laparotomías exploradoras postquirúrgicas (second-look) negativas presentan mayor riesgo de recurrencias (121).

De la misma manera el estudio de la fracción de células en fase S produce resultados similares, observándose relación con el estadio del tumor, el tipo histológico y la supervivencia media. Barnabei et al (117) demostraron que los tumores con una fracción S menor del 18% presentaban mayores periodos libres de enfermedad que el

resto. La mayoría de estudios publicados concluyen que la ploidía del ADN celular era un criterio pronóstico independiente en los carcinomas de ovario.

1.5.7 Oncogenes y genes supresores

A parte de su papel en la patogenia de los carcinomas de ovario de alto grado, las mutaciones de p53 se han correlacionado con el potencial metastásico (122) y también con resistencia a tratamientos como los basados en platinos (123). Clínicamente se ha realizado algún ensayo para restaurar la función de p53 en pacientes con cáncer de ovario avanzado y multirresistente a quimioterapia, mediante adenovirus, con ligera mejora de los niveles de CA125 pero con menor respuesta a la que ofrece la terapia convencional basada en carboplatino y paclitaxel (124).

Otra molécula implicada en la regulación de p53 es MDM2 que también se ha ensayado de forma terapéutica en leucemias (125). MDM2 es una ubiquitina-ligasa cuya función es facilitar la degradación de p53 por el proteasoma. Se encuentra sobreexpresada en aproximadamente una tercera parte de los carcinomas de ovario y se describe en la mitad de los tumores serosos borderline, hecho que explicaría la menor expresión inmunohistoquímica de p53 en los mismos (126). También se ha visto asociación de su expresión con el pronóstico de los carcinomas serosos así como con la respuesta a tratamiento quimioterápico (127). Como en otros tumores también ofrece oportunidades para la terapia, ya que en líneas celulares se ha comprobado que algunos antagonistas de MDM2 actúan de forma sinérgica con tratamientos basados en platinos (128).

Los oncogenes KRAS y BRAF también se han implicado en el pronóstico aunque con resultados desiguales. KRAS se ha relacionado con mayor tendencia a la recidiva en tumores borderline serosos y carcinomas serosos de bajo grado, hecho que no ocurre con BRAF (129). La única relación de BRAF con el comportamiento de estos tumores,

es que se suele observar mutado en tumores en estadios iniciales y con mejor supervivencia (130).

Los receptores de factores de crecimiento se han implicado en el pronóstico de los carcinomas de ovario en múltiples estudios. Especialmente en relación a HER2, se han encontrado resultados contradictorios con estudios en los que tenía valor pronóstico y otros en los que no (131, 132). Otros receptores como HER3 se han implicado en el pronóstico de los carcinomas de ovario (95) aunque este resultado no se ha confirmado en otras series grandes.

La angiogénesis está implicada en el mecanismo de diseminación de la enfermedad y también se ha estudiado su papel en la determinación del pronóstico. En algunos trabajos se demuestra que tiene valor pronóstico independiente la expresión de proteínas relacionadas con la angiogénesis en carcinomas de ovario avanzados (133).

2 CARCINOMAS DE ENDOMETRIO

2.1 GENERALIDADES

Los carcinomas de endometrio representan la neoplasia maligna ginecológica más frecuente y la cuarta más frecuente en las mujeres (ver FIGURA 1). Sin embargo, son la décima causa de muerte por cáncer en mujeres (ver FIGURA 2).

A diferencia de los carcinomas de ovario que se diagnostican en estadios avanzados por no presentar una clínica específica ni haber ningún sistema de detección precoz, en los carcinomas de endometrio la presentación clínica característica es la metrorragia y ésta se puede estudiar de manera más sencilla que en el ovario, lo que permite poder realizar un mayor número de diagnósticos en estadios iniciales.

Los carcinomas de endometrio ya se relacionaron con tratamientos estrogénicos en los años 70 (134). Se describieron en pacientes bajo tratamientos sustitutivos o usuarias de anticonceptivos orales que presentaban un riesgo aumentado de desarrollar carcinomas de endometrio. Asimismo la obesidad, la diabetes o el consumo de tabaco se han relacionado con el riesgo a desarrollar estos tumores. Otros factores relacionados, son la edad de la menarquia, edad de la menopausia y la nuliparidad (135).

Bokhman agrupó los carcinomas de endometrio en 2 grandes grupos tipo 1 y tipo 2 (136). Únicamente el primero de ellos tiene relación con el hiperestrogenismo así como las lesiones endometriales relacionadas con el mismo y que se consideran precursoras como la hiperplasia endometrial. (Ver CUADRO 4)

Los carcinomas de tipo 1, suelen corresponder a carcinomas de tipo endometriode, se dan en mujeres algo más jóvenes que los tipo 2 y aparte de la relación hormonal, suelen ser tumores menos agresivos y se diagnostican en estadios más iniciales que los tipos 2.

El prototipo de este segundo grupo es el carcinoma seroso y actualmente no se conoce

ninguna lesión precursora del mismo. No tiene relación con el estado hormonal y normalmente se origina sobre endometrios atroficos de mujeres de edad más avanzada.

CUADRO 4. Clasificación de los carcinomas de endometrio según las características clínico-patológicas.

	Tipo I	Tipo II
Edad	Pre y perimenopausia	Postmenopausia
Hiperestrogenismo	Presente	Ausente
Hiperplasia	Presente	Ausente
Grado	Bajo	Alto
Estadio	Bajo	Alto
Comportamiento	Indolente	Agresivo
Histología	Endometriode, mucinoso	Seroso, células claras, indiferenciado

El carcinoma de endometrio se relaciona con síndromes hereditarios, fundamentalmente el síndrome de Lynch o carcinoma colorrectal no polipósico familiar y el síndrome Cowden. El primero es más frecuente, y se produce por un defecto en los genes reparadores de ADN (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2) cuya consecuencia es la inestabilidad de microsatélites (137)

En el caso del síndrome de Cowden se relaciona con mutaciones del gen supresor tumoral PTEN y se asocia a desarrollo de tumores en mama, tiroides y endometrio (138).

2.2 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA

La clasificación de la OMS está basada fundamentalmente en las características morfológicas de los tumores (CUADRO 5) (1). A diferencia del ovario, no existen

tumores epiteliales benignos o de potencial incierto, sino que únicamente existen tumores malignos y algunas lesiones precursoras de los carcinomas relacionados con el hiperestrogenismo.

CUADRO 5. Clasificación de la OMS (2014) de los tumores epiteliales de endometrio

Tumores epiteliales y precursores
Precursores
Hiperplasia sin atipias
Hiperplasia atípica / Neoplasia intraepitelial endometriode
Carcinomas endometriales
Carcinoma endometriode
Con diferenciación escamosa
Vello glandular
Secretor
Carcinoma mucinoso
Carcinoma intraepitelial seroso endometrial
Carcinoma seroso
Carcinoma de células claras
Tumores neuroendocrinos
Tumor neuroendocrino de bajo grado
Tumor carcinoide
Tumores neuroendocrinos de alto grado
Carcinoma neuroendocrino de célula pequeña
Carcinoma neuroendocrino de célula grande
Adenocarcinomas mixtos
Carcinoma indiferenciado
Carcinoma desdiferenciado

2.2.1 Lesiones precursoras

Éstas son las hiperplasias sin atipias y las atípicas. Se caracterizan por una proliferación glandular que ocasiona una desproporción de glándulas respecto al estroma. Históricamente, ha habido diversas clasificaciones de hiperplasia con diferentes nomenclaturas con el principal problema de falta de reproducibilidad entre patólogos (139, 140). La clasificación actual de la OMS ya no divide las hiperplasias en simples o complejas sino que entran dentro de la misma categoría y únicamente tiene en cuenta si presentan atipia citológica o no. Las hiperplasias sin atipias son benignas y representan un aumento de 3-4 veces de desarrollar un carcinoma de endometrio que se eleva a 10 veces a los 10 años (141). Respecto la hiperplasia atípica a coexistido con el concepto de neoplasia intraepitelial endometrial desarrollado por Mutter (142) aunque ambas entidades no coincidían en su definición e incluían lesiones morfológicamente diferentes. En la clasificación actual de la OMS, ambos conceptos quedan englobados en una entidad en la que se tiene en cuenta fundamentalmente la atipia citológica que puede ser por aumento del tamaño nuclear, pleomorfismo, núcleos redondeados, presencia de nucléolos o pérdida de la polaridad. Las pacientes con este diagnóstico, van a presentar en un 20-30% un carcinoma de endometrio en la pieza de histerectomía (143) o, si se hace tratamiento conservador, van a tener un riesgo 14 a 45 veces superior de desarrollar carcinoma (144, 145).

2.2.2 Carcinoma endometriode

Es el carcinoma de endometrio más frecuente y representa la mayoría de carcinomas de tipo I de la clasificación de Bokhman. Este tipo se da fundamentalmente en mujeres postmenopáusicas con una edad media de aparición de 59 años y raramente se da antes de los 40 años (146). Macroscópicamente suelen ser lesiones exofíticas, de superficie irregular y que infiltran el miometrio en grado variable, siendo éstas, características

comunes a la mayoría de carcinomas endometriales. Morfológicamente, se trata de una proliferación de glándulas irregulares que se asemejan a las del endometrio proliferativo. Pueden presentar áreas variables de crecimiento sólido y en la superficie no es infrecuente encontrar zonas de crecimiento papilar o velloglandular. En gran parte, las características microscópicas dependen del grado de diferenciación del tumor. No es infrecuente encontrar áreas de diferenciación escamosa. Ha existido cierta controversia sobre la importancia de las características de este componente escamoso, ya que anteriormente, se subclasificaba en función de si era una metaplasia moruliforme, sin atipias que recibía el nombre de adenoacantoma, o bien, si el componente escamoso estaba en la interfase infiltrativa del tumor y con características atípicas, que se llamaba carcinoma adenoescamoso. En la clasificación de la OMS se considera que su presencia no tiene impacto en el pronóstico, ya que a igual estadio tanto unos como otros no muestran diferencias significativas (147). Sí es importante detectar estas áreas para no cuantificarlas como zonas de crecimiento sólido y alterar, de este modo, la gradación del tumor.

Otra variante es la forma secretora, que se suele encontrar en carcinomas muy bien diferenciados y en la que las células son cilíndricas con vacuolización citoplasmática, por lo que se parecen al endometrio secretor. Existen numerosas variantes morfológicas de carcinoma endometrioide poco frecuentes, revisadas por Clement y Young (148) entre las que cabe mencionar la forma velloglandular, la sertoliforme o con elementos de los cordones sexuales y las formas sarcomatoides. Una de las formas que puede aparecer en el carcinoma endometrioide es el carcinoma desdiferenciado (149). Se trata en un carcinoma endometrioide bien diferenciado que presenta un cambio brusco a carcinoma indiferenciado. Este segundo componente tumoral es una transformación del primero por adquisición de nuevas alteraciones genéticas.

Es de interés mencionar que puede haber áreas de diferenciación mucinosa o incluso de carcinoma de tipo seroso, que si no superan el 10% del tumor, no alteran la clasificación del mismo.

2.2.3 Carcinoma seroso

El carcinoma seroso representa el modelo de carcinomas de tipo II de Bokhman. Son tumores de alto grado de atipia cuyo patrón arquitectural más característico es el papilar. Inicialmente se llamaron carcinomas serosos papilares, pero el patrón papilar puede estar presente en cualquier tipo histológico de carcinoma de endometrio por lo que este apelativo ha sido retirado de su nombre. Suelen aparecer en mujeres postmenopáusicas tardías, con una edad media de 60 años y no tienen relación con tratamientos hormonales ni otras situaciones de hiperestrogenismo, por lo que el endometrio de base sobre el que asientan es un endometrio atrófico.

Se ha descrito una situación precursora o carcinoma in situ, llamado carcinoma seroso intraepitelial (150). Se trata de una lesión que afecta al epitelio de superficie del endometrio y que muestra una proliferación epitelial con marcada atipia, generalmente plana aunque puede formar pequeñas proyecciones papilares e incluso glándulas. Se puede ver en zonas adyacentes a un carcinoma papilar o, en ausencia del mismo, en pólipos endometriales o incluso en endometrios aparentemente normales. No se observa infiltración del estroma por definición, pero se ha visto algún caso que se ha asociado con diseminación (151). A parte de esta lesión, recientemente también se ha descrito una lesión precursora de la misma, llamada displasia glandular endometrial, en la que sin la marcada atipia del carcinoma intraepitelial, presenta alteraciones de tipo seroso y atipia leve (152).

Macroscópicamente, son tumores predominantemente exofíticos y de superficie papilar. Al estudio microscópico, suelen tener áreas papilares, pero puede predominar el

componente glandular, que suelen tener forma de hendiduras variablemente ramificadas. Lo que es constante es la presencia de atipia nuclear marcada con núcleos grandes y pleomórficos, que hacen protruir la célula en la papila, adquiriendo aspecto en “tachuela”, o bien, presentar células multinucleadas de forma ocasional. Es frecuente encontrar imágenes de invasión vascular. El pronóstico de estos tumores depende en gran medida del estadio, ya que cuando se han extendido fuera del útero, tienen muy mal pronóstico.

2.2.4 Carcinoma de células claras

El carcinoma de células claras es un tumor que se clasifica por sus características morfológicas y a pesar de que se incluye dentro del tipo II, presenta algunas características comunes con los carcinomas endometrioides y otras con los serosos, e incluso a veces puede verse asociado a cualquiera de ellos (153, 154). El carcinoma de células claras se define por las características morfológicas de sus células. Son células poligonales que habitualmente tienen el citoplasma vacuolizado por presencia de glucógeno o bien eosinofílico. Es característica la protrusión del núcleo confiriendo aspecto en “tachuela”. Este citoplasma vacuolado hace que sea similar a los carcinomas renales por lo que inicialmente se creía que era de origen mesonéfrico y no mülleriano (155). Microscópicamente pueden tener diversos patrones de crecimiento siendo los habituales el sólido, papilar, tubular y quístico, coexistiendo varios de ellos en el mismo tumor. Es característica la presencia de hialinización del estroma de los ejes papilares. También pueden observarse glóbulos hialinos y cuerpos de psammoma. También en el carcinoma de células claras se ha descrito algunas lesiones precursoras, que se presentan con glándulas aisladas con atipias nucleares y citoplasmas claros o eosinófilos, que presentan perfiles inmunohistoquímicos parecidos al carcinoma (156).

Los carcinomas de células claras son tumores de alto grado cuya supervivencia varía mucho según las series publicadas, desde un 21% a un 75% (157, 158), traduciendo probablemente problemas de clasificación de los mismos (1). Globalmente, se considera el pronóstico mejor que el carcinoma seroso.

2.2.5 Otros tipos histológicos

En el endometrio pueden darse otros tipos de carcinomas de forma menos frecuente como el carcinoma mucinoso, los carcinomas neuroendocrinos de alto y bajo grado o los carcinomas indiferenciados. Como en el caso del ovario son tumores de crecimiento sólido predominantemente, alto grado de atipia citológica y que no son clasificables dentro de ninguna de las categorías mencionadas. Cuando coexiste con otro componente constituye el carcinoma desdiferenciado que ya se ha comentado.

Mención aparte requieren los tumores müllerianos mixtos malignos o carcinosarcomas. En la clasificación actual de la OMS se encuentran en una categoría diferenciada de los tumores epiteliales, a pesar que la teoría más aceptada es que se tratan de carcinomas que han sufrido un proceso de desdiferenciación a elementos mesenquimales, dada la multipotencialidad de las células endometriales que no son de origen ectodérmico como el resto de epitelios (159). Suelen ser tumores de aspecto polipoide, de gran tamaño con el doble componente epitelial y mesenquimal en proporciones variables. El componente epitelial suele ser de tipo endometriode o seroso y el mesenquimal más frecuente es de carcinoma de alto grado, que en ocasiones puede presentar elementos heterólogos como cartílago, músculo o hueso. En general son tumores de mal pronóstico.

2.3 ALTERACIONES MOLECULARES EN EL CARCINOMA DE ENDOMETRIO

La morfología de un tumor es el resultado de la expresión genética del mismo, por lo que las alteraciones moleculares que puedan tener pueden reflejarse de alguna manera en la morfología y en el comportamiento de estas células (160). La clasificación de Bokhman (136) define 2 vías patogenéticas que se traducen en alteraciones moleculares distintas en los carcinomas de tipo I y de tipo II (161). Posteriormente, estudios de expresión genética demuestran que ambos tipos de tumores presentan perfiles diferentes (162).

Los carcinomas de tipo I son los que presentan alteraciones recurrentes más frecuentes, algunas de las cuales afectan las vías de señalización celular, los sistemas de reparación del ADN provocando inestabilidad de microsátélites o mutaciones de la vía Wnt, con mutaciones del gen de la beta-catenina. Los carcinomas tipo II tienen como alteración principal, las mutaciones de TP53 que conllevan a una inestabilidad cromosómica que ocasiona múltiples alteraciones secundarias y que condicionan la aparición de carcinomas de alto grado. En ocasiones, estas últimas pueden aparecer en carcinomas de tipo I ocasionando progresiones de un tipo al otro.

2.3.1 Vías de señalización celular

Las alteraciones más frecuentes que se encuentran en los carcinomas de tipo endometriode se concentran en moléculas que controlan las vías de señalización celular de las señales de crecimiento, que se revisarán más adelante. La alteración más frecuente es la mutación de PTEN que, según las series, está presente en proporciones muy variables que oscilan entre 32% y el 83% (163, 164) y es muy poco frecuente en los carcinomas no endometrioides. No se encuentran en endometrio normal pero de

forma interesante sí que se encuentra en las lesiones precursoras, tanto en hiperplasias atípicas como en neoplasia intraepitelial endometrial (164, 165). La alteración más frecuente es la mutación somática (30-60%), las pérdidas de heterocigosidad (40%) o la hipermetilación del promotor del gen (166). El resultado final es la pérdida de función del mismo, con ausencia de expresión inmunohistoquímica de la proteína (167). Por otro lado, la ausencia de función primaria de este gen por mutación germinal del mismo, se asocia a un mayor riesgo de aparición de carcinomas de endometrio, de mama y tiroides, constituyendo el síndrome de Cowden. Otra evidencia de la relación del gen y los carcinomas de endometrio son los modelos experimentales. En modelos animales se observa desarrollo de carcinomas de endometrio e incluso aparición de lesiones tipo hiperplasia endometrial cuando los ratones tienen déficit de PTEN (168). Múltiples estudios valoran la relación entre la presencia de mutaciones de PTEN y las características clínicas de los carcinomas y su pronóstico (163, 167, 169, 170). En general, aunque hay algunos datos contradictorios respecto a la supervivencia global, se asocia a tumores en pacientes más jóvenes, de bajo grado, con patrones de crecimiento expansivos y en estadios iniciales.

Otra alteración relacionada con PTEN por el hecho que regula la misma vía, son las mutaciones de PIK3CA, es decir, de la unidad catalítica de PI3K. Estas mutaciones están presentes en el 36% de carcinomas endometrioides y afectan sobre todo los exones 9 y 20, éste último codificante del dominio tirosina quinasa (171). Son mutaciones que activan la molécula de forma constitutiva, por lo que la vía PI3K-AKT quedaría activada. En algún trabajo se ha encontrado correlación de la mutación con factores adversos como tumores con mayor capacidad infiltrativa o presencia de invasión vascular (172). De forma interesante, se ha visto que un 15% de carcinomas

endometrioides presentan alteraciones tanto de PTEN como de PI3K y que ambas alteraciones podrían tener un efecto aditivo sobre la tumorigénesis (173).

Otra vía de señalización afectada con frecuencia en los carcinomas endometrioides en la vía de las MAPK, concretamente se afecta a nivel de las moléculas BRAF y KRAS. Las mutaciones de BRAF se encuentran en una baja proporción de carcinomas endometrioides y son mutaciones puntuales, siendo la más frecuente la V600E, aunque en una serie hasta el 21% de carcinomas de endometrio la presentan (174, 175). No encontraron correlación con las características clínico-patológicas de los tumores. Las mutaciones de KRAS, la siguiente molécula de esta cascada de señalización son más frecuentes y se encuentran en el 20-30% de carcinomas de endometrio de tipo endometriode, estando ausentes en los carcinomas serosos (176). También se ha descrito su presencia en endometrios con hiperplasia atípica pero no en hiperplasias simples (177). Se ha visto asociación con casos que presentan inestabilidad de microsatélites pero no se ha demostrado que tenga implicación pronóstica (178).

2.3.2 Inestabilidad de microsatélites

La inestabilidad de microsatélites es una alteración de los mecanismos de reparación del ADN en la que los microsatélites no se replican de forma correcta. Los microsatélites son secuencias cortas de nucleótidos que se repiten en un número de veces variable. Muchos de los microsatélites se encuentran en el ADN no codificante como BAT25, BAT26, BAT40 o D2S123 entre otros, o bien, en el ADN codificante (179). Los que están en el ADN codificante pueden tener implicación clínica, ya que cualquier cambio de longitud de la secuencia del ADN puede implicar cambios del marco de lectura del mismo, produciendo proteínas anómalas. Dentro de estos genes que tienen microsatélites están TGF-beta, Bcl10, IGF-IIR, BAX, MSH3, caspasa 5, MSH6 o PTEN, implicando diversas vías, incluidas las de señalización celular comentadas

anteriormente o la apoptosis. Estos errores que se producen durante la replicación del ADN deberían corregirse mediante un grupo de genes llamados genes reparadores del ADN constituido por MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, fundamentalmente. La descripción de estos errores se hizo en el síndrome de Lynch o cáncer de colon no polipósico hereditario, en el que existen mutaciones germinales de estos genes reparadores y está asociado a inestabilidad de microsatélites (180, 181). En este síndrome, aparte de carcinoma de colon, la segunda neoplasia más frecuente es el carcinoma de endometrio y de tipo endometriode (182). Pero aparte de los carcinomas hereditarios, también puede encontrarse inestabilidad de microsatélites en el 25-30% de los carcinomas endometrioides esporádicos (183, 184). También es un evento que debe ocurrir en fases iniciales de la carcinogénesis, ya que se puede observar en el 7% de hiperplasias atípicas (185). Sin embargo, esta alteración es infrecuente en otros tipos histológicos como los carcinomas serosos (186). Los mecanismos por los cuales se produce la inactivación de los genes reparadores del ADN, sobre todo con MLH1, en las formas esporádicas suele ser por hipermetilación del promotor del gen mecanismo por el cual queda silenciado el gen (185). Existen múltiples trabajos que analizan el valor pronóstico de la presencia de inestabilidad de microsatélites en el cáncer de endometrio con resultados contradictorios (187, 188).

2.3.3 Mutaciones de beta-catenina

Beta-catenina es una molécula implicada en el complejo de unión intercelular junto a e-cadherina. Además tiene un papel importante en la vía de señalización Wnt junto con APC y GSK-3-beta(189). Las mutaciones del gen CTNNB1 que codifica la proteína beta-catenina ocurren generalmente en el exón 3 y se encuentran en el 25-40% de los carcinomas de endometrio (190). La forma mutada de beta-catenina o cuando la vía Wnt queda alterada por ejemplo por mutaciones de APC, se acumula beta-catenina en el

citoplasma y puede trasladarse al núcleo donde puede actuar como factor de transcripción y activar la transcripción de genes como c-myc o ciclina D1 que pueden actuar de forma oncogénica (191). También se cree que es una alteración precoz en el proceso de carcinogénesis, dado que también ha podido observarse en hiperplasias atípicas (192). Existen datos contradictorios sobre el valor pronóstico de esta mutación pero se asocia generalmente a tumores menos agresivos.(193).

Igual que beta-catenina, e-cadherina también se encuentra disminuida en algunos carcinomas de endometrio, especialmente en carcinomas serosos. El mecanismo por el que se pierde la expresión es por pérdida de heterocigosidad o por hipermetilación del promotor del gen (194). Esta pérdida de expresión se correlaciona con mayor tendencia a metastatizar a ganglios linfáticos, reflejando la pérdida de cohesividad celular y mayor capacidad infiltrativa (195).

2.3.4 Mutaciones de TP53

Las mutaciones del gen TP53 representan la alteración molecular más frecuente en los carcinomas serosos y está presente en el 90% de los mismos (196). También se puede detectar en gran parte de los carcinomas intraepiteliales endometriales indicando que se trata de una alteración precoz en el proceso de carcinogénesis (196). Las mutaciones de TP53 producen una proteína disfuncional que se acumula en los núcleos de las células haciendo que ésta sea detectable mediante inmunohistoquímica, de manera que una tinción intensa y difusa tiene muy buena correlación con el estado mutacional de la proteína (197). Por ello, en la rutina diagnóstica se usa este test para confirmar el diagnóstico de carcinoma seroso. Una de las funciones de p53 es activar la apoptosis cuando se detectan daños en el ADN celular (198). La consecuencia de la evasión de la apoptosis en estas células por el defecto de p53 es la acumulación de múltiples alteraciones genéticas constituyendo la llamada inestabilidad cromosómica, en la cual se

acumulan alteraciones en los cromosomas que afectan en el número, o bien, pérdidas o ganancias de brazos del cromosoma, siendo frecuentes las aneuploidías (199). Esta inestabilidad cromosómica es una de las características moleculares de los carcinomas serosos y explica el pleomorfismo celular del mismo.

Las mutaciones de TP53 también pueden darse en el 10-20% de los carcinomas endometrioides, pero son generalmente de alto grado y es una alteración tardía, por lo que la expresión de la proteína no es tan intensa y homogénea como la que observamos en los carcinomas serosos (200). En algunos casos se ha visto en estos carcinomas endometrioides como la adquisición de esta mutación va asociada a un proceso de desdiferenciación del tumor (200, 201).

2.3.5 Receptores de factores de crecimiento epidérmico

En endometrio se han implicado fundamentalmente HER2 y EGFR, aunque también se ha estudiado HER3 y HER4, destacando el incremento de la expresión de este último, habiéndose correlacionado con mejor pronóstico (202).

HER2/Neu o c-erbB2 o receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico es un receptor de membrana que se encuentra alterado en distintos tipos de tumores y que tiene especial relevancia por la existencia de un tratamiento dirigido, constituido por un anticuerpo monoclonal llamado trastuzumab, que evita su activación. El mecanismo más frecuente de alteración es la amplificación génica (203). También se describen mutaciones en algunos tipos de tumores como los carcinomas de pulmón. La presencia de alteraciones de HER2 en cáncer de endometrio se ha descrito sobretodo en carcinomas de tipo seroso y con unas frecuencias muy variables que oscilan entre el 18 y el 61% cuando se ha valorado por inmunohistoquímica y entre el 3 y el 71% cuando se han valorado por FISH (204-208). Igualmente se ha demostrado amplificación de HER2 en carcinomas endometrioides, sobre todo en grados 3 en los que se encuentra en casi el 10% y que

además sobreexpresan la proteína en el 30% (209). Esta gran variación de resultados entre estudios puede ser debida tanto a problemas metodológicos como al hecho de tratarse de series relativamente cortas (210). El interés por la presencia de amplificación o sobreexpresión de HER2 en cáncer de endometrio es fundamentalmente de tipo pronóstico ya que se asocia claramente a menor supervivencia global de forma independiente (91, 209, 211). Así como en otras localizaciones como la mama o el estómago los tratamientos con trastuzumab se han demostrado efectivos, no es así en los carcinomas de endometrio. En un ensayo fase II con trastuzumab en carcinomas de endometrio no se demostraron respuestas al fármaco ni en pacientes con sobreexpresión de la proteína ni en pacientes con amplificación por FISH (212).

EGFR o HER1 o c-erbB1 es otro receptor de factores de crecimiento epidérmico que es una importante diana terapéutica en otras localizaciones como el pulmón o el colon. En carcinomas serosos de endometrio se ha encontrado sobreexpresado en el 36-56% de casos y se ha demostrado de interés pronóstico dada la menor supervivencia global de los casos positivos (213, 214). Sin embargo, a diferencia de otras localizaciones no suelen detectarse mutaciones en los carcinomas serosos por lo que es poco probable que presenten respuesta a tratamientos inhibidores (210).

2.3.6 Inactivación de p16

p16 es una proteína supresora tumoral que regula el ciclo celular uniéndose a CDK4, inhibiendo la unión de éste con la ciclina D, además de tener un papel importante en la regulación de la senescencia celular (215). La detección de esta proteína es de uso rutinario en el estudio de la patología del cérvix uterino y vulvar como marcador indirecto de la infección por HPV (216, 217). Su sobreexpresión en cáncer de endometrio es poco frecuente pero se han descrito deleciones y mutaciones puntuales en algunos carcinomas endometriales (218). Inmunohistoquímicamente, se puede detectar

carcinomas de alto grado sobretodo en carcinomas serosos (80%) y menos frecuentemente carcinomas de células claras (11%) y endometrioides (11%) (219). En algunos de los carcinomas se produce una inactivación de la expresión de la proteína, en los que además tiene valor pronóstico (220) Esta inactivación se produce en aproximadamente un 10% de los carcinomas de tipo I y en un 50% de los carcinomas serosos por un mecanismo que no está bien definido ya que los estudios de metilación del promotor del gen no están hipermetilados y la frecuencia de deleciones y mutaciones puntuales no lo explican (220, 221).

Estas alteraciones moleculares descritas se pueden observar con mayor frecuencia en carcinomas de tipo I o en carcinomas de tipo II con lo que los tipos clínico-patológicos de Bokhman se correlacionan con perfiles moleculares distintos (CUADRO 6).

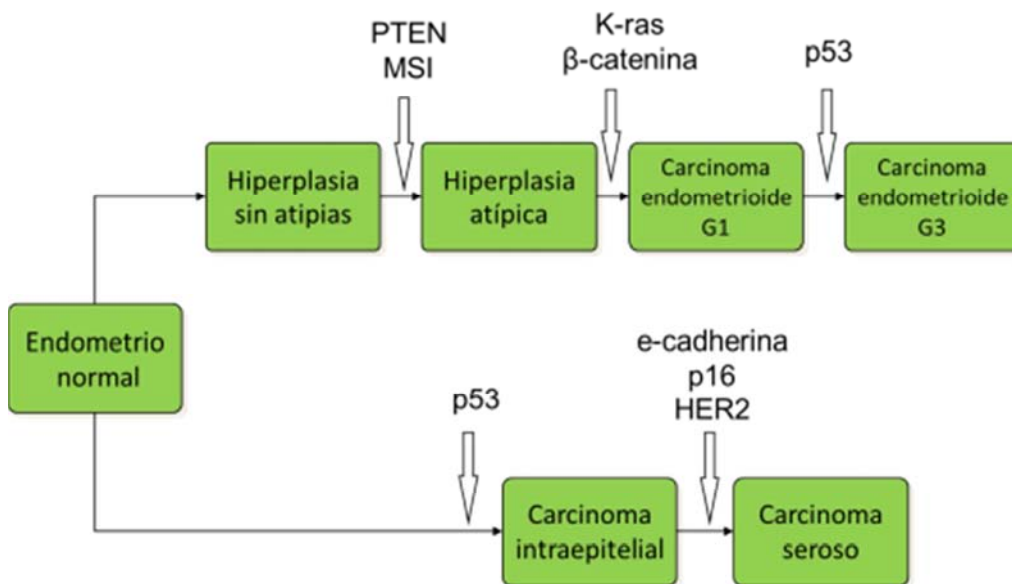
CUADRO 6. Alteraciones moleculares más frecuentes en los carcinomas de tipo I y tipo II

Tipo I	Tipo II
Inestabilidad de microsatélites	Inestabilidad cromosómica
Mutaciones β -catenina	Alteraciones e-cadherina
Mutaciones PTEN	Mutaciones p53
Mutaciones de PIK3CA	Inactivación p16
Mutaciones K-ras	Amplificación de HER2

Además, con estas alteraciones moleculares se han propuesto modelos de carcinogénesis y progresión de ambos tipos tumorales de endometrio, en los que de forma secuencial se van adquiriendo las disfunciones genéticas, de un modo parecido al modelo propuesto por Vogelstein en el cáncer de colon (FIGURA 5) (222). Es interesante, que ambas vías de carcinogénesis pueden confluir en los tipos I al adquirir las mutaciones de p53, pudiendo generar carcinomas mixtos o bien desdiferenciados.

Los carcinomas de células claras, son difíciles de clasificar molecularmente ya que comparten algunas características de los carcinomas de tipo I como la presencia de mutaciones de PTEN en el 21% de casos o la inestabilidad de microsatélites en el 14%. También pueden presentar mutaciones de TP53 en el 9% de casos (61, 154). Sin embargo otras alteraciones frecuentes en los carcinomas de tipo I como las mutaciones de KRAS están ausentes y el comportamiento clínico es más cercano a los carcinomas de tipo II (223).

FIGURA 5. Vías de carcinogénesis en el cáncer de endometrio, con la adquisición de alteraciones genéticas de forma acumulativa, en función de la progresión del proceso oncogénico, siguiendo el modelo dualístico.



2.3.7 Perfiles moleculares

Como en el cáncer de ovario, el grupo *The Cancer Genome Atlas Research network* (224) también realizó un estudio integrando el análisis de diversas técnicas de análisis molecular masivo, en las que estudió las alteraciones numéricas en genes somáticos, el análisis del exoma, así como análisis de expresión y alteraciones epigenéticas como los microARN y el estudio de metilación del ADN. De este trabajo, se obtuvo una nueva clasificación de los carcinomas de endometrio en la que definieron 4 grupos: POLE (ultramutado), inestabilidad de microsatélites (hipermutado), *copy-number low* (endometriode) y *copy-number high* (tipo seroso). El primero presenta un elevado número de mutaciones y destaca la presencia de mutaciones en el dominio exonucleasa de POLE, una polimerasa involucrada en la replicación y reparación del ADN. El grupo con inestabilidad de microsatélites, también presenta un elevado número de mutaciones pero sensiblemente inferior al primer grupo. El tercer grupo presenta estabilidad de microsatélites y baja frecuencia de alteraciones numéricas en el genoma y presenta como alteración más frecuente las mutaciones de beta-catenina. El cuarto grupo presentaba alto número de alteraciones en el número de copias genéticas y estaba constituido fundamentalmente por carcinomas de tipo seroso y endometrioides de alto grado. Estos grupos resultaron de valor pronóstico siendo el primero el de mejor pronóstico y el cuarto el de peor comportamiento.

2.4 FACTORES PRONÓSTICOS

2.4.1 Factores clínicos

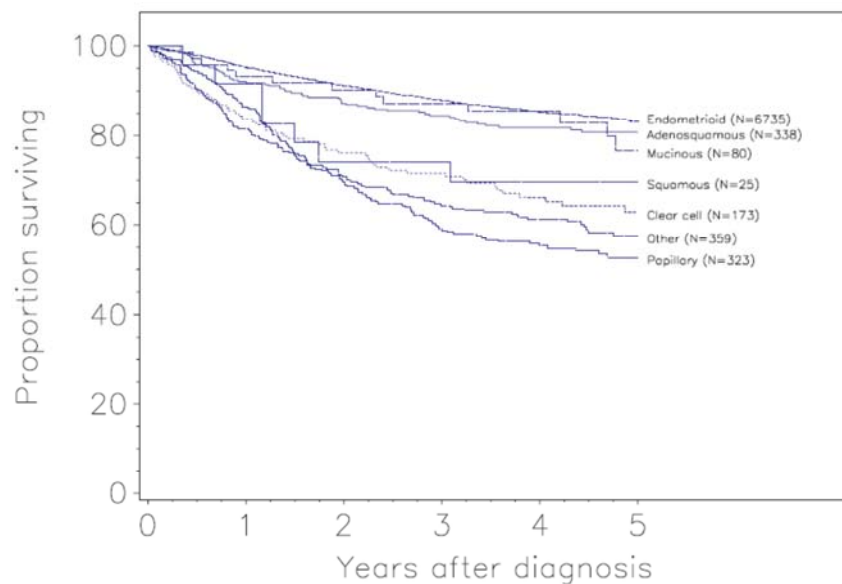
Los factores dependientes del tumor son los parámetros pronósticos más importantes, pero algunos como la edad de la paciente o el estado socioeconómico se han demostrado tener un valor independiente. Las mujeres de <45 años tienen mejor pronóstico que las

mayores. A pesar de asociarse a tumores de mejor grado y estadios iniciales, la edad se mantiene como factor de riesgo de progresión (225).

2.4.2 Tipo histológico

De los carcinomas de endometrio los tipos II de la clasificación de Bokhman son los de peor pronóstico y concretamente, los carcinomas serosos, seguidos de los carcinomas de célula clara.

FIGURA 6. Curvas de supervivencia en función del tipo histológico en el carcinoma de endometrio (FIGO Annual Report)



Los carcinomas endometrioides junto con los mucinosos son los que presentan mayor supervivencia global (ver FIGURA 6) (146).

2.4.3 Grado histológico

El grado histológico se ha demostrado en varios estudios como factor pronóstico (146, 226, 227). Dentro de los carcinomas habituales, el grado histológico se aplica fundamentalmente al carcinoma endometriode, ya que tanto el carcinoma de células claras como el seroso se consideren grados 3. El sistema de gradación utilizado es el propuesto por la FIGO y que se basa en las características microscópicas del tumor y que ha sido adoptado por la OMS (1). Se basa en la valoración del patrón arquitectural y el grado de atipia nuclear. El patrón arquitectural tiene en cuenta el porcentaje de áreas sólidas, evitando contar las áreas de metaplasia escamosa. El grado nuclear se valora como 1 si los núcleos son monótonos, ligeramente aumentados y con la cromatina dispersa y como grado 3 si son núcleos grandes, con características pleomórficas, cromatina grosera o nucléolo prominente. El grado 2 corresponde a los núcleos intermedios. La actividad mitótica es un parámetro de valor pronóstico, que habitualmente está relacionado con el grado de atipia nuclear.

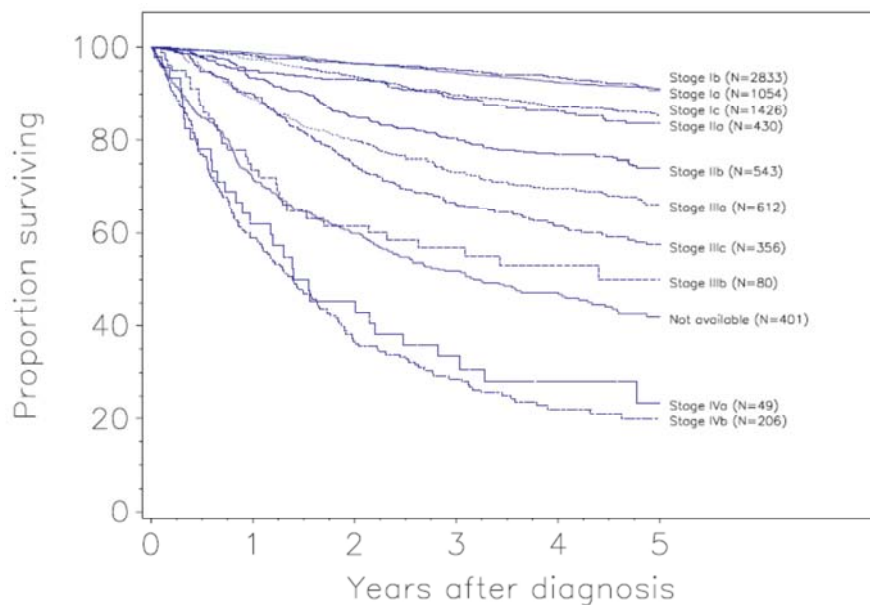
Las OMS define como grado 1 aquellos tumores que presentan <5% de áreas sólidas, grado 2 los que presentan del 5-50% de áreas sólidas y grado 3 si >50% de patrón sólido. En los grado 1 y 2 se aumenta un grado si los núcleos presentan características de grado de atipia 3 (228). En los casos en los que haya heterogeneidad de grado en el tumor, se recomienda gradar según la apariencia global del mismo. Existe discordancia entre el grado del aspirado y el grado final de la pieza en un 25% de casos, que se explica por la representatividad de la muestra (229).

2.4.4 Estadio

El estadio refleja la extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico y sigue siendo el factor pronóstico más importante como en la mayoría de tumores malignos

(ver FIGURA 7) (146). Para la estadificación correcta, es necesario realizar la histerectomía total con doble anexectomía así como la valoración de los ganglios pélvicos y paraaórticos. Desde 2009 se aplica un sistema actualizado de estadificación según los criterios de la FIGO (230, 231) (CUADRO 7). En este nuevo sistema se modifican fundamentalmente los estadios I y II. El estadio I estaba dividido en 3 subestadios en función del grado de infiltración del miometrio que dada la dificultad de valorar la existencia o no de infiltración del miometrio si éste está poco infiltrado es muy poco reproducible, se agruparon los antiguos estadios IA y IB.

FIGURA 7. Curvas de supervivencia en función del estadio en cáncer de endometrio (FIGO Annual Report)



Igualmente la afectación exclusivamente glandular del cérvix, que antes se consideraba estadio IIA pasa a ser estadio I y sólo se considera estadio II si existe afectación estromal del cérvix, es decir, que las células tumorales desarrollan una respuesta estromal desmoplásica (232). El estadio III también se modifica, de manera que ya no

tiene en cuenta la afectación citológica de los lavados peritoneales y se separó la afectación de ganglios pélvicos de los paraaórticos (233).

CUADRO 7. Clasificación TNM y FIGO de los carcinomas de endometrio.

TNM	FIGO	
Tx		El tumor primario no se puede evaluar
T0		No evidencia de tumor primario
Tis		Carcinoma in situ (carcinoma preinvasivo)
	IVB	Metástasis a distancia (excluye metástasis a vagina, serosa pélvica o anejos)
M1		
T1	I	Tumor limitado al cuerpo uterino
	T1a IA	Tumor limitado al endometrio o que infiltra <50% del miometrio
	T1b IB	Tumor que infiltra ≥ 50% del miometrio
T2	II	Tumor que infiltra el estroma cervical pero no se extiende fuera del útero
T3 y/o N1	III	Diseminación local o regional del tumor
	T3a IIIA	Tumor que afecta la serosa uterina o anejos
	T3b IIIB	Tumor que infiltra parametrios o vagina
N1	IIIC	Metástasis a ganglios pélvicos o paraaórticos
	IIIC1	Metástasis a ganglios pélvicos
N2	IIIC2	Metástasis a ganglios paraaórticos con o sin afectación de ganglios pélvicos
T4	IVA	Tumor que infiltra vejiga o mucosa intestinal

El estadio conjuntamente con el grado representa el factor pronóstico más importante y usado en la práctica clínica. Con estos parámetros se establecen 3 grupos de riesgo (234):

- Bajo riesgo: carcinomas endometrioides grados 1 o 2 con infiltración de <50% de la pared uterina

- Riesgo intermedio: carcinomas endometrioides grado 1 o 2 con infiltración de >50% de la pared y grados 3 con infiltración de <50%
- Alto riesgo: carcinomas no endometrioides o endometrioides grados 3 con infiltración de >50% de la pared uterina

2.4.5 Infiltración miometrial

La medida del grado de infiltración de la pared miometrial es un dato que forma parte del estadio patológico. Sin embargo, se ha demostrado su valor pronóstico independiente tanto en estadios I como II (235). La información que debería hacerse constar es la profundidad de invasión en milímetros, el porcentaje de pared invadida y la distancia del tumor a la serosa (236). Debe tenerse en cuenta que se han de medir los nidos de células infiltrantes y no los que puedan estar presentes en el interior de vasos.

2.4.6 Invasión vascular

Se define por la presencia de células tumorales en el interior de vasos linfáticos o venas. En ocasiones, es difícil de distinguir de artefactos de retracción del estroma alrededor de los nidos tumorales, por lo que deben poder identificarse células endoteliales revistiendo el espacio vascular. La invasión vascular es poco frecuente en los carcinomas de endometrio y se observa en un 10-20% de casos (237) y se ha demostrado claramente como factor pronóstico dada la asociación con recidiva de la enfermedad, incluso en estadios iniciales (238). Incluso, en un trabajo se encontró que la invasión vascular era de interés pronóstico incluso en casos que presentaban metástasis ganglionares (239).

2.4.7 Receptores hormonales

Generalmente la expresión de receptores hormonales en el cáncer de endometrio está restringida al carcinoma endometriode mientras que tanto los carcinomas serosos como los de células claras son negativos (240). Existen múltiples trabajos que analizan el valor pronóstico de los receptores hormonales, con resultados contradictorios en algunos casos. En algún trabajo se correlaciona únicamente la expresión de receptores de estrógeno con pronóstico, pero no la de progesterona (241), pero en otros los de progesterona se relacionan con mejor pronóstico (242) aunque en todos ellos se valoran de forma global. Probablemente, los resultados tienen más sentido si se evalúan las isoformas de los receptores y el balance entre las mismas. En un estudio más actual se valora de esta forma (243), y los receptores de estrógenos alfa positivos se correlacionan con mejor supervivencia que los negativos y los receptores de progesterona alfa tienen el efecto contrario, con peor supervivencia los casos positivos. Si se valora la relación entre alfa y beta, si en los estrógenos predomina la fracción beta, también se asocia a menor supervivencia.

2.4.8 Oncogenes y genes supresores

Múltiples moléculas han sido estudiadas en los carcinomas endometriales y que o en análisis univariante o multivariante han resultado de valor pronóstico. Algunas de las moléculas que se han comentado que forman parte de los mecanismos patogenéticos de los carcinomas endometrioides como PTEN, PI3K, beta-catenina, KRAS o la inestabilidad de microsátélites, se asocian a lesiones de bajo grado y a características clínicas más indolentes, por lo que tienen relación con el pronóstico y ya se han comentado en los mecanismos moleculares del cáncer de endometrio. Sin embargo, en la práctica diaria no se usan marcadores moleculares con fines pronósticos.

HER2 se ha mostrado en diversos estudios como un factor pronóstico independiente, tanto en estudios basados en la sobreexpresión inmunohistoquímica como en los que se ha analizado la amplificación genética por técnicas de hibridación in situ (208, 209, 244).

Múltiples moléculas se han estudiado en cáncer de endometrio y se han asociado a factores biológicos relacionados con la agresividad pero que no se ha confirmado su valor pronóstico (245). Entre ellas se incluyen diversas moléculas relacionadas con resistencia a la apoptosis (246), a la invasividad celular (247), mutaciones de ATR (248) o la expresión de p62 (249).

3 BASES MOLECULARES DEL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad producida por alteración en la expresión de diversos genes. Se cree que una célula se convierte en neoplásica por el acúmulo de una serie de mutaciones que le dan ventaja sobre las demás, creciendo hasta constituir un tumor. Las células tumorales derivan de esta célula, es decir, son monoclonales, aunque posteriormente pueden seguir acumulando mutaciones y formar nuevos clones celulares de características biológicas diferentes (250). Este proceso sigue un modelo de evolución darwiniano en el que van a desarrollarse más aquellos clones que adquieran mayor ventaja adaptativa que el resto (251, 252). La coexistencia de múltiple clones dentro de un mismo tumor, indica que los tumores son heterogéneos, adquiriendo este hecho gran importancia a la hora de plantear tratamientos dirigidos contra moléculas específicas o al valorar la respuesta a estas terapias (253).

Con el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva, se ha visto que los tumores tienen un número elevado de alteraciones genéticas que afectan entre 30-60 genes en un carcinoma, aunque hay tumores como los melanomas que pueden llegar a 200. No todos estos genes tienen la misma relevancia en el proceso de tumorigénesis. Se han identificado unos 140 genes, hasta el momento, que tienen capacidad oncogénica por sí mismos y a los que se les ha llamado “*drivers*”. Un carcinoma puede tener mutados de 2 a 8 genes de este tipo (254). El resto, las mutaciones que por sí solas no confieren ventaja proliferativa a la célula y en consecuencia, no tienen importancia en el proceso tumorigénico, por lo que se les ha llamado “*passengers*” (255). Estas mutaciones se adquieren de forma progresiva y a medida que se acumulan, la célula tiene mayor ventaja sobre el resto, por lo que el tumor va a progresar (256). Todo este proceso ocurre a lo largo de 10-20 años, dependiendo del tumor.

Los genes que tras su activación por una mutación son capaces de producir una neoplasia se denominan oncogenes. Los genes que, por el contrario, al perder su función normal pueden producir una neoplasia se denominan genes supresores. Del mismo modo las proteínas resultantes de la expresión de dichos genes, se denominan oncoproteínas y proteínas supresoras, respectivamente.

Se han descrito múltiples alteraciones moleculares asociadas a carcinogénesis, aunque en la mayoría de casos no existe una alteración específica y suficiente para la génesis de un tumor determinado. Hanahan y Weinberg agruparon estas alteraciones en seis grandes vías o aspectos funcionales de la célula, es decir, todas estas anomalías moleculares tiene como consecuencia la alteración de estas seis vías para convertir una célula en tumoral (80). Estos seis aspectos funcionales son la autosuficiencia de señales de crecimiento, la insensibilidad ante las señales que frenan el crecimiento, la alteración de los mecanismos de apoptosis, posibilidad ilimitada de replicación, la angiogénesis y la capacidad de invasión y metástasis. La presencia de vías redundantes en las células que suplan la función ante la pérdida de otra vía, hace que la aparición de enfermedades neoplásicas sea relativamente baja en la vida de un individuo y por otro lado complique el estudio de estas vías. Las células tienen diferentes sistemas para detectar y reparar errores en el ADN, de modo que si existen mutaciones que alteran estas vías, éstas puedan ser reparadas, o bien, la célula sea eliminada. En este proceso intervienen proteínas supresoras como la p53 y los genes reparadores de ADN como el MLH1, MSH2 o MSH6. Por ello, para que se existan mutaciones que alteren estas vías, tiene que haber una disminución de la funcionalidad de estos sistemas reparadores.

Por otro lado, es interesante el concepto propuesto por estos autores, en el que el tumor no es una masa de células anómalas que proliferan en nidos aislados sino que es un complejo en el que intervienen las células tumorales, la matriz extracelular con sus

células de soporte, los vasos y la celularidad del sistema inmune (80). Este hecho ha dado lugar a numerosos estudios en los que se demuestra la importancia de estos elementos, o microambiente tumoral, en la evolución del tumor e incluso en la respuesta terapéutica al mismo (257).

En 2011 los mismos autores actualizaron la revisión y añadieron 4 nuevas alteraciones funcionales en las células tumorales (258).

3.1 PRINCIPALES VÍAS ALTERADAS EN CÁNCER

De forma resumida, a continuación se describen las vías principales que se alteran en la carcinogénesis según el esquema de Hanahan y Weinberg (80, 258):

- **Señalización proliferativa mantenida.** Cualquier célula necesita señales para pasar de un estado quiescente a uno proliferativo. En esta señalización intervienen múltiples factores que incluyen factores de crecimiento, receptores celulares y vías de transmisión de la señal hacia el núcleo, donde se produce la acción esperada tanto a través del ciclo celular como del crecimiento de la célula. Esta característica representa uno de los rasgos más importantes de las células tumorales dado que se trata de uno de los procesos más regulados en tejidos normales para mantener la homeostasis del organismo. La regulación de estas señales de crecimiento es poco conocida en tejidos normales. Sin embargo, en cáncer, las células pueden producir sus propias señales mitogénicas o bien emitir señales a las células estromales acompañantes para que produzcan los factores de crecimiento (259, 260). Otro mecanismo es la activación constitutiva de una vía de señalización independientemente de que exista estímulo de la misma. Esto ocurre con la amplificación o mutación de los receptores de membrana o bien mutaciones que activan moléculas que forman parte de la

cascada de señalización (261, 262). Las células tumorales también pueden evitar los mecanismos reguladores fisiológicos cuando quedan inhibidos por mutaciones u otros mecanismos. Esto ocurre con las mutaciones de PTEN que hacen que éste no pueda contrarrestar las señales transmitidas por PI3K, o mutaciones de KRAS que evitan que RAS GTPasa pueda desactivar la molécula (263).

