

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
en
Biología y Tecnología Aplicada a la
Reproducción Humana Asistida

**Tratamiento del cáncer de ovario
mediante edición génica vía CRISPR/Cas:
Situación actual y futuras perspectivas.**

Autor: **Sara Alonso Fernández**

Tutores: **Estibaliz Olabarrieta, PhD. (UPV/EHU)**

José Rivera Torres, PhD. (UEM)

Alcobendas, Septiembre 2023

ÍNDICE

1. Resumen y palabras clave	3
2. Abreviaturas	4
3. Introducción	5
3.1. Anatomía del aparato reproductor femenino: El ovario sano.....	5
3.2. Histofisiología del ovario sano y foliculogénesis.....	5
3.3. Patologías ováricas: Cáncer de ovario, su biología y tratamientos actuales.....	6
3.4. Edición génica: Fundamentos y aplicación potencial en cáncer de ovario.....	8
3.5. Hipótesis.....	10
4. Objetivos	10
4.1. Objetivo principal.....	10
4.2. Objetivos secundarios.....	10
5. Metodología	11
5.1. Diseño.....	11
5.2. Formulación de la pregunta.....	11
5.3. Estrategia de búsqueda bibliográfica.....	11
5.4. Criterios de inclusión y exclusión.....	12
5.5. Extracción y análisis de datos.....	12
6. Resultados	12
6.1. Según el objetivo del análisis.....	13
6.2. Según la naturaleza de los genes.....	16
6.3. Según el vehículo de entrada.....	16
7. Argumentación crítica	20
7.1. Manejo clínico del cáncer de ovario.....	21
7.2. Desventajas de CRISPR/Cas9: Obstáculos y cortes no deseados.....	21
7.3. Edición génica: Aplicaciones presentes y futuras de CRISPR.....	23
7.4. Bioética:.....	25
7.4.1. Aplicación de la edición génica en humanos.....	25
7.4.2. Edición génica como Técnica de Reproducción Humana Asistida.....	25
8. Conclusiones	27
9. Bibliografía	28
10. Anexos	31

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

El ovario es un importante órgano femenino perteneciente al eje hipotálamo-hipofisiario, cuya histofisiología sana da lugar a un ovocito preparado para ser fecundado. No obstante, el ovario presenta distintas variaciones patológicas entre las cuales se encuentra el cáncer de ovario (CO). Ésta es la octava causa de muerte por cáncer en mujeres, y su etiología, clínica, estadificación y tratamiento varían de forma compleja. Por desgracia, las recidivas y la resistencia al tratamiento todavía suponen un gran reto, por lo que la comunidad científica trabaja continuamente para aumentar el conocimiento en el CO. En este artículo de revisión se analiza bibliografía en la cual, mediante la herramienta de edición génica vía CRISPR/Cas y algunas de sus variaciones, ha sido exitosa al presentar potenciales marcadores pro- y anti-apoptóticos del CO. Así, se prueban también distintos vehículos de entrada del sistema de edición génica y herramientas sinérgicas novedosas que combinan CRISPR/Cas9 con quimioterapia. Aunque la aplicación de la edición génica en humanos todavía forme parte de un controvertido debate bioético, y CRISPR/Cas presente algunas limitaciones como obstáculos y cortes no deseados, las presentes y futuras aplicaciones de la herramienta abren las puertas a enormes avances tanto en la biomedicina del cáncer como en otros campos.

Palabras clave: Ovario, cáncer de ovario, edición génica, CRISPR/Cas, vehículo de entrada, marcadores apoptóticos, tratamiento sinérgico.

2. ABREVIATURAS

Cas9: Endonucleasa asociada a CRISPR 9

CMCO: Células madre cancerígenas del ovario

CO: Cáncer de ovario

COCG: Cáncer de ovario de células germinales

COE: Cáncer de ovario epitelial

SRY: Región Determinante del Sexo en el Cromosoma Y

CombiGEM: Genética combinatoria en masa

COSAG: Cáncer/carcinoma ovárico seroso de alto grado

crARN: ARN derivado de CRISPR

CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

CRISPRa: Activación de CRISPR (del inglés, *CRISPR Activation*)

CRISPRi: Interferencia CRISPR (del inglés, *CRISPR Interference*)

CROP-seq: CRISPR droplet sequencing

FSH: Hormona foliculoestimulante (del inglés, *Follicle-Stimulating Hormone*)

