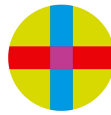


**Universidad San Pablo-CEU
CEU Escuela Internacional de Doctorado
(CEINDO)**

PROGRAMA DE DOCTORADO en MEDICINA TRASLACIONAL



CEU

*Escuela Internacional
de Doctorado*

**Caracterización del contenido
proteico exosomal en pacientes
con cáncer de ovario para su
utilización como biomarcadores
predictivos y pronósticos**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Miguel Quiralte Pulido

Dirigida por: Dr. Jesús García-Donas Jiménez,

Dr. Sergio Ruiz Llorente

MADRID
2024

TESIS DOCTORAL
MIGUEL QUIRALTE PULIDO
AÑO 2024

D. Jesús García-Donas Jiménez y D. Sergio Ruiz Llorente, profesor del departamento de Ciencias Médicas Clínicas perteneciente a la Facultad de Medicina de la Universidad San Pablo CEU y profesor del departamento de Biomedicina y Biotecnología perteneciente a la Universidad de Alcalá, respectivamente,

HACEN CONSTAR:

Que D. Miguel Quiralte Pulido ha realizado en el Laboratorio de Innovación en Oncología del CIOCC (Hospital HM Sanchinarro) y en el Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA) bajo su dirección el trabajo titulado “Caracterización del contenido proteico exosomal en pacientes con cáncer de ovario para su utilización como biomarcadores predictivos y pronósticos” con objeto de obtener el Grado de Doctor, y que dicho trabajo reúne todos los requisitos necesarios y constituye una aportación original al tema.

MADRID, 15 de abril de 2024



Dr. Jesús García-Donas Jiménez



Dr. Sergio Ruiz Llorente

“Para mí, no hay emoción comparable a la que produce la actividad creadora, tanto en ciencia como en arte, literatura u otras ocupaciones del intelecto humano. Mi mensaje, dirigido sobre todo a la juventud, es que si sienten inclinación por la ciencia, la sigan, pues no dejará de proporcionarles satisfacciones inigualables. Ciertamente es que abundan los momentos de desaliento y frustración, pero estos se olvidan pronto, mientras que las satisfacciones no se olvidan jamás”.

Severo Ochoa

A mis padres, José Miguel y Tere, sois todo para mí,
A mi gran hermano Víctor,
A mi gran apoyo, Marta,
A toda mi familia y amigos,
A mis abuelos Aida y Lorenzo,
A mi abuela Tere y a mi tía Mari que desde el cielo siempre me han guiado en
este camino.

Os quiero.

AGRADECIMIENTOS

Por fin puedo decir que esta etapa llega a su fin. Parece increíble, especialmente si retrocedo a la época de la pandemia, donde todo eran incertidumbres, y si la ciencia vive de ello, esa época no fue diferente. Cuando parecía que mi camino se iba a separar de la investigación para siempre, hubo algo en mí, que hizo que no me rindiera. Quizás fue por una de las mejores y peores cualidades que me definen, la cabezonería, esa perseverancia que me caracteriza, o tal vez fue un impulso inexplicable lo que hizo que mi camino se uniera de manera definitiva con la investigación contra el cáncer. Aún recuerdo esas decisiones y momentos que me impulsaron a seguir adelante y me decantara por hacer la tesis doctoral. Sin todo ello, nunca podría decir que he conseguido llegar hasta aquí.

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis directores de tesis.

A Jesús, por acogerme en su laboratorio, darme esta oportunidad y depositar su confianza en mí para realizar este proyecto. Su enfoque riguroso me ha enseñado la importancia de cuestionar cada resultado y profundizar aún más en ello.

A Sergio, a quien considero en gran medida un mentor en mi trayectoria científica y como un padre en la ciencia para mí. Sin sus enseñanzas, sus ánimos constantes y su apoyo cada vez que me he caído y me he levantado, todo hubiera sido mucho más difícil si cabe.

Gracias a todo el grupo de los básicos y los clínicos. A los que están, Alejandra, Arantxa, Paloma, Juanfran, Elena y Tati; y a los que han pasado, Mónica, María y Sandra. Gracias a todos por haberme apoyado y, sobre todo, gracias por haberme soportado y haber escuchado mis desahogos. La vida diaria en el laboratorio es mucho mejor a vuestro lado.

Gracias a todos mis compañeros del CEU, siempre habéis estado dispuestos a ayudarme en esos momentos de apuro.

Gracias a todos mis amigos por haber estado siempre ahí y haberme ayudado a pasar todos los malos tragos que he vivido de la manera más liviana posible. Se dice que los amigos de verdad se cuentan con los dedos de una mano, y creo que soy la excepción que confirma esa regla.

Gracias a toda mi familia, tíos, tías, primos, primas, abuelo y abuela. Sé que siempre os voy a tener ahí, para lo bueno y lo malo. Os quiero.

Gracias a mi hermano Víctor. Gracias por estar ahí, en lo malo y en lo peor, sé que igual no nos vemos tanto como desearíamos, pero ambos sabemos que siempre podremos contar el uno con el otro. Si tienes decisión, disciplina y confianza en ti mismo, podrás alcanzar todo lo que te propongas. Te quiero.

Gracias a mi papá. Has sido siempre un padre ejemplar conmigo y siempre te has portado mejor de lo que a veces incluso me hubiera merecido. Aunque no hemos estado tan cerca como hubiéramos querido, siempre te he sentido muy cerquita de mí. Te quiero.

Gracias a mi mamá también, por haberme apoyado siempre, aconsejarme mejor que nadie, y haber dado cada día un pedacito de ti para que pudiera seguir adelante. Gracias por estar ahí siempre, incluso cuando no eras capaz ni de poder estar para ti. Solo conozco a una superheroína en este mundo y eres sin duda tú. Te quiero.

Quiero terminar dándole las gracias a mi gran apoyo, Marta, mi otra familia, el rincón donde siempre puedo refugiarme. Gracias por sostenerme cuando ya no tenía más fuerzas para seguir adelante, por ser la que me ha guiado incluso en los momentos más oscuros. Esto no habría sido posible sin ti. Te quiero.

No tengo palabras suficientes que quepan en esta tesis para agradeceros todo lo que habéis hecho por mí. Simplemente volver a decir...

¡Muchas gracias!

RESUMEN

El cáncer de ovario (CO) es la quinta causa de mortalidad entre las mujeres y la principal causa de muerte atribuida a los cánceres ginecológicos en los países desarrollados. Esta malignidad se caracteriza por diseminarse a través de la cavidad abdominal en lugar de hacerlo a través de los sistemas linfático o vascular. Las pacientes con CO a menudo se diagnostican en estadios avanzados, lo que resulta en altas tasas de mortalidad. Además, las herramientas de detección actuales tienen una sensibilidad y especificidad limitadas, especialmente en etapas tempranas. Por lo tanto, la identificación de biomarcadores específicos es crucial para un diagnóstico temprano y un tratamiento eficaz. Las vesículas extracelulares tumorales de pequeño tamaño, y entre ellas los exosomas, son capaces de modificar el microambiente tumoral y promover la progresión tumoral. Estas vesículas son secretadas a partir de cualquier tipo celular al espacio extracelular y acumulan una amplia variedad de biomoléculas que pueden modificar la fisiología de las células huésped que las internalizan. Por lo tanto, la secreción de tales vesículas en el fluido peritoneal podría ser un factor determinante en la diseminación y comportamiento de esta enfermedad. La presente tesis doctoral se desarrolló a partir de un estudio observacional prospectivo que evalúa el impacto de los exosomas derivados del fluido peritoneal (Exo-DFP) en aspectos clínicos del CO. Para ello, se recolectaron muestras de fluidos peritoneales de un total de 94 pacientes, que incluyeron 65 pacientes con CO, divididas en dos cohortes, que se sometieron a una cirugía diagnóstica o citorreductora, y 29 pacientes no oncológicas, como controles, que se sometieron a cirugía abdominal por condiciones ginecológicas benignas. La extracción sistemática de los Exo-DFP a partir de muestras quirúrgicas permitió observar diferencias cuantitativas y cualitativas significativas asociadas con el diagnóstico del CO, histología, etapa de la enfermedad y quimiosensibilidad al platino. El análisis del perfil proteómico de estos Exo-DFP condujo a la identificación de vías moleculares y proteínas de interés y a la validación biológica de S100A4 y STX5. Además, el análisis no supervisado de los perfiles proteómicos de los Exo-DFP en casos con CO seroso de alto grado reveló dos clústeres con diferentes resultados en términos de supervivencia global. En resumen, la caracterización exhaustiva del contenido de los Exo-DFP proporciona información pronóstica valiosa con posibles implicaciones para el manejo clínico del CO.

Palabras clave: Cáncer de ovario, exosomas, fluidos peritoneales, exosomas derivados de fluidos peritoneales (Exo-DFP), proteómica, espectrometría de masas, biomarcadores.
--

ABSTRACT

Ovarian cancer (OC) is the fifth leading cause of mortality among women and the leading cause of death attributed to gynecologic cancers in developed countries. This malignancy is characterized by spread through the abdominal cavity rather than through the lymphatic or vascular systems. Patients with OC are often diagnosed at advanced stages, resulting in high mortality rates. In addition, current screening tools have limited sensitivity and specificity, especially in early stages. Therefore, the identification of specific biomarkers is crucial for early diagnosis and effective treatment. Tumoral small extracellular vesicles, including exosomes, are capable of modifying the tumor microenvironment and promoting tumor progression. These vesicles are secreted from any cell type into the extracellular space and accumulate a wide variety of biomolecules that can modify the physiology of the host cells that internalize them. Therefore, the secretion of such vesicles into the peritoneal fluid could be a determining factor in the dissemination and behavior of this disease. The present doctoral thesis was developed from a prospective observational study evaluating the impact of peritoneal fluid-derived exosomes (PFD-Exo) on clinical aspects of OC. For this purpose, peritoneal fluid samples were collected from a total of 94 patients, including 65 CO patients, divided into two cohorts, who underwent diagnostic or cytoreductive surgery, and 29 non-oncologic patients, as controls, who underwent abdominal surgery for benign gynecologic conditions. Systematic extraction of PFD-Exo from surgical specimens allowed us to observe significant quantitative and qualitative differences associated with OC diagnosis, histology, disease stage, and platinum chemosensitivity. Proteomic profiling analysis of these PFD-Exo led to the identification of molecular pathways and proteins of interest and biological validation of S100A4 and STX5. Furthermore, unsupervised analysis of the proteomic profiles of PFD-Exo in high-grade serous OC cases revealed two clusters with different outcomes in terms of overall survival. In summary, comprehensive characterization of PFD-Exo content provides valuable prognostic information with potential implications for the clinical management of OC.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Número estimado de nuevos casos de cáncer diagnosticados en 2020, a nivel mundial, en ambos sexos y para todas las edades.
- Figura 2.** Incidencia mundial del CO en diciembre 2020.
- Figura 3.** Clasificación histológica y molecular del CO.
- Figura 4.** Diferentes subpoblaciones de vesículas extracelulares.
- Figura 5.** Biogénesis de los exosomas.
- Figura 6.** Representación esquemática de la biogénesis y liberación de los exosomas desde la célula secretora y su posterior unión a la célula receptora.
- Figura 7.** Composición molecular de los exosomas.
- Figura 8.** Protocolo de aislamiento de los exosomas de fluidos peritoneales.
- Figura 9.** Descripción gráfica de la Información clínico-patológica de la cohorte de casos con CO.
- Figura 10.** Descripción gráfica de la información del diagnóstico patológico que motivó la cirugía de las pacientes control.
- Figura 11.** Caracterización de las partículas y los Exo-DFP en controles y casos con CO.
- Figura 12.** Caracterización de los Exo-DFP en controles y casos con CO en función de la información clínico-patológica y molecular recogida.
- Figura 13.** Análisis cuantitativo del contenido proteico exosomal por partícula en los Exo-DFP.
- Figura 14.** Caracterización del contenido proteico de los Exo-DFP mediante inmunotransferencia en muestras de casos con CO y controles.
- Figura 15.** Diagrama de Venn que muestra la superposición entre las proteínas identificadas en los Exo-DFP de nuestro estudio y las 100 proteínas principales de las bases de datos Vesiclepedia y ExoCarta.
- Figura 16.** Comparación del contenido proteico de los Exo-DFP de aquellos casos con CSAG con estudios previos de CO.
- Figura 17.** Mapa de agrupamiento de correlaciones que representa el análisis no supervisado del perfil de proteínas contenidas en los Exo-DFP en todos los casos y controles caracterizados por espectrometría de masas.
- Figura 18.** PCA basado en los datos proteómicos obtenidos al comparar muestras de pacientes control con todos los casos con CO estudiados.
- Figura 19.** Mapa de agrupamiento de correlaciones que representa el análisis no supervisado del perfil de proteínas contenidas en los Exo-DFP en los casos con CSAG y controles caracterizados por espectrometría de masas.
- Figura 20.** PCA basado en los datos proteómicos obtenidos al comparar muestras de pacientes control con todos los casos con CSAG estudiados.

Figura 21. Gráfico tipo volcán en el que se representan las PDCs entre casos con CSAG vs. controles (PDCs =192).

Figura 22. Mapa de agrupamiento de correlaciones que representa el análisis no supervisado del perfil de proteínas contenidas en los Exo-DFP, caracterizadas por espectrometría de masas, para las muestras de los casos con CSAG según el momento quirúrgico.

Figura 23. Mapa de agrupamiento de correlaciones que representa el análisis no supervisado del perfil de proteínas contenidas en los Exo-DFP, caracterizadas por espectrometría de masas, para las muestras de los casos con CSAG teniendo en cuenta el estado mutacional de los genes *BRCA1/2* y su estado RH.

Figura 24. Mapa de agrupamiento de correlaciones que representa el análisis no supervisado del perfil de proteínas contenidas en los Exo-DFP, caracterizadas por espectrometría de masas, para las muestras de los casos con CSAG según el grado de respuesta al tratamiento con platino.

Figura 25. Gráfico tipo volcán en el que se representan las PDCs para las muestras de los casos con CSAG obtenidas según el momento quirúrgico.

Figura 26. Gráfico tipo volcán en el que se representan las PDCs para las muestras de los casos con CSAG teniendo en cuenta el estado mutacional de los genes *BRCA1/2*.

Figura 27. Gráfico tipo volcán en el que se representan las PDCs para las muestras de los casos con CSAG analizando el grado de respuesta al tratamiento con platino.

Figura 28. Gráficos de barras que representan procesos biológicos y categorías funcionales de interés enriquecidas según la herramienta *Enrichr* en ciertas comparaciones de interés.

Figura 29. Tabla que muestra las 25 PDCs contenidas en diversas comparaciones de interés.

Figura 30. Gráficos relativos a los datos proteómicos de factores proteicos de potencial interés pronóstico y predictivo: S100A4 y STX5.

Figura 31. Cuantificación relativa mediante inmunotransferencia de las proteínas de interés en muestras de la cohorte de validación (n=5 controles y n=22 casos de CSAG).

Figura 32. Cuantificación relativa mediante inmunotransferencia de las proteínas de interés en muestras de la cohorte de validación (n=5 controles y n=22 casos con CSAG) en función de la respuesta a platino o del momento quirúrgico.

Figura 33. Correlación de los principales clústeres definidos en el análisis proteómico en aquellos casos con CSAG (S-1 vs. S-2) con variables cuantitativas de los Exo-DFP.

Figura 34. Asociación de los clústeres de los casos con CSAG descritos en el análisis proteómico con la SG (meses).

Figura 35. Gráficas que muestran resultados relacionados con los datos proteómicos derivados de la comparación del clúster S-1 vs. S-2.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadificación del cáncer de ovario (CO) (FIGO 2014).

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios.

Tabla 3. Información clínico-patológica y molecular de los casos con CO y controles.

Tabla 4. Listado de las 50 proteínas contenidas en los Exo-DFP con mayor poder discriminatorio entre las muestras pertenecientes al clúster S-1 (n=10) y al clúster S-2 (n=13).

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.** Dictamen favorable del Comité de Ética e Investigación con Medicamentos.
- Anexo 2.** Valores obtenidos de la cuantificación del número total de partículas medidas por NTA y de proteínas exosomales totales por partículas $\times 10^9$ medidas por BCA en todas las muestras de los casos con CO (n=74) y de los controles (n=29).
- Anexo 3.** Imágenes que muestran el análisis por inmunotransferencias de la expresión de los marcadores exosomales (ALIX, TSG101 y CD9) y marcadores de contaminación (APOB y Albúmina) en muestras de Exo-DFP de casos con CO (n=13) y controles (n=2).
- Anexo 4.** Listado de las 1825 proteínas exosomales encontradas por MS en las 29 muestras de casos con CO y en las 10 muestras de controles sanos.
- Anexo 5.** Tabla que muestra datos previos del estudio de *Toss et al.* (178) relacionados con la expresión de marcadores pronósticos determinados mediante perfilación proteómica en diferentes especímenes de caso con CO y su correlación con nuestros datos proteómicos de los Exo-DFP.
- Anexo 6.** Listado de las 10 rutas biológicas más enriquecidas y significativas en las diferentes categorías relevantes (*Hallmarks, Reactome, GO Biological Process y GO Cellular Component*) para cada una de las comparaciones de interés.
- Anexo 7.** Imágenes representativas del análisis por inmunotransferencia de la expresión de las proteínas S100A4, STX5 y CD9 en muestras de la cohorte de validación. El conjunto de muestras analizadas mediante inmunotransferencia incluía 22 casos con CSAG y 5 controles.
- Anexo 8.** Asociación de los dos clústeres de los casos con CSAG definidos en el análisis proteómico con la SLP (meses).
- Anexo 9.** Otras actividades y producción científica realizadas durante la Tesis Doctoral.

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AFM	Proteína Afamina, del inglés <i>Alpha-fetoprotein-like</i> .
ALIX	Proteína ALIX, del inglés <i>ALG-2 interacting protein X</i> .
ANXA	Proteína Anexina A.
APOA4	Proteína APOA4, del inglés <i>Apolipoprotein A4</i> .
ARF6	Factor 6 de ribosilación del ADP.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ARNncc	Ácido ribonucleico no codificante corto.
ARNncl	Ácido ribonucleico no codificante largo.
ATP	Adenosín Trifosfato.
BCA	Ácido bicinconínico, del inglés, <i>BiCinchoninic Acid</i> .
BPC	Buenas Prácticas Clínicas.
CCC	Carcinoma de células claras.
CE	Carcinoma endometrioide.
CEIm	Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos.
CM	Carcinoma mucinoso.
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad.
CO	Cáncer de ovario.
COL3A1	Proteína COL3A1, del inglés <i>Collagen type III alpha 1 chain</i> .
CSAG	Carcinoma de ovario seroso de alto grado.
CSBG	Carcinoma seroso de bajo grado.
E.	Estadio.
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico, del inglés <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> .
ESCRT	Complejo ESCRT, del inglés <i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i> .
ESMO	Sociedad Europea de Oncología Médica, del inglés <i>European Society for Medical Oncology</i> .
EV	Vesícula extracelular, del inglés <i>Extracellular Vesicle</i> .
Exo-DCT	Exosoma derivados de las células tumorales.
Exo-DFP	Exosoma derivado del fluido peritoneal.
FACs	Fibroblastos asociados al cáncer.
FC	Del inglés <i>Fold Change</i> .

FDR	Tasa de falsos descubrimientos, del inglés <i>False Discovery Rate</i> .
FGA	Proteína codificada por el gen <i>FGA</i> , del inglés <i>Fibrinogen alpha chain</i> .
FGB	Proteína codificada por el gen <i>FGB</i> , del inglés <i>Fibrinogen beta chain</i> .
FGG	Proteína codificada por el gen <i>FGG</i> , del inglés <i>Fibrinogen gamma chain</i> .
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia.
FO	Fosforilación oxidativa.
FT	Factor de transcripción.
FTL	Proteína codificada por el gen <i>FTL</i> , del inglés <i>Ferritin light chain</i> .
GIS	Inestabilidad genómica, del inglés <i>Genomic Inestability Status</i> .
GO	Del inglés, <i>Gene Ontology</i> .
GTPasas	Guanosina trifosfatasa.
HLA-DRB5	Proteína codificada por el gen <i>HLA-DRB5</i> , del inglés <i>Major histocompatibility complex, class II, DR beta 5</i> .
Hrs	Sustrato Hrs, del inglés <i>hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate</i> .
HSP	Proteínas de choque térmico, del inglés <i>Heat Shock Protein</i> .
HSPD1	Proteína de choque térmico de la familia D1.
ILP	Intervalo libre de platino.
ILV	Vesículas intraluminales, del inglés <i>Intraluminal Vesicles</i> .
ISEV	Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares, del inglés <i>International Society for Extracellular Vesicles</i> .
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem, del inglés <i>Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry</i> .
LEVs	EVs grandes, del inglés <i>Large Extracellular Vesicles</i> .
LGALS3	Proteína Galectina-3.
m/z	Masa-carga.
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión.
miARN	Micro Ácido ribonucleico.
µl	Microlitros.
ml	Mililitros.
MMRd	Deficiencia en la reparación de emparejamientos erróneos, del inglés <i>MisMatch Repair deficiency</i> .
MP	Membrana plasmática.
MS	Espectrometría de masas (MS, del inglés <i>Mass Spectrometry</i>).

MSLN	Proteína Mesotelina.
MT	Microambiente tumoral.
MUC16	Proteína Mucina 16.
MVBs	Cuerpos multivesiculares, del inglés <i>Multivesicular Bodies</i> .
MVEs	Endosomas multivesiculares (MVEs, del inglés <i>Multivesicular Endosomes</i>).
NK	Del inglés, <i>Natural Killer</i> .
NTA	Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA, del inglés <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>).
p/ml	Partículas/ml.
PARP	Poli(ADP-ribosa)-polimerasa.
PAX8	Proteína codificada por el gen <i>PAX8</i> , del inglés <i>Paired box 8</i> .
PBS	Tampón fosfato salino, del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i> .
PDCL	Proteína PDCL, del inglés <i>Phosducin-like protein</i> .
PDCs	Proteínas diferencialmente contenidas.
PEBP1	Proteína PEBP1, <i>Phosphatidylethanolamine binding protein 1</i> .
PHB1	Proteína Prohibitina 1.
p/p	Proteínas por partícula.
PSMA6	Proteína PSMA6, del inglés <i>Proteasome 20S subunit alpha 6</i> .
QT	Quimioterapia.
Rab	Proteína Rab, del inglés <i>Ras-associated binding</i> .
RAD23A	Proteína RAD23A, del inglés <i>RAD23 homolog A, nucleotide excision repair protein</i> .
RBP1	Proteína RBP1, del inglés <i>Retinol binding protein 1</i> .
RHd	Recombinación homóloga deficiente.
RHe	Recombinación homóloga eficiente.
rpm	Revoluciones por minuto.
RTF	Receptor de la Transferrina.
S100A4	Proteína S100A4, del inglés <i>S100 calcium binding protein A4</i> .
S100A6	Proteína S100A6, del inglés <i>S100 calcium binding protein A6</i> .
S100A8	Proteína S100A8, del inglés <i>S100 calcium binding protein A8</i> .
SAG	Seroso de alto grado.
SETSIP	Proteína SETSIP, del inglés <i>SET like protein</i> .
SEVs	EVs pequeñas, del inglés <i>Small Extracellular Vesicles</i> .
SLP	Supervivencia libre de progresión.

SNARE	Receptores SNARE, del inglés <i>Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor –NSF– Attachment protein Receptor</i> .
STX5	Proteína Sintaxina 5, del inglés <i>Syntaxin 5</i> .
Subc.	Subclúster.
TF	Proteína Transferrina.
THS	Terapia hormonal sustitutiva.
TMED2	Proteína TMED2, del inglés <i>Transmembrane p24 trafficking protein 2</i> .
TMED7	Proteína TMED7, del inglés <i>Transmembrane p24 trafficking protein 7</i> .
TSG101	Proteína codificada por el gen <i>TSG101</i> , del inglés <i>Tumor susceptibility 101</i> .
UPK1B	Proteína Uroplaquina.
VPS4	Proteína VPS4, del inglés <i>Vacuolar protein sorting 4</i> .
Vs.	<i>Versus</i> .
VTA1	Proteína codificada por el gen <i>VTA1</i> , del inglés <i>Vesicle trafficking 1</i> .
WB	<i>Western Blot</i> .
wt	Del inglés <i>Wild Type</i> .
µg	Microgramos.
µl	Microlitros.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	IX
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT	XVII
ÍNDICE DE FIGURAS	XXI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XXV
ÍNDICE DE ANEXOS	XXIX
LISTADO DE ABREVIATURAS	XXXIII
ÍNDICE.....	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Cáncer.....	5
1.2. Cáncer de ovario.....	6
1.2.1. Generalidades y epidemiología del cáncer de ovario	6
1.2.2. Factores de riesgo y protectores del CO	7
1.2.3. Técnicas diagnósticas en CO	9
1.2.4. Clasificación histopatológica y molecular del CO	10
1.2.5. Estadificación y diferenciación	13
1.2.6. Estudio molecular en el CO	15
1.2.7. Tratamiento del carcinoma epitelial de ovario.....	15
1.3. Vesículas Extracelulares.....	18
1.3.1. Descripción, características generales y clasificación	18
1.4. Exosomas.....	19
1.4.1. Biogénesis, secreción al espacio extracelular y captación	20
1.4.2. Composición molecular.....	24
1.4.3. Funciones de los exosomas.....	26
1.4.4. Papel de los exosomas en el desarrollo del cáncer.....	27
1.4.5. Implicación de los exosomas en el CO	30
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1. Diseño y población del estudio	39
3.2. Recogida de datos clínico-patológicos y moleculares	39
3.3. Aislamiento de exosomas de fluidos peritoneales	41
3.4. Caracterización de los exosomas	43
3.4.1. NanoSight	43
3.4.2. Microscopía electrónica	43
3.4.3. Inmunotransferencia	44
3.5. Análisis proteómico	45
3.5.1. Análisis de cuantificación relativa mediante marcaje químico isobárico TMT18-plex de las muestras de aislados exosomales	46
3.5.2. Análisis LC-MS/MS y extracción de datos	47
3.6. Análisis bioinformático	48
3.7. Sistemas biológicos	49

3.8.	Análisis estadístico.....	49
4.	RESULTADOS.....	51
4.1.	Características clínicas y moleculares de la población a estudio	53
4.2.	Caracterización y análisis de los exosomas aislados de los fluidos peritoneales en casos y controles.....	56
4.3.	Análisis de los Exo-DFP en función de las distintas variables clínico-patológicas y moleculares	58
4.4.	Análisis de la carga proteómica de los Exo-DFP en los casos con CO y controles	61
4.5.	Análisis proteómico del contenido de los Exo-DFP en casos y controles	66
4.6.	Análisis no supervisado de la carga proteómica de los Exo-DFP de casos y controles	71
4.7.	Análisis no supervisado de la carga proteómica de los Exo-DFP en los casos con CSAG frente a los controles	73
4.8.	Análisis comparativo de la carga proteica en las distintas variables clínicas .	76
4.9.	Análisis comparativo de las PDCs de los Exo-DFP en las distintas categorías clínicas	81
4.10.	Análisis de enriquecimiento funcional de las PDCs en los Exo-DFP en las distintas categorías de interés	85
4.11.	Validación	90
4.12.	Relevancia clínica de los Exo-DFP en el CO	94
5.	DISCUSIÓN	99
5.1.	Diferencias en cuanto a las variables clínico-patológicas y moleculares de los casos con CO dentro del estudio	103
5.2.	La cantidad de Exo-DFP presenta un comportamiento diferencial en casos y controles y aumenta a medida que avanza la enfermedad y que la paciente es sometida a más líneas de tratamiento	104
5.3.	El contenido proteico exosomal total está asociado con perfiles clínicos de los casos con CO	106
5.4.	Los Exo-DFP extraídos de los casos con CO contenían biomarcadores relacionados con el CO	109
5.5.	El perfil del contenido proteico de los Exo-DFP reveló factores asociados a variables clínicas específicas del CO	112
5.6.	Los estudios de validación respaldan un papel protumorigénico de S100A4 y STX5 derivados de Exo-DFP en los casos con CO.....	115
5.7.	La carga proteómica de los Exo-DFP se correlaciona con la SG y revela la presencia de vías biológicas que podrían influir en aspectos clínicos de las pacientes.....	116
5.8.	Aspectos destacables y principales limitaciones de nuestro estudio	118
6.	CONCLUSIONES	121
7.	BIBLIOGRAFÍA	125
	ANEXOS.....	143

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por un crecimiento celular incontrolado y anormal. Puede desarrollarse en casi cualquier zona del cuerpo y tiene el potencial de invadir los tejidos cercanos y propagarse a otras localizaciones del cuerpo a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático.

La aparición de esta enfermedad está causada por mutaciones genéticas que alteran la regulación normal de la división y la muerte celular. Estas mutaciones pueden desencadenarse por diversos factores, como la predisposición genética, la exposición a carcinógenos (como el humo del tabaco, la radiación y determinadas sustancias químicas), infecciones víricas y factores relacionados con el estilo de vida, como la dieta.

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es una de las enfermedades que más muertes causa al año, siendo el responsable de casi 10 millones de defunciones en el año 2020 (1). Los tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo en el año 2020 fueron los de mama, pulmón, colon y recto, próstata y estómago (1,2) (Figura 1).

En España, el cáncer también figura como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Se estimó que el número de casos de cáncer diagnosticados en el país en el año 2023 alcanzaría una cifra aproximada de 279.260 (3), siendo los tipos de cáncer más comúnmente diagnosticados en hombres en España en 2023, al igual que en 2022, el de próstata (29.002 casos), colon y recto (26.357 casos) y pulmón (22.266 casos); mientras que en mujeres fueron los de mama (35.001 casos), los de colon y de recto (16.364 casos) (3,4).

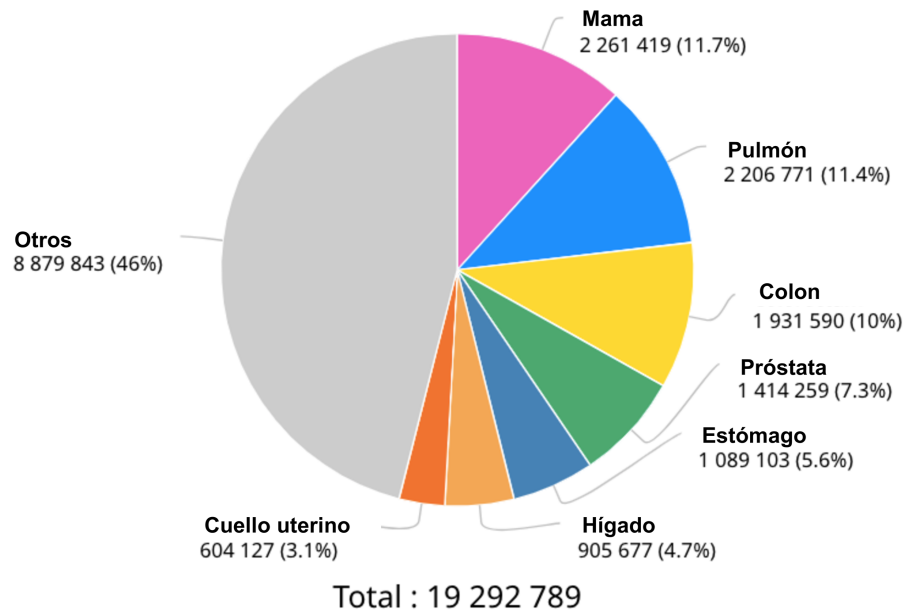


Figura 1. Número estimado de nuevos casos de cáncer diagnosticados en 2020, a nivel mundial, en ambos sexos y para todas las edades. Fuente: GLOBOCAN 2020 (<http://gco.iarc.fr/>).

1.2. Cáncer de ovario

1.2.1. Generalidades y epidemiología del cáncer de ovario

El cáncer de ovario (CO) es un tipo de cáncer que se origina en el epitelio ovárico, una fina capa de células que recubre el ovario, o en el epitelio de las trompas de Falopio. Según la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO, del inglés *European Society for Medical Oncology*), el CO es la segunda neoplasia ginecológica más letal en todo el mundo, tras el cáncer de cuello uterino, y ocupa el primer lugar en los países desarrollados, llegando a diagnosticarse más de 300.000 nuevos casos en 2020 (1) (Figura 2) y representando entre el 4 y el 5% de todos los tumores femeninos (5). Cada año se diagnostican en España cerca de 3.300 nuevos casos (6). El riesgo de que una mujer desarrolle CO a lo largo de su vida es de aproximadamente 1 entre 78, y la probabilidad de que una mujer fallezca a causa de CO a lo largo de su vida es aproximadamente de 1 entre 108 (7).

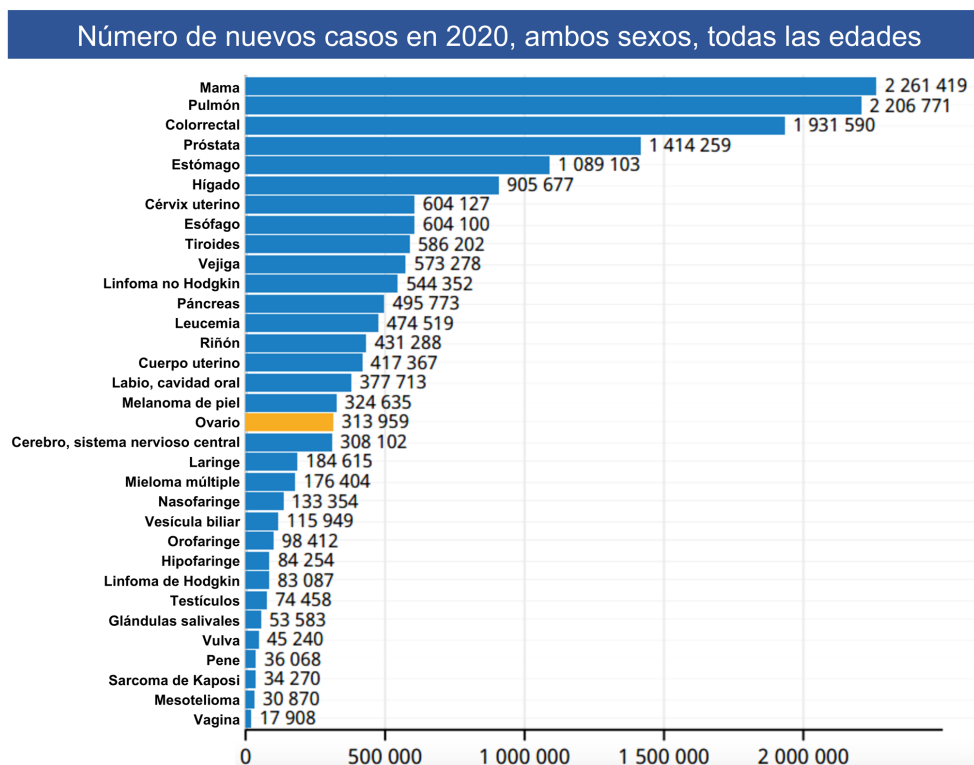


Figura 2. Incidencia mundial del CO en diciembre 2020. Fuente: GLOBOCAN 2020 (<http://gco.iarc.fr/>).

La tasa de supervivencia en los casos con CO ha experimentado un aumento del 22% a lo largo de las últimas tres décadas, gracias al progreso significativo en el conocimiento en campos como la biología molecular, la mejora de las técnicas quirúrgicas y la quimioterapia (QT). Además, el empleo de fármacos antiangiogénicos e inhibidores de la poli(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP) como terapia de mantenimiento después de una respuesta a la QT basada en platino es cada vez mayor y ha supuesto un cambio en la trayectoria de la enfermedad, al mismo tiempo que ha reducido la mortalidad (6).

1.2.2. Factores de riesgo y protectores del CO

La causa del CO sigue siendo desconocida. Al igual que en otros tumores malignos, el CO surge debido a una acumulación de cambios genéticos que resulta en un crecimiento y proliferación descontrolados de las células epiteliales.

Sin embargo, aún no se comprenden los mecanismos específicos que desencadenan dichas alteraciones.

Entre los factores que podrían aumentar el riesgo de la enfermedad se encuentran:

- a) Edad: El riesgo de desarrollar CO aumenta con la edad, especialmente después de la menopausia. El CO es poco común en mujeres menores de 40 años y la gran mayoría de los casos se presentan en mujeres mayores de 65 años, situándose la edad promedio de diagnóstico entre los 50-79 años (8).
- b) Factores genéticos:
 - Mutaciones en los genes *BRCA*: es uno de los factores de riesgo más importantes. El riesgo de presentar CO en aquellas personas que presentan mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* aumenta considerablemente, aunque es importante señalar que no todas las mujeres con mutaciones en *BRCA* desarrollarán CO. Entre el 65% y el 85% de los tumores de ovario hereditarios resultan de mutaciones en los genes *BRCA* en la línea germinal (9). Aunque el riesgo de desarrollar CO en las portadoras de mutaciones *BRCA1* y *BRCA2* es menor al 3% a los 40 años, este riesgo aumenta al 10% a los 50 años (10). Además de estas alteraciones, otros factores de riesgo ampliamente estudiados en los últimos años son las alteraciones en genes involucrados en el sistema de reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN) por la vía de la recombinación homóloga (RH) o el presentar un sistema de RH deficiente (RHd).
 - Síndrome de Lynch: Suele estar también asociado al desarrollo de otros tipos de tumores, como el colorrectal o el de endometrio. La aparición de CO en mujeres con este síndrome se encuentra entre el 10-15% y las histologías más frecuentemente asociadas son la endometrioides y de células claras (8).

- c) Terapia hormonal sustitutiva (THS): Diversos estudios han estudiado la asociación de la THS con el riesgo de padecer CO (11–14). Aunque dicha relación no está muy bien definida, hay un mayor incremento en el desarrollo del CO con el uso de estrógenos de forma individual (14), que en combinación con progesterona tras la menopausia (11).
- d) Endometriosis: existe una relación entre la endometriosis y el CO a través de diversos factores, como la producción elevada de estrógenos, mutaciones en el gen *ARID1A* y el desplazamiento de células endometriales a la pelvis a través del flujo menstrual (15,16). La endometriosis está más asociada a los subtipos histológicos endometrioide y células claras y en edades más tempranas y estadios (E.) tumorales más bajos (16,17).

Entre los factores que podrían disminuir el riesgo de la enfermedad se encuentran la multiparidad, la lactancia y la toma de anticonceptivos. Estos factores están relacionados con la teoría de la ovulación incesante, puesto que se cree que la rotura de la cápsula ovárica es un factor de riesgo (18). Por tanto, los momentos de reposo ovárico, en los que se interrumpe el proceso de microtraumatismo repetido en el ovario podría proporcionar protección contra el desarrollo del CO (19,20).

1.2.3. Técnicas diagnósticas en CO

La mayoría de las pacientes diagnosticadas con CO exhiben síntomas poco específicos tales como malestar, dolor en la zona lumbar, fatiga y molestias durante las relaciones sexuales (21). En etapas más avanzadas de la enfermedad, es posible que se manifiesten síntomas como distensión abdominal, debido a la acumulación de líquido en el abdomen (ascitis).

El diagnóstico del CO se basa en los resultados de los siguientes exámenes y pruebas (22):

- Examen clínico mediante la exploración del abdomen y de los ganglios linfáticos por parte del médico.

- Estudio de los niveles de CA125 mediante análisis de sangre. Este marcador se eleva en alrededor del 50% de las mujeres con un cáncer epitelial de ovario en E. inicial y aproximadamente en el 85% de las mujeres con cáncer en E. avanzado (22).
- Ecografía pélvica: se puede realizar mediante dos modalidades, la abdominal o la transvaginal, a través de la introducción de una sonda de ultrasonido por la vagina, lo que permite la visualización de los ovarios.
- Tomografía computarizada (TC): es una técnica de imagen tridimensional que evalúa con eficacia el alcance del cáncer y que permite planificar la cirugía cuando ésta resulte apropiada.
- Resonancia magnética nuclear: esta técnica utiliza potentes campos magnéticos y ondas de radio para producir imágenes detalladas del interior del cuerpo.
- Radiografía de tórax: es una técnica de diagnóstico que hace uso de rayos X y que determina si el CO se ha propagado, por ejemplo a los pulmones, al detectar acumulación de líquido alrededor de ellos (derrame pleural).

1.2.4. Clasificación histopatológica y molecular del CO

Aunque existen 3 tipos de CO, el tipo más común es el cáncer epitelial de ovario, que representa aproximadamente el 90% de todas las mujeres diagnosticadas (22). El inicio de este tipo de cáncer tiene lugar en el epitelio ovárico, una delgada capa de células que recubre el ovario, o bien en el epitelio de la trompa de Falopio. Además también se encuentran los tumores de células germinales y del estroma, muy infrecuentes (23).

La evaluación histológica del tejido resecado puede ser compleja y requiere la intervención de especialistas. Diversos estudios han dado lugar al desarrollo de una nueva forma de clasificación del CO basado en un modelo dualista. Este modelo divide el CO en dos categorías principales: Tipo I y Tipo II, que a su vez se subdividen en cinco subtipos histológicos primarios (23–25).

Los tumores de tipo I tienen su origen en superficie epitelial ovárica. Se caracterizan por ser tumores de bajo grado, de crecimiento lento y genéticamente estables, presentando algunas mutaciones en *BRAF*, *PTEN* o *KRAS*. Se pueden producir por causas tales como la interrupción de los ciclos de ovulación, la inflamación y la endometriosis. En este grupo se incluyen los carcinomas serosos de bajo grado, endometrioides, mucinosos y de células claras (Figura 3).

Los tumores de tipo II tienen su origen en las trompas de Falopio. Se caracterizan por su pobre diferenciación, son de afectación difusa y de rápido crecimiento, lo que conlleva su diagnóstico tardío y resulta en una supervivencia menor que los de tipo I. Son genéticamente inestables y con frecuencia contienen mutaciones en *TP53*, *BRCA1* y *BRCA2*. En este grupo se incluyen los tumores serosos de alto grado (Figura 3).

Carcinoma seroso de alto grado (CSAG): es el subtipo histológico más comúnmente diagnosticado, representando el 70-80% de los casos de CO, y el que presenta peor pronóstico. Casi la totalidad de este subtipo tienen mutación en el gen *TP53* (26) y un alto porcentaje en *BRCA1/2*, además de caracterizarse por la inestabilidad genómica y una RHd. El CSAG se correlaciona con un pronóstico más desfavorable que los otros subtipos debido a que más del 85% de las mujeres diagnosticadas con este subtipo suelen presentar E. avanzados de la enfermedad.

Carcinoma seroso de bajo grado (CSBG): es un subtipo poco común y representa <5% de todos los casos CO. Como el CSAG, se suele diagnosticar en una etapa tardía y por tanto su pronóstico a largo plazo es desfavorable. En cambio, se diferencian de estos anteriores en que son tumores de crecimiento lento, con una pobre respuesta a la QT basada en platino, y suelen presentar mutaciones en los genes *BRAF* y *KRAS* en lugar de en *p53* o *BRCA1/2* (27).

Carcinoma endometriode (CE): el CE representa alrededor del 10% de los CO. Está relacionado con procesos de endometriosis (hasta el 42% de pacientes tienen endometriosis ovárica o pélvica) y suele presentarse en mujeres en estado peri- o posmenopáusico. También se divide en tumores de bajo grado, que por lo general son menos agresivos y bastante quimiosensibles, lo que contribuye a un mejor pronóstico; y en tumores de alto grado, que a diferencia de los anteriores, se caracterizan por ser de rápido crecimiento, de diagnóstico en E. avanzados y de baja supervivencia, además de ser muy similares morfológicamente a los CSAG. Suelen presentar alteraciones en los genes *PTEN*, *ARID1A*, *PI3KCA* y *TP53* en formas de alto grado (28–30) además de presentar deficiencia en la reparación de emparejamientos erróneos (MMRd, del inglés *Mismatch Repair deficiency*) e inestabilidad de microsatélites (IMS) (22).

Carcinoma de células claras (CCC): los CCC representan el 10% de los CO. Se caracteriza por la presencia de células con citoplasma transparente. Al igual que con los CE, los CCC tienen un pronóstico favorable ya que se suelen diagnosticar en etapas tempranas de la enfermedad, aunque es el tumor con mayor resistencia a la QT. Las complicaciones principales derivadas de este subtipo tumoral son el desarrollo de coágulos de sangre e hipercalcemia paraneoplásica (31). Al igual que el CE, presenta alteraciones en *ARID1A*, dMMR e IMS (22), además de presentar una alta positividad para *HNF1-β* (32).

Carcinoma mucinoso (CM): los CM son frecuentemente tumores localizados y se caracterizan por asemejarse a la mucosa intestinal o al epitelio endocervical, siendo difícil distinguirlos de tumores metastásicos del tracto gastrointestinal. Son los tumores que alcanzan un mayor tamaño. Representan el 3-4% de los CO, siendo aproximadamente el 80% cistoadenomas mucinosos benignos (33). Suele presentar mutaciones en los genes *KRAS* y *HER2* (34).

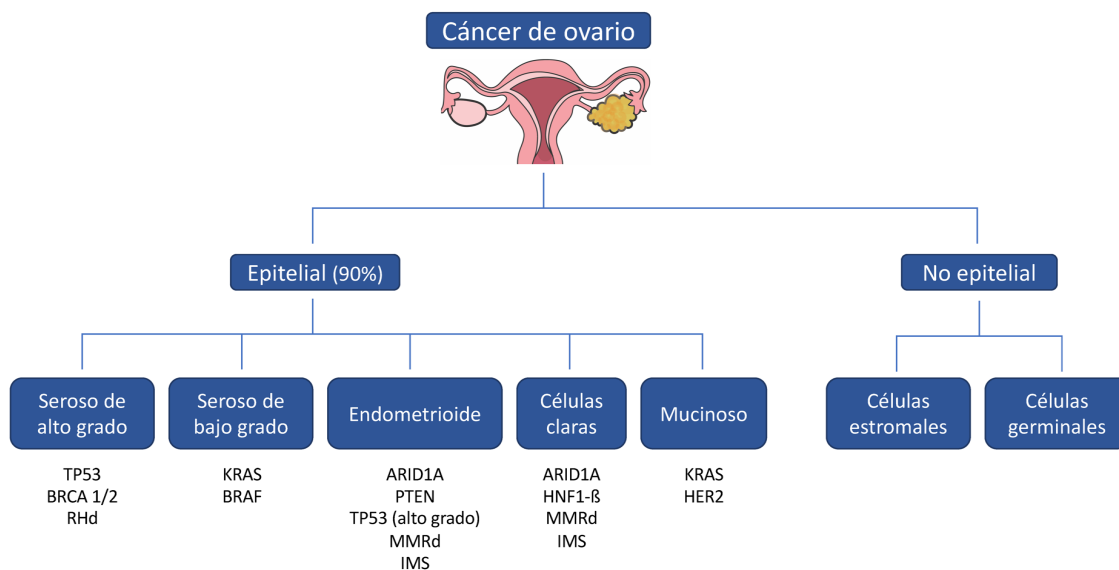


Figura 3. Clasificación histológica y molecular del CO.

1.2.5. Estadificación y diferenciación

La determinación del E. resulta clave para establecer la extensión anatómica del tumor y, por ende, para definir la estrategia terapéutica apropiada. En el CO se recurre a la exploración quirúrgica con el fin de llevar a cabo la estadificación de la enfermedad conforme a la clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) del año 2014 (35) (Tabla 1).

El grado de diferenciación celular del tumor es un criterio crucial para determinar su nivel de agresividad. Este criterio se evalúa mediante la observación microscópica de una muestra de biopsia tumoral por parte de un histopatólogo, quien asignará un grado numérico en función del nivel de diferenciación celular. Las células tumorales se pueden clasificar como "bien diferenciadas" si se parecen mucho a las células normales, o como "poco diferenciadas" o "indiferenciadas" si muestran características menos convencionales. Los tumores de grado 1 son aquellos de apariencia más similar a las células normales y mejor pronóstico, mientras que los de grado 3 son poco diferenciados, más agresivos y con peor pronóstico. Los tumores de grado 2 se encuentran entre estos extremos, siendo moderadamente diferenciados.

ESTADIO	LOCALIZACIÓN
I	Tumor confinado en ovarios o trompa(s) de Falopio
IA	Tumor limitado a 1 ovario (cápsula intacta) o a la trompa de Falopio; sin tumor en la superficie ovárica o de la trompa de Falopio; sin células malignas en la ascitis o en los lavados peritoneales
IB	Tumor limitado a ambos ovarios (cápsulas intactas) o a las trompas de Falopio; ausencia de tumor en la superficie de los ovarios o las trompas de Falopio; ausencia de células malignas en la ascitis o los lavados peritoneales
IC	Tumor limitado a 1 o ambos ovarios o trompas de Falopio, con cualquiera de los siguientes síntomas: <ul style="list-style-type: none"> - IC1: Derrame quirúrgico - IC2: Ruptura de la cápsula antes de la cirugía o tumor en la superficie del ovario o de la trompa de Falopio - IC3: Células malignas en la ascitis o en los lavados peritoneales
II	El tumor afecta a uno o ambos ovarios o trompas de Falopio con extensión pélvica o cáncer peritoneal primario
IIA	Extensión y/o implantes en útero y/o trompas de Falopio y/u ovarios
IIB	Extensión a otros tejidos intraperitoneales pélvicos
III	El tumor afecta a 1 o ambos ovarios o trompas de Falopio, o cáncer peritoneal primario, con diseminación confirmada citológica o histológicamente al peritoneo fuera de la pelvis y/o metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales
IIIA1	Sólo ganglios linfáticos retroperitoneales positivos (comprobado citológica o histológicamente): <ul style="list-style-type: none"> - IIIA1(i) Metástasis de hasta 10 mm en su mayor dimensión - IIIA1(ii) Metástasis de más de 10 mm en su mayor dimensión
IIIA2	Afectación peritoneal extrapélvica microscópica (por encima del borde pélvico) con o sin ganglios linfáticos retroperitoneales positivos
IIIB	Metástasis peritoneales macroscópicas más allá del borde pélvico de hasta 2 cm en su mayor dimensión, con o sin metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales
IIIC	Metástasis peritoneales macroscópicas más allá del borde pélvico mayores de 2 cm en su mayor dimensión, con o sin metástasis en los ganglios retroperitoneales.
IV	Metástasis a distancia, excluidas las metástasis peritoneales
IVA	Derrame pleural con citología positiva
IVB	Metástasis parenquimatosas y metástasis en órganos extraabdominales (incluidos los ganglios linfáticos inguinales y los ganglios linfáticos fuera de la cavidad abdominal)

Tabla 1. Estadificación del cáncer de ovario (CO) (FIGO 2014).

1.2.6. Estudio molecular en el CO

El estudio de las alteraciones moleculares en el CO es fundamental para el manejo del paciente en la práctica clínica. Ciertas alteraciones moleculares, como las mutaciones en *BRCA1/2* o la RHd, son útiles para predecir la magnitud de los beneficios de la terapia dirigida con inhibidores de PARP en tumores de alto grado (22,36). La reparación del ADN a través de la vía de la RH es el proceso mediante el cual se corrigen los daños en el ADN utilizando secuencias homólogas a la hebra de ADN dañada y en el que intervienen una serie de proteínas específicas (37). Cuando este mecanismo no es capaz de arreglar el daño producido en el ADN se habla de una deficiencia en la RH.

El estado de RHd se puede determinar a través de varios test disponibles en la práctica clínica (*SOPHiA GENETICS*, *Myriad MyChoice* y *FoundationOne CDx®*) que miden, mediante la secuenciación del ADN, el estado mutacional de los genes *BRCA1/2* y evalúan la inestabilidad genómica (GIS, del inglés *Genomic Instability Status*). Si se confirma una mutación en *BRCA1* o *BRCA2* o si la GIS está por encima de un determinado valor, se considera positivo para la RHd. Aquellas pacientes que tengan un tumor con un estado de RHd se podrán beneficiar de terapias con inhibidores de PARP, son más sensibles a la QT y, por lo tanto, tendrán una mayor supervivencia.

1.2.7. Tratamiento del carcinoma epitelial de ovario

- a) Cirugía: el tratamiento estándar en primera línea es la cirugía asociada a QT. La cirugía de citorreducción completa, en la que se consigue eliminar todo el tumor, está asociada con un incremento en la supervivencia de las pacientes (38). Es crucial el proceso de estadificación, sobre todo en los E. iniciales, ya que determinará la necesidad o no de tratamiento adyuvante.

- b) Quimioterapia: es el tratamiento que suele administrarse en conjunto con la cirugía. Normalmente se basa la administración de ciclos de paclitaxel (175 mg/m²)–carboplatino por vía intravenosa (i.v.) cada 3 semanas (22). Este régimen se suele seguir para aquellas pacientes con tumores en E. iniciales de alto riesgo (IA y IB Grado 3, tumores de células claras y cualquier grado de E. IC y IIA), para los cuales el riesgo de recaída a los 5 años está en torno al 20-40% (39) y en aquellas con E. avanzados. Solo aquellas pacientes con bajo riesgo (E. IA/B y Grado 1) que hayan recibido una estadificación quirúrgica completa requerirán únicamente de observación continua. Se debe considerar también la QT neoadyuvante en aquellas que no son aptas para someterse a una cirugía de citorreducción completa o para aquellos en quienes la citorreducción óptima no es factible. Este proceso consiste en tres ciclos de QT neoadyuvante basada en platino y taxol, seguida de cirugía, denominada cirugía de intervalo, y de otros tres ciclos más de QT adyuvante basada en platino y taxol.
- c) Tratamiento de mantenimiento: está considerado para aquellas pacientes con CO avanzado y enfermedad macroscópica residual tras la cirugía. Según la Guía ESMO 2023 (22), el tratamiento de mantenimiento viene marcado por la caracterización molecular:
- Bevacizumab: es un anticuerpo monoclonal que se dirige al factor de crecimiento endotelial vascular y actúa como antiangiogénico. Se suele administrar al inicio de la QT adyuvante en pacientes adultas con CO en E. avanzados, que son sensibles al platino después de su primera recaída, así como en pacientes adultas con CO recurrente resistente a platino que no hayan recibido más de dos regímenes de QT previos o tratamiento previo con bevacizumab. Además se suele mantener en monoterapia hasta progresión de la enfermedad o hasta un máximo de 15 meses o toxicidad inaceptable (22).
 - También hay que mencionar el uso de los inhibidores de PARP. Las enzimas PARP actúan en el mecanismo de reparación del ADN por escisión de bases reparando las roturas de una sola cadena. El uso de inhibidores de PARP en aquellas pacientes portadoras de mutaciones

en los genes *BRCA1* y/o *BRCA2* o RHd provoca una acumulación de daño en el ADN induciendo lo que se denomina “letalidad sintética” en las células tumorales. Hasta el 50% de las pacientes con CSAG se diagnostican como positivas para la RHd con las pruebas genéticas actuales (40). Entre ellas se encuentran un 15-20% con mutaciones en *BRCA1/2* (22). El olaparib está autorizado para el tratamiento de pacientes con CO portadoras de mutaciones en *BRCA1/2*, en monoterapia, (estudio SOLO1) (41) o en combinación con bevacizumab en aquellas pacientes con la RHd (estudio PAOLA 1) (42), durante 2 años. Por otro lado, el tratamiento con niraparib está autorizado para el tratamiento de aquellas pacientes con CO independientemente del estado mutacional de *BRCA* (estudio PRIMA) (43).