- **Evasión de los mecanismos de supresión del crecimiento.** Existen mecanismos de control del crecimiento celular que pueden forzar una célula a salir del ciclo celular. Muchos de estos mecanismos están centrados en genes supresores tumorales, siendo moléculas prototípicas de los mismos las proteínas Rb (del gen del retinoblastoma) o p53 que van a determinar si la célula progresa en el ciclo celular, va a apoptosis o se vuelve senescente. Uno de los mecanismos de regulación del crecimiento fisiológico es la inhibición por contacto en el que las células dejan de proliferar cuando están en contacto con otras, produciendo cultivos celulares en monocapa cuando se reproduce experimentalmente (264). Las células tumorales evitan esta inhibición y en cultivos celulares crecen de forma tridimensional. En este mecanismo se han implicado moléculas como Merlin o LKB1 (265, 266). Otro de los factores más estudiados con efecto anti-proliferativo es el TGF β (factor de crecimiento transformante) y las proteínas Smad que transmiten su señal al núcleo.
- **Evasión de la muerte celular.** La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo fundamental en la homeostasis de los tejidos. Para que exista crecimiento debe haber un aumento en la proliferación celular y una disminución en la apoptosis. Dentro del conjunto de moléculas que intervienen en el proceso se pueden distinguir dos grandes grupos: los sensores y los

efectores. Los primeros monitorizan el microambiente celular a través de receptores de membrana, o bien, la falta de bienestar celular generado por las situaciones de hipoxia, la falta de nutrientes, las alteraciones en las vías de señalización celular producidas por la activación de oncogenes, el daño del ADN o la falta de factores de supervivencia celular. Los efectores son los que van a llevar a cabo el proceso de apoptosis, que en gran parte está regulado por la mitocondria por la liberación de citocromo C o de moléculas de la familia de Bcl2 pro y anti-apoptóticas que van a regular todo el proceso (267). Finalmente, los efectores finales van a ser las caspasas (268, 269). En función del origen de la señal que va a desencadenar el proceso, se activa una vía u otra. Si se trata de señales extracelulares será la vía extrínseca y si son intracelulares, será la intrínseca. Las células tumorales utilizan diversos mecanismos para evitar la apoptosis siendo el más habitual la pérdida de función de TP53 o bien aumentando la expresión de moléculas antiapoptóticas como Bcl2 o bien reprimiendo la expresión de moléculas proapoptóticas como Bax. Otro mecanismo asociado con la apoptosis es la autofagia. Suele inducirse en situaciones de estrés celular como la falta de nutrientes, y la célula degrada organelas que van a metabolizarse para ayudarla a sobrevivir (270). Otro mecanismo para evadir la muerte celular se produce por los factores de crecimiento liberados antes respuestas inflamatorias asociadas a focos de necrosis y de esta manera facilitar la progresión tumoral (271).

- **Capacidad ilimitada de replicación** o inmortalidad replicativa Este concepto nace de las células procedentes de cultivos en las que se observó el número de divisiones era limitado. Al final de este máximo la célula pasaba a un estado de crisis en el que moría por apoptosis o bien, era capaz de sobrevivir pasando a un

estado irreversible en el que la célula ya no se podía volver a dividir pero seguía viable, llamándose a este estado senescencia. En raras ocasiones, algunas células sobrevivían a la fase de crisis y adquirían capacidad ilimitada de replicación, conociéndose este proceso como inmortalización. Esta propiedad está regulada por el telómero. Es una estructura que se encuentra en el extremo de los cromosomas (272). Una célula normal se divide 60-70 veces, y en cada división pierde de 50-100 pares de bases de los telómeros, que disminuyen su división hasta que la división no es posible. La telomerasa es un encima que añade repeticiones de hexanucleótidos en los telómeros e impide el acortamiento de los mismos y, por tanto, la célula adquiere una capacidad ilimitada de replicación. El 85-90% de tumores malignos tienen aumentados los niveles de telomerasa, inmortalizando las células. En cambio, en los tejidos normales casi no se detecta telomerasa (273).

- **Capacidad de inducir la angiogénesis.** Las células tumorales igual que las normales necesitan estar a <100 micras de un capilar para poder recibir los nutrientes y el oxígeno, así como liberar los desechos del metabolismo. Para ello, es necesario que el crecimiento tumoral vaya acompañado de la formación de nuevos vasos. La formación de estos nuevos vasos se denomina angiogénesis y está regulada por el balance entre factores proangiogénicos y factores inhibidores de la angiogénesis. Son muchas las moléculas implicadas en este proceso, siendo VEGF el prototipo de las primeras y la trombospondina-1 el de las segundas (79, 274). La hipoxia es uno de los factores que estimula este proceso a través de moléculas como HIF1o bien por estimulación oncogénica. Además intervienen moléculas que regulan la remodelación de la matriz extracelular para permitir el crecimiento vascular, como las metaloproteasas o

factores de crecimiento fibroblástico (275). Todo este proceso se inicia muy precozmente en la carcinogénesis, habiéndose detectado un aumento de las moléculas proangiogénicas incluso en lesiones preinvasivas (276). En esta generación de nuevos vasos intervienen también otras células como los pericitos, macrófagos, neutrófilos, mastocitos y progenitores mieloides (277).

- **Capacidad de invasión tisular y de metástasis.** Para que las células puedan diseminarse tiene que perder las moléculas de adhesión intercelulares y con la matriz extracelular. Entre estas moléculas se encuentran la e-cadherina, b-catenina, n-cadherina o las integrinas, siendo la primera la mejor caracterizada. Por otro lado, la célula debe adquirir capacidades como el aumento de la movilidad o la resistencia a la apoptosis para poder diseminar y las adquiere en el proceso denominado transición epitelio-mesénquima. En este proceso intervienen múltiples moléculas como Snail, Slug, Twist o Zeb1/2 (278, 279). Además, son necesarias las proteasas que degradan la matriz extracelular para facilitar la migración de la célula y la resistencia a la apoptosis y así invadir los tejidos circundantes (280). El estroma y concretamente el microambiente tumoral contribuye de forma esencial en todo este proceso, jugando un papel importante los macrófagos asociados al tumor que van a producir metaloproteasas o factores de crecimiento para favorecer la diseminación y crecimiento de las células tumorales (281). A parte de la diseminación local, la mayor parte de tumores malignos tiene la capacidad de hacerlo a distancia. Este proceso de metástasis requiere de 2 fases: la diseminación física de las células tumorales y la adaptación de estas células en el nuevo microambiente. No siempre el órgano huésped es el adecuado para que estas células sobrevivan. Además las células tumorales han de ser capaces de crear las condiciones para

poder proliferar y una de las más importantes en esta fase es generar el estímulo angiogénico. Cuando no lo consiguen se pueden generar metástasis “durmientes” (282).

Estas son las 6 características principales que se definieron en 2000 y su alteración garantiza la proliferación del tumor, la supervivencia de sus células y la diseminación (80). Para que la célula tumoral pueda tener alteradas estas vías depende de dos factores: la inestabilidad genética necesaria para alterarlas y el estado inmunitario y grado de respuesta inflamatoria, es decir, de la interacción del estroma. Además la célula tiene que reprogramar el control metabólico celular, para que pueda soportar el aumento de proliferación y crecimiento propios del tumor. De estas características, Hanahan y Weinberg definieron 4 nuevas características en 2011 (258).

- **Inestabilidad genética.** Algunas alteraciones genéticas o conjunto de alteraciones confieren ventaja adaptativa de algunas células tumorales sobre otras. Para que estos genotipos pasen de una célula a sus descendientes implican que ha habido mutaciones que activan los genes oncogénicos o bien que inactivan los genes supresores tumorales. Por otro lado, la alteración puede adquirirse en genes no mutados por mecanismos epigenéticos, ya sea por metilación y silenciamiento de algunos genes o bien por microARNs que bloquea la transcripción de los mismos (283). El acúmulo de mutaciones también se puede dar cuando fallan los mecanismos implicados en la reparación de ADN, en el mantenimiento de los telómeros o en los sistemas de evasión de la apoptosis ante el daño tumoral. Recientemente, con los estudios con arrays de hibridación genómica comparada así como en los estudios de secuenciación

masiva, se han visto la abundancia de alteraciones genéticas en forma de amplificaciones y deleciones múltiples, algunas recurrentes y que contienen genes importantes en la progresión tumoral (284).

- **Respuesta inflamatoria.** Los tumores se asocian a grados variables de respuesta inflamatoria que acompañan al mismo. De forma interesante, no siempre se genera el mismo tipo de respuesta, predominando unos tipos de poblaciones linfocitarias u otros. Además, en algunos casos, como en los linfomas, el tipo de respuesta inflamatoria asociada condiciona el pronóstico del tumor y el grado de respuesta al tratamiento (285). Clásicamente, se ha interpretado la respuesta inflamatoria como un mecanismo del organismo para controlar el crecimiento tumoral, pero hay evidencias de que hay un efecto paradójico por el que esta respuesta estimula la tumorigénesis y la progresión tumoral (271).
- **Reprogramación del metabolismo energético.** Las células tumorales para poder crecer y dividirse a un ritmo superior al de las células normales tienen que adaptar su metabolismo para poder proporcionar la energía suficiente. En las células tumorales ocurre un cambio metabólico conocido como efecto Warburg, ya que fue Otto H Warburg quien lo describió en 1956 en relación a las células tumorales (286). Resumidamente, las células normales habitualmente utilizan la vía del piruvato en la mitocondria en situación aeróbica para obtener energía y la vía del lactato a través de la glucólisis en situaciones anaeróbicas. Sin embargo, las células tumorales utilizan esta segunda incluso en situación aeróbica. Este cambio de metabolismo es menos eficiente que la fosforilación oxidativa mitocondrial. Por otro lado, esta vía implica un mayor consumo de glucosa por lo que la célula tiene que aumentar la expresión de transportadores de glucosa como GLUT1 (287). Este aumento del consumo de glucosa en la base de la

tomografía por emisión de positrones (PET). El citado cambio metabólico se ha relacionado con la activación de oncogenes y de genes supresores, observándose aumento de factores de hipoxia como HIF1 tanto por la mutación de RAS como por la propia hipoxia, que acaban activando la vía de la glucólisis (287) . El resultado, es un aumento del lactato que puede ser usado como fuente energética por parte de otras células tumorales.

- **Evasión de la respuesta inmune.** El sistema inmune destruye en condiciones normales células anómalas que potencialmente podrían producir tumores o células tumorales circulantes, evitando la diseminación tumoral. Este hecho, queda respaldado por el aumento en la incidencia de tumores en pacientes inmunodeprimidos, como ocurre en situaciones post-trasplante (288). Las células tumorales utilizan diversos mecanismos para evitar su destrucción por el sistema inmune como el aumento de la actividad de los linfocitos T reguladores, que, además, los asociados a tumores tienen mayor actividad supresora que los presentes en la respuesta inmunológica normal (289). Otros mecanismos implicados son la reducción de los antígenos inmunógenos disminuyendo la respuesta asociada la vía del complejo mayor de histocompatibilidad. También la inhibición mediante citoquinas de la respuesta T citotóxica o produciendo anergia a los linfocitos T y, por tanto, creando tolerancia. Estos mecanismos son la base para el desarrollo de terapias basadas en evitar estos sistemas de supresión de la respuesta inmune. En algunos tumores como el melanoma se han obtenido buenos resultados con moléculas que bloquean algunos de estos factores como PD1 o PDL1 (290).

La descripción de estas vías que son claves para que un tumor pueda progresar, han representado la posibilidad de que se pueda abordar el tratamiento del tumor como un mecanismo de bloqueo de cada una de ellas. En la práctica clínica, hay fármacos de uso rutinario o en fase de ensayo clínico dirigidos contra moléculas específicas en cada una de ellas.

3.2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR

Las células que constituyen un tejido, un órgano o todo el organismo no actúan de forma independiente sino que lo hacen de forma coordinada por lo que necesitan comunicarse entre ellas. Esta comunicación puede ser directa entre células adyacentes, es decir, una molécula de la membrana de una célula interacciona con una molécula receptora de la célula adyacente o bien a través de las uniones y canales intercelulares. Un mecanismo más complejo es a través de la liberación de moléculas que van a activar un receptor de la propia célula (autocrino), una célula próxima (paracrino) o a distancia (endocrino) e incluso mediante estructuras especializadas como ocurre en las uniones sinápticas (291).

Los receptores pueden ser de membrana o intracelulares, necesitando en ocasiones una molécula transportadora de la señal desde el espacio extracelular hasta el receptor. La estimulación de los receptores habitualmente activa una cascada de señalización en la que interaccionan múltiples moléculas que pueden ser activadoras, represoras, simples transmisoras o moléculas que tienen un papel de soporte como las “*scaffold proteins*” que permiten que otras moléculas puedan interaccionar entre sí o ser moléculas de anclaje. Este proceso de transmisión de la señal se denomina transducción y las moléculas que intervienen de forma directa constituyen las vías de señalización celular (292).

Hay muchas vías de señalización en las células y muchas de ellas se han implicado en cáncer. Las principales son las vía PI3K-AKT-mTOR, la vía RAS-RAF-MAPK, la vía de TGF-beta, la vía NOTCH, la vía JAK-STAT, la vía Hedgehog, la vía Wnt o la de NF-kB (291).

Dado que este trabajo estudia las principales vías de señalización involucradas en la regulación de las señales de crecimiento celular, únicamente se describirán las 2 primeras.

3.2.1 Receptores de los factores de crecimiento

Los receptores de los factores de crecimiento son las primeras moléculas en recibir el estímulo y transmitirlo hacia el interior de la célula. Existen receptores de diversos tipos que van desde los asociados a canales de membrana o receptores con actividad enzimática en los que existe una unidad catalítica de tipo tirosina quinasa, tirosina fosfatasa, serina treonina quinasa, guanilato ciclasa, etc. (261, 291). Algunos receptores forman complejos con otras proteínas en las que se combinan el receptor con una proteína acopladora o transductora y una efectora.

A pesar de la complejidad e interconectividad de las distintas vías de señalización las vías principales tanto desde el punto de vista fisiológico como de la enfermedad se centran en 8 principales tipos de receptores: los receptores unidos a proteínas G, receptores hormonales nucleares, TGF-beta, JSK, Hedgehog, Wnt y los receptores tirosina quinasa (293). Sin embargo, el número de receptores tirosina quinasa en los vertebrados es aproximadamente de 58, representando el triple que los invertebrados, en relación a la totalidad del genoma. Como consecuencia de este incremento de genes a lo largo de la evolución, existe marcada duplicidad o redundancia de moléculas implicadas en las vías de señalización, aumentando la complejidad del sistema, aunque parte de

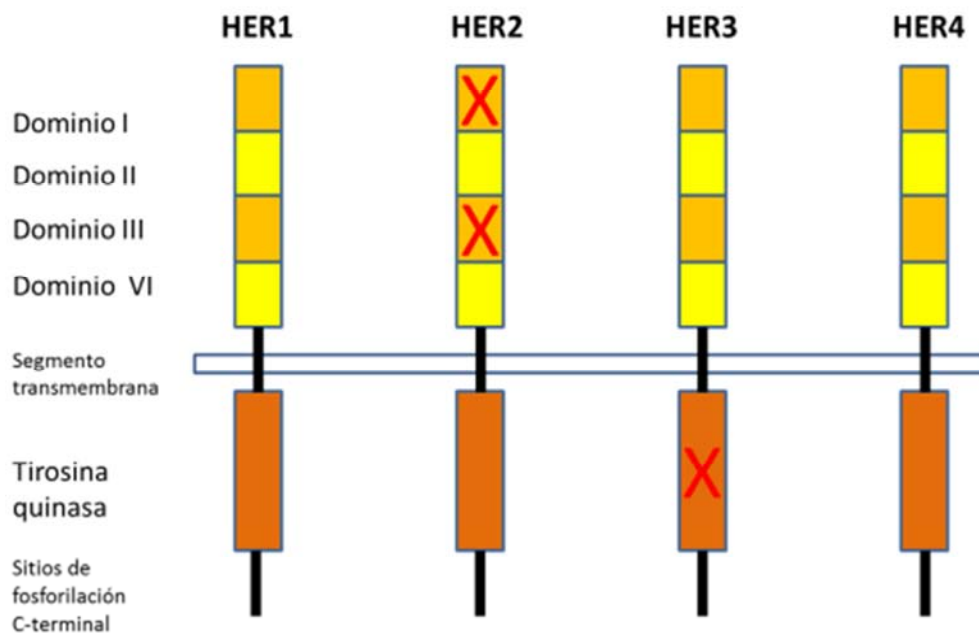
estos genes se encuentran normalmente inactivados o acaban constituyendo pseudogenes (294).

Los receptores de los factores de crecimiento epidérmico representan una familia de receptores con actividad quinasa y como otras proteína quinasas juegan un papel clave en la regulación de la biología celular y entre los que también se incluyen otros receptores como c-kit, VEGFR, HGFR y RET (261, 295). Actualmente se conocen 4 miembros en esta familia de receptores (296). Tienen en común su estructura, estando constituidos por un dominio extracelular, un segmento transmembrana y un dominio intracitoplasmático con actividad tirosina quinasa. En el dominio extracelular se encuentra el sitio de unión del el ligando ocasionando la dimerización del receptor, es decir, la aproximación y unión de los moléculas, dando como resultado la autofosforilación de los dominios intracitoplasmáticos y el inicio de la cascada de señalización intracelular. Esta dimerización puede ocurrir entre moléculas iguales o entre miembros distintos de la familia, denominándose homodimerización y heterodimerización, respectivamente. Según sean las moléculas que formen parte del dímero, la vía de señalización activada y la capacidad transformante será diferente (296). Por otro lado la heterodimerización aumenta el número de ligandos que pueden activar un receptor individualmente y aumenta las vías de señalización que puede activar.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o c-erbB1 o HER1) es una glicoproteína de membrana de 1186 aminoácidos en su forma más frecuente, que está formada por un dominio extracelular de 622 aa, un dominio transmembrana de unos 50 aa y un dominio citoplasmático de 542 aa con actividad tirosina-quinasa (297). EGFR se activa por la unión con un ligando como EGF, TGF-alfa o la anfiregulina. Tras la unión con el ligando dimeriza con otra molécula de EGFR con otro receptor de la

misma familia como HER2. EGFR se sobreexpresa en múltiples carcinomas entre los que cabe destacar los de vejiga, mama, cabeza y cuello, riñón, pulmón y próstata (298-300).

FIGURA 8. Representación esquemática de los receptores de la familia EGF. HER2 no tiene sitio de unión de ligando y HER3 no tiene actividad tirosina quinasa en el dominio intracelular.



El segundo miembro de la familia es HER2/Neu o c-erbB2. Comparte una homología del 40% con EGFR (301). El gen está localizado en el cromosoma 17q21 y codifica un proteína de 185kDa formada por un dominio extracelular de 632 aa con capacidad de unión a ligando, un dominio transmembrana de 22 aa y un dominio citoplasmático de 580 aa, con actividad tirosina-quinasa. En la actualidad no se conoce un ligando específico para el mismo. Los mecanismos por los cuales puede alterarse la función de HER2 son múltiples, si bien el más habitual en tumores humanos es la amplificación, es decir, el número de copias del gen. Se han observado alteraciones en HER2 en múltiples

tumores como mama (302), ovario (92), vejiga urinaria (303), glándula salival (304), endometrio (305), páncreas (306), en carcinomas de células pequeña pulmonar (307) o próstata (308).

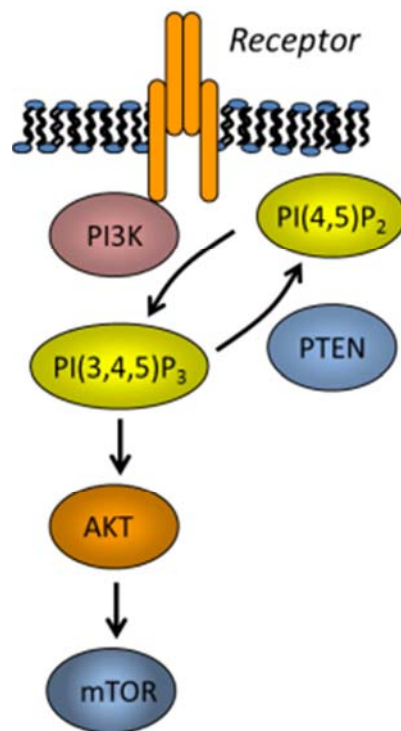
Los dos miembros restantes de la familia de receptores ErbB son HER3 y HER4. El primero tiene un dominio tirosina quinasa no funcionante, por lo que sólo puede activarse por heterodimerización con otros miembros de la familia. Se ha encontrado sobreexpresado en tumores de mama, próstata y colon (298-300). Recientemente, se ha visto correlación de su sobreexpresión con la supervivencia en cáncer de ovario, incluso en el análisis multivariado (95). HER4 se ha descrito sobreexpresado en tumores de mama y en tumores de la granulosa ováricos (298).

3.2.2 Vía PI3K/AKT/mTOR

Esta vía interviene regulando muchos procesos celulares destinados a garantizar la supervivencia de la célula como la apoptosis, el crecimiento celular, la diferenciación celular o la proliferación. Es una vía que tiene gran interés clínico ya que se puede bloquear farmacológicamente en diversos puntos de la misma (309).

- **PI3K** o fosfatidilinositol-3-quinasa es una quinasa lipídica que integra las señales procedentes de los receptores y las traslada a nivel intracelular para poder controlar múltiples procesos celulares como la proliferación, el crecimiento, la supervivencia, la motilidad o el metabolismo (310). PI3K fosforila los fosfatidilinositoles en el grupo hidroxilo 3'. Está compuesto por una unidad catalítica (p110) de la que existen 3 isoformas PIK3CA, PI3CB y PIK3CD. Esta unidad se asocia con la unidad reguladora (p85) de la que existen 5 isoformas.

FIGURA 9. Representación esquemática de la vía PI3K-AKT-mTOR



En ausencia de señales de crecimiento, ambas unidades están unidas. Al activarse el receptor, p85 se libera y p110 fosforila el fosfatidilinositol bifosfato, que a su vez activará AKT (311). PIK3CA se encuentra mutado en múltiples tumores, siendo los más frecuentes los de endometrio, mama, ovario y colorrectales (311).

- **PTEN** (fosfatasa y homólogo de la tensina en el cromosoma 10) es una fosfatasa que elimina el fosfato del grupo hidroxilo 3, desactivando la vía y por tanto contrarrestando el papel de PI3K. También se han descrito ganancias numéricas o amplificaciones génicas en tumores de cabeza y cuello, cérvix uterino, pulmón o linfomas. El resultado es la activación constitutiva de la vía. La inactivación de PTEN ocurre generalmente por mutación, que puede ser germinal constituyendo el síndrome de Cowden o somática, encontrándose en este caso en carcinomas de endometrio, mama, pulmón o linfomas (312).

- **AKT** o proteína-quinasa B (PKB) es una serina-treonina quinasa que regula funciones celulares tan dispares como el metabolismo, la apoptosis, el crecimiento celular, la diferenciación celular, la angiogénesis o la motilidad celular (313). Se conocen actualmente tres miembros de la familia: Akt1, Akt2 y Akt3 los cuales comparten una homología de >80%. Están constituidos por tres dominios: un dominio con homología a la plectrina con el que se une a los 3-fosfatidilinositoles, un dominio con actividad quinasa y un dominio regulador. En estos dos últimos dominios existen dos puntos de activación por fosforilación que son los residuos Thr308 y Ser473 en el caso de AKT1 (313). La forma de activación principal de AKT está mediada por PI3K, ya que la forma fosforilada ancla AKT a la membrana citoplasmática y cambia su conformación para poder ser fosforilada por PDK1 (quinasa dependiente de fosfatidilinositol-1). También se ha visto que también puede fosforilarse por vías independientes de PI3K como a través de quinasas de la familia SRC (314). Una de las primeras funciones descritas de AKT es el aumento de la supervivencia bloqueando procesos y proteínas proapoptóticas como los inhibidores de Bcl2 o BAD (315). A través de mTOR, como se discutirá más adelante, regula el crecimiento celular. Paralelamente a la vía de MAPK, AKT también puede regular la proliferación celular, favoreciendo la activación del ciclo celular. Se ha visto que AKT puede fosforilar p27kip1 que es un inhibidor del ciclo celular. Esta fosforilación evita su traslocación al núcleo por lo que mitiga su efecto inhibidor (316). La activación de AKT en las células endoteliales a través de factores de crecimiento como VEGF contribuye al proceso de angiogénesis. Además, a través de mTOR favorece la traducción de factores proangiogénicos como HIF1(317). Por último, también interviene en la regulación del metabolismo

celular estimulando la entrada de glucosa en la célula, fundamentalmente mediado por el transportador de glucosa Glut4 (318). En cáncer se ha descrito la amplificación génica y sobreexpresión en algunos carcinomas de ovario (319) y de mama (320) y de forma menos frecuente en otros carcinomas y también en linfomas (321). Es más frecuente la hiperactivación de AKT y puede observarse en múltiples tipos de tumores que van desde linfomas, glioblastomas o tumores de localizaciones muy variables, con unos porcentajes que oscilan entre el 30-80% de los casos (322).

- **mTOR** (*mammalian target of rapamycin*) o diana de la rapamicina es una molécula central en la transmisión de las señales de crecimiento hacia el núcleo y su papel más importante está en la regulación del crecimiento celular (323) pero también interviene regulando el metabolismo celular, la proliferación y la supervivencia. La rapamicina es un antifúngico de la familia de los macrólidos que inhibe la proliferación celular en mamíferos y que además tiene efectos inmunosupresores. En 1991 se identificó TOR porque su mutación confería resistencia a la capacidad inhibitoria de la rapamicina (324). Se trata de una proteína con actividad serina-treonina quinasa en su extremo carboxi-terminal. Esta proteína forma los complejos mTORC1 y mTORC2, estando el primero constituido por 5 proteínas entre las que se incluye raptor y el segundo por 6 proteínas entre las que está rictor y deptor (325). El primero regula de forma positiva el crecimiento celular promoviendo la síntesis de proteínas, lípidos y organelas y limitando procesos catabólicos como la autofagia. La síntesis de proteínas la regula favoreciendo la formación del proceso de iniciación de la síntesis proteica liberando eIF4E de su molécula inhibidora 4E-BP1 como se expondrá más adelante. A través de la fosforilación de p70S6K aumenta la

síntesis de mRNA y la función ribosomal (326). Asimismo, aumenta la síntesis de lípidos y el metabolismo y biogénesis de mitocondrias (327). El segundo complejo, mTORC2, está peor caracterizado y no responde a la rapamicina. También tiene un papel regulador de AKT ya que en parte la fosforilación completa de la misma depende de este complejo (328). También regula la organización del citoesqueleto (329). La regulación de mTORC1 es muy compleja e intervienen múltiples factores, de manera que es una molécula integradora de múltiples señales. La más importante es la que proviene de los factores de crecimiento y que llega a través de la activación de AKT y está mediada por TSC1 / TSC2 (complejos de la esclerosis tuberosa) y Rheb (330). A su vez TSC1 y TSC2 están reguladas por ERK1/2 y RSK1 (326). Su activación también depende del estado energético de la célula a través de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) (331), del nivel de oxígeno (332) y de la presencia de aminoácidos (325). Dado que se trata de una molécula que centraliza el crecimiento celular y éste es clave en el desarrollo de neoplasias, mTOR se encuentra hiperactivado en gran número de neoplasias. Este hecho adquiere especial importancia dada la existencia de moléculas, algunas derivadas de la rapamicina, que lo bloquean y por tanto es una diana terapéutica. Se ha descrito activado en carcinomas de células renales, carcinoma no microcítico pulmonar, cáncer de mama, sarcomas, linfomas o tumores gastrointestinales entre otros (333-338).

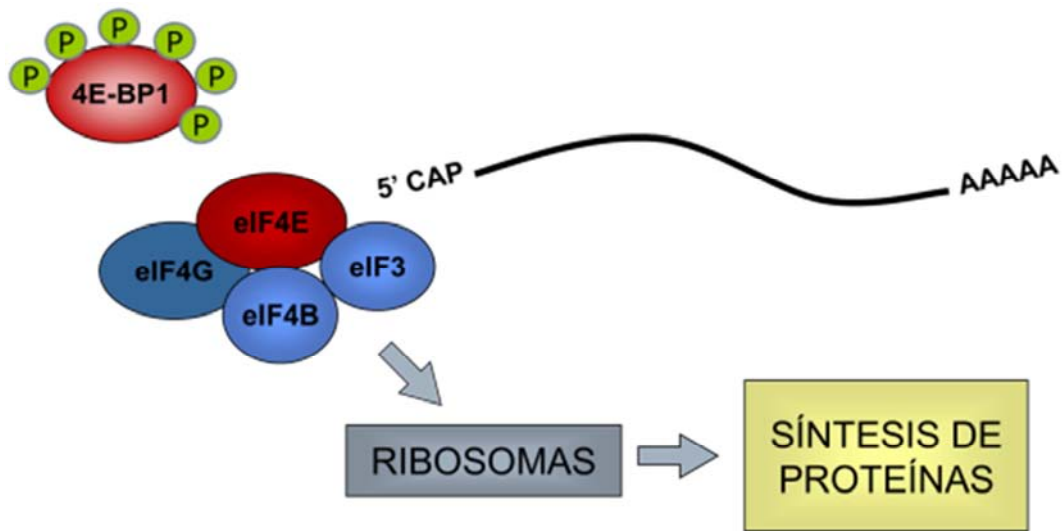
- Los efectores de mTOR son diferentes en función del complejo que forme con las otras proteínas mencionadas. El complejo TORC1 tiene como principales moléculas efectoras la proteína p70S6K y 4E-BP1, además de regular otras vías como la biogénesis de ribosomas, algunos factores de transcripción o bloquear la

autofagia. Por otro lado, el complejo TORC2 regula AKT, PKC o Rho y Rac (339). Mediante el primer complejo, mTOR regula la traducción de proteínas (340). La activación de p70S6K depende de mTOR y de PDK1 que la fosforilan en distintos sitios, necesarios para su completa funcionalidad, que consiste en fosforilar la proteína S6 de la subunidad ribosómica 40S. Esta activación conlleva el aumento de transcripción de los mARNs que contienen en el extremo 5' el tracto de oligopirimidina o 5'TOP. Estos mARNs codifican proteínas implicadas en la traducción de proteínas, incluyendo proteínas ribosomales o factores de elongación de la traducción proteica. Estos mARNs 5'TOP representan el 15-20% del total de mARNs de la célula (339). Esta función ha sido debatida en la literatura, ya que puede ocurrir también de forma independiente a la activación de p70S6K (341, 342). Otras funciones atribuidas a esta proteína están implicadas directamente a la síntesis de proteínas, el crecimiento celular, la regulación de la vía de mTOR en forma de retroalimentación, supervivencia celular o motilidad celular (341).

Otra molécula efectora de TORC1 es 4E-BP1 y su función principal es unirse al factor iniciador de la traducción 4E o eIF4E, bloqueándolo. Es, por tanto, un represor de la traducción proteica (342-344). En realidad, se conocen 3 proteínas con esta función también llamadas 4E-BP2 y 4E-BP3, estando las 2 primeras presentes en la mayoría de tejidos y la tercera presenta un patrón de expresión más restringido (345). 4E-BP1 es el miembro mejor caracterizado de la familia. Cuando 4E-BP1 es fosforilada, libera eIF4E, de manera que éste puede unirse al complejo de iniciación de la traducción y empezar la síntesis de proteínas (346) (ver FIGURA 10). Esta fosforilación de 4E-BP1 depende en gran parte del complejo TORC1 y se produce de forma jerárquica de forma que para poder

fosforilarse la Ser65 tiene que hacerlo primero la Thr37, Thr46 y la Thr70 (347), Este proceso es muy complejo y no totalmente conocido, dado que se conocen 6 sitios de fosforilación en humanos que regulan su función y al menos 2 de ellos dependen directamente de TORC1 (347). Se ha demostrado que el bloqueo de mTOR por la rapamicina impide la fosforilación completa de 4E-BP1 (348)

FIGURA 10. Formación del complejo de iniciación de la traducción cuando 4E-BP1 libera eIF4E al hiperfosforilarse



Una vez liberado eIF4E se formará el complejo de iniciación con eIF4G, eIF4B y eIF3 que se unirán a través del primero a la estructura CAP de los mARNs. (346). En esta fase se van a unir el ARN de transferencia (tARN) con el codón de iniciación correcto, la subunidad 40S del ribosoma y los eIFs. Cuando el complejo está constituido se une la subunidad 60S del ribosoma para empezar la traducción. Este inicio de la traducción puede seguir 2 vías diferentes en función de si la estructura del mRNA que interacciona con el complejo es la estructura CAP del ARN o no (349). La estructura CAP constituida por m^7GpppN y está situada en el extremo terminal 5' del mRNA al que se le van a unir los eIFs.

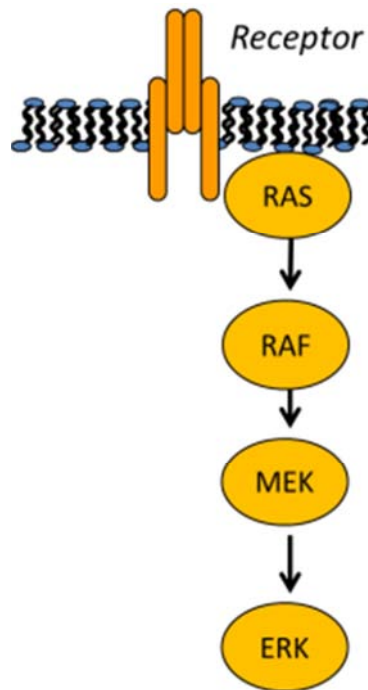
Otras moléculas pueden regular esta fase del inicio de la síntesis proteica así como la función de 4E-BP1 como por ejemplo p53 (350) y otras todavía desconocidas.

3.2.3 Vía Ras/Raf/ERK MAPK

En el estudio de las vías de señalización de las señales mitogénicas hacia el núcleo, esta vía es la primera que se describió (351). La cascada de señales que transmite esta vía interviene en aspectos fundamentales de la célula como la proliferación, diferenciación y supervivencia. Al ser una vía que regula la proliferación celular su alteración se ha descrito en diversos cánceres humanos. Esta vía de señalización es de gran interés ya que varias de las moléculas que la constituyen se encuentran mutadas de forma recurrente en diversos tipos de tumores y además existen tratamientos dirigidos contra ellas (352). Globalmente, las diferentes MAPK se activan de manera similar. Existe una quinasa que las fosforila (MAPKK) y ésta a su vez es fosforilada por otra quinasa (MAPKKK). Existen diversas MAPK siendo las principales ERK1/2, JNK, p38 y ERK5, que intervienen en procesos similares de la célula. La vía mejor caracterizada es la de ERK1/2 ya que es la que se encuentra alterada con mayor frecuencia en cáncer y existe mayor desarrollo de fármacos que la bloquean a distintos niveles.

A parte de las moléculas implicadas directamente en la transducción de la señal intervienen diversas proteínas de tipo “*scaffold*” como KSR1, MP1, beta-arrestina o JIP1 (353). En la regulación de la vía también intervienen diversas fosfatasas llamadas MAPK fosfatasas o MKPs que defosforilan e inactivan las MAPK (354)

FIGURA 11. Representación esquemática de la vía de la ERK MAPK



- Los **adaptadores** son las primeras moléculas a activarse tras la unión de un ligando (factor de crecimiento) al receptor tirosina quinasa de la membrana e iniciarse la cascada de señalización. Esta activación promueve la unión de proteínas como Grb2 y SOS a la membrana celular, acercando esta última a RAS. SOS favorece la unión de GTP con RAS activándolo (355).
- **RAS** es un miembro de la familia de proteínas unidas a GTP o proteínas G y que actúan como interruptores moleculares. Se conocen tres miembros de la familia RAS: Harvey-RAS (H-RAS), Kirsten-RAS (K-RAS) y Neuroblastoma-RAS (N-RAS) (356). La mutación de RAS se ha descrito en aproximadamente una tercera parte de tumores humanos, convirtiendo esta proteína en uno de los oncogenes más potentes (351). RAS es una proteína que se encuentra unida a la membrana citoplasmática, que tras la unión con SOS y el intercambio de GDP, sufre un cambio conformacional que permite la unión con sus efectores,

principalmente RAF. Se encuentra mutado en múltiples tumores siendo el resultado la activación constitutiva de la molécula existiendo un cambio conformacional que impide que pueda defosforilarse y por tanto ser inactivada. Se ha descrito mutada en múltiples tumores entre los que destacan los carcinomas pancreáticos, colon, pulmón y mama (357).

- **RAF** es una serina-treonina proteína quinasa representando en esta vía la MAPKKK y por tanto el primer miembro del módulo central de la vía. Se conocen 3 tipos: RAF-1, A-RAF y B-RAF, de la cual se conocen múltiples isoformas (358). Se ha demostrado mediante estudios experimentales que RAF juega un papel importante en el desarrollo tisular y alguno de los miembros de esta familia como B-RAF es encuentra mutado en algunos tumores humanos, destacando el carcinoma folicular de tiroides (359) y melanomas (360) y más recientemente algunos tumores hematológicos como las tricoleucemias (361). Resulta interesante la diferente afinidad entre los distintos miembros de la familia RAS y de la familia RAF, pudiendo condicionar el tipo de respuesta.
- El segundo miembro del módulo central de la vía es **MEK**. Es una quinasa de la MAPK (MAPKK) que es activada cuando RAF la fosforila. Existen 2 formas que comparten el 80% de la secuencia: MEK1 y MEK2. Cada una de ellas es activada de manera diferencial por los diversos miembros de RAF: B-RAF activa MEK1, RAF-1 activa ambas formas y A-RAF tiene escasa actividad activadora de MEK. Se ha relacionado con procesos de angiogénesis durante el desarrollo y se ha demostrado su activación de diversos tumores humanos (362).
- El centro de esta vía lo ocupa la quinasa regulada por señales extracelulares o **ERK** (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) (363) . Es una MAPK de la que se conocen 2 formas: ERK1 y ERK2. Son serina-treonina quinasas de 44 y 42

kD respectivamente y con secuencias idénticas en el 90%. Se expresan de forma normal en todos los tejidos de los mamíferos, con predominio de ERK2 sobre ERK1 (351). La activación de ambas proteínas es por fosforilación en Thr185 y Tyr187, siendo necesaria la fosforilación de ambos sitios para que su activación sea significativa. Por otro lado, el control de estas moléculas está realizado por fosfatasas específicas para ambos sitios de fosforilación, llamadas DSP o MKP. Las ERK son quinasas dirigidas por prolina, que fosforilan residuos de serina o treonina cercanos a prolinas. Su activación regula las vías relacionadas con las señales de crecimiento en el citoplasma y cuando se trasloca al núcleo fosforila diversos factores de transcripción que regulan la expresión génica (363). Dentro de las dianas de ERK en el citoplasma se encuentra SOS ejerciendo de este modo un feed-back negativo sobre la vía, ya que la fosforilación de SOS por ERK, lo separa de la membrana y por tanto lo aleja de RAS (364). En este mismo sentido, también ejerce un autocontrol fosforilando las MPK.

- Dos proteínas reguladas directamente por ERK son **MNK1 y 2**. Son serina-treonina proteína-quinasas que se encuentran en el citoplasma. Estas proteínas activan el factor de iniciación de la traducción de proteínas eIF4E mediante su fosforilación en la posición Ser209 (365). Las ERK también pueden regular la traducción de proteínas mediante la fosforilación de las quinasas de la proteína ribosomal S6 (RSK). Se trata de una familia de serina-treonina quinasas de 90kD que se activan en respuesta a estímulos mitogénicos y que tienen en común la presencia de varios dominios catalíticos dispuestos en tándem que se activan de manera secuencial por fosforilación. Las RSK regulan la transcripción mediando la translocación al núcleo de diversos factores de transcripción como el protooncogen c-fos. Por otro lado, las ERK también

ejercen su función en el núcleo al traslocarse al mismo, induciendo la expresión de ciertos genes (366). En el núcleo pueden fosforilar unas proteínas con estructura similar a las RSK, llamadas quinasas activadas por estrés y mitógenos (MSK), que también se poseen varios puntos de fosforilación en tándem y de activan de manera secuencial. Pueden ser activadas tanto por ERK como por la MAPK p38 (367). Otros sustratos de las ERK son los factores del complejo ternario o TCF, entre los que cabe destacar Elk-1, Sap1, Sap2, otros miembros de la familia de factores de transcripción Ets, así como Myc. Finalmente, la activación de las ERK está relacionada con la biosíntesis de proteínas, actuando directamente sobre los ribosomas. ERK puede fosforilar el factor de transcripción específico de la ARN polimerasa-III (TFIIIB), induciendo la síntesis de tARN y de la proteína ribosómica 5S.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Justificación del trabajo

Los carcinomas de ovario y de endometrio, como los de otras localizaciones, muestran multitud de alteraciones genéticas y gran heterogeneidad tumoral, Además, la redundancia de moléculas y de vías de señalización dificultan la comprensión de los mecanismos oncogénicos implicados y el diseño de estrategias terapéuticas dirigidas al bloqueo de las mismas, dada la aparición de mecanismos compensadores por parte de las células. A pesar de los grandes avances en el conocimiento de las alteraciones genéticas y de los mecanismos de regulación de la expresión molecular, el número de dianas terapéuticas eficaces en estos tumores sigue siendo limitado.

Por todo ello, pensamos que el estudio funcional de las vías que transmiten la señal oncogénica desde la membrana celular al núcleo y que finalmente implica la traducción de unas proteínas en los ribosomas producto de la expresión de los genes activados, es importante para la comprensión de los mecanismos que subyacen en el proceso de carcinogénesis y de la historia natural del tumor. Además, aportaría información útil para establecer estrategias terapéuticas dirigidas al bloqueo de las mismas. Dada la redundancia de vías de señalización y las múltiples interacciones entre ellas, es de interés estudiar la expresión de factores representativos de las mismas, que puedan ser indicativos de la activación funcional de la célula tumoral, independientemente de cual sea el origen de la señal oncogénica que reciba la célula.

Por todo lo anterior, planteamos la siguiente hipótesis:

Hipótesis

Dada la complejidad de alteraciones implicadas en el proceso de carcinogénesis de los tumores de ovario y endometrio, con presencia de alteraciones en moléculas implicadas en las vías de transducción de la señal, nos planteamos estudiar estas rutas a nivel proteómico en estos tumores, para valorar su papel en la determinación de su comportamiento biológico y correlación con parámetros clínico-patológicos.

La hipótesis central del trabajo es que esta complejidad y redundancia de moléculas y vías de señalización implica que escasos factores sean los efectores finales de las mismas, y que en ellos converjan las señales proliferativas. Estos factores serían mecanismos clave en la regulación de la expresión genética resultante del estímulo proliferativo, actuando a nivel nuclear o de la síntesis selectiva de proteínas.

Para la realización de dicha hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos.

Objetivos

Objetivo principal

Estudiar los factores más relevantes conocidos en la actualidad en las vías de señalización celular implicadas en garantizar la señal replicativa de la célula. Estos factores van desde los receptores de los factores de crecimiento a nivel de la membrana celular hasta los que actúan a nivel de la regulación de la síntesis de proteínas en los ribosomas. Este objetivo se centra en el estudio de la expresión de algunos de estos factores y su correlación con las características clínico-patológicas de los tumores, para identificar aquellos que puedan tener un papel central en la regulación de estas vías.

Objetivos específicos

- Estudiar, de forma descriptiva, las características clínico-patológicas de los carcinomas de ovario y de endometrio del Hospital Vall d'Hebron
- Estudiar los factores más representativos de las vías de señalización celular implicadas en la regulación del crecimiento y proliferación celular, incluyendo receptores de factores de crecimiento, moléculas transductoras de la señal y moléculas efectoras.
 - o Estudiar por inmunohistoquímica de la expresión de estos factores en los carcinomas de ovario y de endometrio así como en tejido normal y tumores benignos.
 - o Estudiar la correlación de la expresión de estos marcadores con las características clínico-patológicas de los tumores.
 - o Estudiar la correlación de la expresión de los distintos marcadores para determinar las posibles interacciones entre ellos
 - o Estudiar su papel en la determinación de la supervivencia de las pacientes.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1 CASOS A ESTUDIO

El estudio es de tipo retrospectivo en el que se analizaron casos de carcinomas de ovario y endometrio consecutivos. Se incluyeron todos aquellos casos en los que se pudieron obtener todos los datos descritos a continuación, siendo excluidos el resto.

La serie a estudio está constituida por 129 neoplasias de ovario intervenidas en el Hospital Materno infantil de la Vall d'Hebron desde 1994 a 1998 (TABLA 1). Todos los tumores borderline y malignos siguieron el mismo procedimiento. Las muestras se recibieron en fresco y como estudio intraoperatorio en un plazo de tiempo desde la extracción no superior a los 15 minutos. Tras la apertura de la pieza se procedieron a fijarse en formol por un periodo de 24h. Posteriormente se realizó el tallado siguiendo los protocolos del Servicio en los que se incluyen 5-10 cortes de tumor en función del tamaño, estando representadas la cápsula y las áreas macroscópicamente distintas así como la trompa. El resto de cirugía protocolizada también fue incluida para la correcta estadificación. En el caso de los cistadenomas se recibieron fijados en formol en la mayor parte de casos. El material fue incluido en parafina y se realizó tinción de hematoxilina-eosina y las técnicas inmunohistoquímicas necesarias para el diagnóstico si el caso lo requería.

Fueron diagnosticados según la clasificación de las OMS (ver CUADRO 1) y estadificados por el sistema de la FIGO (ver CUADRO 3). El grado histológico se valoró según las recomendaciones de la OMS que se basa en el de la FIGO. Los carcinomas mucinosos y los endometrioides se valoraron en 3 grados y los serosos en alto y bajo grado. Los carcinomas de células claras se consideraron todos grado 3.

TABLA 1. Muestras del estudio de carcinomas de ovario

	Núm casos
Tumores benignos	27
Tumores borderline	27
Carcinomas	75
Total	129

También se estudió una serie de carcinomas de endometrio, así como endometrios funcionales y con hiperplasia endometrial. La serie incluía en total 138 casos recibidos en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron entre los años 1995 y 2000 (TABLA 2).

TABLA 2. Muestras del estudio de carcinoma de endometrio

	Núm casos
Endometrios funcionales y atróficos	15
Hiperplasias	3
Carcinomas	120
Total	138

Los carcinomas, como con los ovarios, se recibieron en fresco en el Servicio de Anatomía patológica y tras la apertura del útero se dejaron fijar 24h. Se realizó el tallado de las piezas incluyendo las muestras protocolizadas en el Servicio que incluyen al menos 3 bloques de tumor con representación de la zona de máxima infiltración, orificio cervical interno, orificio cervical externo, anejos uterinos y cualquier otra lesión macroscópica de interés. Las muestras de endometrio funcional e hiperplasias procedieron de aspirados endometriales recibidos fijados en formol.

De todos los casos se recogieron datos de seguimiento de las historias clínicas hasta el año 2004 y las variables enumeradas a continuación fueron incluidas en una base de datos Microsoft Access 2000®:

1. Número de historia clínica
2. Número de biopsia
3. Edad de la paciente en el momento del diagnóstico
4. Fecha de cirugía
5. Presencia de recidivas y fecha de su diagnóstico
6. Muerte por enfermedad y fecha
7. Fecha del último control en el caso de ausencia de enfermedad neoplásica
8. Estadio FIGO
9. Tipo histológico del tumor
10. Grado histológico
11. El % de invasión miometrial en los carcinomas de endometrio

2 CONSTRUCCIÓN DE LAS MATRICES DE TEJIDOS ("TISSUE MICROARRAYS" (TMA))

De los bloques de parafina de los distintos casos se escogió el más representativo y de las zonas mejor conservadas y alejadas de las áreas de necrosis, se seleccionaron tres puntos de donde se realizó una punción de la que extrajo un cilindro de tejido. La aguja utilizada para la punción fue de 2mm de diámetro y se realizaron 3 punciones por caso.

Con los cilindros obtenidos se incluyeron en un bloque de parafina en blanco, construyéndose así, una matriz de muestras de los diferentes bloques de parafina. Cada TMA incluía un número variable de casos que oscilaba entre 10 y 20. En una tabla se recogió la identificación del caso al que correspondía cada cilindro de tejido según la posición en el TMA. Asimismo, se dejaron espacios en blanco para permitir orientar el TMA correctamente e identificar cada caso.

3 TINCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS

De los bloques de TMA se realizaron cortes de 5 micras para la realización de las tinciones inmunohistoquímicas, en portas tratados con poli-L-lisina.

Las técnicas inmunohistoquímicas realizadas para el estudio de cáncer de ovario fueron para HER2, EGFR y para las formas fosforiladas de AKT, ERK MAPK, 4E-BP1, p70S6K y la proteína ribosómica S6.

Para el estudio de cáncer de endometrio se realizaron técnicas inmunohistoquímicas para HER2, EGFR y para las formas fosforiladas de AKT, ERK MAPK y 4E-BP1.

Simultáneamente, en ambos estudios también se realizaron las mismas técnicas sobre cortes completos de tumor para confirmar que el resultado obtenido en los TMAs era concordante con el obtenido en el corte entero.

Los anticuerpos primarios y características principales de los protocolos usados fueron los siguientes:

Anticuerpo: EGFR

Casa comercial: Dako

Código: K1494

Dilución: 1/100

Desenmascaramiento antigénico: proteinasa K

Tiempo de incubación: 30 min.

Anticuerpo: HER2

Casa comercial: Dako Código: K5209

Dilución: 1/20

Desenmascaramiento antigénico: olla a presión 5min con citrato 10 mM, pH6

Tiempo de incubación: 30 min.

Anticuerpo: p-ERK

Sitio de fosforilación: Thr 202/ Tyr 204

Casa comercial: Cell signaling Código: 9101

Dilución: 1/50

Desenmascaramiento antigénico: olla a presión 5min con citrato 10 mM, pH6

Tiempo de incubación: 120 min.

Anticuerpo: p-AKT

Sitio de fosforilación: Ser 473

Casa comercial: Cell signaling Código: 9277

Dilución: 1/50

Desenmascaramiento antigénico: olla a presión 5min con citrato 10 mM, pH6

Tiempo de incubación: 120 min.

Anticuerpo: p-4EBP1

Sitio de fosforilación: Thr 70

Casa comercial: Cell signaling Código: 9455

Dilución: 1/100

Desenmascaramiento antigénico: olla a presión 5min con citrato 10 mM, pH6

Tiempo de incubación: 60 min.

Anticuerpo: p-p70S6K

Sitio de fosforilación: Thr 389

Casa comercial: Cell signaling Código: 9205

Dilución: 1/100

Desenmascaramiento antigénico: olla a presión 5min con citrato 10 mM, pH6

Tiempo de incubación: 120 min.

Anticuerpo: p-S6

Sitio de fosforilación: Ser 240/ 244

Casa comercial: Cell signaling Código: 2215

Dilución: 1/50

Desenmascaramiento antigénico: olla a presión 5min con citrato 10 mM, pH6

Tiempo de incubación: 60 min.

El procedimiento de la técnica fue el siguiente y fue realizada de forma automatizada en el teñidor Autostainer de Dako:

- Desparafinado en xilol (2 x 5 min)

- Rehidratación en soluciones decrecientes de etanol (2 x 5 min en 100%, 95%, 60% y agua destilada)
- Bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno 10% en metanol, 20 min
- Desenmascaramiento antigénico (especificado para cada anticuerpo)
- Incubación con el anticuerpo primario (dilución y tiempos especificados para cada anticuerpo)
- Detección mediante el sistema EnVision+ de Dako, según las indicaciones del producto.
- Contraintinción con hematoxilina 5 min
- Deshidratación con soluciones crecientes de etanol
- Montado con DPX

Valoración de la inmunotinción:

Los anticuerpos con positividad de membrana se valoraron en 3 grados, con los siguientes criterios:

Negativo: ausencia de tinción

1+: positividad débil de membrana e incompleta

2+: positividad moderada y completa de toda la membrana

3+: positividad intensa y completa de la membrana

Los anticuerpos con tinción citoplasmática se valoraron de forma semicuantitativa en 3 grados:

- Negativos: ausencia de tinción

- 1+: positividad débil y focal
- 2+: positividad moderada en la mayoría de células
- 3+: positividad intensa en la mayoría de células

Los anticuerpos con tinción nuclear se cuantificaron por el porcentaje de células positivas y su intensidad de forma semicuantitativa. Posteriormente, se realizó el Histscore (Hscore) como se describió para valorar los receptores hormonales en el cáncer de mama (368). Se calcula la positividad mediante la siguiente fórmula: (% células débiles x 1) + (% células moderadas x 2) + (% células intensas x 3). De esta forma se obtienen valores comprendidos entre 0 y 300.