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas (del inglés, *Gonadotrophin-Releasing Hormone*)

LH: Hormona luteinizante (del inglés, *Luteinizing Hormone*)

mARN: ARN mensajero

MeSH: Títulos de temas médicos / Descriptores en ciencias de la salud

nCas9: Cas9 nickasa

pADN: ADN plasmídico

PAM: Motivo adyacente de protoespaciador (del inglés, *Potospacer-Adjacent Motif*)

PARPi: Inhibidores de la enzima poli ADP ribosa polimerasa

pegARN: gRNA de Prime Editing

PICO: Problema/Paciente, Intervención, Comparación, Resultados (del inglés, *Outcomes*)

PtUTP-F: Nanoplataforma de transfección universal de platino (IV) fluorado

RA: Receptor androgénico

sgARN: ARN guía (del inglés, *single-guided RNA*)

tracrARN: Trans-activador de crARN

TALEN: Nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (del inglés, *Transcription Activator-Like Effector Nuclease*)

TEM: Transición epitelio-mesénquima

ZFN: Nucleasa de dedos de zinc (del inglés, *Zinc-Finger Nuclease*)

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Anatomía del aparato reproductor femenino: El ovario sano.

El sexo de los seres humanos queda determinado desde el momento de la fecundación, dependiendo de la ausencia o presencia del gen de determinación sexual del cromosoma Y (gen SRY). En el caso de ausencia, no es hasta el final de la sexta semana post-fecundación que los ovarios primitivos se diferencian a partir de la gónada bipotente formada por una superficie cortical y una parte interna medular. Como resultado, esta última desaparece y únicamente queda la corteza. Además, la ausencia del gen SRY hace que los conductos paramesonéfricos – o de Müller – se desarrollen y, en consecuencia, los mesonéfricos desaparezcan¹.

Los **ovarios adultos** se sitúan flotando en la fosa ovárica de la pelvis humana, manteniendo su posición gracias a los ligamentos propios del ovario, que los unen al **útero**. Este se trata de una estructura hueca y mayormente muscular, a cuyos lados se observan dos **trompas de Falopio**. El **infundíbulo**, situado al extremo de cada trompa, se abre a la cavidad peritoneal adyacente al ovario, para que el ovocito expulsado en el momento de la ovulación viaje a través de la trompa y pueda recibir al espermatozoide (Figura 1A)¹.

3.2. Histofisiología del ovario sano y foliculogénesis.

La estructura del ovario maduro es elipsoide, de unos 3 x 1,5 x 1 cm de ancho, y con una superficie rugosa formada a causa de las pequeñas cicatrices resultantes de las continuas ovulaciones². Histológicamente, en el parénquima del ovario se diferencian dos zonas

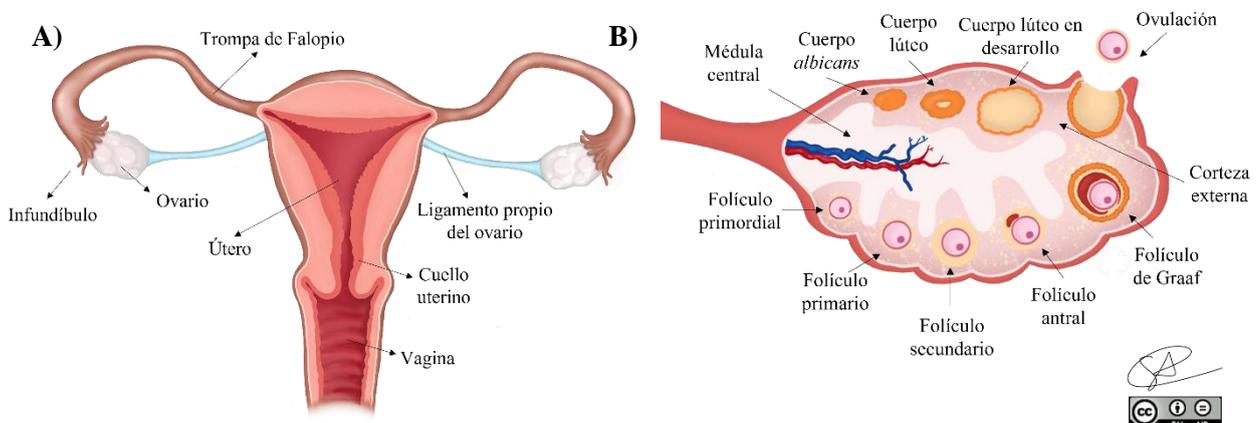


Figura 1. Anatomía fundamental del aparato reproductor femenino (A) y foliculogénesis en el ovario (B). Obsérvese la posición de los ovarios y la formación del folículo ovulatorio dentro de los mismos, previo a la ovulación y a la consiguiente formación del cuerpo lúteo. Elaboración propia.