- d) Tratamiento en recaída: en casos de recurrencia de la enfermedad, la cirugía no es una opción de tratamiento estándar aunque puede ser contemplada en pacientes que cumplan los criterios del estudio DESKTOP III (44), que incluyen un período libre de enfermedad de más de 6 meses, que no presentasen enfermedad residual tras la primera intervención quirúrgica y tengan un buen estado de salud. La QT es el tratamiento más habitual, estableciéndose categorías en función del grado de respuesta de las pacientes en recaída a agentes de platino. Para la toma de decisiones clínicas en este contexto hay que fijarse en el intervalo libre de platino (ILP), histología, estado mutacional de los genes *BRCA1/2*, número de líneas previas, exposición y toxicidad de tratamientos previos, condición y preferencias de las pacientes. El régimen estándar es la combinación de platino con otro agente quimioterápico en aquellas pacientes que recaen tras más de 6 meses desde su último ciclo de platino (pacientes platino sensibles) con la consideración de incorporar bevacizumab o algún inhibidor de PARP, en caso de presentar mutación en *BRCA1/2*. A aquellas pacientes que recaen tras menos de 6 meses después de su último ciclo de platino (pacientes platino resistentes) se les suelen aplicar otros regímenes de QT en monoterapia basada en taxol semanal, doxorubicina liposomal pegilada, topotecán o gemcitabina.

1.3. Vesículas Extracelulares

1.3.1. Descripción, características generales y clasificación

Según la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV, del inglés *International Society for Extracellular Vesicles*), se acuñó el término genérico de vesícula extracelular (EV, del inglés *Extracellular Vesicle*) para describir a las partículas que son liberadas por cualquier tipo de célula de forma natural, que están delimitadas por una bicapa lipídica y que no tienen la capacidad de replicarse, ya que carecen de un núcleo funcional (45). Éstas son utilizadas por las células como vehículos para intercambiar diferentes tipos de biomoléculas, actuando como herramientas importantes en la comunicación intercelular y el contacto célula-célula (46) y desempeñando un papel esencial en la regulación de diversos procesos fisiológicos normales así como patológicos (47,48).

Las EVs comprenden una población heterogénea de vesículas de membrana originadas en diferentes tipos celulares. Esta diversidad conlleva que su contenido molecular, tamaño y función varíen según el tipo celular del que se originen (45,47). Según estas características, las EVs se dividen generalmente en dos grupos: las EVs grandes (LEVs, del inglés *Large Extracellular Vesicles*), que tienen un tamaño de diámetro mayor a 200 nanómetros (nm) y se generan a partir de la membrana plasmática (MP) (45,49,50). Este grupo incluye microvesículas o micropartículas, cuerpos desprendidos, ectosomas y los oncosomas grandes (50–53). También existe otro subgrupo de EVs con un tamaño superior a 1 micrómetro (μm) de tamaño, conocidas comúnmente como "cuerpos apoptóticos" (54–56). Por otro lado, están las EVs pequeñas (SEVs, del inglés *Small Extracellular Vesicles*), que tienen un tamaño de diámetro menor a 200 nm y se caracterizan por su origen endosomal y la presencia de marcadores de proteínas en su superficie (50). Dentro de este grupo se encuentran los exosomas, que son los más representativos y han sido objeto de numerosos estudios debido a sus funciones ampliamente descritas en diversas condiciones fisiológicas y patológicas (57) (Figura 4).

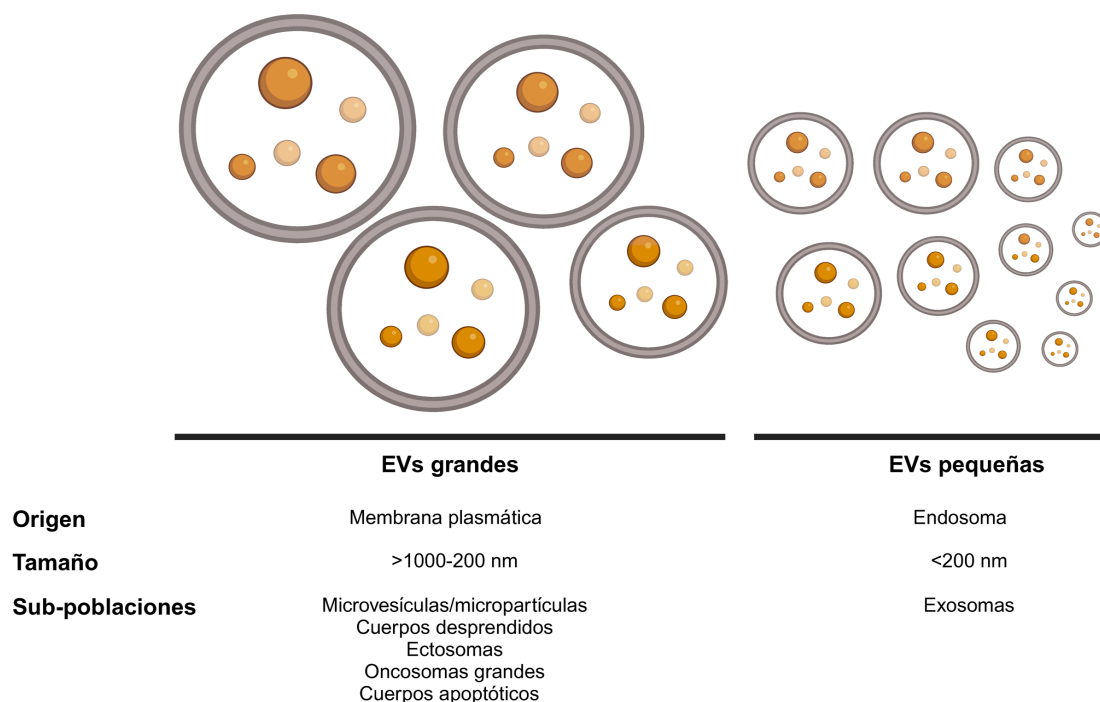


Figura 4. Diferentes subpoblaciones de vesículas extracelulares. Figura adaptada de *Malkin and Bratman. Cell Death and Disease (2020)*. Creada con BioRender.com

1.4. Exosomas

Los exosomas son un subtipo de SEVs de entre 30-150 nm de diámetro. Estas vesículas están constituidas por una bicapa lipídica y contienen una carga diversa de moléculas, como proteínas, lípidos y varios tipos de ácidos nucleicos, tales como el ADN, ácido ribonucleico (ARN) o microARNs (miARNs). Éstas se forman durante la maduración de los endosomas multivesiculares (MVEs, del inglés *Multivesicular Endosomes*) (53) y se liberan al exterior celular a través de la fusión de estos MVEs con la MP.

A principios de la década de los 80 dos artículos publicados casi al mismo tiempo en las revistas *Journal of Cell Biology* (58) y *Cell* (59) describieron cómo los receptores de transferrina (RTF) localizados en la membrana celular de reticulocitos interactuaban con vesículas activas de aproximadamente 50 nm de diámetro que se originaban en éstos y que eran secretadas al entorno extracelular (60,61). Aunque estos representaron los primeros estudios

centrados en este tipo de vesículas, pasarían algunos años antes de que se acuñara por primera vez el término "exosomas" gracias al estudio de *Rose M. Johnstone* (62).

A partir de los 2000, los exosomas empezaron a adquirir mayor relevancia en los campos de la inmunología (63–65), la comunicación intercelular (46) y el cáncer (66–68), en gran parte, gracias a los avances tecnológicos en la microscopía electrónica y la proteómica, que permitieron una mejor visualización y caracterización de los exosomas.

1.4.1. Biogénesis, secreción al espacio extracelular y captación

Los exosomas se originan como vesículas intraluminales (ILV, del inglés *Intraluminal Vesicles*) en el interior de los endosomas tempranos durante el proceso de su maduración hacia cuerpos multivesiculares (MVB, del inglés *Multivesicular Bodies*) en la que se clasifican y se introducen determinadas moléculas en su interior, dentro de un proceso que implica diferentes vías (53,69,70).

Los mecanismos de biogénesis de los exosomas más ampliamente descritos incluyen la vía dependiente del complejo ESCRT (del inglés *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) y la independiente de este mismo complejo (Figura 5). La formación de vesículas intraluminales (ILVs) y cuerpos multivesiculares (MVBs) está predominantemente mediada por la maquinaria ESCRT, que consta de cuatro complejos (numerados de ESCRT-0 a -III) que se ensamblan junto con proteínas asociadas como la proteína VPS4, del inglés *Vacuolar protein sorting 4* (VPS4), la proteína codificada por el gen *VTA1*, del inglés *Vesicle trafficking 1* (VTA1) y la proteína ALIX, del inglés *ALG-2 interacting protein X* (ALIX) (69,71).

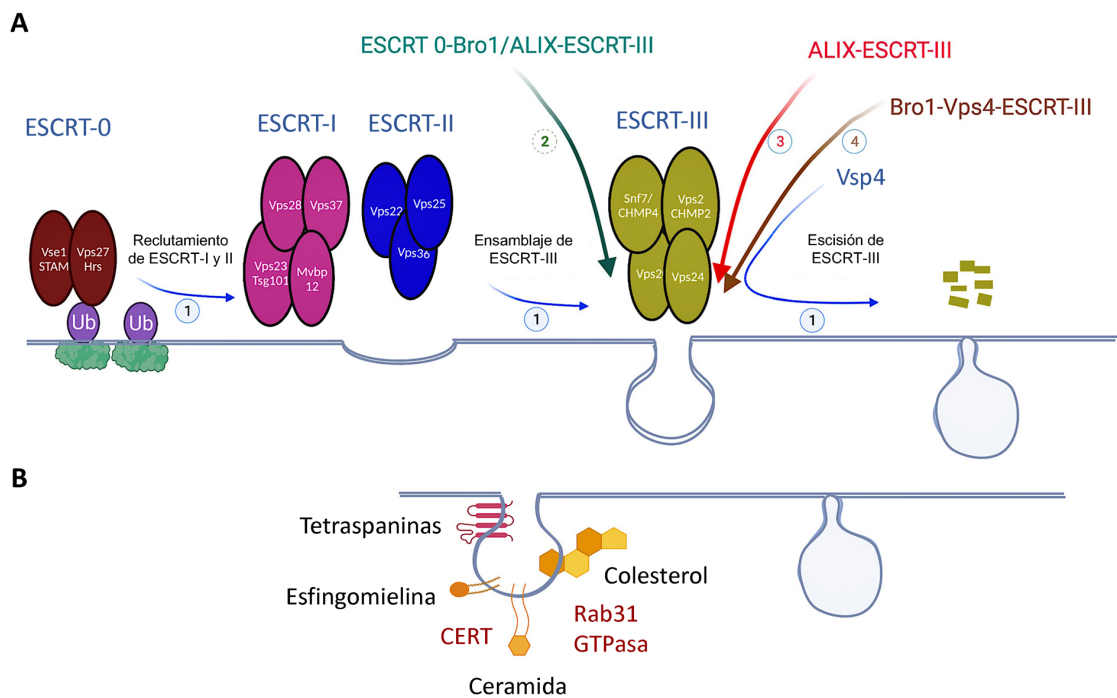


Figura 5. Biogénesis de los exosomas. (A) Biogénesis dependiente de ESCRT. **(B)** Biogénesis independiente de ESCRT. Figura adaptada de Krylova, S.V. et al. *Int. J. Mol. Sci.* (2023).

El proceso de biogénesis dependiente del complejo ESCRT comienza con la activación del complejo ESCRT-0 por parte del fosfatidilinositol 3-fosfato. Tras ello, el complejo ESCRT-0 reconoce y se une a proteínas transmembrana ubiquitinadas presentes en el exterior de la membrana endosomal, promoviendo su concentración en la membrana endosomal tardía. A continuación, ESCRT-0 recluta a ESCRT-I gracias a la interacción entre sustrato Hrs, del inglés *hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate* (Hrs), con la subunidad de la proteína codificada por el gen *TSG101*, del inglés *Tumor susceptibility 101* (TSG101) del complejo ESCRT-I. Este complejo desempeña una función esencial participando en la clasificación de la carga en el MVB y en la deformación de la membrana, lo que resulta en la formación de invaginaciones. Después, ESCRT-I recluta a ESCRT-II, que a su vez se une a proteínas ubiquitinadas que se incorporarán al contenido de las vesículas. Finalmente, la subunidad ESCRT-II se ensamblará a ESCRT-III, facilitando la clasificación y concentración del contenido de los MVBs, así como la formación de las ILVs, utilizando para ello adenosín trifosfato (ATP) catalizado por la

proteína VPS4 (72–75). Por otra parte, se ha observado en mamíferos que el complejo ESCRT-III puede ser reclutado de manera independiente del proceso anterior mediante la interacción con ALIX en presencia de ácido lisofosfatídico (73) facilitando la clasificación de la carga en el MVB y la formación de ILV (76).

Los exosomas también pueden formarse de manera independiente de ESCRT. El primer mecanismo descrito tiene que ver con una enzima, la esfingomielinasa, que se encarga de hidrolizar la esfingomielina en ceramida, que se ha visto que juega un papel fundamental en la clasificación del contenido en las ILV destinadas a la liberación de exosomas (77). Otro mecanismo ampliamente investigado implica a proteínas de la familia de las tetraspaninas, como CD63, CD81, CD82 y CD9, entre otras. Numerosos estudios han demostrado el papel que tienen estas proteínas en la formación y secreción de los exosomas, así como en la clasificación de diversas cargas en su interior (78–80).

Una vez formados los MVBs, éstos suelen seguir la vía de la degradación al fusionarse con los lisosomas, aunque también pueden dirigirse hacia la MP y liberar los exosomas al fusionarse con ella (Figura 6). En el proceso de liberación de los exosomas influyen diferentes proteínas como la actina, la miosina, proteínas de la familia de las guanosina trifosfatasa (GTPasas) y de la familia de los receptores SNARE, del inglés *Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor – NSF– Attachment protein Receptor* entre otras (46,61). De igual forma, hay estudios que han descrito el papel importante de algunas proteínas de la familia de las GTPasas, como las proteínas Rab27a y Rab27b, del inglés *Ras-associated binding (Rab)*, para la secreción de exosomas, regulando la movilización y acoplamiento de los MVBs a la MP y promoviendo así su fusión y la liberación de los exosomas (53,61,81). Por otro lado, las proteínas de los receptores SNARE son las encargadas de impulsar la fusión con la MP. Este proceso comienza con la interacción entre la proteína sinaptotagmina, que actúa como sensor de calcio y se encuentra localizada en los MVBs, y otras proteínas de la MP pertenecientes a la familia de las sintaxinas. Posteriormente, los MVBs se irán acumulando en la MP gracias al complejo SNARE, y esta

secuencia de eventos culminará en la liberación de los exosomas al entorno extracelular (73,82,83).

Una vez liberados en el espacio extracelular, las células receptoras tienen la capacidad de reconocer a los exosomas e incorporar su contenido. Los efectos que los exosomas puedan inducir al estado fisiológico y fisiopatológico dependerán de su habilidad para interactuar con estas células y del contenido que transporten (46). Este proceso puede tener lugar de distintas maneras: fusionándose directamente con la MP de la células huésped, mediante su internalización a través de distintas vías endocíticas (fagocitosis, macro y micropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina, caveolina o balsas lipídicas) (73,84,85). Aunque la base molecular que determina la orientación específica hacia las células receptoras todavía no se comprende al detalle, se han podido identificar diversos mediadores de estas interacciones, como las tetraspaninas, integrinas, lípidos, lectinas, proteoglicanos de heparán sulfato y componentes de la matriz extracelular (53) (Figura 6).

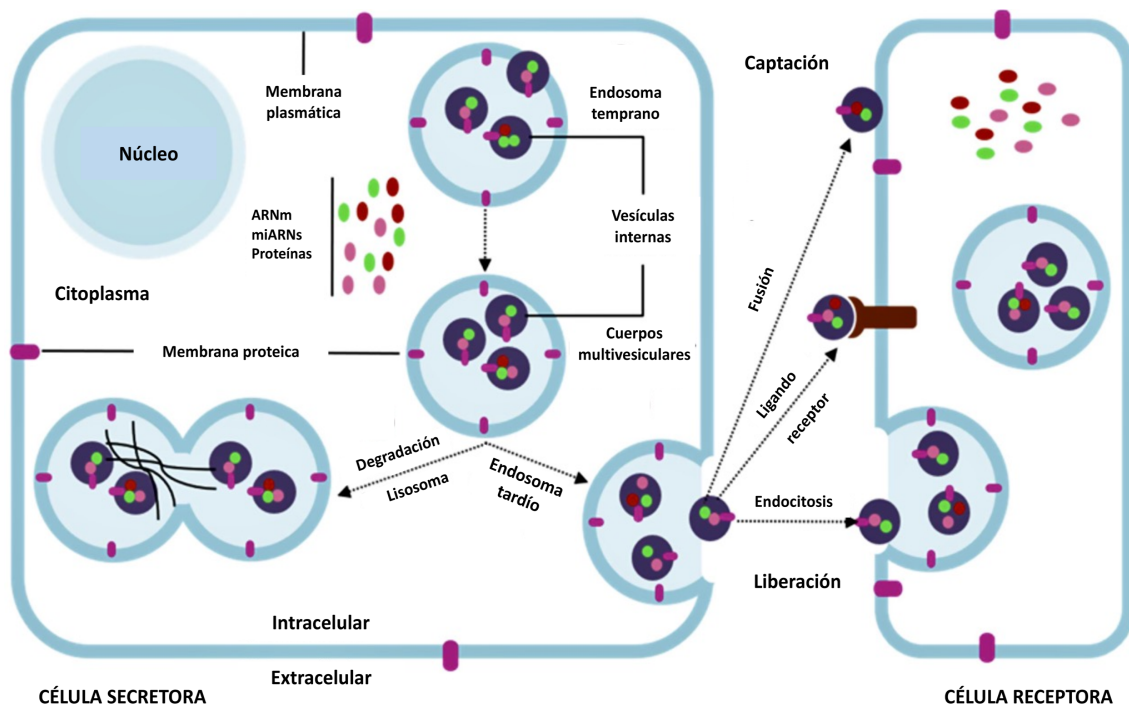


Figura 6. Representación esquemática de la biogénesis y liberación de los exosomas desde la célula secretora y su posterior unión a la célula receptora. Figura adaptada de *Mashouri L, et al. Mol Cancer. (2019).*

1.4.2. Composición molecular

Los exosomas presentan una variedad de biomoléculas distintas tanto en su interior como en su superficie, incluyendo receptores, factores de transcripción (FTs), enzimas, complejos mayores de histocompatibilidad (CMH) de clase I y II, diversos tipos de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (ADN, ARN, miARN), en función del tipo de célula de la que provengan (Figura 7). Sin embargo, gracias a los avances “ómicos” (proteómica, transcriptómica y metabolómica) en el estudio de estas vesículas se ha evidenciado que existen ciertas moléculas que son compartidas por todos los exosomas, con independencia de su origen y que están recogidas en diferentes bases de datos: Exocarta, Vesiclepedia y EVpedia (86–88). Las principales biomoléculas que son comunes en todos los exosomas son:

Lípidos: la composición lipídica se ha estudiado ampliamente en diversos contextos gracias a los estudios metabolómicos realizados en vesículas. Aunque la composición lipídica de la MP de los exosomas es muy similar a la de la célula de origen, varios estudios han demostrado que algunos lípidos pueden asociarse específicamente a diferentes tipos de vesículas (70). Algunos de los lípidos enriquecidos en estas vesículas son la esfingomielina, el colesterol, el ácido fosfatídico, la fosfatidilserina o la ceramida (89–91). Esta composición característica de la bicapa lipídica no solo desempeña un papel fundamental en la biogénesis y liberación de la célula (69,92), sino que también contribuye a esa estabilidad que muestran en diferentes entornos extracelulares (48).

Ácidos nucleicos: los exosomas también están enriquecidos en diferentes tipos de ácidos nucleicos como ADN genómico y mitocondrial (93–95) en menor medida, pero sobre todo, los exosomas están enriquecidos en ARN pequeños, que se transfieren de forma natural de una célula a otra a través de estas vesículas (96,97). Mediante diferentes técnicas de secuenciación se han podido caracterizar un gran número de ARN pequeños como el ARN mensajero (ARNm) (97), miARN (98,99), ARN no codificante largo (ARNncl) y corto (ARNncc)

(100,101). La mayoría del ARN exosomal tiene un tamaño menor a 200 nucleótidos, por tanto, los ARN de gran tamaño o largo seguramente aparezcan fragmentados dentro de los exosomas. El miARN, que representa el ARN más estudiado en SEVs, son moléculas de ARN no codificantes, de unos 22 nucleótidos de longitud, que se expresan de forma endógena y regulan la expresión génica en procesos biológicos como la comunicación intercelular (47), crecimiento celular, la diferenciación, apoptosis (102) y en el cáncer. Además, se cree que el encapsulamiento del ARN dentro de la bicapa lipídica de la membrana protege al ARN de la degradación por la ribonucleasa una vez que se libera en el entorno extracelular (70).

Proteína: son numerosos los estudios proteómicos en los exosomas derivados de distintos tipos celulares los que han revelado que algunas de estas proteínas proceden específicamente de la célula y el tejido de origen, mientras que otras son comunes a todos los exosomas (103). Gran parte del contenido proteico de los exosomas son consecuencia de su origen y está asociado a los mecanismos responsables de la biogénesis (70), como por ejemplo proteínas del complejo ESCRT (ALIX y TSG101), proteínas relacionadas con el proceso de transporte y fusión de membrana (proteínas de la familia de las GTPasas [Rab5a, Rab27A y Rab27B]), el factor 6 de ribosilación del ADP (ARF6) y proteínas de la familia de las anexinas A (ANXAs), además de proteínas de adhesión como integrinas y tetraspaninas (CD82, CD81, CD63, CD53 y CD9). También se han descrito otras proteínas como las proteínas de choque térmico (HSP, del inglés *Heat Shock Protein*, como HSP70 y 90), proteínas del citoesqueleto (actina, miosina y tubulina), proteínas implicadas en la transducción de señales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*), la presentación de antígenos (CMH-I y CMH-II) y otras proteínas transmembrana como la proteína LAMP1, del inglés *Lysosomal associated membrane protein 1* o el RTF (48,61,70,104–106). Dado que algunas de estas proteínas se encuentran exclusivamente en los exosomas, éstas podrían utilizarse como biomarcadores específicos para su identificación.

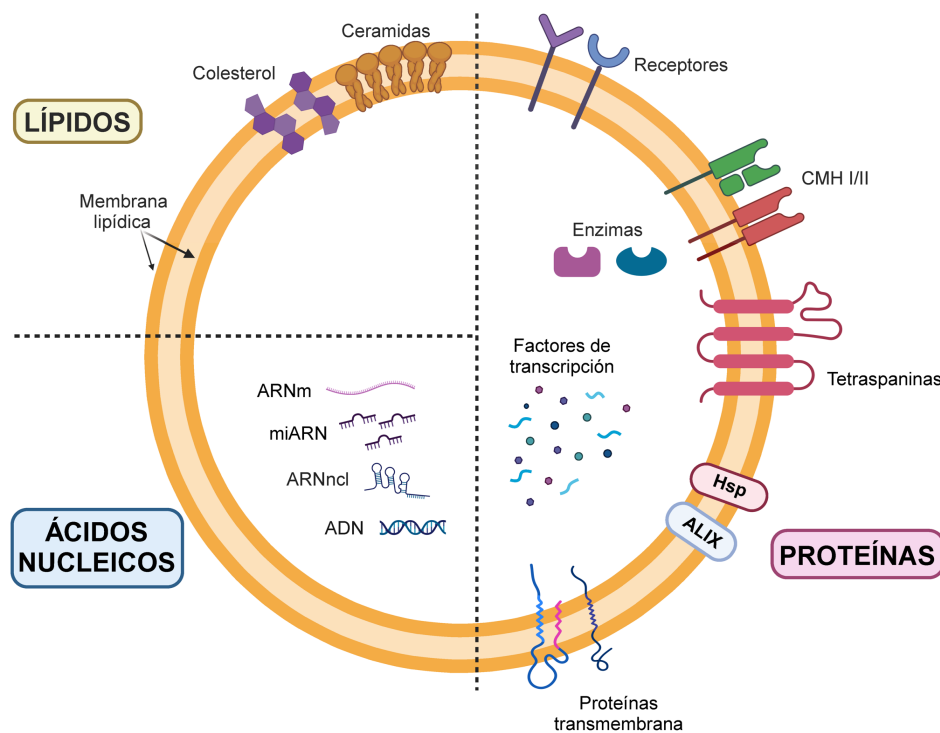


Figura 7. Composición molecular de los exosomas. Creada con BioRender.com

1.4.3. Funciones de los exosomas

Los exosomas pueden ser liberados por cualquier tipo celular. Esto sugiere que desempeñan un papel importante en la comunicación intercelular y tienen la capacidad de transferir carga molecular a las células cercanas, regulando diversos procesos fisiológicos y patológicos. Los exosomas actúan como vehículos de comunicación entre células al transportar biomoléculas a células receptoras, lo que puede influir en su comportamiento, función e incluso fenotipo (48,107,108).

Por otra parte, se ha demostrado que las SEVs y los exosomas desempeñan un papel activo tanto en la promoción de procesos trombóticos (109) como en la regulación de la anticoagulación (110). Además, en otro estudio llevado a cabo en pacientes con CO donde se analizó el contenido proteico de los exosomas derivados del plasma de estas pacientes, se encontraron diversas proteínas relacionadas con procesos de coagulación (111).

Se ha observado también que los exosomas intervienen en la reparación y regeneración de los tejidos. Éstos pueden transportar factores de crecimiento, proteínas solubles, lípidos bioactivos y material genético, como miARN y ARNm (112–114) a los tejidos dañados o lesionados, favoreciendo así los procesos de cicatrización.

También se ha estudiado su participación en la regulación inmunitaria al transportar moléculas de señalización y antígenos entre las distintas células inmunitarias. Los efectos funcionales de estos exosomas dependerán de la carga molecular que porten y del tipo de célula receptora que los reciba. Por ejemplo, se ha descrito que las vesículas liberadas por macrófagos y células dendríticas contienen en su superficie CMH-II lo que favorece el proceso de presentación de antígenos (55,115,116). En otros estudios, se ha observado que las HSP pueden activar células NK (del inglés, *Natural Killer*) (117,118), del mismo modo que se ha descrito el papel de los miARNs, contenidos en estas vesículas, en procesos de respuesta inmunitaria antitumoral (119–122).

Por último, destacar que una de las claves para el éxito del embarazo es la continua comunicación entre el feto y la madre. Esta comunicación involucra interacciones célula-célula, mediadores solubles y EVs. Estas vesículas están presentes en la sangre materna a lo largo de todo el embarazo y tienen un impacto en el sistema inmunológico materno. Además, desempeñan funciones en la modulación inmunológica y la protección del feto (48).

1.4.4. Papel de los exosomas en el desarrollo del cáncer

Por otro lado, hay que destacar el papel que pueden desempeñar estas vesículas en diferentes patologías. En la última década, se ha descrito el papel de éstas en diversas patologías (123–127). En el contexto del cáncer, se sabe que el microambiente tumoral (MT) es muy heterogéneo, incluyendo células tumorales, fibroblastos, células estromales e infiltrado inmune en constante interacción. En este entorno, los exosomas, por medio de su contenido, tienen la capacidad de

producir cambios en las células receptoras a través de mecanismos de señalización autocrina y paracrina (128).

Un componente principal del MT son los fibroblastos asociados al cáncer (FACs). Éstos juegan un papel muy importante en el desarrollo del cáncer favoreciendo el proceso de proliferación tumoral, invasión angiogénesis o resistencia a terapias (129,130). Varias investigaciones han demostrado este papel a través de la secreción de exosomas y su contenido, que influye en el comportamiento de las células cancerosas y en la señalización de diversas vías protumorales (131,132).

Asimismo, los exosomas derivados de las células tumorales (Exo-DCT) desempeñan un papel significativo en los procesos de formación del nicho premetastásico y metástasis. Éstos inducen la movilización y el reclutamiento de varias poblaciones celulares en zonas de los órganos secundarios, creando un entorno propicio para la metástasis tumoral a través de la interacción entre las células tumorales reclutadas y el estroma local (133). También se ha descrito que en el entorno tumoral los Exo-DCT promueven, en distintos tipos tumorales, una respuesta angiogénica aumentada, sobre todo en condiciones hipóxicas, los que es necesario para el crecimiento del tumor y la metástasis. A través de su contenido, los Exo-DCT promueven la respuesta angiogénica mediante la reprogramación y modulación de las células endoteliales (134,135), incrementando la densidad de los vasos (136) o regulando vías de señalización que favorecen la angiogénesis (137–139).

Los exosomas desempeñan un papel dual en los procesos de supresión tumoral y progresión de la enfermedad. Mientras que en general participan en la modulación de la respuesta inmune mediante la presentación de antígenos (133), los Exo-DCT tienen un papel activo en la supresión de la respuesta inmune promoviendo así la progresión tumoral. Los Exo-DCT pueden regular la carcinogénesis regulando la interacción con diversas células inmunes como macrófagos, células B, linfocitos T o células NK. Por ejemplo, multitud de

estudios han descrito cómo los Exo-DCT desempeñan un papel en la polarización de los macrófagos, promoviendo su cambio del subtipo M1 al subtipo M2 protumoral, promovido por diversos miARNs que regulan el MT en varios tipos de tumores (140–142). Por otra parte, se ha visto que los exosomas que contienen el ligando Fas pueden provocar inmunosupresión al inducir la apoptosis en células T CD8+ (143,144). De igual forma, se ha descrito ampliamente la actividad que tienen los Exo-DCT en la activación de las células T reguladoras para influir en la inmunosupresión (145,146).

Por otro lado, los exosomas pueden inducir resistencia a los medicamentos en varios tipos de tumores a través de diversos mecanismos (61). Los exosomas, mediante su contenido en miARNs, tienen la capacidad de inducir resistencia a distintos tratamientos, activando o inhibiendo diversas rutas metabólicas (147–150) o regulando genes y proteínas (147,151–153). Además, la carga proteómica exosomal juega un papel muy importante en la resistencia a fármacos anticancerígenos (148,154–156).

A pesar de la relevancia de todos estos estudios, la mayoría de ellos han sido desarrollados en líneas celulares o en modelos animales con el fin de caracterizar el contenido exosomal y buscar una justificación biológica que explique la posible implicación de la carga exosomal en el cáncer. Sin embargo, en la práctica clínica, son limitadas las aproximaciones experimentales que favorezcan el desarrollo de estos estudios. Por lo tanto, es fundamental aplicar este conocimiento al paciente y adoptar un enfoque traslacional para avanzar en este campo. Destacar además que la secreción extracelular de los exosomas es continua, no solo al torrente sanguíneo, sino también a otros fluidos corporales como la orina, linfa, semen o el líquido ascítico (157–159), lo que posibilitaría el estudio dinámico y no invasivo de la evolución biológica del tumor y el desarrollo de la resistencia a fármacos.

1.4.5. Implicación de los exosomas en el CO

En el CO, la ruta transcelómica es la vía más común de diseminación metastásica. Esta vía se caracteriza por la propagación de las células cancerosas dentro de la cavidad abdominal, lo que conduce a la diseminación peritoneal y a la formación de ascitis maligna (160). Por ello, el líquido peritoneal puede servir como reservorio que contiene diversos componentes celulares y factores solubles que constituyen un microambiente único en este tumor (161). Además, la acumulación de ascitis maligna suele ser más frecuente en las fases avanzadas de la enfermedad, por lo que la obtención de muestras para un análisis exhaustivo en la fase de diagnóstico inicial sigue constituyendo un reto en la actualidad (162).

Principalmente, los estudios sobre los exosomas en el CO se han realizado utilizando modelos *in vitro* que difieren considerablemente de lo que ocurre en los tumores desarrollados por las pacientes. En este sentido, algunos autores han descrito asociación entre determinadas moléculas contenidas en los exosomas (principalmente miARNs) y la aparición de resistencia a terapias o la promoción de fenotipos invasivos en modelos de cultivo celular (150,163,164). Sin embargo, no se han podido demostrar dichas asociaciones entre el contenido de los exosomas y el grado de respuesta a las nuevas terapias usadas para el CO (inhibidores de PARP o antiangiogénicos). Por tanto, es difícil justificar el mecanismo por el que estas resistencias pueden desarrollarse.

Desde una perspectiva clínica, la caracterización de la carga de las SEVs y exosomas secretados por el tumor podría ser relevante para la identificación de marcadores diagnósticos, predictivos y pronósticos (127). A pesar de ello, son escasos los estudios previos que han aislado exosomas de sangre periférica y fluidos peritoneales de pacientes con CO para identificar firmas de miARNs capaces de diagnosticar tumores en E. tempranos (161,165–167).

Además, el contenido proteico de los exosomas derivados del CO se ha evaluado en menor medida y se ha limitado al cribado de proteínas específicas o al uso de paneles personalizados de bajo rango con fines diagnósticos (166,168,169), lo que puede representar un sesgo muy importante al ignorar el complejo perfil proteómico que los exosomas podrían presentar y limitando el estudiar más a fondo las funciones atribuidas a éstos. Consideramos por lo tanto que un análisis proteómico exhaustivo podría ayudar a determinar y comprender el papel de los exosomas y su carga proteica en el pronóstico de las pacientes con CO.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis principal del trabajo sostiene que el contenido de los exosomas presentes en la cavidad peritoneal desempeña un papel activo en la progresión del CO y en la resistencia terapéutica a los tratamientos actuales. Este estudio sugiere que este enfoque podría ser una forma novedosa, menos invasiva y más específica, de poder pronosticar el curso de la enfermedad.

Por tanto, se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo primario: correlacionar los perfiles proteómicos, estudiados mediante espectrometría de masas, del contenido de los exosomas aislados del fluido peritoneal (Exo-DFP) de pacientes con CO avanzado con su evolución clínica real.

Objetivos secundarios:

- Caracterizar los perfiles proteómicos del contenido de los Exo-DFP en función del:
 - Subtipo histológico (seroso de alto o bajo grado, endometrioides, células claras y mucinoso).
 - Momento de la toma de muestra (cirugía primaria, de intervalo o recurrencia).
 - Tumores platino-sensibles frente a platino-resistentes.
- Determinar, mediante la comparación con bases de datos públicas, las rutas moleculares de interés sobre o infra representadas entre los perfiles clínicos descritos anteriormente.
- Considerando la información molecular y genética disponible, establecer posibles asociaciones con la información proteica obtenida del estudio de los exosomas.
- Estudiar la naturaleza dinámica del CO mediante la caracterización de muestras seriadas obtenidas de distintos pacientes.

3. *MATERIALES Y MÉTODOS*

3.1. Diseño y población del estudio

Para llevar a cabo este trabajo se diseñó un estudio observacional prospectivo en pacientes mayores de 18 años con CO avanzado que se sometieron a laparoscopia diagnóstica o cirugía citorreductora en cuatro de los centros del grupo hospitalario HM (HM Sanchinarro, HM Puerta del Sur, HM Montepíncipe y HM Madrid) entre junio de 2018 y septiembre de 2022. Además, se estableció una cohorte control que incluyó pacientes sometidas a cirugías no oncológicas de las cuales se recogieron igualmente lavados abdominales. Todas las pacientes dieron su consentimiento por escrito (versión 2.0 de fecha 21 de diciembre de 2020 y versión 1.0 de fecha 21 de diciembre de 2020). Anterior a esto, se obtuvo la aprobación del estudio por parte del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos (CEIm) del grupo HM Hospitales (Anexo 1). El estudio se ha realizado de acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki y las guías de Buenas Prácticas Clínicas (BPC), que incluyen: la Orden Ministerial SAS/3470/2009; Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales; el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo; y la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica. En relación a las pacientes fallecidas, se aplicó lo estipulado en la Ley de Investigación Biomédica 14/2007 de 3 de julio y las consideraciones del CEIm.

3.2. Recogida de datos clínico-patológicos y moleculares

Todas las variables, tanto las clínico-patológicas como las moleculares, se fueron recopilando en paralelo a la recogida de los fluidos peritoneales. Todos los datos de las pacientes con y sin enfermedad oncológica se fueron almacenando en un archivo Excel. A continuación se exponen las variables recogidas durante el estudio.

Variables relacionadas con el paciente oncológico:

- Código de identificación del paciente.
- Edad al diagnóstico.
- Tratamiento neoadyuvante recibido (SI/NO).
- Tratamiento adyuvante recibido (SI/NO).
- Líneas de tratamiento recibidas.
- Esquema del tratamiento y número de ciclos recibidos.
- Progresión al tratamiento (SI/NO).
- Fecha de progresión al tratamiento.
- Progresión platino sensible o resistente: las pacientes sensibles al platino se definieron como aquellas con un ILP (tiempo transcurrido desde la última QT hasta la recaída tumoral) superior a 6 meses, mientras que las pacientes resistentes al platino se consideraron aquellas con un ILP inferior a 6 meses.
- Exitus (SI/NO).
- Fecha de exitus.
- Fecha de último seguimiento.

Variables relacionadas con la muestra tumoral:

- Código de identificación de la muestra.
- Histología del tumor.
- E. del tumor según los criterios FIGO.
- Tipo de cirugía de la cual se obtuvo la muestra (laparoscopia diagnóstica o citorreducción primaria (citadas en el texto como cirugía primaria), cirugía de intervalo post QT neoadyuvante y cirugía de salvamento tras recaída (citada en el texto como cirugía de recaída).
- Fecha de la cirugía.
- Resultado quirúrgico de la operación: R0 se asigna al resultado quirúrgico en el que no hay evidencia de enfermedad micro o macroscópica y R1 se atribuye al resultado de la cirugía en el que persiste la enfermedad microscópica.

Variables relacionadas con el paciente no oncológico:

- Código de identificación del paciente.
- Edad al diagnóstico de la patología de la cual se operó.
- Diagnóstico de la patología por la cual se operó.
- Código de identificación de la muestra.

Variables moleculares:

- Estatus molecular *BRCA* (mutado/no mutado).
- Clasificación de la mutación *BRCA* (patogénica/variante de significado incierto).
- Mutación en otros genes relacionados con la RH y asociados previamente al desarrollo del CO y/o estatus de activación de la RH. En este sentido, RHe, se refiere a aquellos tumores que presentan el sistema de reparación del ADN por RH eficiente, mientras que RHd, hace alusión a aquellos con sistema de reparación del ADN por RH deficiente.

3.3. Aislamiento de exosomas de fluidos peritoneales

Las muestras de fluidos peritoneales se recolectaron en el momento de la operación en Tubos Falcon™ de 50 mililitros (ml), obteniendo entre 30-50 ml de muestra. Tras la recolección, se realizó un primer procesamiento mediante una centrifugación a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar restos de tejido de gran tamaño que se hubieran arrastrado durante la recogida de la muestra. Posteriormente, las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso.

El procesamiento de los fluidos peritoneales se realizó mediante centrifugaciones seriadas de los sobrenadantes. En primer lugar, las muestras se centrifugaron a una velocidad de $3.000 \times g$ durante 20 minutos para eliminar contaminantes celulares. Luego, el sobrenadante resultante se centrifugó a

12.000 × g durante 20 minutos en la ultracentrífuga *Beckman Optima L-90K* (*Beckman Coulter, Fullerton, CA, EEUU*) utilizando el rotor Tipo 55.2 con el fin de eliminar restos celulares. A continuación, el sobrenadante se sometió a una nueva centrifugación a 100.000 × g durante 70 minutos para concentrar los exosomas. El pellet resultante se lavó en 5 ml de tampón fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*) y se recogió mediante una segunda ultracentrifugación a 100.000 × g durante 70 minutos utilizando el rotor SW55.

Finalmente, el pellet enriquecido en exosomas, se resuspendió en 100 microlitros (μl) de PBS y se almacenó a -80°C (Figura 8). La concentración proteica de todas las muestras a estudio se cuantificó mediante un análisis colorimétrico utilizando el método del ácido bicinónico (*BCA*, del inglés, *BiCinchoninic Acid*) empleando el kit de ensayo de proteínas *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*, *ThermoFisher Scientific, EEUU*.

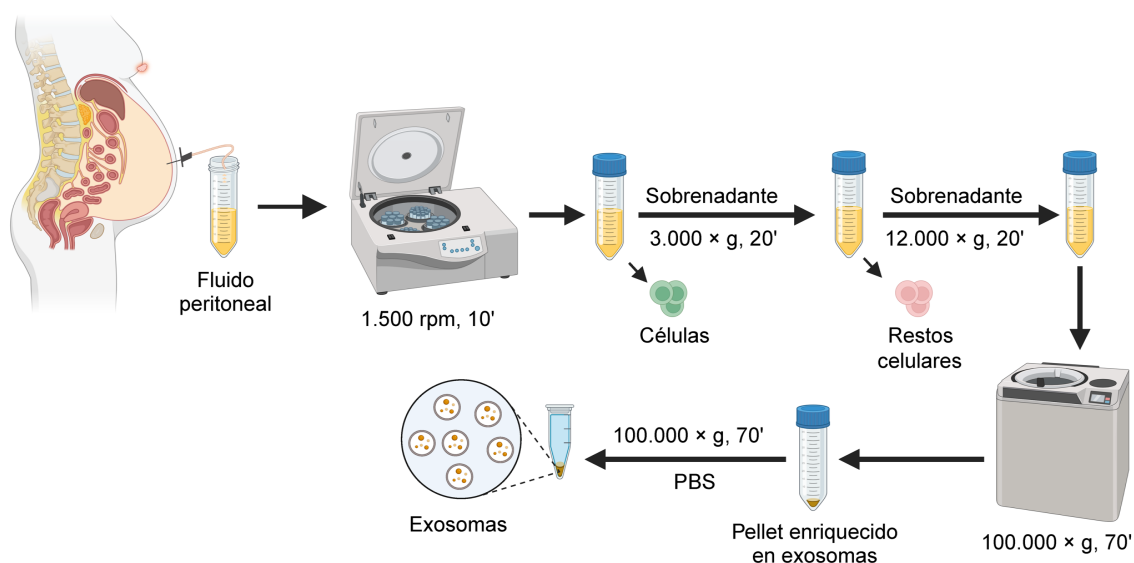


Figura 8. Protocolo de aislamiento de los exosomas de fluidos peritoneales. Creada con BioRender.com

3.4. Caracterización de los exosomas

3.4.1. NanoSight

La distribución del tamaño y el número de las partículas aisladas se midió a partir de una alícuota de 1-2 μl de exosomas diluida en 1 ml de PBS utilizando el sistema de análisis de rastreo de nanopartículas (NTA, del inglés *Nanoparticle Tracking Analysis*). El NTA permite medir la concentración y el tamaño de partículas en suspensión en el rango de 1-1000 nm según el movimiento browniano que éstas realizan en el medio en el que están suspendidas gracias al análisis de una secuencia de vídeo. En nuestro caso, se hizo uso de un equipo NanoSight (*Malvern*). Las partículas de la muestra se visualizan mediante la iluminación con un haz láser. La luz dispersa de las partículas se graba con una cámara y, mediante la ecuación de *Stokes-Einstein*, se calcula el diámetro de cada partícula y la concentración de las partículas de la muestra (partículas/ml [p/ml]).

3.4.2. Microscopía electrónica

La morfología y el tamaño de los exosomas también se analizó mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) en el Servicio interdepartamental de investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Para la tinción negativa, se depositaron 5 μl de las fracciones purificadas de los exosomas resuspendidas en paraformaldehído al 2% a una concentración de 1×10^{11} p/ml cada una sobre una capa de parafilm. Se colocó una rejilla recubierta de formvar/carbono sobre cada gota y se dejó que los exosomas se adsorbieran durante 20 min. A continuación, las rejillas se lavaron sobre 5 gotas de 100 μl de PBS (1 minuto cada lavado), y se fijaron durante 5 minutos al colocarlas sobre una gota de 50 μl de Glutaraldehído al 1% en PBS. Después de esto, las rejillas se lavaron sobre 8 gotas de 100 μl de agua destilada (2 minutos cada lavado) y se contrastaron durante 5 minutos al disponerlas sobre una gota

de 50 µl de Uranil-Oxalato, y se dejaron secar. Por último, las rejillas se colocaron sobre una gota de 50 µl de Metil-Celulosa-Uranil-Acetato durante 10 minutos en hielo y se dejaron secar a temperatura ambiente. La visualización de las rejillas se realizó en un microscopio electrónico de transmisión *JEOL JEM1010* (100 kilovoltios). Las imágenes se grabaron con una cámara digital *Gatan Orius 200 SC*.

3.4.3. Inmunotransferencia

La pureza de los exosomas aislados de los fluidos peritoneales de las pacientes con CO y de las pacientes no oncológicas se comprobó mediante el análisis de los marcadores proteicos exosomales, ALIX, TSG101 y CD9, y de los marcadores de contaminación, APOB y Albúmina, (Tabla 2), mediante la técnica de Western Blot (WB). Lo primero que se realizó fue determinar la concentración proteica mediante el análisis BCA (apartado 3.3). Posteriormente, se prepararon e incubaron alícuotas de 10 µg de proteínas totales en tampón Laemmli a 96°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y los extractos proteicos se resolvieron mediante SDS-PAGE. Dichos extractos proteicos se corrieron en un gel de gradiente de poliacrilamida-SDS del 4-20 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. A continuación, la unión no específica del anticuerpo se incubó con una solución de bloqueo (leche desnatada en polvo disuelta en PBS Tween-20 al 5%) durante 1 hora.

Seguidamente, se procedió a la incubación de las membranas con los anticuerpos primarios (Tabla 2) disueltos en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos se eligieron de acuerdo con las directrices del estudio *Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles (MISEV2023)* (45). Al día siguiente, se procedió al lavado de las membranas en tres pasos de 10 minutos con PBS-Tween-20 para proceder a la incubación con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo a una dilución 1:2000. Se utilizó el sustrato *Clarity ECL Western Blotting Substrate* (Biorad, Hercules,

CA, EE.UU.) para visualizar las bandas y se reveló en el sistema de imágenes *ChemiDoc* (*Biorad*, Hercules, CA, EE.UU.). La intensidad de las bandas inmunorreactivas se cuantificó mediante densitometría utilizando *ImageJ* (*National Institutes of Health*).

Para la validación biológica de los resultados proteómicos en la cohorte de validación, se emplearon anticuerpos específicos dirigidos contra las proteínas de interés, la proteína syntaxina 5, del inglés *Syntaxin 5* (STX5) y la proteína S100A4, del inglés *S100 calcium binding protein A4* (S100A4) (Tabla 2).

ANTICUERPO	ESPECIE	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	DILUCIÓN
Anti-ALIX	Ratón	Abcam	ab88743	1:500
Anti-TSG101	Conejo	Abcam	ab125011	1:500
Anti-CD9	Ratón	Abcam	ab58989	1:500
Anti-ALBÚMINA	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-271605	1:1000
Anti-APOB	Conejo	Abcam	ab139401	1:1000
Anti-S100A4	Ratón	Abcam	ab93283	1:500
Anti-STX5	Ratón	Sigma-Aldrich	HPA001358	1:500
Anti-Ratón	-	Thermo Fisher	A21146	1:2000
Anti-Conejo	-	Thermo Fisher	A301-591A	1:2000

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios.

3.5. Análisis proteómico

El análisis del contenido proteico de los exosomas aislados de los fluidos peritoneales de las pacientes con CO y controles se llevó a cabo mediante la técnica de espectrometría de masas (MS, del inglés *Mass Spectrometry*) a través del Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC).

La MS es una técnica analítica que se basa en la obtención de iones en fase gaseosa provenientes de compuestos orgánicos o inorgánicos y que permite obtener información de su masa-carga (m/z) a partir de los espectros resultantes.

Es una técnica ampliamente utilizada en el análisis a gran escala de péptidos y proteínas presentes en muestras. Uno de los métodos más comunes es la cromatografía líquida acoplada a MS en tándem (LC-MS/MS, del inglés *Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry*), que combina la separación física mediante cromatografía líquida con el análisis a través de MS. El equipo consta de varios módulos (170): el primero es un sistema de introducción y separación de la muestra que se realiza mediante la cromatografía líquida. Luego, le sigue una fuente de ionización, que es un mecanismo mediante el cual los componentes de la muestra se convierten en iones. Después, hay un analizador de masas donde los iones se separan en función de su relación m/z y, finalmente, se encuentra el detector en el que los iones analizados se transforman en una señal interpretada para identificar los péptidos y proteínas presentes en la muestra.

3.5.1. Análisis de cuantificación relativa mediante marcaje químico isobárico *TMT18-plex* de las muestras de aislados exosomales

Para el análisis proteómico se utilizó un sistema de nano cromatografía líquida *Ultimate 3000 nano HPLC* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas *Orbitrap Exploris 240* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Una vez aisladas las EVs, se concentraron en columnas Nanosep (Omega, 10 kilodaltons) usando un volumen inicial superior a 50 μ l. A continuación, se lisaron con SDS al 4%, seguido de la reducción y alquilación de cisteínas utilizando Tris(2-carboxietil)fosfina y metil metanosulfonato, como reactivo reductor y alquilante, respectivamente. Posteriormente, se realizó una digestión trípica en las columnas comerciales *S-Trap* de Protifi y se cuantificaron los péptidos finalmente obtenidos (*QuBit*). Por último, se realizó un marcaje isobárico con 20 microgramos (μ g) de mezcla peptídica por condición. En esta estrategia, cada muestra se etiqueta con una versión isotópica diferente del reactivo y se combina en una sola muestra (*TMT18-plex*) para el análisis por espectrometría de masas.

Los péptidos trípticos generados se separan por cromatografía líquida, se desolvatan y se ionizan antes de incorporarse en el espectrómetro de masas de alta resolución *Exploris 240* (con analizador Orbitrap), donde se detectan primero como iones m/z en el intervalo 375-1200 m/z , y luego se toman los 20 más intensos de los que se obtienen espectros de fragmentación MS/MS para su identificación. Para ello, se aplica un gradiente de gran longitud (120 minutos) en una columna C18 de 75 μm de ID y 50 centímetros de longitud. Las distintas versiones isotópicas del reactivo son químicamente idénticas, de modo que el mismo péptido marcado isotópicamente generará el mismo ion precursor en el espectro MS1, diferenciándose únicamente en los valores m/z de los iones control característicos de cada una de ellas. La relación entre las intensidades de estos iones de control en los espectros de fragmentación proporciona información cuantitativa a nivel de péptido, que a su vez está relacionada con los niveles de expresión diferencial a nivel de proteína entre las muestras.

3.5.2. Análisis LC-MS/MS y extracción de datos

Los péptidos se identificaron por comparación de sus correspondientes espectros de masas con aquellos resultantes de la digestión teórica de las proteínas contenidas en la base de datos, con lo que se obtiene una puntuación de correlación o similitud entre ambos (*score*) que permite la identificación a nivel de péptido. El sistema asignó dichos péptidos a proteínas, pero la identificación es a nivel de péptido.

Las proteínas se identificaron en los archivos sin procesar utilizando el algoritmo *SEQUEST HT* integrado en *Proteome Discoverer 2.5* (*Thermo Finnigan, Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EE.UU.) (171). Los resultados obtenidos gracias a la MS/MS se cotejaron con la base de datos del proteoma humano *UniProtKB* (2022_06 Release) concatenada con la base de datos de “señuelos invertidos” obtenida del programa *DecoyPYrat* (*James Christopher Wright, Wellcome Trust Sanger Institute*).

Los parámetros seleccionados para la búsqueda en la base de datos fueron los siguientes: digestión con tripsina con dos escisiones perdidas máximas permitidas, tolerancia de masa del precursor de 2 Dalton y una tolerancia de masa del fragmento de 0,02 Dalton (172). Las modificaciones N-terminal y de lisina *TMT18-plex*, y la carbamidometilación de cisteína se eligieron como modificaciones fijas, mientras que la acetilación N-terminal, la oxidación de metionina y Gln->pyro-Glu (N-term Q) se eligieron como modificación variable. La tasa de falsos descubrimientos (FDR, del inglés *False Discovery Rate*) se calculó utilizando el método refinado (173) a partir de los resultados obtenidos mediante la búsqueda en bases de datos. La información cuantitativa se extrajo de la intensidad de los iones control del *TMT18-plex* en los espectros MS/MS.

En el proceso de identificación de proteínas, se utiliza un grupo de proteínas redundantes que identifican un péptido. Se selecciona la proteína más probable teniendo en cuenta el número total de “correspondencias de secuencias de péptidos” y el número total de péptidos asignados a esa proteína. En caso de empate, se elige la proteína en orden alfanumérico. De esta manera, se obtiene un número total de proteínas que pasarían al proceso de cuantificación después de cumplir con el filtro de $FDR < 1\%$.