Los anticuerpos que presentaron más de un patrón de tinción, se valoró cada patrón por separado según los criterios arriba mencionados y se registraron en la base de datos como valores independientes.

4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron exportados desde la base de datos al programa SPSS versión 17.0 (PASW17) donde fueron analizados.

Para el estudio de la relación entre las variables cualitativas por las diferencias observadas en cada categoría se usó la prueba de Chi-cuadrado de Pearson (χ^2), con un nivel de significación bilateral de $p < 0.05$. Sólo se consideró el resultado como valorable en aquellos casos en los que las frecuencias esperadas en cada categoría eran superiores a 5. En aquellos casos en los que se valoraban variables con dos categorías (tablas de

contingencia de 2 x 2) se aplicó la corrección de Yates (corrección por continuidad). Para su representación gráfica se usaron diagramas de barras.

Para las variables cuantitativas se usaron las pruebas no paramétricas de U de Mann-Whitney cuando se valoraban 2 muestras independientes y la H de Kruskal-Wallis cuando eran más de 2 muestras independientes. Para la representación gráfica de las diferencias observadas en cada grupo se usaron diagramas de cajas.

El análisis de la supervivencia se hizo mediante el método de Kaplan-Meier usando el Log rank para analizar las diferencias entre los diferentes grupos. El análisis multivariado de la supervivencia se hizo con aquellas variables que resultaron estadísticamente significativas en el estudio univariado, utilizando el método de regresión de Cox para el estudio de riesgos proporcionales.

IV. RESULTADOS

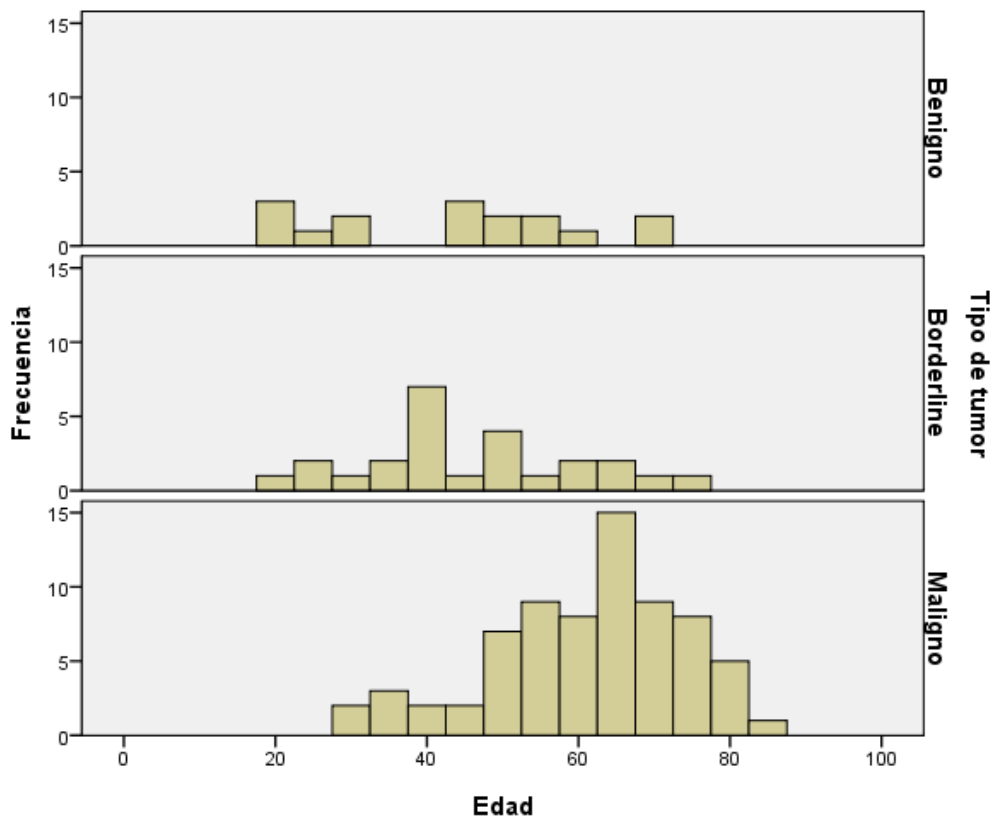
1 RESULTADOS EN TUMORES DE OVARIO

1.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

1.1.1 Edad

En la serie estudiada había un predominio de mujeres postmenopáusicas. Las edades de las pacientes estaban comprendidas entre 20 y 87 años, con una media de 55.18 años, la distribución de las cuales puede observarse en la FIGURA 12. Esta media variaba según se tratara de tumores benignos (media de 43.31 años), borderline (media de 45.96 años) o malignos (media de 61.10 años).

FIGURA 12. Histograma y curva normal representativa de la frecuencia de tumores de ovario por edades y tipo de tumor.



1.1.2 Tipo histológico

La serie constaba de 27 (21%) tumores benignos, 27 (21%) tumores borderline y 75 (58%) tumores malignos. Distribuidos por tipos histológicos como se muestra en la TABLA 3.

TABLA 3. Frecuencia de tipos histológicos

Tipo histológico		n	%
Tumores benignos	Cistad seroso	20	15,5
	Cistad mucinoso	7	5,4
Tumores borderline	BL seroso	11	8,5
	BL mucinoso	16	12,4
Carcinomas	Ca seroso	29	22,5
	Ca mucinoso	15	11,6
	Ca endometriode	16	12,4
	Ca células claras	15	11,6
TOTAL		129	100,0

1.1.3 Grado histológico

Dentro de los tumores malignos, 10 casos (13.3%) eran bien diferenciados, 13 (17,3%) moderadamente diferenciados y 52 (69.3%) poco diferenciados. La distribución por tipos histológicos puede observarse en la TABLA 4. Los carcinomas serosos y los de célula clara fueron todos de alto grado y los mucinosos eran mayoritariamente de bajo grado.

TABLA 4. Tabla de contingencia para grado histológico y tipo histológico.

			Grado			Total
			1	2	3	
Tipo histológico	Ca seroso	Núm	0	0	29	29
		%	,0%	,0%	100,0%	100,0%
	Ca mucinoso	Núm	9	5	1	15
		%	60,0%	33,3%	6,7%	100,0%
	Ca endometrioide	Núm	1	8	7	16
		%	6,3%	50,0%	43,8%	100,0%
	Ca cél claras	Núm	0	0	15	15
		%	,0%	,0%	100,0%	100,0%
Total		Núm	10	13	52	75
		%	13,3%	17,3%	69,3%	100,0%

1.1.4 Estadío

De todos los tumores malignos se conocía el estadio quirúrgico según los criterios de la FIGO tras el estudio anatomopatológico del material remitido. La serie estaba constituida por 15 casos en estadio IA, 3 en estadio IB, 1 en estadio IC, 13 en estadio IIA, 3 en estadio IIB, 6 en estadio IIIA, 6 en estadio IIIB, 23 en estadio IIIC y 3 en estadio IV. No había ningún caso en estadio IIC. Dado el bajo número de casos en cada subgrupo, se juntaron los casos de cada grupo para poder realizar la estadística. De este modo, la serie consta de 19 casos en estadio I, 17 casos en estadio II, 35 casos en estadio III y 3 casos en estadio IV. La TABLA 5 muestra la distribución de los diferentes tipos histológicos según los estadios.

TABLA 5. Tabla de contingencia para estadio quirúrgico y tipo histológico.

			Estadio				Total
			I	II	III	IV	
Tipo histológico	Ca seroso	Núm	4	3	18	2	27
		%	14,8%	11,1%	66,7%	7,4%	100,0%
	Ca mucinoso	Núm	10	1	3	0	14
		%	71,4%	7,1%	21,4%	,0%	100,0%
	Ca endometrioide	Núm	7	0	8	0	15
		%	46,7%	,0%	53,3%	,0%	100,0%
	Ca cél claras	Núm	8	0	6	1	15
		%	53,3%	,0%	40,0%	6,7%	100,0%
Total		Núm	29	4	35	3	71
		%	40,8%	5,6%	49,3%	4,2%	100,0%

1.1.5 Evolución

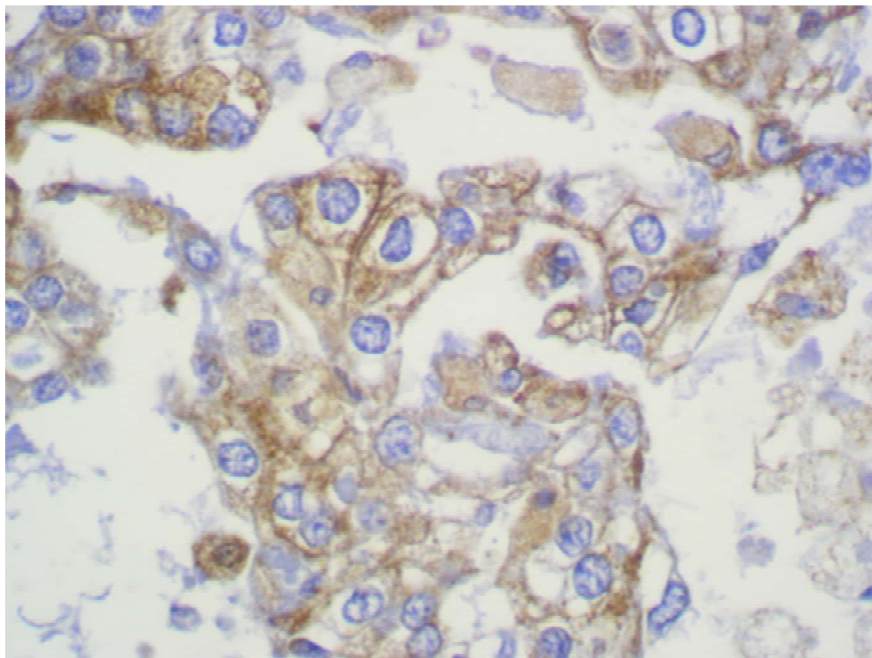
El periodo de seguimiento obtenido fue variable con un rango de 13 a 75 meses (media 40.56 meses). Entre las mujeres con tumores borderline, 1 paciente murió por la enfermedad (3,7%) y 1 (3.7%) presentaba enfermedad activa en el último control. Las 22 restantes (81.5%) no presentaban evidencia de enfermedad. Entre las mujeres con tumores malignos se observaron 23 muertes por enfermedad (32.4%), 14 (18.7%) mujeres vivas con enfermedad activa en el último control y en 34 casos (45.3%) no se evidenció enfermedad.

1.2 RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

1.2.1 HER2

La tinción inmunohistoquímica para HER2 demostró positividad de membrana y en algunos casos, sobre todo los que presentaban mayor intensidad de tinción, también se observaba marcaje granular citoplasmático (FIGURA 13). Los resultados obtenidos según la intensidad de la tinción fueron los siguientes: 38 (29.5) negativos, 31 (24%) intensidad 1, 37 (28.7%) intensidad 2 y 23 (17.8%) intensidad 3. Con fines estadísticos estos resultados se agruparon y se consideraron negativos aquellos con intensidades menores de 3, es decir, 89 casos (79.5%) como negativos y 23 casos (20.5%) como positivos.

FIGURA 13. Expresión de HER2. Positividad de membrana y granular citoplasmática en algunas células.



Todos los tumores benignos y borderline resultaron negativos mientras que 23 carcinomas sobreexpresaron HER2 representando el 32% de los mismos. Estas

diferencias de expresión fueron estadísticamente altamente significativas ($p < 0.001$). En relación al tipo histológico los carcinomas mucinosos fueron los que menos expresaron HER2 que sólo se observó en el 7% y los carcinomas serosos en un 27% de casos. Los carcinomas de células claras fueron positivos en un 46% y los endometrioides en un 54%. Las diferencias de expresión de HER2 observadas entre grados histológicos, que a pesar de observarse un aumento en el número de casos a medida que aumentaba el grado, no fueron estadísticamente significativas. En la TABLA 6 se muestran los valores p que han resultado del test de chi-cuadrado.

TABLA 6. Significación estadística de la expresión de HER2

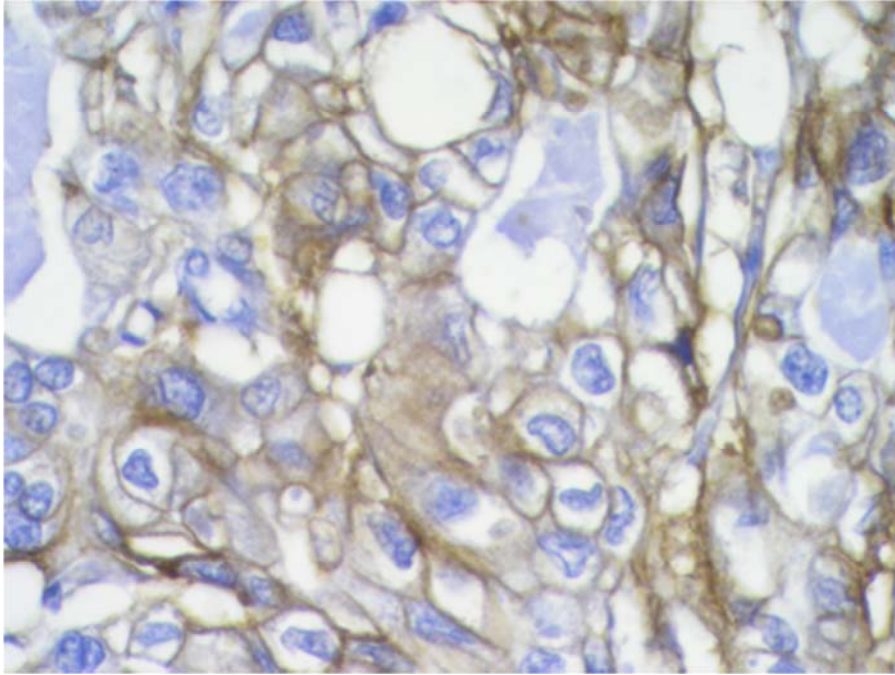
Variable	Significación (χ^2)
Tipo de tumor (benigno, borderline, maligno)	<0.001
Tipo histológico	0.037
Grado de diferenciación	0.208
Estadio FIGO	0.152

1.2.2 EGFR

La expresión inmunohistoquímica para EGFR fue principalmente de membrana (FIGURA 14). Se demostró expresión de la proteína en 56 casos (51.4%), de proporciones similares en tumores benignos (56%), borderline (41%) y malignos (53%). No se observaron diferencias de expresión de EGFR entre los diferentes tipos

histológicos: carcinomas serosos (52%), carcinomas mucinosos (36%), carcinoma endometriode (54%) y carcinomas de células claras (67%).

FIGURA 14. Expresión de membrana de EGFR



El grado histológico no condicionaba la expresión de EGFR aunque los tumores bien diferenciados eran los menos frecuentemente positivos (20%) frente a los grados 2 (64%) y los grados 3 (58%). En relación con el estadio clínico, las diferencias observadas fueron escasas y no significativas. En la TABLA 7 se muestran los valores p que han resultado del test de chi-cuadrado.

TABLA 7. Significación estadística de la expresión de EGFR

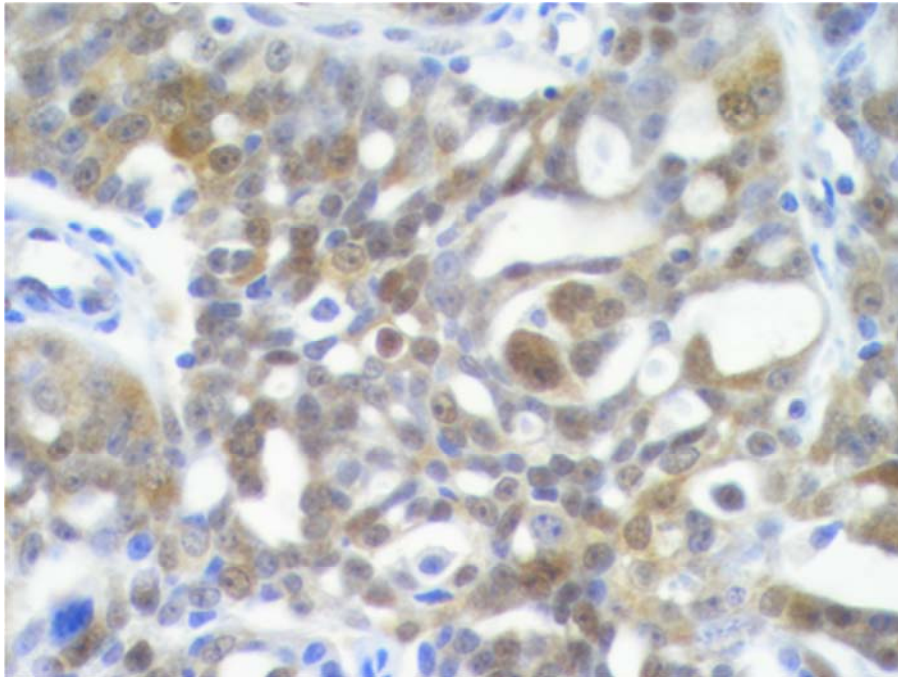
Variable	Significación (χ^2)
Tipo de tumor (benigno, borderline, maligno)	0.536
Tipo histológico	0.414
Grado de diferenciación	0.068
Estadio FIGO	0.212

1.2.3 AKT fosforilado

La expresión de p-AKT pudo observarse tanto en núcleo como en citoplasma (FIGURA 15). Se analizaron ambas localizaciones de forma separada y se analizaron de forma independiente y de forma conjunta. En 22 casos (17%) se observó expresión nuclear y en 56 casos (43.4%) la expresión fue citoplasmática.

La expresión nuclear se observó más frecuentemente en tumores borderline (37%) que en tumores benignos o carcinomas que se expresó en un 12% de casos. En los carcinomas se observó en un 40% de células claras, en un 6.9% de carcinomas serosos y en un 6.3% de carcinomas endometrioides. No se observó en ningún carcinoma mucinoso. Respecto al grado histológico su expresión era creciente en función del mismo, con positivities del 15% en los grados 3, del 7% en los grados 2 y ausente en los grados 1. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas estadísticamente. Respecto a los estadios no se observaron diferencias destacables.

FIGURA 15. Expresión de p-AKT en núcleos y citoplasmas de las células tumorales



La expresión citoplasmática fue más frecuente y fue similar en todos los tipos histológicos (52%-66%) exceptuando los carcinomas mucinosos que fue sensiblemente menor (20%). Con el grado la expresión citoplasmática fue creciente de forma directa con el mismo, con positivities del 56% en los grados 3, del 54% en los grados 2 y del 20% en los grados 1, sin ser estas diferencias significativas. Igual que la expresión nuclear, la citoplasmática no se asociaba al estadio mostrando porcentajes similares en cada uno de ellos.

Si se miraba de forma global, la sobreexpresión de p-AKT fue observada en 61 casos (48%). Los tumores benignos fueron los menos frecuentemente positivos (36%) comparados con los borderline (48%) y los malignos (52%) sin ser estadísticamente significativas las diferencias. Los carcinomas serosos, endometrioides y de células claras mostraron frecuencias de positividad parecidas, observándose expresión en el 52%, 62% y 73%, respectivamente. Los carcinomas mucinosos fueron los menos frecuentemente positivos (20%). Por otro lado, al valorar la relación con el grado de

diferenciación se observó una menor frecuencia de casos positivos entre los carcinomas bien diferenciados (18%) frente a los grados intermedios (54%) y los mal diferenciados (59%). La expresión de p-AKT fue similar en los distintos estadios clínicos. En la TABLA 8 se muestran los valores p que han resultado del test de chi-cuadrado.

TABLA 8. Significación estadística de la expresión de p-AKT global

Variable	Citoplasma Significación (χ^2)	Núcleo Significación (χ^2)	Global Significación (χ^2)
Tipo de tumor	0.126	0.008	0.248
Tipo histológico	0.044	0.002	0.022
Grado histológico	0.113	0.340	0.091
Estadio FIGO	0.458	0.521	0.476

1.2.4 ERK fosforilado

La expresión inmunohistoquímica de p-ERK MAPK fue tanto nuclear como citoplasmática (FIGURA 16). Se valoraron de forma independiente ambas localizaciones y la expresión citoplasmática se observó en un 17% de casos y la nuclear en un 45% de casos. También se analizaron los resultados sin tener en cuenta la localización subcelular del marcador.

Los casos con expresión nuclear se observó en un 66% de carcinomas de células claras, en un 55% de carcinomas serosos, un 20% de carcinomas endometrioides y en un 30% de carcinomas mucinosos. En función del grado, la expresión fue creciente, con mayor frecuencia de positivos en los carcinomas grado 3 (53%), que los grados 2 (31%) o los grados 1 (20%) sin ser estas diferencias estadísticamente significativas. No se observaron diferencias en relación con el estadio clínico.

La expresión citoplasmática fue similar en los carcinomas de células claras y endometrioides (26% y 25%, respectivamente) y menor en los carcinomas serosos (38%), siendo todos los mucinosos negativos. En relación al grado, los grados 3 fueron positivos en un 21%, los grados 2 en un 15% y los grados 1 fueron todos negativos. Estas diferencias no son significativas estadísticamente. Igual que con la expresión nuclear, el estadio mostró frecuencias de expresión similares en cada uno de ellos.

Cuando se miraba la expresión de forma independiente de la localización subcelular, en 76 casos (60.3%) se observaba positividad. Se observó sobreexpresión de p-ERK en tumores benignos (58%), borderline (59%) y carcinomas (61%), en proporciones similares. Los carcinomas de células claras fueron los que expresaron con mayor frecuencia el marcador (87%) seguidos de los carcinomas serosos (65%), carcinomas endometrioides (50%) y carcinomas mucinosos (40%). Respecto al grado de diferenciación la expresión fue creciente en función del mismo, siendo menor en grados 1 (30%), grados 2 (54%) y mayor en los grados 3 (69%). Respecto al estadio, la expresión era mayor en estadios avanzados frente a los iniciales, con expresiones en estadio I del 55%, estadio II del 50%, estadio III, 71% y estadio IV del 100%. En la TABLA 9 se muestran los valores p que han resultado del test de chi-cuadrado.

FIGURA 16. Positividad heterogénea de p-ERK tanto nuclear como citoplasmática

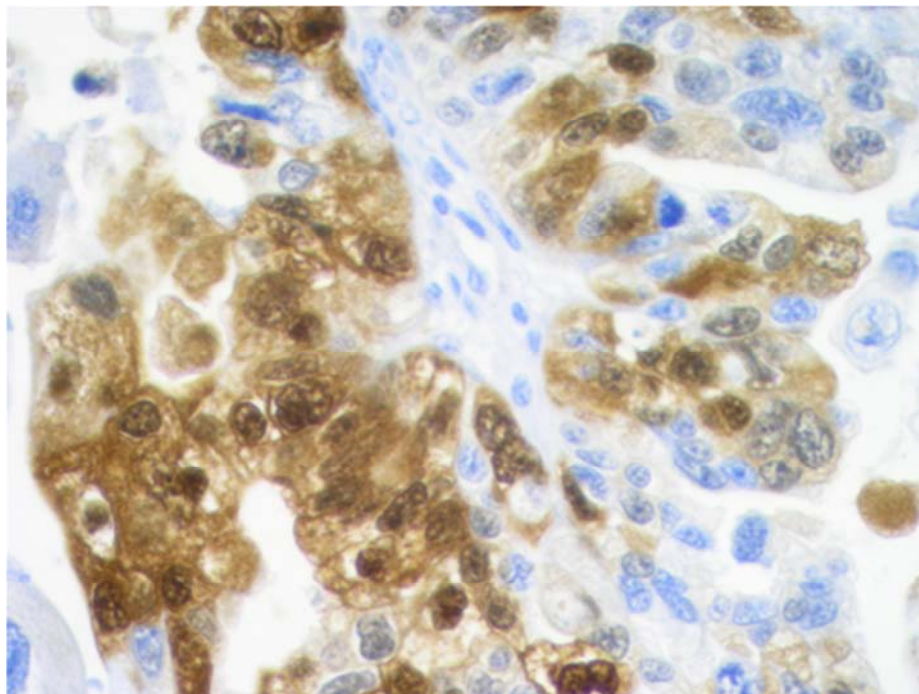


TABLA 9. Significación estadística de la expresión de p-ERK

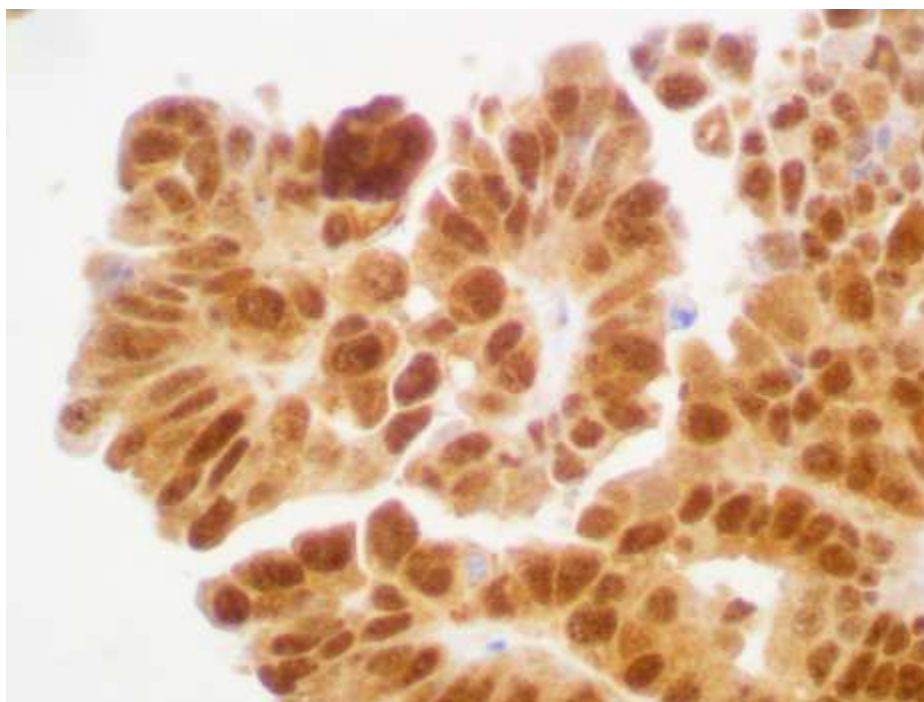
Variable	Citoplasma Significación (χ^2)	Núcleo Significación (χ^2)	Global Significación (χ^2)
Tipo de tumor	0.765	0.108	0.691
Tipo histológico	0.194	0.029	0.046
Grado histológico	0.264	0.065	0.055
Estadio FIGO	0.641	0.668	0.166

1.2.5 4E-BP1 fosforilado

La expresión de p-4EBP1 fue nuclear en 76 casos (66.6%) y granular citoplasmática en 18 casos (14%). Se observaron dos patrones de tinción nuclear: uno homogéneo, fino y débil, y otro más intenso y grosero. Este último, iba acompañado de positividad citoplasmática en algunos casos (FIGURA 17), es decir, todos los casos con tinción en citoplasma también presentaban tinción nuclear intensa. El primer tipo de positividad nuclear, se consideró negativa ya que también se observaba en tejidos normales como la piel o el epitelio de superficie ovárico normal por lo que se consideró una expresión basal de la proteína. La expresión moderada o intensa fue la única que se consideró como positiva. Según estos criterios se observó positividad en 53 casos (41.7%).

Se observaron diferencias significativas entre los tumores benignos, borderline y malignos ($p = 0.001$). Los tumores malignos eran positivos en un 60% de casos y los benignos (33%) y los tumores borderline (28%) lo eran en proporciones similares. Las diferencias observadas entre los distintos tipos histológicos fueron únicamente significativas para los carcinomas mucinosos que eran los menos frecuentemente positivos (14%) y los carcinomas de células claras que fueron los más positivos (85%). Los carcinomas serosos lo fueron en un 69% y los endometrioides en un 64%. Respecto al grado, la expresión era claramente creciente en función del grado de diferenciación: tumores grado 1 positivos en el 10%, grado 2 en el 39% y grado 3 en el 78%, siendo estas diferencias altamente significativas. Respecto al estadio la frecuencia de positivos era para estadios I del 46%, estadios II del 75%, estadios III del 73% y estadio IV del 33%. En la TABLA 10 se muestran los valores p que han resultado del test de chi-cuadrado para la expresión nuclear.

FIGURA 17. Positividad nuclear intensa y citoplasmática en un carcinoma seroso



La expresión citoplasmática sólo fue observada en tumores malignos y en casos con elevada expresión nuclear y estaba presente en el 24% de los mismos. En relación a los tipos histológicos, La frecuencias de positividad citoplasmática fue similar con porcentajes que oscilaron entre el 26% y el 31% excepto los carcinomas mucinosos que lo fueron solo en el 7% de casos. Respecto al grado, la expresión fue mayor en grados 3 (29%) que en grados 2 (23%) siendo los grados 1 todos negativos. Los diferentes estadios clínicos mostraron frecuencias similares de positividad. Estadísticamente las diferencias observadas con las diferentes variables no fueron significativas estadísticamente.

TABLA 10. Significación estadística de la expresión citoplasmática y nuclear de p-4E-BP1

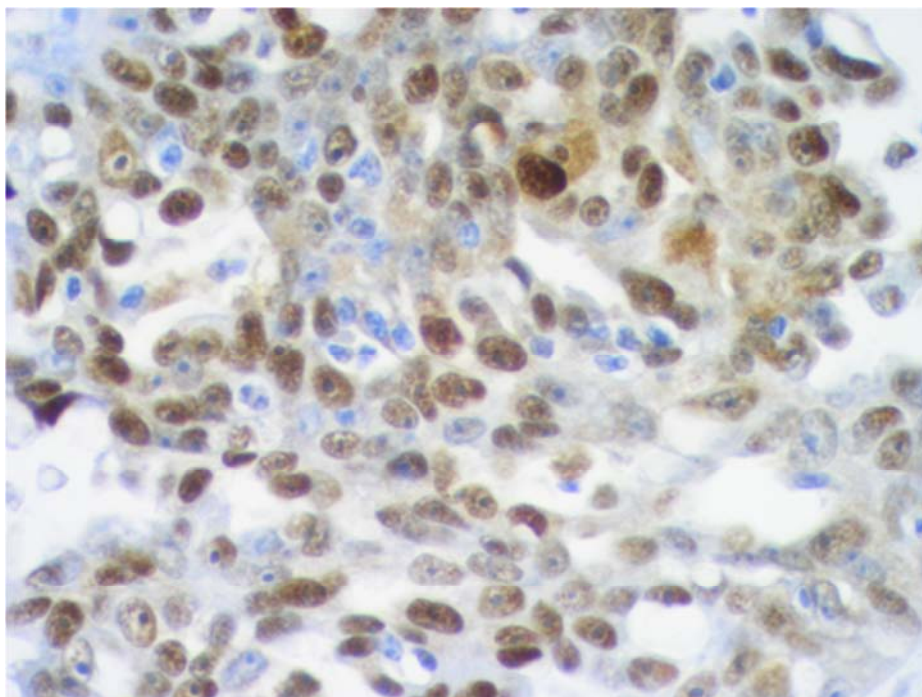
Variable	Citoplasma Significación (χ^2)	Núcleo Significación (χ^2)
Tipo de tumor	0.001	0.009
Tipo histológico	0.363	0.001
Grado histológico	0.147	<0.001
Estadio FIGO	0.082	1.130

1.2.6 p70S6K fosforilada

La expresión inmunohistoquímica para p-p70S6K fue predominantemente nuclear en 34 casos (26.4%) aunque en 14 casos (30.2%) también se observó positividad granular citoplasmática (FIGURA 18). Todos los casos con expresión citoplasmática también presentaban positividad nuclear.

Fueron positivos fundamentalmente los carcinomas malignos (40%) y los escasos tumores borderline (16%) y benignos (12%). Los resultados por tipos histológicos fueron los siguientes: carcinomas serosos 63%, carcinomas mucinosos 14%, carcinomas endometrioides 47%, carcinomas de células claras 60%. Respecto al grado de diferenciación los grados 3 fueron los más frecuentemente positivos (48%) frente a los grado 1 (20%) y los grados 2 (23%). Los estadios no mostraron relación con la expresión del marcador. En la TABLA 11 se muestran los valores p que han resultado del test de chi-cuadrado respecto a la positividad nuclear.

FIGURA 18. Positividad predominantemente nuclear de p-p70S6K



La positividad citoplasmática sólo fue observada en los tumores malignos y en un 23% de casos. Mostró escasas diferencias entre tipos histológicos con sobreexpresión en los carcinomas endometrioides del 37%, los carcinomas serosos del 24%, los células claras del 20% y los mucinosos del 7%. En relación al grado se observó tinción en el 10% de grados 3, el 31% de grados 2 y el 23% de grados 1. El estadio no mostró diferencias destacables. Ninguna de estas variables fue estadísticamente significativa en relación a la expresión de p70S6K fosforilada.

TABLA 11. Significación estadística de la expresión de p-p70S6K

Variable	Citoplasma Significación (χ^2)	Núcleo Significación (χ^2)
Tipo de tumor	0.001	0.022
Tipo histológico	0.231	0.080
Grado histológico	0.495	0.106
Estadio FIGO	0.387	0.843

1.2.7 Proteína S6 fosforilada

La expresión de la proteína ribosómica p-S6 fue exclusivamente citoplasmática (FIGURA 19) y solamente fue observada en 29 casos (15.5%) y con intensidades globalmente débiles pero superiores a las células no tumorales acompañantes. Su expresión se observó fundamentalmente en tumores malignos (29%) siendo del 6% en los benignos y del 5% en los borderline. Los tipos histológicos no mostraron diferencias con porcentajes de positividad que oscilaron entre el 23% y el 35%. Al valorar los grados de diferenciación se observó mayor frecuencia de positivos en los carcinomas de grado 2 (45%) siendo menor en grados 3 (26%) y grados 1 (22%). Igualmente, el estadio no mostró diferencias respecto a la expresión de p-S6 que osciló entre 30% y 33%. En la TABLA 12 se muestran los valores p que han resultado del test de chi-cuadrado.

FIGURA 19. Positividad citoplasmática débil de p-S6

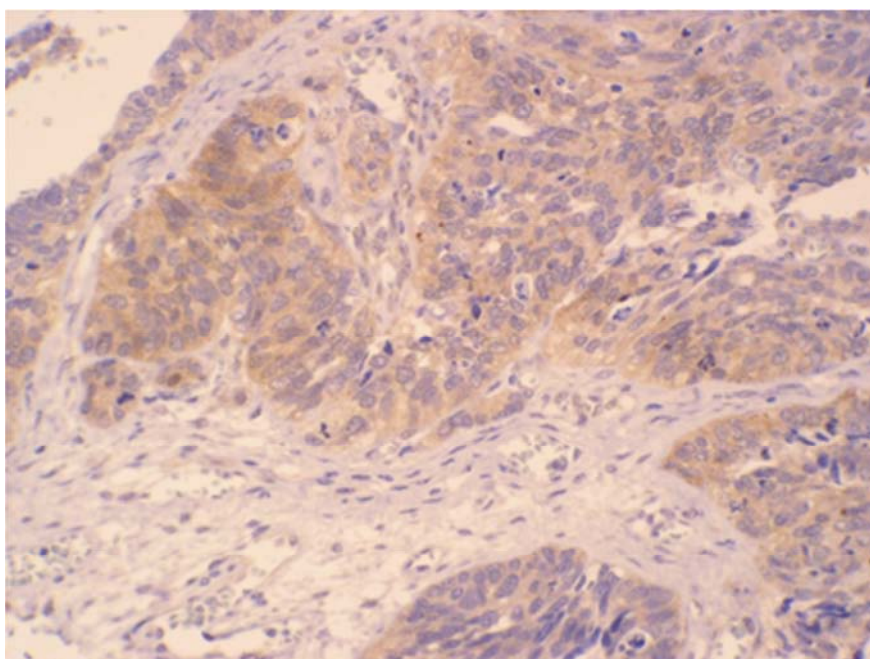


TABLA 12. Significación estadística de la expresión de p-S6

Variable	Significación (χ^2)
Tipo de tumor (benigno, borderline, maligno)	0.018
Tipo histológico	0.841
Grado de diferenciación	0.405
Estadio FIGO	0.834

1.3 ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS

1.3.1 Relación de la expresión de los receptores

En el 33% de los carcinomas se observó coexpresión de HER2 y EGFR, y en un 43% ambos fueron negativos. El tipo histológico que con mayor frecuencia mostraba

coexpresión fueron los carcinomas de células claras con un 40% de casos positivos para ambos mientras que los que fueron dobles negativos con mayor frecuencia fueron los carcinomas mucinosos, que lo fueron en un 66% de casos. En relación con el grado ninguno de los dobles positivos fue grado 1 mientras que el 77% de los mismos fue grado 3. No se observaron diferencias en relación con el estadio.

1.3.2 p-AKT en relación a los receptores

La expresión de p-AKT se observó con mayor frecuencia en los casos en que se evidenciaba aumento de la expresión de HER2 y menor en los casos HER2 negativos aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. La TABLA 13 muestra dichas diferencias. La expresión de p-AKT era parecida cuando la vía se activaba por EGFR pero las diferencias observadas están al límite de la significación estadística. Por otro lado, no se observó variación la frecuencia de positividad de p-AKT en los casos en los que no había sobreexpresión de receptores, tanto HER2 como EGFR.

TABLA 13. Tabla de contingencia para expresión de p-AKT y de HER2.

			p-AKT		Total
			Neg	Pos	
HER2	Neg	Núm	60	46	106
		%	56,6%	43,4%	100,0%
	Pos	Núm	8	15	23
		%	34,8%	65,2%	100,0%
Total	Núm	68	61	129	
	%	52,7%	47,3%	100,0%	

P=0.057

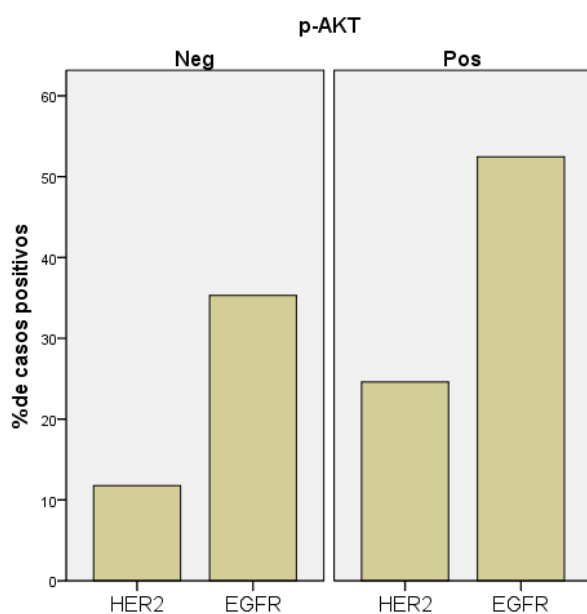
TABLA 14. Tabla de contingencia para expresión de p-AKT y de EGFR

			p-AKT		Total
			Neg	Pos	
EGFR	Neg	Núm	44	29	73
		%	60,3%	39,7%	100,0%
	Pos	Núm	24	32	56
		%	42,9%	57,1%	100,0%
Total		Núm	68	61	129
		%	52,7%	47,3%	100,0%

P=0.050

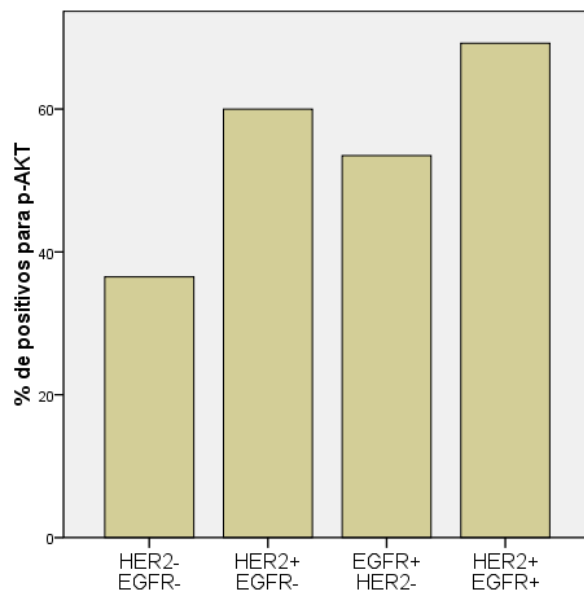
Si se valoraba la expresión de p-AKT en función del receptor expresado, obteníamos un gráfico como el de la FIGURA 20 en el que tanto los casos positivos como negativos para p-AKT mantenían la proporción de casos positivos para HER2 y EGFR.

FIGURA 20. Proporción de casos HER2 y EGFR positivos en función de la expresión de p-AKT



En la FIGURA 21 se ilustra el porcentaje de casos positivos para p-AKT en función de la expresión combinada de ambos receptores, mostrando como los casos con doble positividad de receptores son los que con más frecuencia tienen activación de AKT.

FIGURA 21. Proporción de casos p-AKT positivos en función de la coexpresión de HER2 y EGFR



1.3.3 p-ERK en relación a los receptores

Los casos con expresión aumentada de HER2 no mostraron diferencias significativas en la expresión de p-ERK respecto a los HER2 negativos ($p = 0.350$). En la TABLA 15 se ilustran estas diferencias. Con EFGR los resultados fueron similares pero con mayor diferencia entre categorías por lo que los resultados fueron significativos (TABLA 16). Es decir, la mayoría de casos EGFR positivos tienen activación de p-ERK.

TABLA 15 . Tabla de contingencia para expresión de p-ERK y HER2.

			p-ERK		Total
			Neg	Pos	
HER2	Neg	Núm	46	60	106
		%	43,4%	56,6%	100,0%
	Pos	Núm	7	16	23
		%	30,4%	69,6%	100,0%
Total	Núm		53	76	129
	%		41,1%	58,9%	100,0%

P=0.350

TABLA 16. Tabla de contingencia para expresión de p-ERK y EGFR.

			p-ERK		Total
			Neg	Pos	
EGFR	Neg	Núm	36	37	73
		%	49,3%	50,7%	100,0%
	Pos	Núm	17	39	56
		%	30,4%	69,6%	100,0%
Total	Núm		53	76	129
	%		41,1%	58,9%	100,0%

P=0.032

En la FIGURA 22 puede observarse la frecuencia de expresión de p-ERK en función de la expresión de los receptores de membrana. En la FIGURA 23 pueden observarse el porcentaje de casos positivos para p-ERK en función de si uno o los dos receptores estaban sobreexpresados inmunohistoquímicamente.

FIGURA 22. Diagrama de barras que muestra las diferencias de expresión los receptores HER y EGFR en relación a la activación de ERK.

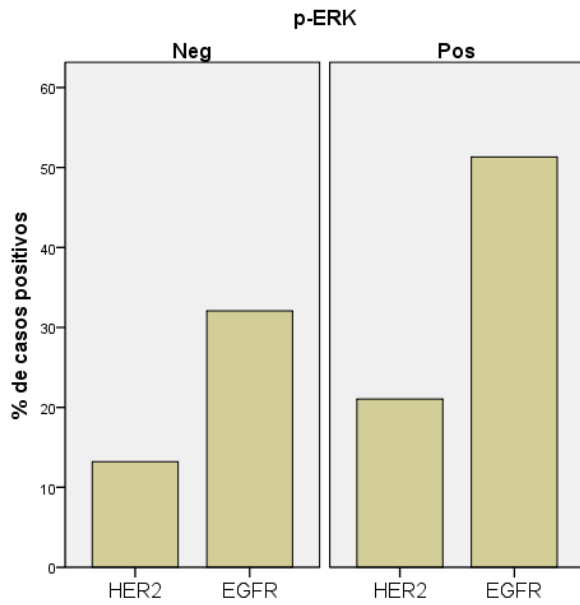
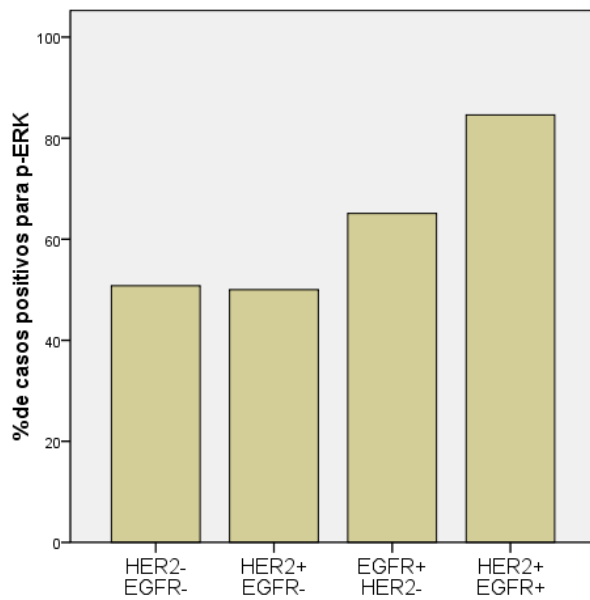


FIGURA 23. Proporción de casos p-ERK positivos en función de la coexpresión de HER2 y EGFR



1.3.4 p-4E-BP1 en relación a la expresión de p-AKT y p-ERK

La expresión de p-4E-BP1 se observó aumentada en aquellos casos en los que existía aumento de p-AKT de manera significativa ($p = 0.002$). De igual manera estas diferencias también fueron observadas con la expresión de p-ERK ($p = 0.002$). Para estas valoraciones y dado que interesaba valorar la variación en el nivel de expresión de la molécula en función de si la vía estaba activada o no, se valoró con el Hscore y como variable continua. En la FIGURA 24 y en la FIGURA 25 se muestran estas diferencias, respectivamente. La FIGURA 26 muestra las variaciones en la expresión de p-4EBP1 en relación a la ausencia de expresión de p-AKT y p-ERK, a la expresión de una de las dos proteínas o a la coexpresión de ambas. La expresión máxima de p-4E-BP1 se produce cuando ambas vías están activadas y la mínima expresión cuando están desactivadas. Cuando sólo una de las vías está activada la expresión es intermedia. Estas diferencias observadas fueron altamente significativas ($p < 0.0001$).

FIGURA 24. Diagrama de cajas que muestra las diferencias de expresión de p-4E-BP1 en relación a la positividad de p-AKT.

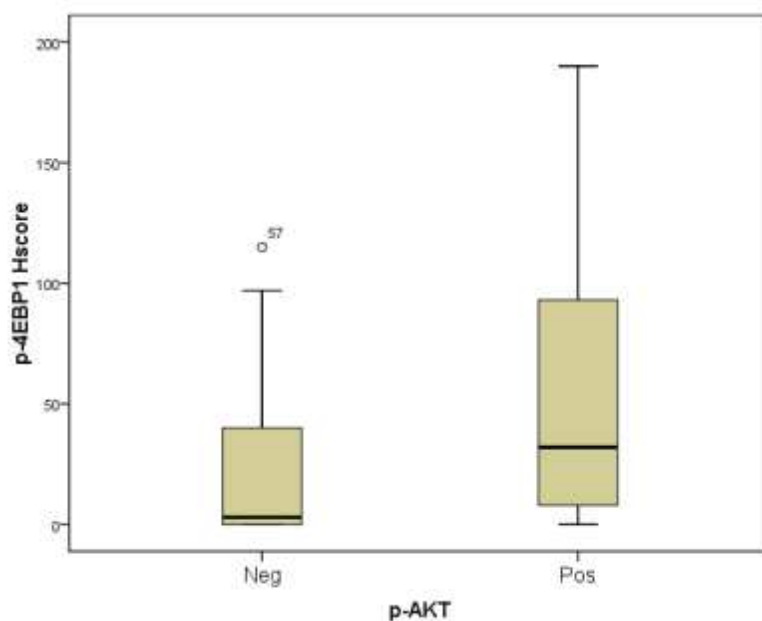


FIGURA 25. Diagrama de cajas que muestra las diferencias de expresión de p-4E-BP1 en relación a la positividad de p-ERK.

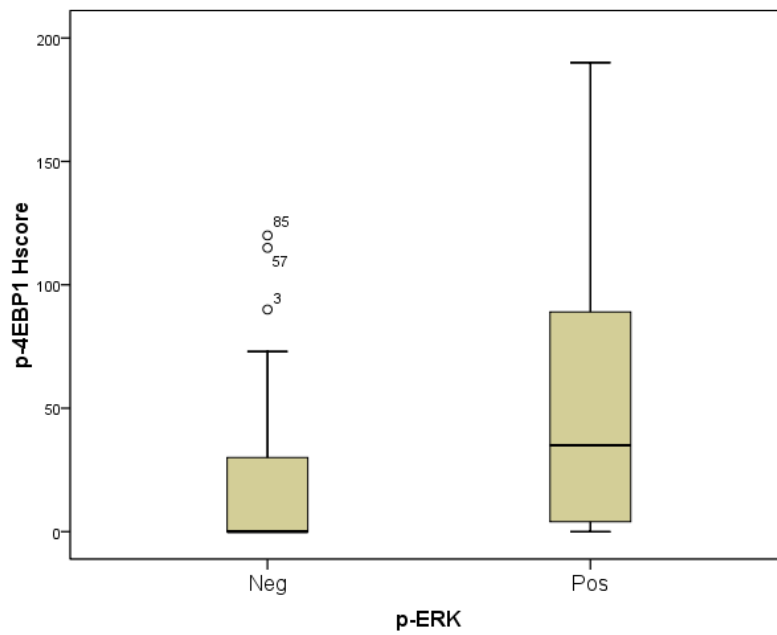
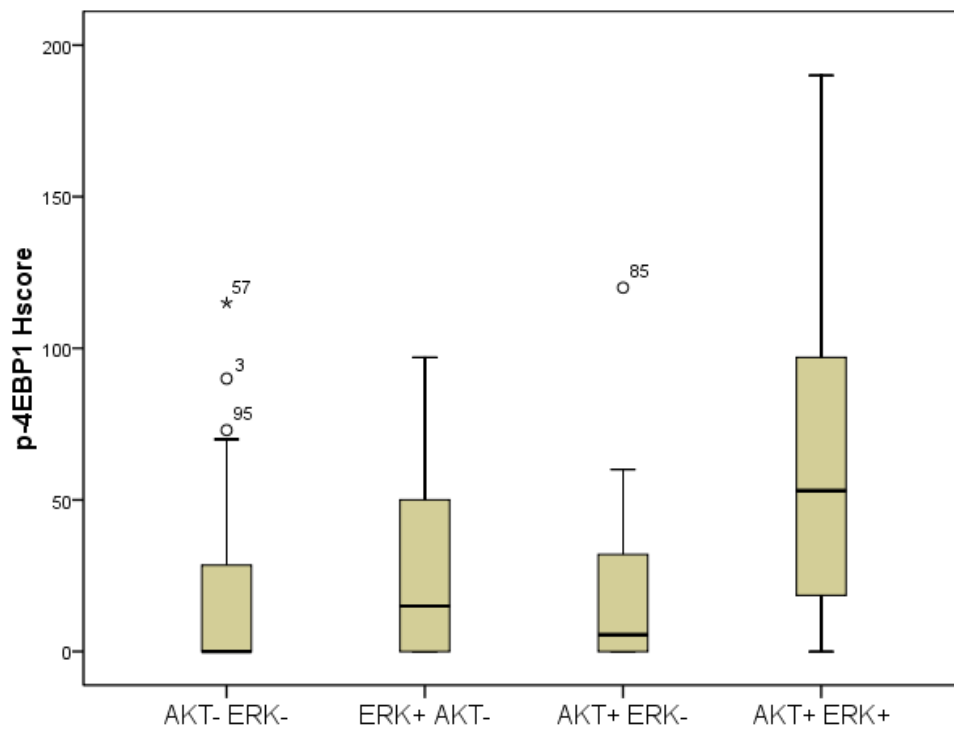


FIGURA 26. Diagrama de cajas que muestra las diferencias de expresión de p-4E-BP1 en relación a la positividad o negatividad de p-AKT y/o p-ERK.