ligeramente separadas: por un lado, la **médula central** vascular consiste en un tejido denso y fibroso y en un grupo variado de vasos sanguíneos, tejido linfático y tejido nervioso; por otra parte, la **corteza externa** está mayormente compuesta de folículos germinales en desarrollo (Figura 1B). No obstante, también pueden observarse cuerpos lúteos, resultantes del folículo dominante post-ovulación, tejido conectivo de soporte y algunos vasos sanguíneos².

El ciclo menstrual femenino se compone de dos fases principales: la fase folicular y la fase lútea, separadas mediante el proceso conocido como ovulación. Al comienzo del ciclo, un grupo de **folículos primordiales** comienzan a crecer independientemente de la acción hormonal. La secreción de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (**GnRH**) desde el hipotálamo a la hipófisis anterior provoca la liberación de la Hormona Folículo-Estimulante (**FSH**) y la Hormona Luteinizante (**LH**). Ambas hormonas facilitan el crecimiento de los folículos primarios y, además, la FSH activa la enzima aromatasa para que los andrógenos de las **células de la teca** se conviertan en estrógenos en las **células de la granulosa**. Al aumentar la concentración de estrógenos, se inhibe la actividad de la FSH y los folículos menos desarrollados terminan en atresia, quedando uno dominante (también conocido como **folículo de Graaf**). En él, la alta concentración de estradiol inhibe la secreción de FSH y estimula aún más la de LH, lo que optimiza la maduración del folículo dominante y el pico de LH (Figura 2). Horas después, se produce la **ovulación**, tras lo cual la progesterona impide que otros folículos se desarrollen, y se forma el **cuerpo lúteo** (Figura 1B). Si el ovocito liberado no es fecundado, la inhibición de la secreción de las gonadotropinas desaparece, por lo que la GnRH aumenta y comienza un nuevo ciclo¹.

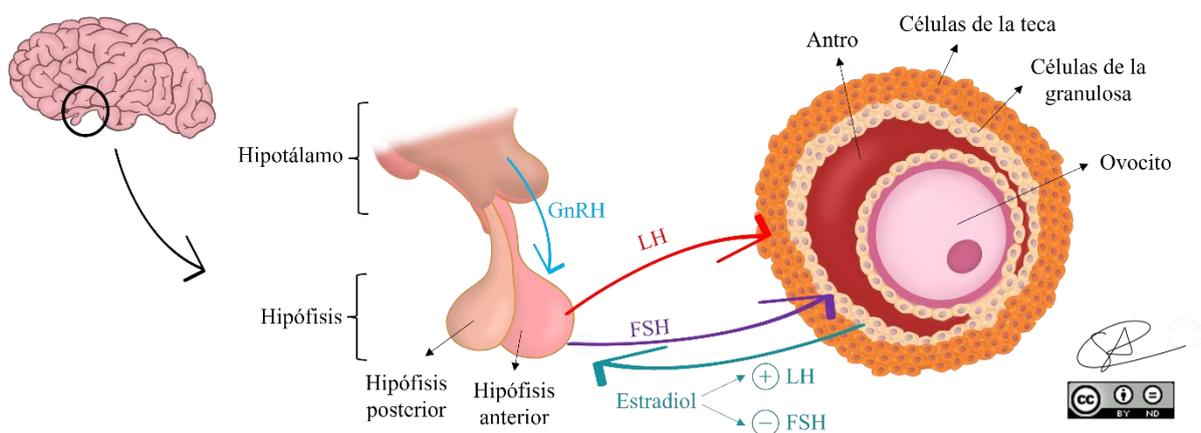


Figura 2. Control neuroendocrino de la foliculogénesis sobre el folículo dominante. Elaboración propia.

3.3. Patologías ováricas: Cáncer de ovario, su biología y tratamientos actuales.

Si bien lo mencionado hasta ahora resume un entorno sano del ovario, existen numerosas patologías asociadas a este, siendo la más peligrosa y estudiada el **cáncer**. Se trata de un

término ambiguo que engloba distintos tipos de cáncer de ovario (CO), cada uno con sus características y etiologías diferentes.