3.6. Análisis bioinformático

Para el análisis comparativo de los cambios en la abundancia de estas proteínas, se utilizó el modelo estadístico *Weighted Spectrum, Peptide, and Protein* (174) en el paquete de software *SanXoT* (175). El modelo proporciona una descripción detallada del comportamiento de la varianza técnica, y al analizarla de forma independiente a nivel de espectro, péptido y proteína, el modelo es capaz de capturar por separado las fuentes de error específicas del método de MS. Además, este modelo proporciona una variable estandarizada (valores z), definido como el logaritmo en base 2 de la proporción entre dos valores, que ha sido ajustada en relación a la media, lo que proporciona una medida de cuántas veces un valor es mayor o menor que otro en una escala logarítmica.

3.7. Sistemas biológicos

Para realizar el análisis biológico de las rutas de enriquecimiento asociadas a las proteínas identificadas en nuestro estudio se utilizó la herramienta *Enrichr* (176). Para este análisis se incluyeron aquellas proteínas diferencialmente contenidas (PDCs) con un p-valor < 0,05 para cada comparación de interés, incluyendo las categorías funcionales *Hallmarks*, *Reactome* y diversas categorías de *Gene Ontology* (GO) (*Biological Process* y *Cellular Component*).

3.8. Análisis estadístico

Se utilizó *GraphPad Prism* (versión 8.1.1, San Diego, CA, EE.UU.) para realizar todos los análisis estadísticos. Dichos análisis, incluida la evaluación de todas las partículas y la concentración de los Exo-DFP, el análisis cuantitativo del contenido proteico por partícula por 10^9 en Exo-DFP, la medición de los ratios normalizados (PAX8/CD9, STX5/CD9 y S100A4/CD9) mediante inmunotransferencia en muestras control y en pacientes con CO, y las comparaciones de la carga proteómica entre controles y casos, se realizaron mediante la prueba no paramétrica de *Mann-Whitney*. Para las comparaciones múltiples, los p-valores se ajustaron mediante el método de *Benjamini-Hochberg*. Para los análisis que implicaban a más de dos grupos, se empleó la prueba de *Kruskal-Wallis*, seguida de la comparación múltiple *post hoc* de *Dunn* con ajuste del p-valor de *Bonferroni*. Los resultados se muestran utilizando la mediana y el rango intercuartílico. Los análisis de la concentración de los Exo-DFP y del contenido proteico por partícula por 10^9 en los Exo-DFP entre las muestras pareadas se realizaron mediante la prueba paramétrica *t-test* pareada. Para los análisis de supervivencia se utilizaron el estimador de *Kaplan-Meier* y el método de *Cox*. Las diferentes curvas de supervivencia se compararon mediante la prueba de rangos logarítmicos. Además, se utilizó el paquete *LIMMA* para determinar las PDCs en las variables clínicas de interés del CO y de los controles. Para la significación estadística, se consideraron p-valores < 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Características clínicas y moleculares de la población a estudio

Para este estudio se incluyeron un total de 94 pacientes (65 pacientes con CO y 29 pacientes sin enfermedad oncológica) de las cuales se recogieron muestras de fluidos peritoneales (líquidos ascíticos o lavados abdominales), desde junio de 2018 hasta septiembre de 2022, en cualquiera de los cuatro centros de Madrid del grupo HM.

Las pacientes con CO incluidas en el estudio se dividieron en 2 cohortes: una primera, formada por 40 pacientes de las que se obtuvieron un total de 45 muestras (n=5 con muestras seriadas de distintas cirugías), que constituye la "cohorte *discovery*", y una segunda cohorte, conocida como "cohorte de validación", conformada por 26 pacientes, una de ellas incluida también en la anterior cohorte, de las que se obtuvieron un total de 29 muestras (n=4 con muestras seriadas de distintas cirugías) (Figura 9).

Además, se recopiló la información clínico-patológica más relevante de las pacientes con CO (de ahora en adelante citadas en el texto como casos con CO). Nuestro estudio abarcó principalmente CO de histología serosa de alto grado (SAG) (54 casos [83%]), seguida de la endometrioides (6, [9,2%]), y en menor medida, de células claras (2, [3,1%]), serosa de bajo grado (2, [3,1%]) y mucinosa (1, [1.5%]) (Tabla 3 y Figura 9). Los E. patológicos reportados en el momento de la cirugía se distribuyeron de la siguiente manera: E: I-II en 7 casos [10,8%], E. III en 38 casos [58,4%] y E. IV en 20 casos [30,8%]. También se obtuvo información sobre la sensibilidad a los tratamientos con platino. Como parte de la práctica asistencial, se recopiló información relacionada con las alteraciones genómicas del tumor mediante las técnicas de Secuenciación de Nueva Generación: *FoundationOne*[®]*CDx*, *IdBRCA*[®] y/o *SOPHiA GENETICS test*. Estos estudios genéticos revelaron mutaciones en *BRCA1/2* en 16 de los 54 casos con CO (30%) de los cuales se obtuvo información molecular. De estos, 7 mostraron mutación germinal (43.8%), 6 presentaron mutación somática (37.5%), y el origen de la mutación no pudo ser confirmado en 3 casos.

COHORTE "DISCOVERY"	CASO #14 *	CASO #39 *	CASO #1	CASO #35 *	CASO #30 *	CASO #41 *	CASO #31 *	CASO #12.1 *	CASO #12.2	CASO #10.1 *	CASO #10.2	CASO #7.1 *	CASO #7.2 *	CASO #23.1 *	CASO #23.2	CASO #22.1 *	CASO #22.2	CASO #34 *	CASO #4 *	CASO #45 *	CASO #27 *	CASO #18	CASO #19	
ESTADIO FIGO	I	I	I	I	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III
HISTOLOGÍA	C	E	E	M	C	E	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CIRUGÍA	P	P	P	P	P	P	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	P	P	P	P	I	I
ESTADO DE TUMOR RESIDUAL								N/A		N/A		N/A		N/A		N/A		N/A						
ESTADO MUTACIONAL DE BRCA					N/A														N/A					
PLATINO-SENSIBILIDAD		N/A			N/A													N/A	N/A	N/A				

COHORTE "DISCOVERY"	CASO #11 *	CASO #13 *	CASO #6 *	CASO #29	CASO #5 *	CASO #16	CASO #21 *	CASO #52 **	CASO #38 *	CASO #9 *	CASO #37 **	CASO #24 **	CASO #42	CASO #26 *	CASO #40 **	CASO #17	CASO #8 *	CASO #32 *	CASO #2 *	CASO #3 *	CASO #49	CASO #50 *	
ESTADIO FIGO	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV
HISTOLOGÍA	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
CIRUGÍA	I	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	P	P	P	I	I	I	I	I	R	R	R	R
ESTADO DE TUMOR RESIDUAL																							
ESTADO MUTACIONAL DE BRCA												N/A	N/A										
PLATINO-SENSIBILIDAD	N/A											N/A	N/A										

COHORTE DE VALIDACIÓN	CASO #63	CASO #47	CASO #65	CASO #44	CASO #59.1 **	CASO #59.2 **	CASO #55 **	CASO #56 **	CASO #57 **	CASO #46	CASO #51 **	CASO #54 **	CASO #48 **	CASO #43 **	CASO #15	CASO #20 **	CASO #33 **	CASO #23.3	CASO #58.1 **	CASO #58.2 **	CASO #62.1 **	CASO #62.2 **	CASO #60	CASO #36	CASO #25 **	CASO #28	CASO #61	CASO #53 **	CASO #64 **		
ESTADIO FIGO	I	I	I	II	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	
HISTOLOGÍA	E	E	E	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
CIRUGÍA	P	P	P	P	D	I	P	P	P	P	P	P	P	P	I	I	I	I	R	D	I	D	I	D	P	P	P	I	I	R	R
ESTADO DE TUMOR RESIDUAL					N/A														N/A	N/A			N/A								
ESTADO MUTACIONAL DE BRCA	N/A						N/A	N/A						N/A							N/A		N/A	N/A	N/A						
PLATINO-SENSIBILIDAD	N/A						N/A	N/A						N/A									N/A	N/A	N/A						

ESTADIO FIGO	I-II	III-IV	
HISTOLOGÍA	SEROSO	NO-SEROSO	
CIRUGÍA	PRIMARIA-DIAGNÓSTICA	INTERVALO	RECAÍDA
ESTADO DE TUMOR RESIDUAL	R0	R1	
ESTADU MUTACIONAL BRCA	SI	NO	
PLATINO-SENSIBILIDAD	SENSIBLE	RESISTENTE	

Figura 9. Descripción gráfica de la Información clínico-patológica de la cohorte de casos con CO. La información adicional que se detalla en las tablas corresponde a la histología del tumor (A, carcinomas serosos de alto grado; B, carcinomas serosos de bajo grado; C, carcinomas de células claras; M, carcinomas mucinosos; E, carcinomas endometrioides) y al momento quirúrgico del cual se obtuvo la muestra (D, cirugía diagnóstica; P, cirugía primaria; I, cirugía de intervalo; R, cirugía de recaída). N/A, no aplica, se añadió en aquellas casillas en las cuales no se pudo obtener la información correspondiente a dicha variable en ese paciente. Los casos marcados con * corresponden a aquellos utilizados en la proteómica mientras que los que se marcan con ** se utilizaron para los experimentos de validación.

Asimismo, durante el período de enero a mayo de 2021, se recogieron muestras de lavado abdominal de una cohorte de 29 pacientes sin enfermedad oncológica. Estas muestras, recopiladas durante la cirugía no oncológica (de ahora en adelante citada en el texto como controles), dieron lugar a la cohorte control (Figura 10).

Además de esto, se recopilaron datos sobre la patología que motivó la decisión de realizar dicha cirugía en las pacientes control (Tabla 3). Los diagnósticos patológicos de la cohorte control incluían: cistoadenomas ováricos serosos (n=7, [24,1%]), cistoadenomas ováricos mucinosos (n=3, [10,35%]), miomas uterinos (n=7, [24,1%]), teratomas quísticos ováricos (n=2, [6,9%]), endometriosis (n=4, [13,8%]), tejido normal (cirugías profilácticas debido a mutaciones germinales en los *loci BRCA*) (n=2, [6,9%]), prolapso uterino (n=3, [10,35%]) e hiperplasia endometrial (n=1, [3,5%]).

CONTROLES	CTRL #1	CTRL #16 *	CTRL #17 *	CTRL #21	CTRL #23 *	CTRL #24 *	CTRL #29 *	CTRL #8 *	CTRL #10	CTRL #25 *	CTRL #4	CTRL #5 *	CTRL #6 *	CTRL #7	CTRL #11	CTRL #13 "	CTRL #18 "	CTRL #3 "	CTRL #26	CTRL #9	CTRL #14 "	CTRL #19	CTRL #27	CTRL #2	CTRL #15 "	CTRL #12	CTRL #20	CTRL #28	CTRL #22 *	

DIAGNÓSTICO	Cistoadenoma seroso de ovario	Mioma uterino	Endometriosis	Prolapso uterino
	Cistoadenoma mucinoso de ovario	Teratoma quístico de ovario	Cirugía profiláctica	Endometrio atrófico

Figura 10. Descripción gráfica de la información del diagnóstico patológico que motivó la cirugía de las pacientes control. Los controles marcados con * corresponden a aquellos utilizados en la proteómica mientras que los que se marcan con " se utilizaron para los experimentos de validación.

Parámetro		Casos con CO (n=65)	Controles (n=29)
Edad	Media; rango	61; 26-83	43; 25-79
Estadio FIGO	I-II	7	
	III	38	NA
	IV	20	
Histología (Casos)	SAG	54	
	Endometriode	6	
	SBG	2	NA
	Células claras	2	
	Mucinoso	1	
Diagnóstico (Controles)	Cistoadenoma ovárico seroso		7
	Cistoadenoma ovárico mucinoso		3
	Mioma uterino		7
	Teratoma quístico ovárico		2
	Endometriosis		4
	Tejido normal		2
	Prolapso uterino		3
	Hiperplasia endometrial		1
Cirugía	Principal	35	
	Intervalo	25	NA
	Recaída	14	
Resultado quirúrgico	R0	54	
	R1	10	NA
	NA	10	
Estados mutacionales de <i>BRCA1/2</i>	Mutado	16	Mutado (2); NA (27)
	No mutado	38	
	NA	11	
Sensibilidad al platino	Sensible	43	
	Resistente	16	NA
	NA	15	

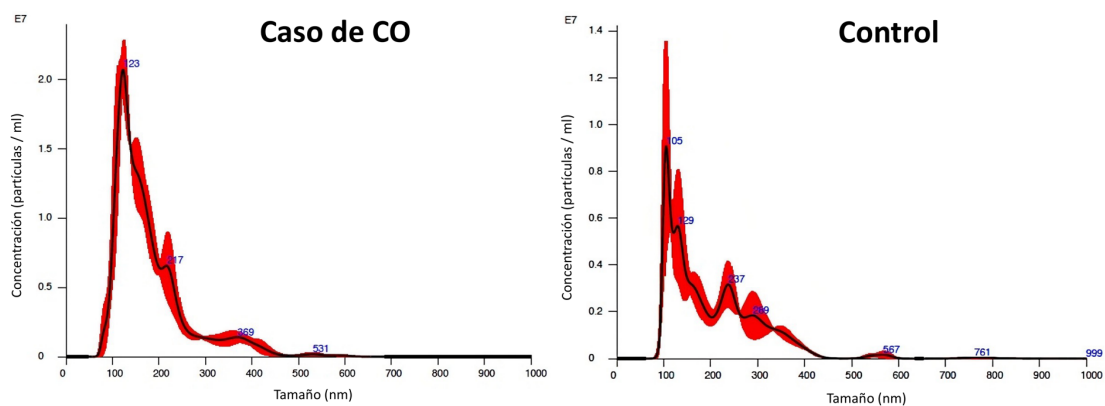
Tabla 3. Información clínico-patológica y molecular de los casos con CO y controles.

4.2. Caracterización y análisis de los exosomas aislados de los fluidos peritoneales en casos y controles

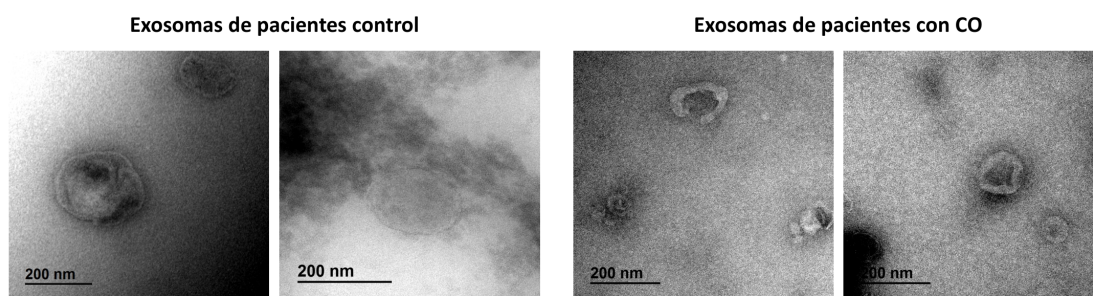
Una vez realizado el aislamiento de los exosomas por ultracentrifugación, se llevó a cabo la caracterización de su naturaleza en todas las muestras de los casos con CO (n=74 muestras de 65 casos) y los controles (n=29) mediante el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) (Figura 11A y anexo 2).

El análisis del tamaño de las vesículas mediante NTA demostró una recogida eficiente y homogénea de partículas en el rango de tamaños de los exosomas, con un tamaño medio del pico primario similar para ambos conjuntos de muestras (casos: 132,5 nm *versus* [vs.] controles: 139,8 nm) (Figura 11B). En concordancia, el análisis mediante MET mostró la presencia de estas vesículas en el rango de tamaño de los exosomas tanto en las muestras de los casos con CO como en las de los controles, lo que confirma un enriquecimiento de exosomas en el pellet extraído del fluido peritoneal (Figura 11C). El perfil NTA mostró además que no había diferencias significativas entre el número de partículas derivadas del fluido peritoneal obtenidas de los casos en comparación con los controles (Figura 11D). Sin embargo, se observó un aumento significativo en la concentración de partículas en los casos con CO cuando el rango de tamaño se restringió al asociado a los exosomas (Exo-DFP) (mediana de tamaño en los casos, $2,81 \times 10^{11}$ vs. controles, $1,41 \times 10^{11}$ p/ml, $p=0,0014$) (Figura 11E).

11A



11B



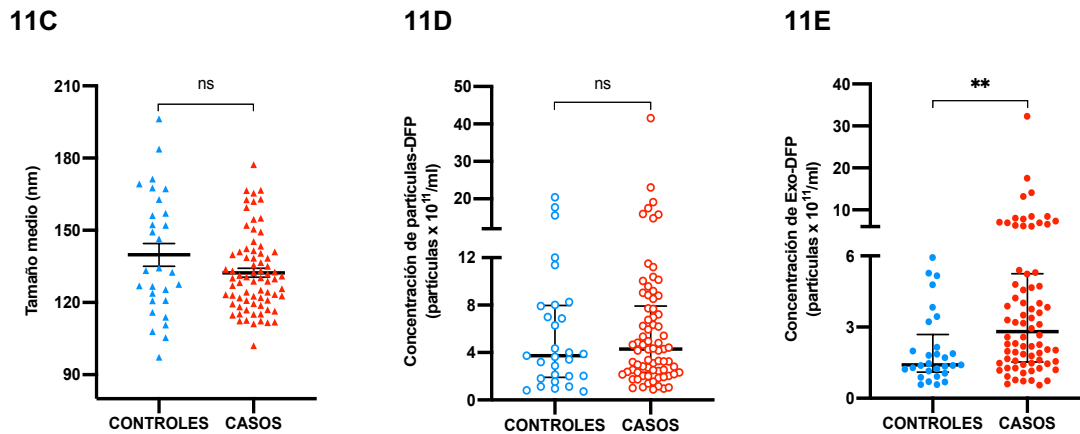


Figura 11. Caracterización de las partículas y los Exo-DFP en controles y casos con CO. (A) Imagen representativa de la distribución del tamaño de partículas determinada por NTA en muestras de controles (n=29) y casos con CO (n=74). (B) Morfología de las vesículas extracelulares observada por MET. Escala 200 nm. (C) Gráfica que muestra el tamaño medio de exosomas observado en cada muestra y el tamaño medio del pico primario de partículas en cada grupo de interés medido por NTA. (D) Análisis de la concentración de las partículas en muestras de controles (n=29) y casos con CO (n=74). (E) Análisis de la concentración de los exosomas derivados de los fluidos peritoneales (Exo-DFP) en muestras de controles (n=29) y casos con CO (n=74). Valores de significancia (**, p-valor<0,01, prueba de *Mann-Whitney*). Todos los datos se muestran utilizando la mediana junto con el rango intercuartílico.

4.3. Análisis de los Exo-DFP en función de las distintas variables clínico-patológicas y moleculares

Tras confirmarse que el pellet aislado de las muestras de fluidos peritoneales estaba enriquecido en exosomas, el siguiente objetivo fue evaluar si la cantidad de estos Exo-DFP podría ser un factor determinante en relación a las características clínico-patológicas y/o moleculares recopiladas previamente.

Al realizar la separación de los casos con CO según el E. tumoral se vio que las diferencias entre casos y controles estaban determinadas principalmente por el mayor número de Exo-DFP detectados en los casos que desarrollaron tumores en E. III-IV (mediana de tamaño en los casos con E. III-IV, $2,95 \times 10^{11}$ vs. controles, $1,41 \times 10^{11}$ p/ml, $p=0,0033$) (Figura 12A). Es importante resaltar que el subtipo SAG y el de células claras fueron las únicas histologías que mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles

(mediana de tamaño en los casos con CSAG, $2,67 \times 10^{11}$ vs. controles, $1,41 \times 10^{11}$ p/ml, $p=0,031$). Sin embargo, el limitado tamaño muestral de las patologías no-SAG impidió llegar a conclusiones definitivas en relación al número de Exo-DFP en estos subtipos histológicos (Figura 12B). Por esto, y debido a la clara heterogeneidad en cuanto al subtipo histológico observada en los E. I-II, los análisis posteriores de los datos con respecto al NTA, se llevaron a cabo únicamente teniendo en cuenta las histologías SAG, el subtipo histológico más frecuentemente diagnosticado en la práctica clínica y en nuestro estudio.

En este sentido, el análisis de la concentración de los Exo-DFP según el origen quirúrgico de la muestra mostró que la cantidad exosomal era significativamente mayor en las recidivas. Estas muestras se recolectaron de aquellos casos con un curso clínico prolongado y que fueron sometidas a múltiples líneas de QT, o en los tumores tratados con neoadyuvancia, en comparación con las muestras de aquellos casos que nunca habían sido sometidos a QT (Figura 12C). Cabe destacar que en aquellos casos para los que se disponía de muestras seriadas ($n=8$), la concentración de partículas fue sistemáticamente mayor en la cirugía de intervalo, realizada tras la QT neoadyuvante, en comparación con los procedimientos quirúrgicos sin QT aplicada (Figura 12D).

Al clasificar a los casos con CO según su respuesta a la QT basada en platino, se observó un aumento significativo de los Exo-DFP en los casos quimio-resistentes (definidos como aquellos con un ILP inferior a 6 meses) (mediana de tamaño en los casos platino-resistentes, $3,93 \times 10^{11}$ vs. casos platino-sensibles, $2,19 \times 10^{11}$ p/ml, $p=0,0187$) (Figura 12E). Por otro lado, no se mostraron diferencias significativas cuando se consideraron las mutaciones en *BRCA1/2* o el estado de RHd, que son eventos oncogénicos principales asociados con el desarrollo del CO (Figura 12F).

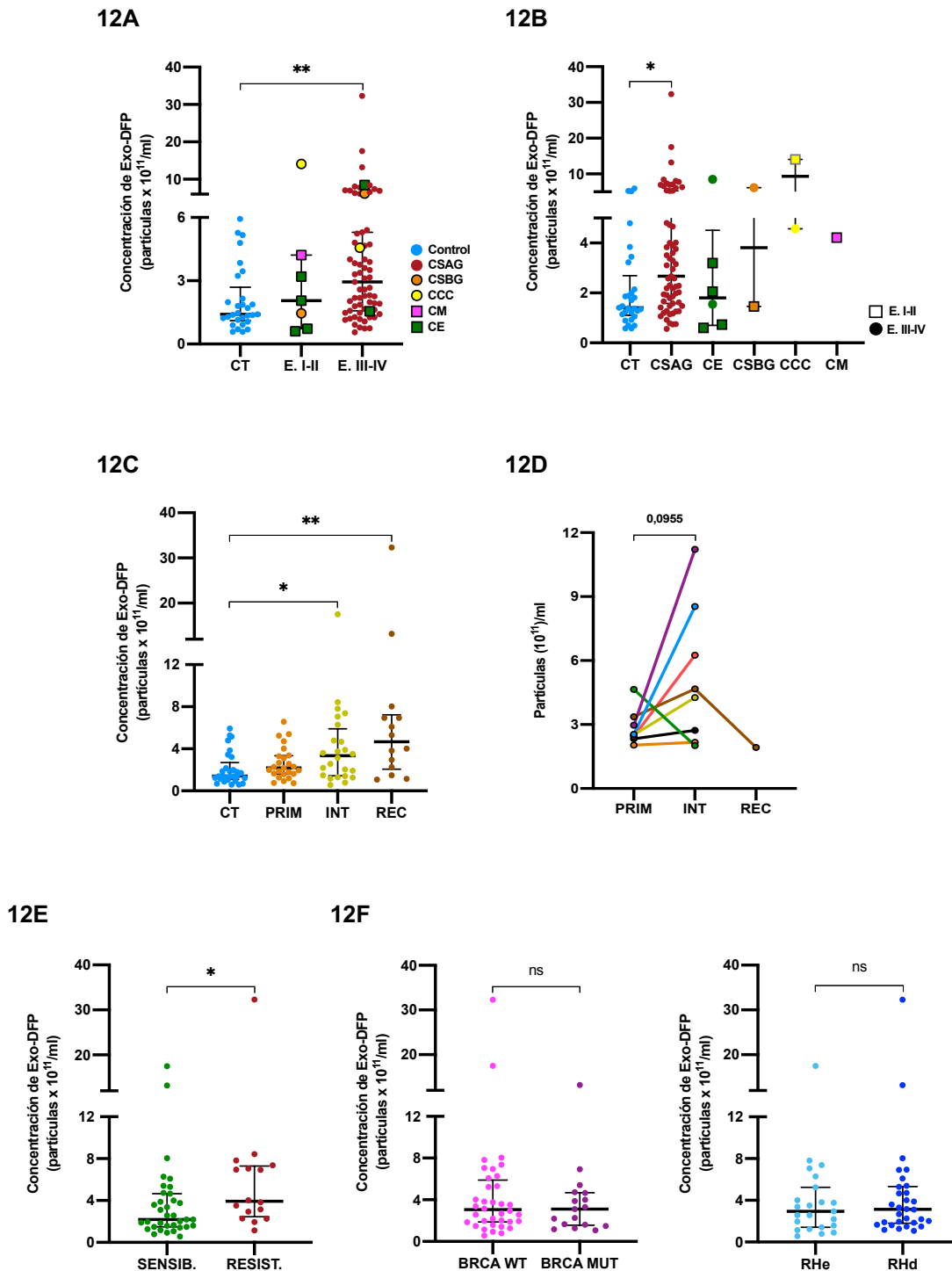


Figura 12. Caracterización de los Exo-DFP en controles y casos con CO en función de la información clínico-patológica y molecular recogida. (A) Concentración de los Exo-DFP en controles (CT, n=29) y casos con CO separados según el E. tumoral (E. I-II [n=7] y E. III-IV [n=67]). Se proporciona información adicional sobre la histología (CSAG, carcinoma seroso de alto grado; CE, carcinoma endometriode; CSBG, carcinoma seroso de bajo grado; CCC, carcinoma de células claras; CM, carcinoma mucinoso). **(B)** Concentración de los Exo-DFP en controles (CT, n=29) y casos con CO según la histología del CO. Las muestras analizadas incluyeron controles (CT, n=29), carcinomas serosos de alto grado (CSAG, n=63), carcinomas endometrioides (CE, n=6), carcinomas serosos de bajo grado (CSBG, n=2), carcinomas de células claras (CCC, n=2) y carcinoma mucinoso (CM, n=1). Se proporciona información adicional sobre el

E. de la enfermedad. **(C)** Concentración de los Exo-DFP en muestras de controles (CT, n=29) y casos con CSAG separados según el origen quirúrgico de la muestra. En el grupo "PRIM" se incluyen las muestras obtenidas de cirugías primarias y diagnósticas (n=25), "INT" incluye las muestras obtenidas de cirugías de intervalo (n=24) y "REC" incluye aquellas muestras obtenidas de cirugías de recaída (n=14). **(D)** Concentración de los Exo-DFP en los diferentes momentos quirúrgicos de los casos con CSAG con muestras seriadas (n=8) (PRIM, primaria/diagnóstica; INT, intervalo; REC, recaída). **(E)** Concentración de los Exo-DFP en muestras de casos con CSAG según la sensibilidad a la terapia con platino (sensib., sensible [n=35]; resist., resistente [n=16]). **(F)** Concentración de los Exo-DFP en muestras de casos con CSAG según el estado mutacional de *BRCA1/2* (WT, tipo salvaje [n=36] o MUT, mutado [n=17]) o el estado del sistema de reparación del ADN por RH (RHe, RH eficiente [n=23] o RHd, RH deficiente [n=30]). Valores de significancia (*, p-valor<0,05; ** y p-valor<0,01, prueba de *Mann-Whitney* [E y F] o prueba de *Kruskal-Wallis* con la prueba de comparaciones múltiples de *Dunn* y p-valores ajustados usando el método de *Bonferroni* [A-C]). Todos los datos se muestran utilizando la mediana junto con el rango intercuartílico.

4.4. Análisis de la carga proteómica de los Exo-DFP en los casos con CO y controles

De forma paralela al NTA, se cuantificó la cantidad total de proteína exosomal mediante BCA en todos los casos y controles y se analizó su correlación con las distintas variables clínicas (Anexo 2). Al igual que ocurrió en el análisis de la cantidad de los Exo-DFP, la cantidad total de proteína exosomal total fue significativamente mayor en los casos con CO frente a los controles (mediana de la cantidad de proteínas por partícula (p/p) en los casos, $1,85 \mu\text{g} \times 10^9$ partículas vs. controles, $1,15 \mu\text{g} \times 10^9$ partículas, $p=0,0086$) (Figura 13A).

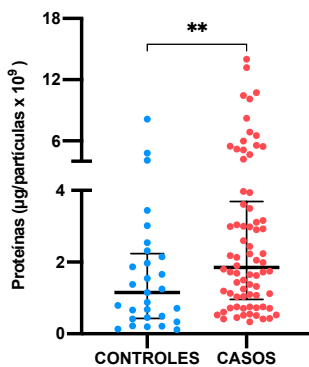
Por otro lado, el análisis cuantitativo de las concentraciones de proteínas en los Exo-DFP también mostró asociaciones significativas con ciertos perfiles clínicos. En este sentido, se observó un aumento de 2 a 3 veces en la concentración de proteínas en los casos diagnosticados en E. tumorales III-IV ($2,1 \mu\text{g}$ por 1×10^9 partículas) en comparación con los controles ($1,15 \mu\text{g}$ por 1×10^9 partículas) y con los tumores detectados en E. tempranos ($0,75 \mu\text{g}$ por 1×10^9 partículas), observando significación estadística en ambas comparaciones (p-valores: <0,01 y <0,05, respectivamente) (Figura 13B).

También se detectaron diferencias significativas en la concentración de proteínas al comparar los casos con CSAG con los controles, pero no para los subtipos histológicos restantes (Figura 13 C). Teniendo en cuenta esto, y que la

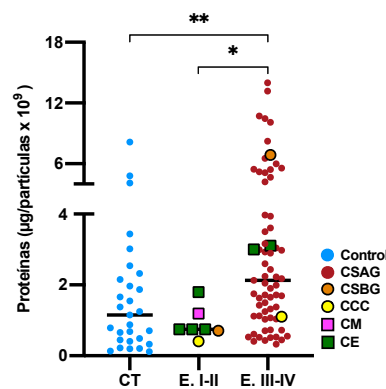
histología SAG es la más frecuentemente diagnosticada en la práctica clínica y en nuestro propio estudio, los análisis subsecuentes se realizaron considerando únicamente a los casos con CSAG, de forma similar a la cuantificación realizada con el NTA.

Llama la atención que cuando se analizó la concentración de proteínas totales de los Exo-DFP en los casos con CSAG en función del origen quirúrgico de la muestra, se observó que aquellas muestras obtenidas de cirugías primarias exhibían un mayor contenido de proteínas que las adquiridas de cirugías de intervalo o recaída (Figura 13D). Esta tendencia también se confirmó cuando se compararon los niveles de proteínas totales entre muestras seriadas de diferentes casos, especialmente entre las muestras diagnósticas y las de cirugía de intervalo (realizadas después de la QT neoadyuvante) (p-valor<0,01) (Figura 13E). Por otro lado, cuando se analizó la cantidad de proteínas en función de la sensibilidad al platino (Figura 13F) o según el perfil molecular del CO de los casos (estado mutacional de *BRCA1/2* y estado RH) no se observaron diferencias significativas (Figura 13G).

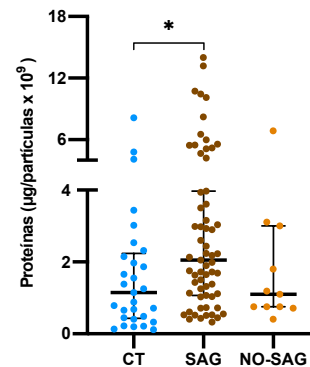
13A



13B



13C



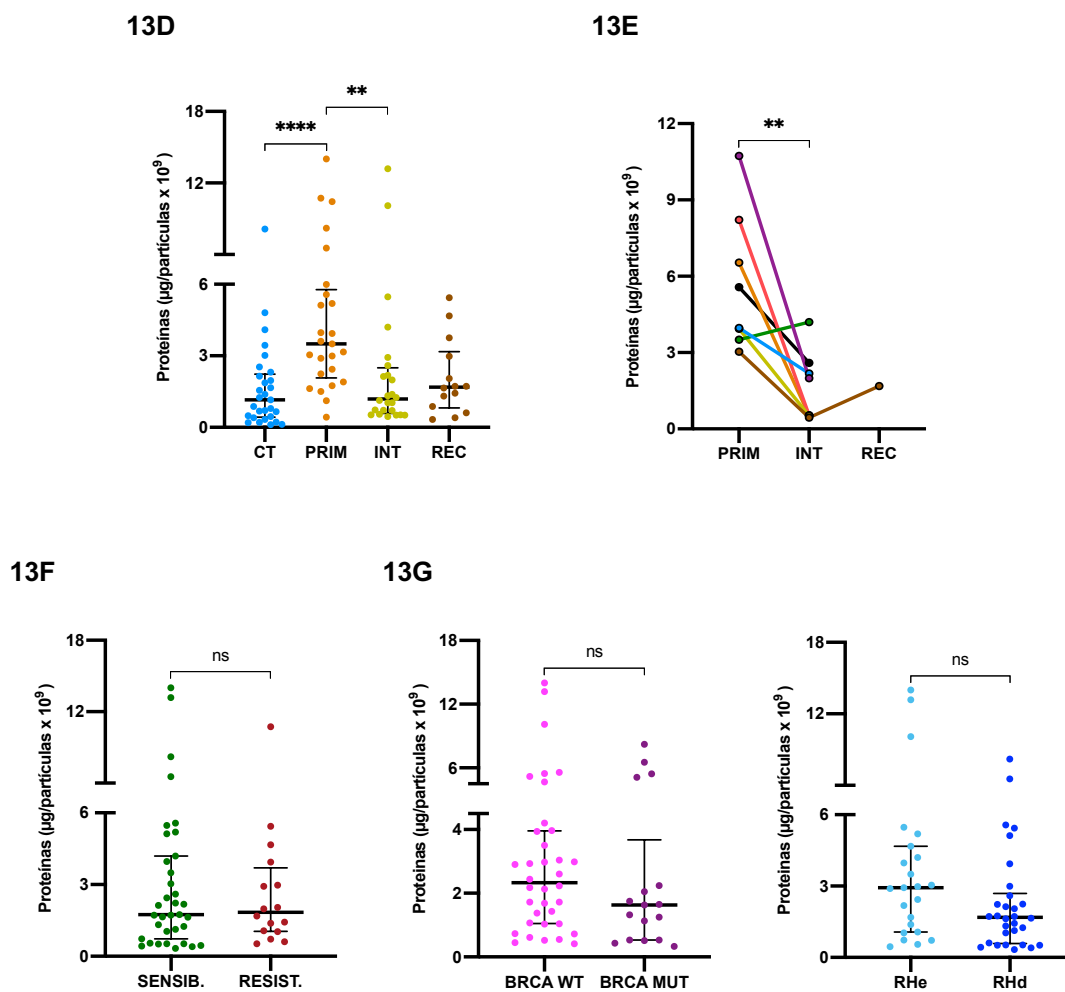


Figura 13. Análisis cuantitativo del contenido proteico exosomal por partícula en los Exo-DFP. (A) Proporción de p/p en controles y casos con CO. **(B)** Proporción de p/p en controles (n=29) y casos con CO separadas según el E. tumoral (E. I-II [n=7] y E. III-IV [n=67]). Se proporciona información adicional sobre la histología (CSAG, carcinoma seroso de alto grado; CE, carcinoma endometriode; CSBG, carcinoma seroso de bajo grado [n=2]; CCC, carcinoma de células claras; CM, carcinoma mucinoso). **(C)** Proporción de p/p en muestras de controles (n=29) y casos con CO separadas en función de la histología SAG (n=63) o no-SAG (n=11), compuesta por los subtipos endometriode (n=6), seroso de bajo grado (n=2), de células claras (n=2) y mucinoso (n=1). **(D)** Proporción de p/p en muestras de controles y casos con CSAG separadas según el origen quirúrgico de la muestra, en el grupo “PRIM” se incluyen tanto las muestras obtenidas de cirugías primarias como aquellas obtenidas de cirugías diagnósticas (n=25), “INT” hace referencia al conjunto de muestras obtenidas de cirugías de intervalo (n=24) y “REC” hace referencia al conjunto de muestras obtenidas de cirugías de recaída (n=14). **(E)** Evolución de los niveles de proteínas normalizadas en relación con la concentración de los Exo-DFP en diferentes muestras seriadas de casos con CSAG (n=8) (PRIM, primaria/diagnóstica; INT, intervalo; REC, recaída) (Prueba *t-student* pareada, **, p-valor<0,01). **(F)** Proporción de p/p en muestras de casos con CSAG según la sensibilidad a la terapia con platino (sensib., sensible [n=35]; resist., resistente [n=16]). **(G)** Proporción de p/p en muestras de casos con CSAG según el estado mutacional de *BRCA1/2* (WT, tipo salvaje [n=36] o MUT, mutado [n=17]) o el estado del sistema de reparación del ADN por RH (RHe, RH eficiente [n=23] o RHd, RH deficiente [n=30]). Valores de significancia (*, p-valor<0,05; **, p-valor<0,01, y ****, p-valor<0,0001, prueba de *Mann-Whitney* [A, F y G] o prueba de *Kruskal-Wallis* con la prueba de comparaciones múltiples de *Dunn* y p-valores ajustados usando el método de *Bonferroni* [B, C y D] o la prueba *t-test* pareada [E]). Todos los datos se muestran utilizando la mediana junto con el rango intercuartílico.

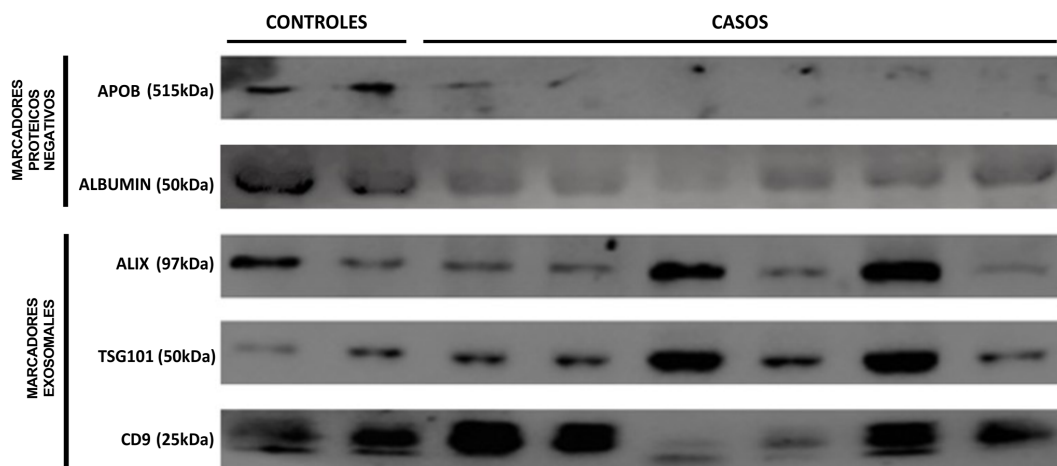
De acuerdo con las guías MISEV (45), la pureza de los Exo-DFP aislados mediante ultracentrifugación se confirmó mediante el análisis de los marcadores exosomales, ALIX, TSG101, CD9, y marcadores de contaminación, APOB y Albúmina, en un subconjunto representativo de muestras de Exo-DFP obtenidas de casos con CO o controles (Figura 14A y anexo 3). Además, los perfiles de inmunotransferencia de los diferentes sobrenadantes o fracciones recogidos durante la extracción realizada por ultracentrifugación mostraron una expresión sólida de marcadores asociados con la biogénesis de exosomas (ALIX) o su dinámica y morfología de membrana (tetraspanina CD9) exclusivamente en el pellet de los Exo-DFP (Figura 14B). Por el contrario, los sobrenadantes obtenidos en pasos previos al aislamiento de los Exo-DFP (fluido peritoneal total o sobrenadante) mostraron una ausencia absoluta de expresión para estos marcadores (Figura 14B), indicando una extracción selectiva y un enriquecimiento en exosomas.

Para determinar si la fracción de los Exo-DFP aislada de los casos oncológicos contenía vesículas secretadas específicamente por el tumor ovárico, se evaluó mediante inmunotransferencia la expresión de la proteína codificada por el gen *PAX8*, del inglés *Paired box 8* (PAX8), en un subconjunto de casos y controles. Aunque PAX8 es conocido principalmente por codificar un FT esencial en la fisiología de las células foliculares tiroideas, su sobreexpresión ha sido ampliamente descrita en el contexto del CO representando un marcador diagnóstico fiable y ampliamente utilizado para patologías ginecológicas derivadas de las células epiteliales secretoras de las trompas de Falopio (177).

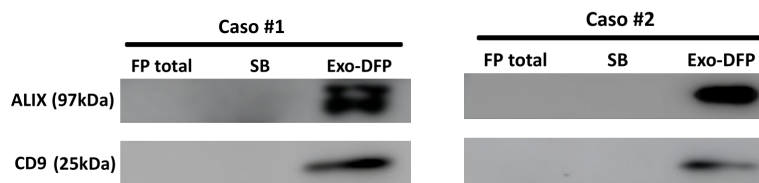
El análisis de la expresión de PAX8 mediante WB demostró positividad en todas las fracciones de los Exo-DFP recolectadas a partir de casos con CO (n=13) en comparación con solo uno de los 7 controles evaluados (ratio normalizado PAX8/CD9, p-valor<0,0001) (Figura 14, C y D). Además, estos hallazgos confirman que las vesículas purificadas a partir de lavados peritoneales de los casos con CO son secretadas, en gran medida, por el tumor ovárico. Esto nos garantizaba la idoneidad de realizar una caracterización mediante MS del

contenido vesicular, cuyo principal objeto sería identificar potenciales biomarcadores predictivos y pronósticos en CO e, identificar vías específicas moduladas por los Exo-DFP, pudiendo clasificar mejor los CSAG en función de sus patrones proteómicos de Exo-DFP.

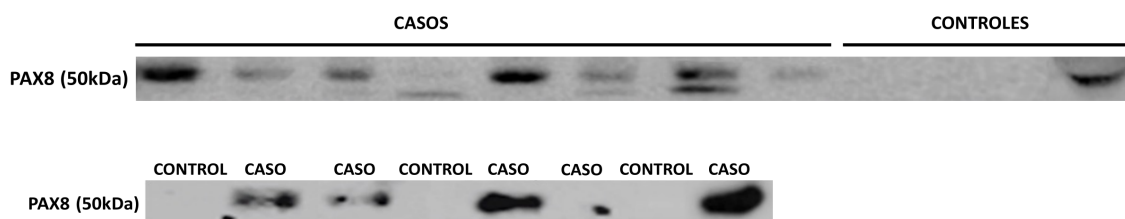
14A



14B



14C



14D

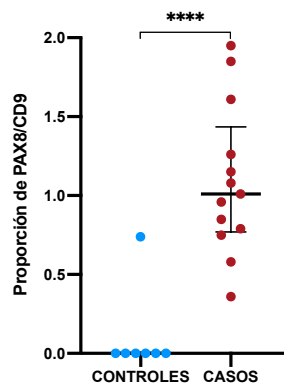


Figura 14. Caracterización del contenido proteico de los Exo-DFP mediante inmunotransferencia en muestras de casos con CO y controles. (A) Imagen representativa del análisis por inmunotransferencias de la expresión de los marcadores exosomales (ALIX, TSG101 y CD9) y marcadores de contaminación (APOB y Albúmina) en un panel de muestras de Exo-DFP de casos con CO (n=6) y controles (n=2). **(B)** Análisis mediante inmunotransferencia de los marcadores exosomales ALIX y CD9 en muestras de casos con CO (n=2) en diferentes etapas del proceso de aislamiento de los exosomas. Se recogió el fluido peritoneal total (FP total) antes de comenzar el proceso de aislamiento, muestra del sobrenadante (SB) inmediatamente después del primer paso de ultracentrifugación y muestra del pellet obtenido tras la ultracentrifugación (Exo-DFP). **(C)** Imágenes representativas de geles de WB que evalúan la expresión de PAX8 en un panel de muestras de Exo-DFP de casos con CO (n=13) y controles (n=7). **(D)** Cuantificación de la proporción de PAX8/CD9 obtenidas mediante inmunotransferencia en casos con CO (n=13) vs. controles (n=7). Las bandas de inmunotransferencia correspondientes a los factores mencionados anteriormente se cuantificaron utilizando el software *Image J*. Valores de significancia (****, p-valor<0,0001, prueba de *Mann-Whitney*). Todos los datos se muestran utilizando la mediana junto con el rango intercuartílico.

4.5. Análisis proteómico del contenido de los Exo-DFP en casos y controles

Para realizar el análisis proteómico del contenido exosomal se procedió a seleccionar una serie de casos de la cohorte “*discovery*” y controles teniendo en cuenta la cantidad mínima de proteína total requerida para la caracterización proteómica ($\geq 20 \mu\text{g}$). Finalmente, el análisis de la carga proteica de los Exo-DFP mediante LC-MS/MS se llevó a cabo en 29 casos y 10 controles, manteniendo tamaño muestral lo suficientemente grande como para establecer ciertas comparaciones de interés (casos con CO vs. controles; casos con CSAG vs. controles; platino-sensibles vs. platino-resistentes; citorreducción primaria [cirugía inicial] vs. cirugía de intervalo [después de la neoadyuvancia] o citorreducción de recaída [cirugía de salvamento en caso de recaída] y casos

con mutación en *BRCA* (*BRCA* mut.) vs. casos sin ninguna alteración [*BRCA* wt, del inglés *Wild Type*]).

La caracterización proteómica de la carga proteica de los Exo-DFP mediante LC-MS/MS nos permitió identificar 20899 péptidos (FDR <1%, calculado a nivel de péptido) correspondientes a 1825 proteínas (Anexo 4). La lista de las proteínas identificadas en estas dos cohortes, “*discovery*” y control, se comparó con una lista de referencia de marcadores de exosomas y EVs obtenidos de repositorios de referencia (Vesiclepedia y ExoCarta). Este análisis resultó en la identificación de más del 90% de las 100 proteínas más comúnmente detectadas en sEVs y exosomas según las bases de datos de Vesiclepedia y ExoCarta, incluyendo los reconocidos marcadores exosomales (CD9, CD63 y CD81, entre otros) (Figura 15). Estos hallazgos, junto a aquellos relacionados con el análisis cuantitativo del tamaño de las vesículas mediante NTA y MET, demostraron que los exosomas fueron aislados eficientemente mediante el enfoque experimental utilizado en nuestro estudio.

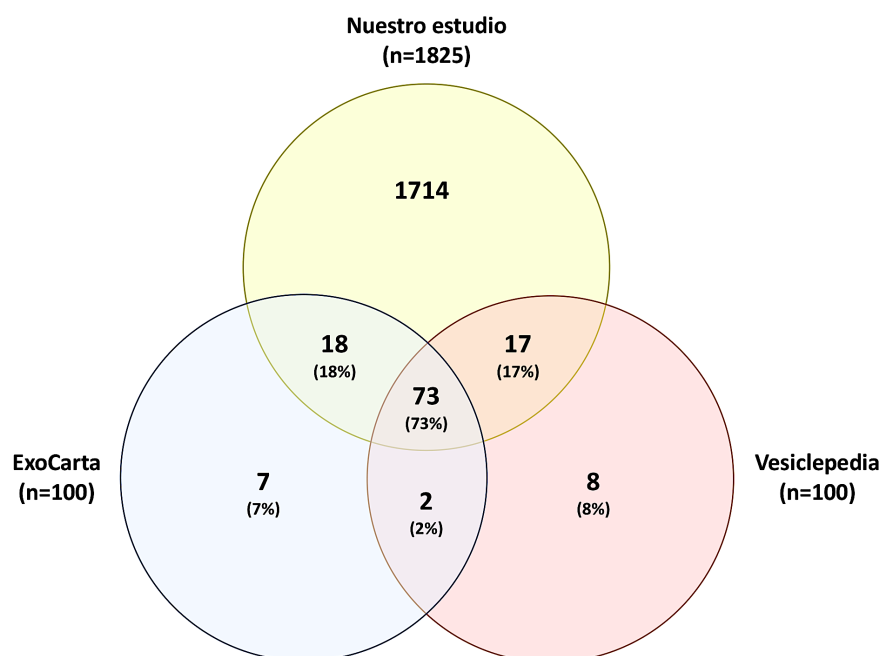
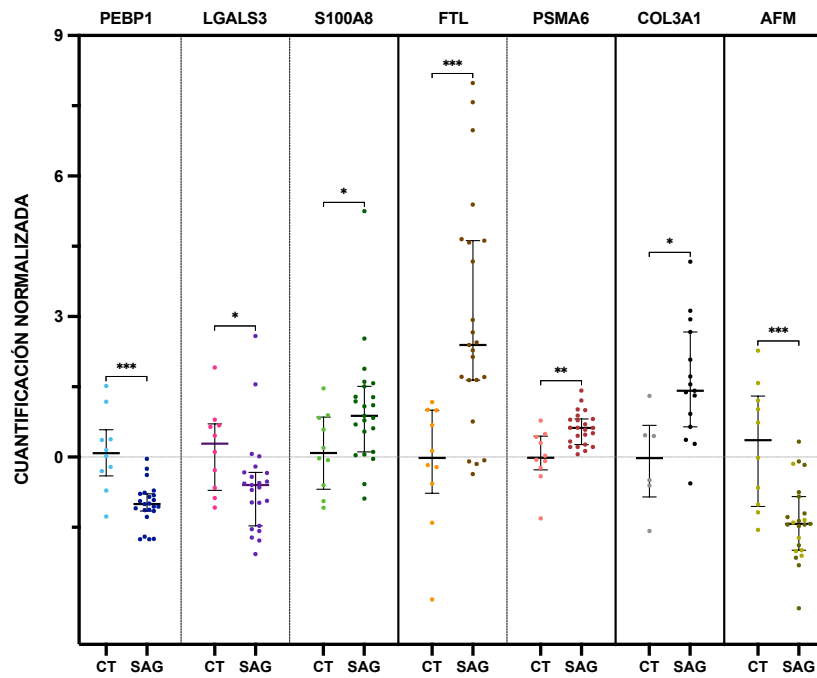


Figura 15. Diagrama de Venn que muestra la superposición entre las proteínas identificadas en los Exo-DFP de nuestro estudio y las 100 proteínas principales de las bases de datos Vesiclepedia y ExoCarta.

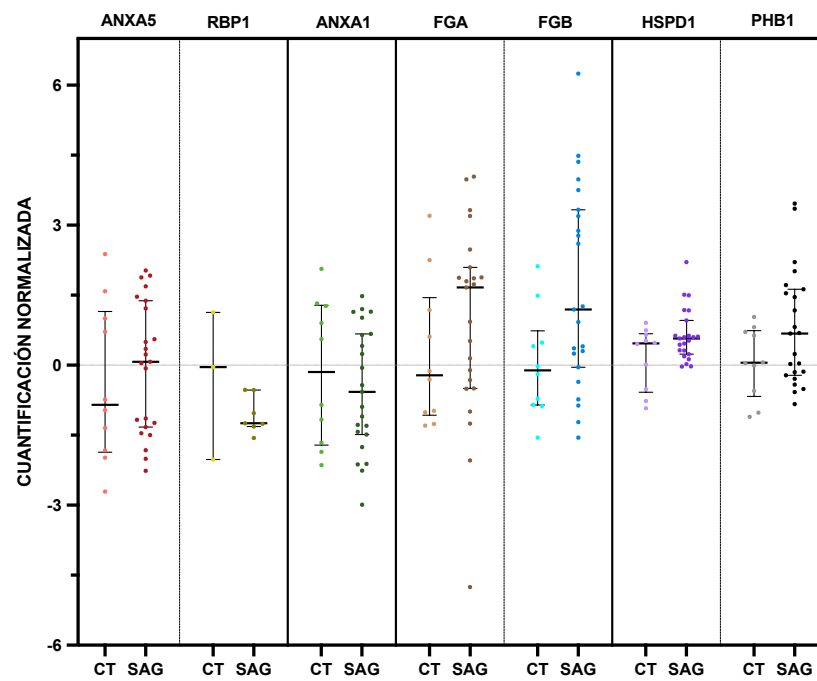
Tras comparar nuestros datos proteómicos derivados de los Exo-DFP de casos con CSAG con estudios previos centrados en la identificación de proteínas expresadas de manera diferencial entre los tejidos de CO y sus correspondientes tejidos normales (178), se observaron que 7 de ellas (la proteína PEBP1, del inglés *Phosphatidylethanolamine binding protein 1* [PEBP1], la proteína Galectina-3 [LGALS3], la proteína S100A8, del inglés *S100 calcium binding protein A8* [S100A8], la proteína codificada por el gen *FTL*, del inglés *Ferritin light chain* [FTL], la Proteína PSMA6, del inglés *Proteasome 20S subunit alpha 6* [PSMA6], la proteína COL3A1, del inglés *Collagen type III alpha 1 chain* [COL3A1] y la proteína Afamina, del inglés *Alpha-fetoprotein-like* [AFM]) mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su expresión entre casos y controles (p -valor $<0,05$) y una tendencia de expresión similar en nuestros datos proteómicos en comparación con dicho estudio. Además, otra proteína tuvo un p -valor cercano al umbral de significación (p -valor=0,056) (la proteína codificada por el gen *FGB*, del inglés *Fibrinogen beta chain* [FGB]) (Figura 16A y anexo 5). Asimismo, los restantes biomarcadores mencionados en dicho estudio (178) presentaron una tendencia similar en cuanto a su carga en los Exo-DFP, pero no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 16B y anexo 5).

Considerando además los resultados recientemente obtenidos por *Lai et al.*, que se centraron en la caracterización de proteínas en exosomas derivados de sangre periférica de pacientes con CO, nuestros datos proteómicos confirmaron el valor diagnóstico de la proteína de la cadena gamma de fibrinógeno (FGG) y de la apolipoproteína A-IV (APOA4), pero no para la mucina 16 (MUC16, también conocida por CA125). Este último marcador presentó una relación de expresión opuesta a la esperada en nuestros hallazgos en comparación con los datos de dicho estudio (166) (Figura 16C).