1.3.5 p-p70S6K en relación a p-AKT y p-ERK

La expresión de p-p70S6K estaba marcadamente aumentada en aquellos casos en que había aumento de expresión de p-AKT, como se observa en la FIGURA 27, así como en los casos en los que se expresaba p-ERK, como indica la FIGURA 28. Estas diferencias eran estadísticamente significativas para p-AKT ($p = 0.002$), mientras que no lo fueron para p-ERK ($p = 0.067$). En la FIGURA 29 se muestran las variaciones en la expresión p-p70S6K en aquellos casos con ausencia de expresión de p-ERK y p-AKT, los casos con expresión de una de ellas y los casos con coexpresión de ambas. La expresión es máxima cuando están activadas ambas vías simultáneamente y muy escasa en el resto de situaciones. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 0.009$).

FIGURA 27. Diagrama de cajas que muestra las diferencias de expresión de p-p70S6K en relación a la positividad de p-AKT.

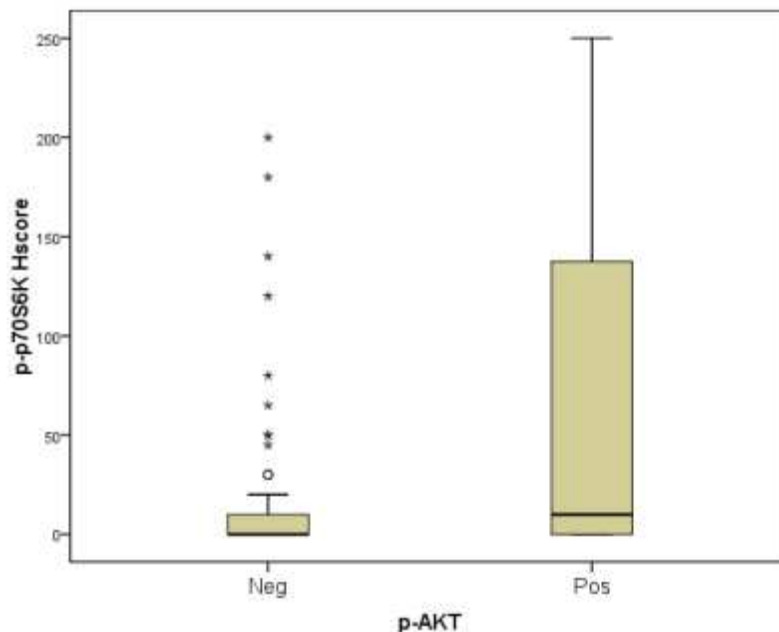


FIGURA 28. Diagrama de cajas que muestra las diferencias de expresión de p-p70S6K en relación a la positividad de p-ERK.

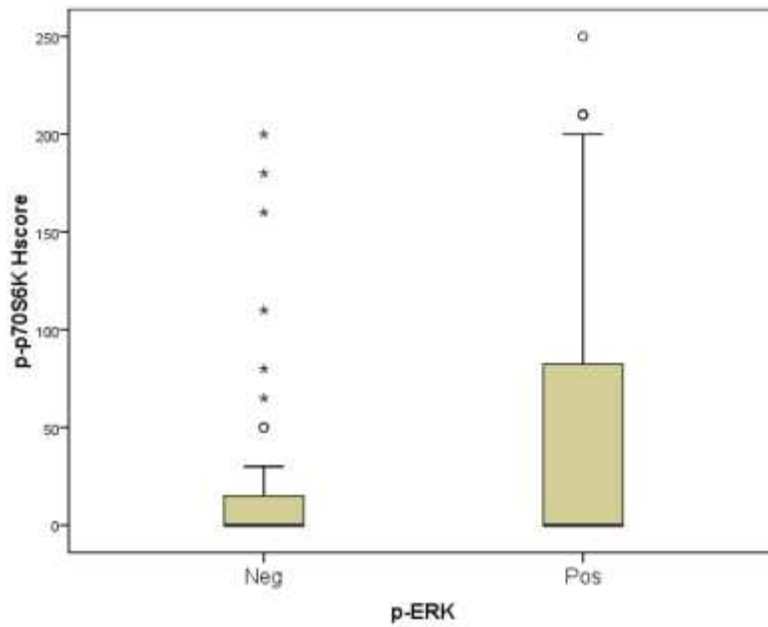
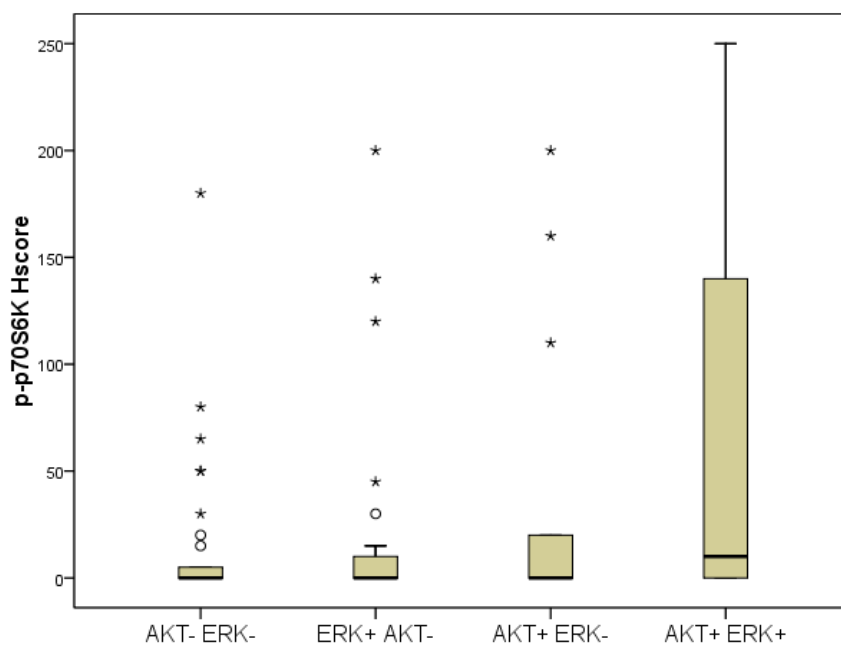


FIGURA 29. Diagrama de cajas que muestra las diferencias de expresión de p-p70S6K en relación a la positividad o negatividad de p-AKT y/o p-ERK.



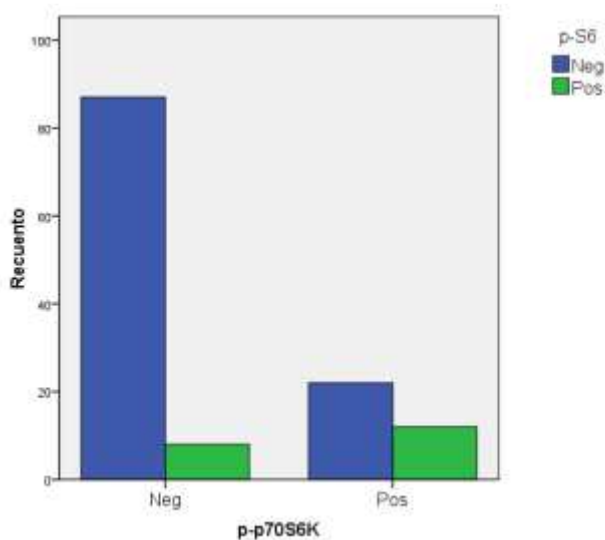
1.3.6 p-S6 en relación con la expresión de p-p70S6K

Los casos con expresión de p-S6 mostraron expresiones variables p-p70S6K como se refleja en la Tabla 17 y en la FIGURA 30. Las diferencias observadas eran estadísticamente significativas ($p = 0.001$). La expresión de p-S6 se observó en un número de bajo de casos pero el 60% de los que la expresaban eran también positivos para p-p70S6K.

TABLA 17. Tabla de contingencia para expresión de p-S6 y p-p70S6K.

			p-S6		Total
			Neg	Pos	
p-p70S6K	Neg	Núm	87	8	95
		%	91,6%	8,4%	100,0%
	Pos	Núm	22	12	34
		%	64,7%	35,3%	100,0%
Total	Núm	109	20	129	
	%	84,5%	15,5%	100,0%	

FIGURA 30. Diagrama de barras que muestra las diferencias de expresión de p-S6 según el estado de p-p70S6K.

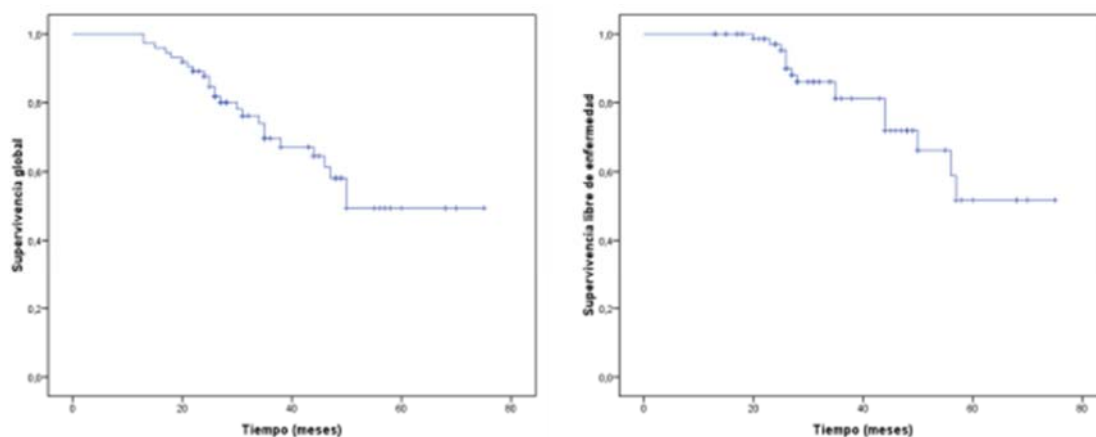


1.4 ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA

El análisis estadístico de la supervivencia realizado para cada uno de los factores estudiados fue realizado con el método de Kaplan-Meier y las diferencias encontradas fueron valoradas mediante el test de Log Rank (Mantel-Cox), obteniendo los siguientes resultados.

La supervivencia global de los tumores malignos de nuestra serie, con un seguimiento medio de 40.56 meses (rango 13-75 meses), fue del 67.6% a los 5 años del diagnóstico. La media de supervivencia fue de 54.81 meses. La FIGURA 31 muestra la curva de supervivencia global y libre de enfermedad de los carcinomas de ovario de nuestra serie.

FIGURA 31. Curva de supervivencia global de los carcinomas de ovario de nuestra serie.

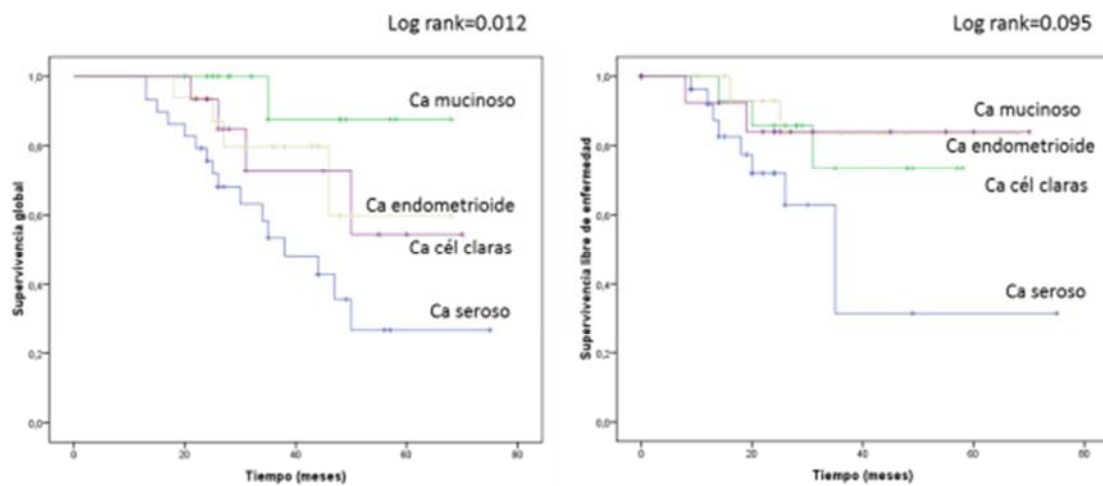


1.4.1 Tipo histológico

Se observaron diferencias significativas en la supervivencia según el tipo histológico. En las pacientes con carcinomas serosos se produjeron 15 muertes por la enfermedad (55.5%) con una supervivencia media de 43.47 meses. En las pacientes con carcinomas

mucinosos hubo una sola muerte (7.1%), con una supervivencia media de 63.87 meses. En los casos con carcinoma endometriode hubieron 3 muertes (20%) con una supervivencia media de 57.07 meses. En las pacientes con carcinoma de células claras se produjeron 4 muertes (26.6%) con una supervivencia media de 54.63 meses. La FIGURA 32 muestra las curvas de supervivencia para los diferentes tipos histológicos. Estas diferencias resultaron significativas con un Log Rank = 0.012.

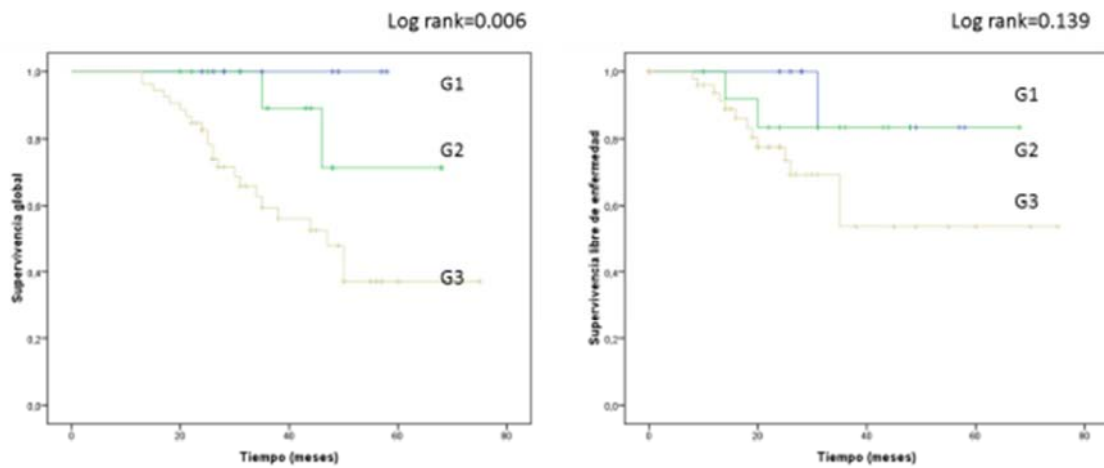
FIGURA 32. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad según tipo histológico.



1.4.2 Grado histológico

El grado histológico se correlacionaba con la supervivencia, sin observarse ninguna muerte en las pacientes con carcinomas de grado 1, mientras que las pacientes de grado 2 el 28% murieron durante el seguimiento y los de grado 3 el 52% murieron. Las curvas de supervivencia se muestran en la FIGURA 33. El Log Rank fue de 0.006.

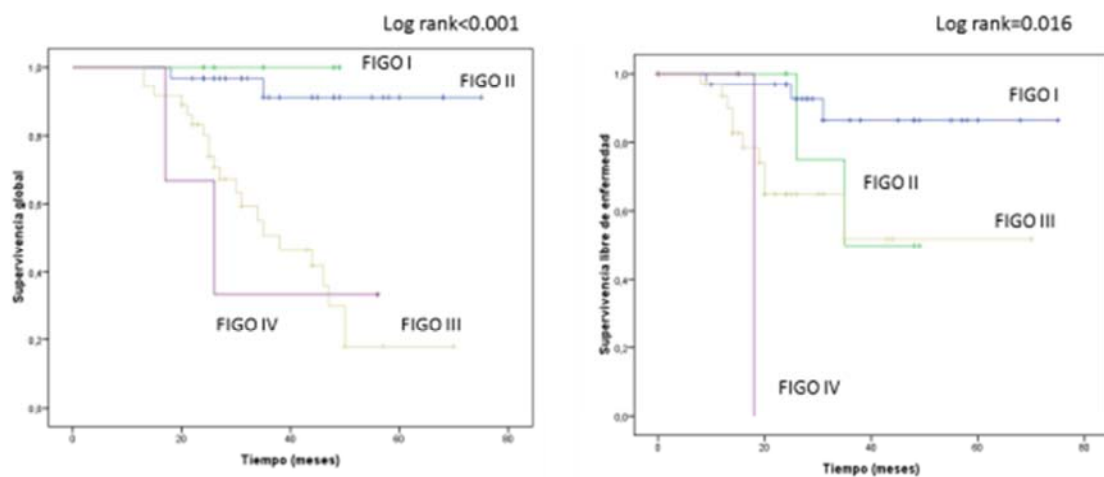
FIGURA 33 Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para el grado histológico



1.4.3 Estadio FIGO

El estadio clínico mostró las curvas de supervivencia que se muestran en la FIGURA 34. El Log Rank fue <0.001 y se distinguieron 2 grupos de estadios de diferente valor pronóstico. Los estadios I y II en los que sólo se observaron 2 eventos y los grados III y IV en los que el 60-70% murieron.

FIGURA 34. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad en función del estadio FIGO

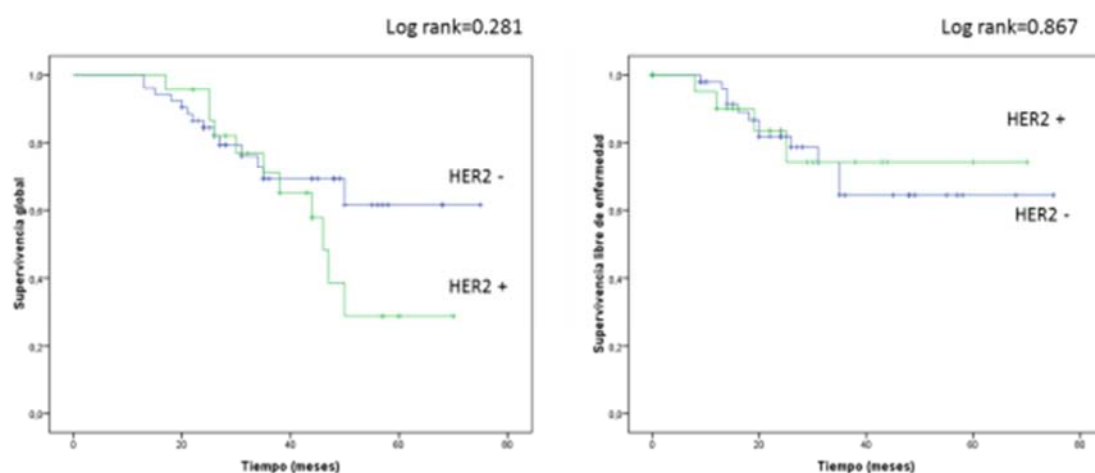


1.4.4 Marcadores inmunohistoquímicos

A continuación se muestran las curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para los diferentes marcadores inmunohistoquímicos realizados.

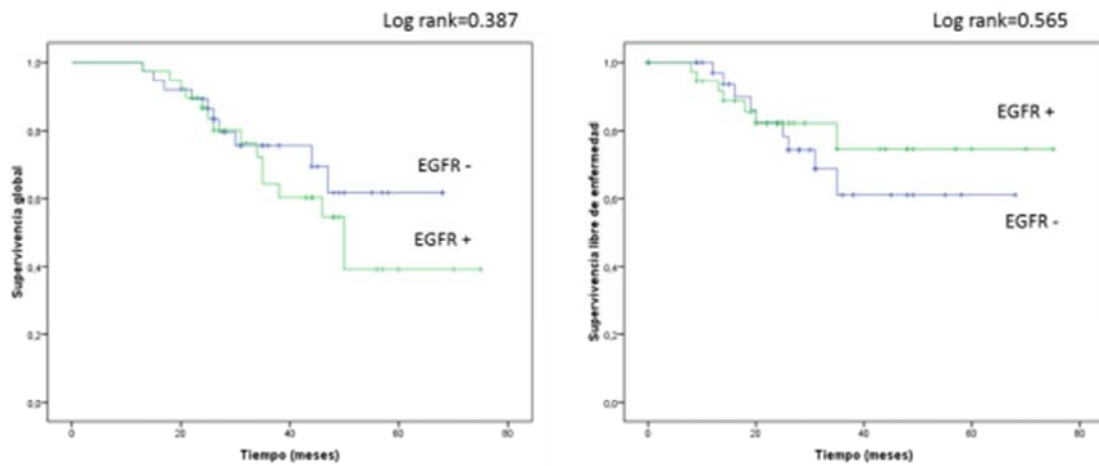
En la FIGURA 35 se muestran los resultados de HER2 en que los casos positivos tenían peor pronóstico aunque las diferencias no fueron estadísticamente positivas. Los casos positivos tenían una supervivencia media 10 meses superior a los negativos. Sin embargo, para el periodo libre de enfermedad no se observaron diferencias.

FIGURA 35. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para HER2



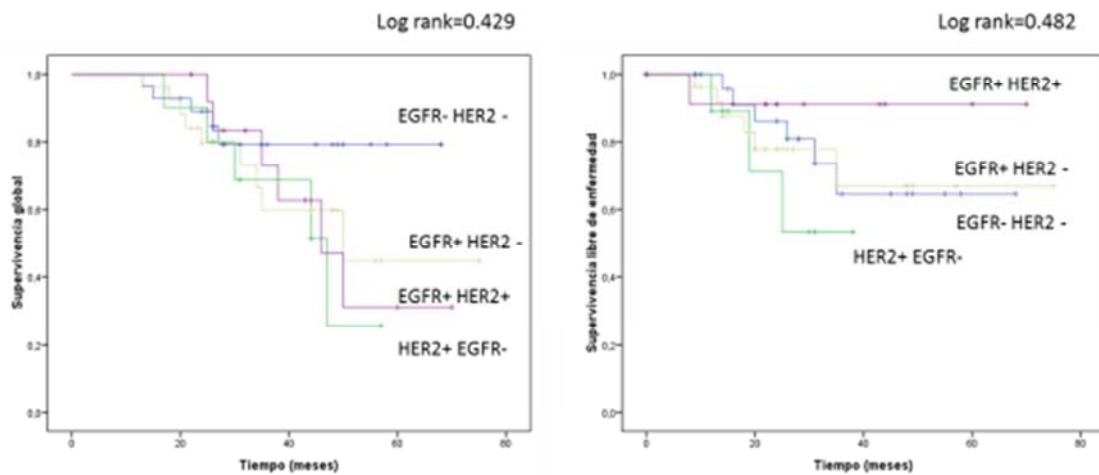
La FIGURA 36 muestra los resultados para EGFR en los que no se observaron diferencias destacables entre los casos positivos y negativos, con supervivencias medias entre ambos grupos de solo 3 meses. Los resultados para la supervivencia libre de enfermedad fueron similares.

FIGURA 36. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para EGFR



Se valoró también la supervivencia en función de si uno o los dos receptores se expresaban simultáneamente. El resultado es el mostrado en la FIGURA 37.

FIGURA 37. Curvas de supervivencia para la coexpresión de ambos receptores



p-AKT valorado de forma independiente de la localización de la proteína no mostró diferencias respecto a la supervivencia global y libre de enfermedad como se puede observar en la

Figura 38. Las supervivencias medias tenían 2 meses de diferencia entre ambos grupos.

Sin embargo, en el periodo libre de enfermedad hubo una diferencia de 12 meses, mayor

en los casos positivos pero estadísticamente no significativa. Estos resultados son superponibles a los observados cuando se valoraba de forma independiente los casos de expresión nuclear y citoplasmática como puede observarse en la Figura 39 y en la FIGURA 40, respectivamente.

FIGURA 38. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para p-AKT total

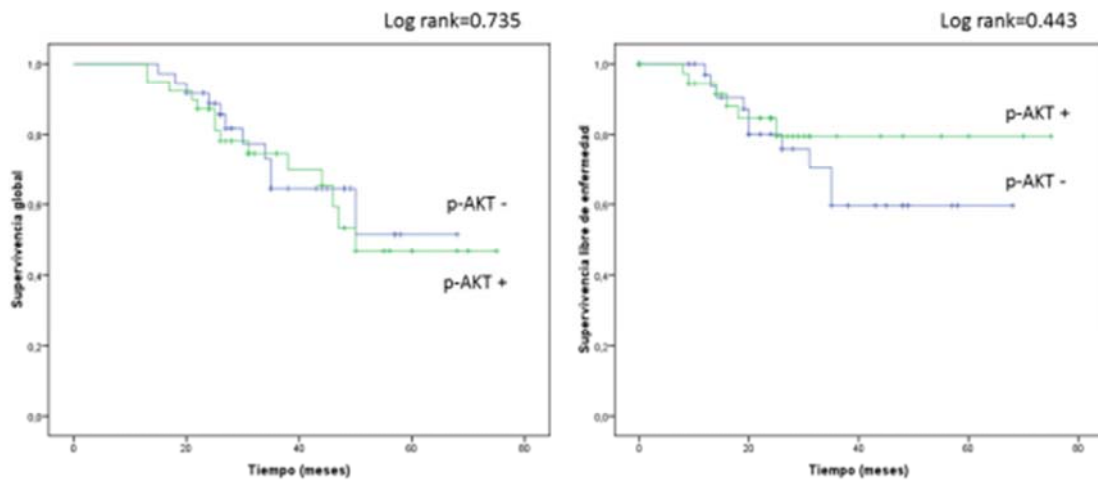


FIGURA 39. Curva de supervivencia global y libre de enfermedad para p-AKT nuclear

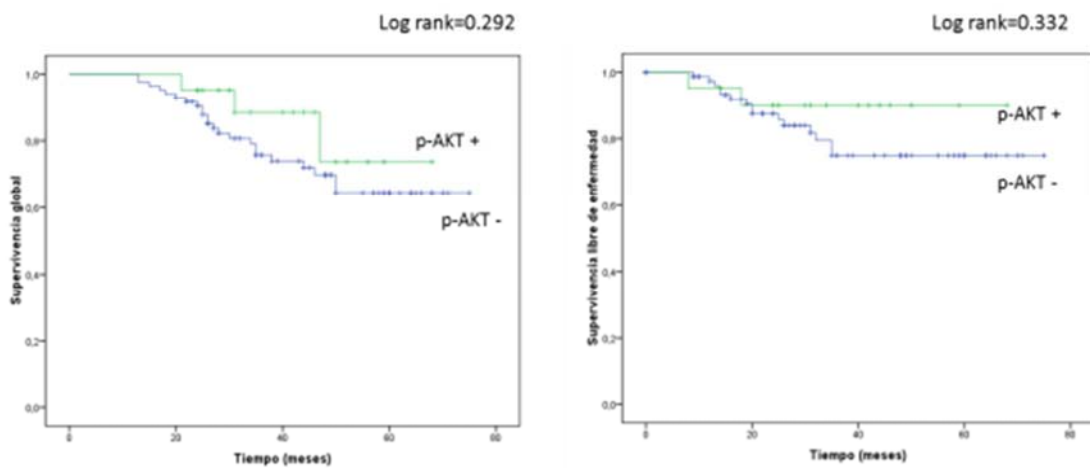
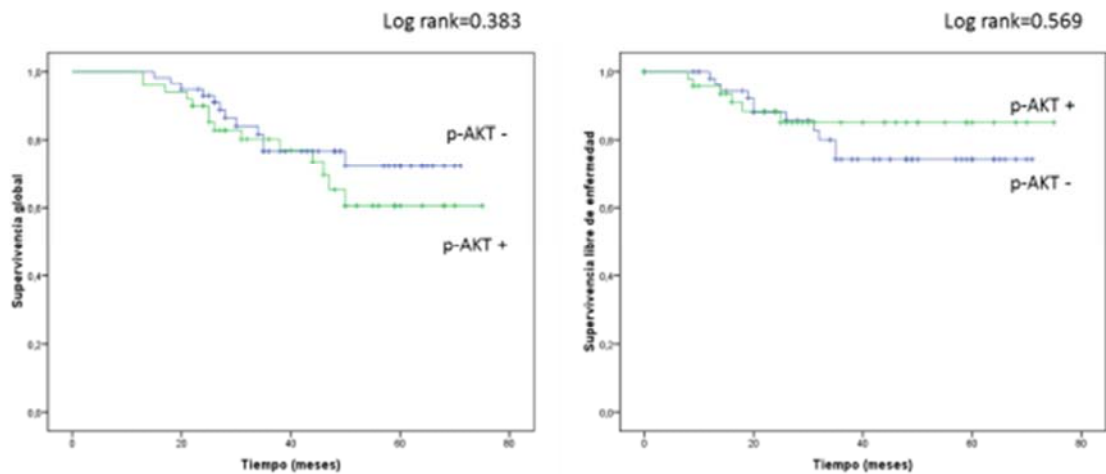


FIGURA 40. Curva de supervivencia global y libre de enfermedad para p-AKT citoplasmático



En la

Figura 41 están los resultados de p-ERK valorado globalmente nuclear y citoplasmático, en los que la supervivencia global de los casos positivos fue 11 meses inferior a los negativos pero sin ser significativa. La supervivencia libre de enfermedad resultó igual entre los dos grupos. En el análisis de las curvas de supervivencia separando los casos con positividad nuclear y citoplasmática se obtuvieron resultados superponibles como puede observarse en la FIGURA 42 y en la FIGURA 43.

FIGURA 41. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para p-ERK

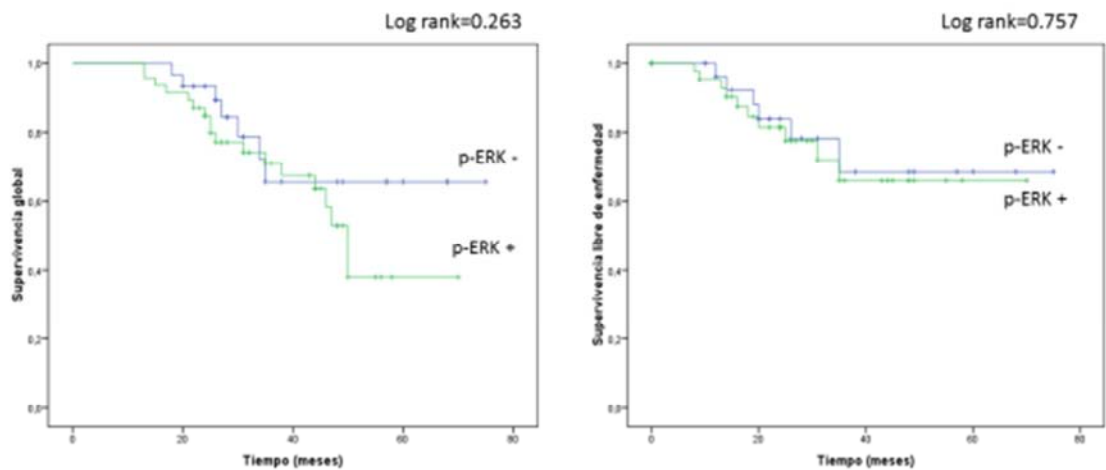


FIGURA 42. Curva de supervivencia global y libre de enfermedad para p-ERK nuclear

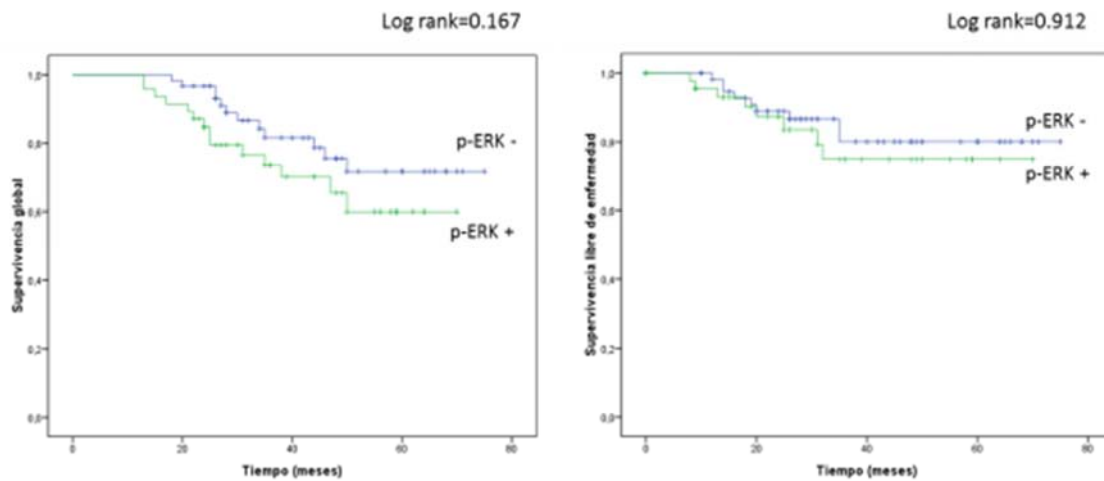
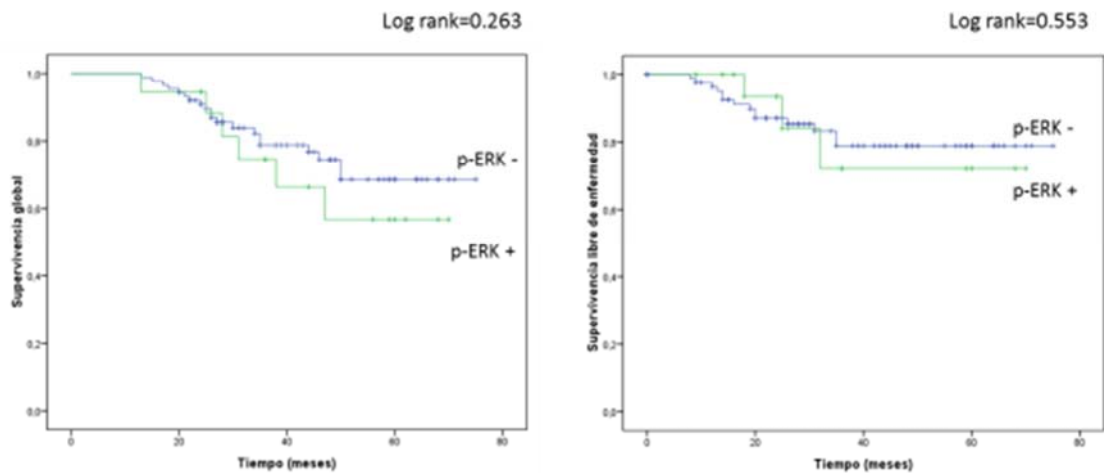
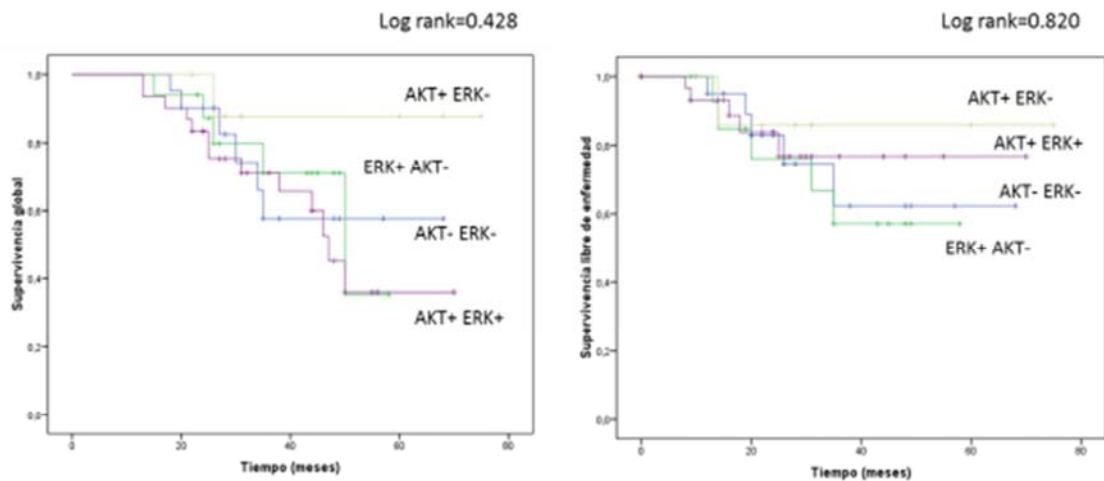


FIGURA 43. Curva de supervivencia global y libre de enfermedad para p-ERK citoplasmático



En la FIGURA 44 se muestran los resultados de supervivencia global y libre de enfermedad para la expresión conjunta o individual de p-AKT y p-ERK. Aunque las diferencias en las curvas no fueron significativas, se observó que los casos con activación de ERK tenían un comportamiento peor, sobre todo cuando también tienen activado AKT. Al contrario, los casos que solamente tienen activado AKT tienen mejor pronóstico.

FIGURA 44. Curvas de supervivencia para la expresión conjunta de p-AKT y p-ERK



Los resultados de p-4E-BP1 fueron los ilustrados en la FIGURA 45 y muestran las diferencias en supervivencia, presentando los negativos una supervivencia media de 63.3 meses y los positivos una de 48.8 meses. Estas diferencias no se observaban en el periodo libre de enfermedad en el que los negativos recidivaban 4 meses antes que los positivos, sin ser esta diferencia significativa. En la FIGURA 46 se muestran las curvas en función de su expresión citoplasmática..

FIGURA 45. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para p-4E-BP1

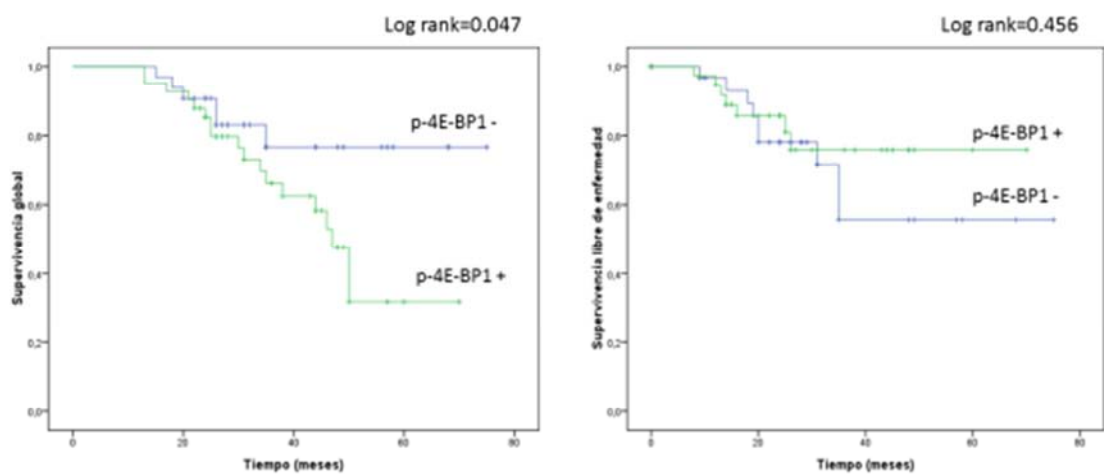
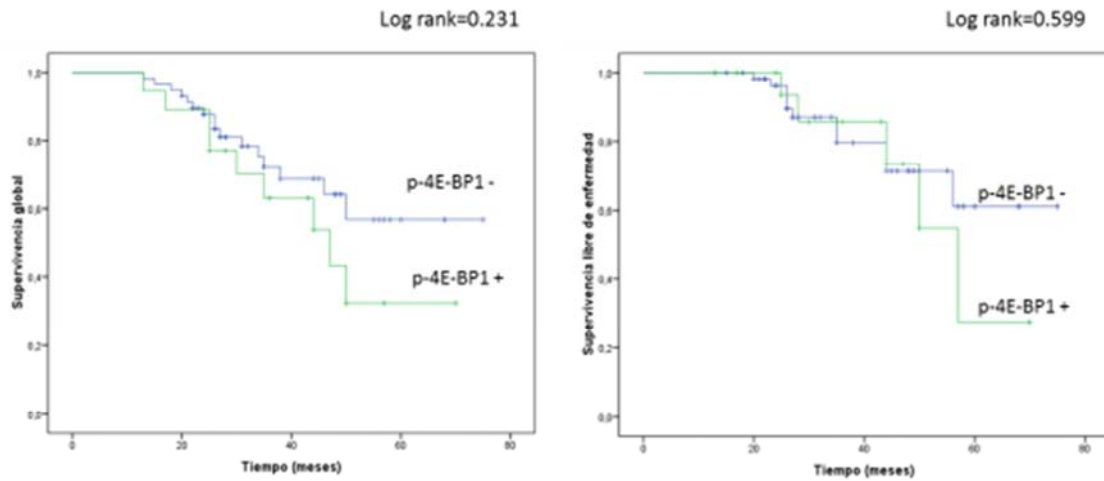


FIGURA 46 Curvas de supervivencia para p-4E-BP1 citoplasmático



Respecto a p-p70S6K, cuyos resultados se muestran en la FIGURA 47, también se observó un peor pronóstico en los casos positivos, con una supervivencia media 13 meses menor que los negativos aunque no fueron diferencias estadísticamente significativas. La supervivencia libre de enfermedad no mostró diferencias destacables en ambos grupos.

En la FIGURA 48 se muestran los resultados del análisis de supervivencia para la expresión citoplasmática de p70S6K fosforilada.

FIGURA 47. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para p-p70S6K

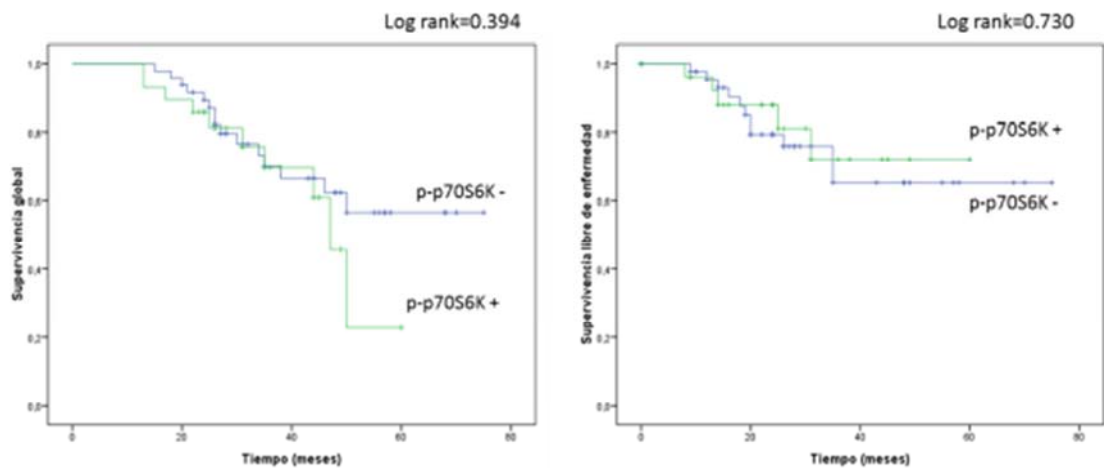
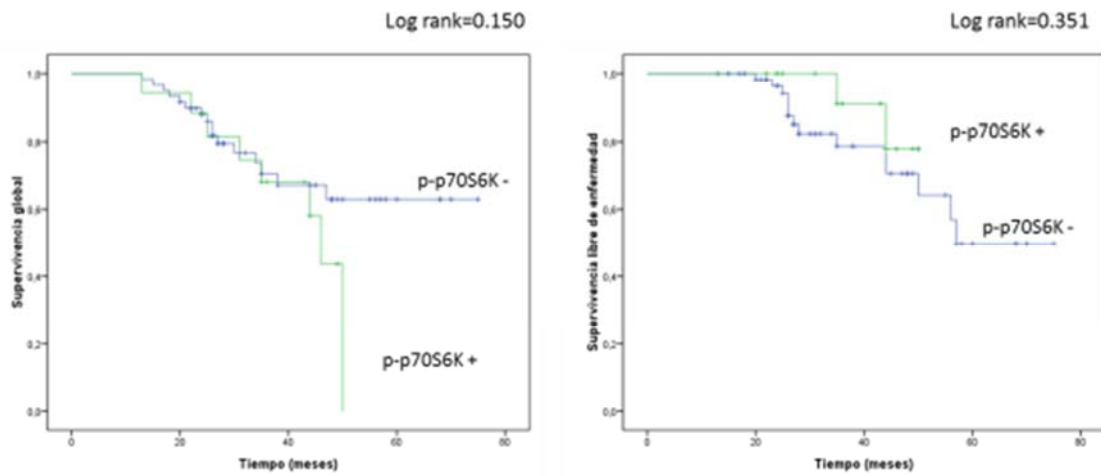
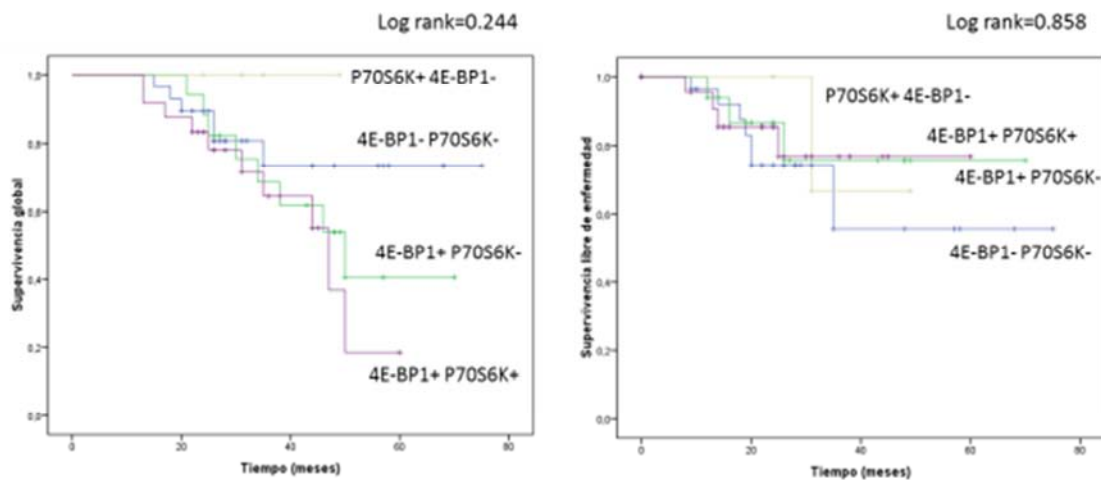


FIGURA 48. Curvas de supervivencia para la expresión de p-p70S6K citoplasmática



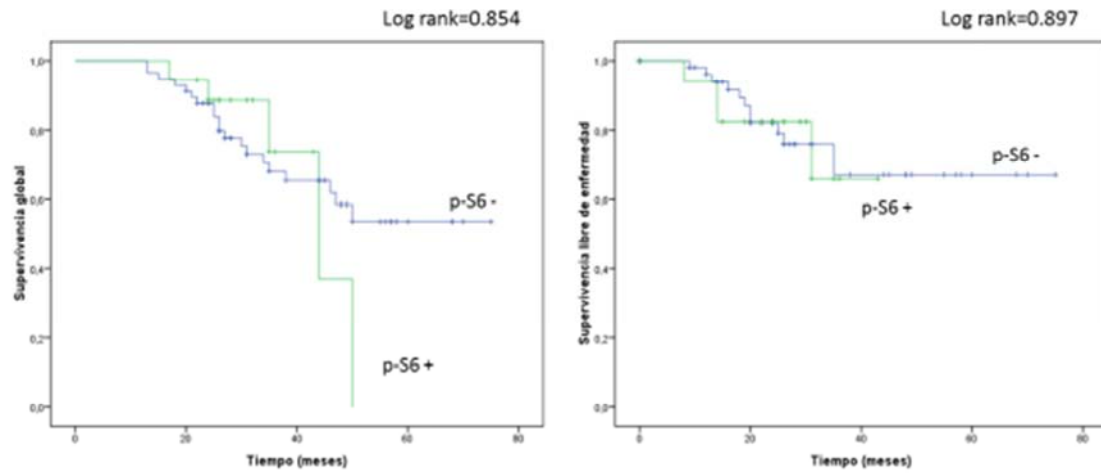
Al analizar la expresión conjunta de ambos efectores de la vía de mTOR obtuvimos los resultados mostrados en la FIGURA 49. Valoradas en conjunto, no se obtuvo significación estadística, aunque los casos que sobreexpresaron ambas proteínas fosforiladas tuvieron un comportamiento peor que los que solamente expresaron 4E-BP1. Ambos grupos de casos tuvieron menor supervivencia que los 4E-BP1 negativos.

FIGURA 49. Curvas de supervivencia para la expresión conjunta de p-4E-BP1 y p-p70S6K



En la FIGURA 50 se ilustra como los resultados de p-S6 no alteran la supervivencia global de las pacientes ni el periodo libre de enfermedad.

FIGURA 50. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para p-S6



1.5 Análisis multivariante

Se realizó el estudio de regresión de Cox para las variables en las que se obtuvo un log Rank significativo en el análisis de supervivencia. Se seleccionó el grado, estadio y la expresión nuclear de p-4E-BP1. En el análisis se puede observar que tanto el estadio como la expresión de p-4E-BP1 tienen un resultado significativo. Del mismo análisis se desprende que el riesgo o “hazard ratio” en pacientes con expresión de la proteína es 5 veces superior

Variables en la ecuación

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
p-4E-BP1	1,627	,823	3,908	1	,048	5,090	1,014	25,550
Grado	1,372	1,023	1,796	1	,180	3,942	,530	29,298
Estadio	1,273	,487	6,818	1	,009	3,570	1,374	9,280

2 RESULTADOS EN CÁNCER DE ENDOMETRIO

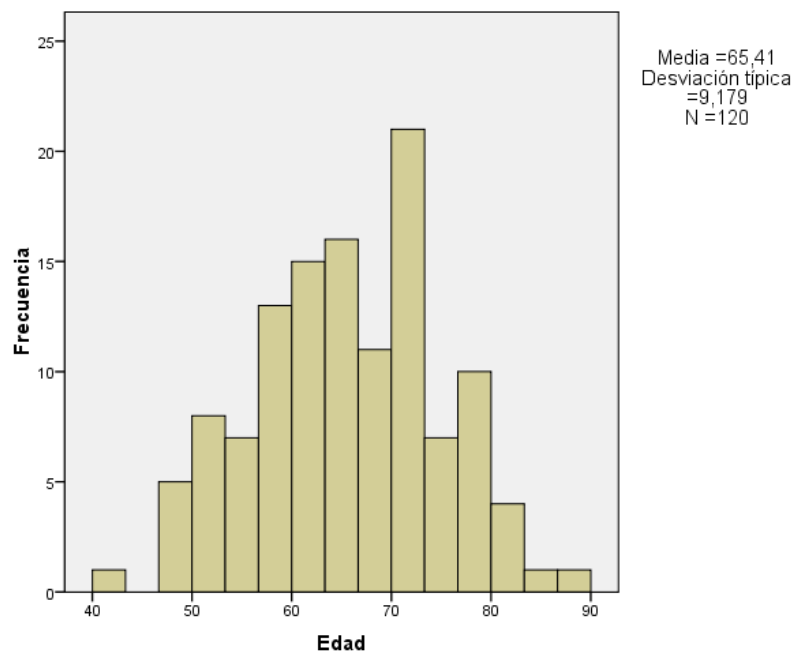
2.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

2.1.1 Edad

La serie estudiada estaba constituida predominantemente por pacientes postmenopáusicas con un rango de edad entre 41 años y 87 años y una media de 65.4 años. La distribución por edades de los carcinomas se muestra en la FIGURA 51.