El CO es el tercer cáncer ginecológico más común en el mundo, y la octava causa de muerte por cáncer en mujeres³. Los tumores formados por esta patología se agrupan en tres categorías principales: de células germinales, de células del estroma de los cordones sexuales y epiteliales.

Se cree que el CO de **células germinales** (COCG) se produce durante el desarrollo temprano de células germinales embrionarias y, dependiendo del momento en el que suceden los eventos de metilación del ADN durante la migración de las células germinales primordiales a la cresta genital, da lugar a distintos subtipos tales como el teratoma, el tumor de saco de Yolk, y otros tantos. Por otro lado, el CO de **células del estroma de los cordones sexuales** (COCECS) (tumores malignos) se forma a partir de distintos tipos de células provenientes de las estromales o de las de los cordones sexuales, diferenciándose en otros tantos tipos de tumores (Anexo [10.1](#)). El CO **epitelial** (COE) (también conocido como carcinoma epitelial) se trata de la segunda causa de muerte de cánceres ginecológicos, siendo también el tipo más común entre los CO. De nuevo, se divide en otros tantos subtipos principales dependiendo de su origen y características histológicas: tumores serosos de bajo grado, endometrioides, mucinosos y de células claras, los cuales forman el grupo de COE Tipo I y, por otro lado, tumores serosos de alto grado, tumores mixtos y otros tipos de tumores malignos raros, que forman el grupo de COE Tipo II [4](#), [5](#), [6](#).

Se describen también distintas etapas en las que este cáncer se presenta (Anexo [10.2](#)). La estadificación, ya sea clínica, patológica o terapéutica es un elemento clave para determinar el tratamiento de la patología, así como para definir el pronóstico de las pacientes y comparar la información relacionada con la etapa en cuestión entre distintos centros⁵. Así, se tienen en cuenta el tamaño del tumor, la propagación a los nódulos linfáticos adyacentes y la metástasis a lugares distantes para determinar etapas desde la I, en la que la neoplasia solo se encuentra en su lugar de origen, hasta la IVB, en la que se ha propagado a órganos externos, a la cavidad peritoneal y/o a distintos nódulos⁶.

La variabilidad descrita hace ver que hay muchos orígenes de la enfermedad, si bien se sabe que tanto las hormonas como los propios procesos de inflamación juegan un papel importante. Se conocen también distintas alteraciones moleculares – o combinaciones de las mismas – relacionadas con la aparición de los distintos tipos y subtipos previamente descritos,

tales como FOXL2, DICER1, AKT1, Erβ o gsp para el COCECS; ARID1A, PTEN, PI3KCA, BRCA1, BRCA2, NOTCH, etc., para COE, y OCT4, c-kit y el cromosoma 12p para COCG. Pax8, p53, p16, CK7 y CK20 también se observan en varios tipos de CO. Sea como fuere, son combinaciones complejas dependientes de los mismos^{4,5}.

A la hora de tratar esta patología, y siempre teniendo en cuenta el estadio de la enfermedad, situación reproductiva de la paciente y otros aspectos, destacan dos estrategias: los tratamientos quirúrgicos y los tratamientos farmacológicos. Por un lado, la cirugía puede ser de citorreducción o mutilante, mientras que la quimioterapia podría ser tanto de primera línea como adyuvante. De cualquier manera, la variabilidad de tratamiento es igual de compleja que la tipología del CO⁵.

A pesar de que ha habido una mejoría notable respecto al tratamiento de esta enfermedad, a día de hoy todavía existe un número considerable de pacientes, sobre todo si son diagnosticadas en fases tardías de la misma, que sufren recidivas. Estas pacientes vuelven a ser tratadas con cirugía secundaria, quimioterapia combinada o con terapia dirigida, pero sus esperanzas de curarse disminuyen⁵. Además, la resistencia a la quimioterapia de algunos de los tipos de CO provoca un alto grado de incertidumbre y miedo. Por dicha razón, la comunidad científica trabaja sin descanso en la lucha contra el CO estudiando diferentes marcadores, vías de señalización y variabilidad genotípica y fenotípica, con el fin de que, en un futuro, el diagnóstico temprano y la cura definitiva sea lo que prevalezca.