16A



16B



16C

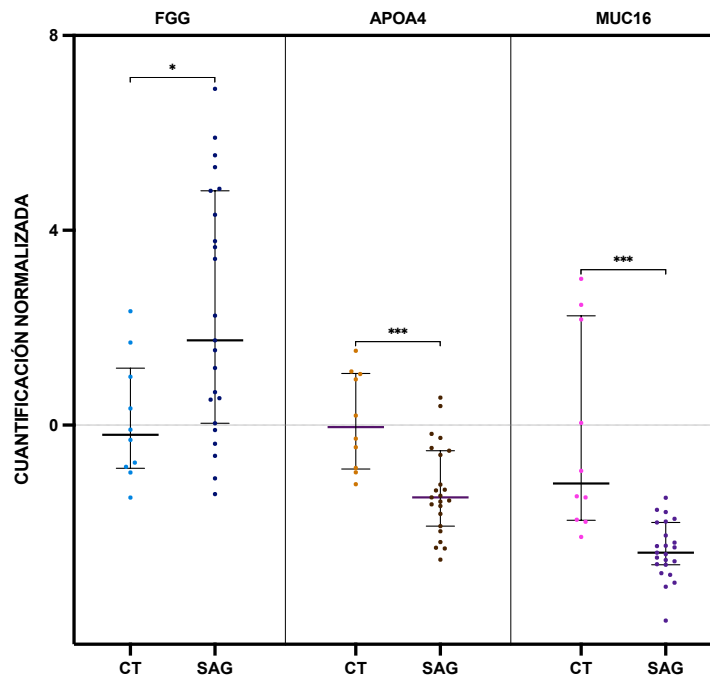


Figura 16. Comparación del contenido proteico de los Exo-DFP de aquellos casos con CSAG con estudios previos de CO. (A) Gráfico que representa los datos de cuantificación proteómica normalizada, con diferencias estadísticamente significativas, entre casos con CSAG (SAG, n=23) y controles (CT, n=10) de 7 proteínas (PEBP1, LGALS3, S100A8, FTL, PSMA6, COL3A1 y AFM) previamente descritas como biomarcadores proteicos de CO y que siguen la misma tendencia de contenido exosomal que dichos estudios (178). P-valores de significancia ajustados de *Benjamini-Hochberg* (*, p-valor<0,05; **, p-valor<0,01 y ***, p-valor<0,001, prueba de *Mann-Whitney*). Todos los datos se muestran utilizando la mediana junto con el rango intercuartílico. Las líneas verticales oscuras separan los marcadores previamente descritos por 4 estudios independientes. **(B)** Gráfico que representa los datos de cuantificación proteómica normalizada de 7 proteínas (ANXA5, proteína de unión a retinol 1 [RBP1], ANXA1, la proteína de la cadena alfa de fibrinógeno [FGA], la proteína codificada por el gen FGB, del inglés *Fibrinogen beta chain* [FGB], la proteína miembro 1 de la Familia D de las proteínas de choque térmico [HSPD1] y la Prohibitina 1 [PHB1]) que no mostraron diferencias estadísticamente significativas pero que siguen la misma tendencia de contenido en exosomas que dichos estudios (178). La comparación se establece entre controles (CT, n=10) y casos con CO con histología SAG (SAG, n=23). Las líneas verticales oscuras separan los marcadores previamente descritos por 4 estudios independientes (Anexo 5). **(C)** Gráfico que muestra los datos de cuantificación proteómica normalizada de la proteínas FGG, APOA4 y MUC16, estudiadas en EVs, comparando muestras de nuestra cohorte de casos con CSAG (SAG, n=23) vs. controles (CT, n=10). Estos factores fueron descritos previamente como marcadores de diagnóstico para CO en EVs derivados del suero (166).

4.6. Análisis no supervisado de la carga proteómica de los Exo-DFP de casos y controles

El siguiente paso consistió en realizar un análisis no supervisado que permitió confeccionar un mapa de correlación basado en las 1825 proteínas identificadas en el análisis proteómico de todos los casos y controles (Figura 17). Este mapa de correlación mostró una separación de las muestras no tumorales en 2 clústeres con perfiles de expresión diferentes (Clúster 1 y subclúster [subc.] 2A). Este último subc. incluyó de manera aislada una muestra de CO (C1133). Con respecto a las muestras tumorales, los casos con CO se subdividieron en dos clústeres bien diferenciados (Subc. 2B-C vs. 3A-B). En ambos clústeres, se evidenció una distribución indistinta de CSAG en dos subc. (Subc. 2B y 3A) y la acumulación preferencial de muestras procedentes de histología no SAG en ramas específicas (Subc. 2C y 3B). Mencionar además que el clúster 2C incluyó a un paciente control que en el momento del diagnóstico presentaba un cistoadenoma mucinoso (ctrl1351).

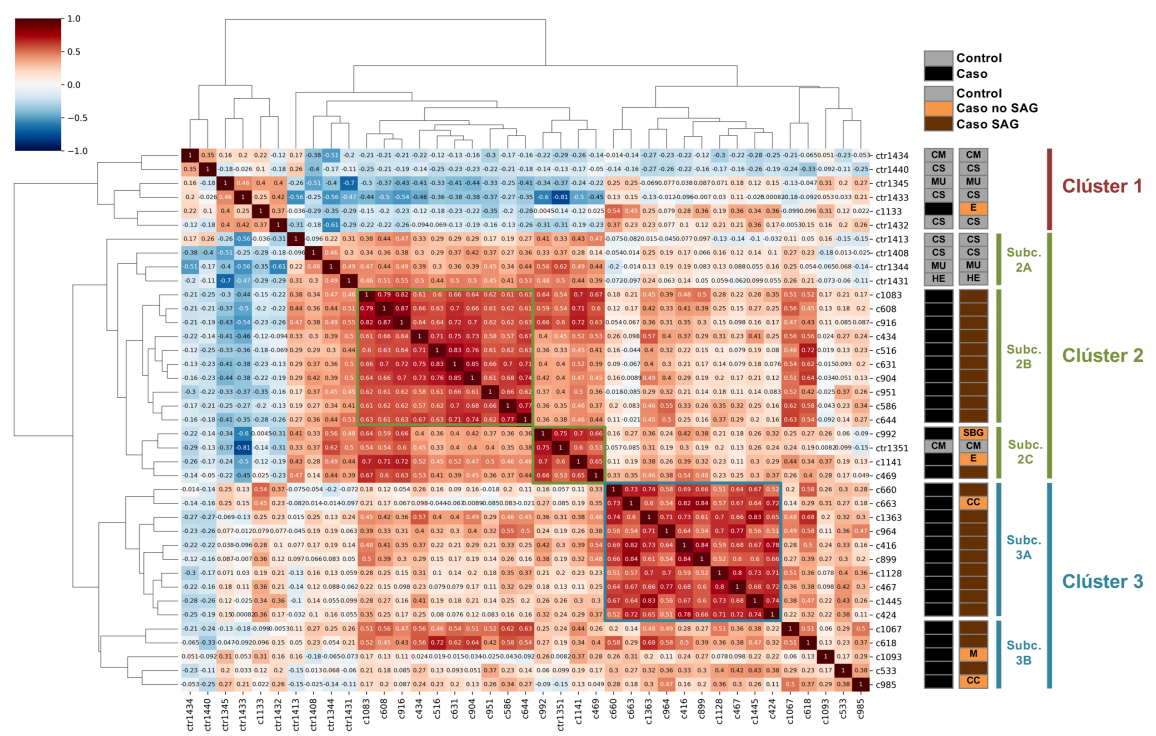


Figura 17. Mapa de agrupamiento de correlaciones que representa el análisis no supervisado del perfil de proteínas contenidas en los Exo-DFP en todos los casos y controles caracterizados por espectrometría de masas. La barra de color a la izquierda indica el grado de correlación entre dos muestras en estudio, con un valor de 1 (rojo oscuro) que indica una muestra idéntica en cuanto al contenido de proteínas y -1 (azul oscuro) que indica muestras con perfiles potencialmente opuestos. En el lado derecho, se resaltan los principales clústeres (1, 2 y 3) y subc. (2A-C y 3A-B) y las principales características clínicas de las muestras en comparación (controles [CS: Cistoadenoma ovárico seroso; CM: cistoadenoma ovárico mucinoso; MU: mioma uterino; HE: hiperplasia endometrial] vs. muestra tumoral de CO; SAG vs. No SAG (E, Endometrioides; SBG, Seroso de bajo grado; M, Mucinoso; y CC, de Células claras). Los clústeres de muestras con los ratios de correlación más altos están etiquetados en cuadros verdes y azul.

Estos patrones de agrupación también se observaron en el Análisis de Componentes Principales (PCA, del inglés *Principal Component Analysis*) basado en los datos proteómicos (Figura 18) que, a diferencia del análisis anterior, consideró exclusivamente las proteínas detectadas en todas las muestras incluidas a estudio. En esta figura se observa una clara separación entre las muestras pertenecientes a los clústeres 2 y 3, que fueron definidos previamente mediante análisis de correlación (Figura 17). Además, se puede apreciar cierta separación entre el subc. 2B, conformado únicamente por muestras tumorales de histología SAG, y los subc. 2A y 2C, donde se acumulan muestras no tumorales y tumorales no SAG.

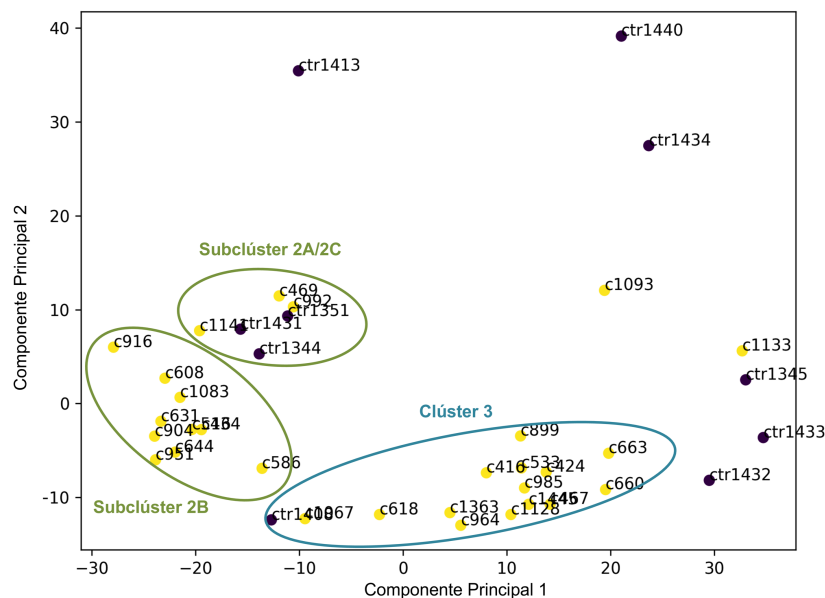


Figura 18. PCA basado en los datos proteómicos obtenidos al comparar muestras de pacientes control con todos los casos con CO estudiados.

4.7. Análisis no supervisado de la carga proteómica de los Exo-DFP en los casos con CSAG frente a los controles

Para minimizar el posible factor de confusión debido a la inclusión de subtipos histológicos no SAG, que como se mencionó anteriormente, presentaban una cantidad reducida de Exo-DFP y una carga proteica reducida en comparación con las histologías SAG (Figuras 12A y 13C), se realizó una correlación no supervisada similar comparando exclusivamente las patologías SAG con los controles (Figura 19). El mapa de correlación permitió distinguir claramente los casos con CSAG de los controles, diferenciándose dos clústeres principales de casos con CSAG, que se nombraron como clúster S-1 y clúster S-2.

El subc. principal S-1 agrupó predominantemente muestras obtenidas durante cirugías de recaída (5 de 9 casos con CSAG, 55%). Estas muestras también se agruparon en un reducido clúster que mostró una sólida correlación entre ellas (C1128, C467, C1445 y C424 [Figura 19, cuadro en verde oscuro]; correlación promedio=0,76). Por otro lado, el subc. principal S-2 incluyó principalmente muestras diagnósticas y muestras primarias (quimio-naive) (8 de 10, 80%). Este subc. mostró además un subconjunto de muestras con la correlación más alta de todo el análisis (C1083, C608 y C916 [Figura 19, cuadro en verde oscuro]; correlación promedio: 0,82), siendo estas muestras exclusivamente diagnósticas.

En cuanto a las muestras obtenidas de cirugías de intervalo, aunque su distribución en el mapa de correlación abarcó ambos clústeres, éstas tendieron a agruparse cercanas unas a otras (C1067, C618 y C469 o C660 y C416). Es igualmente importante destacar que las muestras seriadas incluidas en el análisis proteómico (C618, intervalo y C516, diagnóstica), a pesar de mostrar una alta correlación en el contenido de sus vesículas (índice de correlación=0,72), se agruparon con otras muestras obtenidas en momentos quirúrgicos similares en lugar de hacerlo conjuntamente.

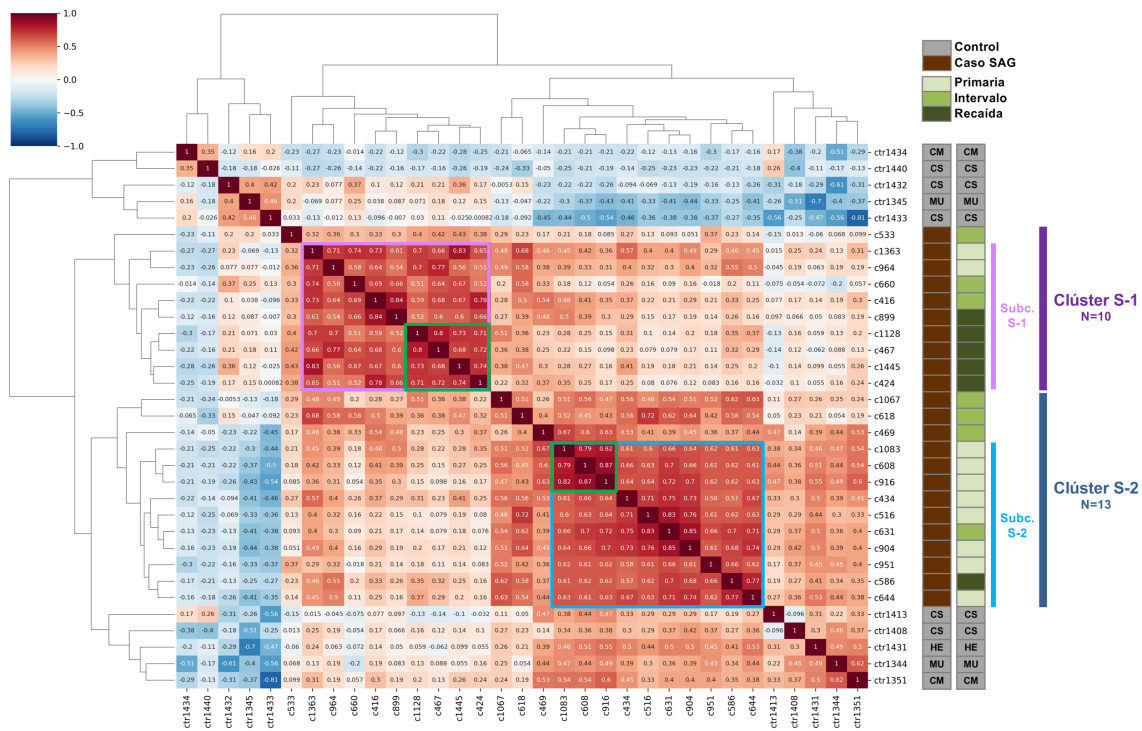


Figura 19. Mapa de agrupamiento de correlaciones que representa el análisis no supervisado del perfil de proteínas contenidas en los Exo-DFF en los casos con CSAG y controles caracterizados por espectrometría de masas. La barra de colores a la izquierda indica el grado de correlación entre dos muestras en estudio, donde un valor de 1 (rojo oscuro) indica una muestra idéntica en términos de contenido proteico y -1 (azul oscuro) indica muestras potencialmente opuestas. En el lado derecho, se resaltan los principales clústeres (S-1, n=10 y S-2, n=13) y las características clínicas más relevantes de las muestras en comparación (controles [CS: cistoadenoma ovárico seroso; CM: cistoadenoma ovárico mucinoso; MU: mioma uterino; HE: hiperplasia endometrial] vs. CSAG; procedimientos: cirugías primarias, de intervalo o de recurrencia). Los subclústeres de correlación principales para S-1 y S-2 se representan en recuadros morado y azul. Los recuadros verdes incluyen las muestras con la correlación más alta y están asociados exclusivamente con recurrencias (correlación promedio=0,76) o con muestras diagnósticas (correlación promedio=0,82).

Estos resultados se confirmaron mediante PCA, ya que se observó una clara separación de los dos clústeres S-1 y S-2. Además, se pudo ver una mayor agrupación en las muestras obtenidas tras las cirugías de recaída dentro del clúster S-1, así como una mayor agrupación de aquellas muestras obtenidas tras cirugías primarias o diagnósticas en el clúster S-2 (Figura 20).

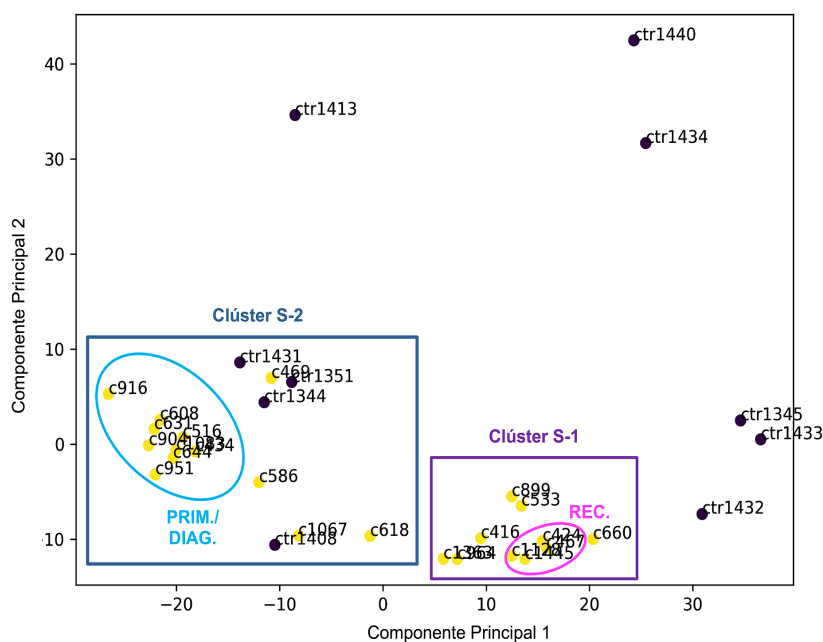


Figura 20. PCA basado en los datos proteómicos obtenidos al comparar muestras de pacientes control con todos los casos con CSAG estudiados.

La comparación del perfil proteómico entre casos con CSAG y controles reveló un total de 485 PDCs en los Exo-DFP entre ambos grupos, con un p -valor $< 0,05$ (Figura 21), lo que representa más del 25% del total de proteínas identificadas. Entre ellas, 192 PDCs mostraron una presencia significativamente mayor en el grupo de casos con CSAG (97/192) o en el grupo de los controles (95/192) cuando se aplicaron umbrales más rigurosos ($Fold\ Change\ [FC] \geq 2$ o ≤ -2) (Figura 21). De interés, mencionar algunas de las proteínas significativamente más sobre-contenidas en los casos de CSAG, tales como STX5, la proteína SETSIP, del inglés *SET like protein* (SETSIP), las proteínas TMED, del inglés *Transmembrane p24 trafficking protein* (TMED) 2 y 7, S100A4, FTL, la proteína codificada por el gen *HLA-DRB5*, del inglés *Major histocompatibility complex, class II, DR beta 5* (HLA-DRB5), COL3A1 o la proteína PDCL, del inglés *Phosducin-like protein* (PDCL). Por otro lado, se vio un mayor contenido de proteínas pertenecientes a la familia de las uroplaquinas (UPK), de la proteína transferrina (TF) y de la proteína mesotelina (MSLN) en los Exo-DFP de los controles.

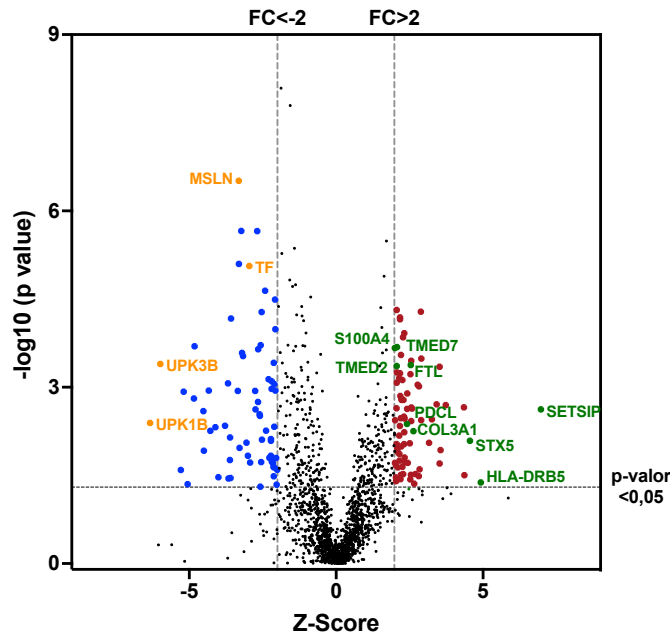


Figura 21. Gráfico tipo volcán en el que se representan las PDCs entre casos con CSAG vs. controles (PDCs =192). En el gráfico se muestran los valores z normalizados de cada proteína detectada frente a sus correspondientes p-valores ajustados. Las líneas discontinuas representan los p-valores ajustados con umbrales inferiores a 0,05 (eje x) o un $FC \geq 2$ o ≤ -2 (eje y). Las proteínas significativamente desreguladas que se muestran en el cuadrante superior derecho (círculos rojos y verdes) denotan proteínas sobrecontenidas en el clúster de casos con CSAG, mientras que las proteínas etiquetadas como círculos azules y naranjas representan proteínas sobrecontenidas en el clúster de control. Los nombres de las proteínas de mayor interés biológico aparecen reflejadas con sus símbolos: STX5, SETSIP, TMED2, TMED7; FTL, HLA-DRB5, COL3A1 y S100A4 (proteínas reguladas al alza en los casos con CSAG). UPK1B, UPK3B, TF y MSLN (proteínas reguladas a la baja en los casos con CSAG).

4.8. Análisis comparativo de la carga proteica en las distintas variables clínicas

Como se mencionó anteriormente, y teniendo en cuenta solo el grupo de los casos con CSAG, se realizó un análisis de correlación entre dichas muestras según el momento quirúrgico en el cual se recogieron. Las distintas comparaciones realizadas mostraron una clara correlación entre los especímenes en función de su origen quirúrgico.

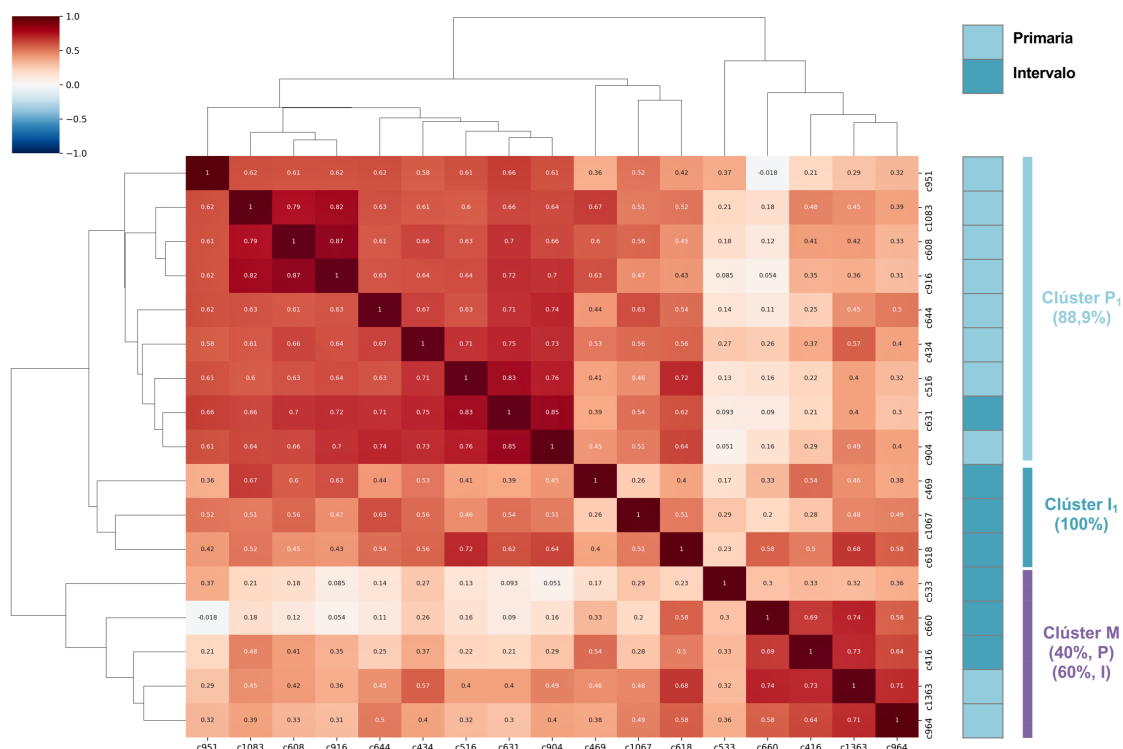
En la comparación entre las muestras obtenidas de las cirugías primarias o diagnósticas y las obtenidas de cirugías de intervalo, se pueden identificar tres clústeres en el mapa de correlación (Figura 22A). Un primer clúster compuesto mayoritariamente por muestras de cirugías primarias/diagnósticas (Clúster P₁,

8/9 [88,9%]), un segundo compuesto por cirugías de intervalo (Clúster I₁, 3/3 [100%]) y un tercer clúster compuesto por muestras obtenidas de cualquiera de los procedimientos quirúrgicos (Clúster M) (Figura 22A).

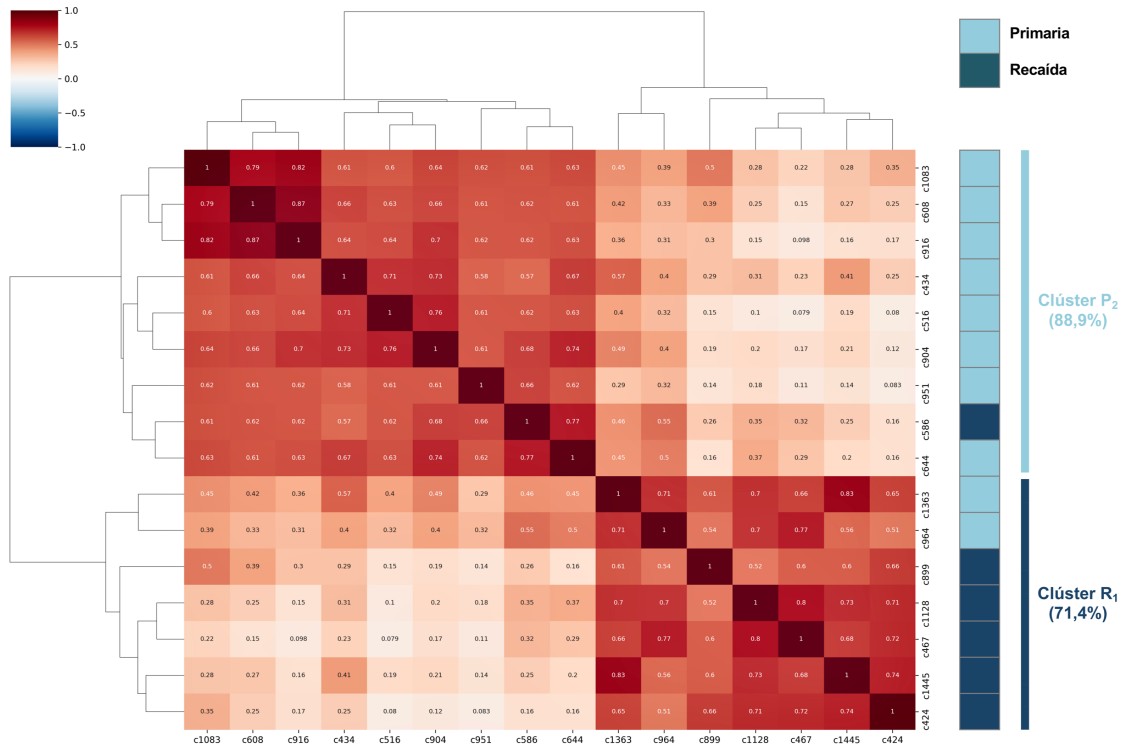
Al realizar la comparación entre las muestras obtenidas de cirugías primarias/diagnósticas frente a las de recaída se observaron igualmente 2 clústeres, el primero compuesto en su mayoría por muestras de cirugías primarias/diagnósticas (Clúster P₂, 8/9 [88,9%]) y un segundo clúster compuesto mayoritariamente por muestras obtenidas en cirugías de recaídas (Clúster R₁, 5/7 [71,4%]) (Figura 22B).

Finalmente, tras comparar las muestras obtenidas de cirugías de intervalo frente a las de recaída, éstas se volvieron a separar en 2 clústeres, uno de ellos que agrupaba en su mayoría muestras de cirugías de intervalo (Clúster I₂, 5/6 [83,3%]) y un segundo clúster que incluía mayoritariamente muestras obtenidas en cirugías de recaídas (Clúster R₂, 5/7 [71,4%]) (Figura 22C).

22A



22B



22C

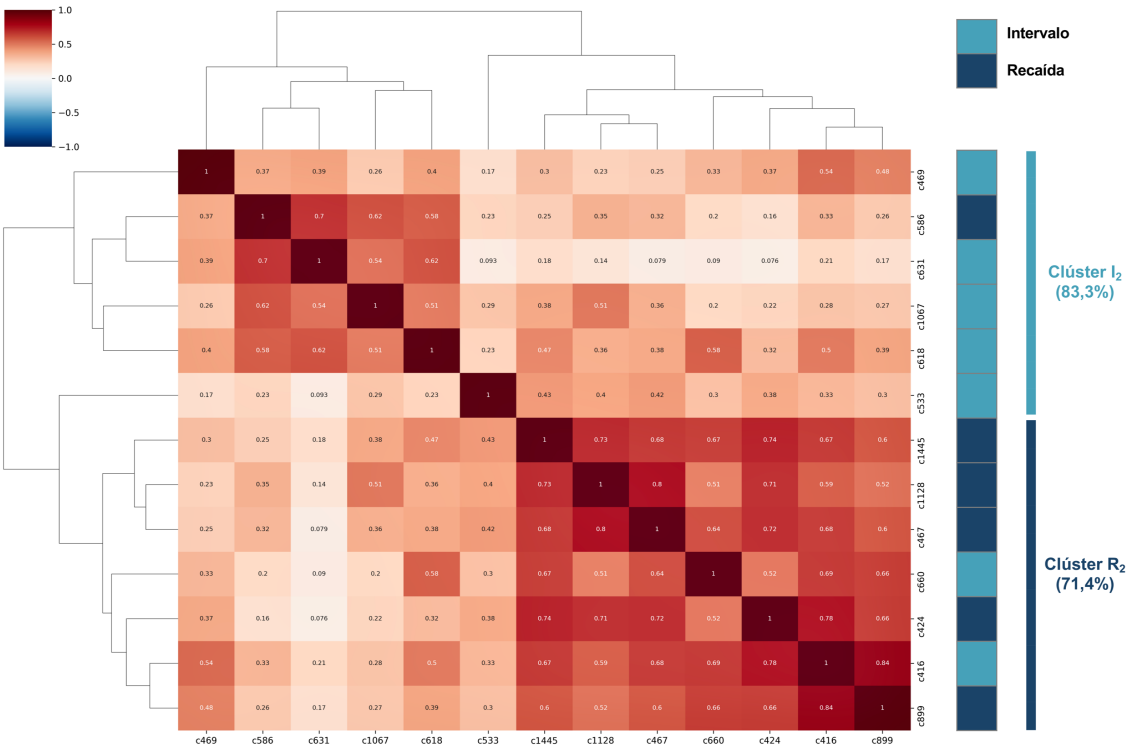


Figura 22. Mapa de agrupamiento de correlaciones que representa el análisis no supervisado del perfil de proteínas contenidas en los Exo-DFP, caracterizadas por espectrometría de masas, para las muestras de los casos con CSAG según el momento quirúrgico. (A) Cirugía de intervalo vs. primaria/diagnóstica. (B) Cirugía de recaída vs. primaria/diagnóstica. (C) Cirugía de recaída vs. de intervalo. La barra de colores a la izquierda indica el grado de correlación entre dos muestras en estudio, con un valor de 1 (rojo oscuro) que indica una muestra idéntica en cuanto al contenido de proteínas y -1 (azul oscuro) que indica posibles muestras con perfiles completamente opuestos. En el lado derecho de cada panel, se muestran los principales grupos de correlación y los procedimientos quirúrgicos (cirugías primarias/diagnósticas [P], de intervalo [I] o de recaída [R]).

En cuanto al estado mutacional de los genes *BRCA1/2* en el CSAG, se sabe que alrededor del 20% de las pacientes presentan alteraciones patológicas en estos genes, ya bien sean germinales o somáticas. Sin embargo, es importante destacar que este porcentaje se incrementa significativamente hasta el 50% de las pacientes a estudio cuando se considera cualquier deficiencia de la RH (22,40). Considerando el perfil genético de los casos con CSAG de nuestro estudio, se observó que aquellas muestras de los casos que tenían algún tipo de alteración patológica en los *loci BRCA1/2* o en otros genes vinculados con el sistema de reparación del ADN por la vía de la RH (como *PALB2*, *BRIP1*, amplificación de *RAD21*, *CCNE1*), o valores indicativos de RHd, se distribuyeron de manera similar en el análisis de correlación entre los clústeres proteómicos S-2 y S-1 (7/12 [58%] vs. 10/10 [80%], respectivamente) (Figura 23).

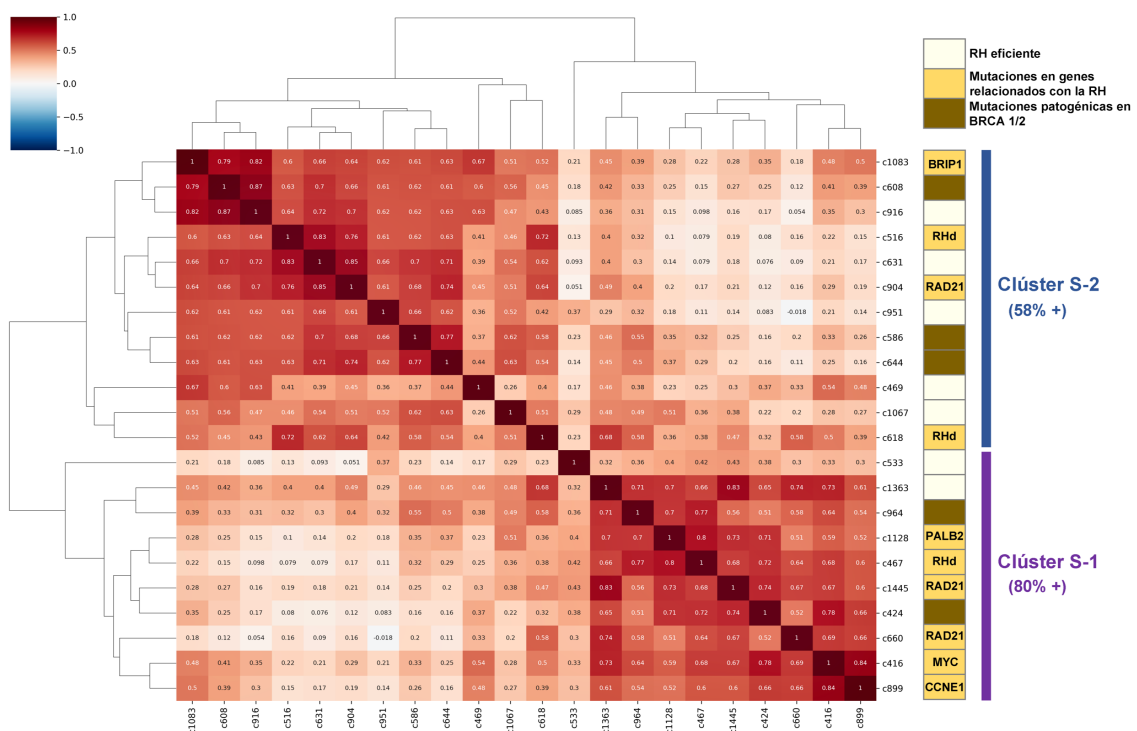


Figura 23. Mapa de agrupamiento de correlaciones que representa el análisis no supervisado del perfil de proteínas contenidas en los Exo-DFP, caracterizadas por espectrometría de masas, para las muestras de los casos con CSAG teniendo en cuenta el estado mutacional de los genes *BRCA1/2* y su estado RH. La barra de colores a la izquierda indica el grado de correlación entre dos muestras en estudio, con un valor de 1 (rojo oscuro) que indica una muestra idéntica en cuanto al contenido de proteínas y -1 (azul oscuro) que indica posibles muestras con perfiles completamente opuestos. En el lado derecho de la figura, se muestran los clústeres principales de los casos con CSAG (S-1 y S-2). También se proporciona información sobre la presencia de alteraciones patogénicas en los loci de *BRCA1/2* (amarillo oscuro), en otros genes relacionados con la RHd (*PALB2*, *BRIP1*, *CCNE1*, *MYC* y *RAD21*) o la presencia de otros eventos moleculares sugestivos de fenotipos deficientes en la RH (recuadros amarillos claros). Los tumores sin alteración patogénica y con RHe se representan con recuadros blancos.

Finalmente, el análisis no supervisado del perfil proteómico entre los casos con CSAG en función de la platino-sensibilidad reveló que los dos clústeres contenían un porcentaje similar de muestras platino-sensibles y platino-resistentes (30% y 38% para el clúster S-2 y S-1, respectivamente) (Figura 24).

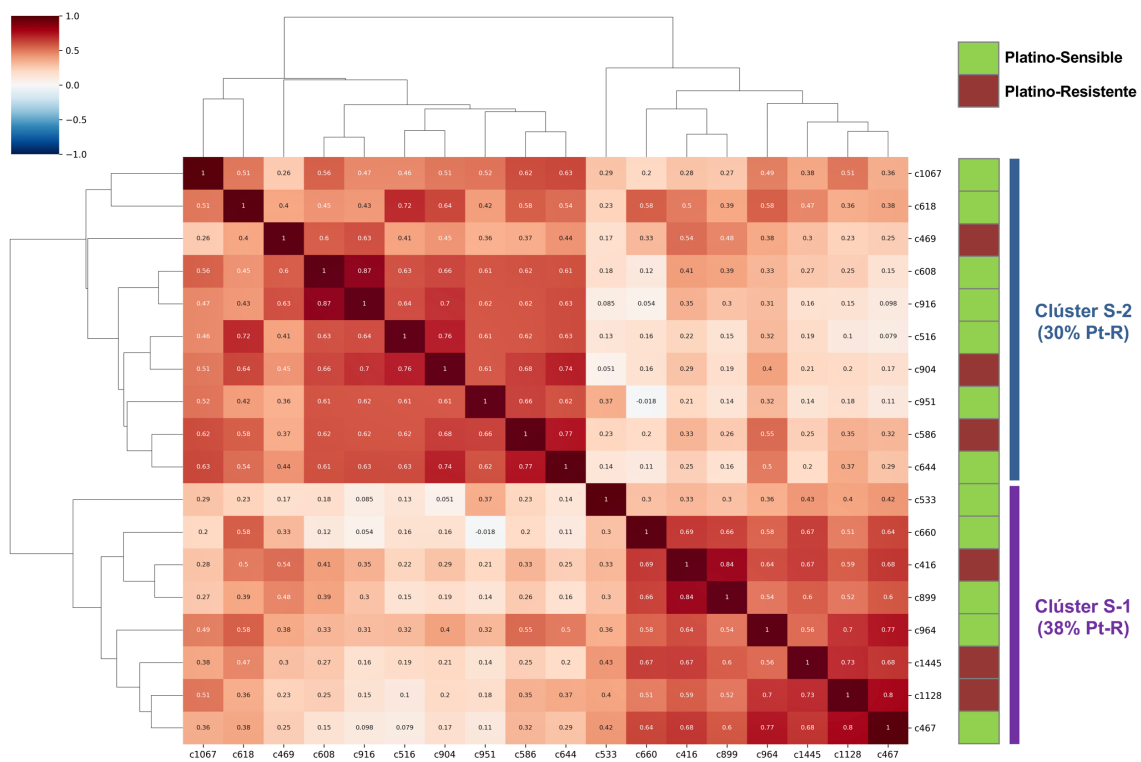


Figura 24. Mapa de agrupamiento de correlaciones que representa el análisis no supervisado del perfil de proteínas contenidas en los Exo-DFP, caracterizadas por espectrometría de masas, para las muestras de los casos con CSAG según el grado de respuesta al tratamiento con platino. La barra de colores a la izquierda indica el grado de correlación entre dos muestras en estudio, con un valor de 1 (rojo oscuro) que indica una muestra idéntica en cuanto al contenido de proteínas y -1 (azul oscuro) que indica posibles muestras con perfiles completamente opuestos. En el lado derecho de la figura, se muestran los clústeres principales de los casos con CSAG (S-1 y S-2). También se proporciona información sobre el grado de respuesta al platino de cada paciente (platino-sensible, verde; platino-resistente, granate).

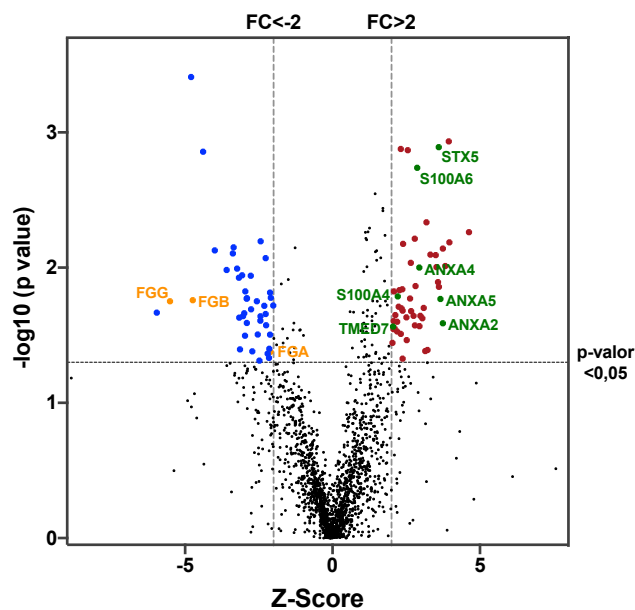
4.9. Análisis comparativo de las PDCs de los Exo-DFP en las distintas categorías clínicas

Además de lo anterior, se analizaron las PDCs en los Exo-DFP entre las diferentes categorías clínicas estudiadas. En primer lugar, se estudiaron las PDCs entre los casos con CSAG en función del momento quirúrgico del cual se obtuvo la muestra (intervención diagnóstica/primaria, cirugía de intervalo o cirugía de rescate [recaídas]). La comparación del contenido proteico de los Exo-DFP obtenidos a partir de muestras de cirugías de intervalo frente a las obtenidas de cirugías primarias/diagnósticas reveló un total de 164 PDCs en los Exo-DFP que mostraron diferencias significativas entre ambos grupos con un p -valor $<0,05$. Cuando además se restringió el número de PDCs aplicando un umbral de un $FC \geq 2$ o ≤ -2 , se detectaron un total de 51 proteínas sobrecontenidas en los Exo-DFP que se aislaron de muestras procedentes de cirugías de intervalo frente a las de cirugías diagnósticas/ primarias y 42 proteínas infracontenidas. Cabe destacar, dada su función biológica, algunas de ellas tales como STX5, S100A4, la proteína S100A6, del inglés *S100 calcium binding protein A6* (S100A6), TMED7 o proteínas de la familia de las ANXAs, entre las que presentaron un mayor contenido en muestras de cirugías de intervalo; y FGG, FGB y la proteína codificada por el gen *FGA*, del inglés *Fibrinogen alpha chain* (FGA), entre aquellas proteínas sobrecontenidas en muestras de cirugías primarias/diagnósticas (Figura 25A).

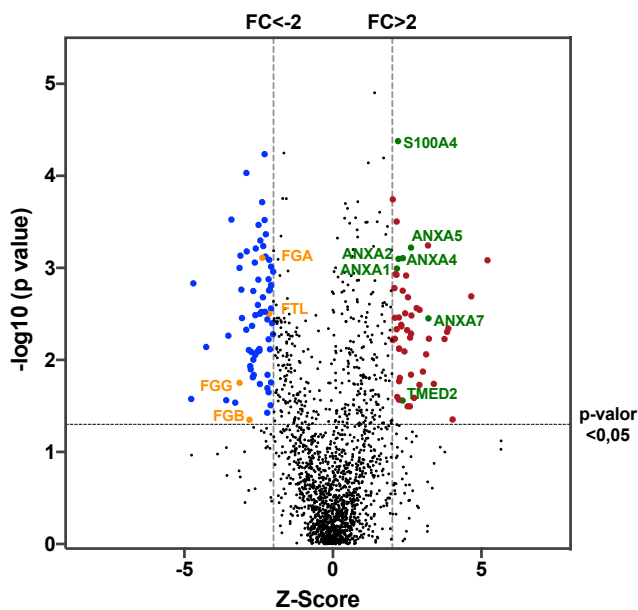
Al comparar el contenido proteico de los Exo-DFP de las muestras de cirugías de recaída frente a las obtenidas de cirugías primarias/diagnósticas, se detectaron un total de 493 PDCs entre ambos grupos que mostraron diferencias significativas con un p -valor $<0,05$. De ellas, 52 fueron PDCs con un mayor contenido en recaídas ($FC \geq 2$), incluyendo proteínas de la familia de las anexinas, TMED2 y S100A4, y 69 PDCs mostraron mayor contenido en muestras primarias/diagnósticas ($FC \leq -2$), como FGA, FGB, FGG y FTL (Figura 25B).

Finalmente, al comparar el contenido proteico de los Exo-DFP entre las muestras de cirugías de recaída frente a las de intervalo, se identificaron 81 PDCs entre ambos grupos con diferencias significativas ($p\text{-valor} < 0,05$). De ellas, 24 fueron PDCs sobre-contenidas en muestras de recidivas ($FC \geq 2$), destacando PDCL, y 19 PDCs infra-contenidas, ($FC \leq -2$), en el grupo de muestras obtenidas de cirugías de recaída, entre las que cabe destacar a FTL (Figura 25C).

25A



25B



25C

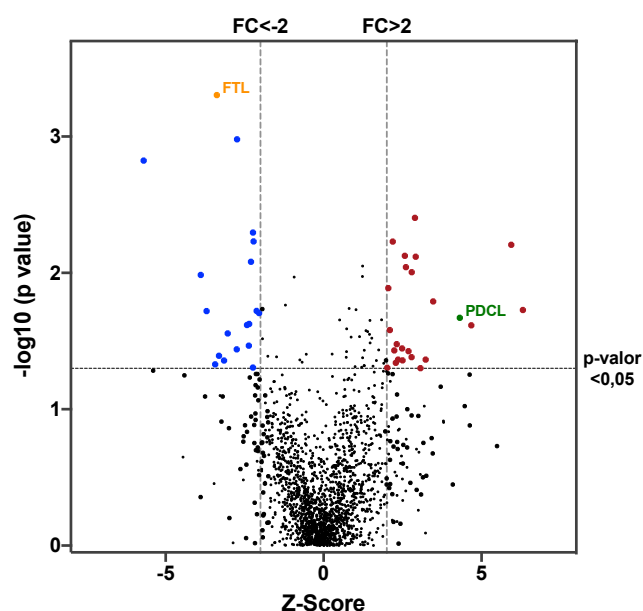


Figura 25. Gráfico tipo volcán en el que se representan las PDCs para las muestras de los casos con CSAG obtenidas según el momento quirúrgico. (A) Cirugía de intervalo vs. primaria/diagnóstica (PDCs=164). **(B)** Cirugía de recaída vs. primaria/ diagnóstica (PDCs=493). **(C)** Cirugía de recaída vs. de intervalo (PDCs=81). En cada gráfico se muestra los valores z normalizados de cada proteína detectada frente a sus correspondientes p-valores ajustados. Las líneas discontinuas representan los p-valores ajustados con umbrales inferiores a 0,05 (eje x) o un $FC \geq 2$ o ≤ -2 (eje y). **(A)** En este gráfico se representan las PDCs que se muestran en el cuadrante superior derecho (círculos rojos) que indican proteínas sobre-contenidas en el grupo de muestras pertenecientes a cirugías de intervalo, mientras que las proteínas etiquetadas con círculos azules representan proteínas sobre-contenidas en el grupo de muestras obtenidas de cirugías primarias/diagnósticas. **(B)** En el gráfico se representan las PDCs que se muestran en el cuadrante superior derecho (círculos rojos) indicando las proteínas sobre-contenidas en el grupo de muestras pertenecientes a cirugías de recaída, mientras que las proteínas etiquetadas con círculos azules representan proteínas sobre-contenidas en el grupo de muestras obtenidas de cirugías primarias/diagnósticas. **(C)** En este gráfico se representan las PDCs que se muestran en el cuadrante superior derecho (círculos rojos) que indican aquellas proteínas sobre-contenidas en el grupo de muestras pertenecientes a cirugías de recaída, mientras que las proteínas etiquetadas con círculos azules representan proteínas sobre-contenidas en el grupo de muestras obtenidas de cirugías de intervalo. Los nombres de las proteínas de mayor interés biológico aparecen reflejadas con sus símbolos: S100A4; S100A6; ANXA1, 2, 4, 5, 7; STX5; TMED2; TMED7; FGA; FGB; FGG; FTL y PDCL.

Al comparar el perfil proteómico de los Exo-DFP entre los casos con CSAG teniendo en cuenta únicamente el estado mutacional de los genes *BRCA1/2*, se observaron un total de 48 PDCs que mostraron diferencias significativas entre ambos grupos con un $p\text{-valor} < 0,05$. Cuando además se restringió el número de PDCs aplicando un umbral de un $FC \geq 2$ o ≤ -2 , se detectaron un total de 5 PDCs que estaban sobre-contenidas en el grupo de los Exo-DFP aislados de muestras de casos que tenían mutaciones en los genes *BRCA1/2*, pudiendo destacar a

HLA-DRB5. Por el contrario, no se detectó ninguna PDC sobre-contenida en aquellas muestras de casos sin mutaciones en los genes *BRCA1/2* (Figura 26).

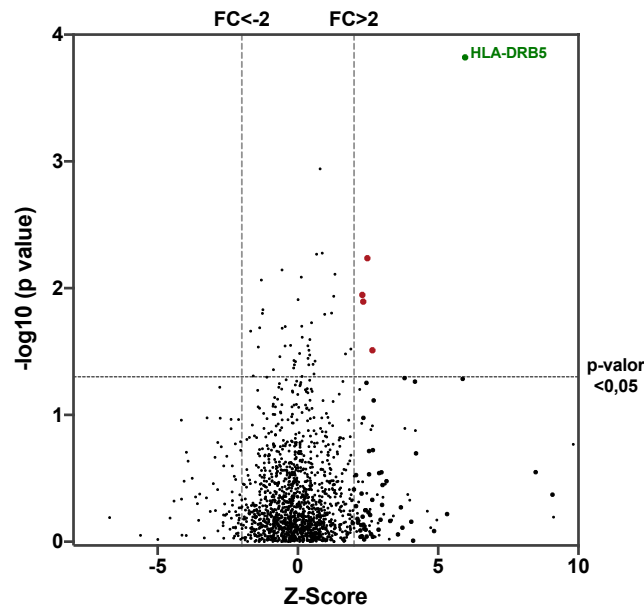


Figura 26. Gráfico tipo volcán en el que se representan las PDCs para las muestras de los casos con CSAG teniendo en cuenta el estado mutacional de los genes *BRCA1/2*. En el gráfico se muestra los valores z normalizados de cada proteína detectada frente a sus correspondientes p-valores ajustados. Las líneas discontinuas representan los p-valores ajustados con umbrales inferiores a 0,05 (eje x) o un $FC \geq 2$ o ≤ -2 (eje y). En el cuadrante superior derecho (círculos rojos) se representan las proteínas significativamente sobre-contenidas en el grupo de muestras de casos con mutaciones en los genes *BRCA1/2*. Los nombres de las proteínas de mayor interés biológico aparecen reflejados con sus símbolos: HLA-DRB5.

Cuando se realizó la comparación del perfil proteómico de los Exo-DFP entre los casos con CSAG en función de la sensibilidad o resistencia al platino con posterioridad a la recogida de la muestra, se detectaron un total de 22 PDCs que mostraron diferencias significativas entre ambos grupos con un $p\text{-valor} < 0,05$. Al restringir el número de PDCs aplicando un umbral de un $FC \geq 2$ o ≤ -2 , se detectaron un total de 8 PDCs que presentaban un mayor contenido en el grupo de los Exo-DFP aislados de muestras de casos platino-resistentes, destacando STX5 y la proteína RAD23A, del inglés *RAD23 homolog A, nucleotide excision repair protein* (RAD23A). Por contra, se observaron 4 PDCs sobre-contenidas en aquellas muestras de casos platino-sensibles, entre las que destacó FGA (Figura 27).