Además de los carcinomas, los casos controles correspondientes a endometrios atróficos, de edades similares a los carcinomas y los endometrios funcionales e hiperplasias, eran de pacientes de edades comprendidas entre los 29 y 84 años.

FIGURA 51. Distribución por edades de los carcinomas de endometrio de la serie



2.1.2 Tipo histológico

Los tipos histológicos y sus frecuencias en la serie son las mostradas en la TABLA 18. A parte de los carcinomas, los controles estaban constituidos por 8 endometrios atróficos, 4 endometrios proliferativos, 2 endometrios secretores y 1 pólipo fibroepitelial endometrial. Además, 2 casos de hiperplasia compleja y 1 de hiperplasia simple.

TABLA 18. Frecuencia de tipos histológicos

Tipo histológico	n	%
Ca células claras	7	5,8
Ca endometriode	98	81,7
Ca seroso	15	12,5
Total	120	100,0

Según la clasificación de Bokhman, la distribución era la mostrada en la TABLA 19.

TABLA 19. Frecuencias de carcinomas de tipo I y II

Tipo	n	%
Tipo I	97	80,8
Tipo II	23	19,2
Total	120	100,0

2.1.3 Grado histológico

Respecto al grado histológico aplicando los criterios de la FIGO, se obtuvieron 23 casos de grado 1 (19.2%), 46 casos de grado 2 (38.3%) y 51 casos de grado 3 (42.5%). La distribución por tipo histológicos se muestra en la TABLA 20.

TABLA 20. Tabla de contingencia para grado y tipo histológico.

		Grado			Total
		1	2	3	
Ca cél claras	Núm	0	0	7	7
	%	,0%	,0%	100,0%	100,0%
Ca endometrioide	Núm	23	46	29	98
	%	23,5%	46,9%	29,6%	100,0%
Ca seroso	Núm	0	0	15	15
	%	,0%	,0%	100,0%	100,0%
Total	Núm	23	46	51	120
	%	19,2%	38,3%	42,5%	100,0%

2.1.4 Estadío

Para la clasificación se aplicaron los criterios de la FIGO modificados en 2009 (ver CUADRO 7, página 70), resultando la distribución representada en la TABLA 21. La distribución de los estadios en función del tipo histológico se muestra en la TABLA 22.

TABLA 21. Distribución por estadios de los carcinomas de endometrio

Estadio	Frecuencia	Porcentaje
IA	37	30,8
IB	32	26,7
II	19	15,8
IIIA	7	5,8
IIIB	3	2,5
IIIC	17	14,2
IV	4	3,3
Total	120	100,0

TABLA 22. Tabla de contingencia para estadio y tipo histológico

			Estadio				Total
			I	II	III	IV	
Tipo histológico	Ca cél claras	Núm	0	0	3	3	6
		%	,0%	,0%	50,0%	50,0%	100,0%
	Ca endometrioide	Núm	62	18	17	1	98
		%	63,3%	18,4%	17,3%	1,0%	100,0%
	Ca seroso	Núm	7	1	7	0	15
		%	46,7%	6,7%	46,7%	,0%	100,0%
Total	Núm	69	19	27	4	119	
	%	58,0%	16,0%	22,7%	3,4%	100,0%	

2.1.5 Evolución

El periodo de seguimiento de las pacientes estudiado fue variable con un rango de 1 a 153 meses (media 62.35 meses). En este periodo 19 (16%) pacientes murieron por la enfermedad y en 32 (26%) pacientes se les detectó recidiva de la misma.

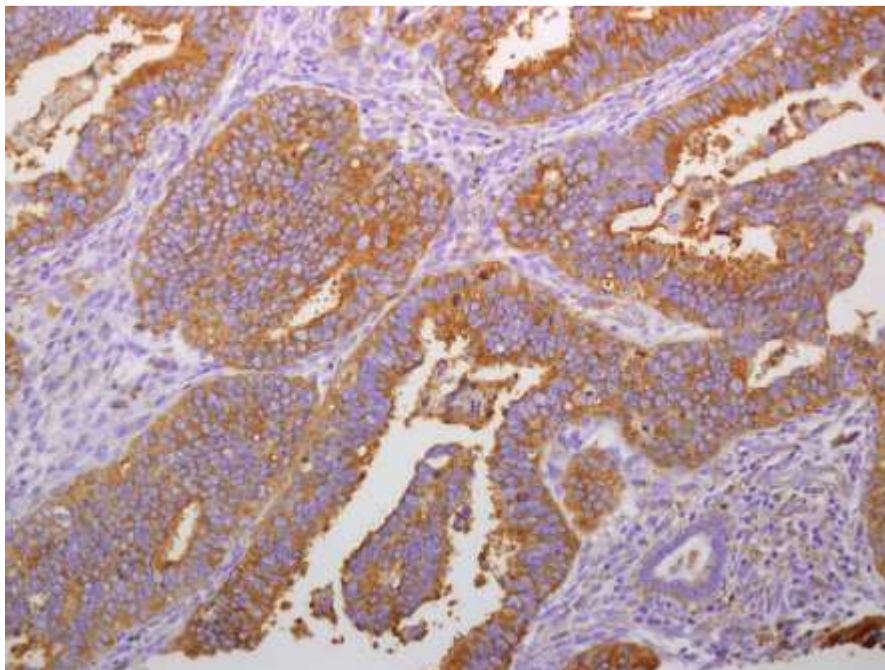
2.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS

2.2.1 HER2

HER2 se expresó fundamentalmente en la membrana de las células tumorales como de ha descrito en el carcinoma de ovario con expresión citoplasmática en los casos con expresión alta de la proteína (FIGURA 52). Se consideró como positivo únicamente los casos con expresión intensa (3+) y el resto de casos se consideraron para fines estadísticos como negativos. Con estos criterios el 11% de carcinomas fueron positivos.

Únicamente se observó positividad en los carcinomas siendo los casos control totalmente negativos, excepto una hiperplasia compleja que presentó positividad moderada. El 25% de carcinomas de células claras fue positivo, el 9% de carcinomas endometrioides y el 25% de carcinomas serosos, sin ser estas diferencias significativas. Incluso si se agrupan los casos dentro de las categorías tipo I o II de Bokhman, el resultado no es estadísticamente significativo. Sin embargo, si se tenía en cuenta el grado histológico de los tumores, éste era significativo.

FIGURA 52. HER2 en cáncer de endometrio. Expresión intensa en el tumor y negatividad en una glándula atrófica atrapada.



Los carcinomas grado 1 resultaron todos negativos, los grados 2 fueron positivos en un 8.7% y los grados 3 en un 21.9%. En relación a los estadios los estadios I fueron positivos en un 6.3%, los estadios II en un 11.8% y los estadios III en un 27.8%. Sólo había un caso en estadio IV que fue negativo. Respecto a la invasión miometrial, los casos con infiltración de la pared de <50% fueron positivos en un 9% mientras que los

que la infiltraban >50%, lo fueron en el 12.7%. En la TABLA 23 se muestra la significación estadística de las variables clínico-patológicas y HER2 con el test de chi-cuadrado.

TABLA 23. Significación estadística de la expresión de HER2

Variable	Significación (χ^2)
Tipo histológico	0.255
Grado de diferenciación	0.033
Invasión miometrial	0.390
Estadio FIGO	0.079

2.2.2 EGFR

EGFR se expresó en la membrana de las células tumorales siendo negativo en todos los casos controles (FIGURA 53). En total, se observó sobreexpresión en el 19% de los carcinomas. Todos los carcinomas de células claras fueron negativos, mientras que los más frecuentemente positivos fueron los carcinomas serosos (37.5%) seguidos de los carcinomas endometrioides (18%). Estas diferencias no fueron significativas. Al valorar la relación con el grado histológico tampoco se observaron diferencias destacables, siendo positivos el 27% de grados 1, el 17% de grados 2 y el 15% de grados 3. Igualmente, tampoco se observó relación con el estadio clínico siendo positivos el 20% de estadios I, el 23% de estadios II y el 12% de estadios III. El caso en estadio IV fue negativo. Sin embargo, si se tenía en cuenta únicamente la infiltración miometrial el 28% de los casos que infiltraban <50% eran positivos para EGFR mientras que sólo el

11% de los que infiltraban >50% lo eran, siendo este resultado estadísticamente significativo. Ver TABLA 24 para los valores resultantes del test de chi-cuadrado para EGFR y las variables clínico-patológicas estudiadas.

FIGURA 53. Expresión moderada de EGFR en un carcinoma de endometrio

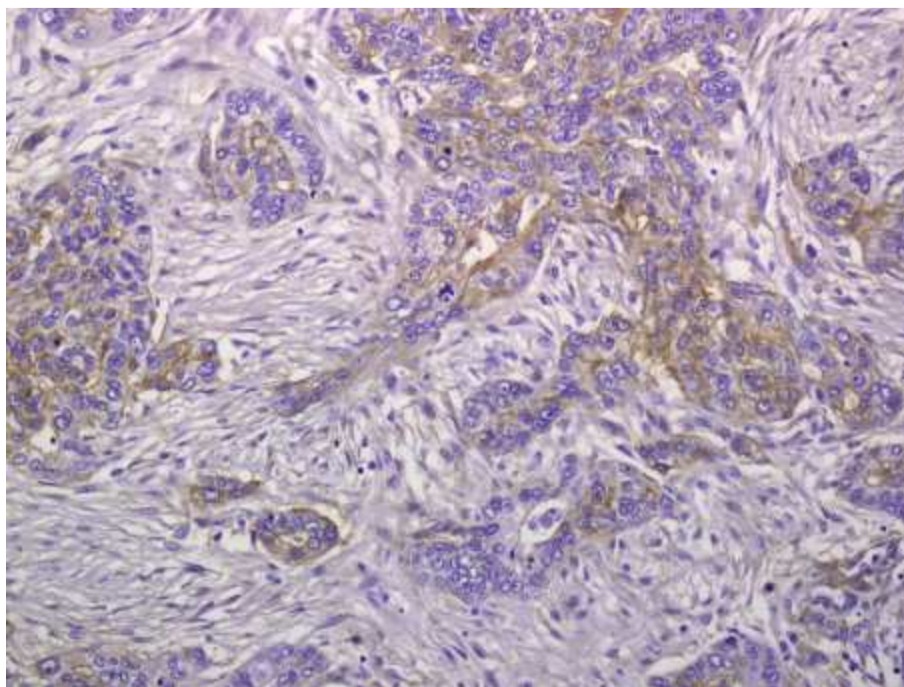


TABLA 24. Significación estadística de la expresión de EGFR

Variable	Significación (χ^2)
Tipo histológico	0.247
Grado de diferenciación	0.501
Invasión miometrial	0.024
Estadio FIGO	0.785

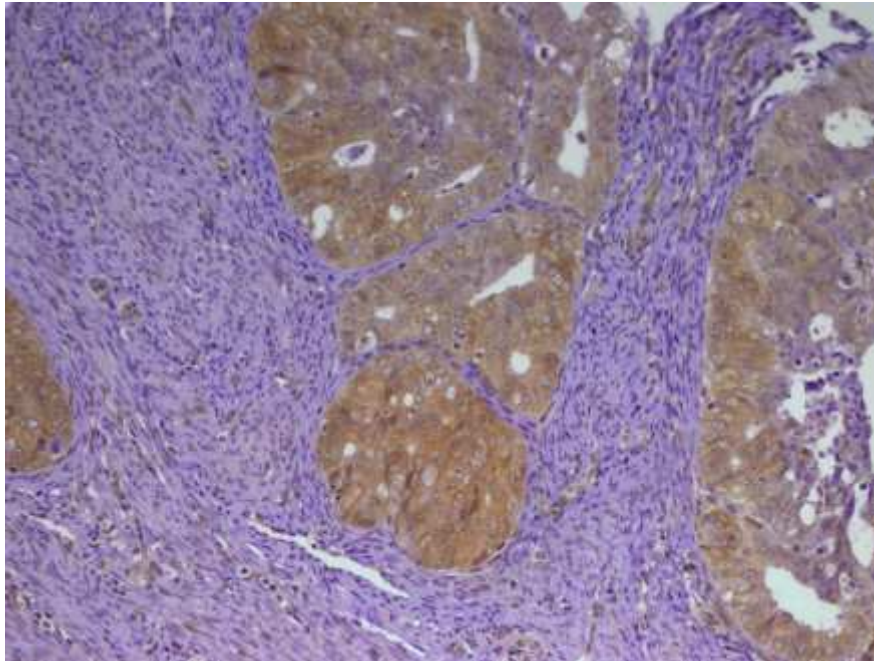
2.2.3 AKT fosforilado

Se observó expresión de p-AKT tanto nuclear como citoplasmática (FIGURA 54) y ambas se valoraron de forma independiente y se analizaron de forma separada y conjuntamente. La expresión citoplasmática se observó en un 41% de los casos mientras que la nuclear lo fue en el 29% del total. Si se valoraba de forma conjunta el 47% de los casos presentaba algún tipo de positividad.

La expresión citoplasmática se observó en el 40% de los casos controles, siendo únicamente positivos los endometrios funcionales y totalmente negativos los endometrios atróficos. Igualmente, las hiperplasias fueron todas ellas positivas. Respecto a los tipos histológicos se observó expresión citoplasmática más frecuentemente en los carcinomas endometrioides (43%) seguido de los carcinomas serosos (33%), siendo los carcinomas de células claras totalmente negativos. Los diferentes grados histológicos no mostraron diferencias de expresión citoplasmática de p-AKT con porcentajes que oscilaban entre 35% y el 45%. Esta positividad no mostró diferencias relevantes entre estadios siendo éstas similares tanto en estadios iniciales como avanzados. El grado de invasión miometrial tampoco determinó la expresión de p-AKT siendo los de <50% positivos en un 43% y los de >50% en un 37%.

La expresión nuclear fue menos frecuente que la citoplasmática y se observó con mayor frecuencia en los carcinomas de células claras (85%), seguido de los carcinomas serosos (53% y los endometrioides (22%). En relación al grado, los grados 3 fueron positivos en un 51%, los grados 2 en un 9% y los grados 1 en el 23% de los casos. Este patrón de expresión tampoco se relacionó con el estadio clínico con frecuencias que oscilaban entre el 39% y el 48%, sin ser significativas, al igual que la infiltración miometrial que presentaron porcentajes similares.

FIGURA 54. p-AKT en un carcinoma endometriode. Caso con predominio de expresión citoplasmática.



Si se valoraba la expresión de p-AKT independientemente de la localización de la misma se obtenían los siguientes resultados. Todos los carcinomas de células claras fueron positivos, mientras que los endometrioides y los carcinomas serosos lo fueron en un 44% y un 55% de los casos, respectivamente. Al evaluar la influencia del grado histológico en la expresión de p-AKT se observó positividad del 50% en los grados 1, del 37% en los grados 2 y del 62% en los grados 3, sin ser estas diferencias significativas. Lo mismo ocurría con el estadio en el que los estadios I fueron positivos en un 50%, los estadios II en un 47%, los estadios III en un 39% y el caso en estadio IV fue positivo. Tampoco influyó su expresión en relación al grado de invasión miometrial siendo igualmente positivos en porcentaje similar en el grupo de <50% y el de >50%, como puede observarse en la TABLA 25.

TABLA 25. Significación estadística de la expresión de p-AKT

Variable	Citoplasma Significación (χ^2)	Núcleo Significación (χ^2)	Global Significación (χ^2)
Tipo histológico	0.213	0.001	0.077
Grado histológico	0.597	0.001	0.055
Invasión miometrial	0.551	0.541	0.888
Estadio FIGO	0.283	0.102	0.646

2.2.4 ERK fosforilado

La expresión de p-ERK también fue nuclear y/o citoplasmática observándose un 25% de casos con positividad citoplasmática y un 22% de positividad nuclear y en un 28% de casos se observaba alguna positividad independientemente de la localización subcelular (ver FIGURA 55). Como con p-AKT e igual que en el ovario, se tuvo en cuenta que los casos fueron positivos independientemente de la localización y se hizo el análisis de forma individualizada para cada localización y de forma conjunta. Los casos controles fueron todos negativos tanto para la expresión nuclear como citoplasmática, mientras que las hiperplasias fueron positivas únicamente a nivel nuclear en un 30% de casos siendo todas negativas para la tinción citoplasmática.

Los carcinomas presentaron expresión nuclear en el 25% de los casos. Los carcinomas serosos fueron los más frecuentemente positivos (47%), seguidos de los carcinomas de células claras (43%) y los endometrioides (20%). Se observó una expresión creciente con el grado, siendo los grados 3 positivos en un 39%, los grados 2 en un 15% y los grados 1 en un 13%. Sin embargo, ni la infiltración miometrial ni el estadio de la FIGO demostró diferencias entre los casos positivos y los negativos.

La expresión citoplasmática se observó en el 20% de los carcinomas. Los carcinomas de células claras y los serosos fueron positivos en un 43% y un 40% respectivamente, mientras que los carcinomas endometrioides lo fueron en un 15%. En relación al grado de diferenciación los grados 3 fueron los que más frecuentemente eran positivos citoplasmáticos (39%) comparado con los grados 2 (4%) y los grados 1 (8%). Respecto al estadio se observó una relación directa con p-ERK citoplasmático, con expresión en estadios I en el 8%, estadios II en el 16%, estadios III en el 40% y estadios IV en el 75% de los casos. Igualmente, los que tenían infiltración miometrial de >50% fueron positivos en un 27% comparado con los que lo infiltraban >50% que lo fueron en un 6%, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

Al analizar conjuntamente ambas expresiones obtuvimos que dentro de los carcinomas el 31% de los casos fueron positivos. Los de tipo II fueron positivos con mayor frecuencia, tanto los carcinomas serosos (53%) como los de células claras (57%), mientras que los carcinomas endometrioides lo fueron en un 26% de los casos. Se observó una mayor expresión en los carcinomas grado 3 (51%) comparado con los grados 2 (17%) o los grados 1 (13%), siendo estas diferencias altamente significativas. En los diferentes estadios, las frecuencias de positividad de p-ERK fueron del 22% en estadios I, 26% en estadios II, 48% en estadios III y del 75% en estadios IV, siendo estas diferencias también significativas. No se observaron diferencias en función de la infiltración miometrial.

FIGURA 55. Expresión de p-ERK de predominio nuclear en un carcinoma de endometrio

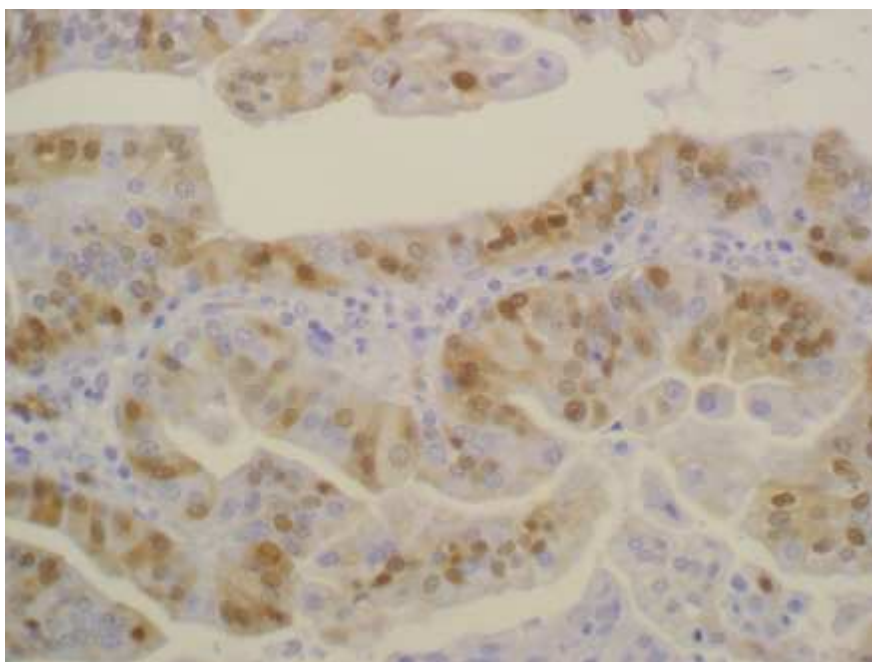


TABLA 26. Significación estadística de la expresión de p-ERK

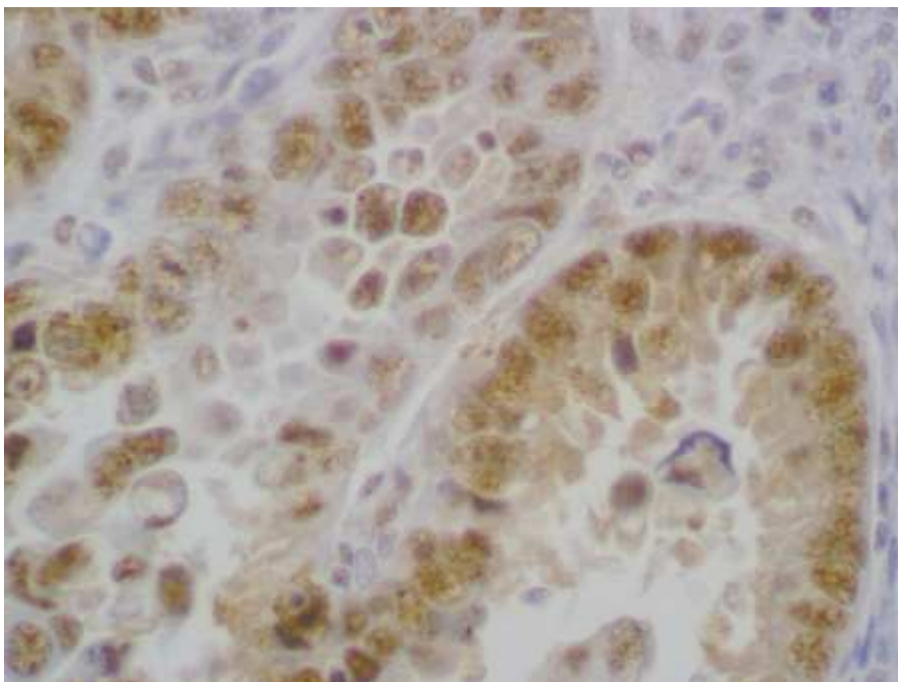
Variable	Citoplasma Significación (χ^2)	Núcleo Significación (χ^2)	Global Significación (χ^2)
Tipo histológico	0.025	0.052	0.031
Grado histológico	<0.001	0.010	<0.001
Invasión miometrial	0.004	0.537	0.149
Estadio FIGO	<0.001	0.316	0.017

2.2.5 4E-BP1 fosforilado

La expresión de p-4E-BP1 fue tanto citoplasmática como nuclear, aunque más intensa a nivel nuclear. Como en el ovario, también se observaron 2 patrones de tinción: uno débil homogéneo, que estaba presente también en tejidos normales y que se consideró

basal, y uno más intenso y grosero, que además se solía acompañar de tinción citoplasmática. El marcador se valoró usando el Hscore descrito, pero para fines estadísticos los resultados se agruparon en positivos, si existían células con intensidad moderada o intensa y negativos si la tinción era totalmente ausente o correspondía a la tinción débil.

FIGURA 56. Expresión de p-4E-BP1 con positividad moderada nuclear y débil citoplasmática.



Siguiendo estos criterios, se obtuvieron un 30% de casos positivos entre los controles, siendo las hiperplasias todas positivas. El 63% de los carcinomas fueron positivos. Dentro de los carcinomas, los carcinomas serosos fueron todos ellos positivos seguidos de los carcinomas de células claras en un 85% y los carcinomas endometrioides en un 56%, siendo estas diferencias significativas. Mucho más evidente era si comparáramos tipo I frente a tipo II en cuya diferencia era altamente significativa ($p < 0.001$). Respecto

al grado histológico, también se observaron diferencias. Tomados en conjunto, los grados 1 fueron positivos en un 35%, los grados 2 en un 56% y los grados 3 en un 82%. Incluso si solamente se evaluaban los carcinomas endometrioides de forma aislada, los grados 1 fueron positivos en un 35%, los grados 2 en un 56% y los grados 3 en un 72% con lo que las diferencias seguían siendo significativas con una $p=0.025$. Al valorar si existían diferencias con el estadio clínico, se obtuvo que los estadios I fueron positivos en un 58%, los estadios II, en un 58%, los estadios III en un 81% y los estadios IV en un 75%, sin ser significativas. Sin embargo, al valorar el grado de invasión miometrial el grupo de carcinomas que infiltraban $>50\%$ de la pared fue positivo en un 71% y el grupo que infiltraba $<50\%$ lo fue solo en el 52% con lo que se obtuvo una p en el límite de la significación estadística.

La expresión citoplasmática se observó en casos que también presentaban positividad nuclear y se observó en un caso de hiperplasia endometrial y en el 32% de carcinomas, siendo ausente en los endometrios control. Se encontró en el 60% de los carcinomas de células claras, en el 43% de carcinomas serosos y en el 26% de los endometrioides, siendo estas diferencias significativas como las observadas en la valoración de la expresión nuclear. Respecto al grado de diferenciación la frecuencia de positividad era mayor en los altos grados, siendo los grados 3 positivos en un 51%, los grados 2 en un 13% y los grados 1 en un 25%. Asimismo, los casos en estadios avanzados fueron más frecuentemente positivos que los iniciales, aunque las diferencias no fueron significativas (estadio I 27%, estadio II 21%, estadio III 40%, estadio IV 75%). No se observaron diferencias en función del grado de invasión miometrial: 27% si infiltraba $<50\%$ y 33% se era $>50\%$.

TABLA 27. Significación estadística de la expresión de p-4E-BP1 en citoplasma y núcleo

Variable	Citoplasma Significación (χ^2)	Núcleo Significación (χ^2)
Tipo histológico	0.027	0.002
Grado de diferenciación	<0.001	<0.001
Invasión miometrial	0.540	0.050
Estadio FIGO	0.106	0.159

2.3 ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS

2.3.1 Relación entre la expresión de los receptores

Los carcinomas de ovario presentaron una expresión casi excluyente entre HER2 y EGFR. Únicamente en 2 casos (2%) había coexpresión de ambos. Estos casos fueron un carcinoma endometriode grado 2 y un carcinoma seroso, que se encontraban en estadios iniciales.

2.3.2 p-AKT en relación a los receptores

La activación de AKT se detectó en proporciones similares de casos EGFR positivos y negativos. Igualmente, p-AKT se expresaba tanto en casos HER2 positivos como negativos, sin evidenciarse diferencias entre los 2 grupos, como puede observarse en la

TABLA 28. Tabla de contingencia de la expresión de EGFR y p-AKT

			p-AKT		Total
			Neg	Pos	
EGFR	Neg	Núm	43	39	82
		%	52,4%	47,6%	100,0%
	Pos	Núm	10	9	19
		%	52,6%	47,4%	100,0%
Total		Núm	53	48	101
		%	52,5%	47,5%	100,0%

P=0.988

TABLA 29. Tabla de contingencia de la expresión de HER2 y p-AKT

			p-AKT		Total
			Neg	Pos	
HER2	Neg	Núm	49	40	89
		%	55,1%	44,9%	100,0%
	Pos	Núm	5	6	11
		%	45,5%	54,5%	100,0%
Total		Núm	54	46	100
		%	54,0%	46,0%	100,0%

P=0.750

Si se valoraba la expresión de p-AKT en función del receptor que sobreexpresaba, obteníamos un gráfico como el de la FIGURA 57 en el que tanto los casos positivos como los negativos presentaban proporciones similares, predominando los casos EGFR positivos sobre los EGFR positivos.

En la FIGURA 58 se representa el porcentaje de casos positivos para p-AKT en función de la sobreexpresión de los receptores de membrana.

FIGURA 57. Proporción de casos HER2 y EGFR positivos en función de la expresión de p-AKT

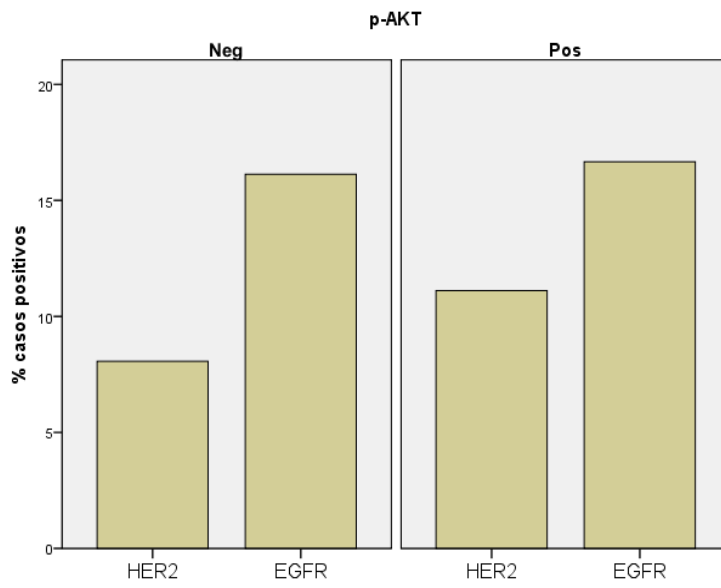
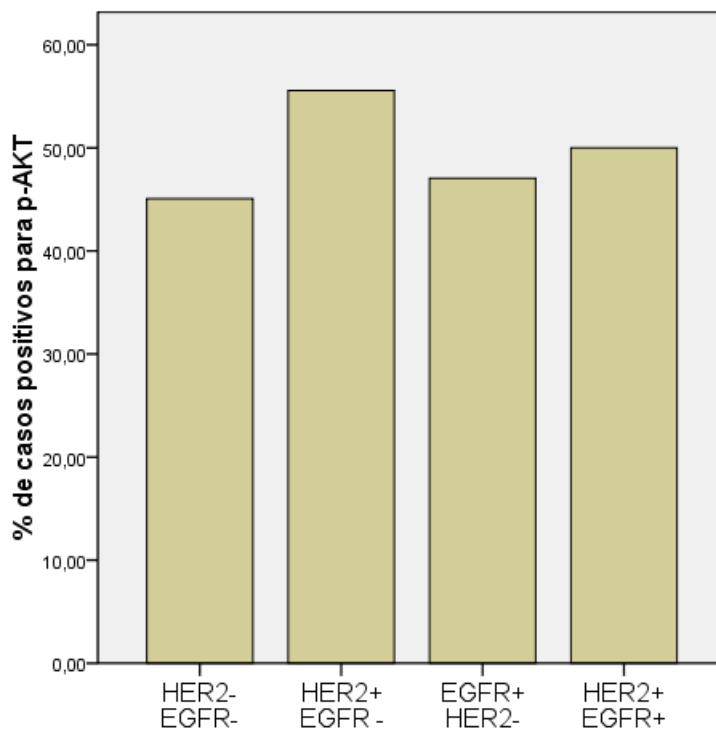


FIGURA 58. Porcentaje de expresión de p-AKT en función de la expresión de HER2 y EGFR



2.3.3 P-ERK en relación a los receptores

Como se puede ver en la TABLA 30 no se observaron diferencias entre los casos HER2 positivos y negativos en relación a la activación de la vía p-ERK. Con EGFR se obtuvieron resultados similares como queda expresado en la TABLA 31.

TABLA 30. Tabla de contingencia para la expresión de p-ERK y HER2

			p-ERK		Total
			Neg	Pos	
HER2	Neg	Núm	89	17	106
		%	84,0%	16,0%	100,0%
	Pos	Núm	9	2	11
		%	81,8%	18,2%	100,0%
Total	Núm		98	19	117
	%		83,8%	16,2%	100,0%

P=0.854

TABLA 31. Tabla de contingencia para la expresión de p-ERK y EGFR

			p-ERK		Total
			Neg	Pos	
EGFR	Neg	Núm	82	18	100
		%	82,0%	18,0%	100,0%
	Pos	Núm	16	3	19
		%	84,2%	15,8%	100,0%
Total	Núm		98	21	119
	%		82,4%	17,6%	100,0%

P=0.817

En la FIGURA 59 se representa el porcentaje de casos positivos para cada uno de los receptores en función de si ERK está activado o no. En la FIGURA 60 se muestra el

porcentaje de casos positivos en función de la expresión individual o conjunta de los receptores. En grupo de doble positividad es poco representativo ya que estuvo constituido únicamente por 2 casos.

FIGURA 59. Diagrama de barras que muestra las proporciones de casos positivos de HER y EGFR en función del estado de p-ERK

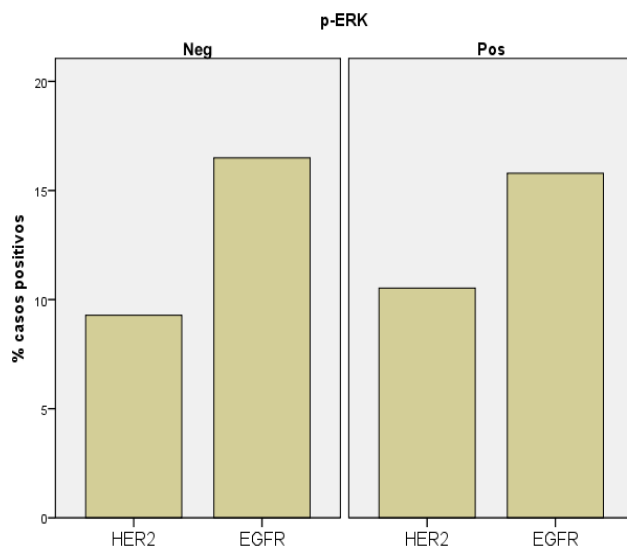
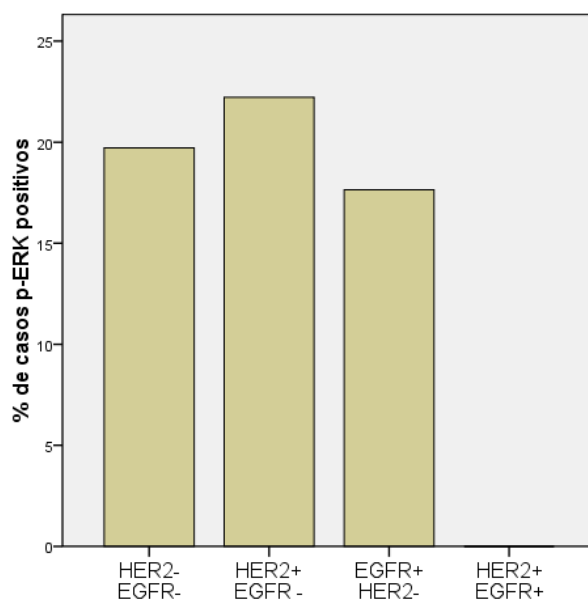


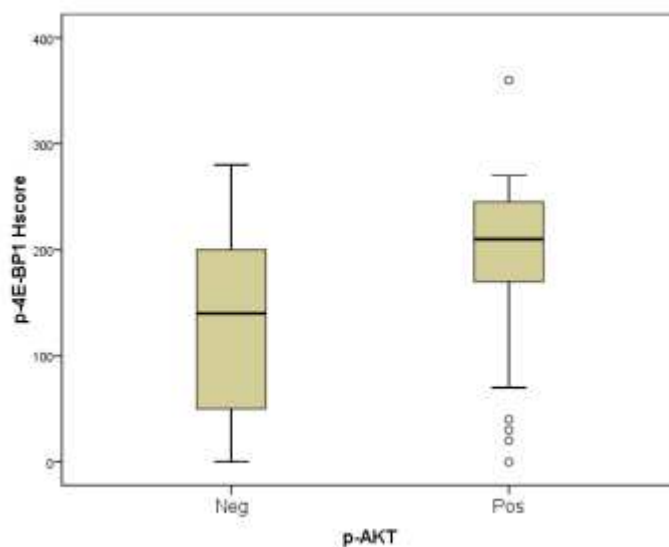
FIGURA 60. Proporción de casos positivos para p-ERK en función de los receptores EGFR y HER2



2.3.4 P-4E-BP1 en relación a la expresión de p-AKT y p-ERK

La expresión de p-4E-BP1 fue significativamente más frecuente en aquellos casos en los que se activaba AKT, con una $p=0.001$, habiendo un 77% de casos p-AKT positivos en los que también había sobreexpresión de p-4E-BP1 (FIGURA 61). Con p-ERK también se observó una diferencia significativa aunque algo menor ($p=0.031$), con positividad para p-4E-BP1 en el 76% de los casos p-ERK positivos (FIGURA 62). Para poder valorar si, además, había relación con la intensidad de la expresión de la proteína, se realizó también la estadística en función del Hscore de p-4E-BP1. Con este análisis únicamente se observó una mayor expresión de la proteína en los casos p-AKT positivos sin observarse diferencias en los p-ERK. En los primeros se obtuvo una $p=0.001$ mientras que en el segundo fue de 0.693.

FIGURA 61. Diagrama de cajas que muestra las diferencias de expresión de p-4E-BP1 en relación a la positividad de p-AKT



Se valoró también si la coexpresión de p-AKT y p-ERK podía tener alguna influencia sobre la intensidad de expresión de p-4E-BP1. El resultado fue que los casos con activación de ambas vías presentaron un nivel mayor de expresión de p-4E-BP1 pero

éste era similar a los que únicamente eran positivos para p-AKT. Es decir, p-ERK no influenciaba sobre la expresión de p-4E-BP1 ni en los casos p-AKT positivos ni en los negativos ($p=0.488$) (ver FIGURA 63).

FIGURA 62. Diagrama de cajas que muestra las diferencias de expresión de p-4E-BP1 en relación a la positividad de p-ERK

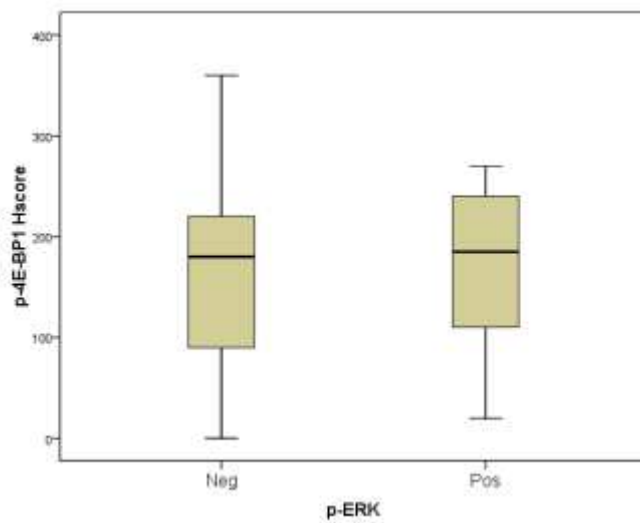
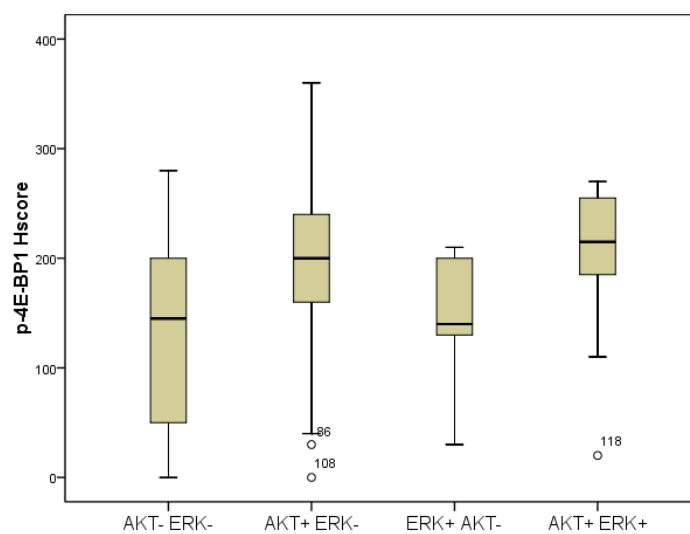


FIGURA 63. Diagrama de cajas que muestra las diferencias de expresión de p-4E-BP1 en relación a la positividad o negatividad de p-AKT y/o p-ERK

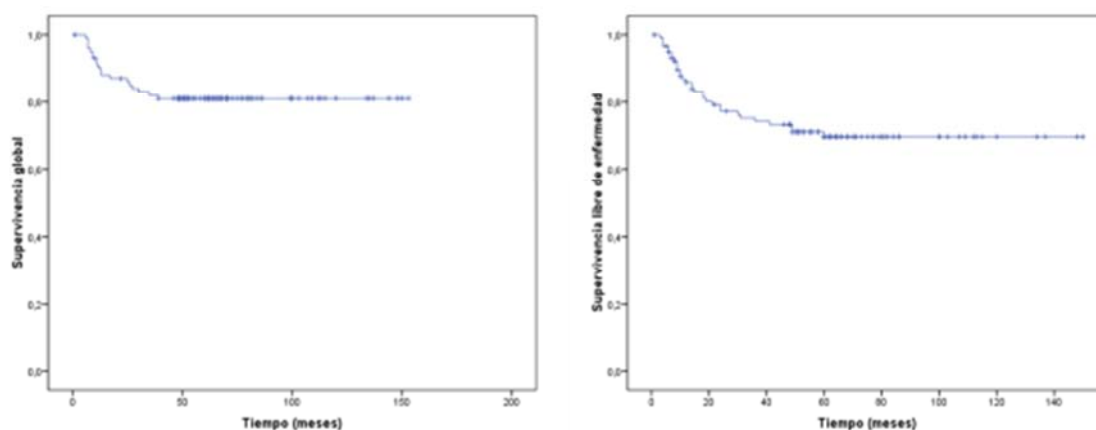


2.4 ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA

Los resultados del análisis de la supervivencia global y libre de enfermedad de los carcinomas de endometrio se muestran a continuación.

La supervivencia global de la serie con un seguimiento medio de 62.3 meses (rango de 1-153 meses) en el que se detectaron 19 muertes y 32 recidivas. La supervivencia media fue de 127 meses. La FIGURA 64 muestra las curvas globales de supervivencia y periodo libre de enfermedad de la serie.

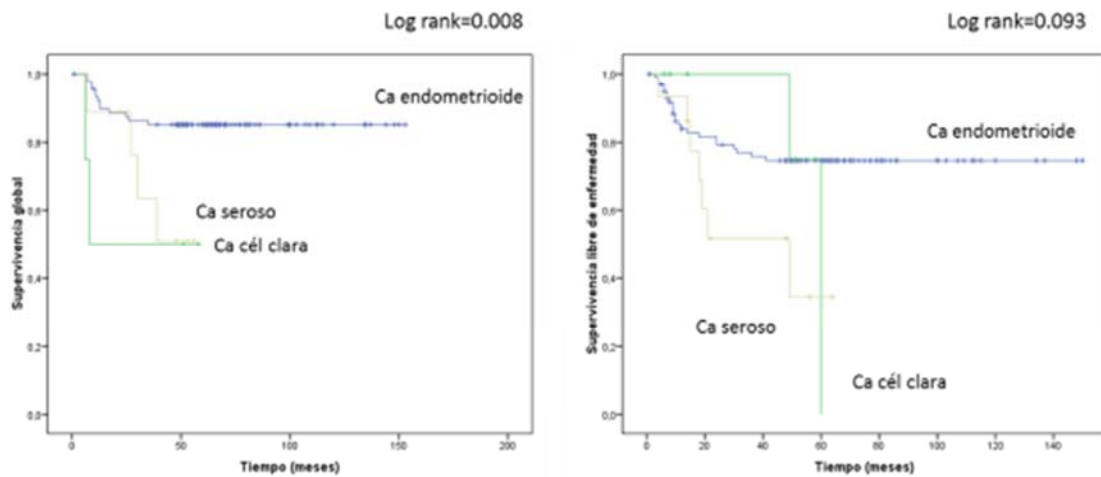
FIGURA 64. Curva de supervivencia global y libre de enfermedad de los carcinomas de endometrio



2.4.1 Tipo histológico

El tipo histológico mostró valor en la determinación de la supervivencia de las pacientes. Concretamente, los carcinomas de tipo II mostraron claramente una supervivencia inferior a los carcinomas de tipo I como se puede apreciar en la FIGURA 65, con un valor estadísticamente significativo. La supervivencia media de los carcinomas endometrioides fue de 132 meses mientras que la de los carcinomas serosos fue de 32.5 meses y los carcinomas serosos de 41 meses. En la FIGURA 65 se muestran las curvas y puede observarse que el valor del tipo histológico varía cuando se mira el periodo libre de enfermedad se pierden estas diferencias.

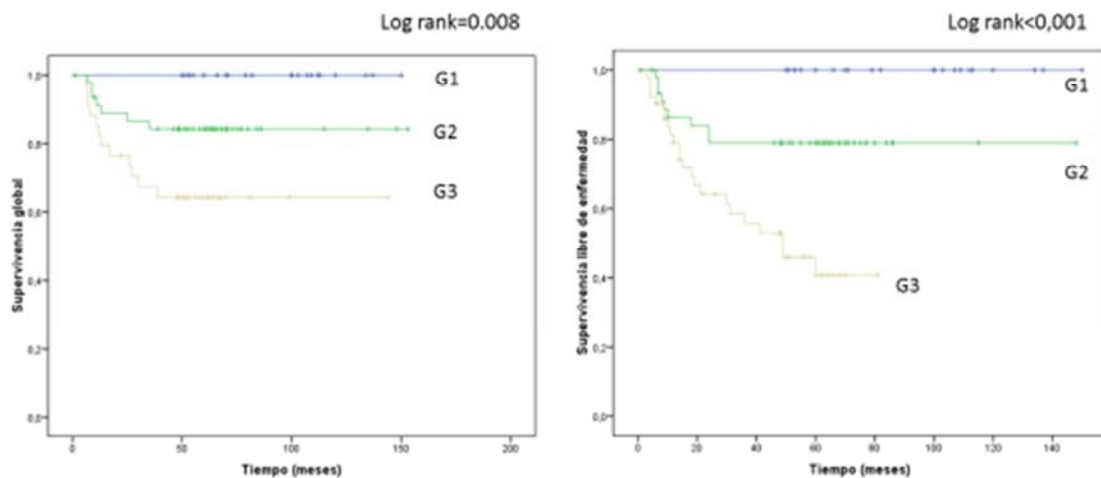
FIGURA 65. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para el tipo histológico



2.4.2 Grado de diferenciación

El grado de diferenciación se muestra como una variable de valor pronóstico en la que, como puede verse en la FIGURA 66, ningún carcinoma bien diferenciado murió durante el periodo de seguimiento. Estas diferencias se pierden en el periodo de seguimiento en el que no se detectaron eventos en los bien diferenciados y se mantienen las diferencias entre los distintos grados de manera significativa.

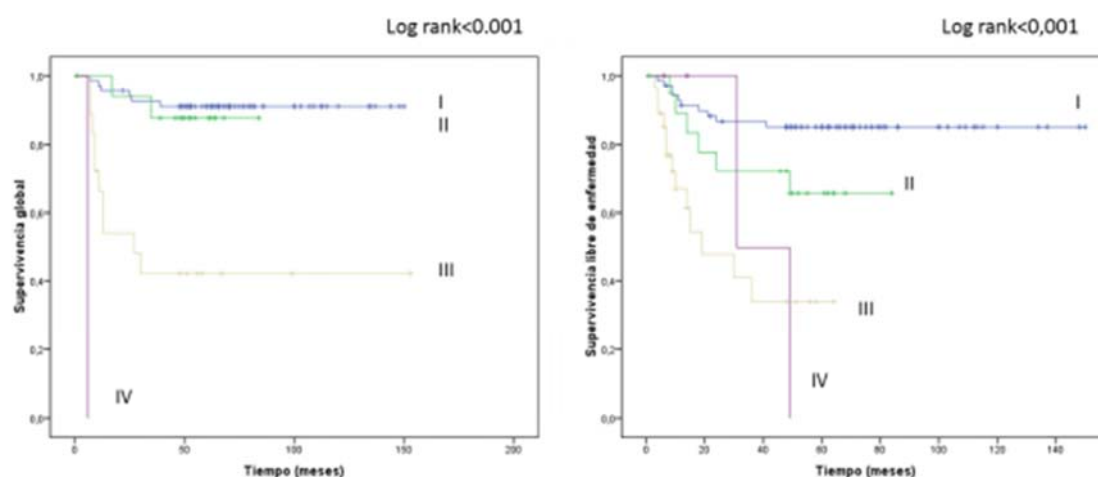
FIGURA 66. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad según el grado histológico



2.4.3 Estadio FIGO

El estadio es uno de los factores pronósticos más importantes. En nuestra serie los diferentes estadios muestran un impacto claro en el pronóstico, llamando la atención la proximidad de comportamiento de los estadios I y II respecto a los avanzados. Estas diferencias son altamente significativas tanto en la supervivencia global como en la libre de enfermedad. Los casos en estadio I, mostraron una supervivencia media de 238 meses a diferencia de los estadios IV que fue de 6 meses, estando el resto en valores intermedios a éstos.

FIGURA 67. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad según el estadio de la FIGO

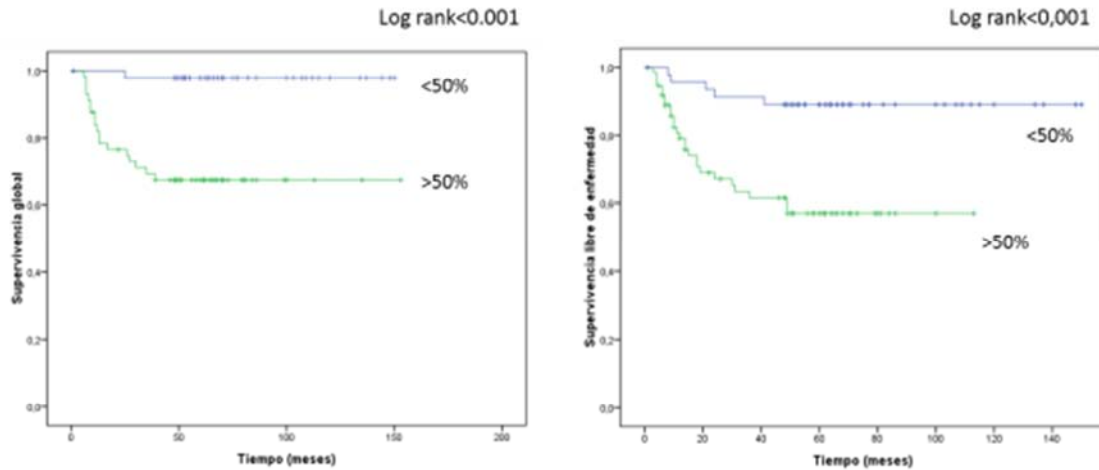


2.4.4 Infiltración miometrial

Independientemente del estadio se valoró el grado de infiltración endometrial. Aunque todos los casos en estadio III y IV presentaron infiltración >50% de la pared miometrial, hubo 9 casos en estadio II en los que la infiltración fue <50%. Las diferencias en la supervivencia global y libre de enfermedad fueron altamente significativas entre los 2

grupos, con una diferencia de 40 meses de supervivencia entre ambos. En la FIGURA 68 pueden verse las gráficas correspondientes.