3.4. Edición génica: Fundamentos y aplicación potencial en cáncer de ovario.

La edición génica se define como una técnica de ingeniería genómica en la cual se introducen modificaciones específicas de locus haciendo uso de la capacidad intrínseca de la célula para reparar el ADN.

Esta tecnología comenzó con las Nucleasas de dedos de zinc (del inglés, *Zinc-Finger Nucleases*), enzimas de restricción quiméricas en cuyas subunidades se encuentran distintos dominios “zinc finger” (ZF). Cada uno se compone de 28 aminoácidos, unidos a un dominio de actividad endonucleasa FokI que, al estar en forma dimérica se activa y, al reconocer una secuencia específica de ADN, la corta (Figura 3A). Gracias a ello, se producen roturas de doble hebra del ADN y se activa la maquinaria de reparación celular. Las ZFN son fáciles de diseñar, ya que únicamente se realiza un montaje combinatorio de ZFs preexistentes con patrones de reconocimiento ya conocidos, y cada módulo ZF reconoce 3 nucleótidos. No obstante, su especificidad no solo depende de la secuencia de ADN diana, sino que también

puede depender de los ZF adyacentes, lo cual puede generar fragmentación e inestabilidad genómicas en el caso de que se den muchas roturas inespecíficas. Además, solo reconoce un punto del genoma cada vez⁷. Por ello, se desarrolló otro tipo de endonucleasas programables (EP): Las nucleasas de actividad similar a activador de transcripción (del inglés, *Transcription activator-like effector nucleases*; TALEN) también son proteínas artificiales quiméricas y modulares compuestas de un dominio de actividad endonucleasa Fok1, activa en su forma dimérica. Por el contrario, se trata de una técnica más segura, de coste algo más bajo, eficiente y específica (Figura 3B)⁷. En este caso, cada módulo únicamente reconoce un nucleótido en su dominio de unión al ADN, por lo que no hay interferencia de reconocimiento, incluso a pesar de que se unan varios módulos. Si bien su especificidad es mayor, también lo es su tamaño, ya que cada módulo está compuesto por 33 aminoácidos⁷.

A pesar de que dichas endonucleasas dirigidas por proteínas parecían ventajosas, su complejidad de diseño (debían ser rediseñadas para cada secuencia de ADN diana), largos ciclos y alto coste daban pie a una aún más conveniente, fácil de diseñar y con un coste más bajo. No fue hasta el año 2012 cuando las científicas Emmanuelle Charpentier y Jennifer A.

Doudna presentaron al mundo una tecnología revolucionaria, y la actual herramienta de edición génica de tercera generación: CRISPR/Cas9⁸. Esta herramienta se trata de un sistema de defensa antiviral en el que un ARN maduro derivado de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas (del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, CRISPR) (crRNA) se une a un trans-activador de crARN (tracrARN), formando una estructura (sgARN) que guía a la proteína enzimática Cas9 a la secuencia específica del ADN diana, adyacente en la región 5'-3' a la secuencia del protoespaciador (PAM), para así romperla (Figura 3C). Su origen radica en la capacidad inmunológica de algunas bacterias, como *Streptococcus pyogenes*, para detectar y romper ADN viral. Al contrario de lo observado en las ZFN y las TALEN, en el sistema CRISPR/Cas9 la capacidad

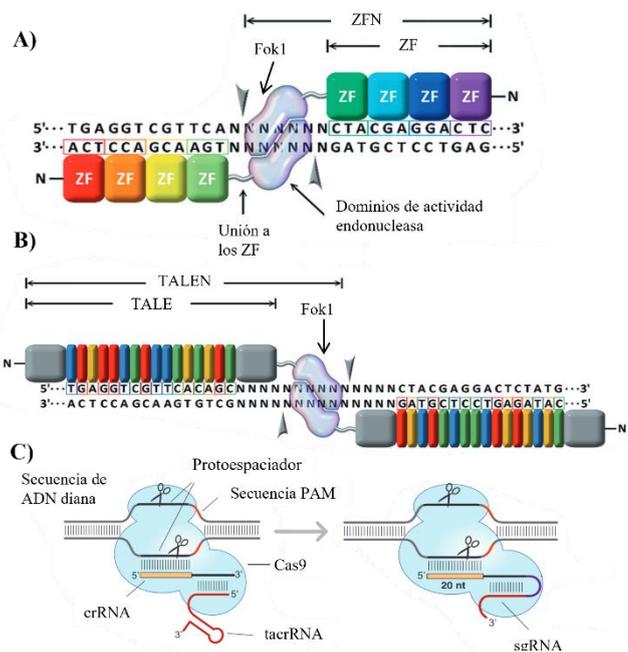


Figura 3. Endonucleasas programables. **A)** ZFN **B)** TALEN **C)** Herramienta CRISPR/Cas9. Adaptado de Khalil⁷ (A-B) y de Jinek⁸ (C).