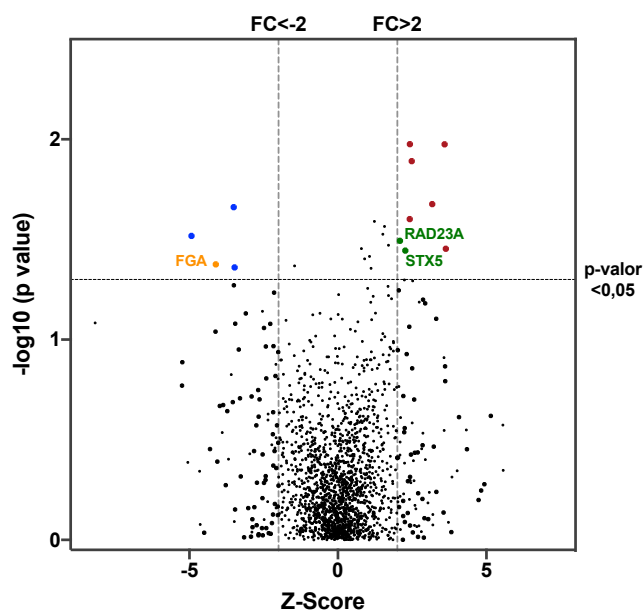


Figura 27. Gráfico tipo volcán en el que se representan las PDCs para las muestras de los casos con CSAG analizando el grado de respuesta al tratamiento con platino. En el gráfico se muestran los valores z normalizados para cada proteína detectada frente a sus correspondientes p-valores ajustados. Las líneas discontinuas representan los p-valores ajustados con umbrales inferiores a 0,05 (eje x) o un FC >2 o <-2 (eje y). En el cuadrante superior (círculos rojos) se representan las proteínas significativamente desreguladas y sobre-contenidas en el grupo de muestras de casos platino-resistentes, mientras que las proteínas etiquetadas con círculos azules representan proteínas sobre-representadas en el grupo de muestras de casos platino-sensibles. Los nombres de las proteínas de mayor interés biológico aparecen reflejadas con sus símbolos: STX5; RAD23A y FGA.

4.10. Análisis de enriquecimiento funcional de las PDCs en los Exo-DFP en las distintas categorías de interés

El análisis realizado mediante la herramienta *Enrichr* tenía como objetivo identificar procesos biológicos y categorías funcionales alteradas entre las PDCs en los Exo-DFP, para lo que se consideró aquellas PDCs con un p-valor < 0,05. Teniendo en cuenta la comparación de casos con CSAG vs. controles, dicho análisis reveló un enriquecimiento en proteínas asociadas con componentes extracelulares, tales como EVs, orgánulos y exosomas (Figura 28A y anexo 6), confirmando la eficacia de nuestro enfoque experimental y la solidez de nuestros hallazgos. Resultados similares fueron obtenidos para cualquiera de las comparaciones realizadas en nuestro estudio (datos no mostrados).

Al comparar los casos con CSAG frente a los controles, se observó que aquellas PDCs sobre-contenidas en las muestras de los casos con CSAG estaban involucradas en diversas rutas biológicas como la regulación del oncogén *MYC*, la transición epitelio-mesénquima, las vías de señalización de mTOR, rutas metabólicas como la fosforilación oxidativa (FO) y rutas asociadas al sistema inmune y al transporte de proteínas, entre otras. Mientras que, las proteínas significativamente sobre-contenidas en los Exo-DFP de los controles, estaban involucradas en procesos relacionados con la coagulación y hemostasia y el transporte de componentes celulares a la MP (Figura 28B y anexo 6).

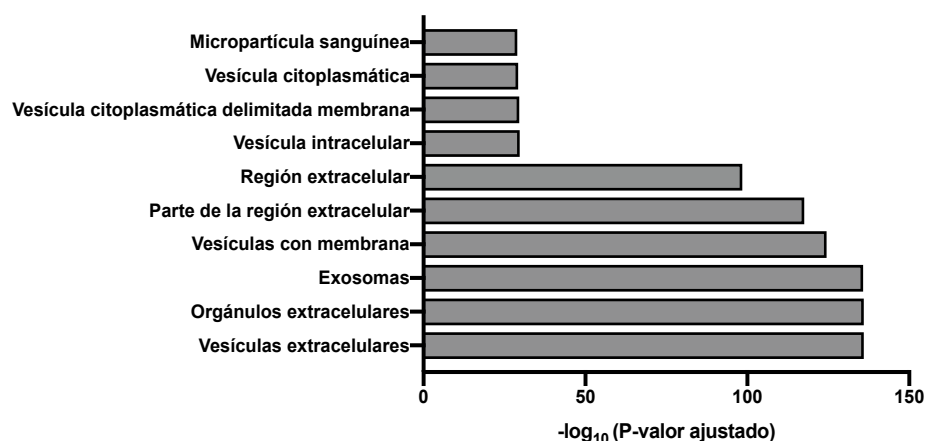
Una vez analizadas las muestras en función del momento quirúrgico en el cual se recogieron, se identificaron diversas rutas biológicas asociadas a las proteínas sobre-contenidas en aquellas muestras provenientes de las biopsias diagnósticas o de las cirugías primarias que estaban asociadas con la coagulación, la cascada del complemento y eventos inmunitarios (Figura 28C y anexo 6). Por otro lado, aquellas muestras que provenían de cirugías de intervalo o de recaída, y que por tanto habían sido sometidas a una o varias líneas de tratamiento y presentaban una mayor evolución de la enfermedad, mostraron un mayor contenido de proteínas implicadas en rutas biológicas relacionadas con la vía de mTOR y JAK/STAT, con procesos hipóxicos y metabólicos, y específicamente, en aquellas muestras obtenidas de cirugías de recaída, se observó un enriquecimiento en rutas asociadas al proceso de transición epitelio-mesénquima y a la regulación del oncogén *MYC* (Figura 28, D y E; y anexo 6).

Después de analizar las rutas biológicas asociadas a las PDCs sobre-contenidas en los Exo-DFP de las muestras con diferentes estados mutacionales en *BRCA1/2*, se vio un enriquecimiento significativo en vías implicadas en procesos inmunológicos (Figura 28F y anexo 6).

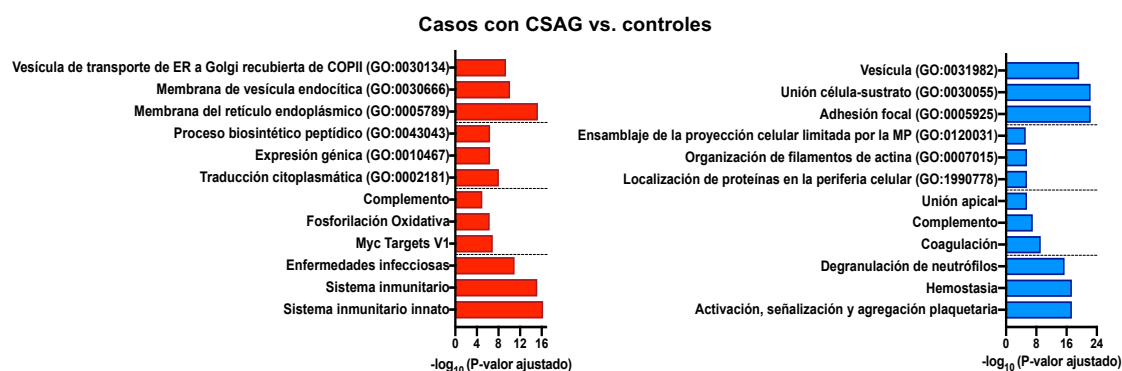
Finalmente, se analizaron las muestras de los casos platino-sensibles vs. platino-resistentes y se observó que las rutas biológicas más enriquecidas entre las proteínas sobre-contenidas de las muestras de los casos platino-resistentes estaban implicadas principalmente en procesos hipóxicos y metabólicos y en eventos inmunitarios (Figura 28G y anexo 6).

En base a todos estos resultados, se pudo concluir que las proteínas sobre-contenidas en los Exo-DFP de aquellas muestras asociadas a un peor pronóstico están preferentemente implicadas en múltiples procesos oncogénicos, moleculares y metabólicos que favorecen la progresión tumoral.

28A

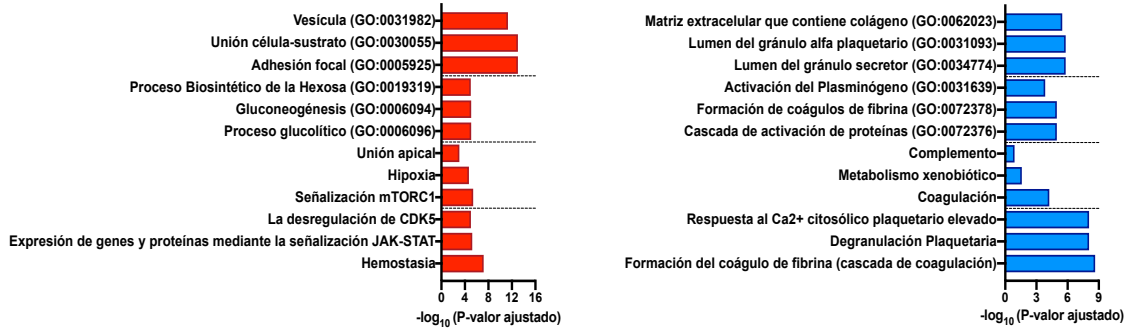


28B



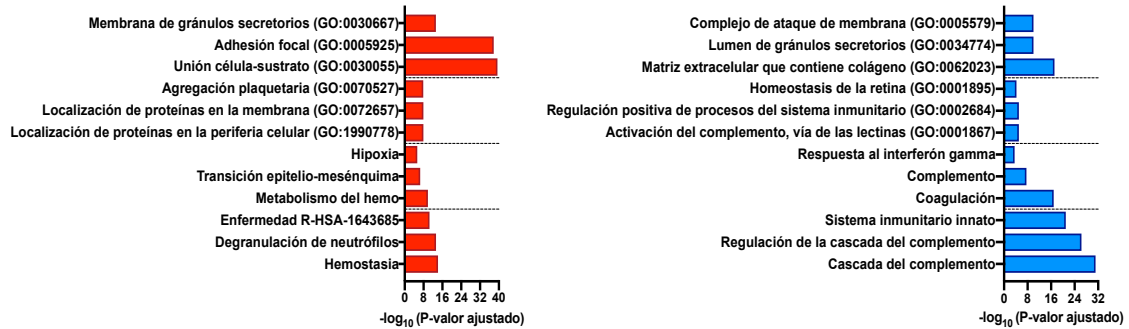
28C

Muestras recogidas de cirugías de intervalo vs. de cirugías diagnósticas/primarias



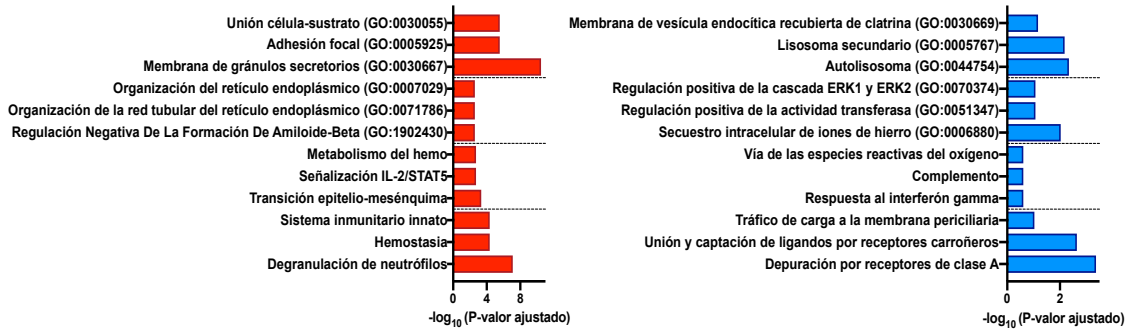
28D

Muestras recogidas de cirugías de recaída vs. de cirugías diagnósticas/primarias

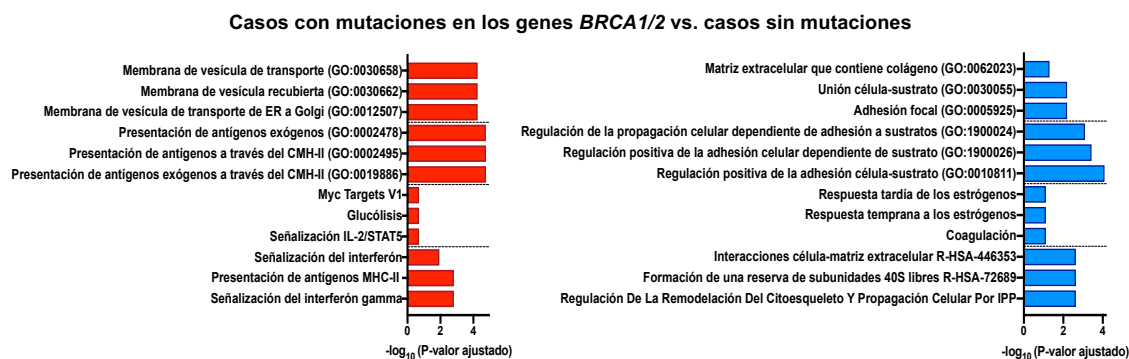


28E

Muestras recogidas de cirugías de recaída vs. de cirugías de intervalo



28F



28G

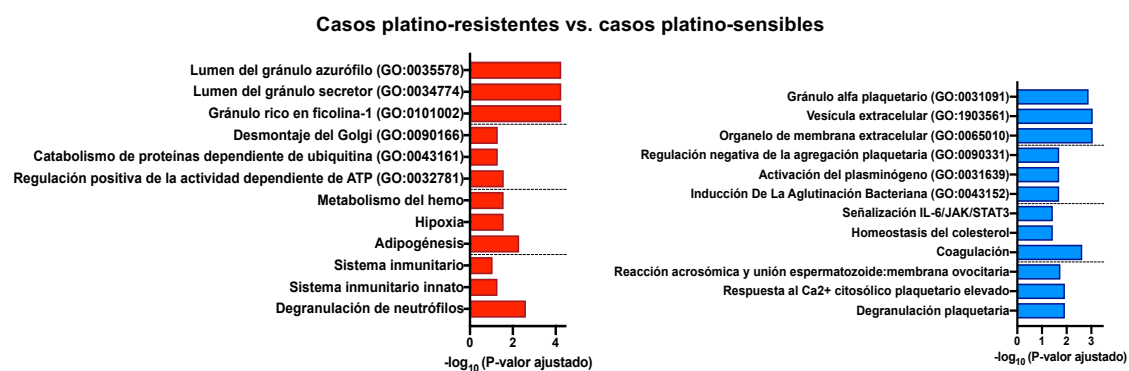


Figura 28. Gráficos de barras que representan procesos biológicos y categorías funcionales de interés enriquecidas según la herramienta *Enrichr* en ciertas comparaciones de interés. (A) Categorías relacionadas con compartimentos celulares enriquecidas en muestras de casos con CSAG en comparación con los controles (p -valor ajustado $< 0,01$). **(B-G)** Categorías incluidas para las diferentes comparaciones (p -valor ajustado $< 0,05$): de abajo a arriba *Hallmarks*, *Reactome*, *GO Biological Process* y *GO Cellular Component*. En cada gráfica se muestran el top 3 de las rutas biológicas más enriquecidas y significativas para las diferentes categorías relevantes para cada una de las comparaciones. Dichas categorías están separadas una de otra por una línea de puntos en cada comparación. Las gráficas en rojo o en azul se generan a partir del análisis de las PDCs en uno u otro de los grupos a estudio que se comparan. **(B)** Casos con CSAG (en color rojo a la izquierda) vs. controles (en color azul a la derecha). Comparación entre las muestras recogidas en distintos momentos quirúrgicos: **(C)** muestras recogidas en cirugías de intervalo (en color rojo a la izquierda) vs. diagnósticas/primarias (en color azul a la derecha); **(D)** muestras de cirugías de recaída (en color rojo a la izquierda) vs. cirugías diagnósticas/ primarias (en color azul a la derecha); **(E)** muestras de cirugías de recaída (en color rojo a la izquierda) vs. de intervalo (en color azul a la derecha). **(F)** Muestras de casos con mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2* (en color rojo a la izquierda) vs. muestras de casos sin mutaciones (en color azul a la derecha). **(G)** Muestras de casos platino-resistentes (en color rojo a la izquierda) vs. platino-sensibles (en color azul a la derecha).

4.11. Validación

Como se muestra en la figura 29, 25 de las PDCs identificadas aparecieron significativamente desreguladas (p -valor $<0,05$ y un FC ≥ 2 o ≤ -2) para varias comparaciones clínicas de interés. Dicha información se tuvo en cuenta para la validación de proteínas de potencial interés pronóstico o predictivo, estableciendo como criterio de selección aquellas proteínas con un papel biológico plausible en el desarrollo o progresión del tumor ovárico y que además, presentasen ratios de expresión con una tendencia consistente entre las diferentes comparaciones del análisis. Considerando estas condiciones, nos centramos en 2 de estas 25 proteínas, S100A4 y STX5.

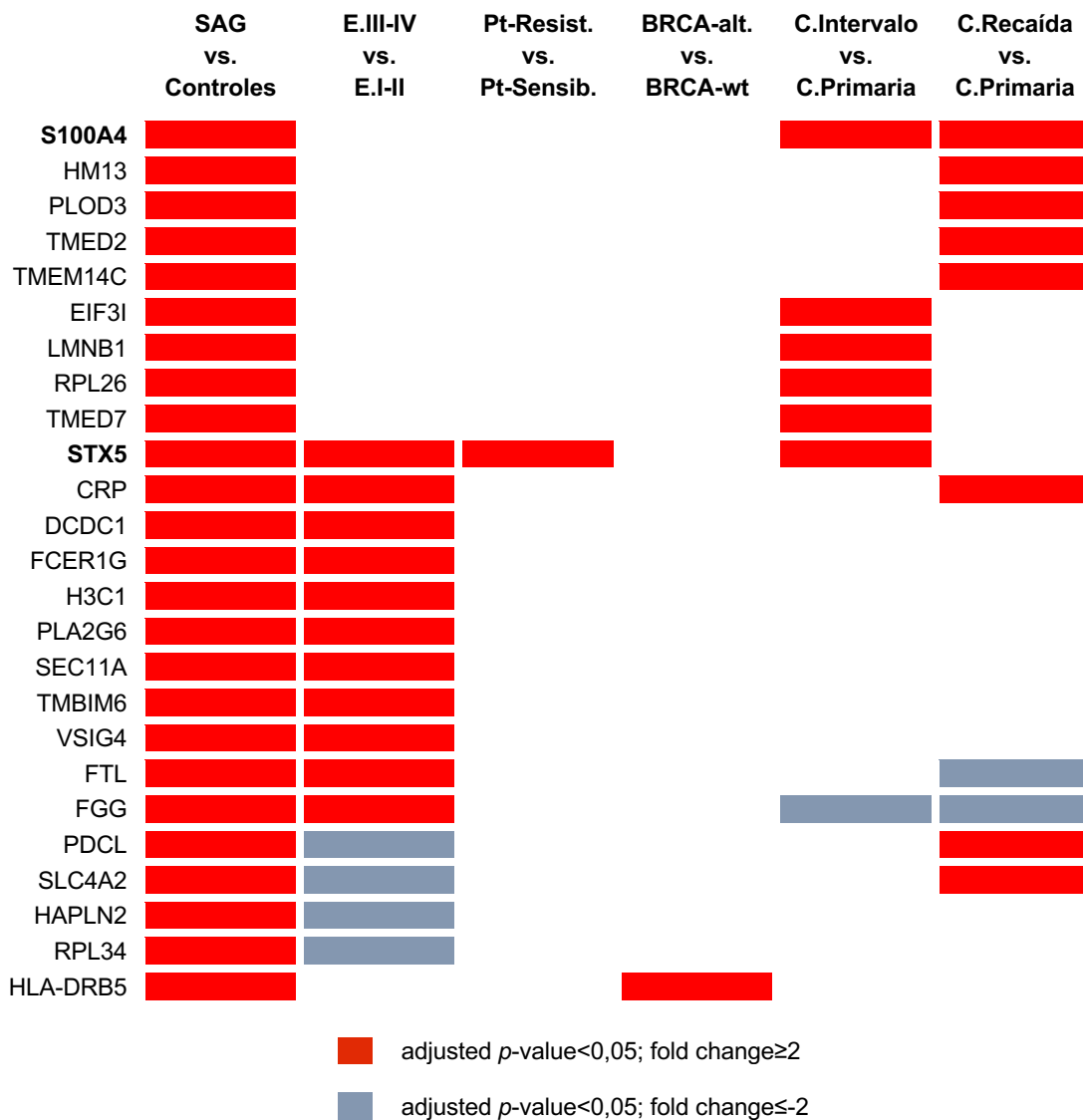


Figura 29. Tabla que muestra las 25 PDCs contenidas en diversas comparaciones de interés. Las casillas rojas representan las proteínas con mayor contenido en los Exo-DFP de la condición a estudio o primera condición, mientras que las casillas azules indican las proteínas con mayor expresión en la condición control o segunda condición.

En este sentido, STX5 está involucrado activamente tanto en eventos de autofagia como en el transporte entre compartimentos celulares (del retículo endoplasmático al aparato de Golgi). Nuestro conjunto de datos mostró que el contenido en STX5 en los Exo-DFP era estadísticamente más alto tanto en las comparaciones de casos con CSAG frente a controles (ratio de expresión=4,55, p-valor ajustado=0,008) (Figura 21), como en casos platino-resistentes frente a platino-sensibles (ratio de expresión=2,27, p-valor ajustado=0,036) (Figura 27). Estas diferencias significativas también se observaron cuando se consideraron los valores z individuales para el contenido de STX5 (Figura 30A).

En cuanto al factor S100A4, los extensos datos de la literatura respaldan su papel, y el de diferentes miembros de su familia de proteínas, en la predisposición al desarrollo y adquisición de fenotipos agresivos en diferentes carcinomas sólidos (179,180). De acuerdo con esto, nuestro perfil proteómico mostró que el contenido en S100A4 de los Exo-DFP era significativamente mayor en casos con CSAG frente a controles (ratio de expresión=2,00, p-valor ajustado<0,001) (Figuras 21 y 30A) y en recaídas y cirugías de intervalo frente a muestras de cirugías diagnósticas/primarias (ratio de expresión=2,19 y p-valor ajustado<0,0001 y ratio de expresión=2,21 y p-valor ajustado=0,016, respectivamente) (Figura 25, A y B). Otros datos adicionales que respaldan el papel potencial de S100A4 en la patogénesis del CO fueron el aumento progresivo de sus valores z a lo largo de la evolución clínica de la enfermedad (Figura 30B).

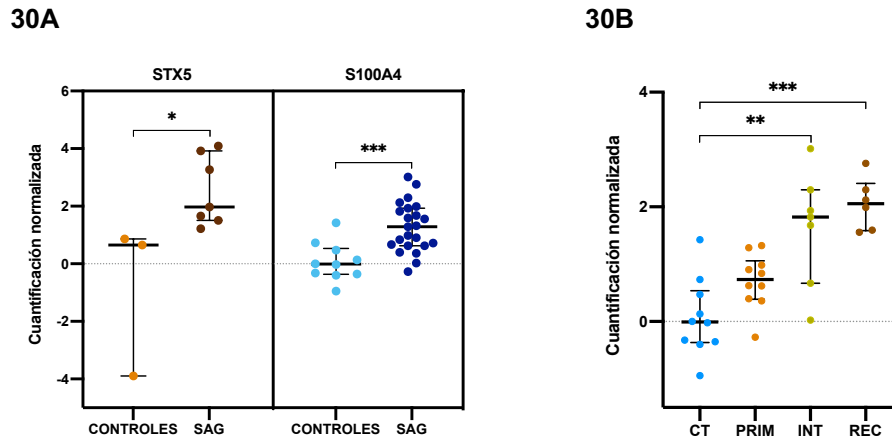


Figura 30. Gráficos relativos a los datos proteómicos de factores proteicos de potencial interés pronóstico y predictivo: S100A4 y STX5. (A) Gráfico de puntos que muestra los valores z individuales de las proteínas S100A4 y STX5 de las muestras de Exo-DFP de los casos con CSAG (SAG) frente a los controles. **(B)** Gráfico de puntos con los valores z individuales de la proteína S100A4, categorizados según el momento quirúrgico, incluyendo muestras no oncológicas (CT, n=10), muestras de Exo-DFP de los casos con CSAG recogidas de cirugías primarias/diagnósticas (PRIM, n=10), de intervalo (INT, n=7) o de recaída (REC, n=6). Valores de significancia (*, p-valor<0,05; **, p-valor<0,01 y ***, p-valor<0,001, prueba de *Mann-Whitney* [A] o prueba de *Kruskal-Wallis* con la prueba de comparaciones múltiples de *Dunn* y p-valores ajustados usando el método de *Bonferroni* [B]). Todos los datos se muestran utilizando la mediana junto con el rango intercuartílico.

Con estas premisas, se llevó a cabo una validación biológica mediante inmunotransferencia en muestras pertenecientes a una cohorte independiente de 22 casos con CSAG y 5 controles que no se incluyeron en el análisis de MS. Con este análisis se pudo confirmar una expresión mayor y estadísticamente significativa de las proteínas STX5 y S100A4 diferencialmente contenidas en las muestras de los casos con CSAG en comparación con los controles (STX5, p-valor=0,0098; S100A4, p-valor=0,008) (Figura 31, A y B; y anexo 7).

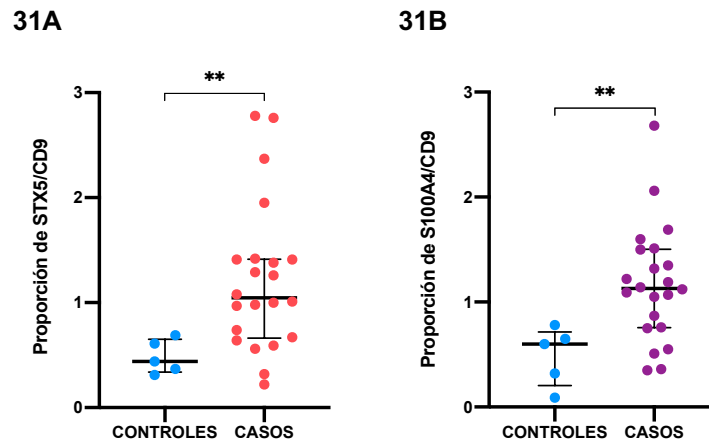


Figura 31. Cuantificación relativa mediante inmunotransferencia de las proteínas de interés en muestras de la cohorte de validación (n=5 controles y n=22 casos de CSAG). (A) Cuantificación normalizada del ratio de expresión de STX5/CD9. **(B)** Cuantificación normalizada del ratio de expresión S100A4/CD9. Las bandas de inmunotransferencia correspondientes a los factores mencionados anteriormente se cuantificaron utilizando el software *Image J* y la proporción normalizada correspondiente se representa en este gráfico como puntos individuales. Valores de significancia (**, p-valor < 0,01, prueba de *Mann-Whitney*). Todos los datos se muestran utilizando la mediana junto con el rango intercuartílico.

A pesar de no haber encontrado una significación estadística que respaldara de manera concluyente el valor predictivo de STX5, se observó cierta tendencia entre un aumento en su expresión y la resistencia terapéutica al último régimen de platino que recibieron aquellos casos que experimentaron progresión clínica tras la toma de la muestra (Figura 32A y anexo 7).

Además, la subclasificación de los casos con CSAG según el origen quirúrgico de la muestra confirmó una mayor relación de S100A4/CD9 para cualquiera de los procedimientos en comparación con los controles, detectando una tendencia consistente con las muestras de recaída y diferencias sólidas al comparar con las muestras primarias (p-valor < 0,01) (Figura 32B y anexo 7).

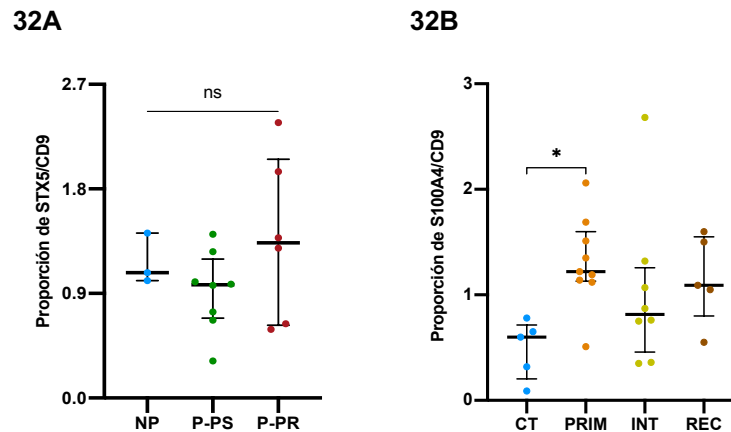


Figura 32. Cuantificación relativa mediante inmunotransferencia de las proteínas de interés en muestras de la cohorte de validación (n=5 controles y n=22 casos con CSAG) en función de la respuesta a platino o del momento quirúrgico. (A) Cuantificación normalizada del ratio de expresión de STX5/CD9 en muestras de casos con CSAG en función de la respuesta a platino: no progresión (NP), n=3; progresión platino-sensible (P-PS), n=8; progresión platino-resistente (P-PR), n=6. **(B)** Cuantificación normalizada del ratio de expresión de S100A4/CD9 en muestras de controles (n=5) y casos con CSAG subclasificadas en función del tipo de muestra quirúrgica: primaria (PRIM), n=9; intervalo (INT), n=8; recaída (REC), n=5. Las bandas de inmunotransferencia se cuantificaron utilizando el software *Image J* y la proporción normalizada correspondiente se representa en este gráfico como puntos individuales. Valores de significancia (*, p-valor < 0,05, prueba de *Kruskal-Wallis* con la prueba de comparaciones múltiples de *Dunn* y p-valores ajustados usando el método de *Bonferroni* [A-B]). Todos los datos se muestran utilizando la mediana junto con el rango intercuartílico.

4.12. Relevancia clínica de los Exo-DFP en el CO

Al comparar los dos principales clústeres obtenidos del mapa de correlación derivados de los datos proteómicos de los 23 casos con CSAG (clúster S-1 vs. S-2), se observaron diferencias significativas en términos de concentración de proteínas (p-valor < 0,01, clúster S-2 contenido estadísticamente mayor que el clúster S-1) y cierta tendencia a una reducción en la cantidad de vesículas en el clúster S-2 vs. S-1 (Figura 33, A y B). Esto podría sugerir una variación en el comportamiento secretor en función del estado de la enfermedad.

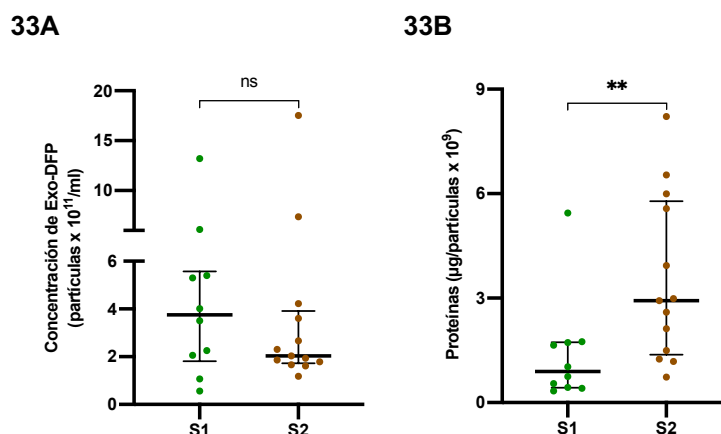
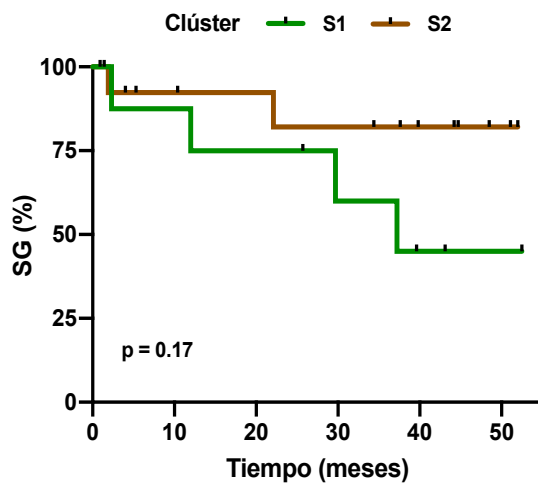


Figura 33. Correlación de los principales clústeres definidos en el análisis proteómico en aquellos casos con CSAG (S-1 vs. S-2) con variables cuantitativas de los Exo-DFP. (A) Asociación de los clústeres S-1 y S-2 con la concentración total de proteínas o **(B)** con la concentración de los Exo-DFP. Valores de significancia (**, p-valor<0,01, prueba de *Mann-Whitney*). Todos los datos se muestran utilizando la mediana junto con el rango intercuartílico.

En cuanto a los resultados de los casos con CSAG, aunque el clúster S-2 (n=13) mostró una tendencia a una supervivencia libre de progresión (SLP) más larga que en el clúster S-1 (n=10), no se vieron diferencias estadísticamente significativas (Anexo 8). En términos de supervivencia global (SG), el clúster S-1 mostró una tendencia hacia una mediana de SG más corta (37,2 meses), en comparación con el clúster S-2 (mediana de SG no alcanzada). La mediana de seguimiento general fue de 34,4 meses (27,7 meses para el clúster S-1 vs. 37,6 meses para el clúster S-2) (Figura 34A).

Cuando se limitó la comparación a los casos con CSAG cuyas muestras se obtuvieron en el momento de la intervención terapéutica inicial (cirugías diagnósticas/primarias e intervalo), esta diferencia resultó ser significativa (29,7 meses, clúster S-1 (n=5) vs. 38,7 meses, clúster S-2 (n=12); mediana de seguimiento general: 37,2 meses, p-valor<0,05) (Figura 34B). Estos resultados van en consonancia con la acumulación preferencial de muestras recogidas de cirugías de rescate en el subc. principal S-1 y sugieren que el contenido de los exosomas no solo está asociado con la histología y el E. del CO, sino también con el resultado clínico de los casos.

32A



32B

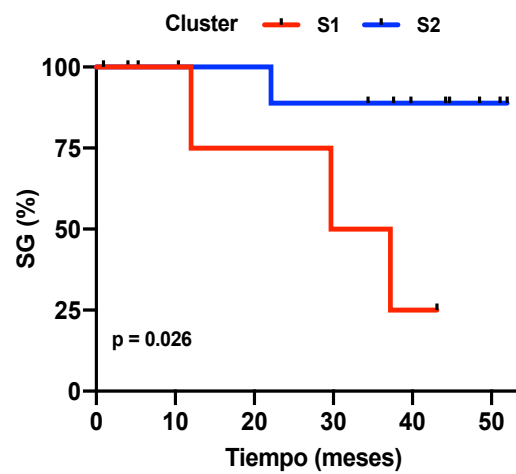


Figura 34. Asociación de los clústeres de los casos con CSAG descritos en el análisis proteómico con la SG (meses). En la gráfica A se incluyeron todas las muestras (S-1, n=10 vs. S-2, n=13), mientras que en la B se excluyeron aquellos casos con enfermedad recurrente (panel derecho; S-1, n=5 vs. S-2, n=12).

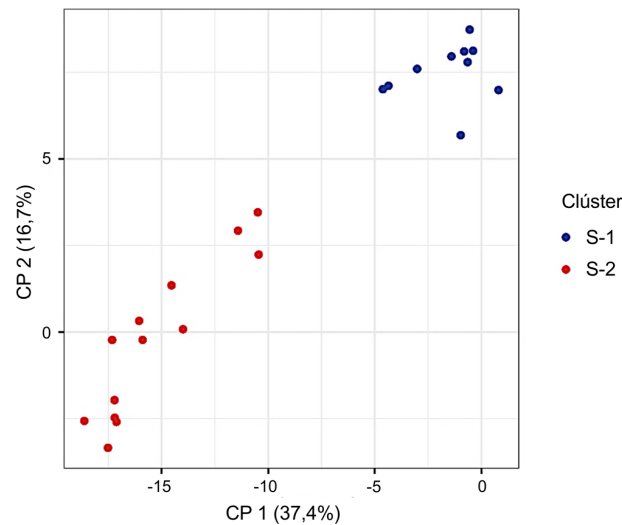
Además de esto, se realizó un PCA considerando las 25 proteínas sobre- o infra- contenidas obtenidas de la comparación entre los clústeres S-1 y S-2 (Tabla 4). Este análisis permitió distinguir claramente las muestras de los casos con CSAG incluidas en cada clúster (Figura 35A), lo que sugiere que este panel de proteínas podría representar una firma molecular de interés clínico para la identificación de pacientes con una mayor probabilidad de presentar una SG prolongada.

Proteínas sobre-contenidas en el clúster S-1				Proteínas sobre-contenidas en el clúster S-2			
Proteína	logFC	t	P-valor ajustado	Proteína	logFC	t	P-valor ajustado
SELENBP1	-1,76	-5,66	4,10E-05	LRG1	1,66	5,20	6,34E-05
PRDX6	-1,73	-5,56	4,10E-05	IGKV3_20	1,66	5,23	5,88E-05
TUBB4B	-1,73	-5,54	4,10E-05	IGHV3_30	1,67	5,30	5,53E-05
UPK1B	-1,73	-5,53	4,10E-05	IGKV3D_7	1,67	5,30	5,53E-05
TUBA1B	-1,73	-5,59	4,10E-05	IGHG2	1,68	5,31	5,53E-05
ACTB	-1,71	-5,47	4,39E-05	TECTA	1,68	5,19	6,41E-05
SSR3	-1,68	-5,27	5,67E-05	IGLC2	1,68	5,28	5,67E-05
ANXA1	-1,68	-5,17	6,48E-05	IGKV1D_33	1,69	5,30	5,53E-05
RRAS	-1,67	-5,24	5,88E-05	IGHA1	1,69	5,36	5,17E-05
CLIC3	-1,64	-5,23	5,88E-05	PMEL	1,70	5,36	5,17E-05
ANXA5	-1,64	-5,12	7,23E-05	CFH	1,70	5,39	4,99E-05
CLIC1	-1,64	-5,12	7,23E-05	C4BPA	1,70	5,43	4,72E-05
CDC42	-1,62	-5,13	7,10E-05	C4BPB	1,71	5,39	4,99E-05
EIF5A	-1,62	-4,95	8,74E-05	C1S	1,72	5,48	4,39E-05
ANXA7	-1,62	-5,02	7,86E-05	IGHV3_72	1,73	5,52	4,10E-05
DDOST	-1,62	-5,06	7,65E-05	IGLC7	1,73	5,55	4,10E-05
ANXA4	-1,62	-5,02	7,86E-05	PROS1	1,73	5,54	4,10E-05
GNB4	-1,61	-5,04	7,86E-05	ZNF317	1,74	5,58	4,10E-05
RDX	-1,61	-4,94	8,96E-05	FCN3	1,76	5,65	4,10E-05
ADH1B	-1,61	-5,02	7,86E-05	IGKC	1,76	5,69	4,10E-05
IPO5	-1,61	-4,95	8,74E-05	C1R	1,78	5,75	4,10E-05
PRNP	-1,61	-5,15	6,81E-05	C1QB	1,78	5,78	4,10E-05
S100A6	-1,60	-4,98	8,41E-05	C1QA	1,78	5,83	4,10E-05
MYL6	-1,60	-4,94	8,96E-05	IGHG1	1,79	5,85	4,10E-05
MYO1D	-1,57	-4,95	8,74E-05	C1QC	1,79	5,85	4,10E-05

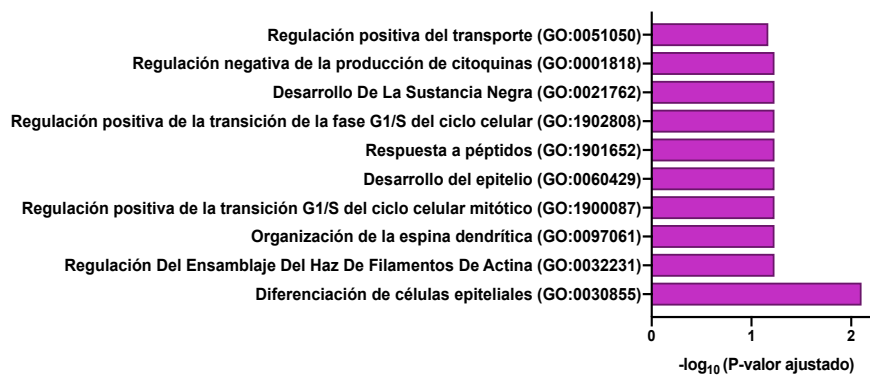
Tabla 4. Listado de las 50 proteínas contenidas en los Exo-DFP con mayor poder discriminatorio entre las muestras pertenecientes al clúster S-1 (n=10) y al clúster S-2 (n=13). El panel izquierdo se refiere a las 25 proteínas contenidas en menor medida en los Exo-DFP en la comparación del clúster S-2 vs. S-1. En cambio, el panel derecho muestra las 25 proteínas con un mayor contenido en los Exo-DFP pertenecientes al clúster S-2. logFC, logaritmo del FC; t, estadística t; P-valor ajustado, p-valor ajustado del algoritmo de Benjamini-Hochberg

El análisis de estas proteínas a través de *Enrichr* reveló un enriquecimiento significativo de categorías funcionales asociadas con la diferenciación epitelial y celular entre las proteínas con mayor contenido en los exosomas del clúster S-1, en el que tendían a acumularse las muestras de cirugías de recaída (Figura 35B). Por otro lado, en el clúster S-2, donde se agrupaban sobre todo muestras de cirugías primarias, se observó un enriquecimiento de proteínas relacionadas con categorías vinculadas a procesos inmunológicos (Figura 35C).

35A



35B



35C

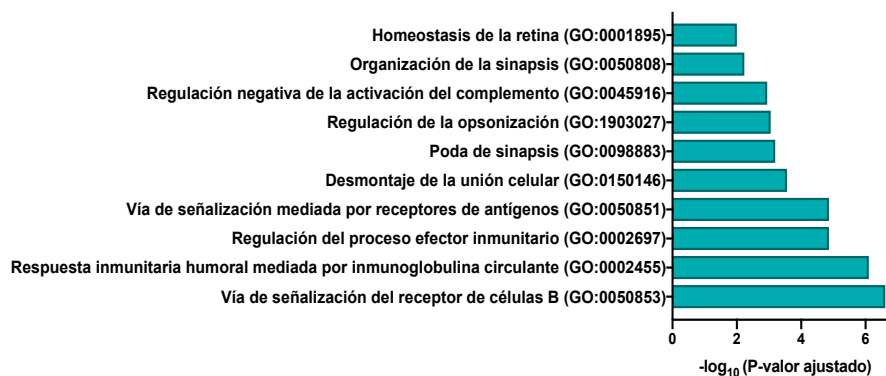


Figura 35. Gráficas que muestran resultados relacionados con los datos proteómicos derivados de la comparación del clúster S-1 vs. S-2. (A) PCA realizado para la comparación del clúster S-1 vs. S-2 considerando los datos proteómicos de los Exo-DFP de las 25 proteínas sobre-contenidas o infra-contenidas en dicho análisis proteómico (mostradas en la Tabla 4). **(B-C)** Categorías funcionales de marcadores enriquecidos en el conjunto de 25 proteínas sobre-contenidas en el clúster S-1 **(B)** o en el clúster S-2 **(C)**. El análisis de enriquecimiento se realizó utilizando la herramienta *in silico* Enrich.

5. DISCUSIÓN

En los últimos años, varios estudios han destacado el papel de las EVs en la patogénesis de diversas enfermedades humanas (127,181). Entre ellas se encuentran los exosomas, un subtipo de SEVs con un tamaño de 30-150 nm, que se originan a partir de endosomas multivesiculares en cualquier tipo celular. Éstos, que acumulan en su interior una amplia variedad de biomoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, son secretados al espacio extracelular y pueden modificar la fisiología de las células receptoras que los internalizan (46).

En el contexto del cáncer, las biomoléculas contenidas en estas vesículas pueden inducir la angiogénesis, promover la comunicación intercelular en el MT y regular la respuesta inmunitaria, así como remodelar la actividad metabólica (182). Consecuentemente, estos procesos influyen en la progresión del tumor, facilitan la formación de nichos premetastásicos y contribuyen al desarrollo de resistencias terapéuticas (47,183). Desde esta perspectiva clínica, el estudio de los exosomas podría ser de gran utilidad para la identificación de marcadores diagnósticos y predictivos e incluso podrían constituir, por sí mismos, una verdadera herramienta terapéutica (127). Además, dado que la secreción extracelular de los exosomas hacia varios fluidos corporales, como la sangre, la orina o el líquido ascítico, es continua, sería posible estudiar mediante aproximaciones no invasivas, cómo las variaciones en el contenido de los exosomas derivados del tumor afectan a su evolución y al desarrollo de resistencias a los fármacos.

En el caso del CO, que sigue representando un problema grave en términos de incidencia y pronóstico, el estudio de los exosomas podría ser crucial por múltiples motivos. Entre ellos, destaca el hecho de que el perfil mutacional y transcriptómico relativamente sencillo de los tumores ováricos se traduce en una escasez de verdaderas alteraciones “*driver*” que puedan ser consideradas como potenciales dianas terapéuticas (184). Esa tasa mutacional, baja en comparación con otros tumores sólidos (185), ha limitado el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, siendo los inhibidores de PARP uno de los pocos avances notables desde la incorporación del bevacizumab a la QT convencional.

Considerando estos antecedentes, resulta obvio que una mejor comprensión del papel de las EVs en la progresión del CO, especialmente en procesos como la diseminación metastásica o la resistencia a terapias, podría tener un impacto terapéutico significativo. Sin embargo, son escasos los trabajos que han estudiado desde un punto de vista clínico las EVs y los exosomas en el contexto del CO. Recientemente, se han realizado esfuerzos considerables para dilucidar qué factores exosomales modulan la patogénesis de esta enfermedad. En este sentido, se han descrito varios hallazgos relacionados con miARNs (165,186,161,187) y, en menor medida, con ciertos factores proteicos evaluados de forma individual o en paneles de bajo rendimiento (166,188,189). Si bien, estos resultados podrían potencialmente trasladarse a la práctica diagnóstica, existe un sesgo muy importante al ignorar el complejo perfil proteómico que estas vesículas tienen.

La variabilidad en los diseños experimentales no solo surge de los posibles marcadores biológicos a estudio, sino también del tipo de muestra empleada, centrándose ésta mayormente en muestras de suero y en modelos *in vitro* de CO (155,161,166,190). Aunque estas muestras ofrecen una recolección no invasiva e ilimitada de EVs, presentan limitaciones, tales como una reducción en la proporción de vesículas tumorales y la ausencia de vesículas del MT, claves en el desarrollo del CO (191). Por el contrario, la ascitis está directamente en contacto con el tumor ovárico y su entorno, lo que resulta en concentraciones significativamente más elevadas de factores tumorales en el líquido peritoneal en comparación con el plasma. Además, la ascitis suele estar presente en altos volúmenes, permitiendo obtener más cantidad de material de entrada y detectar una mayor concentración de EVs en la muestra (192–194). Aunque la caracterización de muestras derivadas de ascitis peritoneales solucionaría estos inconvenientes, la reducida prevalencia de este evento clínico en el contexto del CO limitaría el número de pacientes a incluir en este tipo de estudios.

En base a estos antecedentes, se diseñó un estudio observacional prospectivo, que incluyó pacientes con CO sometidas a laparoscopia diagnóstica o cirugía citorreductora, además de controles sanos que se sometieron a cirugías no oncológicas. De todas ellas se recopilaron fluidos peritoneales con el objeto de aislar exosomas y realizar un exhaustivo análisis proteómico. Se decidió priorizar el estudio de proteínas sobre el ARN, considerando su función como un sistema paracrino esencial que conecta las células tumorales con su entorno (191). El enfoque principal se centró en analizar patrones exosomales en diferentes puntos temporales y examinar su evolución en muestras seriadas. En este sentido, nuestro estudio representa una aproximación de gran utilidad para la identificación de potenciales marcadores pronósticos y predictivos en el contexto del CO.

5.1. Diferencias en cuanto a las variables clínico-patológicas y moleculares de los casos con CO dentro del estudio

Para este estudio se consiguió incluir una cohorte de 65 casos con CO y 29 pacientes sin enfermedad oncológica que habían sido sometidas a cirugías oncológicas o no oncológicas en los distintos centros de HM Hospitales durante el periodo de junio de 2018 a septiembre de 2022.

En nuestra serie de casos con CO, la mayoría fueron diagnosticados con histología SAG (83,1%), que está en línea con lo que habitualmente se diagnostica en la práctica clínica general (22). Además, gran parte de los casos fueron diagnosticados en un E. avanzado de la enfermedad (89,2%). Es importante destacar que del total de los casos con CSAG que se sometieron a pruebas genéticas, el 28% fueron portadores de alguna mutación o alteración en los genes *BCRA1* o *BRCA2*, así como el 48% de éstos mostraron alteraciones en genes relacionados con la reparación del ADN por la RH, en consonancia con lo comúnmente reportado en las principales guías y estudios en CO (22,40,184). En cuanto a la cohorte de pacientes no oncológicas, la heterogeneidad de esta

cohorte, en la que se incluyen eventos clínicos no relacionados con procesos tumorales, garantiza la idoneidad de esta población control.

Con todo esto, se puede afirmar que la detallada información clínica y molecular recopilada durante el estudio resultó fundamental para llevar a cabo los análisis sólidos de correlación. Es igualmente importante mencionar que nuestra serie de casos se caracterizó por su heterogeneidad histológica y por la amplia variabilidad entre las muestras, resaltando la representatividad de la cohorte de casos con CSAG con lo que comúnmente se observa en la práctica asistencial.

5.2. La cantidad de Exo-DFP presenta un comportamiento diferencial en casos y controles y aumenta a medida que avanza la enfermedad y que la paciente es sometida a más líneas de tratamiento

Tras aislar los exosomas por el método de la ultracentrifugación se procedió a confirmar que el pellet obtenido correspondía principalmente a la fracción exosomal mediante NTA, ME y WB de acuerdo a las guías MISEV (45). Dado que todos estos análisis corroboraron que el pellet obtenido a partir del fluido peritoneal estaba enriquecido en exosomas, se pudo asegurar que la estrategia experimental empleada resultaba adecuada para evaluar el contenido de los exosomas y su potencial implicación con el proceso tumoral.

A través de los resultados obtenidos se pudo corroborar que la cantidad obtenida de exosomas concuerda con observaciones previas en estudios que también emplearon líquido ascítico o fluidos peritoneales (161,194,195). Además, es importante destacar que la concentración de partículas obtenida fue superior a lo descrito en otros trabajos que aíslan exosomas a partir del plasma de pacientes con CO (111,165,166). Nuestros resultados sugieren, por tanto, que la ruta más eficaz y óptima para estudiar la evolución del CO podría basarse en el

análisis sistemático de muestras obtenidas de la cavidad peritoneal. Aunque esta aproximación es más invasiva que la obtención de muestras de plasma, el papel clínico de las sEVs y los exosomas peritoneales podría impulsar nuevas líneas de investigación para desarrollar estrategias menos invasivas y perjudiciales con las que obtener muestras directamente de la cavidad peritoneal.

Una vez confirmada la eficiente extracción de vesículas peritoneales se procedió a comparar la cantidad de exosomas obtenida de los casos con CO y de los controles. Se observó que los Exo-DFP de los casos con CO era significativamente mayor en comparación con la obtenida a partir de los controles. Además, se observó una mayor cantidad de proteínas exosomales totales, estadísticamente significativa, en los Exo-DFP de los casos con CO en comparación con los controles. Estos resultados coinciden con estudios anteriores que llevaron a cabo análisis similares en muestras obtenidas del plasma o ascitis de casos con CO (161,165,166,194).

Una vez que se identificó este comportamiento diferencial entre las cohortes estudiadas, se procedió a evaluar si esto se reflejaba en la evolución del proceso tumoral en sí mismo, confirmándose que el subtipo histológico, el E. tumoral, la progresión clínica y el grado de exposición a la QT condicionan fuertemente el número de Exo-DFP en CO. En este sentido, se ha descrito previamente una asociación significativa entre el E. y progresión tumoral y la cantidad de SEVs y exosomas en diferentes tipos de tumores sólidos, como el melanoma, el cáncer de pulmón, cáncer de mama y el CO (68,161,196). Sin embargo, son pocos los artículos en los que se profundiza en este tipo de comparaciones, fundamentalmente por la escasez y las dificultades en el acceso a material biológico de pacientes y por el número limitado de muestras humanas.

En el contexto del CO, se ha demostrado cómo diferentes tipos celulares asociados al tumor (células tumorales, FACs, componente inmunitario, entre otros) determinan un alto grado de heterogeneidad en el número y la composición de las EVs en el entorno tumoral local y distal (191), promoviendo

consecuentemente la transición epitelial-mesenquimal en las células cancerosas receptoras (197), la adquisición de propiedades invasivas (189,198), la resistencia al platino (199) y el tropismo preferencial hacia tejidos omentales ricos en adipocitos (200). Sin embargo, estos estudios se basaban igualmente en un número limitado de muestras biológicas o partían de modelos *in vitro* humanos o modelos murinos.

Si bien las modificaciones en el estado de *BRCA* o de la RHD no produjeron cambios significativos en el perfil diferencial de los Exo-DFP, es importante destacar que la histología, el E. tumoral y la progresión en el CO son factores clave de variabilidad en estas vesículas. Por lo tanto, la concentración de los Exo-DFP podría ser un indicador valioso para monitorizar la progresión de la enfermedad y podría tener implicaciones importantes en el desarrollo de biomarcadores para el CO. Además, a diferencia de estudios previos, nuestro trabajo de investigación, basado en una cohorte con un tamaño muestral considerable y una amplia recopilación de información clínica recogida de cada paciente, nos ha permitido hacer un seguimiento exhaustivo de la evolución de la enfermedad y del paciente.