FIGURA 68. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad según la infiltración miometrial

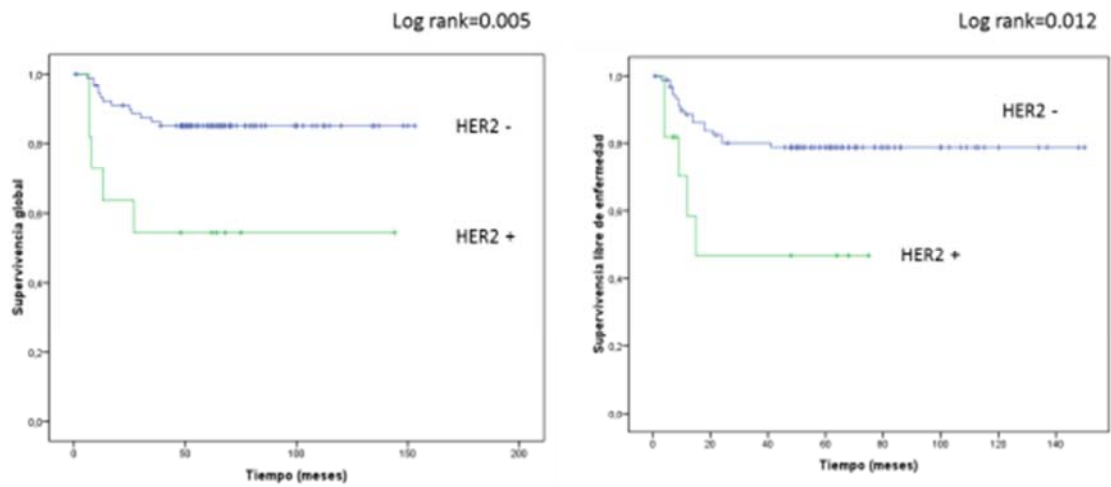


2.4.5 Marcadores inmunohistoquímicos

A continuación se muestran los resultados del análisis de la supervivencia de los carcinomas de endometrio en función de la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos estudiados.

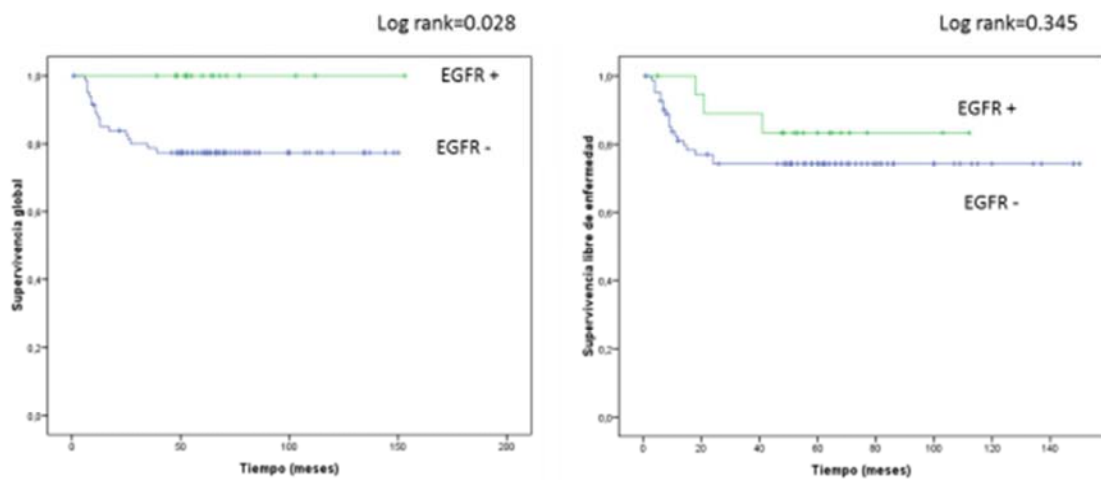
En la FIGURA 69 se muestran las curvas de supervivencia para HER2. Tanto la supervivencia global como la libre de enfermedad mostraron diferencias entre los casos positivos y negativos que fueron estadísticamente significativas. Los casos positivos tuvieron una supervivencia media inferior de 52.7 meses que los negativos.

FIGURA 69. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad en función de HER2



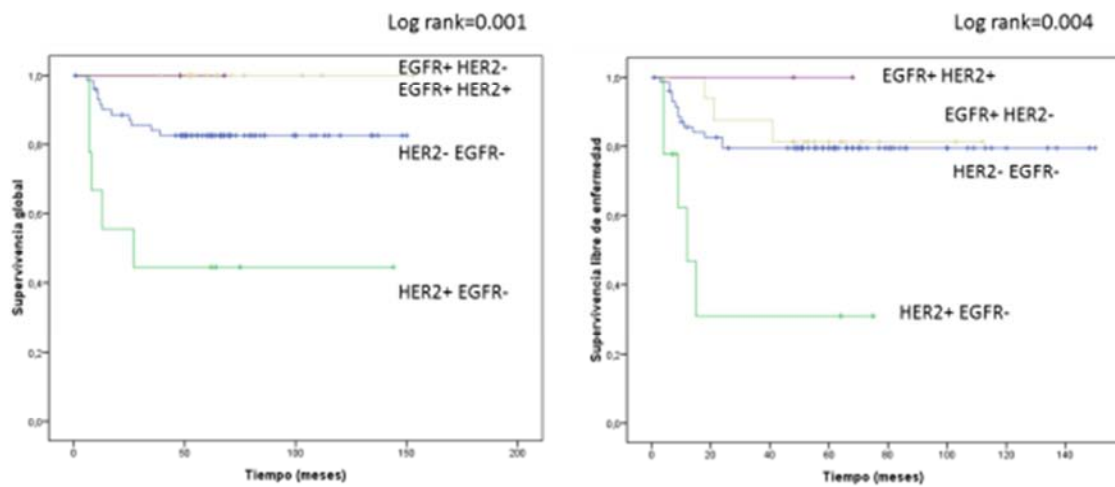
Respecto a EGFR se muestran los resultados en la FIGURA 70. Se observó una peor supervivencia en los casos que negativos tanto para la supervivencia global como libre de enfermedad, sin ser esta última significativa. Ninguno de los casos EGFR positivos mostró ningún evento.

FIGURA 70. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para EGFR



La valoración de la supervivencia en función de la coexpresión de ambos receptores se muestra en la FIGURA 71. Puede observarse que, de forma significativa, la expresión de HER2 mantenía el valor pronóstico si EGFR era negativo. Los casos que fueron positivos para ambos receptores no mostraron ningún evento.

FIGURA 71. Curvas de supervivencia en función de la coexpresión de los receptores



p-AKT no mostró diferencias en las curvas de supervivencia global ni libre de enfermedad (FIGURA 72) cuando se valoraba de forma conjunta la expresión nuclear y citoplasmática. La supervivencia global de ambos grupos fue prácticamente la misma, de 125 meses, próxima a la global de la serie. En la FIGURA 72 y FIGURA 73 se pueden ver las curvas de supervivencia para la expresión nuclear y citoplasmática valorada de forma independiente. En cuanto a la supervivencia global no se observaron diferencias. En la libre de enfermedad, los casos que no expresaron AKT citoplasmático recidivaron antes que los positivos.

FIGURA 72. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para p-AKT total

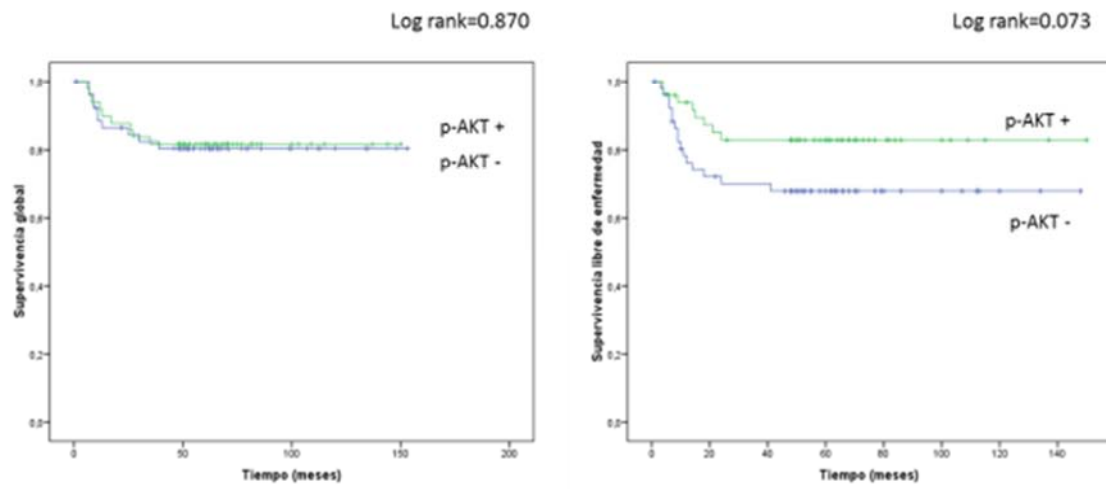


FIGURA 73. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para p-AKT nuclear

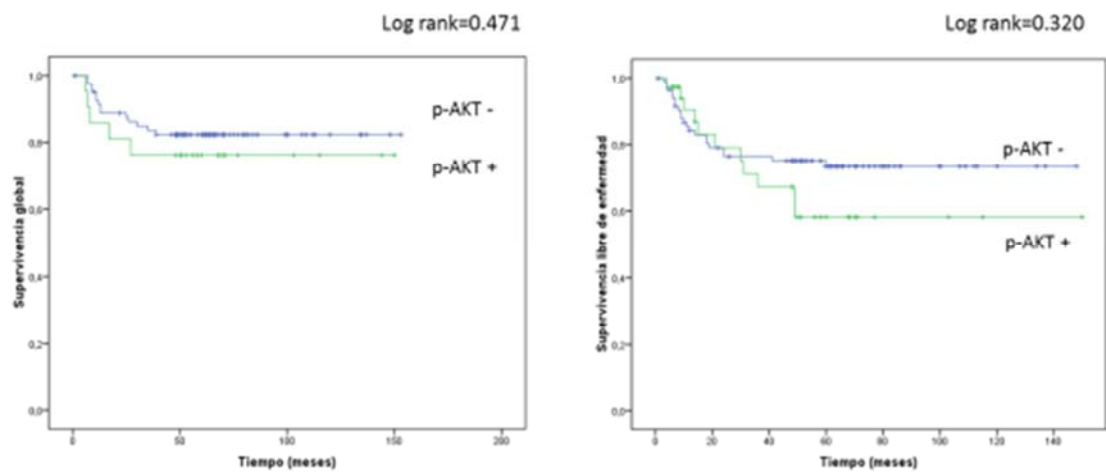
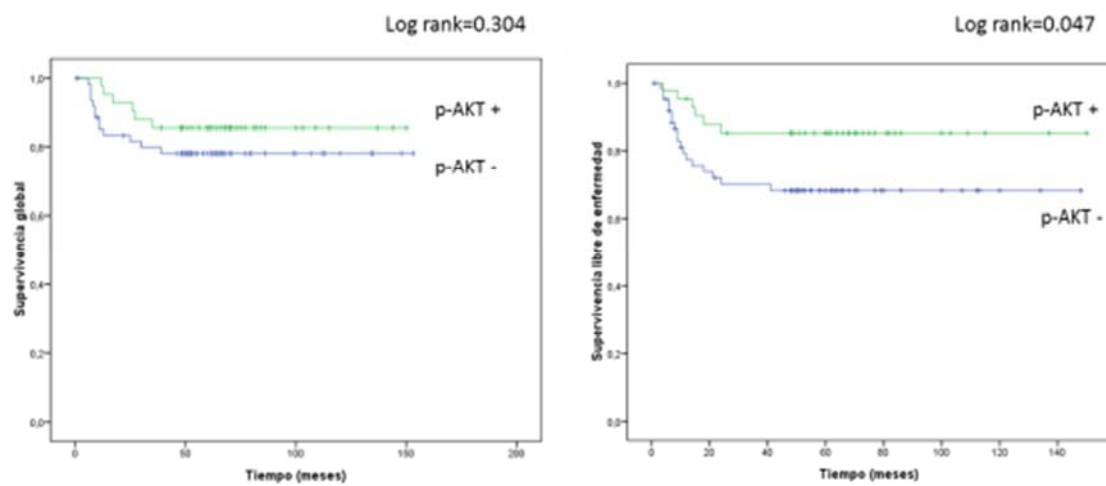
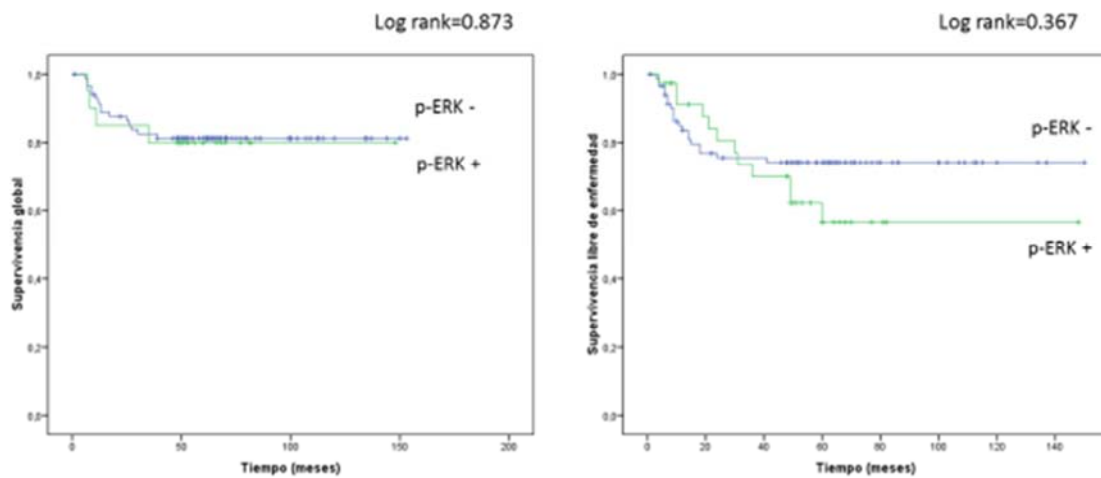


FIGURA 74. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para p-AKT citoplasmático



En el caso de p-ERK tampoco se observaron diferencias significativas si se valoraba la expresión nuclear y citoplasmática de forma conjunta, aunque los casos negativos mostraron una supervivencia media ligeramente menor de 9 meses. En el análisis del periodo libre de enfermedad, ambas curvas fueron prácticamente superponibles (FIGURA 75).

FIGURA 75. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para p-ERK total



Al valorar de forma separada la expresión de p-ERK en función de la localización, se obtuvieron resultados similares, excepto en la supervivencia libre de enfermedad en la que los casos con expresión citoplasmática recidivaban más rápidamente que los negativos, de forma significativa (ver FIGURA 76 y FIGURA 77).

FIGURA 76. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para p-ERK nuclear

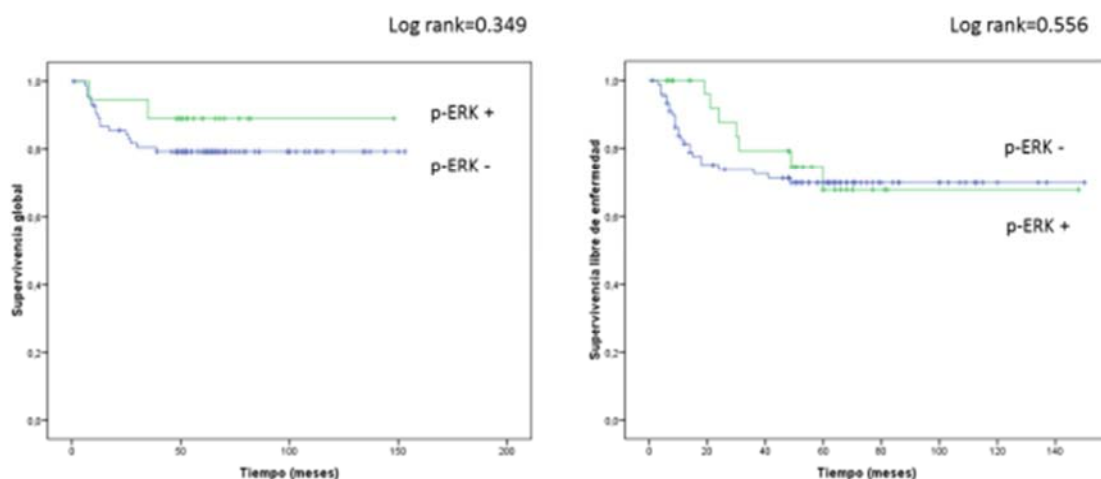
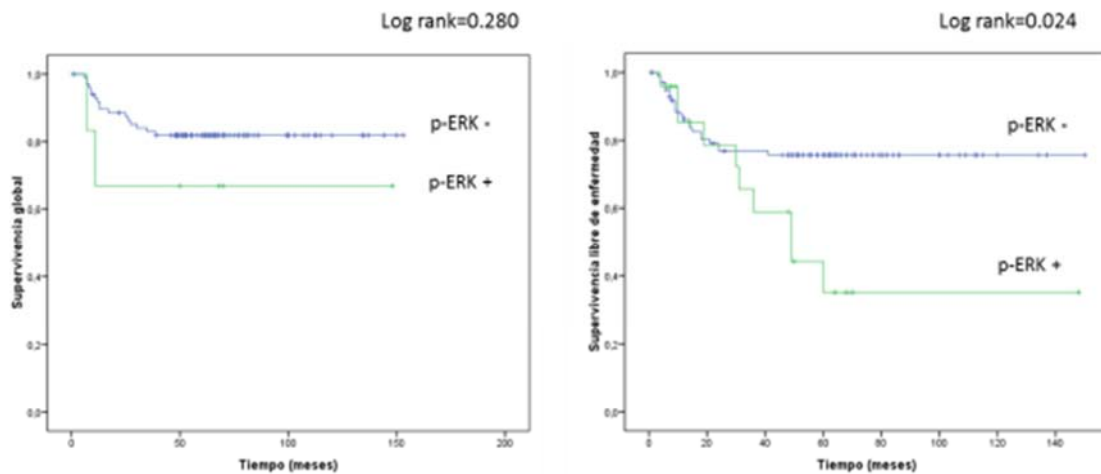
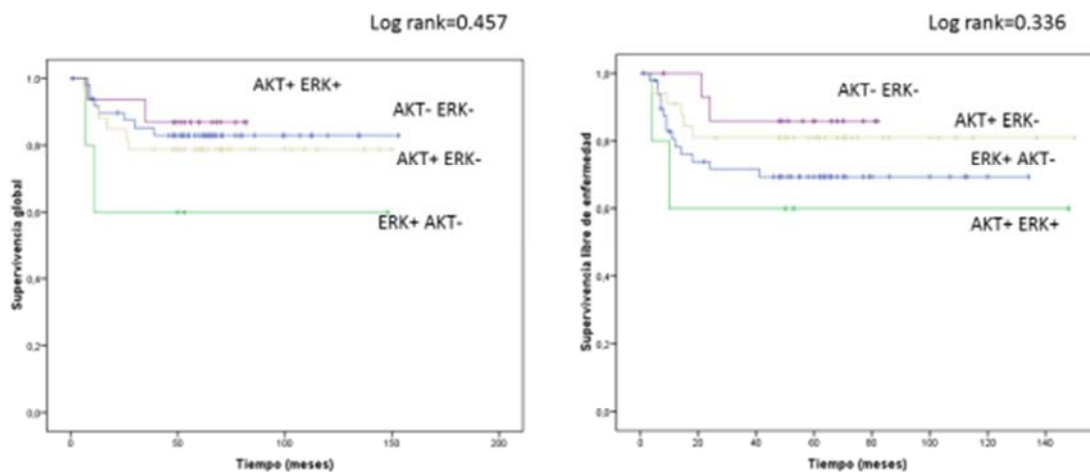


FIGURA 77. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para p-ERK citoplasmático



En la FIGURA 78 se muestran las curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para la activación tanto de AKT y ERK de forma conjunta. Los casos ERK positivos se comportaron de forma más agresiva siempre que no estuviera activado AKT simultáneamente, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

FIGURA 78. Curvas de supervivencia para la activación de AKT y ERK.



Por último, p-4E-BP1 mostró diferencias estadísticas de supervivencia entre los casos positivos y los negativos como puede apreciarse en la FIGURA 79. Los casos positivos

mostraron una supervivencia media de 141 meses mientras que los negativos fue de 111 meses. En el primer grupo hubieron 3 eventos y en el segundo 16 eventos. En el estudio de la supervivencia libre de enfermedad no se encontraron diferencias relevantes entre los 2 grupos. En la FIGURA 80 se muestran los resultados para la expresión citoplasmática de la proteína, en la que se pierde el valor pronóstico que se observaba en la nuclear.

FIGURA 79. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para p-4E-BP1

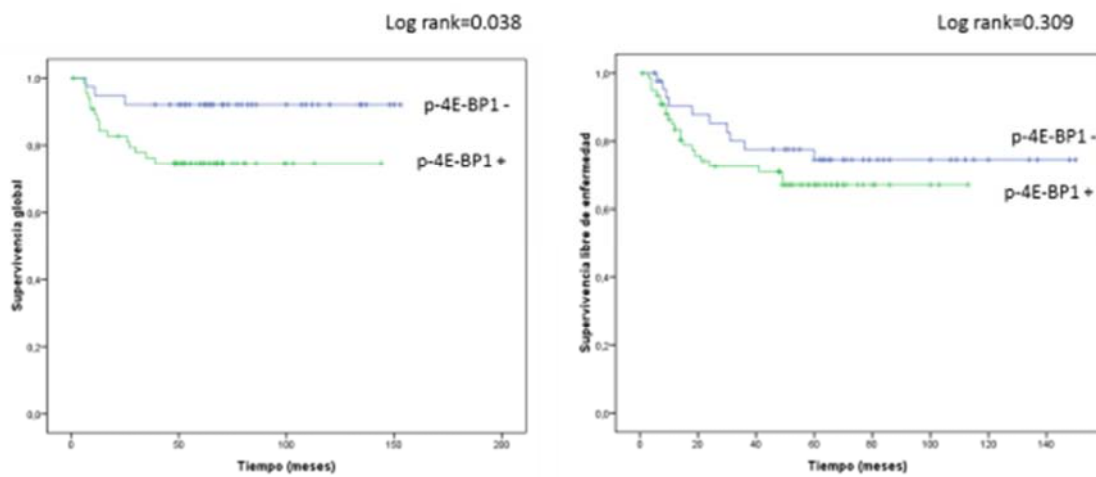
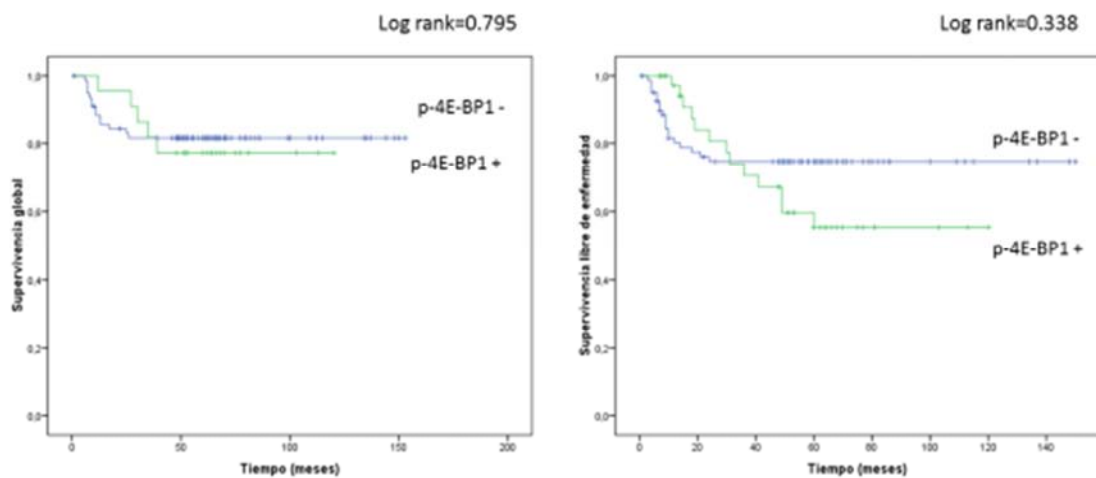


FIGURA 80. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para p-4E-BP1 citoplasmático



2.5 Análisis multivariante

El estudio con la regresión de Cox para calcular los riesgos proporcionales de las distintas variables que analizadas de forma individual fueron significativas resultó el mostrado en la TABLA 32. Fueron significativos los valores de HER2 y el estadio y no fueron significativos ni el grado ni la expresión de p-4E-BP1. Sin embargo, el *hazard ratio* para p-4E-BP1 fue mayor que 1 por lo que aporta valor al riesgo de morir en las pacientes con cáncer de endometrio.

TABLA 32. Regresión de Cox para cáncer de endometrio

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
her2_012_3	1,162	,565	4,232	1	,040	3,196	1,056	9,670
p4EBP1_2cr	,340	,692	,242	1	,623	1,406	,362	5,459
Grade	,904	,536	2,844	1	,092	2,470	,864	7,067
Tipo_Histol	-,633	,416	2,318	1	,128	,531	,235	1,200
Estadio	1,270	,338	14,109	1	,000	3,563	1,836	6,913

V. DISCUSIÓN

1 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

- El estudio se realizó en *tissue microarrays* (TMAs) por lo que podría suponer un problema de representatividad de muestra ante marcadores que mostraran marcada heterogeneidad tumoral. Para minimizar este posible error se realizaron cilindros de mayor diámetro a los habituales (2mm) con mayor representatividad de tejido. Además, de cada caso había 3 muestras de tejido, habiéndose demostrado en algunos estudios que con este número de cilindros los resultados están dentro del índice de confianza del 95% (369). Para mayor seguridad todos los anticuerpos se realizaron también sobre secciones completas en algunos casos confirmando los resultados del TMA.
- La valoración de los resultados inmunohistoquímicos se realizó de forma semicuantitativa utilizando el sistema Hscore, con la limitación de las variaciones intraobservador conocidas. Para minimizar esta variabilidad, para la mayoría de marcadores se utilizaron criterios más cualitativos que cuantitativos para realizar el análisis estadístico. Se agruparon como negativos los casos con intensidades muy bajas y como positivos el resto. Sin embargo, cuando se utilizó el Hscore en el análisis, se observaron resultados similares por lo que las conclusiones del trabajo están poco influenciadas por esta variabilidad.
- El estudio se realizó con anticuerpos que detectan la proteína fosforilada. El estado de fosforilación es más lábil que el de la proteína no fosforilada estimándose su conservación hasta unos 30 minutos como máximo de isquemia fría hasta su fijación (370). Esta variable preanalítica es de difícil control aunque en nuestra serie los casos fueron tratados con el mismo procedimiento por lo que

probablemente este problema afecte a todos los casos de manera similar. Si algún caso hubiera estado en un periodo de isquemia superior, sería de forma aleatoria por lo que la probabilidad de que afectara de forma significativa los resultados valorados de forma global sería baja.

- El bajo número de casos también es un factor limitante, sobretodo en algunos de los análisis en los que la segmentación de la muestra, daba lugar a grupos muy pequeños de casos. Los resultados de este trabajo deberían confirmarse en series más amplias en las que estuvieran mejor representados los tipos histológicos menos frecuentes, para poder valorarlos de forma individualizada. Sin embargo, el periodo de tiempo para la recogida de tantos casos sería demasiado alto o sería necesario agrupar casos de otros centros para poder realizarla.

2 VARIABLES CLÍNICO PATOLÓGICAS

2.1 Tipo histológico

El trabajo reúne una serie de carcinomas de ovario y una de endometrio, que comparten tipos histológicos que morfológicamente son similares pero que presentan comportamiento clínico distinto en función de la localización.

Como se menciona en la introducción el tipo histológico representa uno de los factores pronósticos más importantes, ya que, en realidad, son enfermedades distintas que coinciden en la localización (166, 371). Esto es especialmente evidente en los carcinomas de ovario, en los que el avance en el conocimiento de la histogénesis de estos tumores revela orígenes distintos. Además, también presentan alteración de vías moleculares oncogénicas distintas (104, 372). Nuestras series son casos consecutivos, habiéndose eliminado aquellos casos de los que no se disponía de datos clínicos o tejido adecuado para el estudio inmunohistoquímico, por lo que refleja la proporción de tipos histológicos en cada tipo de tumor que tenemos en nuestro entorno.

Así, en cáncer de ovario tenemos un 40% de carcinomas serosos, un 21% de carcinomas endometrioides, un 20% de carcinomas de células claras y un 20% de carcinomas mucinosos, reflejando que dentro de los carcinomas el seroso es el más frecuente (ver TABLA 3).

En cáncer de endometrio, el 80% de los casos son carcinomas endometrioides, el 12% son carcinomas serosos y el 6% carcinomas de células claras (ver TABLA 18).

Como ya está establecido en las diferentes series publicadas o en el informe de la FIGO (111, 146), el tipo histológico tiene valor pronóstico en la supervivencia global tanto en carcinomas de endometrio como de ovario con un resultado estadísticamente

significativo. Respecto al periodo libre de enfermedad también se observan diferencias aunque éstas no alcanzan la significación estadística, tanto en cáncer de ovario como de endometrio (ver FIGURA 32 y FIGURA 65).

2.2 Grado histológico

El valor del grado histológico ha sido un tema controvertido a lo largo de los años, habiéndose propuesto diversos sistemas de gradación para asegurar el valor pronóstico del mismo, especialmente en el cáncer de ovario (113, 373). Actualmente, siguiendo los esquemas de clasificación de la FIGO, fundamentalmente se gradan los carcinomas endometrioides y los mucinosos. Los carcinomas serosos y de células claras se consideran de alto grado en la mayoría de casos. En el cáncer de ovario hay un grupo de carcinomas serosos que se consideran de bajo grado y que siguen una vía oncogénica distinta a los de alto grado, aunque nuestra serie no recoge ningún caso de este tipo. En el cáncer de endometrio se sigue el mismo sistema de gradación, sin existir los carcinomas serosos de bajo grado.

Como se muestra en la TABLA 4, en nuestra serie de carcinomas de ovario estaba constituida mayoritariamente por tumores de grado 3 (69%), en un 17% de grado 2 y en un 13% de grado 1, correspondiendo la mayoría de éstos a carcinomas mucinosos. En la de cáncer de endometrio, los casos fueron de grado 3 en un 42% de grado 2 en un 38% y de grado 1 en un 19% (ver TABLA 20).

En el informe de la FIGO de cáncer de ovario y también en el de endometrio, el grado diferencia grupos pronósticos de forma significativa (111, 146). En nuestra serie también muestra curvas de supervivencia claramente diferenciadas entre grupos de grados histológicos cuando se valora la supervivencia global (ver FIGURA 33 y FIGURA 66). Cuando se valora la supervivencia libre de enfermedad también se observan diferencias aunque éstas no son estadísticamente significativas.

2.3 Estadio

El grado de diseminación de la enfermedad en el momento del diagnóstico es uno de los factores pronósticos más importantes en la mayoría de tumores del organismo. El sistema más utilizado en patología ginecológica es el de la FIGO como se representa en el CUADRO 3 para los carcinomas de ovario y en el CUADRO 7 para los de endometrio.

En la TABLA 5 y en la TABLA 21 se muestran las frecuencias de cada estadio. Los estadios avanzados (III y IV) son los más frecuentes en la serie de ovario y se encuentran en un 53.5% de casos, siendo esta frecuencia superior si sólo se tienen en cuenta los carcinomas serosos en los que estos estadios superan el 70% de los casos. Los carcinomas mucinosos fueron los que se diagnosticaron con mayor frecuencia en estadios iniciales. Estos datos contrastan con los observados en los carcinomas de endometrio en los que la mayor parte de los casos se diagnostican en estadios iniciales, estando en cerca del 60% de los casos localizados en el cuerpo del útero en el momento del diagnóstico.

En los informes anuales de la FIGO (111, 146) se demuestra el valor pronóstico de este sistema de estadificación, que también se reproduce en nuestras series de forma significativa para la supervivencia global, tanto en los carcinomas de endometrio como en los de ovario (ver FIGURA 34 y FIGURA 67).

3 MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS

3.1 Expresión de HER2

La alteración molecular que con mayor frecuencia ocasiona aumento de la actividad de HER2 es la amplificación (92). Esta amplificación se evalúa por hibridación in situ de forma rutinaria en el estudio de carcinomas de mama o gástricos. El aumento de copias del gen se traduce como un aumento de la expresión de la proteína y, por tanto, un aumento en la intensidad de tinción inmunohistoquímica. Esta técnica se usa como método de cribado, ya que los casos inmunohistoquímicamente negativos no suelen presentar amplificación genética y los casos amplificados suelen expresar de forma intensa el receptor. Estudios comparativos de la sensibilidad de las diferentes técnicas ha puesto de manifiesto el alto valor predictivo negativo de los casos sin expresión de la proteína por inmunohistoquímica y los casos con expresión intensa (3+) altamente predictivos para la detección de amplificación génica. Sin embargo, no todos los casos con expresión de HER2, generalmente de forma débil o moderada, es debida a la amplificación (374). Los casos con positivities de grado 2, son de menor reproducibilidad y es necesaria la aplicación de técnicas moleculares para determinar la existencia de amplificación. Es por ello que en nuestra serie hemos considerado únicamente como positivos aquellos casos en que la tinción inmunohistoquímica era grado 3, es decir, positividad en toda la membrana citoplasmática y de manera intensa. En nuestra serie observamos aumento de expresión en un 17.8% de los tumores de ovario. Además, únicamente los tumores malignos mostraron positividad inmunohistoquímica para HER2, siendo positivos el 30.7% de los mismos. En la literatura se describen porcentajes similares, que oscilan entre el 15 y el 10% de carcinomas (94, 305, 375). Los carcinomas de ovario en los que obtuvimos mayor

expresión de HER2 fueron los de célula clara (46.7%) resultado superponible al obtenido por Meden H et al con un 46% (376). Como en este mismo estudio, los carcinomas mucinosos son los que presentaron menor expresión de HER2. Slamon et al estudiaron las alteraciones de HER2 en cáncer de ovario y se identificó amplificación en aproximadamente el 30% de los mismos (92). Se observaron variaciones en la expresión de HER2 según el tipo histológico y el grado histológico. En algunos trabajos, los tumores con mayor expresión de HER2 fueron los carcinomas de células claras (46%) y los serosos (23%), así como los de mayor grado histológico. Respecto al grado, en nuestra serie pudimos comprobar que los carcinomas peor diferenciados presentaron mayor expresión de HER2, siendo los carcinoma G3 los más frecuentemente positivos (45.2%). Sin embargo, las diferencias observadas entre estadios no fueron significativas ($p = 0.208$) como se muestra en la TABLA 23.

En cáncer de endometrio también se observa sobreexpresión de HER2 y se consideraron como en el ovario positivos únicamente los casos con expresión intensa de la proteína. En esta localización, la mayor parte de casos positivos eran carcinomas, pero también pudo observarse una hiperplasia compleja que también mostró positividad moderada por lo que se clasificó como negativa. En nuestra serie, el 11% de los carcinomas fueron positivos, fundamentalmente los tipos II. En los trabajos publicados, los tumores que más frecuentemente son positivos son los carcinomas serosos con unos rangos de positividad muy variables (14-80%) y con una frecuencia de amplificación valorada por FISH del 21-47% de los casos (209, 244, 377). Probablemente las marcadas diferencias de resultados inmunohistoquímicos entre las diferentes series sean debidas a importantes variaciones metodológicas, así como al uso de anticuerpos con especificidad y sensibilidad muy heterogéneas (378). En nuestros casos, los carcinomas serosos fueron positivos en el 25%, entrando dentro de lo reportado y aproximándose al

porcentaje descrito como amplificado en la serie más grande publicada (379). También observamos mayor positividad en los carcinomas de alto grado de forma significativa, incluyendo los carcinomas endometrioides. Sin embargo, no se observó asociación de la expresión de HER2 con la capacidad de infiltración y diseminación, dada la falta de asociación con el estadio (ver TABLA 23).

En los tumores de ovario tanto los tumores benignos como los borderline fueron negativos para HER2. En el caso del endometrio, los controles de endometrio no tumoral resultaron todos negativos, incluidas las hiperplasias endometriales, observándose únicamente en una de ellas tinción moderada, por lo que se valoró como negativa. Estos datos apoyan que la alteración de HER2 es una alteración tardía en el proceso de oncogénesis o que únicamente se da en los casos que van a evolucionar a carcinoma y además de alto grado.

El valor pronóstico de la sobreexpresión de HER2 ha sido motivo de numerosos estudios. En tumores de otras localizaciones, como mama, se ha demostrado claramente su relación con la aparición de recidivas tempranas, supervivencia global y grado de respuesta al tratamiento (92). En el ovario la mayoría de trabajos muestran correlación con la supervivencia global, aunque en el análisis multivariado en algunos estudios no se mantiene como factor independiente (91, 94, 132, 375, 380, 381). En nuestra serie, el análisis de la supervivencia muestra una disminución de la misma en los casos positivos con una supervivencia media de 47 meses frente a 58 meses en los casos negativos, siendo estas diferencias más marcadas a partir de los 40 meses del diagnóstico. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p=0.191$).

En el carcinoma de endometrio se asocia con más frecuencia a peor pronóstico, incluso como valor independiente (209, 244). Además, en el estudio por FISH las diferencias de

ratio de HER2/CEN7 también tienen impacto en el pronóstico (382). En nuestra serie, la expresión de HER2 también mostró valor pronóstico de manera estadísticamente significativa como puede verse en la FIGURA 69, con un *log rank* =0.005. Igualmente, los casos HER2 positivos recidivaron antes que los negativos ($p=0.012$).

El interés del estudio de HER2 en estos tumores, independientemente del significado pronóstico que pueda tener, radica en la posibilidad de que las pacientes puedan beneficiarse de un tratamiento específico que bloquee el receptor. En este sentido, se han realizado algunos ensayos clínicos con trastuzumab en carcinomas de ovario refractarios a los tratamientos habituales pero se han obtenido resultados significativos, con solamente respuestas del 7.3% de los casos positivos (90). También se han realizado ensayos en carcinomas avanzados de endometrio o en enfermedad recurrente, y aunque se ha descrito actividad del fármaco en casos aislados, en el ensayo clínico no se observaron beneficios de este tratamiento (212). En relación a estos resultados se ha criticado que el ensayo mezclara carcinomas de tipo I y tipo II, cuando los casos que principalmente sobreexpresan HER2 son los segundos. También es de interés mencionar que recientemente se ha visto que un porcentaje elevado de los carcinomas de alto grado de endometrio que sobreexpresan HER2 tienen la variante truncada de la proteína p95HER2, que es insensible a trastuzumab y podría explicar en parte la falta de respuesta al tratamiento en casi la mitad de los casos (383).

3.2 Expresión de EGFR

EGFR es, como HER2, un miembro de la familia de los receptores de crecimiento epidérmico que también se ha involucrado en diversos tipos de tumores. Se puede encontrar alterado por mutaciones, amplificación génica o únicamente sobreexpresión del receptor. Las mutaciones de EGFR son especialmente importantes en carcinomas no microcíticos de pulmón donde son predictores de respuesta a tratamientos inhibidores

del receptor (384). Igualmente, el estudio de la amplificación del gen de EGFR se realiza de rutina en el estudio de los glioblastomas en los que tiene un papel patogenético y pronóstico (385). La sobreexpresión de la proteína se encuentra en gran variedad de tumores que van desde los carcinomas colorrectales, gástricos, tumores de cabeza y cuello o mama (386-390). También se ha descrito en tumores ginecológicos, particularmente en carcinomas de ovario y cérvix, en los que se le ha atribuido un papel pronóstico en algunos trabajos. Aunque la expresión inmunohistoquímica de EGFR no aporta información sobre si existe algún tipo de alteración molecular o funcional del receptor, también se ha relacionado con el pronóstico o bien ha demostrado utilidad diagnóstica en algunos trabajos (391, 392).

En carcinomas de ovario se han publicado resultados muy variables de positividad para EGFR que oscilan entre 13-80% de casos. Estas discrepancias de resultados probablemente son debidas a diferencias técnicas entre los trabajos. A nivel molecular, las mutaciones de EGFR son muy poco frecuentes en los carcinomas de ovario, encontrándose en el 4% de los tumores (393). La amplificación, valorada por FISH, es más frecuente y se encuentra fundamentalmente en carcinomas serosos. Se ha visto amplificación en aproximadamente el 6% de los carcinomas y en el 20% de los carcinomas serosos, habiendo casos en los que se observa un resultado inverso entre tumor primario y su recidiva, atribuyéndose estas diferencias a la heterogeneidad tumoral, por lo que probablemente, el número de casos amplificado sea más alto (392). En nuestra serie, el 53% de los carcinomas mostraron sobreexpresión siendo un valor concordante con el observado en otras series (88). Como en la mayoría de series, tampoco observamos relación con las variables clínicas, el tipo histológico, grado o el estadio (ver TABLA 7), aunque los tumores de alto grado eran más frecuentemente positivos que los bien diferenciados.

En los carcinomas de endometrio el número de trabajos que valoran EGFR es sensiblemente menor. Como en el carcinoma de ovario, también hay disparidad de resultados en cuanto a frecuencia de sobreexpresión del receptor, oscilando entre el 10 y el 67% de casos. La mayoría de series coinciden en que los carcinomas endometrioides son los que lo sobreexpresan con mayor frecuencia y que también lo hacen los grados 1, sin encontrar relación con el estadio clínico (214). En nuestra serie, el 19% de los casos mostraron sobreexpresión de EGFR, sin embargo, fueron más frecuentemente positivos los carcinomas serosos que los endometrioides. Al valorar las diferencias de expresión en función del grado histológico, se observó que los bien diferenciados eran positivos con mayor frecuencia que los de alto grado, coincidiendo con la mayoría de trabajos publicados (214, 394). Como en estas series, en la nuestra no encontramos relación con el estadio clínico (ver TABLA 24) sin embargo, sí que se observó menor expresión del receptor en los casos que presentaron mayor infiltración miometrial, de forma significativa. Es decir, en nuestra serie se puede observar una tendencia a expresar más EGFR en aquellos casos con características más indolentes de carcinoma de endometrio. En nuestra serie, se ha observado sobreexpresión de EGFR tanto en tumores benignos de ovario como en los tumores borderline. Sin embargo, en los controles de endometrio normal e hiperplásico, EGFR fue negativo. Este resultado sugiere que la sobreexpresión se produce en las muestras tumorales en las que existe una clonalidad de las células y no en tejidos no tumorales aunque algunos sean lesiones de riesgo de transformación maligna.

El valor pronóstico de EGFR en cáncer de ovario ha sido motivo de debate. En diferentes trabajos los casos con expresión inmunohistoquímica para EGFR se comportan peor, independientemente de otros factores clínicos o histológicos (395)

aunque en otros si se observó correlación con el estadio clínico (396). En un trabajo también se observó valor pronóstico estudiando únicamente casos en estadios I y II (397). Sin embargo, el número de estudios en los que no se observa relación con la supervivencia son mayores. Es de interés que muchos trabajos analizan estadios clínicos concretos o casos con enfermedad avanzada, sin observarse diferencias de comportamiento entre los casos positivos y los negativos (88, 398, 399). En nuestra serie, como se puede observar en la FIGURA 36, no se demostró valor pronóstico ni en la supervivencia global ni en el periodo libre de enfermedad.

En cáncer de endometrio, la expresión de EGFR se asocia a bajo grado y a carcinomas tipo I por lo que en general se ha asociado a mejor pronóstico (400), sin embargo, cuando se valora exclusivamente en el grupo de carcinomas serosos si se observa un peor comportamiento en los casos positivos (214). Estos trabajos sugieren que EGFR juega papeles diferentes en función del tipo histológico, por lo que en los carcinomas serosos se podrían plantear terapias para bloquear el receptor. En nuestra serie, los casos positivos son los que presentan mejor pronóstico, teniendo significativamente mejores supervivencias globales. En el estudio de la supervivencia libre de enfermedad, los casos positivos tenían un mejor comportamiento pero no era estadísticamente significativo. Estos resultados concuerdan con los comentados, aunque en nuestra serie no se pudo realizar el estudio de supervivencia en función del tipo histológico, dado que el número de casos de carcinomas serosos es insuficiente.

Por otro lado, la coexpresión de ambos receptores se observó en el 33% de los carcinomas de ovario mientras que en los de endometrio únicamente en el 2%. No se observó asociación estadística con ninguno de los parámetros clínicos e histológicos

analizados ni diferencias pronósticas por el hecho de que existiera coexpresión de HER2 y EGFR.

3.3 Expresión de AKT fosforilado

AKT es una serina-treonina proteína quinasa también llamada proteína quinasa B que es una molécula central en una vía que regula la supervivencia celular, incluyendo procesos como la apoptosis, la proliferación, diferenciación y metabolismo celular. Es decir, recibe el estímulo a partir de los receptores de la membrana y la señal diverge hacia vías muy diferentes regulando funciones muy diversas (313). Una de las principales es la regulación de mTOR. La proteína tiene diversos puntos de fosforilación, siendo la serina 473 la que depende más directamente de las vías procedentes de los receptores de los factores de crecimiento y, además, es esencial para la activación completa de la proteína (401). Este sitio de fosforilación es el que estudiamos inmunohistoquímicamente en nuestra serie. No se han descrito mutaciones puntuales que afecten AKT en patología neoplásica, aunque sí amplificaciones génicas en carcinomas de ovario, asociándose estos casos a tumores de alto grado (402). En la mayoría de tumores, la activación de AKT se produce a través de la vía de señalización que se inician en el receptor de membrana. Esta hiperactivación de la vía se ha descrito en múltiples tumores como la mayoría de carcinomas de tiroides o linfomas anaplásicos y en más de la mitad de casos de gliomas, carcinomas no microcíticos de pulmón, melanomas o mesoteliomas (322, 403, 404).

En nuestra serie se observó tinción para AKT fosforilado tanto en núcleo como en citoplasma, siendo éste un hecho que no variaba sensiblemente los resultados, aunque se valoró de forma independiente para cada localización. En las series publicadas tampoco se observan diferencias al valorar la localización subcelular de la proteína de forma

independiente (170, 405, 406). En los trabajos in vitro se demuestra que la activación de AKT ocurre en la zona adyacente a la membrana y posteriormente se trasloca al citoplasma y al núcleo (407). La función exacta de AKT en el núcleo no es bien conocida aunque activa algunas moléculas como factores de transcripción o receptores hormonales, siempre con funciones que conllevan un aumento de la supervivencia celular. Además, se ha visto que según la isoforma de AKT que se estudie, ésta se puede localizar en sitios diferentes. AKT1 y AKT3 pueden encontrarse tanto en núcleo como citoplasma y AKT2 en la mitocondria (408, 409). En un trabajo realizado en cáncer de mama se encontraron resultados diferentes en función de la localización subcelular y fue la expresión nuclear la que se asociaba a la expresión de receptores hormonales y a subtipo luminal A a diferencia de la expresión citoplasmática. Además, la expresión nuclear era la única que tenía valor pronóstico (410).

En los carcinomas de ovario se describe sobreexpresión de AKT fosforilado en aproximadamente el 40% de casos. En la mayoría de tumores se asoció la sobreexpresión con la agresividad del tumor, siendo más frecuentemente positivos los altos grados y los estadios avanzados (411). Sin embargo, en otras series no se observó relación ni con tipo histológico, grado o estadio (405). En nuestra serie de carcinomas de ovario se objetivó positividad en el 48% de casos, siendo esta frecuencia concordante con lo publicado. La sobreexpresión de p-AKT valorada de forma global fue mayor en los carcinomas que en los tumores borderline y los tumores benignos, aunque estadísticamente las diferencias no fueron significativas (ver TABLA 8). Respecto a la expresión en función del tipo histológico, se observó que los carcinomas mucinosos eran positivos con menor frecuencia y que los más frecuentemente positivos eran los carcinomas de células claras y los endometrioides. Esta diferencia puede estar relacionada con los mecanismos patogénéticos de estos tipos histológicos, ya que estos

últimos, se relacionan con más frecuencia a inactivación de PTEN y por tanto hiperactivación de la vía de AKT, habiéndose planteado en estos tipos histológicos como posible diana terapéutica (412, 413). Como en otras series de carcinoma de ovario, en la nuestra, los carcinomas de alto grado presentaron mayor frecuencia de activación de AKT que los de bajo grado, aunque con una diferencia estadística no significativa.

En los carcinomas de endometrio, especialmente los tipos 1, la vía AKT se encuentra activada de forma constitutiva dado que la alteración molecular más recurrente en estos tumores es la inactivación de PTEN. Se describe activación de AKT en el 40-48% de los carcinomas endometrioides (167, 414) sin observarse correlación con los distintos parámetros clínicos ni patológicos, incluyendo el tipo histológico, el grado o el estadio (415). En nuestra serie, observamos resultados diferentes en función de la localización de la positividad. Globalmente, se detectó expresión en un 47% de los carcinomas observándose expresión nuclear en un 29% y citoplasmática en un 41%. En el caso de la expresión nuclear, se observan diferencias significativas en función del tipo histológico siendo claramente más frecuente en carcinomas de tipo 2 y especialmente en los carcinomas de células claras. También los carcinomas de alto grado expresaban con más frecuencia la proteína en el núcleo respecto al resto, siendo esta diferencia significativa. Sin embargo, esta significación tanto en el tipo histológico como en el grado se pierde si se valora sin tener en cuenta la localización, siendo ésta la forma habitual de valoración de AKT en otras series (167).

En los casos benignos y borderline se observó también expresión de p-AKT con frecuencia, siendo algo superior en los borderline si se valoraba de forma global. Sin embargo, los tumores borderline presentaron con mayor frecuencia expresión nuclear que los tumores benignos y carcinomas, de forma significativa. Este resultado puede ser

debido al bajo número de tumores borderline en la serie, comparado con los tumores benignos y los carcinomas. Igualmente, en los controles de endometrio no tumoral se observó positividad tanto en endometrios funcionales como hiperplasias, pero los endometrios atróficos fueron todos negativos. Estos resultados tienen sentido si se valora la función de AKT como mediador de la vía de señalización de las señales de supervivencia de la célula y crecimiento celular. La expresión de la molécula es un indicador del grado de activación de la célula, por lo que en las muestras correspondientes a células funcionalmente activas hay expresión y en las atróficas no existe.

Respecto a la supervivencia, en las series publicadas de cáncer de ovario la activación de AKT no se relaciona con el pronóstico (405) a diferencia de lo que ocurre con otros tumores como los de mama (406, 410) o en el melanoma (416). En nuestra serie no se observaron diferencias ni en la supervivencia global ni en la libre de enfermedad. En cáncer de endometrio tampoco se observa correlación con el pronóstico en los trabajos publicados, contrastando con el valor pronóstico que tiene la inactivación de PTEN (415). En diversos estudios se encuentra correlación entre la expresión de PTEN y la fosforilación de AKT (167), por lo que respecto a esta falta de valor pronóstico de AKT se ha hipotetizado que el valor pronóstico de PTEN puede estar más relacionado con la alteración genética en sí, que con la activación funcional de la vía (415). En nuestra serie de cáncer de endometrio tampoco observamos correlación pronóstica presentando los casos positivos y los negativos curvas superpuestas. Respecto al periodo libre de enfermedad se observa una tendencia a recidivar antes aquellos casos con menor expresión del marcador aunque no es significativa.

3.4 Expresión de ERK fosforilado

La MAPK ERK es la proteína central de la vía de señalización que transmite la señal proliferativa desde la membrana hasta el núcleo y forma parte de una cascada de señalización en la que intervienen diversas proteína-quinasa que están muy conservadas evolutivamente (351). Bajo este nombre se incluyen ERK 1 y 2 también conocidas como MAPK1 y MAPK3 y son serina treonina proteína-quinasa. Se activa por fosforilación, que realiza MEK y que a su vez es fosforilada por RAF, ambas también quinasa del mismo tipo. Los efectores de ERK son proteínas citoplasmáticas y también se trasloca al núcleo donde también puede fosforilar factores de transcripción que regulan la expresión genética. En el citoplasma tiene como dianas SOS o principalmente las quinasa MNK1 y 2 que regulan el factor de iniciación de la transcripción 4E o eIF4E, facilitando la transcripción de los mARNs, algunos de los cuales son claves para la proliferación celular (363). Otras dianas de ERK son las RSKs o quinasa de proteínas ribosomales que también se fosforilan en respuesta a estímulos antigénicos. Respecto a las dianas nucleares también se incluyen las RSKs y las MSKs y algunos factores de transcripción entre los cuales, los mejores caracterizados son los llamados factores de los complejos ternarios como Elk-1 (363). Esta traslocación al núcleo de ERK y su actividad tanto nuclear como citoplasmática, explica que inmunohistoquímicamente pueda expresarse en ambas localizaciones. En nuestros casos, también se observó expresión de p-ERK en ambas localizaciones y aunque de forma global los resultados fueron similares, en relación a algunas variables se observaron diferencias en función del sitio de expresión.