5.3. El contenido proteico exosomal total está asociado con perfiles clínicos de los casos con CO

Cuando el contenido proteico total de los Exo-DFP se cuantificó mediante BCA, se observó que dicho contenido proteico por partícula llegaba a ser 2-3 veces mayor en los casos con CO diagnosticados en etapas tardías de la enfermedad comparados con los controles y tumores en etapas tempranas. Vale la pena mencionar que los valores correspondientes a los E. III-IV son 10 veces más altos que los observados por otros autores en SEVs obtenidos del suero de pacientes control (201), lo que puede estar relacionado con un comportamiento secretor activo del CO y su MT en etapas avanzadas.

De manera similar a los datos cuantitativos sobre el número de Exo-DFP, se detectaron diferencias significativas en la concentración de proteínas totales al comparar casos con CSAG y controles. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los subtipos histológicos restantes y la población control. Este hecho puede deberse a que las histologías no SAG estuvieron poco representadas en nuestro estudio, lo que está en concordancia con lo observado frecuentemente en la práctica clínica y en diferentes estudios moleculares de CO (22,202). Además, la mayoría de estas histologías no SAG se diagnosticaron en etapas tempranas, lo que podría ser un factor de confusión clave en el análisis e interpretación de resultados. Por todos estos motivos, se decidió realizar todos los análisis subsecuentes teniendo solo en cuenta los resultados obtenidos a partir de muestras de casos con CSAG.

Contrariamente a la tendencia observada en relación al número de Exo-DFP, el contenido proteico exosomal total de los casos con CSAG decrecía a medida que la enfermedad avanzaba. Aunque algunos estudios han analizado la evolución del número de EVs a lo largo de la enfermedad en el CO y otros tipos de tumores (161,196), la falta de estudios previos que profundicen en este tema, especialmente en el CO, y lo relacionen con el contenido vesicular, hace necesaria la validación de este comportamiento dual en series independientes. Un hecho que podría explicar los resultados obtenidos es el posible efecto citotóxico que la QT desencadena sobre las distintas poblaciones del MT, lo que genera variaciones en las frecuencias de los distintos clones tumorales a lo largo del tiempo (203) e indirectamente induce cambios en el número de determinadas poblaciones inmunes o células estromales, que no necesariamente han de presentar los mismos ratios de secreción que las EVs y el mismo contenido proteico (204). En definitiva, es posible que los Exo-DFP aislados de los fluidos peritoneales y la ascitis de nuestra serie de casos provengan de diversos orígenes celulares, y que su perfil proteómico sea el reflejo de la heterogeneidad tumoral provocada por la progresión de la propia enfermedad o por los efectos de la QT en el MT (205). Con todo esto, nuestros datos refuerzan el posible valor

pronóstico de la cuantificación del contenido proteico de los exosomas que se encuentran en los fluidos peritoneales de casos con CO.

En relación con el análisis del contenido proteico total de los Exo-DFP de los casos en función del perfil mutacional del gen *BRCA1/2* o del estado del sistema de reparación del ADN por la RH, se observó una tendencia, no significativa, hacia un mayor contenido proteico exosomal en aquellas muestras de casos sin alteraciones en estas vías. De esta manera, cabe destacar que los test moleculares que se utilizan en la práctica asistencial se centran o en un panel limitado de genes o en algoritmos que calculan indirectamente las alteraciones derivadas (pérdida de heterocigosidad, desbalances alélicos, o transiciones de gran tamaño) de defectos en la RH (36,206). Sin embargo, una de las limitaciones de estas aproximaciones moleculares es el asumir inequívocamente la presencia de mutaciones deletéreas en homocigosis. En segundo lugar, independientemente del tipo de cáncer, los valores definidos para considerar HRD se sitúan en un score de 42 (207), lo que abre la pregunta de si estos límites son válidos para seleccionar tumores con la vía de la RHd en el contexto del CSAG.

Además, tal y como se ha visto en análisis anteriores, es razonable suponer que tanto el momento de la enfermedad y el tratamiento con QT son las principales fuentes de variabilidad en el contenido proteico de los Exo-DFP. Por otra parte, se han documentado mutaciones de reversión en genes relacionados con la vía de la RH, como en *BRCA1/2*, así como modificaciones epigenéticas y otros factores (208) que podrían estar afectando igualmente a los resultados observados. Aun con estas premisas, consideramos que el número de casos estudiados es limitado y que se requiere de confirmación en estudios independientes para validar esta falta de asociación.

5.4. Los Exo-DFP extraídos de los casos con CO contenían biomarcadores relacionados con el CO

Mediante la caracterización proteómica de los Exo-DFP a través de la LC-MS/MS, se identificaron un total de 1825 proteínas, de las cuales un alto porcentaje de éstas tenían un origen exosomal. Estos hallazgos son complementarios con las mediciones del tamaño de partícula realizadas por NTA y coinciden con resultados de estudios previos que muestran un alto porcentaje de proteínas de origen exosomal (95,166,209). Conjuntamente, estos datos denotan la eficiencia de nuestro enfoque experimental en la obtención, tras el final del proceso de aislamiento mediante la ultracentrifugación, de un pellet enriquecido en exosomas.

Por otro lado, se quiso estudiar si el contenido proteico de los Exo-DFP podría ser diferente en las muestras de los casos con CO y controles. Para ello, se recurrió a un análisis de correlación no supervisado basado en el perfil proteico de cada muestra incluida. Este análisis mostró una separación robusta entre las muestras de los casos con CO y los controles. Hay que mencionar que la única muestra tumoral que se clasificó en el clúster de los controles correspondía a una muestra de una paciente que desarrolló un tumor endometriode, de bajo grado y con un E. bajo, que luego exhibió una respuesta completa sin necesidad de administrarle QT, siendo por tanto un tumor muy poco agresivo. Estos hallazgos sugieren que los procesos tumorales pueden alterar significativamente los patrones del contenido exosomal y respaldan la elección de la población control para la identificación de marcadores diagnósticos. De manera paralela, la presencia de diferentes clústeres entre los casos de CO no puede explicarse únicamente por la inclusión de histologías no SAG, sino también por otras variables clínicas que son capaces de diferenciar distintos clústeres de casos con CSAG.

Cuando se eliminaron aquellos casos con histología no SAG para tener una muestra más homogénea, se volvió a recurrir al análisis de correlación no supervisado. En esta ocasión volvieron a surgir notables diferencias entre los casos con CSAG y los controles. Además, se identificaron dos clústeres bien diferenciados entre los casos con CSAG en función del origen de la muestra: uno en el que se agrupaban muestras procedentes de cirugías diagnósticas/primarias (Clúster S-2) y otro en el que predominaban y se agrupaban las muestras de cirugías de recaída (Clúster S-1). Este patrón, confirmado mediante un análisis de PCA, se alinea con el trabajo recientemente publicado por *Cunnea et al.* (210), en el que se describe cómo el momento de desarrollo de la enfermedad determina una heterogeneidad tumoral espacial y temporal. En este sentido, se puede considerar que dicha heterogeneidad tisular podría traducirse en un distinto comportamiento de secreción y en un contenido vesicular variable (195,211,212).

Otro aspecto relevante de nuestra investigación fue confirmar el origen maligno de los Exo-DFP obtenidos de los casos con CO. En este sentido, se identificó la presencia de la proteína PAX8 en todos los casos con CO analizados. PAX8 representa un marcador de células tumorales derivadas de las células secretoras de la trompa de Falopio (CO serosos, endometrioides y de células claras), cuya expresión se ha demostrado esencial para la proliferación del CO (213). Aunque es cierto que ciertas patologías ováricas benignas pueden mostrar positividad para esta proteína (214,215), estos mismos estudios han demostrado que la frecuencia de expresión de PAX8 en tumores ováricos benignos es significativamente menor (0,40 y 0,16, respectivamente) en comparación con neoplasias malignas ováricas (0,74 y 0,79, respectivamente), proporciones que aumentan cuando el análisis se restringe a tumores malignos de origen seroso (0,93). Estas frecuencias son también similares a las encontradas en nuestro propio trabajo, ya que se detectó positividad en 1 control (quiste mucinoso) de los 7 analizados (que también incluyeron 2 miomas uterinos, un cistoadenoma mucinoso, una endometriosis, un endometrio atrófico y un quiste seroso) y

positividad en los 13 casos con CO, implicando frecuencias de 14,3% vs. 100% en controles vs. casos con CO, respectivamente.

De igual manera, nuestro estudio valida hallazgos previos de investigaciones proteómicas, donde se identificaron proteínas diferencialmente expresadas en muestras pareadas de casos con CO (tejido tumoral vs. tejido normal) y al comparar muestras de CO y controles (en orina y suero) (178). Se confirmó la sobreexpresión de 7 de los marcadores proteicos encontrados en estos estudios, con diferencias estadísticamente significativas. La falta de asociación para los restantes marcadores podría atribuirse no solo al origen diferente de las muestras, sino también a la contribución del MT al perfil proteómico de los Exo-DFP derivados del CO, pudiéndose diluir tal efecto en muestras no derivadas de la cavidad peritoneal.

En este sentido, *Lai et al.* establecieron recientemente una posible firma diagnóstica en el CO basada en la determinación de tres proteínas (FGG, APOA4 y MUC16 [también conocida como CA125]) en la fracción exosomal de muestras de sangre (166). Si bien nuestros resultados respaldan el potencial papel diagnóstico para FGG y APOA4 en Exo-DFP, no se confirmó lo mismo para MUC16 (CA125). Además, este último resultado está en línea con la mayoría de los estudios clínicos previos que han intentado validar extensamente CA125 como marcador del CO. También cabe destacar que a pesar de la inclusión de un gran número de pacientes en estos estudios, la especificidad de este enfoque aún es limitada y debe considerarse en conjunto con otros procedimientos diagnósticos adicionales (216,217). Una explicación alternativa implicaría que MUC16 ejerce su papel como biomarcador en forma soluble y que su incorporación en vesículas representa un evento minoritario, siendo consistente con procesos de selectividad en la inclusión de biomoléculas en los exosomas y las SEVs (218).

5.5. El perfil del contenido proteico de los Exo-DFP reveló factores asociados a variables clínicas específicas del CO

La correlación de los perfiles proteómicos con los distintos momentos quirúrgicos demostró una capacidad significativa de discriminación de los distintos procedimientos en función del contenido vesicular. Sin embargo, los análisis de correlación no supervisados realizados para otras variables clínicas de interés mostraron que el perfil proteómico no logra discriminar correctamente entre los grupos a estudio.

Más concretamente, en la comparación de las muestras basadas en el perfil mutacional, se observó un clúster con el 80% de muestras con mutaciones en genes relacionados con la vía de la RH, mientras que en el otro clúster solo el 58% de las muestras mostraban algún tipo de mutación en estos genes relacionados con la vía de la RH. En la actualidad, hasta un 50% de los casos de CSAG portan mutaciones causales en genes relacionados con la vía de la RH (22,40). Como se ha mencionado anteriormente, las pruebas moleculares usadas en la actualidad en la práctica asistencial para caracterizar defectos en los genes de la vía de la RH utilizan paneles que incluyen genes de alta penetrancia para el desarrollo del CO, con lo que caracterizando una gran mayoría de las potenciales alteraciones causales se aporta una gran eficiencia diagnóstica. Sin embargo, cabe la posibilidad de que existan otros genes de baja penetrancia no incluidos a estudio en los paneles genómicos o que algunos de los casos inicialmente asignados como portadoras de defectos en genes de la RH representen en realidad pacientes con alteraciones en heterocigosis y, por lo tanto, clasificables como individuos wt, lo que alteraría considerablemente las conclusiones obtenidas a partir del agrupamiento. Además, la vía de la RH no es canónica ya que se han reportado mutaciones de reversión en genes asociados a esta vía (208,219). En este sentido, determinar qué otros factores intervienen en la génesis del CO podría arrojar luz a estos resultados. Alternativamente, estos hallazgos sugerirían que la base molecular del CO, a

diferencia del momento de la enfermedad, no son determinantes del contenido vesicular.

En cuanto al análisis de las muestras de casos platino-sensibles y resistentes, la obtención de resultados significativos en función del perfil proteómico no tiene cabida dado lo reducido del tamaño muestral y la baja representatividad de muestras provenientes de casos platino-resistentes. Otro potencial factor a considerar sería el gran número de proteínas incluidas en los análisis; en este sentido, restringir el número de proteínas mediante un análisis bioinformático basado en permutaciones podría identificar una firma capaz de discriminar con precisión las muestras a estudio en función de la respuesta a agentes de platino.

Acotando el número de PDCs asociadas a cada variable clínica de interés, se observaron determinadas proteínas que aparecían desreguladas de forma significativa en varias de las comparaciones de interés. Entre ellas, cabe destacar proteínas asociadas a la vascularización endotelial (SETSIP), involucradas en los procesos de captación celular de hierro y de la coagulación (FTL, TF, FGA, FGB, FGG), proteínas vinculadas al tráfico de vesículas (tales como STX5 y TMED2 y TMED 7), proteínas relacionadas con el proceso de transporte y fusión de membrana de las EVs (familia de las ANXAs) o proteínas implicadas en diversos procesos celulares como la progresión del ciclo celular y la diferenciación (S100A4 o COL3A1, respectivamente). Algunas de estas proteínas han sido descritas como factores de mal pronóstico en diversos tipos tumorales (220–224), lo que sugiere que igualmente podrían representar biomarcadores de interés clínico en el CO.

El análisis detallado de aquellos procesos biológicos en los que estaban implicadas aquellas proteínas descubiertas en los análisis proteómicos a través de las distintas comparaciones (SAG vs. controles, comparaciones de las muestras recogidas en distintos momentos quirúrgicos, muestras de casos platino-sensibles frente a muestras de casos platino-resistentes, muestras de casos con mutaciones en *BRCA1/2* frente a casos sin mutaciones patogénicas)

revelaron una asociación recurrente con categorías funcionales relacionadas con la cascada de complemento/coagulación, con la respuesta inmune, la vía PI3K/AKT/mTOR, la transición epitelio-mesénquima, diferentes procesos metabólicos e hipoxia.

El mayor contenido de factores del complemento en los Exo-DFP de las muestras propias de estados avanzados de la enfermedad podría estar relacionada con hallazgos previos que sugieren que la activación extracelular de esta cascada por los macrófagos asociados a tumores representa un mecanismo innato de inmunosupresión que mantiene un estado inflamatorio crónico promoviendo la progresión tumoral (225,226). Además, vale la pena señalar la estrecha relación entre la inflamación peritoneal y el inicio y progresión del CSAG (227).

Por otro lado, la FO y el procesamiento de ácidos grasos se incluían entre los cambios metabólicos desregulados en nuestro estudio. La participación de estos procesos es coherente con la reprogramación metabólica que pueden experimentar los tumores ováricos, permitiéndoles priorizar la FO sobre la glucólisis para alimentar las células tumorales en condiciones de hipoxia (228). Notablemente, la dependencia del CSAG en la FO se ha asociado no solo con un aumento de la supervivencia (229) y la proliferación de células madre iniciadoras de cáncer, sino también con una mayor quimiosensibilidad de poblaciones tumorales con altas tasas de FO (229).

Otra vía destacable es aquella relacionada con genes y FTs regulados por el oncogén *MYC*. Se sabe que *MYC* codifica una serie de proteínas que son las más comúnmente activadas en las neoplasias humanas (230,231). Más concretamente, se ha descrito el papel de *MYC* en el CO fomentando la evasión de la respuesta inmune, la progresión y la adquisición de fenotipos agresivos, correlacionándose con una menor SG (232–234). También se ha descrito que su papel oncogénico puede ir ligado a los exosomas (235–237).

Todos estos hallazgos indican que aquellas proteínas que estaban sobrecontenidas en los Exo-DFP de muestras de peor pronóstico están involucradas en múltiples procesos oncogénicos, lo que podría ser un reflejo fiel de la progresión tumoral y de su heterogeneidad celular intrínseca.

5.6. Los estudios de validación respaldan un papel protumorigénico de S100A4 y STX5 derivados de Exo-DFP en los casos con CO

Considerando los datos previamente publicados sobre nuestro conjunto de PDCs, se procedió a la validación biológica de ciertas proteínas de interés mediante técnicas alternativas a la MS (inmunotransferencia). La selección de STX5 y S100A4 como potenciales marcadores pronósticos y predictivos a validar en una serie independiente se sustentó igualmente en las funciones protumorales descritas hasta aquel momento para ambos factores.

En este sentido, STX5 es un miembro de la familia de las proteínas sintaxinas, que funcionan como proteínas integrales de membrana, desempeñando un papel crucial en la exocitosis y la fusión de vesículas. También se han descrito ampliamente múltiples propiedades oncogénicas asociadas a esta familia, tales como la adquisición de fenotipos tumorales, la promoción de capacidades invasivas, la autofagia, la muerte celular programada, la activación de quinasas necesarias para el origen de las células cancerosas y la resistencia a la QT (238,239). Además, STX5, ha sido asociada a procesos de adhesión celular, y modula la actividad de la vía PI3K/m-TOR, restringiendo la adhesión celular y favoreciendo así la metástasis en el carcinoma hepatocelular (223). Aunque los mecanismos pro-tumorales mediados por STX5 en el CO aún deben ser dilucidados, nuestros resultados demuestran que su inclusión en los Exo-DFP está asociada con la progresión del CO y, en menor medida, con el grado de respuesta a la QT. Estos resultados están además en consonancia con funciones análogas observadas en otros miembros de su familia proteica que median su efecto a través de su incorporación en SEVs, como es el caso de STX6 (240,241).

Por otro lado, estudios previos han asociado la sobreexpresión tanto de S100A4 como de otros miembros de su familia con el desarrollo de metástasis a través de funciones intra- y extracelulares. Varios componentes tumorales (células cancerosas, FACs o células inmunes) son capaces de secretar S100A4 al medio extracelular, resaltando que su potencial protumorigénico puede estar en parte mediado por su inclusión en SEVs (242,243). Aludiendo a su participación en el desarrollo del CO, varios estudios han descrito su papel en la inducción de metástasis y quimioresistencia (179,221,244), y su uso potencial como marcador pronóstico líquido para estos tumores (245). En consonancia con estas afirmaciones, nuestros resultados demuestran que el papel oncogénico de S100A4 en el CO está mediado, en cierto grado, por su secreción a través de los Exo-DFP y que podría servir como un biomarcador de gran interés pronóstico para el CO.

5.7. La carga proteómica de los Exo-DFP se correlaciona con la SG y revela la presencia de vías biológicas que podrían influir en aspectos clínicos de las pacientes

Es necesario destacar los resultados que unifican los aspectos moleculares con los clínicos. En este sentido, este estudio representa un paso adelante en la comprensión de dicha relación. Al diferenciar dos clústeres dentro del grupo de casos con CSAG en base a su perfil proteómico, se buscó explorar si estas distinciones se manifestaban también en aspectos clínicos. A pesar del tamaño reducido de la muestra, se observaron variaciones significativas en la SG, especialmente al centrar nuestra atención en muestras recolectadas en los momentos iniciales de la enfermedad. Esto sugiere que el contenido vesicular podría ser un prometedor marcador para predecir el comportamiento clínico de los casos con CO en etapas iniciales de la enfermedad. Esta hipótesis se alinea por tanto con otros trabajos que han relacionado el contenido vesicular con la SG en el CO (161,186,193).

En base a nuestros resultados, se pretendió determinar si pequeños paneles de proteínas podrían presentar suficiente capacidad para distinguir eficazmente entre las muestras de los clústeres a estudio. En este sentido, limitando nuestro análisis a aquellas 25 proteínas más sobre o infracontenidas en los Exo-DFP de la comparación de los clústeres S-1 y S-2, se observó una discriminación total entre las muestras de los casos con CSAG incluidos en cada clúster. Este resultado sugiere que dicho panel de proteínas podría representar una firma molecular para la identificación de pacientes con probabilidad de presentar una mayor SG. Vale la pena mencionar que la correlación entre nuestra firma pronóstica y otras firmas bien validadas basadas en tejido de CSAG (246) demostraron que, a pesar de basarse en herramientas “ómicas” diferentes y en materiales biológicos distintos, existía cierto grado de correlación entre ambos estudios. En este sentido, de los 126 genes pertenecientes a la firma de *Yoshihara et al.*, nuestro estudio detectó la expresión de 8 (6,3%) de sus correspondientes proteínas en todas las muestras de nuestra cohorte de casos con CSAG. Curiosamente, 6 de estas 8 proteínas mostraron un contenido diferencial significativo en nuestras muestras de Exo-DFP y un sentido de la expresión acorde con el descrito en dicho estudio previo (246).

Cabe destacar que el análisis mediante *Enrichr* de las proteínas incluidas en nuestra firma pronóstica reveló un enriquecimiento de categorías funcionales relacionadas con la diferenciación epitelial en proteínas sobre-contenidas en el clúster S-1, donde tendían a acumularse las muestras procedentes de cirugías de rescate tras recaída. Por otro lado, y en consonancia con lo descrito por *Yoshihara et al.* (246), varias categorías relacionadas con procesos inmunes estaban enriquecidas entre las proteínas sobre-contenidas en el clúster S-2, donde tendían a agruparse las muestras primarias. Estos hallazgos, que concuerdan con los observados en comparaciones anteriores (casos con CSAG vs. controles y recidivas vs. muestras primarias/diagnósticas o Figura 28), apoyan un papel clave de los procesos inmunitarios en la tumorigénesis del CSAG y concuerdan con comunicaciones anteriores que asocian la actividad del sistema inmunitario a un mejor curso clínico (247).

En consonancia con estos hallazgos, varios estudios sobre el CO han demostrado cómo las SEV derivados de ascitis inducen, *in vitro*, la inactivación de linfocitos CD3 y CD8, (248,249) y la activación de macrófagos M2 (250), lo que conduce a la progresión de la enfermedad. Globalmente, nuestros resultados no sólo confirman el papel de estas vesículas relacionadas con el tumor en la modulación del microambiente inmunitario, sino que también demuestran por primera vez su asociación con el desenlace de la enfermedad. Esto podría tener un impacto en el estudio y desarrollo de nuevos tratamientos con inmunoterapia en el cáncer en general, pero también en el CO específicamente. Si bien, a día de hoy, existen dos agentes inhibidores de los puntos de control que tienen indicación agnóstica para el CO (pembrolizumab y dostarlimab) (251,252), estos tratamientos están limitados a un grupo muy específico dentro de esta población (253). Sin embargo, este potencial deberá determinarse con más detalle en futuros estudios.

En conclusión, consideramos que el estudio de los cambios dinámicos que se producen en el contenido de los Exo-DFP puede contribuir a la identificación de una firma pronóstica, como demuestra la correlación significativa de su perfil proteómico con la SG en nuestra cohorte de casos con CSAG. Aunque nuestro estudio y el trabajo previo de *Yoshihara et al.* (246) se basan en diferentes enfoques moleculares (transcriptómica vs. proteómica) y en diferentes muestras biológicas (tejido tumoral vs. Exo-DFP), la correlación observada entre ambas firmas corrobora el potencial pronóstico de la caracterización del contenido de los Exo-DFP en el CSAG.

5.8. Aspectos destacables y principales limitaciones de nuestro estudio

Hasta donde sabemos, nuestro estudio prospectivo es pionero en realizar un extenso análisis proteómico en muestras de CO derivadas del peritoneo e integrar datos de supervivencia y otras variables clínicas recogidas de forma habitual en la práctica asistencial de esta enfermedad. Este enfoque nos ha

permitido evaluar de manera longitudinal la progresión clínica de la enfermedad, demostrando el potencial del estudio del contenido de los Exo-DFP en la identificación de factores y firmas pronósticas. En particular, se ha podido identificar en los Exo-DFP proteínas protumorales y vías moleculares específicas que podrían desempeñar un papel clave en la comunicación intercelular del MT.

A pesar de contar con un amplio número de muestras de la cavidad peritoneal provenientes de casos con diversas histologías de CO, es importante destacar la necesidad de disponer tanto de una cohorte adecuada de pacientes que actúen como población control como de una cohorte amplia de validación. Aunque esto nos ha permitido confirmar el papel protumoral de ciertas proteínas tales como S100A4 y STX5, sería conveniente realizar una validación biológica más detallada mediante algún método proteómico alternativo.

En cuanto a la homogeneidad de las muestras, no habría que dejar de insistir en la obtención de un número mayor de muestras con histologías no SAG. En este sentido, sería recomendable realizar un estudio multicéntrico que involucre a diversos centros hospitalarios. Esto permitiría obtener una cantidad de muestras representativa y también incorporar muestras ginecológicas no oncológicas más homogéneas, lo que contribuiría a obtener resultados más claros.

Aun precisando de estudios independientes que comprendan cohortes más grandes de casos y controles para corroborar los hallazgos obtenidos, nuestro trabajo representa un sólido punto de partida en el estudio del papel de los exosomas en el desarrollo y progresión del CO y, en particular, del CSAG.

6. CONCLUSIONES

1. La aproximación experimental empleada permitió una extracción sistemática, eficaz y longitudinal de los exosomas a partir de los fluidos peritoneales de casos con CO. Por tanto, estas muestras podrían resultar de interés en la identificación de factores pronósticos y predictivos.
2. El análisis de las variables cuantitativas, número de Exo-DFP y cantidad de proteína exosomal total, mostró correlaciones significativas con el tipo de muestra (caso con CO vs. control), el momento clínico de la enfermedad (cirugías primarias, de intervalo o de recaída) y el grado de exposición a la QT. Esto refleja un dinamismo en la frecuencia de secreción y en el contenido de dichos Exo-DFP.
3. La presencia de PAX8 y de otros marcadores proteicos previamente asociados al diagnóstico y progresión del CO confirmó el origen tumoral de los Exo-DFP extraídos y avaló la posterior consecución de los estudios proteómicos.
4. Basándonos en los estudios de correlación, los perfiles proteómicos de los Exo-DFP varían significativamente durante la oncogénesis ovárica y demuestran que el principal factor que influye en la variabilidad del CSAG es el momento clínico de la enfermedad y, en menor medida, el tratamiento quimioterapéutico.
5. Las PDCs entre las distintas comparaciones estudiadas han permitido definir factores y categorías funcionales potencialmente implicadas en el origen, progresión y grado de respuesta a fármacos.
6. Los resultados proteómicos que sugerían un papel protumoral de los factores S100A4 y STX5 han sido confirmados en una cohorte independiente de validación mediante técnicas moleculares alternativas. Esto sugiere que estas proteínas podrían ser potenciales biomarcadores diagnósticos en el CSAG.
7. El contenido proteico de los Exo-DFP aislados a partir de lavados peritoneales de cirugías diagnósticas/primarias se correlacionó con la tasa de SG. Además, permitió generar una firma proteica pronóstica, avalando estudios transcripcionales de grupos independientes llevados a cabo en tejidos tumorales.

8. Conforme a nuestros hallazgos, el análisis de los Exo-DFP procedentes de lavados peritoneales representa una herramienta clínica de gran interés, dado que recapitula la heterogeneidad fenotípica inherente no solo al tumor primario sino también a las lesiones secundarias desarrolladas dentro de la cavidad peritoneal.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin.* mayo de 2021;71(3):209-49.
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer.* 5 de abril de 2021;
3. Home | Redecan [Internet]. [citado 2 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://redecan.org/es>
4. Las cifras del cáncer en España en 2023 [Internet]. 2023 [citado 2 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://fero.org/es/2023/03/09/las-cifras-del-cancer-en-espana-en-2023/>
5. Asociación Española Contra el Cáncer [Internet]. [citado 2 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.contraelcancer.es/es>
6. Redondo A, Guerra E, Manso L, Martín-Lorente C, Martínez-García J, Pérez-Fidalgo JA, et al. SEOM clinical guideline in ovarian cancer (2020). *Clin Transl Oncol.* mayo de 2021;23(5):961-8.
7. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, et al. Ovarian cancer statistics, 2018: Ovarian Cancer Statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* julio de 2018;68(4):284-96.
8. Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health.* 2019;11:287-99.
9. Toss A, Tomasello C, Razzaboni E, Contu G, Grandi G, Cagnacci A, et al. Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes. *Biomed Res Int.* 2015;2015:341723.
10. Andrews L, Mutch DG. Hereditary Ovarian Cancer and Risk Reduction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* mayo de 2017;41:31-48.
11. Rossing MA, Cushing-Haugen KL, Wicklund KG, Doherty JA, Weiss NS. Menopausal hormone therapy and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* diciembre de 2007;16(12):2548-56.
12. Glud E, Kjaer SK, Thomsen BL, Høgdall C, Christensen L, Høgdall E, et al. Hormone therapy and the impact of estrogen intake on the risk of ovarian cancer. *Arch Intern Med.* 8 de noviembre de 2004;164(20):2253-9.
13. Wernli KJ, Newcomb PA, Hampton JM, Trentham-Dietz A, Egan KM. Hormone therapy and ovarian cancer: incidence and survival. *Cancer Causes Control.* agosto de 2008;19(6):605-13.
14. Lacey JV, Mink PJ, Lubin JH, Sherman ME, Troisi R, Hartge P, et al. Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer. *JAMA.* 17 de julio de 2002;288(3):334-41.
15. Sampson JA. ENDOMETRIAL CARCINOMA OF THE OVARY, ARISING IN ENDOMETRIAL TISSUE IN THAT ORGAN. *Arch Surg.* 1 de enero de 1925;10(1):1.
16. Pavone ME, Lyttle BM. Endometriosis and ovarian cancer: links, risks, and challenges faced. *Int J Womens Health.* 2015;7:663-72.
17. Mogensen JB, Kjær SK, Møller L, Jensen A. Endometriosis and risks for ovarian, endometrial and breast cancers: A nationwide cohort study. *Gynecol Oncol.* octubre de 2016;143(1):87-92.
18. Fathalla MF. Incessant ovulation—a factor in ovarian neoplasia? *Lancet.* 17 de julio de 1971;2(7716):163.
19. Casagrande JT, Louie EW, Pike MC, Roy S, Ross RK, Henderson BE. «Incessant ovulation» and ovarian cancer. *Lancet.* 28 de julio de 1979;2(8135):170-3.
20. Balasch J, González-Merlo J. Estimulación folicular ovárica y riesgo de cáncer ginecológico (con especial referencia al cáncer de ovario).

- Progresos de Obstetricia y Ginecología. 1999;42(9):611-42.
21. Calvo Cebrián A, Monge Ropero N, Gómez Moreno R. Detección precoz del cáncer de ovario. *Medicina Integral*. 2002;40(8):354-7.
 22. González-Martín A, Harter P, Leary A, Lorusso D, Miller RE, Pothuri B, et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. agosto de 2023;S0923753423007974.
 23. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. *The Lancet*. octubre de 2014;384(9951):1376-88.
 24. Koshiyama M, Matsumura N, Konishi I. Subtypes of Ovarian Cancer and Ovarian Cancer Screening. *Diagnostics (Basel)*. 2 de marzo de 2017;7(1):12.
 25. Kurman RJ, Shih IM. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol*. julio de 2011;42(7):918-31.
 26. Köbel M, Reuss A, du Bois A, Kommoss S, Kommoss F, Gao D, et al. The biological and clinical value of p53 expression in pelvic high-grade serous carcinomas. *J Pathol*. octubre de 2010;222(2):191-8.
 27. Shih IM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*. mayo de 2004;164(5):1511-8.
 28. Munksgaard PS, Blaakaer J. The association between endometriosis and ovarian cancer: a review of histological, genetic and molecular alterations. *Gynecol Oncol*. enero de 2012;124(1):164-9.
 29. Hollis RL, Thomson JP, Stanley B, Churchman M, Meynert AM, Rye T, et al. Molecular stratification of endometrioid ovarian carcinoma predicts clinical outcome. *Nat Commun*. 5 de octubre de 2020;11(1):4995.
 30. Leskela S, Romero I, Rosa-Rosa JM, Caniego-Casas T, Cristobal E, Pérez-Mies B, et al. Molecular Heterogeneity of Endometrioid Ovarian Carcinoma: An Analysis of 166 Cases Using the Endometrial Cancer Subrogate Molecular Classification. *Am J Surg Pathol*. julio de 2020;44(7):982-90.
 31. Lewin S, Dezube D, Guddati A, Mittal K, Muggia F, Klein P. Paraneoplastic hypercalcemia in clear cell ovarian adenocarcinoma. *Ecancermedicalscience*. 2012;6:271.
 32. DeLair D, Han G, Irving JA, Leung S, Ewanowich CA, Longacre TA, et al. HNF-1 β in ovarian carcinomas with serous and clear cell change. *Int J Gynecol Pathol*. noviembre de 2013;32(6):541-6.
 33. Pons Porrata LM, García Gómez O, Salmon Cruzata A, Macías Navarro MM, Guerrero Fernández CM. Tumores de ovario: patogenia, cuadro clínico, diagnóstico ecográfico e histopatológico. *MEDISAN*. junio de 2012;16(6):920-31.
 34. Ricci F, Affatato R, Carrassa L, Damia G. Recent Insights into Mucinous Ovarian Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 24 de mayo de 2018;19(6):1569.
 35. Mutch DG, Prat J. 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. *Gynecologic Oncology*. junio de 2014;133(3):401-4.
 36. Miller RE, Leary A, Scott CL, Serra V, Lord CJ, Bowtell D, et al. ESMO recommendations on predictive biomarker testing for homologous recombination deficiency and PARP inhibitor benefit in ovarian cancer. *Ann Oncol*. diciembre de 2020;31(12):1606-22.
 37. Hoppe MM, Sundar R, Tan DSP, Jeyasekharan AD. Biomarkers for Homologous Recombination Deficiency in Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1 de julio de 2018;110(7):704-13.
 38. du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian

- cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*. 15 de marzo de 2009;115(6):1234-44.
39. Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, Vermorken JB, Mangioni C, Madronal C, et al. Impact of Adjuvant Chemotherapy and Surgical Staging in Early-Stage Ovarian Carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm Trial. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 15 de enero de 2003;95(2):113-25.
 40. Konstantinopoulos PA, Ceccaldi R, Shapiro GI, D'Andrea AD. Homologous Recombination Deficiency: Exploiting the Fundamental Vulnerability of Ovarian Cancer. *Cancer Discov*. noviembre de 2015;5(11):1137-54.
 41. Moore K, Colombo N, Scambia G, Kim BG, Oaknin A, Friedlander M, et al. Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 27 de diciembre de 2018;379(26):2495-505.
 42. Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, Pérol D, González-Martín A, Berger R, et al. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 19 de diciembre de 2019;381(25):2416-28.
 43. González-Martín A, Pothuri B, Vergote I, DePont Christensen R, Graybill W, Mirza MR, et al. Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 19 de diciembre de 2019;381(25):2391-402.
 44. Harter P, Sehouli J, Vergote I, Ferron G, Reuss A, Meier W, et al. Randomized Trial of Cytoreductive Surgery for Relapsed Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 2 de diciembre de 2021;385(23):2123-31.
 45. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J of Extracellular Vesicle*. febrero de 2024;13(2):e12404.
 46. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*. 18 de febrero de 2013;200(4):373-83.
 47. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. Mattson MP, editor. *Pharmacol Rev*. julio de 2012;64(3):676-705.
 48. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066.
 49. Johnson SM, Banyard A, Smith C, Mironov A, McCabe MG. Large Extracellular Vesicles Can be Characterised by Multiplex Labelling Using Imaging Flow Cytometry. *Int J Mol Sci*. 18 de noviembre de 2020;21(22):8723.
 50. Malkin EZ, Bratman SV. Bioactive DNA from extracellular vesicles and particles. *Cell Death Dis*. 27 de julio de 2020;11(7):584.
 51. Pezzicoli G, Tucci M, Lovero D, Silvestris F, Porta C, Mannavola F. Large Extracellular Vesicles—A New Frontier of Liquid Biopsy in Oncology. *IJMS*. 7 de septiembre de 2020;21(18):6543.
 52. Haraszti RA, Didiot MC, Sapp E, Leszyk J, Shaffer SA, Rockwell HE, et al. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J Extracell Vesicles*. 2016;5:32570.
 53. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. abril de 2018;19(4):213-28.

54. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* agosto de 2011;68(16):2667-88.
55. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* agosto de 2009;9(8):581-93.
56. Beyer C, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* enero de 2010;6(1):21-9.
57. Jia Y, Yu L, Ma T, Xu W, Qian H, Sun Y, et al. Small extracellular vesicles isolation and separation: Current techniques, pending questions and clinical applications. *Theranostics.* 2022;12(15):6548-75.
58. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of cell biology.* 1 de agosto de 1983;97(2):329-39.
59. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell.* julio de 1983;33(3):967-78.
60. Harding CV, Heuser JE, Stahl PD. Exosomes: looking back three decades and into the future. *J Cell Biol.* 18 de febrero de 2013;200(4):367-71.
61. Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, Ahadi AM, Molaei F, Alahari SK. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol Cancer.* diciembre de 2019;18(1):75.
62. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 5 de julio de 1987;262(19):9412-20.
63. Théry C, Duban L, Segura E, Véron P, Lantz O, Amigorena S. Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol.* diciembre de 2002;3(12):1156-62.
64. Segura E, Nicco C, Lombard B, Véron P, Raposo G, Batteux F, et al. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood.* 1 de julio de 2005;106(1):216-23.
65. Ramachandra L, Qu Y, Wang Y, Lewis CJ, Cobb BA, Takatsu K, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Synergizes with ATP To Induce Release of Microvesicles and Exosomes Containing Major Histocompatibility Complex Class II Molecules Capable of Antigen Presentation. *Infect Immun.* diciembre de 2010;78(12):5116-25.
66. Skog J, Würdinger T, Van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* diciembre de 2008;10(12):1470-6.
67. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin JP, et al. Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest.* 19 de enero de 2010;JCI40483.
68. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med.* junio de 2012;18(6):883-91.
69. Patil AA, Rhee WJ. Exosomes: Biogenesis, Composition, Functions, and Their Role in Pre-metastatic Niche Formation. *Biotechnol Bioproc E.* septiembre de 2019;24(5):689-701.
70. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol.* abril de 2016;36(3):301-12.
71. Christ L, Raiborg C, Wenzel EM, Campsteijn C, Stenmark H. Cellular

- Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery. *Trends in Biochemical Sciences*. enero de 2017;42(1):42-56.
72. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal*. 23 de abril de 2021;19(1):47.
73. Krylova SV, Feng D. The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake. *IJMS*. 10 de enero de 2023;24(2):1337.
74. Williams RL, Urbé S. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mayo de 2007;8(5):355-68.
75. Tschuschke M, Kocherova I, Bryja A, Mozdziak P, Angelova Volponi A, Janowicz K, et al. Inclusion Biogenesis, Methods of Isolation and Clinical Application of Human Cellular Exosomes. *J Clin Med*. 6 de febrero de 2020;9(2):436.
76. Cardona-López X, Cuyas L, Marín E, Rajulu C, Irigoyen ML, Gil E, et al. ESCRT-III-Associated Protein ALIX Mediates High-Affinity Phosphate Transporter Trafficking to Maintain Phosphate Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*. septiembre de 2015;27(9):2560-81.
77. Kajimoto T, Okada T, Miya S, Zhang L, Nakamura S ichi. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat Commun*. 15 de noviembre de 2013;4(1):2712.
78. van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P, et al. The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Developmental Cell*. octubre de 2011;21(4):708-21.
79. Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *Journal of Cell Biology*. 20 de septiembre de 2010;190(6):1079-91.
80. Buschow SI, Nolte-'t Hoen ENM, van Niel G, Pols MS, ten Broeke T, Lauwen M, et al. MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic*. octubre de 2009;10(10):1528-42.
81. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*. enero de 2010;12(1):19-30.
82. Kennedy MJ, Ehlers MD. Mechanisms and Function of Dendritic Exocytosis. *Neuron*. marzo de 2011;69(5):856-75.
83. Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S. Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs Work Together to Mediate the Intracellular Destination of a Transport Vesicle. *Developmental Cell*. mayo de 2007;12(5):671-82.
84. Tian T, Zhu YL, Zhou YY, Liang GF, Wang YY, Hu FH, et al. Exosome Uptake through Clathrin-mediated Endocytosis and Macropinocytosis and Mediating miR-21 Delivery. *Journal of Biological Chemistry*. agosto de 2014;289(32):22258-67.
85. Costa Verdera H, Gitz-Francois JJ, Schiffelers RM, Vader P. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *Journal of Controlled Release*. noviembre de 2017;266:100-8.
86. Simpson RJ, Kalra H, Mathivanan S. ExoCarta as a resource for exosomal research. *Journal of Extracellular Vesicles*. enero de 2012;1(1):18374.
87. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*. 2012;10(12):e1001450.
88. Kim DK, Kang B, Kim OY, Choi DS, Lee J, Kim SR, et al. EVpedia: an integrated database of high-throughput data for

- systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2013;2.
89. Llorente A, Skotland T, Sylvänne T, Kauhanen D, Róg T, Orłowski A, et al. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. julio de 2013;1831(7):1302-9.
 90. Skotland T, Sandvig K, Llorente A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Progress in Lipid Research*. abril de 2017;66:30-41.
 91. Ghadami S, Dellinger K. The lipid composition of extracellular vesicles: applications in diagnostics and therapeutic delivery. *Front Mol Biosci*. 13 de julio de 2023;10:1198044.
 92. Donoso-Quezada J, Ayala-Mar S, González-Valdez J. The role of lipids in exosome biology and intercellular communication: Function, analytics and applications. *Traffic*. julio de 2021;22(7):204-20.
 93. Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, Pomeroy SL, Breakefield XO, et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun*. 1 de febrero de 2011;2:180.
 94. Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm (Vienna)*. enero de 2010;117(1):1-4.
 95. García-Silva S, Benito-Martín A, Sánchez-Redondo S, Hernández-Barranco A, Ximénez-Embún P, Nogués L, et al. Use of extracellular vesicles from lymphatic drainage as surrogate markers of melanoma progression and *BRAF V600E* mutation. *Journal of Experimental Medicine*. 6 de mayo de 2019;216(5):1061-70.
 96. Eldh M, Ekström K, Valadi H, Sjöstrand M, Olsson B, Jernås M, et al. Exosomes Communicate Protective Messages during Oxidative Stress; Possible Role of Exosomal Shuttle RNA. Tailleux L, editor. *PLoS ONE*. 17 de diciembre de 2010;5(12):e15353.
 97. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. junio de 2007;9(6):654-9.
 98. Pontecorvi G, Bellenghi M, Puglisi R, Carè A, Mattia G. Tumor-derived extracellular vesicles and microRNAs: Functional roles, diagnostic, prognostic and therapeutic options. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. febrero de 2020;51:75-83.
 99. Martellucci S, Orefice NS, Angelucci A, Luce A, Caraglia M, Zappavigna S. Extracellular Vesicles: New Endogenous Shuttles for miRNAs in Cancer Diagnosis and Therapy? *IJMS*. 4 de septiembre de 2020;21(18):6486.
 100. Li C, Xu X. Biological functions and clinical applications of exosomal non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma. *Cell Mol Life Sci*. noviembre de 2019;76(21):4203-19.
 101. Luo J, Xiong Y, Fu P fen, Li E chun, Qu L, Fan X, et al. Exosomal long non-coding RNAs: biological properties and therapeutic potential in cancer treatment. *J Zhejiang Univ Sci B*. junio de 2019;20(6):488-95.
 102. Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, Hill AF. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J of Extracellular Vesicle*. enero de 2014;3(1):23743.
 103. Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, Ahadi AM, Molaei F, Alahari SK. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol Cancer*. diciembre de 2019;18(1):75.
 104. Zöller M. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer*. enero de 2009;9(1):40-55.

105. Li J, Zhang Y, Dong PY, Yang GM, Gurunathan S. A comprehensive review on the composition, biogenesis, purification, and multifunctional role of exosome as delivery vehicles for cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. septiembre de 2023;165:115087.
106. Chaput N, Théry C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol*. septiembre de 2011;33(5):419-40.
107. Ludwig AK, Giebel B. Exosomes: Small vesicles participating in intercellular communication. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. enero de 2012;44(1):11-5.
108. Simons M, Raposo G. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology*. agosto de 2009;21(4):575-81.
109. Mooberry MJ, Bradford R, Hobl EL, Lin FC, Jilma B, Key NS. Procoagulant microparticles promote coagulation in a factor XI-dependent manner in human endotoxemia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. mayo de 2016;14(5):1031-42.
110. Srikanthan S, Li W, Silverstein RL, McIntyre TM. Exosome poly-ubiquitin inhibits platelet activation, downregulates CD36 and inhibits pro-atherothrombotic cellular functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. noviembre de 2014;12(11):1906-17.
111. Zhang W, Ou X, Wu X. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: A potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis. *Int J Oncol* [Internet]. 7 de marzo de 2019 [citado 11 de octubre de 2023]; Disponible en: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2019.4742>
112. Tetta C, Bruno S, Fonsato V, Deregibus MC, Camussi G. The role of microvesicles in tissue repair. *Organogenesis*. abril de 2011;7(2):105-15.
113. Ratajczak MZ, Kucia M, Jadczyk T, Greco NJ, Wojakowski W, Tendera M, et al. Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies? *Leukemia*. junio de 2012;26(6):1166-73.
114. Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 1 de mayo de 2011;26(5):1474-83.
115. Shenoda BB, Ajit SK. Modulation of Immune Responses by Exosomes Derived from Antigen-Presenting Cells. *Clin Med Insights Pathol*. enero de 2016;9s1:CPATH.S39925.
116. Qu Y, Ramachandra L, Mohr S, Franchi L, Harding CV, Nunez G, et al. P2X7 Receptor-Stimulated Secretion of MHC Class II-Containing Exosomes Requires the ASC/NLRP3 Inflammasome but Is Independent of Caspase-1. *The Journal of Immunology*. 15 de abril de 2009;182(8):5052-62.
117. Gastpar R, Gehrmann M, Bausero MA, Asea A, Gross C, Schroeder JA, et al. Heat Shock Protein 70 Surface-Positive Tumor Exosomes Stimulate Migratory and Cytolytic Activity of Natural Killer Cells. *Cancer Research*. 15 de junio de 2005;65(12):5238-47.
118. Elsner L, Flügge PF, Lozano J, Muppala V, Eiz-Vesper B, Demiroglu SY, et al. The endogenous danger signals HSP70 and MICA cooperate in the activation of cytotoxic effector functions of NK cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. abril de 2010;14(4):992-1002.
119. Li X, Wang S, Mu W, Barry J, Han A, Carpenter RL, et al. Reactive oxygen species reprogram macrophages to suppress antitumor immune response through the exosomal miR-155-5p/PD-L1 pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 27 de enero de 2022;41(1):41.

120. Chen H, Luo Y, Lin M, Peng X, Liu M, Wang Y, et al. Serum exosomal miR -16-5p functions as a tumor inhibitor and a new biomarker for PD-L1 inhibitor-dependent immunotherapy in lung adenocarcinoma by regulating PD-L1 expression. *Cancer Medicine*. julio de 2022;11(13):2627-43.
121. Zheng Z, Sun R, Zhao HJ, Fu D, Zhong HJ, Weng XQ, et al. MiR155 sensitized B-lymphoma cells to anti-PD-L1 antibody via PD-1/PD-L1-mediated lymphoma cell interaction with CD8+T cells. *Mol Cancer*. diciembre de 2019;18(1):54.
122. Zheng Z, Xu PP, Wang L, Zhao HJ, Weng XQ, Zhong HJ, et al. MiR21 sensitized B-lymphoma cells to ABT-199 via ICOS/ICOSL-mediated interaction of Treg cells with endothelial cells. *J Exp Clin Cancer Res*. diciembre de 2017;36(1):82.
123. Pinnell JR, Cui M, Tieu K. Exosomes in Parkinson disease. *Journal of Neurochemistry*. mayo de 2021;157(3):413-28.
124. Ge X, Guo M, Hu T, Li W, Huang S, Yin Z, et al. Increased Microglial Exosomal miR-124-3p Alleviates Neurodegeneration and Improves Cognitive Outcome after rmTBI. *Molecular Therapy*. febrero de 2020;28(2):503-22.
125. Liu J, Jiang F, Jiang Y, Wang Y, Li Z, Shi X, et al. Roles of Exosomes in Ocular Diseases. *IJN*. diciembre de 2020;Volume 15:10519-38.
126. Zhu J, Liu B, Wang Z, Wang D, Ni H, Zhang L, et al. Exosomes from nicotine-stimulated macrophages accelerate atherosclerosis through miR-21-3p/PTEN-mediated VSMC migration and proliferation. *Theranostics*. 2019;9(23):6901-19.
127. Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell*. diciembre de 2016;30(6):836-48.
128. Zhang L, Yu D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. abril de 2019;1871(2):455-68.
129. LeBleu VS, Kalluri R. A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. *Dis Model Mech*. 19 de abril de 2018;11(4):dmm029447.
130. Barrett R, Puré E. Cancer-associated fibroblasts: key determinants of tumor immunity and immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. junio de 2020;64:80-7.
131. Li C, Teixeira AF, Zhu HJ, Ten Dijke P. Cancer associated-fibroblast-derived exosomes in cancer progression. *Mol Cancer*. 1 de diciembre de 2021;20(1):154.
132. Shoucair I, Weber Mello F, Jabalee J, Maleki S, Garnis C. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Extracellular Vesicles in Tumorigenesis. *Int J Mol Sci*. 17 de septiembre de 2020;21(18):6837.
133. Li K, Chen Y, Li A, Tan C, Liu X. Exosomes play roles in sequential processes of tumor metastasis. *Int J Cancer*. abril de 2019;144(7):1486-95.
134. Chowdhury R, Webber JP, Gurney M, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts. *Oncotarget*. 20 de enero de 2015;6(2):715-31.
135. Ludwig N, Yerneni SS, Razzo BM, Whiteside TL. Exosomes from HNSCC Promote Angiogenesis through Reprogramming of Endothelial Cells. *Mol Cancer Res*. noviembre de 2018;16(11):1798-808.
136. Sheldon H, Heikamp E, Turley H, Dragovic R, Thomas P, Oon CE, et al. New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood*. 30 de septiembre de 2010;116(13):2385-94.
137. Kucharzewska P, Christianson HC, Welch JE, Svensson KJ, Fredlund E, Ringnér M, et al. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and

- mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30 de abril de 2013;110(18):7312-7.
138. Nazarenko I, Rana S, Baumann A, McAlear J, Hellwig A, Trendelenburg M, et al. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res*. 15 de febrero de 2010;70(4):1668-78.
 139. Treppe L, Perret R, Edmond S, Ricard D, Gavard J. Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2017;6(1):1359479.
 140. Ying X, Wu Q, Wu X, Zhu Q, Wang X, Jiang L, et al. Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages. *Oncotarget*. 12 de julio de 2016;7(28):43076-87.
 141. Ham S, Lima LG, Chai EPZ, Muller A, Lobb RJ, Krumeich S, et al. Breast Cancer-Derived Exosomes Alter Macrophage Polarization via gp130/STAT3 Signaling. *Front Immunol*. 8 de mayo de 2018;9:871.
 142. Zhao S, Mi Y, Guan B, Zheng B, Wei P, Gu Y, et al. Tumor-derived exosomal miR-934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal cancer. *J Hematol Oncol*. diciembre de 2020;13(1):156.
 143. Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, Reichert TE, Watkins S, Whiteside TL. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res*. 1 de febrero de 2005;11(3):1010-20.
 144. Cai Z, Yang F, Yu L, Yu Z, Jiang L, Wang Q, et al. Activated T cell exosomes promote tumor invasion via Fas signaling pathway. *J Immunol*. 15 de junio de 2012;188(12):5954-61.
 145. Wieckowski EU, Visus C, Szajnik M, Szczepanski MJ, Storkus WJ, Whiteside TL. Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8+ T lymphocytes. *J Immunol*. 15 de septiembre de 2009;183(6):3720-30.
 146. Szajnik M, Czystowska M, Szczepanski MJ, Mandapathil M, Whiteside TL. Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PLoS One*. 22 de julio de 2010;5(7):e11469.
 147. Liu T, Chen G, Sun D, Lei M, Li Y, Zhou C, et al. Exosomes containing miR-21 transfer the characteristic of cisplatin resistance by targeting PTEN and PDCD4 in oral squamous cell carcinoma. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 1 de septiembre de 2017;49(9):808-16.
 148. Crow J, Atay S, Banskota S, Artale B, Schmitt S, Godwin AK. Exosomes as mediators of platinum resistance in ovarian cancer. *Oncotarget*. 14 de febrero de 2017;8(7):11917-36.
 149. Ozawa PMM, Alkhalawi F, Cavalli IJ, Malheiros D, de Souza Fonseca Ribeiro EM, Cavalli LR. Extracellular vesicles from triple-negative breast cancer cells promote proliferation and drug resistance in non-tumorigenic breast cells. *Breast Cancer Res Treat*. diciembre de 2018;172(3):713-23.
 150. Fu X, Liu M, Qu S, Ma J, Zhang Y, Shi T, et al. Retraction Note: Exosomal microRNA-32-5p induces multidrug resistance in hepatocellular carcinoma via the PI3K/Akt pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 19 de julio de 2023;42(1):174.
 151. Li XJ, Ren ZJ, Tang JH, Yu Q. Exosomal MicroRNA MiR-1246 Promotes Cell Proliferation, Invasion and Drug Resistance by Targeting CCNG2 in Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(5):1741-8.
 152. Fornari F, Pollutri D, Patrizi C, La Bella T, Marinelli S, Casadei Gardini A, et al. In Hepatocellular Carcinoma miR-221 Modulates Sorafenib Resistance through Inhibition of Caspase-3-Mediated

- Apoptosis. *Clin Cancer Res.* 15 de julio de 2017;23(14):3953-65.
153. Kanlikilicer P, Bayraktar R, Denizli M, Rashed MH, Ivan C, Aslan B, et al. Exosomal miRNA confers chemo resistance via targeting Cav1/p-gp/M2-type macrophage axis in ovarian cancer. *EBioMedicine.* diciembre de 2018;38:100-12.
154. Ning K, Wang T, Sun X, Zhang P, Chen Y, Jin J, et al. UCH-L1-containing exosomes mediate chemotherapeutic resistance transfer in breast cancer. *J Surg Oncol.* junio de 2017;115(8):932-40.
155. Dorayappan KDP, Wanner R, Wallbillich JJ, Saini U, Zingarelli R, Suarez AA, et al. Hypoxia-induced exosomes contribute to a more aggressive and chemoresistant ovarian cancer phenotype: a novel mechanism linking STAT3/Rab proteins. *Oncogene.* julio de 2018;37(28):3806-21.
156. Xu ZH, Miao ZW, Jiang QZ, Gan DX, Wei XG, Xue XZ, et al. Brain microvascular endothelial cell exosome-mediated S100A16 up-regulation confers small-cell lung cancer cell survival in brain. *FASEB J.* febrero de 2019;33(2):1742-57.
157. Keller S, Ridinger J, Rupp AK, Janssen JWG, Altevogt P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J Transl Med.* 8 de junio de 2011;9:86.
158. Lässer C. Identification and analysis of circulating exosomal microRNA in human body fluids. *Methods Mol Biol.* 2013;1024:109-28.
159. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *Journal of Clinical Investigation.* 1 de abril de 2016;126(4):1208-15.
160. Tan DS, Agarwal R, Kaye SB. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *The Lancet Oncology.* noviembre de 2006;7(11):925-34.
161. Wang W, Jo H, Park S, Kim H, Kim SI, Han Y, et al. Integrated analysis of ascites and plasma extracellular vesicles identifies a miRNA-based diagnostic signature in ovarian cancer. *Cancer Letters.* agosto de 2022;542:215735.
162. Rickard BP, Conrad C, Sorrin AJ, Ruhi MK, Reader JC, Huang SA, et al. Malignant Ascites in Ovarian Cancer: Cellular, Acellular, and Biophysical Determinants of Molecular Characteristics and Therapy Response. *Cancers (Basel).* 26 de agosto de 2021;13(17):4318.
163. He L, Zhu W, Chen Q, Yuan Y, Wang Y, Wang J, et al. Ovarian cancer cell-secreted exosomal miR-205 promotes metastasis by inducing angiogenesis. *Theranostics.* 2019;9(26):8206-20.
164. Zhuang L, Zhang B, Liu X, Lin L, Wang L, Hong Z, et al. Exosomal miR-21-5p derived from cisplatin-resistant SKOV3 ovarian cancer cells promotes glycolysis and inhibits chemosensitivity of its progenitor SKOV3 cells by targeting PDHA1. *Cell Biol Int.* octubre de 2021;45(10):2140-9.
165. Meng X, Müller V, Milde-Langosch K, Trillsch F, Pantel K, Schwarzenbach H. Diagnostic and prognostic relevance of circulating exosomal miR-373, miR-200a, miR-200b and miR-200c in patients with epithelial ovarian cancer. *Oncotarget.* 29 de marzo de 2016;7(13):16923-35.
166. Lai H, Guo Y, Tian L, Wu L, Li X, Yang Z, et al. Protein Panel of Serum-Derived Small Extracellular Vesicles for the Screening and Diagnosis of Epithelial Ovarian Cancer. *Cancers.* 30 de julio de 2022;14(15):3719.
167. Teng Y, Su X, Zhang X, Zhang Y, Li C, Niu W, et al. miRNA-200a/c as potential biomarker in epithelial ovarian cancer (EOC): evidence based on miRNA meta-signature and clinical investigations. *Oncotarget.* 6 de diciembre de 2016;7(49):81621-33.
168. Liang B, Peng P, Chen S, Li L, Zhang M, Cao D, et al. Characterization and proteomic analysis of ovarian cancer-

- derived exosomes. *Journal of Proteomics*. marzo de 2013;80:171-82.
169. Zhou W, Ma J, Zhao H, Wang Q, Guo X, Chen L, et al. Serum Exosomes From Epithelial Ovarian Cancer Patients Contain LRP1, Which Promotes the Migration of Epithelial Ovarian Cancer Cell. *Mol Cell Proteomics*. abril de 2023;22(4):100520.
170. Pratima NA. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Applications: A Brief Review. AOICS [Internet]. 24 de enero de 2018 [citado 21 de septiembre de 2023];1(1). Disponible en: <http://lupinepublishers.com/chemistry-journal/fulltext/liquid-chromatography-mass-spectrometry-and-its-applications-a-brief-review.ID.000103.php>
171. Orsburn BC. Proteome Discoverer-A Community Enhanced Data Processing Suite for Protein Informatics. *Proteomes*. 23 de marzo de 2021;9(1):15.
172. Bonzon-Kulichenko E, Garcia-Marques F, Trevisan-Herraz M, Vázquez J. Revisiting Peptide Identification by High-Accuracy Mass Spectrometry: Problems Associated with the Use of Narrow Mass Precursor Windows. *J Proteome Res*. 6 de febrero de 2015;14(2):700-10.
173. Navarro P, Vázquez J. A Refined Method To Calculate False Discovery Rates for Peptide Identification Using Decoy Databases. *J Proteome Res*. 3 de abril de 2009;8(4):1792-6.
174. Navarro P, Trevisan-Herraz M, Bonzon-Kulichenko E, Núñez E, Martínez-Acedo P, Pérez-Hernández D, et al. General Statistical Framework for Quantitative Proteomics by Stable Isotope Labeling. *J Proteome Res*. 7 de marzo de 2014;13(3):1234-47.
175. Trevisan-Herraz M, Bagwan N, García-Marqués F, Rodríguez JM, Jorge I, Ezkurdia I, et al. SanXoT: a modular and versatile package for the quantitative analysis of high-throughput proteomics experiments. Valencia A, editor. *Bioinformatics*. 1 de mayo de 2019;35(9):1594-6.
176. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*. 15 de abril de 2013;14:128.
177. Di Palma T, Zannini M. PAX8 as a Potential Target for Ovarian Cancer: What We Know so Far. *OTT*. octubre de 2022;Volume 15:1273-80.
178. Toss A, De Matteis E, Rossi E, Casa L, Iannone A, Federico M, et al. Ovarian Cancer: Can Proteomics Give New Insights for Therapy and Diagnosis? *IJMS*. 15 de abril de 2013;14(4):8271-90.
179. Hiruta A, Oguri Y, Yokoi A, Matsumoto T, Oda Y, Tomohiro M, et al. S100A4/Nonmuscle Myosin IIA/p53 Axis Contributes to Aggressive Features in Ovarian High-Grade Serous Carcinoma. *The American Journal of Pathology*. noviembre de 2020;190(11):2304-16.
180. Kim B, Jung S, Kim H, Kwon JO, Song MK, Kim MK, et al. The role of S100A4 for bone metastasis in prostate cancer cells. *BMC Cancer*. diciembre de 2021;21(1):137.
181. Olejarz W, Dominiak A, Żolnierzak A, Kubiak-Tomaszewska G, Lorenc T. Tumor-Derived Exosomes in Immunosuppression and Immunotherapy. *Journal of Immunology Research*. 22 de mayo de 2020;2020:1-11.
182. Asleh K, Dery V, Taylor C, Davey M, Djeungoue-Petga MA, Ouellette RJ. Extracellular vesicle-based liquid biopsy biomarkers and their application in precision immuno-oncology. *Biomark Res*. 17 de noviembre de 2023;11(1):99.
183. Ciardiello C, Cavallini L, Spinelli C, Yang J, Reis-Sobreiro M, de Candia P, et al. Focus on Extracellular Vesicles: New Frontiers of Cell-to-Cell Communication in Cancer. *IJMS*. 6 de febrero de 2016;17(2):175.
184. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 29 de junio de 2011;474(7353):609-15.

185. Martincorena I, Campbell PJ. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*. 25 de septiembre de 2015;349(6255):1483-9.
186. Cai J, Gong L, Li G, Guo J, Yi X, Wang Z. Exosomes in ovarian cancer ascites promote epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells by delivery of miR-6780b-5p. *Cell Death Dis*. 24 de febrero de 2021;12(2):210.
187. Chen L, Wang K, Li L, Zheng B, Zhang Q, Zhang F, et al. Plasma exosomal miR-1260a, miR-7977 and miR-192-5p as diagnostic biomarkers in epithelial ovarian cancer. *Future Oncol*. agosto de 2022;18(26):2919-31.
188. Shimizu A, Sawada K, Kobayashi M, Yamamoto M, Yagi T, Kinose Y, et al. Exosomal CD47 Plays an Essential Role in Immune Evasion in Ovarian Cancer. *Mol Cancer Res*. septiembre de 2021;19(9):1583-95.
189. Shen X, Wang C, Zhu H, Wang Y, Wang X, Cheng X, et al. Exosome-mediated transfer of CD44 from high-metastatic ovarian cancer cells promotes migration and invasion of low-metastatic ovarian cancer cells. *J Ovarian Res*. 24 de febrero de 2021;14(1):38.
190. Zhu X, Shen H, Yin X, Yang M, Wei H, Chen Q, et al. Macrophages derived exosomes deliver miR-223 to epithelial ovarian cancer cells to elicit a chemoresistant phenotype. *J Exp Clin Cancer Res*. 15 de febrero de 2019;38(1):81.
191. Lee AH, Koh IL, Dawson MR. The role of exosome heterogeneity in epithelial ovarian cancer. *Advances in Cancer Biology - Metastasis*. julio de 2022;4:100040.
192. Dong L, Zieren RC, Horie K, Kim C, Mallick E, Jing Y, et al. Comprehensive evaluation of methods for small extracellular vesicles separation from human plasma, urine and cell culture medium. *J of Extracellular Vesicle*. diciembre de 2020;10(2):e12044.
193. Vyhliđalová Kotrbová A, Gömöryová K, Mikulová A, Plešingerová H, Sladeček S, Kravec M, et al. Proteomic analysis of ascitic extracellular vesicles describes tumour microenvironment and predicts patient survival in ovarian cancer. *J of Extracellular Vesicle*. marzo de 2024;13(3):e12420.
194. Yamamoto CM, Oakes ML, Murakami T, Muto MG, Berkowitz RS, Ng SW. Comparison of benign peritoneal fluid- and ovarian cancer ascites-derived extracellular vesicle RNA biomarkers. *J Ovarian Res*. diciembre de 2018;11(1):20.
195. Mitra A, Yoshida-Court K, Solley TN, Mikkelsen M, Yeung CLA, Nick A, et al. Extracellular vesicles derived from ascitic fluid enhance growth and migration of ovarian cancer cells. *Sci Rep*. 28 de abril de 2021;11(1):9149.
196. Carretero-González A, Hergueta-Redondo M, Sánchez-Redondo S, Ximénez-Embún P, Manso Sánchez L, Gil EC, et al. Characterization of plasma circulating small extracellular vesicles in patients with metastatic solid tumors and newly diagnosed brain metastasis. *Oncoimmunology*. 2022;11(1):2067944.
197. Li W, Zhang X, Wang J, Li M, Cao C, Tan J, et al. TGFβ1 in fibroblasts-derived exosomes promotes epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells. *Oncotarget*. 10 de noviembre de 2017;8(56):96035-47.
198. Ma R, Ye X, Cheng H, Cui H, Chang X. Tumor-derived exosomal circRNA051239 promotes proliferation and migration of epithelial ovarian cancer. *Am J Transl Res*. 2021;13(3):1125-39.
199. Li T, Lin L, Liu Q, Gao W, Chen L, Sha C, et al. Exosomal transfer of miR-429 confers chemoresistance in epithelial ovarian cancer.
200. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med*. noviembre de 2011;17(11):1498-503.

201. Brennan K, Martin K, FitzGerald SP, O'Sullivan J, Wu Y, Blanco A, et al. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Sci Rep.* 23 de enero de 2020;10(1):1039.
202. Lisio MA, Fu L, Goyeneche A, Gao ZH, Telleria C. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. *Int J Mol Sci.* 22 de febrero de 2019;20(4):952.
203. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol.* febrero de 2018;15(2):81-94.
204. Opzoomer JW, Sosnowska D, Anstee JE, Spicer JF, Arnold JN. Cytotoxic Chemotherapy as an Immune Stimulus: A Molecular Perspective on Turning Up the Immunological Heat on Cancer. *Front Immunol.* 2019;10:1654.
205. Izar B, Tirosh I, Stover EH, Wakiro I, Cuoco MS, Alter I, et al. A single-cell landscape of high-grade serous ovarian cancer. *Nat Med.* agosto de 2020;26(8):1271-9.
206. Mangogna A, Munari G, Pepe F, Maffii E, Giampaolino P, Ricci G, et al. Homologous Recombination Deficiency in Ovarian Cancer: from the Biological Rationale to Current Diagnostic Approaches. *J Pers Med.* 2 de febrero de 2023;13(2):284.
207. Telli ML, Timms KM, Reid J, Hennessy B, Mills GB, Jensen KC, et al. Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 1 de agosto de 2016;22(15):3764-73.
208. Li H, Liu ZY, Wu N, Chen YC, Cheng Q, Wang J. PARP inhibitor resistance: the underlying mechanisms and clinical implications. *Mol Cancer.* 20 de junio de 2020;19(1):107.
209. Shen S, Tu C, Shen H, Li J, Frangou C, Zhang J, et al. Comparative Proteomics Analysis of Exosomes Identifies Key Pathways and Protein Markers Related to Breast Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci.* 17 de febrero de 2023;24(4):4033.
210. Cunnea P, Curry EW, Christie EL, Nixon K, Kwok CH, Pandey A, et al. Spatial and temporal intra-tumoral heterogeneity in advanced HGSOC: Implications for surgical and clinical outcomes. *Cell Reports Medicine.* junio de 2023;4(6):101055.
211. Bortot B, Apollonio M, Rampazzo E, Valle F, Brucale M, Ridolfi A, et al. Small extracellular vesicles from malignant ascites of patients with advanced ovarian cancer provide insights into the dynamics of the extracellular matrix. *Mol Oncol.* diciembre de 2021;15(12):3596-614.
212. Gonda A, Zhao N, Shah JV, Siebert JN, Gunda S, Inan B, et al. Extracellular Vesicle Molecular Signatures Characterize Metastatic Dynamicity in Ovarian Cancer. *Front Oncol.* 18 de noviembre de 2021;11:718408.
213. Cheung HW, Cowley GS, Weir BA, Boehm JS, Rusin S, Scott JA, et al. Systematic investigation of genetic vulnerabilities across cancer cell lines reveals lineage-specific dependencies in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 26 de julio de 2011;108(30):12372-7.
214. Wang Y, Wang Y, Li J, Yuan Z, Yuan B, Zhang T, et al. PAX8: a sensitive and specific marker to identify cancer cells of ovarian origin for patients prior to neoadjuvant chemotherapy. *J Hematol Oncol.* 19 de agosto de 2013;6:60.
215. Kim J, Kim NY, Pyo JS, Min KW, Kang DW. Diagnostic roles of PAX8 immunohistochemistry in ovarian tumors. *Pathol Res Pract.* octubre de 2023;250:154822.
216. Menon U, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Singh N, Ryan A, Karpinskyj C, et al. Ovarian cancer population screening and mortality after long-term follow-up in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet.* 5 de junio de 2021;397(10290):2182-93.

217. Buys SS. Effect of Screening on Ovarian Cancer Mortality: The Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 8 de junio de 2011;305(22):2295.
218. Liu XM, Ma L, Schekman R. Selective sorting of microRNAs into exosomes by phase-separated YBX1 condensates. *eLife*. 12 de noviembre de 2021;10:e71982.
219. Abkevich V, Timms KM, Hennessy BT, Potter J, Carey MS, Meyer LA, et al. Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*. 6 de noviembre de 2012;107(10):1776-82.
220. Wang L, Sun Y, Guo Z, Liu H. COL3A1 Overexpression Associates with Poor Prognosis and Cisplatin Resistance in Lung Cancer. *Balkan Med J*. 7 de noviembre de 2022;39(6):393-400.
221. Deo AN, Thorat R, Dhadve AC, De A, Rekhi B, Ray P. IGF1R- $\alpha 6$ integrin-S100A4 network governs the organ-specific metastasis of chemoresistant epithelial ovarian cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. enero de 2022;1868(1):166282.
222. Cruz IN, Coley HM, Kramer HB, Madhuri TK, Safuwani NAM, Angelino AR, et al. Proteomics Analysis of Ovarian Cancer Cell Lines and Tissues Reveals Drug Resistance-associated Proteins. *Cancer Genomics Proteomics*. 2 de enero de 2017;14(1):35-51.
223. Zhang B, Zhao Z, Wang Y, Guo T, He M, Guan G, et al. STX5 Inhibits Hepatocellular Carcinoma Adhesion and Promotes Metastasis by Regulating the PI3K/mTOR Pathway. *J Clin Transl Hepatol*. 9 de enero de 2023;000(000):000-000.
224. Fang Z, Song YX, Wo GQ, Zhou HL, Li L, Yang SY, et al. Screening of the novel immune-suppressive biomarkers of TMED family and whether knockdown of TMED2/3/4/9 inhibits cell migration and invasion in breast cancer. *Ann Transl Med*. diciembre de 2022;10(23):1280.
225. Kolev M, Das M, Gerber M, Baver S, Deschatelets P, Markiewski MM. Inside-Out of Complement in Cancer. *Front Immunol*. 1 de julio de 2022;13:931273.
226. Nunez-Cruz S, Gimotty PA, Guerra MW, Connolly DC, Wu YQ, DeAngelis RA, et al. Genetic and Pharmacologic Inhibition of Complement Impairs Endothelial Cell Function and Ablates Ovarian Cancer Neovascularization. *Neoplasia*. noviembre de 2012;14(11):994-IN1.
227. Savant S, Sriramkumar S, O'Hagan H. The Role of Inflammation and Inflammatory Mediators in the Development, Progression, Metastasis, and Chemoresistance of Epithelial Ovarian Cancer. *Cancers*. 30 de julio de 2018;10(8):251.
228. Ashton TM, McKenna WG, Kunz-Schughart LA, Higgins GS. Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*. 1 de junio de 2018;24(11):2482-90.
229. Anderson AS, Roberts PC, Frisard MI, Hulver MW, Schmelz EM. Ovarian tumor-initiating cells display a flexible metabolism. *Experimental Cell Research*. octubre de 2014;328(1):44-57.
230. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer*. diciembre de 2008;8(12):976-90.
231. Schaub FX, Dhankani V, Berger AC, Trivedi M, Richardson AB, Shaw R, et al. Pan-cancer Alterations of the MYC Oncogene and Its Proximal Network across the Cancer Genome Atlas. *Cell Syst*. 28 de marzo de 2018;6(3):282-300.e2.
232. Ning YX, Luo X, Xu M, Feng X, Wang J. Let-7d increases ovarian cancer cell sensitivity to a genistein analog by targeting c-Myc. *Oncotarget*. 26 de septiembre de 2017;8(43):74836-45.
233. Chen Y, León-Letelier RA, Abdel Sater AH, Vykoukal J, Dennison JB, Hanash S, et al. c-MYC-Driven Polyamine Metabolism in Ovarian Cancer: From

- Pathogenesis to Early Detection and Therapy. *Cancers (Basel)*. 19 de enero de 2023;15(3):623.
234. Jin Y, Qiu J, Lu X, Li G. C-MYC Inhibited Ferroptosis and Promoted Immune Evasion in Ovarian Cancer Cells through NCOA4 Mediated Ferritin Autophagy. *Cells*. 19 de diciembre de 2022;11(24):4127.
235. Lin J, Wang X, Zhai S, Shi M, Peng C, Deng X, et al. Hypoxia-induced exosomal circPDK1 promotes pancreatic cancer glycolysis via c-myc activation by modulating miR-628-3p/BPTF axis and degrading BIN1. *J Hematol Oncol*. 6 de septiembre de 2022;15(1):128.
236. Li B, Chen Y, Liang L, Wang Y, Huang W, Zhao K, et al. Tumor-derived extracellular vesicles shuttle c-Myc to promote gastric cancer growth and metastasis via the KCNQ1OT1/miR-556-3p/CLIC1 axis. *Cell Death Dis*. 8 de marzo de 2022;13(3):217.
237. Tokgün O, İnci K. Myc manipulates the miRNA content and biologic functions of small cell lung cancer cell-derived small extracellular vesicles. *Mol Biol Rep*. agosto de 2022;49(8):7953-65.
238. Meng J, Wang J. Role of SNARE proteins in tumorigenesis and their potential as targets for novel anti-cancer therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. agosto de 2015;1856(1):1-12.
239. Mehdi M, Menon MKC. SNARE Protein in Cellular Membrane Trafficking, Its Regulation and as a Potential Target for Cancer Treatment. *OJI*. 2016;06(01):34-48.
240. Zhang W, Lv Q, Lu D, Chen F. Syntaxin 6 Enhances the Progression of Epithelial Ovarian Cancer by Promoting Cancer Cell Proliferation. *Asian Pac J Cancer Prev*. 1 de junio de 2023;24(6):2003-10.
241. Moreno-Smith M, Halder JB, Meltzer PS, Gonda TA, Mangala LS, Rupaimoole R, et al. ATP11B mediates platinum resistance in ovarian cancer. *J Clin Invest*. 1 de mayo de 2013;123(5):2119-30.
242. Sun H, Wang C, Hu B, Gao X, Zou T, Luo Q, et al. Exosomal S100A4 derived from highly metastatic hepatocellular carcinoma cells promotes metastasis by activating STAT3. *Sig Transduct Target Ther*. 26 de mayo de 2021;6(1):187.
243. Wu X, Zhang H, Jiang G, Peng M, Li C, Lu J, et al. Exosome-transmitted S100A4 induces immunosuppression and non-small cell lung cancer development by activating STAT3. *Clin Exp Immunol*. 31 de diciembre de 2022;210(3):309-20.
244. Yan W, Chen J, Chen Z, Chen H. Deregulated miR-296/S100A4 axis promotes tumor invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition in human ovarian cancer. *Am J Cancer Res*. 2016;6(2):260-9.
245. Link T, Kuhlmann JD, Kobelt D, Herrmann P, Vassileva YD, Kramer M, et al. Clinical relevance of circulating MACC 1 and S100A4 transcripts for ovarian cancer. *Molecular Oncology*. mayo de 2019;13(5):1268-79.
246. Yoshihara K, Tsunoda T, Shigemizu D, Fujiwara H, Hatae M, Fujiwara H, et al. High-risk ovarian cancer based on 126-gene expression signature is uniquely characterized by downregulation of antigen presentation pathway. *Clin Cancer Res*. 1 de marzo de 2012;18(5):1374-85.
247. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 16 de enero de 2003;348(3):203-13.
248. Asare-Werehene M, Communal L, Carmona E, Han Y, Song YS, Burger D, et al. Plasma Gelsolin Inhibits CD8+ T-cell Function and Regulates Glutathione Production to Confer Chemoresistance in Ovarian Cancer. *Cancer Res*. 15 de septiembre de 2020;80(18):3959-71.
249. Shenoy GN, Loyall J, Berenson CS, Kelleher RJ, Iyer V, Balu-Iyer SV, et al. Sialic Acid-Dependent Inhibition of T Cells by Exosomal Ganglioside GD3 in Ovarian Tumor Microenvironments. *The*

- Journal of Immunology. 15 de diciembre de 2018;201(12):3750-8.
250. Chen X, Ying X, Wang X, Wu X, Zhu Q, Wang X. Exosomes derived from hypoxic epithelial ovarian cancer deliver microRNA-940 to induce macrophage M2 polarization. *Oncology Reports*. enero de 2017;38(1):522-8.
251. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, Di Giacomo AM, De Jesus-Acosta A, Delord JP, et al. Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *JCO*. 1 de enero de 2020;38(1):1-10.
252. André T, Berton D, Curigliano G, Sabatier R, Tinker AV, Oaknin A, et al. Antitumor Activity and Safety of Dostarlimab Monotherapy in Patients With Mismatch Repair Deficient Solid Tumors: A Nonrandomized Controlled Trial. *JAMA Netw Open*. 1 de noviembre de 2023;6(11):e2341165.
253. Wilson EM, Eskander RN, Binder PS. Recent Therapeutic Advances in Gynecologic Oncology: A Review. *Cancers (Basel)*. 13 de febrero de 2024;16(4):770.

ANEXOS

Anexo 1. Dictamen favorable del Comité de Ética e Investigación con Medicamentos.



INFORME DEL CEIm HM Hospitales

La Dra. Almudena Lage, Secretaria del Comité Ético de Investigación con medicamentos de HM Hospitales

CERTIFICA

Que el Comité de HM Hospitales, ha evaluado en su reunión del 28 de enero de 2021, Acta N.º 212, la propuesta de Fundación Investigación HM Hospitales, para que se realice la enmienda del proyecto de investigación titulado:

Estudio de biomarcadores predictivos y pronósticos en sangre, lavado peritoneal y tejido sobrante de biopsia en tumores ginecológicos

Código CEIm HM Hospitales: 21.01.1289E1-GHM Código del Promotor: GYN-JGD

- Protocolo TEJIDO SOBRANTE GYN-JGD versión 2.0 de fecha 21 de diciembre de 2020
- Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado versión 2 de fecha 21 de diciembre de 2020_GINE GENERAL - HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE. Tumores Ginecológicos.
- Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado-Casos controles versión 1.0 de fecha 21 de diciembre de 2020_HIP Y CI - GINEGENERAL LAVADOS PERITONEALES

Y habiendo valorado el proyecto desde un punto de vista ético y metodológico, emite un **DICTAMEN FAVORABLE**, para que se realice la enmienda del estudio, en el servicio de Oncología del Hospital Universitario HM Sanchinarro, siendo el Investigador principal el Dr. Jesús García-Donas.

Que el CEIm de HM Hospitales, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento.

Miembros que pertenecen al Comité:

- Dr. Alfonso Moreno González, especialista en Farmacología Clínica
- Dr. Santiago Ruiz de Aguiar, especialista en Farmacología Clínica
- Dra. Almudena Lage Moreda, Licenciada en Medicina y Cirugía
- Dña. Raquel Alcántara Partido, Licenciada en Farmacia
- Dra. María José Ferreiro, especialista en Neumología
- Dr. José Felipe Varona, especialista en Medicina Interna
- Dra. María Teresa Curiel García especialista en Oncología
- Don Juan Carpio, Diplomado en Enfermería
- Dr. César G. Muñoz Sánchez-Miguel, especialista en Oncología
- Dr. Marcial García Murillo, especialista en Oncología

- Dña. María Teresa Espina Castrillo, Licenciada en Derecho, Dpto. Jurídico de HM Hospitales y vicepresidenta del CEAS de HM Hospitales
- Don Ignacio García Gómez. Licenciado en Derecho
- Dña. Ofelia de Lorenzo, Licenciada en Derecho
- Dña. Gema Jiménez. Licenciada en Derecho. HM Hospitales
- Dña. Noelia Pérez Domínguez, Farmacéutica de Atención Primaria
- Dña. Estrella Blanco Patiño, Licenciada en Derecho, Delegado de Protección de Datos

Que en dicha reunión del Comité Ético de Investigación Clínica se cumplió el quórum preceptivo legalmente.

Que en caso de evaluar algún proyecto en el que un miembro es investigador/colaborador, éste se ausenta de la reunión durante la discusión del mismo.

Lo que firmo en Madrid, a 2 de febrero de 2021.



LAGE MOREDA
ALMUDENA -
05402139Z

Firmado digitalmente por
LAGE MOREDA ALMUDENA -
05402139Z
Fecha: 2021.02.02 16:28:06
+01'00'

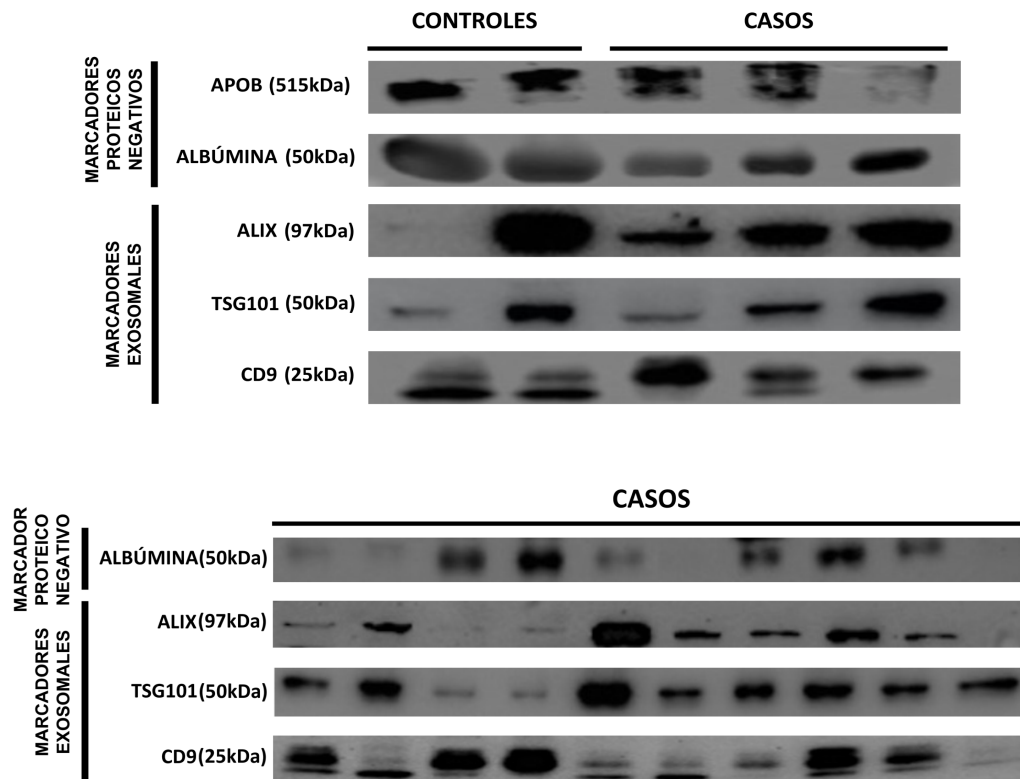
Fdo. Dra. Almudena Lage Secretaria
CEIm HM Hospitales

Anexo 2. Valores obtenidos de la cuantificación del número total de partículas medidas por NTA y de proteínas exosomales totales por partículas $\times 10^9$ medidas por BCA en todas las muestras de los casos con CO (n=74) y de los controles (n=29).

Concentración total de partículas (casos)				Concentración de proteínas exosomales totales			
Muestra	Partículas(10^{11})/ml	Muestra	Partículas(10^{11})/ml	Muestra	$\mu\text{g/partículas} (\times 10^9)$	Muestra	$\mu\text{g/partículas} (\times 10^9)$
413	4.81	1083	4.17	413	0.75	1083	2.99
416	4.82	1086	4.67	416	1.03	1086	0.45
424	15.82	1093	14.81	424	0.33	1093	1.19
434	3.11	1096	2.03	434	5.99	1096	1.12
467	7.21	1120	5.41	467	1.72	1120	1.07
469	11.49	1128	41.59	469	2.93	1128	0.61
516	2.33	1133	4.35	516	5.57	1133	0.75
533	23.06	1136	2.82	533	0.73	1136	1.32
586	3.21	1141	2.38	586	5.44	1141	3.11
608	2.04	1314	1.02	608	6.54	1314	3.61
618	2.73	1323	8.81	618	2.60	1323	0.71
631	1.74	1325	3.30	631	10.10	1325	0.71
644	2.44	1363	6.97	644	8.22	1363	2.90
660	6.35	1401	6.75	660	2.13	1401	0.43
663	19.12	1420	1.06	663	0.41	1420	1.80
673	0.96	1426	2.16	673	0.55	1426	5.20
704	2.17	1442	8.85	704	0.53	1442	2.05
753	2.55	1445	9.59	753	1.72	1445	1.43
771	6.25	1479	7.67	771	0.53	1479	1.75
781	4.17	1487	10.03	781	1.04	1487	2.23
794	2.32	1527	4.43	794	1.13	1527	4.67
813	6.19	1623	5.95	813	0.51	1623	5.12
867	1.08	1763	9.18	867	13.19	1763	1.90
899	9.05	1804	1.73	899	0.41	1804	10.45
904	2.52	1857	3.25	904	3.94	1857	2.44
916	3.37	1862	4.65	916	3.04	1862	3.50
926	2.83	1874	2.54	926	1.50	1874	3.97
929	5.35	1884	1.15	929	2.24	1884	3.16
951	1.41	1900	1.93	951	14.01	1900	1.69
957	4.27	1921	10.14	957	0.52	1921	1.38
964	4.30	1927	2.02	964	1.63	1927	4.20
973	1.85	1941	8.54	973	1.25	1941	2.18
983	1.55	1964	2.97	983	1.65	1964	10.73
985	7.72	1969	15.99	985	1.10	1969	3.00
992	17.53	1988	4.95	992	6.86	1988	2.98
1067	3.24	2036	11.21	1067	5.47	2036	1.99
1077	10.37	2063	0.89	1077	0.72	2063	0.75

Concentración total de partículas (casos)		Concentración de proteínas exosomales totales	
Muestra	Partículas(10^{11})/ml	Muestra	$\mu\text{g/partículas} (\times 10^9)$
1340	2.03	1340	0.13
1341	1.81	1341	0.12
1342	2.89	1342	1.97
1343	1.13	1343	0.20
1344	15.56	1344	4.09
1345	7.93	1345	3.44
1347	0.82	1347	1.66
1351	2.14	1351	8.14
1352	6.28	1352	1.15
1353	3.65	1353	0.79
1359	3.88	1359	0.71
1360	0.97	1360	0.22
1368	3.20	1368	1.25
1369	7.00	1369	1.38
1407	11.37	1407	0.68
1408	12.00	1408	2.32
1413	3.74	1413	2.15
1414	2.01	1414	3.02
1415	4.34	1415	0.49
1416	1.12	1416	0.21
1425	1.54	1425	0.41
1431	20.45	1431	4.81
1432	6.87	1432	1.87
1433	17.75	1433	0.45
1434	4.00	1434	1.55
1436	3.43	1436	0.66
1437	8.26	1437	0.88
1439	0.72	1439	0.33
1440	8.01	1440	2.54

Anexo 3. Imágenes que muestran el análisis por inmunotransferencias de la expresión de los marcadores exosomales (ALIX, TSG101 y CD9) y marcadores de contaminación (APOB y Albúmina) en muestras de Exo-DFP de casos con CO (n=13) y controles (n=2).



Anexo 4. Listado de las 1825 proteínas exosomales encontradas por MS en las 29 muestras de casos con CO y en las 10 muestras de controles sanos.

A1BG	A2M	ABCA2	ABCA8	ABCB6	ABCB9	ABHD12B	ABHD16A	ABI1
ACADVL	ACBD3	ACE	ACHE	ACLY	ACO2	ACP1	ACP4	ACSL1
ACTB	ACTC1	ACTN1	ACTN4	ACTR1A	ACTR2	ACTR3	ADAM10	ADD1
ADD2	ADD3	ADGRE5	ADGRL3	ADH1B	ADH5	ADIPOQ	AFM	AGPAT1
AGT	AGTRAP	AHCY	AHCYL1	AHNAK	AHNAK2	AHSG	AIDA	AIFM1
AK1	AKAP12	AKAP13	AKNA	AKR1C3	AKR7A2	ALAD	ALB	ALDH16A1
ALDH1A1	ALDH1A2	ALDH1A3	ALDH2	ALDH3A2	ALDH3B1	ALDH9A1	ALDOA	ALDOC
ALG5	ALOX15	ALOX5AP	ALPL	ALPP	AMBP	ANK1	ANKFY1	ANKRD11
ANKRD2	ANO1	ANO6	ANP32C	ANPEP	ANXA1	ANXA11	ANXA13	ANXA2
ANXA3	ANXA4	ANXA5	ANXA6	ANXA7	ANXA8	ANXA8L1	AOC3	AOX1
AP1B1	AP1G1	AP2A1	AP2B1	AP2M1	AP2S1	AP3D1	APCS	APEH
APMAP	APOA1	APOA2	APOA4	APOB	APOC1	APOC3	APOD	APOE
APOH	APOL1	A POM	APRT	AQP1	AQP9	ARAP1	ARF3	ARF4
ARF5	ARF6	ARG1	ARHGAP1	ARHGAP17	ARHGAP18	ARHGDI A	ARHGDI B	ARHGEF2
ARHGEF7	ARL3	ARL6IP1	ARL6IP5	ARL8A	ARPC1B	ARPC2	ARPC4	ARPC5
ARR3	ARRDC1	ASAP2	ASPH	ASPN	ASS1	ATL3	ATM	ATP11A
ATP1A1	ATP1B1	ATP1B3	ATP2A1	ATP2A2	ATP2A3	ATP2B1	ATP2B2	ATP2B4
ATP5F1A	ATP5F1B	ATP5F1C	ATP5F1E	ATP5MC1	ATP5MF	ATP5MG	ATP5PB	ATP5PD
ATP5PO	ATP6AP1	ATP6V0A1	ATP6V0D1	ATP6V1A	ATRN	AZGP1	AZU1	B2M
B4GALT1	BAG2	BAIAP2	BASP1	BBS7	BCAM	BCAP29	BCAP31	BCEH
BDH2	BGN	BLMH	BLVRA	BLVRB	BPGM	BPI	BPIFA1	BPIFB1
BPNT2	BR13BP	BRINP2	BROX	BSG	BST1	BST2	BTD	BTN3A3
C1orf52	C1QA	C1QB	C1QBP	C1QC	C1R	C1RL	C1S	C2
C3	C4A	C4B	C4BPA	C4BPB	C5	C6	C6orf132	C7
C8A	C8B	C8G	C9	CA1	CA12	CA2	CA3	CA4
CAB39	CACNA2D1	CAD	CADM3	CALB2	CALD1	CALHM2	CALM3	CALML5
CALR	CALU	CAMK2D	CAMP	CAND1	CANX	CAP1	CAPG	CAPN1
CAPN2	CAPNS1	CAPS	CAPZA1	CAPZA2	CAPZB	CASP14	CASQ1	CAST
CAT	CAV1	CAV2	CAVIN1	CAVIN2	CAVIN3	CAVIN4	CBR1	CBY2
CCDC47	CCDC73	CCDC88A	CCM2	CCNB3	CCNY	CCT2	CCT3	CCT4
CCT5	CCT6A	CCT7	CCT8	CD109	CD14	CD151	CD163	CD200
CD248	CD276	CD34	CD36	CD38	CD4	CD44	CD47	CD53
CD55	CD58	CD59	CD5L	CD63	CD74	CD81	CD82	CD9
CD99	CD99L2	CDC16	CDC42	CDH7	CDHR3	CDIPT	CDK13	CDS2
CEACAM6	CEACAM7	CEACAM8	CEMIP	CEP295	CES1	CFB	CFD	CFH
CFHR2	CFHR5	CFI	CFL1	CFP	CHCHD3	CHMP1A	CHMP1B	CHMP2A
CHMP4B	CHMP5	CHN1	CHP1	CIB1	CISD2	CKAP4	CKB	CKM
CLDN1	CLDN10	CLDN3	CLDN6	CLEC16A	CLEC2A	CLEC3B	CLEC4M	CLIC1
CLIC2	CLIC3	CLIC4	CLIC5	CLN6	CLTA	CLTC	CLU	CLUL1
CMBL	CMTM3	CMTM7	CNDP2	CNNM4	CNP	COL12A1	COL14A1	COL18A1
COL19A1	COL1A1	COL1A2	COL23A1	COL27A1	COL3A1	COL4A2	COL6A1	COL6A2
COL6A3	COL6A3	COLEC12	COMP	COMT	COPA	COPB1	COPB2	COPE
COPG1	CORO1A	CORO1C	COTL1	COX4I1	COX5B	COX6C	COX7B	COX7C
CP	CPA3	CPB2	CPM	CPN1	CPN2	CPNE1	CPNE3	CPT1A
CRABP2	CRB2	CRIP1	CRIP2	CRISP3	CRK	CRKL	CRP	CRYAB
CRYZ	CSNK1A1	CSNK2A1	CSNK2B	CSR1P	CST3	CSTA	CSTB	CTDSP1
CTNNA1	CTNNA2	CTNNB1	CTNND1	CTSB	CTSD	CTSG	CTSS	CUL3
CWC22	CXCR1	CYB5A	CYB5B	CYB5R3	CYBA	CYBB	CYBC1	CYBRD1
CYFIP1	CYP2R1	CYP4F2	CYRIB	CYSTM1	DAD1	DAPK1	DARS1	DBN1
DBNL	DCAF6	DCD	DCDC1	DCN	DCTN1	DCTN2	DDAH2	DDB1
DDI2	DDOST	DDX11L8	DDX3X	DENND5B	DERA	DHCR7	DHRS7	DHX9
DLAT	DLST	DMBT1	DMD	DMTN	DNA2	DNAH2	DNAJB11	DNAJC5
DNM2	DNMBP	DNPEP	DNPH1	DOCK11	DOCK2	DPAGT1	DPP3	DPP4
DPYSL2	DPYSL3	DSC1	DSC2	DSG2	DSG3	DSP	DST	DSTN
DYNC1H1	DYNC1I2	DYNC1LI2	DYNLL1	DYNLRB1	DZIP1	ECM1	EEA1	EEF1A1
EEF1B2	EEF1G	EEF2	EFEMP1	EFR3A	EGFR	EHD1	EHD2	EHD3
EHD4	EIF3A	EIF3B	EIF3CL	EIF3E	EIF3F	EIF3H	EIF3I	EIF3K
EIF3M	EIF4A2	EIF4B	EIF5A	ELANE	ELMOD2	EMILIN1	EMILIN2	EMP2
EMP3	ENDOD1	ENG	ENO1	EPB41	EPB41L2	EPB41L3	EPB42	EPCAM
EPHX1	EPPK1	EPRS1	EPS8	EPS8L1	EPS8L2	ERAP1	ERBIN	ERGIC1
ERGIC3	ERICH3	ERLIN1	ERLIN2	ERMAP	ERMP1	ERP29	ERP44	ESD
ESYT1	ESYT2	ETFA	EXOC3	EXOSC9	EZR	F10	F11	F11R
F12	F13A1	F2	F5	F8	F9	FAAH	FABP4	FABP5
FAM162A	FAM186B	FAM3C	FAM98A	FAP	FAS	FASN	FAT4	FBLN1
FBN1	FBXO7	FCER1G	FCGBP	FCGR2B	FCGR3A	FCGRT	FCN1	FCN2

FCN3	FDFS	FEM1A	FERMT3	FETUB	FGA	FGB	FGG	FGL2
FHL1	FIS1	FKBP11	FKBP1A	FKBP2	FLG	FLG2	FLNA	FLNB
FLNC	FLOT1	FLOT2	FN1	FN3K	FN3KRP	FOLR1	FRMD3	FSCN1
FSIP2	FTH1	FTL	FXDY1	G6PD	GAK	GALNT1	GALNT2	GALNT7
GANAB	GAPDH	GAPVD1	GAS1	GATB	GC	GCA	GCLM	GCSAM
GDE1	GDI1	GDJ2	GET3	GGT1	GGT5	GHDC	GJA1	GLG1
GLIPR2	GLO1	GLOD4	GLRX	GLUD1	GLUL	GMPPA	GMPR	GNA11
GNA13	GNA14	GNAI1	GNAI2	GNAI3	GNAQ	GNAS	GNB1	GNB2
GNB4	GNG12	GNG2	GNG5	GOLIM4	GOLM1	GOLPH3	GOLT1B	GORASP2
GP1BB	GP9	GPC4	GPD2	GPI	GPM6A	GPNUMB	GPR107	GPR4
GPRC5A	GPRC5B	GPRC5C	GPS1	GPX1	GPX3	GPX4	GSAP	GSN
GSR	GSS	GSTM1	GSTM3	GSTO1	GSTP1	GTSE1	GYG1	GYP A
GYPC	GYS1	H2AC21	H2AC4	H2AX	H2BC11	H2BC13	H3C1	H4C1
H6PD	HABP2	HACD3	HADHA	HADHB	HAPLN2	HAPLN4	HAS1	HBA1
HBB	HBD	HBG1	HBG2	HEBP1	HECTD3	HEG1	HGFAC	HGS
HINT1	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DMB	HLA-DPA1	HLA-DPB1	HLA-DRA	HLA-DRB1
HLA-DRB3	HLA-DRB5	HLA-E	HLA-H	HM13	HNRNPD	HNRNPH1	HNRNPK	HNRNPM
HNRNPU	HNRNPUL2	HP	HPCAL1	HPR	HPX	HRG	HRRR	HSD17B10
HSD17B11	HSD17B12	HSD17B4	HSD17B6	HSDL2	HSP90AA1	HSP90AB1	HSP90B1	HSPA1B
HSPA4	HSPA5	HSPA8	HSPA9	HSPB1	HSPB6	HSPD1	HSPE1	HSPG2
HTRA1	HYDIN	HYOU1	IARS1	ICAM1	ICAM3	IDH1	IFITM3	IFT172
IFT22	IFT27	IFT80	IGF2R	IGFALS	IGHA1	IGHA2	IGHD	IGHG1
IGHG2	IGHG3	IGHG4	IGHM	IGHV1-18	IGHV1-2	IGHV1-24	IGHV1-3	IGHV1-38-4
IGHV1-45	IGHV1-46	IGHV1-58	IGHV1-69	IGHV1-69D	IGHV1-8	IGHV2-26	IGHV2-5	IGHV2-70D
IGHV3-15	IGHV3-21	IGHV3-23	IGHV3-30	IGHV3-33	IGHV3-35	IGHV3-38	IGHV3-49	IGHV3-53
IGHV3-64D	IGHV3-7	IGHV3-72	IGHV3-74	IGHV4-28	IGHV4-30-2	IGHV4-34	IGHV4-4	IGHV5-10-1
IGHV5-51	IGHV6-1	IGHV7-81	IGKC	IGKJ1	IGKV1-16	IGKV1-17	IGKV1-27	IGKV1-5
IGKV1D-13	IGKV1D-16	IGKV1D-33	IGKV1D-39	IGKV2-30	IGKV2D-24	IGKV2D-29	IGKV2D-30	IGKV3-20
IGKV3D-11	IGKV3D-15	IGKV3D-20	IGKV3D-7	IGKV4-1	IGKV6-21	IGKV6D-21	IGLC2	IGLC7
IGLL1	IGLL5	IGLV1-40	IGLV1-47	IGLV1-51	IGLV10-54	IGLV2-11	IGLV2-14	IGLV2-18
IGLV2-23	IGLV2-8	IGLV3-10	IGLV3-16	IGLV3-9	IGLV4-60	IGLV4-69	IGLV5-39	IGLV6-57
IGLV7-43	IGLV7-46	IGLV8-61	IGLV9-49	IGSF1	IL1RAP	IL6ST	ILK	ILVLB
IMMT	IMPDH2	INPP5A	IP05	IQGAP1	IRS4	ISG15	IST1	ITGA2B
ITGA3	ITGA5	ITGA6	ITGAM	ITGAV	ITGB1	ITGB2	ITGB3	ITGB5
ITIH1	ITIH2	ITIH3	ITIH4	ITLN1	ITM2B	ITPA	JAGN1	JAK1
JCHAIN	JUP	KCNAB2	KCNT1	KCTD12	KDEL1	KDM3A	KDM4C	KEL
KIF22	KIF3B	KIF4A	KIRREL1	KLKB1	KNG1	KPNB1	KRAS	KRT1
KRT10	KRT13	KRT14	KRT16	KRT17	KRT18	KRT19	KRT2	KRT36
KRT5	KRT6A	KRT6B	KRT6C	KRT7	KRT72	KRT77	KRT78	KRT8
KRT82	KRT9	LAMB1	LAMC1	LAMP1	LAMTOR2	LAMTOR3	LAP3	LASP1
LBP	LBR	LCN2	LCP1	LDHA	LDHB	LGALS1	LGALS3	LGALS3BP
LGALS8	LGALS9	LILRB3	LIMA1	LIMS1	LIN7C	LIPE	LITAF	LMAN1
LMAN2	LMAN2L	LMNA	LMNB1	LNPEP	LNPK	LPA	LPCAT2	LPCAT3
LRG1	LRP1	LRPAP1	LRRC31	LRRC57	LRRK1	LRRN4	LSAMP	LTA4H
LTF	LUM	LXN	LYN	LYVE1	LYZ	LZTFL1	M6PR	MACF1
MACROH2A1	MAGT1	MAN1A1	MANF	MAOA	MAOB	MARCKS	MARCKSL1	MASP1
MASP1 ISO2	MASP2	MATN2	MATR3	MB	MBL2	MBOAT7	MBP	MCM
MCEMP1	MCM6	MCM7	MDH1	MDH2	MDM2	MDN1	ME1	MELTF
METTL7A	MFAP4	MFAP5	MFF	MFGE8	MFSD10	MGA	MGAM	MGST1
MGST2	MGST3	MIF	MLEC	MMP9	MNDA	MOB1B	MOCS3	MOGS
MPIG6B	MPO	MPP1	MRC1	MRGPRF	MSH4	MSLN	MSN	MT-ATP6
MT-CO2	MTHFD1	MTOR	MUC1	MUC16	MUC19	MUC5B	MVP	MX1
MXD4	MYADM	MYCBP2	MYCBPAP	MYCL	MYDGF	MYH1	MYH10	MYH11
MYH14	MYH4	MYH7	MYH9	MYL12B	MYL6	MYLK	MYO18A	MYO1B
MYO1C	MYO1D	MYO1G	MYOF	N4BP2	NAMPT	NAP1L1	NAPA	NAXE
NCKAP1	NCL	NCOA2	NCSTN	NDRG1	NDUFA10	NDUFB3	NDUFB5	NEBL
NEBL	NECAB2	NECTIN2	NEDD8	NEGR1	NIBAN1	NIBAN2	NID2	NIPSNAP3B
NME1	NME2	NME2P1	NMT2	NNMT	NNT	NOA1	NOMO3	NOTCH2
NPC1L1	NPEPPS	NPM1	NPR1	NPTN	NQO1	NSDHL	NSFL1C	NT5E
NTRK1	NUCB1	NUCB2	NUP188	OGN	OLFM4	OLFML2B	OPA1	OR1M1
ORC3	ORM1	ORM2	OTUB1	OVGP1	OXSR1	P4HB	PABPC1	PABPC4
PACCSIN2	PACCSIN3	PAFAH1B3	PAICS	PAK6	PALM	PALS1	PARK7	PARP4
PARVB	PATJ	PBRM1	PCBP1	PCDHGC5	PCGF5	PCMT1	PCNX1	PCOLCE
PCYOX1	PDCD10	PDCD6	PDCD6IP	PDCL	PDE5A	PDGFRB	PDIA3	PDIA4
PDIA6	PDLIM1	PEBP1	PECAM1	PEF1	PF4	PFKL	PFKM	PFKP
PFN1	PFN2	PGAM1	PGD	PGK1	PGK2	PGLS	PGLYRP2	PGM1
PGRMC1	PGRMC2	PHB1	PHB2	PHGDH	PHKA2	PHPT1	PI16	PI4K2A
PI4KA	PIGR	PIK3CB	PIP	PIP4K2A	PITPNB	PKHD1L1	PKLR	PKM
PKP2	PLA2G4A	PLA2G6	PLCB1	PLCB3	PLCD1	PLCH1	PLEC	PLEK
PLG	PLIN1	PLIN4	PLLP	PLOD3	PLP2	PLPP1	PLS3	PLSCR1

PLSCR3	PLSCR4	PLTP	PLXNB2	PMEL	PNCK	PNP	PNPLA8	PODXL
PON1	POR	POSTN	PPA1	PPIA	PIIB	PPL	PPP1CA	PPP1CB
PPP2CB	PPP2R1A	PPP2R2A	PPP3CB	PRDM2	PRDX1	PRDX2	PRDX3	PRDX4
PRDX5	PRDX6	PRELP	PRG4	PRKACA	PRKAR1A	PRKAR2A	PRKCA	PRKCB
PRKCQ	PRKCSH	PRKDC	PRNP	PROCR	PROM1	PROS1	PRPF8	PRPS1
PRXL2A	PSMA1	PSMA2	PSMA3	PSMA4	PSMA5	PSMA6	PSMA7	PSMB1
PSMB2	PSMB3	PSMB4	PSMB5	PSMB6	PSMB7	PSMB8	PSMB9	PSMC2
PSMC3	PSMC5	PSMC6	PSMD10	PSMD11	PSMD13	PSMD14	PSMD2	PSMD3
PSMD6	PSMD7	PSMD8	PSME1	PSME2	PTBP1	PTGDS	PTGES3	PTGFRN
PTGIS	PTGR1	PTGS1	PTK7	PTPN1	PTPRC	PTPRF	PTPRG	PTPRJ
PTTG1IP	PTX3	PURA	PVR	PYGL	PYGM	PYROXD2	PZP	QSOX1
QSOX2	RAB10	RAB11A	RAB13	RAB14	RAB18	RAB1A	RAB1B	RAB23
RAB27A	RAB2A	RAB31	RAB35	RAB3D	RAB5A	RAB5B	RAB5C	RAB6A
RAB7A	RAB8A	RAB8B	RAC1	RAC2	RACK1	RAD23A	RAD23B	RAI14
RALA	RALB	RAN	RAP1A	RAP1B	RAP2B	RARS1	RBM12B	RBP1
RBP4	RCN1	RDX	RECK	REEP5	RELA	RENBP	RER1	RETN
RETREG3	RETSAT	RFTN1	RFX3	RHAG	RHCE	RHEB	RHOA	RHOB
RHOC	RHOG	RIOK1	RNF123	RNF213	RNH1	RNPEP	ROCK2	ROR2
RP2	RPL10	RPL10A	RPL11	RPL13	RPL13A	RPL14	RPL15	RPL17
RPL18	RPL18A	RPL19	RPL21	RPL22	RPL23	RPL24	RPL26	RPL27
RPL27A	RPL28	RPL29	RPL3	RPL32	RPL34	RPL35	RPL35A	RPL36
RPL36A	RPL4	RPL5	RPL6	RPL7	RPL7A	RPL8	RPL9	RPLP0
RPN1	RPN2	RPS11	RPS12	RPS13	RPS14	RPS15	RPS15A	RPS16
RPS18	RPS2	RPS23	RPS24	RPS26	RPS3	RPS3A	RPS4X	RPS5
RPS6	RPS6KA3	RPS8	RPS9	RPSA	RPUSD2	RRAS	RRAS2	RRBP1
RRM2B	RSAD2	RSU1	RTN2	RTN3	RTN4	RUVBL1	RUVBL2	S100A2
S100A4	S100A6	S100A7	S100A8	S100A9	S100A10	S100A11	S100A16	SAA1
SAA2	SAA4	SACM1L	SAR1A	SASH1	SCAMP1	SCAMP2	SCAMP3	SCAMP4
SCARB2	SCCPDH	SCEL	SCGN	SCP2	SDCBP	SDHA	SDHB	SDHC
SEC11A	SEC13	SEC22B	SEC23A	SEC61A1	SEC61B	SEC63	SELENBP1	SELENOP
SEMA3D	SEMG1	SEPTIN10	SEPTIN11	SEPTIN2	SEPTIN7	SEPTIN8	SEPTIN9	SERINC1
SERINC3	SERINC5	SERP1	SERPINA1	SERPINA3	SERPINA4	SERPINA5	SERPINA6	SERPINA7
SERPINB1	SERPINB3	SERPINB6	SERPINC1	SERPIND1	SERPINF1	SERPINF2	SERPING1	SERPINH1
SETSIP	SFRP1	SFT2D2	SH3BGRL	SH3BGRL3	SH3BP4	SHBG	SHF	SHISAL2B
SHROOM3	SIGLEC5	SIGLEC9	SIRPA	SKIV2L	SKP1	SLC14A1	SLC15A2	SLC16A1
SLC16A2	SLC1A5	SLC25A1	SLC25A11	SLC25A24	SLC25A3	SLC25A4	SLC25A5	SLC25A6
SLC26A2	SLC28A3	SLC29A1	SLC2A1	SLC2A3	SLC30A7	SLC34A2	SLC35B2	SLC39A11
SLC39A7	SLC39A8	SLC3A2	SLC40A1	SLC43A2	SLC43A3	SLC44A2	SLC44A4	SLC4A1
SLC4A2	SLC9A3R1	SLC9A3R2	SLIT1	SLK	SLMAP	SMIM1	SMPD3	SMPDL3B
SNAP23	SNAP91	SNCA	SNRNP200	SNRPA	SNX2	SNX6	SOD1	SOD2
SOD3	SORD	SOX15	SPATA1	SPCS1	SPCS2	SPCS3	SPN	SPP1
SPP2	SPPL2A	SPTA1	SPTAN1	SPTB	SPTBN1	SPTLC1	SQOR	SRI
SRL	SRP68	SRPRA	SRPRB	SRSF1	SRSF3	SRSF4	SSR1	SSR3
SSR4	SSRP1	ST13	STAB1	STEAP1	STEAP2	STEAP4	STING1	STIP1
STK24	STOM	STOML2	STT3A	STT3B	STX3	STX4	STX5	STX7
STXBP1	STXBP2	STXBP3	SUB1	SULT1A3	SULT2B1	SUMF2	SUN2	SUN3
SUPT16H	SURF4	SUSD2	SYK	SYNGR2	SYPL1	TAGLN	TAGLN2	TALDO1
TAP1	TAP2	TAPBP	TBC1D10A	TBC1D2	TBXAS1	TCN1	TCP1	TECR
TECTA	TF	TFG	TFRC	TGFBI	TGM1	TGM2	TGM3	TGOLN2
THAP4	THBS1	THEM6	THY1	TIMM50	TKT	TLN1	TLR2	TM4SF1
TM9SF2	TM9SF3	TM9SF4	TMBIM1	TMBIM6	TMED10	TMED2	TMED4	TMED5
TMED7	TMED9	TMEM109	TMEM115	TMEM119	TMEM14C	TMEM165	TMEM192	TMEM205
TMEM30A	TMEM33	TMEM43	TMEM64	TMEM97	TMF1	TMOD1	TMSB4X	TMTC4
TMX1	TMX3	TMX4	TNFAIP2	TNKS1BP1	TNPO2	TNXB	TOLLIP	TOR1AIP1
TPBG	TPI1	TPM1	TPM2	TPM3	TPM4	TPM4	TPP1	TPPP3
TPT1	TRAF3IP1	TRAM1	TRIM56	TRIP12	TRMT1	TRMT1L	TSG101	TSPAN15
TSPAN3	TSPAN4	TSPAN6	TSP0	TTC26	TTC9B	TTF1	TTN	TRR
TUBA1B	TUBA4A	TUBAL3	TUBB	TUBB4B	TUBB6	TUFM	TVP23C	TXN
TXNDC12	TXNDC5	UBA1	UBAP1	UBB	UBE2F	UBE2L3	UBE2N	UBE2O
UBE2V1	UBR4	UCHL1	UGDH	UGGT1	UGP2	UPK1B	UPK3B	UQCR10
UQCRB	UQCR1	UQCR2	UQCRFS1	UQCRQ	USO1	USP15	USP5	USP9X
VAMP3	VAMP8	VAPA	VARS1	VASP	VAT1	VCAM1	VCAN	VCL
VCP	VDAC1	VDAC2	VDAC3	VIM	VKORC1	VKORC1L1	VNN1	VNN2
VPS11	VPS26A	VPS29	VSIG4	VSIR	VTA1	VTCN1	VTN	VVA5A
VWF	WARS1	WBP2	WDR1	WDR11	WDR35	WNK1	WWC2	XK
XKR3	XPNEP1	XPO1	XPO7	XRCC5	XRCC6	YARS1	YBX1	YES1
YIF1A	YIPF5	YWHAB	YWHAE	YWHAG	YWHAH	YWHAQ	YWHAZ	ZG16B
ZMPSTE24	ZMYM1	ZNF225	ZNF317	ZNF672	ZNF804B	ZZEF1		

Anexo 5. Tabla que muestra datos previos del estudio de *Toss et al.* (178) relacionados con la expresión de marcadores pronósticos determinados mediante perfilación proteómica en diferentes especímenes de casos con CO y su correlación con nuestros datos proteómicos de los Exo-DFFP.