ERK fosforilado se ha estudiado en escasas series de ovario con resultados desiguales entre ellas. Se describe positividad para el marcador en un 30-40% de carcinomas de ovario (417, 418). En estos trabajos no distinguen la localización de la señal para su

evaluación. En ninguna de las series encuentran relación con parámetros clínico-patológicos como el grado, el tipo histológico o el estadio. En uno de ellos se observa incremento significativo de su expresión en muestras tumorales post-quimioterapia. En el análisis de supervivencia describen un ligero descenso de la supervivencia en los casos positivos sin ser estadísticamente significativa. (418). En un trabajo se encuentra relación pronóstica con la expresión de p-ERK y otras MAPK si se expresan en el líquido ascítico de los carcinomas serosos (419). En nuestros casos se observó tanto marcaje a nivel del núcleo como del citoplasma tanto en carcinomas de ovario como de endometrio y fue valorado de forma independiente. En cáncer de ovario la expresión nuclear fue la más frecuente observándose en un 45% de casos siendo un porcentaje similar a las series publicadas. Ésta fue más frecuente en los carcinomas de células claras y serosos, así como los endometrioides de alto grado. Como en las otras series no se encontró relación con la supervivencia global ni libre de enfermedad.

En los carcinomas de endometrio se observó sobreexpresión de ERK fosforilado en menos del 30% de casos pero se asociaba a tumores más agresivos. La expresión era mayor en carcinomas de tipo II, grados altos e incluso estadios más avanzados, sobretodo en la expresión citoplasmática, aunque al analizar las curvas de supervivencia, a pesar de tener un pronóstico algo inferior no presentan diferencias estadísticamente significativas. Únicamente se observa menor supervivencia libre de enfermedad en los casos con sobreexpresión citoplasmática de la proteína. Estos resultados son comparables con los de otras series en las que tampoco se observa relación con la supervivencia (420)

3.5 Expresión de 4E-BP1 fosforilado

La proteína 4E-BP1 es uno de los efectores del complejo TORC1 que se ha implicado en la regulación del ciclo celular, el crecimiento celular y la supervivencia. Su función principal es la unión al factor de inicio de la traducción proteica eIF4E, el cual no es activo mientras están unidos. Cuando 4E-BP1 se fosforila, libera a eIF4E y puede formarse el complejo de inicio de la traducción. De esta forma, se traducirán los mRNA que contengan la estructura CAP en el extremo 5', constituyendo la conocida como traducción CAP-dependiente (421, 422). La expresión de 4E-BP1 se ha implicado fundamentalmente en cáncer pero también en otras enfermedades como la obesidad o la diabetes (423).

La expresión inmunohistoquímica de p-4E-BP1 no había sido estudiada anteriormente ni en cáncer de ovario ni de endometrio, por lo que los resultados de este trabajo fueron los primeros en publicarse (424, 425). Tanto en ovario como en endometrio se observó tanto tinción citoplasmática como nuclear. La tinción citoplasmática era la esperada dado que la función conocida de la proteína es la de bloquear la formación del complejo de iniciación de la traducción proteica, hecho que ocurre en el citoplasma de las células. Sin embargo, la tinción nuclear se observaba de forma más frecuente que la citoplasmática. En 2008, el grupo de Sonenberg demostró que 4E-BP1 se podía localizar en el núcleo de las células (421). La diana de 4E-BP1, eIF4E a la que se une, se encuentra fundamentalmente en el citoplasma, pero una fracción del 12-33% de la misma se transporta al núcleo mediante la proteína transportadora 4E-T. Ésta se une a eIF4E a través de un dominio que comparte con 4E-BP1 y eIF4G (426). En condiciones de estrés celular 4E-BP1 regula la localización de eIF4E y es necesario para su traslocación al núcleo. En el trabajo del grupo de Sonenberg se demostró que la localización nuclear de 4E-BP1 no dependía de su estado de fosforilación ni tampoco de

su capacidad de unión a eIF4E. Sin embargo, mientras se encuentra unido a eIF4E éste permanece en el núcleo, siendo esta situación más frecuente bajo situaciones de estrés celular (421). En nuestra casuística, todos los tumores que eran positivos en citoplasma también lo eran de forma intensa o moderada a nivel nuclear. Por otro lado, también hubo casos en los que la expresión de la proteína fosforilada fue exclusivamente nuclear.

En nuestra serie de tumores de ovario, el 41% de carcinomas mostraron positividad para 4E-BP1 siendo citoplasmático en el 14%. Esta expresión citoplasmática se observó únicamente en tumores malignos mientras que la nuclear también fue detectada en tumores borderline y en tumores benignos. El porcentaje de casos positivos estaba en relación directa con el grado del tumor, tanto si se valoraba la expresión nuclear como la citoplasmática, siendo las diferencias estadísticamente significativas para la expresión nuclear. La expresión citoplasmática estaba ausente de los carcinomas grados 1 y por tanto presente únicamente en altos grados. Al valorar la relación con la activación de la vía AKT de la cual es efector, pudo verse que los casos en los que estaba activada mostraban de forma significativa un mayor nivel de expresión de p-4E-BP1 apoyando su papel como efector. Es de interés, que la activación de la vía ERK también se asociaba con mayor nivel de p-4E-BP1 de forma significativa (FIGURA 24 y FIGURA 25). Este resultado apoya que ambas vías puedan estar relacionadas en algún punto, como se discutirá más adelante.

En los carcinomas de endometrio los resultados fueron similares. El patrón de expresión observado fue superponible al de los carcinomas de ovario. Como en el ovario, la expresión nuclear de p-4E-BP1 se observó tanto en carcinomas como en lesiones benignas o en los casos controles, mientras que la citoplasmática se detectó solamente en carcinomas, exceptuando una hiperplasia compleja que resultó positiva que al revisar

la histología de la misma se trató de una hiperplasia compleja atípica, de la cual se realizó una histerectomía sin observarse carcinoma endometrioide en la pieza. Como en los carcinomas de ovario, tanto la expresión nuclear como citoplasmática de la proteína aumentaba en frecuencia con el grado histológico de forma estadísticamente significativa para ambas localizaciones. Estas diferencias también se reflejaron al evaluar los tipos histológicos, ya que los de tipo II fueron los más frecuentemente positivos.

En el análisis de supervivencia, tanto los carcinomas de ovario como los de endometrio mostraron diferencias pronósticas significativas al valorar expresión nuclear en la supervivencia global pero no en la libre de enfermedad. Por otro lado, la expresión citoplasmática no mostró diferencias significativas en ambos tipos de tumores, a pesar de que en el ovario los casos positivos mostraron cierta tendencia a comportarse peor.

Esta asociación de la expresión de 4E-BP1 fosforilado con características agresivas tumorales se ha confirmado en otras series y en tumores de diversas estirpes celulares.

En cáncer de ovario, también se ha estudiado el papel de 4E-BP1 en relación al pronóstico encontrándose expresado en tumores de alto grado, estadios avanzados y con quimiorresistencia (427). En cáncer de endometrio, otro trabajo estudió la expresión de 4E-BP1 y mTOR también se observó correlación con el grado del tumor y en estadios avanzados y con la respuesta a tratamiento con rapamicina en líneas celulares (428) En carcinomas de mama, se estudiaron diversos marcadores relacionados con las vías de señalización y se demostró que p-4E-BP1 se relacionaba con el grado del tumor y con el pronóstico (429). En cáncer de cérvix uterino también se relacionó con la supervivencia libre de enfermedad y la global en pacientes tratados con radioterapia (430). En otros tipos tumorales también se ha relacionado con el pronóstico, destacando en los

carcinomas de pulmón (431), mesoteliomas (432), astrocitomas (433) o melanomas (434).

3.6 Expresión de p70S6K fosforilada

La proteína p70S6K es el segundo efector más importante del complejo TORC1 y juega un papel importante en la regulación del ciclo celular, el crecimiento celular y la supervivencia (435). Su activación ocasiona la fosforilación de la proteína ribosómica S6 que forma parte de la unidad 40S, con lo que se inicia la traducción de los 5'TOP mARNs que codifican proteínas necesarias para la maquinaria implicada en el proceso de síntesis de proteínas como otras proteínas ribosómicas o factores de iniciación y elongación de la síntesis proteica. Esta proteína se ha implicado en múltiples enfermedades que van desde la diabetes al cáncer (435). En tumores, se ha estudiado en cáncer de mama (436), carcinoma nasofaríngeo (437), carcinoma de pulmón (438), carcinoma de colon (439), carcinoma de esófago (440) o astrocitomas (441), habiéndose encontrado relación con pronóstico en algunos de ellos, relación con invasividad tumoral o con grado de respuesta a algunos tratamientos.

Existen escasos trabajos en los que se haya estudiado la expresión de p70S6K en cáncer de ovario o de endometrio. En nuestro trabajo sólo estudiamos esta proteína en la serie de cáncer de ovario.

En ovario se ha descrito la relación de la activación de p70S6K con la capacidad de invasión de las células tumorales y ésta mediaría la acción del factor de crecimiento hepatocitario mediante por la inducción de la expresión de la metaloproteína 9 (442).

En este mismo sentido, se ha estudiado el papel de p70S6K en la inducción de la transición epitelio-mesénquima en células de cáncer de ovario, se sería mediada por Snail (443), o bien, mediante el control del citoesqueleto de actina (444). Sin embargo,

no existían series clínicas que estudiaran el papel de esta proteína en cáncer de ovario antes de este trabajo. Posteriormente, en un estudio realizado en 103 pacientes con cáncer de ovario, no se encontró correlación de la proteína con factores clínico-patológicos como el tipo histológico o grado ni se encontró relación con la supervivencia (427). Ni en este trabajo ni en otros describen la localización de la expresión de la proteína aunque encuentran expresión nuclear. En nuestra serie, los resultados que obtuvimos fueron similares. La expresión nuclear de p-p70S6K se observó fundamentalmente en carcinomas aunque también estaba presente en aproximadamente el 15% de tumores borderline y tumores benignos. Sin embargo, la expresión citoplasmática estaba limitada a los carcinomas. No se observó relación ni de la expresión citoplasmática ni la nuclear con el grado el tipo histológico o el estadio clínico, aunque los carcinomas de alto grado eran los más frecuentemente positivos sin ser esta diferencia estadísticamente significativa. La proteína p70S6K se activa con la vía de AKT-mTOR por lo que como se muestra en la FIGURA 27, presenta niveles mayores de expresión en los casos en las que ésta está activada. Como se ha comentado en la proteína 4E-BP1, también se observa un incremento de la expresión de p-p70S6K en los casos en los que también había activación de la vía de ERK, indicando conexión entre ambas vías de señalización.

En cuanto a la supervivencia, ni la expresión nuclear ni citoplasmática mostró ser significativa en el análisis de la supervivencia global ni libre de enfermedad.

3.7 Expresión de S6 fosforilada

La proteína ribosómica S6 forma parte de la unidad 40S y por tanto interviene en la regulación de la síntesis proteica. Se ha implicado en la regulación del crecimiento celular, la proliferación y la regulación de la homeostasis de la glucosa (341). La

activación de la proteína corre a cargo de p70S6K y por tanto regula la traducción de los 5'TOP mARNs. Se ha postulado que puede actuar contrarrestando las señales positivas procedentes de p70S6K y por tanto convirtiéndose en una forma de ajuste fino de las señales procedentes de esta vía (445). Existen escasos trabajos que valoren la expresión de esta proteína destacando alguno en cáncer de mama donde la expresión de S6 es un biomarcador de la resistencia a los tratamientos anti-HER2 (446), sin existir ningún trabajo en relación a cáncer de ovario.

En este trabajo se estudió la expresión de p-S6 únicamente en la serie de carcinomas de ovario. Se observó sobreexpresada a nivel citoplasmático fundamentalmente en carcinomas, existiendo aislados casos de tumores benignos y borderline. Cerca del 30% de los carcinomas mostraron sobreexpresión de la proteína, que en todos los casos fue débil o moderada. Esta expresión no correlacionó con el tipo histológico, grado o estadio. Tampoco se observaron diferencias en la supervivencia global ni libre de enfermedad.

4 RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS

Los marcadores estudiados son representativos de diferentes fases de la señalización celular, por lo que la activación de una de las moléculas puede depender de la activación de la correspondiente a la fase previa. Sin embargo, en las vías de señalización existen interacciones múltiples en las vías que hacen que la relación entre las moléculas no sea lineal, sino que dependa de múltiples factores

4.1 Expresión de los receptores de membrana

HER2 y EGFR son receptores de membrana de la misma familia, con actividad tirosina-quinasa y que se pueden activar de maneras independientes y no excluyentes entre sí. Ambos receptores activan las mismas vías de señalización celular (296), por lo que tiene interés valorar con qué frecuencia se activa cada uno de ellos y si pueden hacerlo simultáneamente. Además, en algunos tumores se ha descrito la coexpresión de ambos se relaciona con un aumento del riesgo de recurrencia y a un pronóstico desfavorable (447) sugiriendo que, en el caso de EGFR, la heterodimerización entre ellos resulta más activa que la homodimerización.

En la serie de carcinomas de ovario se observó coexpresión de ambos receptores en el 33% de casos, siendo más frecuente en los carcinomas de células claras y fundamentalmente en carcinomas de grado 3 donde el 70% de los casos eran positivos para ambos receptores. En un 60% de casos ambos receptores fueron negativos. Sin embargo, en nuestra serie la coexpresión de ambos receptores no significó un empeoramiento de la supervivencia (Log Rank=0.429) respecto al grupo con sólo expresión de HER2, sin ser la diferencia significativa. Los casos dobles negativos fueron los que presentaron mayor supervivencia. En el estudio del periodo libre de enfermedad tampoco se observaron diferencias significativas (FIGURA 37).

En los carcinomas de endometrio, la sobreexpresión de HER2 implicó un peor pronóstico de forma significativa, siempre que EGFR era negativo. Los casos que eran positivos para ambos mostraron un comportamiento mejor que los casos negativos para ambos receptores (FIGURA 71). Este grupo de dobles positivos es poco valorable dado que está constituido únicamente por 2 casos que estaban en estadios iniciales y por tanto hay poca representación de casos.

4.2 Activación de las vías de AKT y de ERK

La vía de AKT se encontraba activada fundamentalmente en los casos en los que se observaba sobreexpresión de HER2 y EGFR, existiendo igualmente un grupo de casos en los que ninguno de los receptores está sobreexpresado. Este hecho, tiene sentido dado que otros receptores pueden activar esta vía como el receptor de factores de crecimiento tipo insulina (IGFR) (448). Además, en cánceres hormonodependientes, como los de ovario y endometrio, se sabe que esta vía se puede activar a través de los receptores de estrógeno (449, 450). Es un hecho conocido que aparte de la actividad nuclear de los receptores hormonales, éstos pueden tener actividad en la membrana y citoplasma. Para ello requiere de algunas proteínas que permitan su anclaje en la membrana, siendo la más estudiada la caveolina (451). Los receptores de estrógenos unidos a la caveolina pueden activar tanto PI3K-AKT como la vía de las MAPK actuando sobre la proliferación celular y supervivencia de la célula de la misma manera que lo hacen los receptores de membrana. Además, estas funciones extranucleares de los estrógenos ocurren de forma inmediata a diferencia de las nucleares (449). El interés del estudio de p-AKT es que recoge las señales de activación procedentes de los diversos estímulos que recibe la célula y los canaliza hacia el núcleo.

En nuestra serie de ovario se puede observar el efecto aditivo de la activación de la vía de AKT cuando existe sobreexpresión de los receptores estudiados y ésta es claramente superior a los casos en los que no hay sobreexpresión de ninguno de los dos (FIGURA 21). También vemos que esta activación es más frecuente a través de EGFR que de HER2 (FIGURA 20). En relación a la activación de p-ERK, los resultados son similares. Los casos en los que hay sobreexpresión inmunohistoquímica de ambos receptores son los que con mayor frecuencia expresan p-ERK. También podemos observar que cuando EGFR es negativo, la activación de HER2 no varía la expresión de p-ERK.

En cáncer de endometrio los resultados no muestran este efecto sumatorio de los receptores de membrana. Como queda representado en la FIGURA 58, el porcentaje de casos positivos para p-AKT apenas varía en función de la expresión de los receptores. Este hecho podría quedar explicado por la mayor hormonodependencia del cáncer de endometrio, por lo que la vía hormonal ejercería un estímulo mayor sobre la activación de la vía de AKT que los receptores de membrana. Con la activación para ERK el resultado es similar, como queda ilustrado en la FIGURA 60, con la limitación de que el grupo de casos con doble positividad de receptores no queda representado ya que solamente obtuvimos 2 casos en esta categoría.

En el análisis de la supervivencia en relación a la expresión de estas 2 proteínas no se observaron diferencias significativas en el pronóstico de los diferentes grupos, aunque los casos con activación de ERK tenían ligeramente menor supervivencia, especialmente si se asociaban a AKT en cáncer de ovario y de forma similar en cáncer de endometrio, aunque los dobles positivos no eran representativos.

4.3 Activación de los efectores 4E-BP1 y p70S6K

La proteína p-4E-BP1 se activa fundamentalmente por la fosforilación que mTOR realiza en al menos tres sitios de la molécula, al activarse la vía de AKT. Se desconoce de forma completa qué moléculas pueden regular la fosforilación del resto de sitios de la misma para su separación de eIF4E (421). Por ejemplo, se sabe que la proteína p53 puede regular la defosforilación de 4E-BP1 por lo que actuaría favoreciendo la unión y bloqueo de eIF4E (350). De la misma manera, las vías de AKT y de ERK interaccionan entre ellas en varios puntos por lo que la activación de 4E-BP1 también puede estar condicionada por la vía de ERK (452). Estas observaciones hacen que sea importante

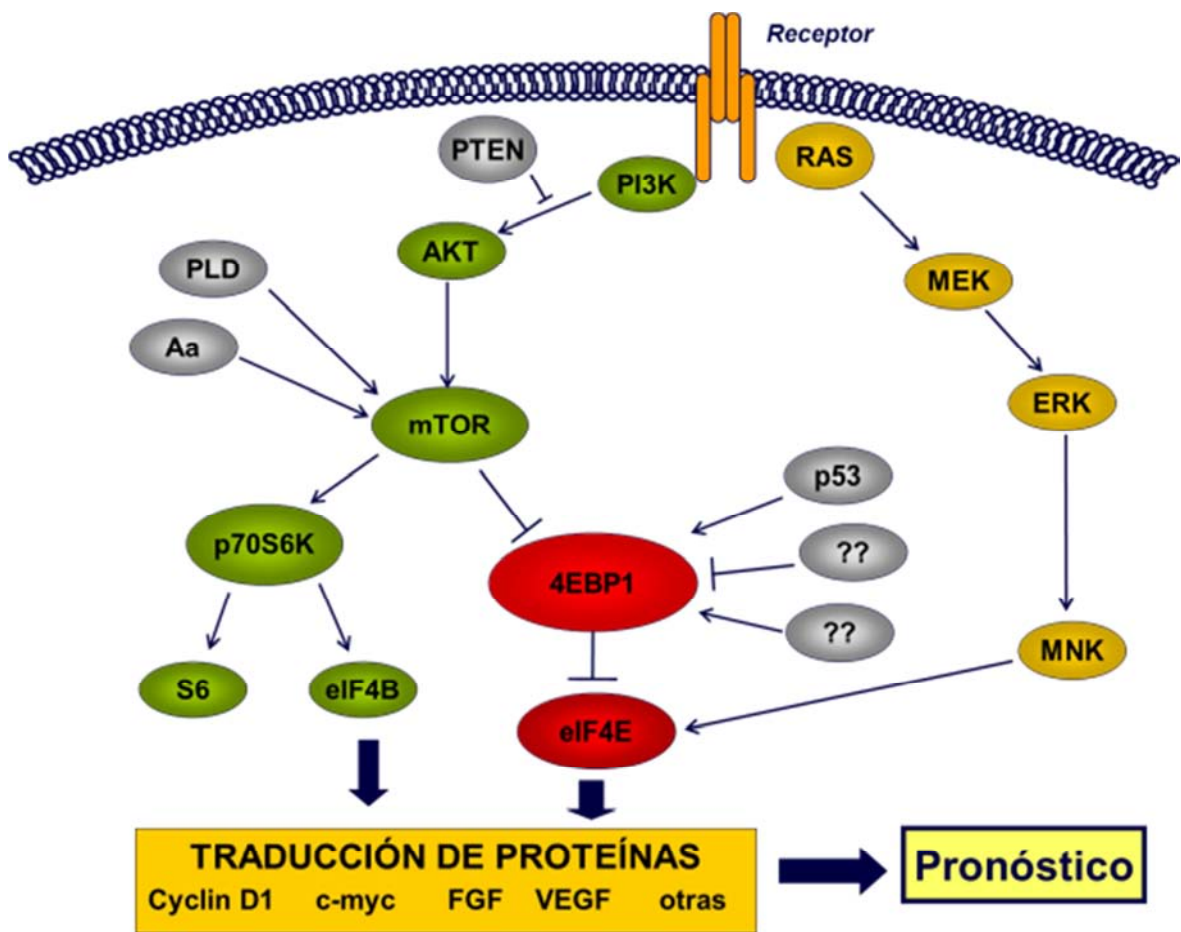
valorar si la activación de ambas vías puede tener influencia en los niveles de expresión de 4E-BP1.

En nuestra serie de cáncer de ovario, tanto 4E-BP1 como p70S6K mostraron un aumento significativo de expresión tanto si había activación de AKT como de ERK. Además éste era aún mayor cuando ambas vías estaban simultáneamente activadas, con una diferencia estadísticamente altamente significativa (FIGURA 26). En cambio, en el cáncer de endometrio, el aumento de expresión de p-4E-BP1 en los casos con activación de ambas vías no era tan marcado y las diferencias no fueron estadísticamente significativas (FIGURA 63).

Este papel de 4E-BP1 como integrador de las señales procedentes de las dos principales vías de señalización celular en la regulación del crecimiento y proliferación ha sido propuesto como “factor embudo” o “*funnel factor*” (ver FIGURA 81) (453). El interés de su identificación radica en que potencialmente puede ser una diana terapéutica ya que podría bloquear la activación de ambas vías simultáneamente. En este sentido, la importancia de 4E-BP1 como centralizador de las señales oncogénicas ha sido confirmada por otros autores que demuestran que la inhibición de las vías de AKT y ERK de forma individualizada no tiene la efectividad esperada, pero si se bloquean de forma combinada sí la tiene. Este hecho, implica que probablemente ambas vías comparten moléculas que llevan a cargo la acción final (454) . She *et al*, en este estudio, demuestran que el bloqueo de 4E-BP1 con ARN de interferencia (siARN) reduce de forma drástica la traducción de proteínas dependiente tanto de la vía AKT como la de ERK, demostrando el papel centralizador de la molécula. Asimismo, demuestran que el bloqueo simultáneo de ambas vías es necesario para reducir la fosforilación de 4E-BP1 confirmando que en su regulación intervienen ambas. Estos autores también bloquearon 4E-BP2, que tiene efectos similares a 4E-BP1, pero la reducción de la

traducción proteica no fue tan marcada como con 4E-BP1 por lo que éste último tiene un papel más importante en la regulación final de estas vías. (454). Por todo ello, recientemente se ha propuesto el bloqueo de eIF4E, es decir, realizar farmacológicamente la función de 4E-BP1, como herramienta terapéutica (455).

FIGURA 81. Esquema de las vías de señalización celular estudiadas ilustrando el papel centralizador de 4E-BP1 en la regulación final de las mismas.



En el estudio de supervivencia, p-4E-BP1 es el único de los marcadores estudiados que tiene valor pronóstico en el cáncer de ovario como se puede ver en la FIGURA 45. Este hecho apoya que a pesar de que tanto la vía AKT como la de ERK pueden estar

activadas, al fosforilarse 4E-BP1 por acción de las mismas, centraliza el efecto oncogénico y es un marcador representativo de la intensidad del mismo, traduciéndose en una menor supervivencia. En cáncer de endometrio también tiene valor pronóstico, siendo otro modelo que confirma este papel central de la molécula.

La proteína p70S6K es otra molécula efectora de la fosforilación de mTOR y que también regula la síntesis de proteínas fosforilando moléculas clave en el inicio de la misma. Como puede verse en la FIGURA 27 y FIGURA 28, su expresión está aumentada de forma significativa en los casos que son positivos para AKT y para ERK. Además, esta expresión es aún más elevada cuando ambas vías están activadas de forma simultánea como puede verse en la FIGURA 29. Este resultado es superponible con el de 4E-BP1, sin embargo, en el análisis de supervivencia no tiene valor pronóstico como se podría esperar siendo el resultado de la activación de las mismas vías (FIGURA 47). Este resultado es concordante con el observado in vitro, en el que el bloqueo de p70S6K también reduce parcialmente la traducción proteica pero a un nivel muy inferior al que lo hace 4E-BP1 (454). En este trabajo también valoran el papel de la fosforilación de la proteína ribosómica S6 que tiene un comportamiento similar pero la reducción es aún menor. Esta observación puede explicar la reducción del impacto de la proteína es el pronóstico. En nuestra serie de carcinomas de ovario la coexpresión de 4E-BP1 y p70S6K representó una discreta disminución de la supervivencia global que no fue significativa (FIGURA 49), apoyando el menor efecto oncogénico que tiene p70S6K.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados de este trabajo se desprenden las siguientes conclusiones:

- 1) El estadio clínico según los criterios de la FIGO es el factor pronóstico más importante tanto en cáncer de ovario como de endometrio, sin correlacionarse con ninguno de los marcadores relacionados con las vías de señalización celular que se han estudiado.
- 2) En nuestra serie, el grado histológico muestra diferencias pronósticas significativas tanto en cáncer de ovario como de endometrio.
- 3) La sobreexpresión de HER2 se asocia a peor supervivencia en cáncer de endometrio pero no en cáncer de ovario, siendo más frecuente en los carcinomas de alto grado.
- 4) La sobreexpresión de EGFR en cáncer de endometrio correlaciona, en nuestra serie, con factores clínico-patológicos de menor agresividad, asociándose a un mejor pronóstico. La sobreexpresión en cáncer de ovario no tiene implicaciones en la supervivencia.
- 5) La sobreexpresión de AKT y de ERK fosforilados no tiene valor pronóstico en cáncer de ovario ni de endometrio ni muestra correlación con el grado de diferenciación ni el estadio.
- 6) La sobreexpresión de 4E-BP1 fosforilado identifica un grupo de carcinomas de ovario y de endometrio de peor pronóstico. Este valor pronóstico es independientemente de la activación de las vías de AKT y de ERK, por lo que constituye un factor clave en la regulación de las vías que controlan el crecimiento y

proliferación celular. El nivel de expresión de 4E-BP1 fosforilado es mayor cuando existe expresión simultánea de AKT y ERK fosforilados, apoyando que está influenciado por ambas vías de señalización y reforzando su papel central en el que converge la señal oncogénica.

- 7) La expresión de 4E-BP1 fosforilado se observa en casos con sobreexpresión de AKT y de ERK fosforilados, así como en ausencia de los mismos, indicando que pueden existir otras vías de regulación de la fosforilación del mismo.
- 8) La sobreexpresión de 4E-BP1 fosforilado es más frecuente en los carcinomas que en las lesiones benignas y aumenta en función del grado de diferenciación tumoral y varía según el tipo histológico, tanto en cáncer de ovario como de endometrio.
- 9) La expresión de p70S6K y de la proteína ribosómica S6 fosforiladas no presenta relación con el pronóstico en los carcinomas de ovario, aunque ésta ocurre fundamentalmente en carcinomas comparado con los tumores borderline y los benignos.
- 10) Nuestros datos apoyan la utilidad del estudio de factores moleculares en los que converjan diferentes vías de señalización y que sean claves en la regulación de las mismas, pudiendo indicar el pronóstico de estos tumores y que, además, puedan ser posibles dianas terapéuticas, como en nuestra serie ha resultado 4E-BP1 fosforilado.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Kurman RJ, International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. WHO classification of tumours of female reproductive organs. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014. 307 p. p.
2. Shih Ie M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *The American journal of pathology*. 2004;164(5):1511-8.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.; 2015. Available from: <http://globocan.iarc.fr/>.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*. 2006;56(2):106-30.
5. Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *EurJCancer*. 2002;38(1):99-166.
6. Scully RE, Young RH, Clement PB. Atlas of tumor pathology. Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube, and broad ligament. Rosai J, editor. Washington, DC: AFIP; 1998.
7. Smith LH. Early clinical detection of ovarian cancer: a review of the evidence. *ExpertRevAnticancer Ther*. 2006;6(7):1045-52.
8. Royar J, Becher H, Chang-Claude J. Low-dose oral contraceptives: protective effect on ovarian cancer risk. *IntJCancer*. 2001;95(6):370-4.
9. Gayther SA, Russell P, Harrington P, Antoniou AC, Easton DF, Ponder BA. The contribution of germline BRCA1 and BRCA2 mutations to familial ovarian cancer: no evidence for other ovarian cancer-susceptibility genes. *AmJHumGenet*. 1999;65(4):1021-9.
10. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *EndocrRev*. 2001;22(2):255-88.
11. Feeley KM, Wells M. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology*. 2001;38(2):87-95.
12. Nicosia SV, Ku NNK, Oliveros-Saunders B, Giacomini G, Pierro E, Mayer J, et al. Ovarian mesothelium (surface epithelium) in normal, pathological and experimental conditions. *Recent Advances in Microscopy of Cells, Tissues and Organs*. 1997.
13. Berchuck A, Carney M. Human ovarian cancer of the surface epithelium. *Biochemical pharmacology*. 1997;54(5):541-4.
14. Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: does the emperor have no clothes? *Gynecol Oncol*. 1999;72(3):437-42.

15. Bell DA. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *ModPathol*. 2005;18 Suppl 2:S19-S32.
16. Barakat RR, Federici MG, Saigo PE, Robson ME, Offit K, Boyd J. Absence of premalignant histologic, molecular, or cell biologic alterations in prophylactic oophorectomy specimens from BRCA1 heterozygotes. *Cancer*. 2000;89(2):383-90.
17. Scott M, McCluggage WG. Current concepts in ovarian epithelial tumorigenesis: correlation between morphological and molecular data. *HistolHistopathol*. 2006;21(1):81-92.
18. Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP, Jansen JW, Poort-Keesom RJ, Menko FH, et al. Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *The Journal of pathology*. 2001;195(4):451-6.
19. Lee Y, Miron A, Drapkin R, Nucci MR, Medeiros F, Saleemuddin A, et al. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *The Journal of pathology*. 2007;211(1):26-35.
20. Saleemuddin A, Folkins AK, Garrett L, Garber J, Muto MG, Crum CP, et al. Risk factors for a serous cancer precursor ("p53 signature") in women with inherited BRCA mutations. *Gynecol Oncol*. 2008;111(2):226-32.
21. Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, Hirsch MS, Feltmate C, Medeiros F, et al. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *The American journal of surgical pathology*. 2007;31(2):161-9.
22. Kuhn E, Kurman RJ, Vang R, Sehdev AS, Han G, Soslow R, et al. TP53 mutations in serous tubal intraepithelial carcinoma and concurrent pelvic high-grade serous carcinoma--evidence supporting the clonal relationship of the two lesions. *The Journal of pathology*. 2012;226(3):421-6.
23. Kurman RJ, Shih I. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *HumPathol*. 2011;42(7):918-31.
24. Li J, Abushahin N, Pang S, Xiang L, Chambers SK, Fadare O, et al. Tubal origin of 'ovarian' low-grade serous carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2011;24(11):1488-99.
25. Kurman RJ, Shih Ie M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *The American journal of surgical pathology*. 2010;34(3):433-43.
26. Kurman RJ, Craig JM. Endometrioid and clear cell carcinoma of the ovary. *Cancer*. 1972;29(6):1653-64.
27. McMeekin DS, Burger RA, Manetta A, Disaia P, Berman ML. Endometrioid adenocarcinoma of the ovary and its relationship to endometriosis. *Gynecol Oncol*. 1995;59(1):81-6.

28. Sainz de la CR, Eichhorn JH, Rice LW, Fuller AF, Jr., Nikrui N, Goff BA. Histologic transformation of benign endometriosis to early epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 1996;60(2):238-44.
29. Rosenblatt KA, Thomas DB. Reduced risk of ovarian cancer in women with a tubal ligation or hysterectomy. The World Health Organization Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 1996;5(11):933-5.
30. Jiang X, Morland SJ, Hitchcock A, Thomas EJ, Campbell IG. Allelotyping of endometriosis with adjacent ovarian carcinoma reveals evidence of a common lineage. *Cancer Res.* 1998;58(8):1707-12.
31. Vigano P, Somigliana E, Chiodo I, Abbiati A, Vercellini P. Molecular mechanisms and biological plausibility underlying the malignant transformation of endometriosis: a critical analysis. *HumReprodUpdate.* 2006;12(1):77-89.
32. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T, et al. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *The New England journal of medicine.* 2010;363(16):1532-43.
33. Vang R, Gown AM, Zhao C, Barry TS, Isacson C, Richardson MS, et al. Ovarian mucinous tumors associated with mature cystic teratomas: morphologic and immunohistochemical analysis identifies a subset of potential teratomatous origin that shares features of lower gastrointestinal tract mucinous tumors more commonly encountered as secondary tumors in the ovary. *The American journal of surgical pathology.* 2007;31(6):854-69.
34. Seidman JD, Khedmati F. Exploring the histogenesis of ovarian mucinous and transitional cell (Brenner) neoplasms and their relationship with Walthard cell nests: a study of 120 tumors. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2008;132(11):1753-60.
35. Godwin AK, Testa JR, Hamilton TC. The biology of ovarian cancer development. *Cancer.* 1993;71(2 Suppl):530-6.
36. Mink PJ, Sherman ME, Devesa SS. Incidence patterns of invasive and borderline ovarian tumors among white women and black women in the United States. Results from the SEER Program, 1978-1998. *Cancer.* 2002;95(11):2380-9.
37. Longacre TA, McKenney JK, Tazelaar HD, Kempson RL, Hendrickson MR. Ovarian serous tumors of low malignant potential (borderline tumors): outcome-based study of 276 patients with long-term (> or =5-year) follow-up. *The American journal of surgical pathology.* 2005;29(6):707-23.
38. Tavassoli FA, Devilee P, International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs.* Lyon: IARC Press; 2003. 432 p. p.
39. Seidman JD, Kurman RJ. Ovarian serous borderline tumors: a critical review of the literature with emphasis on prognostic indicators. *Hum Pathol.* 2000;31(5):539-57.

40. Bell DA, Weinstock MA, Scully RE. Peritoneal implants of ovarian serous borderline tumors. Histologic features and prognosis. *Cancer*. 1988;62(10):2212-22.
41. Bell KA, Smith Sehdev AE, Kurman RJ. Refined diagnostic criteria for implants associated with ovarian atypical proliferative serous tumors (borderline) and micropapillary serous carcinomas. *The American journal of surgical pathology*. 2001;25(4):419-32.
42. Seidman JD, Kurman RJ. Subclassification of serous borderline tumors of the ovary into benign and malignant types. A clinicopathologic study of 65 advanced stage cases. *The American journal of surgical pathology*. 1996;20(11):1331-45.
43. Kobel M, Kalloger SE, Huntsman DG, Santos JL, Swenerton KD, Seidman JD, et al. Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2010;29(3):203-11.
44. Gershenson DM, Sun CC, Lu KH, Coleman RL, Sood AK, Malpica A, et al. Clinical behavior of stage II-IV low-grade serous carcinoma of the ovary. *Obstetrics and gynecology*. 2006;108(2):361-8.
45. Singer G, Oldt R, 3rd, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, et al. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(6):484-6.
46. Salani R, Kurman RJ, Giuntoli R, 2nd, Gardner G, Bristow R, Wang TL, et al. Assessment of TP53 mutation using purified tissue samples of ovarian serous carcinomas reveals a higher mutation rate than previously reported and does not correlate with drug resistance. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2008;18(3):487-91.
47. Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H, et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2012;21(1):134-47.
48. Cuatrecasas M, Villanueva A, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: a clinicopathologic and molecular study of 95 cases. *Cancer*. 1997;79(8):1581-6.
49. Yemelyanova AV, Vang R, Judson K, Wu LS, Ronnett BM. Distinction of primary and metastatic mucinous tumors involving the ovary: analysis of size and laterality data by primary site with reevaluation of an algorithm for tumor classification. *The American journal of surgical pathology*. 2008;32(1):128-38.
50. Enomoto T, Weghorst CM, Inoue M, Tanizawa O, Rice JM. K-ras activation occurs frequently in mucinous adenocarcinomas and rarely in other common epithelial tumors of the human ovary. *The American journal of pathology*. 1991;139(4):777-85.

51. Chen S, Leitao MM, Tornos C, Soslow RA. Invasion patterns in stage I endometrioid and mucinous ovarian carcinomas: a clinicopathologic analysis emphasizing favorable outcomes in carcinomas without destructive stromal invasion and the occasional malignant course of carcinomas with limited destructive stromal invasion. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2005;18(7):903-11.
52. Ayhan A, Mao TL, Seckin T, Wu CH, Guan B, Ogawa H, et al. Loss of ARID1A expression is an early molecular event in tumor progression from ovarian endometriotic cyst to clear cell and endometrioid carcinoma. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society.* 2012;22(8):1310-5.
53. Roth LM, Emerson RE, Ulbright TM. Ovarian endometrioid tumors of low malignant potential: a clinicopathologic study of 30 cases with comparison to well-differentiated endometrioid adenocarcinoma. *The American journal of surgical pathology.* 2003;27(9):1253-9.
54. Storey DJ, Rush R, Stewart M, Rye T, Al-Nafussi A, Williams AR, et al. Endometrioid epithelial ovarian cancer : 20 years of prospectively collected data from a single center. *Cancer.* 2008;112(10):2211-20.
55. DePriest PD, Banks ER, Powell DE, van Nagell JR, Jr., Gallion HH, Puls LE, et al. Endometrioid carcinoma of the ovary and endometriosis: the association in postmenopausal women. *Gynecol Oncol.* 1992;47(1):71-5.
56. Falkenberry SS, Steinhoff MM, Gordinier M, Rappoport S, Gajewski W, Granai CO. Synchronous endometrioid tumors of the ovary and endometrium. A clinicopathologic study of 22 cases. *The Journal of reproductive medicine.* 1996;41(10):713-8.
57. Matias-Guiu X, Lagarda H, Catusus L, Bussaglia E, Gallardo A, Gras E, et al. Clonality analysis in synchronous or metachronous tumors of the female genital tract. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists.* 2002;21(3):205-11.
58. Bell DA, Scully RE. Benign and borderline clear cell adenofibromas of the ovary. *Cancer.* 1985;56(12):2922-31.
59. Chan JK, Teoh D, Hu JM, Shin JY, Osann K, Kapp DS. Do clear cell ovarian carcinomas have poorer prognosis compared to other epithelial cell types? A study of 1411 clear cell ovarian cancers. *Gynecol Oncol.* 2008;109(3):370-6.
60. Ketabi Z, Bartuma K, Bernstein I, Malander S, Gronberg H, Bjorck E, et al. Ovarian cancer linked to Lynch syndrome typically presents as early-onset, non-serous epithelial tumors. *Gynecol Oncol.* 2011;121(3):462-5.
61. Tan DS, Kaye S. Ovarian clear cell adenocarcinoma: a continuing enigma. *Journal of clinical pathology.* 2007;60(4):355-60.

62. Chan JK, Tian C, Monk BJ, Herzog T, Kapp DS, Bell J, et al. Prognostic factors for high-risk early-stage epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*. 2008;112(10):2202-10.
63. de Lima GR, de Lima OA, Baracat EC, Vasserman J, Burnier M, Jr. Virilizing Brenner tumor of the ovary: case report. *Obstetrics and gynecology*. 1989;73(5 Pt 2):895-8.
64. Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*. 2007;26(15):2157-65.
65. May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*. 1999;18(53):7621-36.
66. Soussi T. p53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene*. 2007;26(15):2145-56.
67. Oren M, Rotter V. Introduction: p53--the first twenty years. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 1999;55(1):9-11.
68. Kohler MF, Marks JR, Wiseman RW, Jacobs IJ, Davidoff AM, Clarke-Pearson DL, et al. Spectrum of mutation and frequency of allelic deletion of the p53 gene in ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1993;85(18):1513-9.
69. Berchuck A, Kohler MF, Marks JR, Wiseman R, Boyd J, Bast RC, Jr. The p53 tumor suppressor gene frequently is altered in gynecologic cancers. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1994;170(1 Pt 1):246-52.
70. Mayr D, Hirschmann A, Lohrs U, Diebold J. KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: a comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gynecol Oncol*. 2006;103(3):883-7.
71. Cho YH, Kim DY, Kim JH, Kim YM, Kim KR, Nam JH, et al. Mutational analysis of KRAS, BRAF, and TP53 genes of ovarian serous carcinomas in Korean women. *Yonsei medical journal*. 2009;50(2):266-72.
72. Ardighieri L, Zeppernick F, Hannibal CG, Vang R, Cope L, Junge J, et al. Mutational analysis of BRAF and KRAS in ovarian serous borderline (atypical proliferative) tumours and associated peritoneal implants. *The Journal of pathology*. 2014;232(1):16-22.
73. Heublein S, Grasse K, Hessel H, Burges A, Lenhard M, Engel J, et al. KRAS, BRAF genotyping reveals genetic heterogeneity of ovarian borderline tumors and associated implants. *BMC cancer*. 2013;13:483.
74. Matsumoto T, Yamazaki M, Takahashi H, Kajita S, Suzuki E, Tsuruta T, et al. Distinct beta-Catenin and PIK3CA Mutation Profiles in Endometriosis-Associated Ovarian Endometrioid and Clear Cell Carcinomas. *American journal of clinical pathology*. 2015;144(3):452-63.

75. Campbell IG, Russell SE, Phillips WA. PIK3CA mutations in ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(19 Pt 1):7042; author reply -3.
76. Abubaker J, Bavi P, Al-Haqawi W, Jehan Z, Munkarah A, Uddin S, et al. PIK3CA alterations in Middle Eastern ovarian cancers. *Mol Cancer*. 2009;8:51.
77. Yamamoto S, Tsuda H, Takano M, Iwaya K, Tamai S, Matsubara O. PIK3CA mutation is an early event in the development of endometriosis-associated ovarian clear cell adenocarcinoma. *The Journal of pathology*. 2011;225(2):189-94.
78. Huang HN, Lin MC, Tseng LH, Chiang YC, Lin LI, Lin YF, et al. Ovarian and endometrial endometrioid adenocarcinomas have distinct profiles of microsatellite instability, PTEN expression, and ARID1A expression. *Histopathology*. 2015;66(4):517-28.
79. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249-57.
80. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
81. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(6):464-78.
82. Jayne DG, Perry SL, Morrison E, Farmery SM, Guillou PJ. Activated mesothelial cells produce heparin-binding growth factors: implications for tumour metastases. *British journal of cancer*. 2000;82(6):1233-8.
83. Naora H, Montell DJ. Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(5):355-66.
84. Burger RA. Overview of anti-angiogenic agents in development for ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2011;121(1):230-8.
85. Burger RA, Sill MW, Monk BJ, Greer BE, Sorosky JJ. Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(33):5165-71.
86. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(5):341-54.
87. Despierre E, Vergote I, Anderson R, Coens C, Katsaros D, Hirsch FR, et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Pathway Biomarkers in the Randomized Phase III Trial of Erlotinib Versus Observation in Ovarian Cancer Patients with No Evidence of Disease Progression after First-Line Platinum-Based Chemotherapy. *Targeted oncology*. 2015.
88. Elie C, Geay JF, Morcos M, Le TA, Girre V, Broet P, et al. Lack of relationship between EGFR-1 immunohistochemical expression and prognosis in a multicentre clinical trial of 93 patients with advanced primary ovarian epithelial cancer (GINECO group). *BrJCancer*. 2004;91(3):470-5.

89. Tanaka Y, Terai Y, Tanabe A, Sasaki H, Sekijima T, Fujiwara S, et al. Prognostic effect of epidermal growth factor receptor gene mutations and the aberrant phosphorylation of Akt and ERK in ovarian cancer. *Cancer biology & therapy*. 2011;11(1):50-7.
90. Bookman MA, Darcy KM, Clarke-Pearson D, Boothby RA, Horowitz IR. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(2):283-90.
91. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, et al. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*. 1990;50(13):4087-91.
92. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244(4905):707-12.
93. Kupryjanczyk J, Madry R, Plisiecka-Halasa J, Bar J, Kraszewska E, Ziolkowska I, et al. TP53 status determines clinical significance of ERBB2 expression in ovarian cancer. *British journal of cancer*. 2004;91(11):1916-23.
94. Camilleri-Broet S, Hardy-Bessard AC, Le TA, Paraiso D, Levrel O, Leduc B, et al. HER-2 overexpression is an independent marker of poor prognosis of advanced primary ovarian carcinoma: a multicenter study of the GINECO group. *AnnOncol*. 2004;15(1):104-12.
95. Tanner B, Hasenclever D, Stern K, Schormann W, Bezler M, Hermes M, et al. ErbB-3 predicts survival in ovarian cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(26):4317-23.
96. Gilmour LM, Macleod KG, McCaig A, Gullick WJ, Smyth JF, Langdon SP. Expression of erbB-4/HER-4 growth factor receptor isoforms in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2001;61(5):2169-76.
97. Ramus SJ, Gayther SA. The contribution of BRCA1 and BRCA2 to ovarian cancer. *Mol Oncol*. 2009;3(2):138-50.
98. Boyd EA, Bero LA. Assessing faculty financial relationships with industry: A case study. *JAMA*. 2000;284(17):2209-14.
99. Russell PA, Pharoah PD, De Foy K, Ramus SJ, Symmonds I, Wilson A, et al. Frequent loss of BRCA1 mRNA and protein expression in sporadic ovarian cancers. *Int J Cancer*. 2000;87(3):317-21.
100. Wang C, Horiuchi A, Imai T, Ohira S, Itoh K, Nikaido T, et al. Expression of BRCA1 protein in benign, borderline, and malignant epithelial ovarian neoplasms and its relationship to methylation and allelic loss of the BRCA1 gene. *The Journal of pathology*. 2004;202(2):215-23.

101. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(10):814-9.
102. Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(9):665-76.
103. Singer G, Kurman RJ, Chang HW, Cho SK, Shih I. Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. *AmJPathol*. 2002;160(4):1223-8.
104. Bast RC, Jr., Hennessey B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(6):415-28.
105. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011;474(7353):609-15.
106. Zhang S, Jing Y, Zhang M, Zhang Z, Ma P, Peng H, et al. Stroma-associated master regulators of molecular subtypes predict patient prognosis in ovarian cancer. *Scientific reports*. 2015;5:16066.
107. Konecny GE, Wang C, Hamidi H, Winterhoff B, Kalli KR, Dering J, et al. Prognostic and therapeutic relevance of molecular subtypes in high-grade serous ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(10).
108. FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) annual report on the results of treatment in gynecological cancer. *IntJGynaecolObstet*. 2003;83 Suppl 1:ix-229.
109. Dvoretzky PM, Richards KA, Angel C, Rabinowitz L, Beecham JB, Bonfiglio TA. Survival time, causes of death, and tumor/treatment-related morbidity in 100 women with ovarian cancer. *HumPathol*. 1988;19(11):1273-9.
110. Benedet JL, Ngan HYS, Hacker NF. Staging classifications and clinical practice guidelines of gynaecologic cancers: Elsevier; 2000.
111. Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, et al. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet*. 2006;95 Suppl 1:S161-92.
112. Tornos C, Silva EG, Khorana SM, Burke TW. High-stage endometrioid carcinoma of the ovary. Prognostic significance of pure versus mixed histologic types. *AmJSurgPathol*. 1994;18(7):687-93.
113. Silverberg SG. Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *IntJGynecol Pathol*. 2000;19(1):7-15.
114. Peter A, Heintz M. Surgery in ovarian cancer: the concept of cytoreductive surgery. *CurrOpinObstetGynecol*. 1996;8(1):8-11.
115. Colvin RB, Preffer FI. New technologies in cell analysis by flow cytometry. *ArchPatholLab Med*. 1987;111(7):628-32.

116. Bell DA. Ovarian surface epithelial-stromal tumors. *HumPathol*. 1991;22(8):750-62.
117. Barnabei VM, Miller DS, Bauer KD, Murad TM, Rademaker AW, Lurain JR. Flow cytometric evaluation of epithelial ovarian cancer. *AmJObstetGynecol*. 1990;162(6):1584-90.
118. Gajewski WH, Fuller AF, Jr., Pastel-Ley C, Flotte TJ, Bell DA. Prognostic significance of DNA content in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 1994;53(1):5-12.
119. Hamaguchi K, Nishimura H, Miyoshi T, Miyahara K, Tateno N, Yakushiji M, et al. Flow cytometric analysis of cellular DNA content in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 1990;37(2):219-23.
120. Lage JM, Weinberg DS, Huettner PC, Mark SD. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in ovarian tumors. Association of ploidy with tumor type, histologic grade, and clinical stage. *Cancer*. 1992;69(11):2668-75.
121. Brescia RJ, Barakat RA, Beller U, Frederickson G, Suhrlund MJ, Dubin N, et al. The prognostic significance of nuclear DNA content in malignant epithelial tumors of the ovary. *Cancer*. 1990;65(1):141-7.
122. Havrilesky L, Darcy k M, Hamdan H, Priore RL, Leon J, Bell J, et al. Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(20):3814-25.
123. Hall J, Paul J, Brown R. Critical evaluation of p53 as a prognostic marker in ovarian cancer. *Expert reviews in molecular medicine*. 2004;6(12):1-20.
124. Buller RE, Runnebaum IB, Karlan BY, Horowitz JA, Shahin M, Buekers T, et al. A phase I/II trial of rAd/p53 (SCH 58500) gene replacement in recurrent ovarian cancer. *Cancer gene therapy*. 2002;9(7):553-66.
125. Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, Shikami M, Cabreira-Hansen M, McQueen T, et al. MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. *Blood*. 2005;106(9):3150-9.
126. Palazzo JP, Monzon F, Burke M, Hyslop T, Dunton C, Barusevicius A, et al. Overexpression of p21WAF1/CIP1 and MDM2 characterizes serous borderline ovarian tumors. *Hum Pathol*. 2000;31(6):698-704.
127. Dogan E, Saygili U, Tuna B, Gol M, Gurel D, Acar B, et al. p53 and mdm2 as prognostic indicators in patients with epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis. *Gynecol Oncol*. 2005;97(1):46-52.
128. Mir R, Tortosa A, Martinez-Soler F, Vidal A, Condom E, Perez-Perarnau A, et al. Mdm2 antagonists induce apoptosis and synergize with cisplatin overcoming chemoresistance in TP53 wild-type ovarian cancer cells. *Int J Cancer*. 2013;132(7):1525-36.