Autores (PMID)	Muestras recogidas para el estudio	Conjunto de muestras	Importancia de los hallazgos	Biomarcadores identificados	Alias	Regulación en los datos anteriores	Nuestro estudio (Exo-DFFP)
<i>Corfesi et al.</i> (21728179)	CO frente a tejidos normales	Pacientes con subtipos de CO endometrioides (n=3) o seroso (n=3)	Las alteraciones en las proteínas que controlan la progresión del ciclo celular y la apoptosis pueden utilizarse como biomarcadores de diagnóstico y/o pronóstico	Proteína PEBP1, del inglés <i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	PEBP1	Infraexpresado	p-valor <0.001
				Proteína Galectina-3	LGALS3	Infraexpresado	p-valor <0.05
				Proteína Anexina 5	ANXA5	Sobreexpresado	Misma tendencia de expresión
<i>An et al.</i> (16674097)	CO frente a tejidos normales	4 tumores de ovario congelados serosos, 5 mucinosos y 3 endometrioides	Los perfiles proteómicos difieren según el subtipo histológico y la agresividad tumoral	Proteína S100A8, del inglés <i>S100 calcium binding protein A8</i>	S100A8	Sobreexpresado	p-valor <0.05
				Proteína RBP1, del inglés <i>Retinol binding protein 1</i>	RBP1	Infraexpresado	Misma tendencia de expresión
				Proteína codificada por el gen <i>FTL</i> , del inglés <i>Ferritin light chain</i>	FTL	Sobreexpresado	p-valor <0.001
<i>Petri et al.</i> (19023702)	Muestras de orina	156 tumores benignos, 13 tumores <i>borderline</i> y 40 cánceres epiteliales de ovario malignos	Los perfiles proteómicos en orina representan una estrategia factible para identificar nuevos marcadores diagnósticos en los CO	Proteína PSMA6, del inglés <i>Proteasome 20S subunit alpha 6</i>	PSMA6	Sobreexpresado	p-valor <0.01
				Proteína Anexina 1	ANXA1	Sobreexpresado	Misma tendencia de expresión
				Proteína codificada por el gen <i>FGA</i> , del inglés <i>Fibrinogen alpha chain</i>	FGA	Sobreexpresado	Misma tendencia de expresión
<i>Jackson et al.</i> (18094419)	Muestras de plasma	15 pacientes con cáncer de ovario o quistes ováricos benignos frente a 5 controles sanos. Conjunto de validación: 303 individuos	La evaluación de las glicoproteínas séricas identificó esta diana como un marcador complementario al uso de <i>Ca125</i> en el seguimiento longitudinal de pacientes con CO	Proteína codificada por el gen <i>FGA</i> , del inglés <i>Fibrinogen beta chain</i>	FGB	Sobreexpresado	Misma tendencia de expresión
				Proteína COL3A1, del inglés <i>Collagen type III alpha 1 chain</i>	COL3A1	Sobreexpresado	p-valor <0.01
				Proteína Afamina, del inglés <i>Alpha-fetoprotein-like</i>	AFM	Infraexpresado	p-valor <0.001
<i>Li et al.</i> (19056166)	Cistadenocarcinoma seroso de ovario frente a tejidos normales	16 tejidos epiteliales normales, 16 tumores benignos, 21 cistadenocarcinomas serosos, 16 cistadenomas mucinosos y otros 2 carcinomas epiteliales de ovario.	El cribado proteómico representa una estrategia útil para la caracterización molecular de la progresión y el tratamiento de las neoplasias malignas de ovario	Proteína de choque térmico de la familia D1	HSPD1	Sobreexpresado	Misma tendencia de expresión
				Proteína Prohibitina 1	PHB1	Sobreexpresado	Misma tendencia de expresión

Anexo 6. Listado de las 10 rutas biológicas más enriquecidas y significativas en las diferentes categorías relevantes (*Hallmarks, Reactome, GO Biological Process* y *GO Cellular Component*) para cada una de las comparaciones de interés.

PACIENTES CON CSAG VS. CONTROLES			
REACTOME		HALLMARKS	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Sistema inmunitario innato R-HSA-168249	5.49E-17	Myc Targets V1	1.12E-07
Sistema inmunitario R-HSA-168256	6.66E-16	Fosforilación Oxidativa	4.28E-07
Enfermedades infecciosas R-HSA-5663205	1.04E-11	Complemento	1.01E-05
Respuestas celulares al estrés R-HSA-2262752	1.04E-11	Transición Epitelial-Mesenquimal	1.01E-05
Metabolismo de las proteínas R-HSA-392499	1.10E-11	Señalización mTORC1	4.90E-05
Respuestas celulares a estímulos R-HSA-8953897	1.25E-11	Respuesta a Proteínas Mal Plegadas	6.57E-05
Regulación de la expresión de SLIT y ROBO R-HSA-9010553	1.35E-11	Metabolismo de Ácidos Grasos	3.98E-03
Orientación cotranslacional de proteínas a la membrana dependiente de SRP R-HSA-1799339	1.65E-11	Rechazo de Injerto Alotípico	3.98E-03
Procesamiento de antígenos - Presentación cruzada R-HSA-1236975	1.27E-10	Secreción de Proteínas	5.29E-03
Señalización por receptores ROBO R-HSA-376176	5.38E-10	Coagulación	6.30E-03
GO (BIOLOGICAL PROCESS)		GO (CELLULAR COMPONENTS)	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Traducción citoplasmática (GO:0002181)	8.17E-09	Membrana del retículo endoplásmico (GO:0005789)	4.88E-16
Expresión génica (GO:0010467)	3.58E-07	Membrana de vesícula endocítica (GO:0030666)	7.11E-11
Proceso biosintético peptídico (GO:0043043)	3.58E-07	Vesícula de transporte de ER a Golgi recubierta de COPII (GO:0030134)	3.91E-10
Ensamblaje del antígeno peptídico con el complejo proteico del CMH (GO:0002501)	3.58E-07	Lumen de orgánulo intracelular (GO:0070013)	5.19E-10
Procesamiento y presentación del antígeno peptídico exógeno (GO:0002478)	7.25E-07	Lado lumen de la membrana del retículo endoplásmico (GO:0098553)	6.91E-10
Proceso de biosíntesis de macromoléculas (GO:0009059)	1.48E-06	Unión célula-sustrato (GO:0030055)	2.49E-09
Procesamiento y presentación de antígeno peptídico exógeno vía MHC clase II (GO:0019886)	3.90E-06	Lumen del retículo endoplásmico (GO:0005788)	6.75E-09
Procesamiento del antígeno y presentación del antígeno peptídico a través del CMH de clase II (GO:0002495)	6.02E-06	Adhesión focal (GO:0005925)	7.34E-09
Traducción (GO:0006412)	2.63E-05	Subunidad Ribosómica Citoesqueleto Grande (GO:0022625)	1.04E-08
Transporte de proteínas (GO:0015031)	3.75E-05	Gran subunidad ribosómica (GO:0015934)	1.04E-08

CONTROLES VS. PACIENTES CON CSAG			
REACTOME		HALLMARKS	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Activación, señalización y agregación plaquetaria R-HSA-76002	3.78E-18	Coagulación	6.64E-10
Hemostasia R-HSA-109582	3.78E-18	Complemento	8.50E-08
Degrانulación de neutrófilos R-HSA-6798695	3.40E-16	Unión apical	2.86E-06
Respuesta al Ca ²⁺ citosólico plaquetario elevado R-HSA-76005	2.84E-14	Señalización PI3K/AKT/mTOR	3.44E-03
Degrانulación plaquetaria R-HSA-114608	1.67E-13	Miogénesis	5.29E-03
Sistema inmunitario innato R-HSA-168249	6.25E-11	Señalización mTORC1	5.29E-03
Regulación del transporte y la captación de IGF por las IGFBR R-HSA-381426	4.00E-08	Glucólisis	5.29E-03
Metabolismo R-HSA-1430728	1.01E-07	Metabolismo xenobiótico	1.84E-02
Amplificación de señales R-HSA-392518	4.12E-07	Hipoxia	4.16E-02
Fosforilación postraduccional de proteínas R-HSA-8957275	5.48E-07	Respuesta temprana al estrógeno	4.16E-02
GO (BIOLOGICAL PROCESS)		GO (CELLULAR COMPONENTS)	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Localización de proteínas en la periferia celular (GO:1990778)	2.93E-06	Adhesión focal (GO:0005925)	4.18E-23
Organización de filamentos de actina (GO:0007015)	2.93E-06	Unión célula-sustrato (GO:0030055)	4.56E-23
Ensamblaje de la proyección celular limitada por la membrana plasmática (GO:0120031)	6.37E-06	Vesícula (GO:0031982)	4.48E-20
Localización de proteínas en la membrana (GO:0072657)	8.03E-06	Citoesqueleto de actina (GO:0015629)	3.48E-14
Ensamblaje de componentes celulares (GO:0022607)	8.83E-06	Lumen de gránulos secretorios (GO:0034774)	9.94E-14
Transducción de señales de la proteína Ras (GO:0007265)	8.83E-06	Proyección celular basada en actina (GO:0098858)	5.70E-11
Establecimiento De La Barrera Endotelial (GO:0061028)	1.02E-05	Citoesqueleto (GO:0005856)	8.11E-11
Regulación negativa de la actividad endopeptidasa (GO:0010951)	2.69E-05	Lumen de vesículas citoplasmáticas (GO:0060205)	2.71E-10
Localización de proteínas en la membrana plasmática (GO:0072659)	2.83E-05	Gránulo Rico en Ficolina-1 (GO:0101002)	2.92E-10
Regulación Del Tamaño Celular (GO:0008361)	7.82E-05	Unión célula-célula (GO:0005911)	4.06E-10

MUESTRAS RECOGIDAS DE C. INTERVALO VS. PRIMARIAS/DIAGNÓSTICAS			
REACTOME		HALLMARKS	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Hemostasia R-HSA-109582	6.29E-08	Señalización mTORC1	3.84E-06
Expresión de genes y proteínas mediante la señalización JAK-STAT tras la estimulación con interleucina-12 R-HSA-8950505	5.59E-06	Hipoxia	2.08E-05
La disregulación de CDK5 desencadena vías neurodegenerativas en modelos de la enfermedad de Alzheimer R-HSA-8862803	9.36E-06	Unión apical	8.51E-04
Activación, señalización y agregación plaquetaria R-HSA-76002	9.36E-06	Glucólisis	8.51E-04
Señalización de la interleucina-12 R-HSA-9020591	9.36E-06	Vía de las especies reactivas del oxígeno	9.63E-04
Vía intrínseca defectuosa para la apoptosis R-HSA-9734009	1.02E-05	Respuesta tardía al estrógeno	3.57E-03
Señalización de la familia de la interleucina-12 R-HSA-447115	2.34E-05	Fosforilación oxidativa	3.57E-03
Enfermedad R-HSA-1643685	3.93E-05	Metabolismo de los ácidos grasos	7.02E-03
Degrانulación de neutrófilos R-HSA-6798695	3.05E-04	Huso mitótico	1.56E-02
Interacciones entre basiginas R-HSA-210991	3.58E-04	Complemento	1.56E-02
GO (BIOLOGICAL PROCESS)		GO (CELLULAR COMPONENTS)	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Proceso glucolítico (GO:0006096)	8.35E-06	Adhesión focal (GO:0005925)	9.44E-14
Gluconeogénesis (GO:0006094)	8.35E-06	Unión célula-sustrato (GO:0030055)	9.44E-14
Proceso Biosintético de la Hexosa (GO:0019319)	9.84E-06	Vesícula (GO:0031982)	4.64E-12
Proceso catabólico de carbohidratos (GO:0016052)	1.99E-05	Microvellosidad (GO:0005902)	6.52E-10
Establecimiento de la polaridad apical/basal de las células epiteliales (GO:0045198)	3.34E-05	Proyección celular basada en actina (GO:0098858)	1.81E-08
Citocinesis dependiente del citoesqueleto (GO:0061640)	3.88E-05	Citoesqueleto de septina (GO:0032156)	9.15E-08
Proceso metabólico del piruvato (GO:0006090)	3.88E-05	Anillo de septina (GO:0005940)	9.15E-08
Establecimiento de la barrera endotelial (GO:0061028)	4.59E-05	Balsa de membrana (GO:0045121)	4.73E-06
Proceso metabólico de la glucosa (GO:0006006)	6.53E-05	Filopodio (GO:0030175)	1.14E-05
Diferenciación de células epiteliales polarizadas (GO:0030859)	6.53E-05	Citoesqueleto de actina (GO:0015629)	1.70E-05

MUESTRAS RECOGIDAS DE C. PRIMARIAS/DIAGNÓSTICAS VS. INTERVALO

REACTOME		HALLMARKS	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Formación del coágulo de fibrina (cascada de coagulación) R-HSA-140877	2.24E-09	Coagulación	5.81E-05
Degradación Plaquetaria R-HSA-114608	8.62E-09	Metabolismo xenobiótico	2.59E-02
Respuesta al Ca ²⁺ citosólico plaquetario elevado R-HSA-76005	8.62E-09	Complemento	1.28E-01
Cascada del complemento R-HSA-166658	1.06E-08	Metabolismo de los ácidos grasos	2.85E-01
Activación, señalización y agregación plaquetaria R-HSA-76002	1.03E-07	Respuesta UV	2.85E-01
Regulación de la cascada del complemento R-HSA-977606	1.03E-07	Adipogénesis	3.03E-01
Sistema inmunitario innato R-HSA-168249	1.03E-07	Miogénesis	3.03E-01
Vía común de formación de coágulos de fibrina R-HSA-140875	1.03E-07	Pperoxisoma	4.48E-01
Agregación plaquetaria (formación de tapones) R-HSA-76009	1.27E-06	Metabolismo de los ácidos biliares	4.48E-01
Vinculación de p130Cas con la señalización MAPK de las integrinas R-HSA-372708	1.36E-06	Respuesta UV Dn	4.48E-01
GO (BIOLOGICAL PROCESS)		GO (CELULAR COMPONENTS)	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Cascada de activación de proteínas (GO:0072376)	1.08E-05	Lumen del gránulo secretor (GO:0034774)	1.55E-06
Coagulación sanguínea, formación de coágulos de fibrina (GO:0072378)	1.08E-05	Lumen del gránulo alfa plaquetario (GO:0031093)	1.55E-06
Activación del Plasminógeno (GO:0031639)	1.46E-04	Matriz extracelular que contiene colágeno (GO:0062023)	3.23E-06
Fibrinolisis (GO:0042730)	3.41E-04	Gránulo alfa plaquetario (GO:0031091)	4.70E-06
Regulación positiva de la vasoconstricción (GO:0045907)	3.41E-04	Lumen de orgánulo intracelular (GO:0070013)	2.82E-03
Regulación positiva de la adhesión heterotípica célula-célula (GO:0034116)	4.30E-04	Lumen del gránulo denso plaquetario (GO:0031089)	8.39E-03
Activación de zimógenos (GO:0031638)	4.30E-04	Gránulo denso plaquetario (GO:0042827)	1.73E-02
Respuesta humoral antibacteriana (GO:0019731)	5.31E-04	Lumen del gránulo rico en ficolina-1 (GO:1904813)	5.53E-02
Regulación de la secreción de hormonas peptídicas (GO:0090276)	5.99E-04	Lumen granular terciario (GO:1904724)	8.07E-02
Regulación positiva de la secreción hormonal (GO:0046887)	7.40E-04	Orgánulo con membrana extracelular (GO:0065010)	8.07E-02

MUESTRAS RECOGIDAS DE C. RECAÍDA VS. PRIMARIAS/DIAGNÓSTICAS

REACTOME		HALLMARKS	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Hemostasia R-HSA-109582	6.84E-15	Metabolismo del hemo	1.32E-10
Degradación de neutrófilos R-HSA-6798695	4.79E-14	Transición epitelio-mesénquima	2.74E-07
Enfermedad R-HSA-1643885	3.12E-11	Hipoxia	4.73E-06
Activación, señalización y agregación plaquetaria R-HSA-76002	1.04E-10	Señalización mTORC1	4.73E-06
Enfermedades infecciosas R-HSA-5663205	6.10E-09	Fosforilación oxidativa	4.73E-06
Infecciones por SARS-CoV R-HSA-9679506	2.09E-08	Miogénesis	2.31E-05
Orientación cotranslacional de proteínas a la membrana dependiente de SRP R-HSA-1799339	2.09E-08	Metabolismo de los ácidos grasos	6.03E-05
Guía de axones R-HSA-422475	3.82E-08	Unión apical	7.51E-05
Desarrollo del sistema nervioso R-HSA-9675108	1.02E-07	Complemento	7.51E-05
Infección por SARS-CoV-2 R-HSA-9694516	1.21E-07	Glucólisis	7.51E-05
GO (BIOLOGICAL PROCESS)		GO (CELULAR COMPONENTS)	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Localización de proteínas en la periferia celular (GO:1990778)	1.23E-08	Unión célula-sustrato (GO:0030055)	4.10E-40
Localización de proteínas en la membrana (GO:0072657)	1.23E-08	Adhesión focal (GO:0005925)	1.57E-38
Agregación plaquetaria (GO:0070527)	1.36E-08	Membrana de gránulos secretorios (GO:0030667)	5.59E-14
Localización de proteínas en la membrana plasmática (GO:0072659)	2.19E-08	Vesícula (GO:0031982)	5.63E-14
Adhesión homotípica célula-célula (GO:0034109)	1.60E-07	Balsa de membrana (GO:0045121)	5.03E-11
Establecimiento De Barrera Endotelial (GO:0061028)	2.16E-05	Citoesqueleto (GO:0005856)	1.70E-10
Traducción citoplasmática (GO:0002181)	1.31E-04	Citoesqueleto de actina (GO:0015629)	1.59E-08
Transporte mediado por vesículas (GO:0016192)	1.48E-04	Organelo intracelular no limitado por membranas (GO:0043232)	5.99E-08
Organización de la balsa de membrana (GO:0031579)	1.48E-04	Pequeña subunidad ribosómica citosólica (GO:0022627)	6.26E-08
Diferenciación de células epiteliales polarizadas (GO:0030859)	1.48E-04	Subunidad ribosómica pequeña (GO:0015935)	7.09E-08

MUESTRAS RECOGIDAS DE C. PRIMARIAS/DIAGNÓSTICAS VS. RECAÍDA

REACTOME		HALLMARKS	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Cascada del complemento R-HSA-166658	7.83E-32	Coagulación	1.32E-17
Regulación de la cascada del complemento R-HSA-977606	4.62E-27	Complemento	2.39E-04
Sistema inmunitario innato R-HSA-168249	9.99E-22	Respuesta al interferón gamma	2.50E-04
Activación inicial del complemento R-HSA-166663	5.95E-21	Metabolismo xenobiótico	4.82E-03
Creación de activadores C4 y C2 R-HSA-166786	3.13E-15	Transición epitelio-mesénquima	6.40E-02
Sistema inmunitario R-HSA-168256	3.07E-11	Respuesta del interferón alfa	1.34E-01
Activación clásica del complemento mediada por anticuerpos R-HSA-173623	1.60E-10	Señalización KRAS Up	1.34E-01
Degradación plaquetaria R-HSA-114608	1.11E-08	Señalización KRAS Dn	1.34E-01
Respuesta al Ca ²⁺ citosólico plaquetario elevado R-HSA-76005	1.67E-08	Adipogénesis	7.56E-01
Activación de C3 y C5 R-HSA-174577	5.99E-08	Unión apical	7.56E-01
GO (BIOLOGICAL PROCESS)		GO (CELULAR COMPONENTS)	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Activación del complemento, vía de las lectinas (GO:0001867)	9.01E-06	Matriz extracelular que contiene colágeno (GO:0062023)	6.87E-18
Regulación positiva de procesos del sistema inmunitario (GO:0002684)	9.01E-06	Lumen de gránulos secretorios (GO:0034774)	1.03E-10
Homeostasis de la retina (GO:0001895)	6.06E-05	Complejo de ataque de membrana (GO:0005579)	1.03E-10
Coagulación sanguínea, formación de coágulos de fibrina (GO:0072378)	6.06E-05	Envoltura cornificada (GO:0001533)	9.23E-10
Cascada De Activación De Proteínas (GO:0072376)	6.06E-05	Lumen del gránulo alfa plaquetario (GO:0031093)	1.73E-06
Regulación Negativa De La Actividad De Las Peptidasas (GO:0010466)	6.06E-05	Filamento intermedio (GO:0005882)	2.15E-06
Respuesta Inflamatoria Aguda (GO:0002526)	6.06E-05	Lumen de orgánulo intracelular (GO:0070013)	3.25E-06
Regulación positiva de la eliminación de células apoptóticas (GO:2000427)	7.66E-05	Filamento de queratina (GO:0045095)	4.81E-06
Activación del zimógeno (GO:0031638)	8.60E-05	Gránulo alfa plaquetario (GO:0031091)	1.32E-05
Organización de filamentos intermedios (GO:0045109)	1.12E-04	Gránulo rico en ficolina-1 (GO:0101002)	1.32E-04

MUESTRAS RECOGIDAS DE C. DE RECAÍDA VS. INTERVALO

REACTOME		HALLMARKS	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Degradación de neutrófilos R-HSA-6798695	7.75E-08	Transición epitelio-mesénquima	4.47E-04
Hemostasia R-HSA-109582	4.41E-05	Señalización IL-2/STAT5	1.91E-03
Sistema inmunitario innato R-HSA-168249	4.41E-05	Metabolismo del hemo	1.91E-03
Activación, señalización y agregación plaquetaria R-HSA-76002	4.64E-04	Apoptosis	6.75E-03
GRB2:SOS proporciona enlace con la señalización MAPK de las integrinas R-HSA-354194	5.26E-04	Señalización IL-6/JAK/STAT3	9.34E-03
Vinculación de p130Cas con la señalización MAPK de las integrinas R-HSA-372708	5.26E-04	Myc Targets V1	9.34E-03
Degradación plaquetaria R-HSA-114608	1.15E-03	Secreción de proteínas	9.34E-03
Respuesta al Ca ²⁺ citosólico plaquetario elevado R-HSA-76005	1.21E-03	Angiogénesis	1.59E-02
Señalización de integrinas R-HSA-354192	2.21E-03	Adipogénesis	4.96E-02
Guía de axones R-HSA-422475	2.50E-03	Fosforilación oxidativa	4.96E-02
GO (BIOLOGICAL PROCESS)		GO (CELLULAR COMPONENTS)	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Regulación Negativa De La Formación De Amiloide-Beta (GO:1902430)	2.64E-03	Membrana de gránulos secretorios (GO:0030667)	3.28E-11
Organización de la red tubular del retículo endoplásmico (GO:0071786)	2.64E-03	Adhesión focal (GO:0005925)	2.75E-06
Organización del retículo endoplásmico (GO:0007029)	2.64E-03	Unión célula-sustrato (GO:0030055)	2.75E-06
Regulación Negativa Del Proceso Catabólico De La Proteína Precursora Amiloide (GO:1902992)	2.64E-03	Citosqueleto asociado a espectrina (GO:0014731)	1.71E-05
Señalización mediada por calcio utilizando una fuente de calcio intracelular (GO:0035584)	2.94E-03	Membrana de gránulos azurófilos (GO:0035577)	3.76E-04
Regulación de la formación de beta-amiloide (GO:1902003)	1.15E-02	Citosqueleto cortical (GO:0030863)	4.35E-04
Agregación plaquetaria (GO:0070527)	1.17E-02	Gránulo terciario (GO:0070820)	1.10E-03
Regulación positiva de la diferenciación leucocitaria (GO:1902107)	1.36E-02	Balsa de membrana (GO:0045121)	1.18E-03
Ensamblaje de snRNP de caja CID (GO:0000492)	1.61E-02	Membrana granular específica (GO:0035579)	1.18E-03
Adhesión homotípica célula-célula (GO:0034109)	1.87E-02	Gránulo rico en ficolina-1 (GO:0101002)	1.40E-03

MUESTRAS RECOGIDAS DE C. DE INTERVALO VS. RECAÍDA

REACTOME		HALLMARKS	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Depuración por receptores de clase A R-HSA-3000480	4.25E-04	Respuesta al interferón gamma	2.45E-01
Unión y captación de ligandos por receptores carroñeros R-HSA-2173782	2.29E-03	Complemento	2.45E-01
Tráfico de carga a la membrana periciliar R-HSA-5620920	9.29E-02	Vía de las especies reactivas del oxígeno	2.45E-01
Descomposición De La Envoltura Nuclear R-HSA-2980766	9.29E-02	Respuesta al interferón alfa	2.45E-01
Biogénesis de vesículas asociadas al Golgi R-HSA-432722	9.29E-02	Coagulación	2.45E-01
Captación y transporte de hierro R-HSA-917937	9.29E-02	Reparación del ADN	2.45E-01
Desprendimiento de vesículas de la red trans-Golgi R-HSA-199992	1.11E-01	Metabolismo de los ácidos grasos	2.45E-01
Reensamblaje de la envoltura nuclear (NE) R-HSA-2995410	1.11E-01	Respuesta UV Arriba	2.45E-01
Eliminación de quilomicrones R-HSA-8964026	1.40E-01	Huso mitótico	2.45E-01
Profase mitótica R-HSA-68875	1.46E-01	Metabolismo xenobiótico	2.45E-01
GO (BIOLOGICAL PROCESS)		GO (CELLULAR COMPONENTS)	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Secuestro intracelular de iones de hierro (GO:0006880)	9.27E-03	Autolisosoma (GO:0044754)	4.60E-03
Regulación positiva de la actividad transferasa (GO:0051347)	8.50E-02	Lisosoma secundario (GO:0005767)	6.67E-03
Regulación positiva de la cascada ERK1 y ERK2 (GO:0070374)	8.50E-02	Membrana de vesícula endocítica recubierta de clatrina (GO:0030689)	6.82E-02
Homeostasis intracelular de iones de hierro (GO:0006879)	8.50E-02	Autofagosoma (GO:0005776)	6.82E-02
Regulación de la cascada ERK1 y ERK2 (GO:0070372)	8.50E-02	Lumen de orgánulo intracelular (GO:0070013)	6.82E-02
Citocinesis dependiente del citoesqueleto (GO:0061640)	8.50E-02	Vesícula endocítica recubierta de clatrina (GO:0045334)	6.82E-02
Detección De Virus (GO:0009597)	8.50E-02	Membrana de vesícula recubierta de clatrina (GO:0030665)	6.82E-02
Ensamblaje Del Aparato Central Axonemal (GO:1904158)	8.50E-02	Partículas de lipoproteínas de baja densidad (GO:0034362)	7.12E-02
Proceso metabólico de lipoproteínas (GO:0042157)	8.50E-02	Complejo dihidropol deshidrogenasa (GO:0045240)	7.37E-02
Regulación positiva del desarrollo de la proyección neuronal (GO:0010976)	8.50E-02	Quilomicrón (GO:0042627)	7.58E-02

MUESTRAS DE PACIENTES CON MUTACIÓN EN BRCA 1/2 VS. SIN MUTACIÓN EN BRCA 1/2

REACTOME		HALLMARKS	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Señalización del interferón gamma R-HSA-877300	1.52E-03	Señalización IL-2/STAT5	1.98E-01
Presentación de antígenos MHC de clase II R-HSA-2132295	1.52E-03	Glucólisis	1.98E-01
Señalización del interferón R-HSA-913531	1.14E-02	Myc Targets V1	1.98E-01
Translocación de ZAP-70 a la sinapsis inmunológica R-HSA-202430	1.14E-02	Transición epitelio-mesénquima	1.98E-01
Sistema inmunitario R-HSA-168256	1.14E-02	Señalización IL-6/JAK/STAT3	2.61E-01
Fosforilación de las cadenas zeta de CD3 y TCR R-HSA-202427	1.14E-02	Secreción de proteínas	2.61E-01
Señalización de PD-1 R-HSA-389948	1.14E-02	Respuesta al interferón alfa	2.61E-01
Silenciamiento translocacional de la expresión de ceruloplasmina mediado por L13a R-HSA-156827	1.17E-02	Peroxisoma	2.61E-01
Sistema inmunitario adaptativo R-HSA-1280218	1.17E-02	Respuesta a proteínas no plegadas	2.61E-01
Iniciación de la traducción dependiente de la cápsula R-HSA-72737	1.17E-02	Apoptosis	2.61E-01
GO (BIOLOGICAL PROCESS)		GO (CELLULAR COMPONENTS)	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Procesamiento del antígeno y presentación del antígeno peptídico exógeno a través del CMH de clase II (GO:0019886)	1.68E-05	Membrana de vesícula de transporte de ER a Golgi (GO:0012507)	5.49E-05
Procesamiento y presentación del antígeno peptídico a través del CMH de clase II (GO:002495)	1.68E-05	Membrana de vesícula recubierta (GO:0030662)	5.49E-05
Procesamiento y presentación de antígenos peptídicos exógenos (GO:0002478)	1.72E-05	Membrana de vesícula de transporte (GO:0030658)	5.49E-05
Respuesta inmunitaria mediada por inmunoglobulinas (GO:0016064)	1.23E-03	Complejo proteico MHC (GO:0042611)	8.52E-05
Regulación positiva de la adhesión célula-célula leucocitaria (GO:1903039)	3.17E-03	COPII-coated ER To Golgi Transport Vesicle (GO:0030134)	8.52E-05
Ensamblaje del complejo proteico MHC de clase II (GO:0002396)	1.15E-02	Lado lumen de la membrana del retículo endoplásmico (GO:0098553)	1.26E-04
Ensamblaje del antígeno peptídico con el complejo proteico MHC de clase II (GO:0002503)	1.15E-02	Unión célula-sustrato (GO:0030055)	2.62E-04
Ensamblaje del antígeno peptídico con el complejo proteico MHC (GO:0002501)	1.67E-02	Membrana de vesícula endocítica (GO:0030666)	9.76E-04
Producción de inmunoglobulinas implicada en la respuesta inmunitaria mediada por inmunoglobulinas (GO:0002381)	1.67E-02	Podosoma (GO:0002102)	1.38E-03
Endocitosis mediada por receptores (GO:0006898)	3.27E-02	Complejo proteico MHC de clase II (GO:0042613)	1.88E-03

MUESTRAS DE PACIENTES SIN MUTACIÓN EN BRCA 1/2 VS. CON MUTACIÓN EN BRCA 1/2

REACTOME		HALLMARKS	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Regulación De La Remodelación Del Citoesqueleto Y De La Propagación Celular Por Componentes Del Complejo IPP R-HSA-446388	2.35E-03	Coagulación	7.77E-02
Formación de una reserva de subunidades 40S libres R-HSA-72689	2.35E-03	Respuesta temprana a los estrógenos	7.77E-02
Interacciones célula-matriz extracelular R-HSA-446353	2.35E-03	Respuesta tardía de los estrógenos	7.77E-02
Traducción R-HSA-72766	2.35E-03	Células beta del páncreas	1.51E-01
Silenciamiento translocacional de la expresión de ceruloplasmina mediado por L13a R-HSA-156827	2.35E-03	Respuesta androgénica	1.66E-01
Orientación cotranslocacional de proteínas a la membrana dependiente de SRP R-HSA-1799339	2.35E-03	Metabolismo de los ácidos biliares	1.66E-01
Hidrólisis de GTP y unión de la subunidad ribosomal 60S R-HSA-72706	2.35E-03	Respuesta a las proteínas no plegadas	1.66E-01
Iniciación de la traducción dependiente de la cápsula R-HSA-72737	2.48E-03	Huso mitótico	1.66E-01
Formación del complejo ternario y, posteriormente, del complejo 43S R-HSA-72695	1.38E-02	Señalización IL-2/STAT5	1.66E-01
Exploración ribosómica y reconocimiento del codón de inicio R-HSA-72702	1.39E-02	Metabolismo de xenobióticos	1.66E-01
GO (BIOLOGICAL PROCESS)		GO (CELULAR COMPONENTS)	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Regulación positiva de la adhesión célula-sustrato (GO:0010811)	8.21E-05	Adhesión focal (GO:0005925)	6.44E-03
Regulación positiva de la adhesión celular dependiente de sustrato (GO:1900026)	3.78E-04	Unión célula-sustrato (GO:0030055)	6.44E-03
Regulación de la propagación celular dependiente de la adhesión a sustratos (GO:1900024)	7.90E-04	Matriz extracelular que contiene colágeno (GO:0062023)	4.98E-02
Respuesta celular al estímulo del factor de crecimiento transformante beta (GO:0071560)	3.96E-03	Citoesqueleto de septinas (GO:0032156)	8.15E-02
Regulación positiva de la actividad hidrolasa (GO:0051345)	1.68E-02	Anillo de septina (GO:0005940)	8.15E-02
Respuesta al factor de crecimiento transformante beta (GO:0071559)	1.68E-02	Vesícula (GO:0031982)	1.04E-01
Regulación de la adhesión célula-sustrato (GO:0010810)	1.93E-02	Ribosoma polisómico (GO:0042788)	1.04E-01
Regulación positiva de la adhesión celular (GO:0045785)	6.62E-02	Lumen del retículo endoplásmico (GO:0005786)	1.04E-01
Traducción citoplásmica (GO:0002181)	6.62E-02	Cilio no móvil (GO:0097730)	1.04E-01
Regulación del ensamblaje de cilios no móviles (GO:1902855)	6.84E-02	Subunidad ribosómica citosólica pequeña (GO:0022627)	1.18E-01

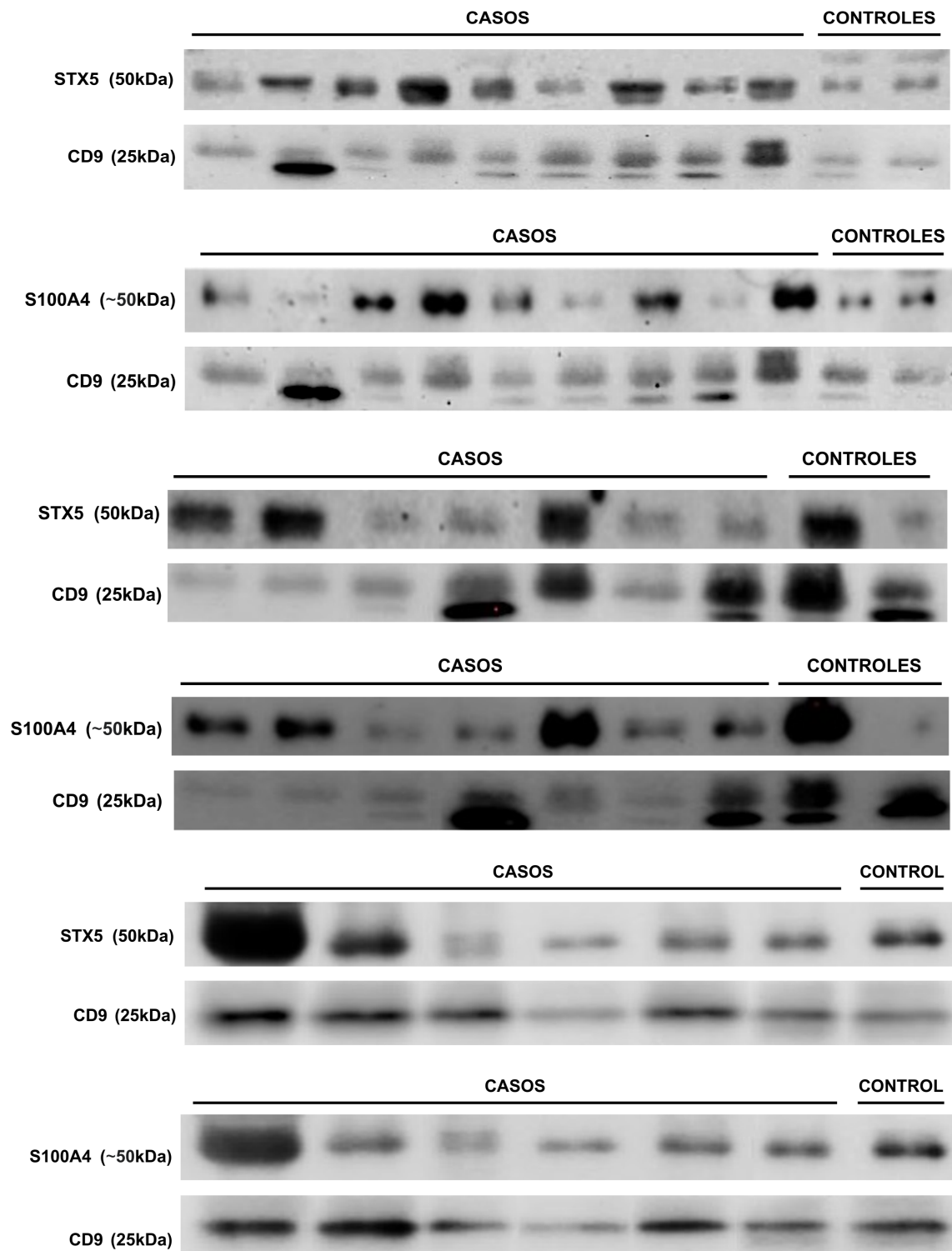
MUESTRAS DE PACIENTES RESISTENTES VS. SENSIBLES AL PLATINO

REACTOME		HALLMARKS	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Degradación de neutrófilos R-HSA-6798695	2.47E-03	Adipogénesis	5.01E-03
Sistema inmunitario innato R-HSA-168249	5.07E-02	Hipoxia	2.72E-02
Sistema inmunitario R-HSA-168256	8.70E-02	Metabolismo del hemo	2.72E-02
Metabolismo de la vitamina C (ascorbato) R-HSA-196836	8.70E-02	Señalización mTORC1	2.72E-02
Plegamiento de actina por CCT/TTC R-HSA-390450	8.70E-02	Homeostasis del colesterol	1.15E-01
Reducción de los niveles de Ca ²⁺ citosólico R-HSA-418359	8.70E-02	Metabolismo de los ácidos biliares	1.43E-01
DUB de dominio de josefina R-HSA-5689877	8.70E-02	Respuesta UV A/B	1.49E-01
Síntesis de glucógeno R-HSA-332077	8.70E-02	Señalización IL-2/STAT5	1.49E-01
Descomposición del glucógeno (glucogenólisis) R-HSA-70221	8.70E-02	Miogénesis	1.49E-01
Tráfico de membrana R-HSA-199991	8.70E-02	Señalización del TNF-alfa a través de NF-κB	1.49E-01
GO (BIOLOGICAL PROCESS)		GO (CELULAR COMPONENTS)	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Regulación positiva de la actividad dependiente de ATP (GO:0032781)	2.63E-02	Gránulo rico en ficolina-1 (GO:0101002)	5.49E-05
Proceso catabólico de proteínas dependiente de la ubiquitina mediado por el proteasoma (GO:0043161)	5.04E-02	Lumen del gránulo secretor (GO:0034774)	5.49E-05
Desmontaje del Golgi (GO:0090166)	5.04E-02	Lumen del gránulo azurífero (GO:0035578)	5.49E-05
Proceso metabólico del ácido L-ascórbico (GO:0019852)	5.33E-02	Ficolin-1-Rich Granule Lumen (GO:1904813)	8.52E-05
Regulación de la actividad de los canales de sodio dependientes de voltaje (GO:1905150)	5.33E-02	Gránulo azurífero (GO:0042582)	8.52E-05
Importación de hexosa a través de la membrana plásmica (GO:0140271)	5.33E-02	Gránulo específico (GO:0042581)	1.26E-04
Regulación positiva de la contracción del músculo estriado (GO:0045989)	5.33E-02	Lumen vacuolar (GO:0005775)	2.82E-04
Transporte Transmembrana De Fructosa (GO:0015755)	5.33E-02	Gránulo terciario (GO:0070820)	9.76E-04
Vía de señalización de SREBP (GO:0032933)	5.33E-02	Citoesqueleto de septina (GO:0032156)	1.38E-03
Regulación del proceso de biosíntesis de esteroides (GO:0106118)	5.33E-02	Anillo de septina (GO:0005940)	1.88E-03

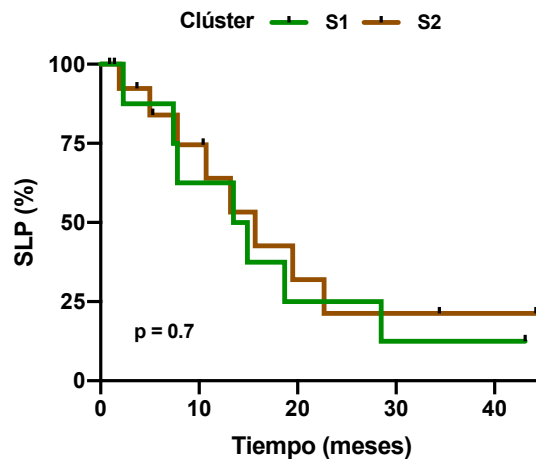
MUESTRAS DE PACIENTES SENSIBLES VS. RESISTENTES AL PLATINO

REACTOME		HALLMARKS	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Degradación plaquetaria R-HSA-114608	1.18E-02	Coagulación	2.33E-03
Respuesta al Ca ²⁺ citosólico plaquetario elevado R-HSA-76005	1.18E-02	Homeostasis del colesterol	3.59E-02
Reacción acrosómica y unión espermatozoide:membrana oocitaria R-HSA-1300645	1.79E-02	Señalización IL-6/JAK/STAT3	3.59E-02
Captación y función de la toxina diférica R-HSA-5336415	1.79E-02	Señalización mTORC1	4.90E-02
Activación, señalización y agregación plaquetaria R-HSA-76002	1.79E-02	Respuesta tardía a los estrógenos	4.90E-02
Vinculación de p130Cas con la señalización MAPK de las integrinas R-HSA-372708	2.35E-02		
GRB2:SOS proporciona enlace con la señalización MAPK de las integrinas R-HSA-354194	2.35E-02		
Deficiencia de MyD88 (TLR2/4) R-HSA-5602498	2.35E-02		
Regulación de TLR por ligando endógeno R-HSA-5686938	2.35E-02		
Deficiencia de IRAK4 (TLR2/4) R-HSA-5603041	2.35E-02		
GO (BIOLOGICAL PROCESS)		GO (CELULAR COMPONENTS)	
Proceso biológico	p-valor ajustado	Proceso biológico	p-valor ajustado
Inducción De La Aglutinación Bacteriana (GO:0043152)	1.98E-02	Organelo de membrana extracelular (GO:0065010)	8.80E-04
Activación del plasminógeno (GO:0031639)	1.98E-02	Vesícula extracelular (GO:1903561)	8.80E-04
Regulación negativa de la agregación plaquetaria (GO:0090331)	1.98E-02	Gránulo alfa plaquetario (GO:0031091)	1.29E-03
Ensamblaje de la mielina (GO:0032288)	1.98E-02	Vesícula (GO:0031982)	6.72E-03
Regulación negativa de la adhesión homotípica célula-célula (GO:0034111)	1.98E-02	Membrana de gránulo secretor (GO:0030667)	7.54E-03
Regulación positiva de la vasoconstricción (GO:0045907)	1.98E-02	Membrana de vesícula citoplásmica (GO:0030659)	1.14E-02
Fibrosis (GO:0042730)	1.98E-02	Membrana del gránulo alfa plaquetario (GO:0031092)	1.14E-02
Regulación positiva de la adhesión heterotípica célula-célula (GO:0034116)	1.98E-02	Membrana circundante de orgánulo (GO:0098588)	3.38E-02
Cascada de activación de proteínas (GO:0072376)	1.98E-02	Lumen del gránulo alfa plaquetario (GO:0031093)	3.38E-02
Coagulación sanguínea, formación de coágulos de fibrina (GO:0072378)	1.98E-02	Membrana de vesícula endocítica recubierta de clatrina (GO:0030669)	3.38E-02

Anexo 7. Imágenes representativas del análisis por inmunotransferencia de la expresión de las proteínas S100A4, STX5 y CD9 en muestras de la cohorte de validación. El conjunto de muestras analizadas mediante inmunotransferencia incluía 22 casos con CSAG y 5 controles.



Anexo 8. Asociación de los dos clústeres de los casos con CSAG definidos en el análisis proteómico con la SLP (meses).



Anexo 9. Otras actividades y producción científica realizadas durante la Tesis Doctoral.
Publicaciones relacionadas con la Tesis Doctoral:

- **Quiralte M**, Barquín A, Yagüe Fernández M, Navarro P, Grazioso TP, Sevillano E, Rodriguez Moreno JF, Balarezo-Saldivar A, Peinado H, Izquierdo E, Millán C, López Carrasco I, Prieto M, Madurga de Lacalle R, Fernández-Miranda I, Ruiz-Llorente S, García-Donas J. Proteomic profiles of peritoneal-derived small extracellular vesicles correlate with outcome in ovarian cancer patients. *J Clin Invest.* 2024 Apr 2:e176161. doi: 10.1172/JCI176161. Epub ahead of print. PMID: 38564289.

Congresos relacionados con la Tesis Doctoral:

- **Miguel Quiralte**, Arantzazu Barquín, Elena Sevillano, Paloma Navarro, Mónica Yagüe, María Barba, Juan F. Rodríguez-Moreno, Alejandra Balarezo, Héctor Peinado, Elena Izquierdo, Jesús García-Donas, Sergio Ruiz-Llorente. Abstract 3223: Prospective study for the assessment of exosomes in ascitic fluid as prognostic markers in patients with advanced ovarian cancer. *Cancer Research.* 2022 Jun 15;82(12_Supplement):3223–3223. Póster.
- **Miguel Quiralte**, Arantzazu Barquín, Mónica Yagüe, Paloma Navarro, Elena Sevillano, Juan Francisco Rodríguez-Moreno, Alejandra Balarezo, Héctor Peinado, Elena Izquierdo, Carlos Millán, Irene López, Sergio Ruiz-Llorente, Jesús García-Donas. Proteomic profiling of peritoneal fluid-derived exosomes as a tool for the identification of prognostic markers in advanced ovarian carcinomas. *JCO.* 2023 Jun 1;41(16_suppl):e17561–e17561. Abstract online.

Publicaciones no relacionadas con la Tesis Doctoral:

- Barquín García A, Palacios-Zambrano S, Lozano Alarcón F, Paumard-Hernández B, **Quiralte Pulido M**, Navarro P, Rodríguez L, Salas Villar I, García-Donas J. Impact of the Identification of Nonhuman Genetic Signatures in the Diagnosis and Management of Carcinoma of Unknown Primary. *J Natl Compr Canc Netw.* 2023 Dec 27;22(1D):e237079. doi: 10.6004/jnccn.2023.7079. PMID: 38150820.
- Garcia-Donas J, Martínez-Urbistondo D, Velázquez Kennedy K, Villares P, Barquin A, Dominguez A, Rodriguez-Moreno JF, Caro E, Suarez Del Villar R, Nistal-Villan E, Yagüe M, Ortiz M, Barba M, Ruiz-Llorente S, **Quiralte M**, Zanin M, Rodríguez C, Navarro P, Berraondo P, Madurga R. Randomized phase II clinical trial of ruxolitinib plus simvastatin in COVID19 clinical outcome and cytokine evolution. *Front Immunol.* 2023 Apr 18;14:1156603. doi: 10.3389/fimmu.2023.1156603. PMID: 37143685; PMCID: PMC10151807.
- Sevillano Fernández E, Madurga de Lacalle R, Rodriguez Moreno JF, Barquín García A, Yagüe Fernández M, Navarro Alcaraz P, Barba Llacer M, **Quiralte Pulido M**, García-Donas Jiménez J. Prognostic Value and Clinical Significance of FGFR Genomic Alterations (GAs) in Metastatic Urothelial Cancer Patients. *J Clin Med.* 2022 Aug 1;11(15):4483. doi: 10.3390/jcm11154483. PMID: 35956100; PMCID: PMC9369263.

Congresos no relacionados con la Tesis Doctoral:

- Elena Sevillano, Rodrigo Madurga, Juan Francisco Rodriguez Moreno, Arantzazu Barquin, Mónica Yagüe, Paloma Navarro, María Barba, **Miguel Quiralte**, Jesús García-Donas. Prognostic impact of fibroblast growth factor receptor (FGFR) genomic alterations and outcomes in patients with metastatic urothelial. JCO. 2022 Feb 20;40(6_suppl):537–537. Póster.

Otras actividades:

- Co-tutela de trabajo de fin de máster: “Estudio retrospectivo para la comparación de los exosomas en lavados peritoneales de pacientes con cáncer de ovario y pacientes control para su utilización como posibles biomarcadores”.