129. Tsang YT, Deavers MT, Sun CC, Kwan SY, Kuo E, Malpica A, et al. KRAS (but not BRAF) mutations in ovarian serous borderline tumour are associated with recurrent low-grade serous carcinoma. *The Journal of pathology*. 2013;231(4):449-56.
130. Grisham RN, Iyer G, Garg K, DeLair D, Hyman DM, Zhou Q, et al. BRAF mutation is associated with early stage disease and improved outcome in patients with low-grade serous ovarian cancer. *Cancer*. 2013;119(3):548-54.
131. Camilleri-Broet S, Hardy-Bessard AC, Le Tourneau A, Paraiso D, Levrel O, Leduc B, et al. HER-2 overexpression is an independent marker of poor prognosis of advanced primary ovarian carcinoma: a multicenter study of the GINECO group. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2004;15(1):104-12.
132. Tuefferd M, Couturier J, Penault-Llorca F, Vincent-Salomon A, Broet P, Guastalla JP, et al. HER2 status in ovarian carcinomas: a multicenter GINECO study of 320 patients. *PLoS One*. 2007;2(11):e1138.
133. Mendiola M, Barriuso J, Redondo A, Marino-Enriquez A, Madero R, Espinosa E, et al. Angiogenesis-related gene expression profile with independent prognostic value in advanced ovarian carcinoma. *PLoS One*. 2008;3(12):e4051.
134. Gray LA, Sr., Christopherson WM, Hoover RN. Estrogens and endometrial carcinoma. *Obstetrical & gynecological survey*. 1977;32(7):619-21.
135. Brinton LA, Berman ML, Mortel R, Twiggs LB, Barrett RJ, Wilbanks GD, et al. Reproductive, menstrual, and medical risk factors for endometrial cancer: results from a case-control study. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1992;167(5):1317-25.
136. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1983;15(1):10-7.
137. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Jass JR, Green JS, Nomizu T, et al. The epidemiology of endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Anticancer research*. 1994;14(4B):1675-8.
138. Gustafson S, Zbuk KM, Scacheri C, Eng C. Cowden syndrome. *Seminars in oncology*. 2007;34(5):428-34.
139. Skov BG, Broholm H, Engel U, Franzmann MB, Nielsen AL, Lauritzen AF, et al. Comparison of the reproducibility of the WHO classifications of 1975 and 1994 of endometrial hyperplasia. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 1997;16(1):33-7.
140. Bergeron C, Nogales FF, Masseroli M, Abeler V, Duvillard P, Muller-Holzner E, et al. A multicentric European study testing the reproducibility of the WHO classification of endometrial hyperplasia with a proposal of a simplified working classification for biopsy and curettage specimens. *The American journal of surgical pathology*. 1999;23(9):1102-8.

141. Parazzini F, La Vecchia C, Bocciolone L, Franceschi S. The epidemiology of endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 1991;41(1):1-16.
142. Mutter GL. Endometrial intraepithelial neoplasia (EIN): will it bring order to chaos? The Endometrial Collaborative Group. *Gynecol Oncol.* 2000;76(3):287-90.
143. Trimble CL, Kauderer J, Zaino R, Silverberg S, Lim PC, Burke JJ, 2nd, et al. Concurrent endometrial carcinoma in women with a biopsy diagnosis of atypical endometrial hyperplasia: a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer.* 2006;106(4):812-9.
144. Kurman RJ, Kaminski PF, Norris HJ. The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients. *Cancer.* 1985;56(2):403-12.
145. Baak JP, Mutter GL, Robboy S, van Diest PJ, Uytterlinde AM, Orbo A, et al. The molecular genetics and morphometry-based endometrial intraepithelial neoplasia classification system predicts disease progression in endometrial hyperplasia more accurately than the 1994 World Health Organization classification system. *Cancer.* 2005;103(11):2304-12.
146. Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Beller U, Benedet JL, et al. Carcinoma of the corpus uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet.* 2006;95 Suppl 1:S105-43.
147. Zaino RJ, Kurman R, Herbold D, Gliedman J, Bundy BN, Voet R, et al. The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. Data from a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer.* 1991;68(10):2293-302.
148. Clement PB, Young RH. Endometrioid carcinoma of the uterine corpus: a review of its pathology with emphasis on recent advances and problematic aspects. *Advances in anatomic pathology.* 2002;9(3):145-84.
149. Silva EG, Deavers MT, Bodurka DC, Malpica A. Association of low-grade endometrioid carcinoma of the uterus and ovary with undifferentiated carcinoma: a new type of dedifferentiated carcinoma? *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists.* 2006;25(1):52-8.
150. Ambros RA, Sherman ME, Zahn CM, Bitterman P, Kurman RJ. Endometrial intraepithelial carcinoma: a distinctive lesion specifically associated with tumors displaying serous differentiation. *Hum Pathol.* 1995;26(11):1260-7.
151. Soslow RA, Pirog E, Isacson C. Endometrial intraepithelial carcinoma with associated peritoneal carcinomatosis. *The American journal of surgical pathology.* 2000;24(5):726-32.
152. Zheng W, Liang SX, Yu H, Rutherford T, Chambers SK, Schwartz PE. Endometrial glandular dysplasia: a newly defined precursor lesion of uterine papillary serous carcinoma. Part I: morphologic features. *International journal of surgical pathology.* 2004;12(3):207-23.

153. Gadducci A, Cosio S, Spirito N, Cionini L. Clear cell carcinoma of the endometrium: a biological and clinical enigma. *Anticancer research*. 2010;30(4):1327-34.
154. An HJ, Logani S, Isacson C, Ellenson LH. Molecular characterization of uterine clear cell carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2004;17(5):530-7.
155. Kurman RJ, Scully RE. Clear cell carcinoma of the endometrium: an analysis of 21 cases. *Cancer*. 1976;37(2):872-82.
156. Fadare O, Liang SX, Ulukus EC, Chambers SK, Zheng W. Precursors of endometrial clear cell carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 2006;30(12):1519-30.
157. Abeler VM, Kjorstad KE. Endometrial adenocarcinoma in Norway. A study of a total population. *Cancer*. 1991;67(12):3093-103.
158. Webb GA, Lagios MD. Clear cell carcinoma of the endometrium. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1987;156(6):1486-91.
159. Sreenan JJ, Hart WR. Carcinosarcomas of the female genital tract. A pathologic study of 29 metastatic tumors: further evidence for the dominant role of the epithelial component and the conversion theory of histogenesis. *The American journal of surgical pathology*. 1995;19(6):666-74.
160. Rosai J. Why microscopy will remain a cornerstone of surgical pathology. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2007;87(5):403-8.
161. Lax SF. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2004;444(3):213-23.
162. Moreno-Bueno G, Sanchez-Estevez C, Cassia R, Rodriguez-Perales S, Diaz-Uriarte R, Dominguez O, et al. Differential gene expression profile in endometrioid and nonendometrioid endometrial carcinoma: STK15 is frequently overexpressed and amplified in nonendometrioid carcinomas. *Cancer Res*. 2003;63(18):5697-702.
163. Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, Carney ME, Dodge RK, Barrett JC, et al. PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1998;4(12):3005-10.
164. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, et al. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(11):924-30.
165. Maxwell GL, Risinger JI, Gumbs C, Shaw H, Bentley RC, Barrett JC, et al. Mutation of the PTEN tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias. *Cancer Res*. 1998;58(12):2500-3.

166. Prat J, Gallardo A, Cuatrecasas M, Catusus L. Endometrial carcinoma: pathology and genetics. *Pathology*. 2007;39(1):72-87.
167. Pallares J, Bussaglia E, Martinez-Guitarte JL, Dolcet X, Llobet D, Rue M, et al. Immunohistochemical analysis of PTEN in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with a comparison of four commercial antibodies in correlation with molecular abnormalities. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2005;18(5):719-27.
168. Stambolic V, Tsao MS, Macpherson D, Suzuki A, Chapman WB, Mak TW. High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in pten^{+/-} mice. *Cancer Res.* 2000;60(13):3605-11.
169. Minaguchi T, Yoshikawa H, Oda K, Ishino T, Yasugi T, Onda T, et al. PTEN mutation located only outside exons 5, 6, and 7 is an independent predictor of favorable survival in endometrial carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2001;7(9):2636-42.
170. Panigrahi AR, Pinder SE, Chan SY, Paish EC, Robertson JF, Ellis IO. The role of PTEN and its signalling pathways, including AKT, in breast cancer; an assessment of relationships with other prognostic factors and with outcome. *JPathol.* 2004;204(1):93-100.
171. Oda K, Stokoe D, Taketani Y, McCormick F. High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer Res.* 2005;65(23):10669-73.
172. Catusus L, Gallardo A, Cuatrecasas M, Prat J. PIK3CA mutations in the kinase domain (exon 20) of uterine endometrial adenocarcinomas are associated with adverse prognostic parameters. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2008;21(2):131-9.
173. Velasco A, Bussaglia E, Pallares J, Dolcet X, Llobet D, Encinas M, et al. PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma: correlation with PTEN and K-RAS alterations. *Hum Pathol.* 2006;37(11):1465-72.
174. Feng YZ, Shiozawa T, Miyamoto T, Kashima H, Kurai M, Suzuki A, et al. BRAF mutation in endometrial carcinoma and hyperplasia: correlation with KRAS and p53 mutations and mismatch repair protein expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2005;11(17):6133-8.
175. Pappa KI, Choleza M, Markaki S, Giannikaki E, Kyroudi A, Vlachos G, et al. Consistent absence of BRAF mutations in cervical and endometrial cancer despite KRAS mutation status. *Gynecol Oncol.* 2006;100(3):596-600.
176. Caduff RF, Johnston CM, Frank TS. Mutations of the Ki-ras oncogene in carcinoma of the endometrium. *The American journal of pathology.* 1995;146(1):182-8.
177. Enomoto T, Inoue M, Perantoni AO, Buzard GS, Miki H, Tanizawa O, et al. K-ras activation in premalignant and malignant epithelial lesions of the human uterus. *Cancer Res.* 1991;51(19):5308-14.

178. Lagarda H, Catusus L, Arguelles R, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *The Journal of pathology*. 2001;193(2):193-9.
179. Schofield MJ, Hsieh P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annual review of microbiology*. 2003;57:579-608.
180. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993;260(5109):812-6.
181. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996;87(2):159-70.
182. Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Watson P, Lynch HT, Boyd J. Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. *Cancer Res*. 1993;53(21):5100-3.
183. Caduff RF, Johnston CM, Svoboda-Newman SM, Poy EL, Merajver SD, Frank TS. Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *The American journal of pathology*. 1996;148(5):1671-8.
184. Catusus L, Machin P, Matias-Guiu X, Prat J. Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations in a series of 42 cases. *Hum Pathol*. 1998;29(10):1160-4.
185. Esteller M, Catusus L, Matias-Guiu X, Mutter GL, Prat J, Baylin SB, et al. hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *The American journal of pathology*. 1999;155(5):1767-72.
186. Tashiro H, Lax SF, Gaudin PB, Isacson C, Cho KR, Hedrick L. Microsatellite instability is uncommon in uterine serous carcinoma. *The American journal of pathology*. 1997;150(1):75-9.
187. Black D, Soslow RA, Levine DA, Tornos C, Chen SC, Hummer AJ, et al. Clinicopathologic significance of defective DNA mismatch repair in endometrial carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(11):1745-53.
188. Zigelboim I, Goodfellow PJ, Gao F, Gibb RK, Powell MA, Rader JS, et al. Microsatellite instability and epigenetic inactivation of MLH1 and outcome of patients with endometrial carcinomas of the endometrioid type. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(15):2042-8.
189. Ilyas M, Tomlinson IP. The interactions of APC, E-cadherin and beta-catenin in tumour development and progression. *The Journal of pathology*. 1997;182(2):128-37.
190. Schlosshauer PW, Pirog EC, Levine RL, Ellenson LH. Mutational analysis of the CTNNB1 and APC genes in uterine endometrioid carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2000;13(10):1066-71.

191. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(10):5522-7.
192. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sarrio D, Sanchez C, Cassia R, Prat J, et al. Abnormalities of E- and P-cadherin and catenin (beta-, gamma-catenin, and p120ctn) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia. *The Journal of pathology*. 2003;199(4):471-8.
193. Saegusa M, Hashimura M, Yoshida T, Okayasu I. beta- Catenin mutations and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis. *British journal of cancer*. 2001;84(2):209-17.
194. Holcomb K, Delatorre R, Pedemonte B, McLeod C, Anderson L, Chambers J. E-cadherin expression in endometrioid, papillary serous, and clear cell carcinoma of the endometrium. *Obstetrics and gynecology*. 2002;100(6):1290-5.
195. Kim YT, Choi EK, Kim JW, Kim DK, Kim SH, Yang WI. Expression of E-cadherin and alpha-, beta-, gamma-catenin proteins in endometrial carcinoma. *Yonsei medical journal*. 2002;43(6):701-11.
196. Tashiro H, Isacson C, Levine R, Kurman RJ, Cho KR, Hedrick L. p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *The American journal of pathology*. 1997;150(1):177-85.
197. Soong R, Robbins PD, Dix BR, Grieu F, Lim B, Knowles S, et al. Concordance between p53 protein overexpression and gene mutation in a large series of common human carcinomas. *Hum Pathol*. 1996;27(10):1050-5.
198. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*. 1998;281(5381):1317-22.
199. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*. 1997;386(6625):623-7.
200. Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L. The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer*. 2000;88(4):814-24.
201. Matias-Guiu X, Catusus L, Bussaglia E, Lagarda H, Garcia A, Pons C, et al. Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol*. 2001;32(6):569-77.
202. Ejskjaer K, Sorensen BS, Poulsen SS, Forman A, Nexø E, Mogensen O. Expression of the epidermal growth factor system in endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2007;104(1):158-67.
203. Gutierrez C, Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2011;135(1):55-62.

204. Grushko TA, Filiaci VL, Mundt AJ, Ridderstrale K, Olopade OI, Fleming GF, et al. An exploratory analysis of HER-2 amplification and overexpression in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2008;108(1):3-9.
205. Rolitsky CD, Theil KS, McGaughy VR, Copeland LJ, Niemann TH. HER-2/neu amplification and overexpression in endometrial carcinoma. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 1999;18(2):138-43.
206. Slomovitz BM, Broaddus RR, Burke TW, Sneige N, Soliman PT, Wu W, et al. Her-2/neu overexpression and amplification in uterine papillary serous carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(15):3126-32.
207. Vilella JA, Cohen S, Smith DH, Hibshoosh H, Hershman D. HER-2/neu overexpression in uterine papillary serous cancers and its possible therapeutic implications. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2006;16(5):1897-902.
208. Santin AD, Bellone S, Van Stedum S, Bushen W, De Las Casas LE, Korourian S, et al. Determination of HER2/neu status in uterine serous papillary carcinoma: Comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Gynecol Oncol*. 2005;98(1):24-30.
209. Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N, Cohn DE, Kelbick N, Copeland L, et al. HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(15):2376-85.
210. Hayes MP, Ellenson LH. Molecular alterations in uterine serous carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2010;116(2):286-9.
211. Peiro G, Mayr D, Hillemanns P, Lohrs U, Diebold J. Analysis of HER-2/neu amplification in endometrial carcinoma by chromogenic in situ hybridization. Correlation with fluorescence in situ hybridization, HER-2/neu, p53 and Ki-67 protein expression, and outcome. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2004;17(3):227-87.
212. Fleming GF, Sill MW, Darcy KM, McMeekin DS, Thigpen JT, Adler LM, et al. Phase II trial of trastuzumab in women with advanced or recurrent, HER2-positive endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2010;116(1):15-20.
213. Hayes MP, Douglas W, Ellenson LH. Molecular alterations of EGFR and PIK3CA in uterine serous carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2009;113(3):370-3.
214. Konecny GE, Santos L, Winterhoff B, Hatmal M, Keeney GL, Mariani A, et al. HER2 gene amplification and EGFR expression in a large cohort of surgically staged patients with nonendometrioid (type II) endometrial cancer. *British journal of cancer*. 2009;100(1):89-95.

215. Romagosa C, Simonetti S, Lopez-Vicente L, Mazo A, Lleonart ME, Castellvi J, et al. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*. 2011;30(18):2087-97.
216. Kalof AN, Cooper K. p16INK4a immunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Advances in anatomic pathology*. 2006;13(4):190-4.
217. Santos M, Montagut C, Mellado B, Garcia A, Ramon y Cajal S, Cardesa A, et al. Immunohistochemical staining for p16 and p53 in premalignant and malignant epithelial lesions of the vulva. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2004;23(3):206-14.
218. Nakashima R, Fujita M, Enomoto T, Haba T, Yoshino K, Wada H, et al. Alteration of p16 and p15 genes in human uterine tumours. *British journal of cancer*. 1999;80(3-4):458-67.
219. Han G, Sidhu D, Duggan MA, Arseneau J, Cesari M, Clement PB, et al. Reproducibility of histological cell type in high-grade endometrial carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2013;26(12):1594-604.
220. Salvesen HB, Das S, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression is not associated with promoter methylation but defines a subgroup of aggressive endometrial carcinomas with poor prognosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(1):153-9.
221. Samarathai N, Hall K, Yeh IT. Molecular profiling of endometrial malignancies. *Obstetrics and gynecology international*. 2010;2010:162363.
222. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
223. Lax SF, Pizer ES, Ronnett BM, Kurman RJ. Clear cell carcinoma of the endometrium is characterized by a distinctive profile of p53, Ki-67, estrogen, and progesterone receptor expression. *Hum Pathol*. 1998;29(6):551-8.
224. Kandath C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013;497(7447):67-73.
225. Yamazawa K, Seki K, Matsui H, Kihara M, Sekiya S. Prognostic factors in young women with endometrial carcinoma: a report of 20 cases and review of literature. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2000;10(3):212-22.
226. Kosary CL. FIGO stage, histology, histologic grade, age and race as prognostic factors in determining survival for cancers of the female gynecological system: an analysis of 1973-87 SEER cases of cancers of the endometrium, cervix, ovary, vulva, and vagina. *Seminars in surgical oncology*. 1994;10(1):31-46.

227. Lee KR, Vacek PM, Belinson JL. Traditional and nontraditional histopathologic predictors of recurrence in uterine endometrioid adenocarcinoma. *Gynecol Oncol.* 1994;54(1):10-8.
228. Zaino RJ, Kurman RJ, Diana KL, Morrow CP. The utility of the revised International Federation of Gynecology and Obstetrics histologic grading of endometrial adenocarcinoma using a defined nuclear grading system. A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer.* 1995;75(1):81-6.
229. Obermair A, Geramou M, Gucer F, Denison U, Graf AH, Kapshammer E, et al. Endometrial cancer: accuracy of the finding of a well differentiated tumor at dilatation and curettage compared to the findings at subsequent hysterectomy. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society.* 1999;9(5):383-6.
230. Odicino F, Tisi G, Rampinelli F, Miscioscia R, Sartori E, Pecorelli S. New development of the FIGO staging system. *Gynecol Oncol.* 2007;107(1 Suppl 1):S8-9.
231. Zaino RJ. FIGO staging of endometrial adenocarcinoma: a critical review and proposal. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists.* 2009;28(1):1-9.
232. Tambouret R, Clement PB, Young RH. Endometrial endometrioid adenocarcinoma with a deceptive pattern of spread to the uterine cervix: a manifestation of stage IIb endometrial carcinoma liable to be misinterpreted as an independent carcinoma or a benign lesion. *The American journal of surgical pathology.* 2003;27(8):1080-8.
233. Lewin SN, Herzog TJ, Barrera Medel NI, Deutsch I, Burke WM, Sun X, et al. Comparative performance of the 2009 international Federation of gynecology and obstetrics' staging system for uterine corpus cancer. *Obstetrics and gynecology.* 2010;116(5):1141-9.
234. Salvesen HB, Haldorsen IS, Trovik J. Markers for individualised therapy in endometrial carcinoma. *The Lancet Oncology.* 2012;13(8):e353-61.
235. Eifel PJ, Ross J, Hendrickson M, Cox RS, Kempson R, Martinez A. Adenocarcinoma of the endometrium. Analysis of 256 cases with disease limited to the uterine corpus: treatment comparisons. *Cancer.* 1983;52(6):1026-31.
236. Schwab KV, O'Malley DM, Fowler JM, Copeland LJ, Cohn DE. Prospective evaluation of prognostic significance of the tumor-free distance from uterine serosa in surgically staged endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol.* 2009;112(1):146-9.
237. Nofech-Mozes S, Ackerman I, Ghorab Z, Ismiil N, Thomas G, Covens A, et al. Lymphovascular invasion is a significant predictor for distant recurrence in patients with early-stage endometrial endometrioid adenocarcinoma. *American journal of clinical pathology.* 2008;129(6):912-7.
238. Gal D, Recio FO, Zamurovic D, Tancer ML. Lymphovascular space involvement- a prognostic indicator in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol.* 1991;42(2):142-5.

239. Inoue Y, Obata K, Abe K, Ohmura G, Doh K, Yoshioka T, et al. The prognostic significance of vascular invasion by endometrial carcinoma. *Cancer*. 1996;78(7):1447-51.
240. Kadar N, Malfetano JH, Homesley HD. Steroid receptor concentrations in endometrial carcinoma: effect on survival in surgically staged patients. *Gynecol Oncol*. 1993;50(3):281-6.
241. Pertschuk LP, Masood S, Simone J, Feldman JG, Fruchter RG, Axiotis CA, et al. Estrogen receptor immunocytochemistry in endometrial carcinoma: a prognostic marker for survival. *Gynecol Oncol*. 1996;63(1):28-33.
242. Tornos C, Silva EG, el-Naggar A, Burke TW. Aggressive stage I grade 1 endometrial carcinoma. *Cancer*. 1992;70(4):790-8.
243. Jongen V, Briet J, de Jong R, ten Hoor K, Boezen M, van der Zee A, et al. Expression of estrogen receptor-alpha and -beta and progesterone receptor-A and -B in a large cohort of patients with endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2009;112(3):537-42.
244. Togami S, Sasajima Y, Oi T, Ishikawa M, Onda T, Ikeda S, et al. Clinicopathological and prognostic impact of human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) and hormone receptor expression in uterine papillary serous carcinoma. *Cancer Sci*. 2012;103(5):926-32.
245. Azueta A, Gatus S, Matias-Guiu X. Endometrioid carcinoma of the endometrium: pathologic and molecular features. *Semin Diagn Pathol*. 2010;27(4):226-40.
246. Song W, Zhang T, Li W, Mu R, Zhang L, Li Y, et al. Overexpression of Fli-1 is Associated with Adverse Prognosis of Endometrial Cancer. *Cancer investigation*. 2015;1-7.
247. Yuan Y, Shen N, Yang SY, Zhao L, Guan YM. Extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase-2 overexpression is associated with loss of hormone receptor expression and poor prognosis in endometrial cancer. *Oncology letters*. 2015;10(1):342-8.
248. Zigelboim I, Ali S, Lankes HA, Backes F, Moore K, Mutch D, et al. Assessing the prognostic role of ATR mutation in endometrioid endometrial cancer: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2015;138(3):614-9.
249. Iwadate R, Inoue J, Tsuda H, Takano M, Furuya K, Hirasawa A, et al. High Expression of p62 Protein Is Associated with Poor Prognosis and Aggressive Phenotypes in Endometrial Cancer. *The American journal of pathology*. 2015;185(9):2523-33.
250. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194(4260):23-8.
251. Vineis P. Cancer as an evolutionary process at the cell level: an epidemiological perspective. *Carcinogenesis*. 2003;24(1):1-6.

252. Scheel C, Onder T, Karnoub A, Weinberg RA. Adaptation versus selection: the origins of metastatic behavior. *Cancer Res.* 2007;67(24):11476-9; discussion 9-80.
253. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England journal of medicine.* 2012;366(10):883-92.
254. Tomasetti C, Marchionni L, Nowak MA, Parmigiani G, Vogelstein B. Only three driver gene mutations are required for the development of lung and colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2015;112(1):118-23.
255. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science.* 2013;339(6127):1546-58.
256. Bozic I, Antal T, Ohtsuki H, Carter H, Kim D, Chen S, et al. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(43):18545-50.
257. Pottier C, Wheatherspoon A, Roncarati P, Longuespee R, Herfs M, Duray A, et al. The importance of the tumor microenvironment in the therapeutic management of cancer. *Expert review of anticancer therapy.* 2015;15(8):943-54.
258. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
259. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2010;141(7):1117-34.
260. Perona R. Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin Transl Oncol.* 2006;8(2):77-82.
261. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000;103(2):211-25.
262. Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, et al. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia.* 2003;17(7):1263-93.
263. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Advances in cancer research.* 2009;102:19-65.
264. Rubin H. Cell-cell contact interactions conditionally determine suppression and selection of the neoplastic phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;105(17):6215-21.
265. Curto M, Cole BK, Lallemand D, Liu CH, McClatchey AI. Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *The Journal of cell biology.* 2007;177(5):893-903.

266. Partanen JI, Nieminen AI, Klefstrom J. 3D view to tumor suppression: Lkb1, polarity and the arrest of oncogenic c-Myc. *Cell Cycle*. 2009;8(5):716-24.
267. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324-37.
268. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281(5381):1312-6.
269. MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO reports*. 2004;5(7):674-8.
270. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42.
271. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
272. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature reviews Genetics*. 2005;6(8):611-22.
273. Ben-Porath I, Weinberg RA. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(1):8-13.
274. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *The New England journal of medicine*. 2008;358(19):2039-49.
275. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52-67.
276. Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *European journal of cancer*. 2009;45(11):1924-34.
277. Zumsteg A, Christofori G. Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis. *Current opinion in oncology*. 2009;21(1):60-70.
278. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1420-8.
279. Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature*. 2006;441(7092):444-50.
280. Stetler-Stevenson WG, Yu AE. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Seminars in cancer biology*. 2001;11(2):143-52.
281. Smith HA, Kang Y. The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. *Journal of molecular medicine*. 2013;91(4):411-29.
282. Naumov GN, Folkman J, Straume O, Akslen LA. Tumor-vascular interactions and tumor dormancy. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2008;116(7-8):569-85.

283. Lichtenstein AV. Cancer: evolutionary, genetic and epigenetic aspects. *Clinical epigenetics*. 2010;1(3-4):85-100.
284. Korkola J, Gray JW. Breast cancer genomes--form and function. *Current opinion in genetics & development*. 2010;20(1):4-14.
285. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, Lopez C, Jaen J, Bosch R, et al. Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(34):5350-7.
286. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
287. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 2008;134(5):703-7.
288. Vajdic CM, van Leeuwen MT. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer*. 2009;125(8):1747-54.
289. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in cancer biology*. 2015.
290. Mamalis A, Garcha M, Jagdeo J. Targeting the PD-1 pathway: a promising future for the treatment of melanoma. *Archives of dermatological research*. 2014;306(6):511-9.
291. Alberts B. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science; 2008. xxxiii, 1268, G 40, I-49 p. p.
292. Weinberg RA. *The biology of cancer*. New York: Garland Science; 2007. xix, 796 p., 48 p. p.
293. Pires-daSilva A, Sommer RJ. The evolution of signalling pathways in animal development. *Nature reviews Genetics*. 2003;4(1):39-49.
294. Amit I, Wides R, Yarden Y. Evolvable signaling networks of receptor tyrosine kinases: relevance of robustness to malignancy and to cancer therapy. *Molecular systems biology*. 2007;3:151.
295. Cohen P. The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *EurJBiochem*. 2001;268(19):5001-10.
296. Roskoski R, Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *BiochemBiophysResCommun*. 2004;319(1):1-11.
297. Wells A. EGF receptor. *IntJBiochemCell Biol*. 1999;31(6):637-43.
298. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 2001;411(6835):355-65.

299. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995;19(3):183-232.
300. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(2):127-37.
301. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature*. 1986;319(6050):226-30.
302. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*. 1985;229(4717):974-6.
303. Wright C, Mellon K, Johnston P, Lane DP, Harris AL, Horne CH, et al. Expression of mutant p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Br J Cancer*. 1991;63(6):967-70.
304. Press MF, Pike MC, Hung G, Zhou JY, Ma Y, George J, et al. Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. *Cancer Res*. 1994;54(21):5675-82.
305. Berchuck A, Rodriguez G, Kinney RB, Soper JT, Dodge RK, Clarke-Pearson DL, et al. Overexpression of HER-2/neu in endometrial cancer is associated with advanced stage disease. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;164(1 Pt 1):15-21.
306. Koka V, Potti A, Koch M, Fraiman G, Mehdi S, Levitt R. Role of immunohistochemical identification of Her-2/neu and detection of variability in overexpression in pancreatic carcinoma. *Anticancer Res*. 2002;22(3):1593-7.
307. Micke P, Hengstler JG, Ros R, Bittinger F, Metz T, Gebhard S, et al. c-erbB-2 expression in small-cell lung cancer is associated with poor prognosis. *Int J Cancer*. 2001;92(4):474-9.
308. Kuhn EJ, Kurnot RA, Sesterhenn IA, Chang EH, Moul JW. Expression of the c-erbB-2 (HER-2/neu) oncoprotein in human prostatic carcinoma. *J Urol*. 1993;150(5 Pt 1):1427-33.
309. Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell*. 2003;4(4):257-62.
310. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews Genetics*. 2006;7(8):606-19.
311. Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature reviews Cancer*. 2015;15(1):7-24.
312. Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(8):4240-5.

313. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*. 2002;14(5):381-95.
314. Chen R, Kim O, Yang J, Sato K, Eisenmann KM, McCarthy J, et al. Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *JBiolChem*. 2001;276(34):31858-62.
315. Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci*. 1997;22(9):355-8.
316. Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, et al. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med*. 2002;8(10):1136-44.
317. Gordan JD, Simon MC. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Current opinion in genetics & development*. 2007;17(1):71-7.
318. Calera MR, Martinez C, Liu H, Jack AK, Birnbaum MJ, Pilch PF. Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem*. 1998;273(13):7201-4.
319. Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, Hamilton TC, et al. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(19):9267-71.
320. Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA, et al. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer*. 1995;64(4):280-5.
321. Arranz E, Robledo M, Martinez B, Gallego J, Roman A, Rivas C, et al. Incidence of homogeneously staining regions in non-Hodgkin lymphomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 1996;87(1):1-3.
322. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*. 2005;24(50):7455-64.
323. Inoki K, Ouyang H, Li Y, Guan KL. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005;69(1):79-100.
324. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*. 1991;253(5022):905-9.
325. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*. 2007;12(1):9-22.
326. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(5):307-18.

327. Schieke SM, Phillips D, McCoy JP, Jr., Aponte AM, Shen RF, Balaban RS, et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J Biol Chem*. 2006;281(37):27643-52.
328. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005;307(5712):1098-101.
329. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*. 2004;14(14):1296-302.
330. Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol*. 2005;15(8):702-13.
331. Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(10):774-85.
332. Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(11):851-64.
333. Behbakht K, Sill MW, Darcy KM, Rubin SC, Mannel RS, Waggoner S, et al. Phase II trial of the mTOR inhibitor, temsirolimus and evaluation of circulating tumor cells and tumor biomarkers in persistent and recurrent epithelial ovarian and primary peritoneal malignancies: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2011;123(1):19-26.
334. Bhatt AP, Bhende PM, Sin SH, Roy D, Dittmer DP, Damania B. Dual inhibition of PI3K and mTOR inhibits autocrine and paracrine proliferative loops in PI3K/Akt/mTOR-addicted lymphomas. *Blood*. 2010;115(22):4455-63.
335. Blay JY. Updating progress in sarcoma therapy with mTOR inhibitors. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2011;22(2):280-7.
336. Hynes NE, Boulay A. The mTOR pathway in breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2006;11(1):53-61.
337. Malizzia LJ, Hsu A. Temsirolimus, an mTOR inhibitor for treatment of patients with advanced renal cell carcinoma. *Clinical journal of oncology nursing*. 2008;12(4):639-46.
338. Westin JR. Status of PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in lymphoma. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2014;14(5):335-42.
339. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006;124(3):471-84.
340. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004;18(16):1926-45.

341. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J.* 2012;441(1):1-21.
342. Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene.* 2006;25(48):6416-22.
343. Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW, Sonenberg N. eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene.* 2004;23(18):3172-9.
344. Petroulakis E, Mamane Y, Le Bacquer O, Shahbazian D, Sonenberg N. mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy. *British journal of cancer.* 2006;94(2):195-9.
345. Tsukiyama-Kohara K, Poulin F, Kohara M, DeMaria CT, Cheng A, Wu Z, et al. Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1. *Nat Med.* 2001;7(10):1128-32.
346. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:913-63.
347. Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, et al. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes & development.* 2001;15(21):2852-64.
348. Beretta L, Gingras AC, Svitkin YV, Hall MN, Sonenberg N. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *The EMBO journal.* 1996;15(3):658-64.
349. Lopez-Lastra M, Rivas A, Barria MI. Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res.* 2005;38(2-3):121-46.
350. Constantinou C, Clemens MJ. Regulation of the phosphorylation and integrity of protein synthesis initiation factor eIF4GI and the translational repressor 4E-BP1 by p53. *Oncogene.* 2005.
351. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995;9(9):726-35.
352. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets.* 2012;16(1):103-19.
353. Pan CQ, Sudol M, Sheetz M, Low BC. Modularity and functional plasticity of scaffold proteins as p(l)acemakers in cell signaling. *Cell Signal.* 2012;24(11):2143-65.
354. Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene.* 2007;26(22):3203-13.
355. Kolch W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *NatRevMolCell Biol.* 2005;6(11):827-37.

356. Shimizu K, Goldfarb M, Suard Y, Perucho M, Li Y, Kamata T, et al. Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *ProcNatlAcadSciUSA*. 1983;80(8):2112-6.
357. Jancik S, Drabek J, Radzioch D, Hajduch M. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:150960.
358. Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal*. 2003;15(5):463-9.
359. Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *NatRevCancer*. 2006;6(4):292-306.
360. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
361. Tiacchi E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *The New England journal of medicine*. 2011;364(24):2305-15.
362. Scholl FA, Dumesic PA, Khavari PA. Effects of active MEK1 expression in vivo. *Cancer Lett*. 2005;230(1):1-5.
363. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *MicrobiolMolBiolRev*. 2004;68(2):320-44.
364. Dong C, Waters SB, Holt KH, Pessin JE. SOS phosphorylation and disassociation of the Grb2-SOS complex by the ERK and JNK signaling pathways. *JBiolChem*. 1996;271(11):6328-32.
365. Holland EC, Sonenberg N, Pandolfi PP, Thomas G. Signaling control of mRNA translation in cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2004;23(18):3138-44.
366. Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J*. 1999;18(3):664-74.
367. Gaestel M. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *NatRevMolCell Biol*. 2006;7(2):120-30.
368. Kinsel LB, Szabo E, Greene GL, Konrath J, Leight GS, McCarty KS, Jr. Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison with quantitative biochemical methods. *Cancer Res*. 1989;49(4):1052-6.
369. Karlsson C, Bodin L, Piehl-Aulin K, Karlsson MG. Tissue microarray validation: a methodologic study with special reference to lung cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009;18(7):2014-21.

370. Vassilakopoulou M, Parisi F, Siddiqui S, England AM, Zarella ER, Anagnostou V, et al. Preanalytical variables and phosphoepitope expression in FFPE tissue: quantitative epitope assessment after variable cold ischemic time. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2015;95(3):334-41.
371. Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2012;460(3):237-49.
372. Bansal N, Yendluri V, Wenham RM. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. *Cancer Control*. 2009;16(1):8-13.
373. Haapasalo H, Collan Y, Seppä A, Gidlund AL, Atkin NB, Pesonen E. Prognostic value of ovarian carcinoma grading methods--a method comparison study. *Histopathology*. 1990;16(1):1-7.
374. Yeh IT. Measuring HER-2 in breast cancer. Immunohistochemistry, FISH, or ELISA? *American journal of clinical pathology*. 2002;117 Suppl:S26-35.
375. Hogdall EV, Christensen L, Kjaer SK, Blaakaer J, Bock JE, Glud E, et al. Distribution of HER-2 overexpression in ovarian carcinoma tissue and its prognostic value in patients with ovarian carcinoma: from the Danish MALOVA Ovarian Cancer Study. *Cancer*. 2003;98(1):66-73.
376. Meden H, Kuhn W. Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER2/neu) in ovarian cancer: a new prognostic factor. *EurJObstetGynecol ReprodBiol*. 1997;71(2):173-9.
377. Khalifa MA, Mannel RS, Haraway SD, Walker J, Min KW. Expression of EGFR, HER-2/neu, P53, and PCNA in endometrioid, serous papillary, and clear cell endometrial adenocarcinomas. *Gynecol Oncol*. 1994;53(1):84-92.
378. Buza N, Roque DM, Santin AD. HER2/neu in Endometrial Cancer: A Promising Therapeutic Target With Diagnostic Challenges. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2014;138(3):343-50.
379. Xu M, Schwartz P, Rutherford T, Azodi M, Santin A, Silasi D, et al. HER-2/neu receptor gene status in endometrial carcinomas: a tissue microarray study. *Histopathology*. 2010;56(2):269-73.
380. Matias-Guiu X, Prat J. Molecular pathology of ovarian carcinomas. *Virchows Arch*. 1998;433(2):103-11.
381. Ross JS, Yang F, Kallakury BV, Sheehan CE, Ambros RA, Muraca PJ. HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization in epithelial tumors of the ovary. *AmJClinPathol*. 1999;111(3):311-6.
382. Santin AD, Bellone S, Van Stedum S, Bushen W, Palmieri M, Siegel ER, et al. Amplification of c-erbB2 oncogene: a major prognostic indicator in uterine serous papillary carcinoma. *Cancer*. 2005;104(7):1391-7.

383. Growdon WB, Groeneweg J, Byron V, DiGloria C, Borger DR, Tambouret R, et al. HER2 over-expressing high grade endometrial cancer expresses high levels of p95HER2 variant. *Gynecol Oncol.* 2015;137(1):160-6.
384. Martinez-Navarro EM, Rebollo J, Gonzalez-Manzano R, Sureda M, Evgenyeva E, Valenzuela B, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in a series of non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients and response rate to EGFR-specific tyrosine kinase inhibitors (TKIs). *Clin Transl Oncol.* 2011;13(11):812-8.
385. Nicholas MK, Lukas RV, Jafri NF, Faoro L, Salgia R. Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2006;12(24):7261-70.
386. De Jong KP, Stellema R, Karrenbeld A, Koudstaal J, Gouw AS, Sluiter WJ, et al. Clinical relevance of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, p53, and Ki67 in colorectal liver metastases and corresponding primary tumors. *Hepatology.* 1998;28(4):971-9.
387. Hainsworth PJ, Henderson MA, Stillwell RG, Bennett RC. Comparison of EGFR, c-erbB-2 product and ras p21 immunohistochemistry as prognostic markers in primary breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 1991;17(1):9-15.
388. Storkel S, Reichert T, Reiffen KA, Wagner W. EGFR and PCNA expression in oral squamous cell carcinomas--a valuable tool in estimating the patient's prognosis. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1993;29B(4):273-7.
389. Tateishi M, Ishida T, Kohdono S, Hamatake M, Fukuyama Y, Sugimachi K. Prognostic influence of the co-expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 protein in human lung adenocarcinoma. *Surg Oncol.* 1994;3(2):109-13.
390. Yonemura Y, Takamura H, Ninomiya I, Fushida S, Tsugawa K, Kaji M, et al. Interrelationship between transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in advanced gastric cancer. *Oncology.* 1992;49(2):157-61.
391. Wen YH, Brogi E, Hasanovic A, Ladanyi M, Soslow RA, Chitale D, et al. Immunohistochemical staining with EGFR mutation-specific antibodies: high specificity as a diagnostic marker for lung adenocarcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2013;26(9):1197-203.
392. Stadlmann S, Gueth U, Reiser U, Diener PA, Zeimet AG, Wight E, et al. Epithelial growth factor receptor status in primary and recurrent ovarian cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2006;19(4):607-10.
393. Schilder RJ, Sill MW, Chen X, Darcy KM, Decesare SL, Lewandowski G, et al. Phase II study of gefitinib in patients with relapsed or persistent ovarian or primary peritoneal carcinoma and evaluation of epidermal growth factor receptor mutations and immunohistochemical expression: a Gynecologic Oncology Group Study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2005;11(15):5539-48.

394. Thoury A, Descatoire V, Kotelevets L, Kannengiesser C, Bertrand G, Theou-Anton N, et al. Evidence for different expression profiles for c-Met, EGFR, PTEN and the mTOR pathway in low and high grade endometrial carcinomas in a cohort of consecutive women. Occurrence of PIK3CA and K-Ras mutations and microsatellite instability. *Histol Histopathol.* 2014;29(11):1455-66.
395. Scambia G, Benedetti-Panici P, Ferrandina G, Distefano M, Salerno G, Romanini ME, et al. Epidermal growth factor, oestrogen and progesterone receptor expression in primary ovarian cancer: correlation with clinical outcome and response to chemotherapy. *British journal of cancer.* 1995;72(2):361-6.
396. Fischer-Colbrie J, Witt A, Heinzl H, Speiser P, Czerwenka K, Sevela P, et al. EGFR and steroid receptors in ovarian carcinoma: comparison with prognostic parameters and outcome of patients. *Anticancer research.* 1997;17(1B):613-9.
397. Skirnisdottir I, Sorbe B, Seidal T. The growth factor receptors HER-2/neu and EGFR, their relationship, and their effects on the prognosis in early stage (FIGO I-II) epithelial ovarian carcinoma. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society.* 2001;11(2):119-29.
398. Baekelandt M, Kristensen GB, Trope CG, Nesland JM, Holm R. Epidermal growth factor receptor expression has no independent prognostic significance in advanced ovarian cancer. *Anticancer research.* 1999;19(5C):4469-74.
399. Meden H, Marx D, Raab T, Kron M, Schauer A, Kuhn W. EGF-R and overexpression of the oncogene c-erbB-2 in ovarian cancer: immunohistochemical findings and prognostic value. *J Obstet Gynaecol (Tokyo 1995).* 1995;21(2):167-78.
400. Leslie KK, Sill MW, Fischer E, Darcy KM, Mannel RS, Tewari KS, et al. A phase II evaluation of gefitinib in the treatment of persistent or recurrent endometrial cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* 2013;129(3):486-94.
401. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* 2005;9(1):59-71.
402. Thompson FH, Nelson MA, Trent JM, Guan XY, Liu Y, Yang JM, et al. Amplification of 19q13.1-q13.2 sequences in ovarian cancer. G-band, FISH, and molecular studies. *Cancer Genet Cytogenet.* 1996;87(1):55-62.
403. Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Advances in cancer research.* 2005;94:29-86.
404. Robertson GP. Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2005;24(2):273-85.
405. Woenckhaus J, Steger K, Sturm K, Munstedt K, Franke FE, Fenic I. Prognostic value of PIK3CA and phosphorylated AKT expression in ovarian cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology.* 2007;450(4):387-95.

406. Kirkegaard T, Witton CJ, McGlynn LM, Tovey SM, Dunne B, Lyon A, et al. AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *The Journal of pathology*. 2005;207(2):139-46.
407. Meier R, Alessi DR, Cron P, Andjelkovic M, Hemmings BA. Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta. *J Biol Chem*. 1997;272(48):30491-7.
408. Santi SA, Lee H. The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;298(3):C580-91.
409. Gonzalez E, McGraw TE. Insulin-modulated Akt subcellular localization determines Akt isoform-specific signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(17):7004-9.
410. Badve S, Collins NR, Bhat-Nakshatri P, Turbin D, Leung S, Thorat M, et al. Subcellular localization of activated AKT in estrogen receptor- and progesterone receptor-expressing breast cancers: potential clinical implications. *The American journal of pathology*. 2010;176(5):2139-49.
411. Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL, et al. AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *The American journal of pathology*. 2001;159(2):431-7.
412. Jin Y, Li Y, Pan L. The target therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2014;7:1647-52.
413. Samartzis EP, Noske A, Dedes KJ, Fink D, Imesch P. ARID1A mutations and PI3K/AKT pathway alterations in endometriosis and endometriosis-associated ovarian carcinomas. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(9):18824-49.
414. Uegaki K, Kanamori Y, Kigawa J, Kawaguchi W, Kaneko R, Naniwa J, et al. PTEN-positive and phosphorylated-Akt-negative expression is a predictor of survival for patients with advanced endometrial carcinoma. *Oncology reports*. 2005;14(2):389-92.
415. Akiyama-Abe A, Minaguchi T, Nakamura Y, Michikami H, Shikama A, Nakao S, et al. Loss of PTEN expression is an independent predictor of favourable survival in endometrial carcinomas. *British journal of cancer*. 2013;109(6):1703-10.
416. Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *JClinOncol*. 2005;23(7):1473-82.
417. de Graeff P, Crijns AP, Ten Hoor KA, Klip HG, Hollema H, Oien K, et al. The ErbB signalling pathway: protein expression and prognostic value in epithelial ovarian cancer. *British journal of cancer*. 2008;99(2):341-9.
418. Wang Y, Kristensen GB, Helland A, Nesland JM, Borresen-Dale AL, Holm R. Protein expression and prognostic value of genes in the erb-b signaling pathway in advanced ovarian carcinomas. *American journal of clinical pathology*. 2005;124(3):392-401.

419. Givant-Horwitz V, Davidson B, Lazarovici P, Schaefer E, Nesland JM, Trope CG, et al. Mitogen-activated protein kinases (MAPK) as predictors of clinical outcome in serous ovarian carcinoma in effusions. *Gynecol Oncol.* 2003;91(1):160-72.
420. Kourea HP, Nikolaou M, Tzelepi V, Adonakis G, Kardamakis D, Tsapanos V, et al. Expression of phosphorylated Akt, mTOR and MAPK in type I endometrial carcinoma: clinical significance. *Anticancer research.* 2015;35(4):2321-31.
421. Rong L, Livingstone M, Sukarieh R, Petroulakis E, Gingras AC, Crosby K, et al. Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs. *RNA (New York, NY).* 2008;14(7):1318-27.
422. Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature.* 2005;433(7025):477-80.
423. Tsai S, Sitzmann JM, Dastidar SG, Rodriguez AA, Vu SL, McDonald CE, et al. Muscle-specific 4E-BP1 signaling activation improves metabolic parameters during aging and obesity. *The Journal of clinical investigation.* 2015;125(8):2952-64.
424. Castellvi J, Garcia A, Rojo F, Ruiz-Marcellan C, Gil A, Baselga J, et al. Phosphorylated 4E binding protein 1: a hallmark of cell signaling that correlates with survival in ovarian cancer. *Cancer.* 2006;107(8):1801-11.
425. Castellvi J, Garcia A, Ruiz-Marcellan C, Hernandez-Losa J, Peg V, Salcedo M, et al. Cell signaling in endometrial carcinoma: phosphorylated 4E-binding protein-1 expression in endometrial cancer correlates with aggressive tumors and prognosis. *Human pathology.* 2009;40(10):1418-26.
426. Dostie J, Ferraiuolo M, Pause A, Adam SA, Sonenberg N. A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *The EMBO journal.* 2000;19(12):3142-56.
427. No JH, Jeon YT, Park IA, Kim YB, Kim JW, Park NH, et al. Activation of mTOR signaling pathway associated with adverse prognostic factors of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2011;121(1):8-12.
428. Darb-Esfahani S, Faggad A, Noske A, Weichert W, Buckendahl AC, Muller B, et al. Phospho-mTOR and phospho-4EBP1 in endometrial adenocarcinoma: association with stage and grade in vivo and link with response to rapamycin treatment in vitro. *Journal of cancer research and clinical oncology.* 2009;135(7):933-41.
429. Rojo F, Najera L, Lirola J, Jimenez J, Guzman M, Sabadell MD, et al. 4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2007;13(1):81-9.
430. Benavente S, Verges R, Hermsilla E, Fumanal V, Casanova N, Garcia A, et al. Overexpression of phosphorylated 4E-BP1 predicts for tumor recurrence and reduced survival in cervical carcinoma treated with postoperative radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2009;75(5):1316-22.

431. Lee HW, Lee EH, Lee JH, Kim JE, Kim SH, Kim TG, et al. Prognostic significance of phosphorylated 4E-binding protein 1 in non-small cell lung cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(4):3955-62.
432. Jacobson BA, De A, Kratzke MG, Patel MR, Jay-Dixon J, Whitson BA, et al. Activated 4E-BP1 represses tumorigenesis and IGF-I-mediated activation of the eIF4F complex in mesothelioma. *British journal of cancer*. 2009;101(3):424-31.
433. Korkolopoulou P, Levidou G, El-Habr EA, Piperi C, Adamopoulos C, Samaras V, et al. Phosphorylated 4E-binding protein 1 (p-4E-BP1): a novel prognostic marker in human astrocytomas. *Histopathology*. 2012;61(2):293-305.
434. O'Reilly KE, Warycha M, Davies MA, Rodrik V, Zhou XK, Yee H, et al. Phosphorylated 4E-BP1 is associated with poor survival in melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(8):2872-8.
435. Bahrami BF, Ataie-Kachoei P, Pourgholami MH, Morris DL. p70 Ribosomal protein S6 kinase (Rps6kb1): an update. *Journal of clinical pathology*. 2014;67(12):1019-25.
436. Holz MK. The role of S6K1 in ER-positive breast cancer. *Cell Cycle*. 2012;11(17):3159-65.
437. Wang W, Wen Q, Xu L, Xie G, Li J, Luo J, et al. Activation of Akt/mTOR pathway is associated with poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One*. 2014;9(8):e106098.
438. Zhang Y, Ni HJ, Cheng DY. Prognostic value of phosphorylated mTOR/RPS6KB1 in non- small cell lung cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2013;14(6):3725-8.
439. Lu Q, Wang J, Yu G, Guo T, Hu C, Ren P. Expression and clinical significance of mammalian target of rapamycin/P70 ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in human colorectal carcinoma tissue. *Oncology letters*. 2015;10(1):277-82.
440. Tasioudi KE, Sakellariou S, Levidou G, Theodorou D, Michalopoulos NV, Patsouris E, et al. Immunohistochemical and molecular analysis of PI3K/AKT/mTOR pathway in esophageal carcinoma. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2015;123(8):639-47.
441. Compostella A, Tosoni A, Blatt V, Franceschi E, Brandes AA. Prognostic factors for anaplastic astrocytomas. *Journal of neuro-oncology*. 2007;81(3):295-303.
442. Zhou HY, Wong AS. Activation of p70S6K induces expression of matrix metalloproteinase 9 associated with hepatocyte growth factor-mediated invasion in human ovarian cancer cells. *Endocrinology*. 2006;147(5):2557-66.
443. Pon YL, Zhou HY, Cheung AN, Ngan HY, Wong AS. p70 S6 kinase promotes epithelial to mesenchymal transition through snail induction in ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 2008;68(16):6524-32.

444. Ip CK, Wong AS. Exploiting p70 S6 kinase as a target for ovarian cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2012;16(6):619-30.
445. Meyuhas O. Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2008;268:1-37.
446. Yang-Kolodji G, Mumenthaler SM, Mehta A, Ji L, Tripathy D. Phosphorylated ribosomal S6 (p-rpS6) as a post-treatment indicator of HER2 signalling targeted drug resistance. *Biomarkers*. 2015;20(5):313-22.
447. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F. Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer. *Oncogene*. 2009;28 Suppl 1:S32-7.
448. McCampbell AS, Broaddus RR, Loose DS, Davies PJ. Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor and activation of the AKT pathway in hyperplastic endometrium. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(21):6373-8.
449. Guzeloglu Kayisli O, Kayisli UA, Luleci G, Arici A. In vivo and in vitro regulation of Akt activation in human endometrial cells is estrogen dependent. *Biology of reproduction*. 2004;71(3):714-21.
450. Vilgelm A, Lian Z, Wang H, Beauparlant SL, Klein-Szanto A, Ellenson LH, et al. Akt-mediated phosphorylation and activation of estrogen receptor alpha is required for endometrial neoplastic transformation in Pten^{+/-} mice. *Cancer Res*. 2006;66(7):3375-80.
451. Boonyaratankornkit V. Scaffolding proteins mediating membrane-initiated extra-nuclear actions of estrogen receptor. *Steroids*. 2011;76(9):877-84.
452. Whittaker S, Martin M, Marais R. All roads lead to the ribosome. *Cancer Cell*. 2010;18(1):5-6.
453. Armengol G, Rojo F, Castellvi J, Iglesias C, Cuatrecasas M, Pons B, et al. 4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications. *Cancer research*. 2007;67(16):7551-5.
454. She QB, Halilovic E, Ye Q, Zhen W, Shirasawa S, Sasazuki T, et al. 4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the AKT and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors. *Cancer Cell*. 2010;18(1):39-51.
455. She QB. 4E-BP1 as an oncotarget. *Aging*. 2015;7(8):517-8.