de reconocimiento únicamente depende de una modificación en su ARN guía, y no en la proteína, lo cual lo hace más fácil y barato de diseñar⁷. Si bien es cierto que existen más clases y tipos de endonucleasas Cas que no necesitan ni la secuencia PAM ni el tracrARN, las científicas presentaron CRISPR/Cas9 como una herramienta pionera de edición génica. Además, se han observado aplicaciones más específicas del sistema. Por un lado, se consiguió mejorar la especificidad de corte mediante la mutación de uno de sus dominios catalíticos, por lo que solo se generaba el corte en una de las hebras de ADN. Esta modificación se conoce como Nickasa Cas9 (nCas9). A ella, se le añadió un editor de bases que únicamente actuaba sobre la hebra simple de ADN y utilizando como molde la editada. Por otra parte, el sistema Prime Editing hace uso de la fusión de una nCas9 con una retrotranscriptasa (RT) y una guía especial (pegARN) que dirige a la nCas9 al punto del genoma en el que se encuentra la secuencia diana y le sirve como molde a la RT al contener la edición deseada. Como estas tecnologías son relativamente nuevas, la comunidad científica trabaja en su potencial aplicación en biomedicina⁹.

Teniendo en cuenta lo ventajosa que podría llegar a ser esta revolución biotecnológica, en este trabajo se pondrán de manifiesto la situación actual en la que se encuentra en relación con la cura, prevención, y/o aumento del conocimiento del CO, así como las perspectivas futuras e, incluso, las limitaciones bioéticas respecto a la aplicación de la edición génica en humanos.

3.5. *Hipótesis*

La herramienta de edición génica vía CRISPR/Cas9 es eficaz para investigar distintos marcadores tumorales y resistencias a ciertas quimioterapias del cáncer de ovario, y su aplicación *in vivo* en humanos abre las puertas a un futuro potencialmente prometedor en la investigación biomédica de dicha enfermedad.

4. OBJETIVOS:

4.1. *Objetivo principal*

Realizar una revisión sobre la situación actual respecto a los avances en la investigación y/o el tratamiento del cáncer de ovario mediante la edición génica vía CRISPR/Cas.

4.2. *Objetivos secundarios*

- Presentar distintos marcadores tumorales de cáncer de ovario que actualmente son objeto de investigación en edición génica.
- Exponer los problemas actuales relacionados con la edición génica en humanos.

5. METODOLOGÍA

5.1. *Diseño*

Este Trabajo de Fin de Máster se ha desarrollado siguiendo un diseño metodológico de una revisión bibliográfica y, por ende, recopila, analiza y sintetiza los datos más actualizados y relevantes sobre el tema de estudio en cuestión para, así, facilitar un conocimiento más avanzado sobre el área de investigación que se desee tratar.

5.2. *Formulación de la pregunta*

La **formulación de la pregunta** de investigación se elaboró mediante el método PICO (Paciente/Problema, Intervención, Comparación, Resultado, del inglés *Outcome*): *¿Cuál es la situación actual respecto a la edición génica vía CRISPR/Cas con el fin de investigar o tratar el cáncer de ovario?* Las pacientes son mujeres afectadas por cáncer de ovario; la intervención es la edición génica vía CRISPR/Cas; la comparación se basa en la aplicación de la edición génica frente al control y el resultado refleja los beneficios y ampliación del conocimiento en el ámbito del cáncer de ovario, así como de los múltiples factores que lo producen y las resistencias a ciertos tipos de quimioterapia.

5.3. *Estrategia de búsqueda bibliográfica*

Se realizó una **estrategia de búsqueda bibliográfica** en las bases de datos y centros de evidencia siguientes: PubMed, Science Direct y Catálogo de la Biblioteca CRAI Dulce Chacón (Universidad Europea), desde febrero del 2023 hasta mayo del 2023, tanto en castellano como en inglés, sobre los distintos términos de interés. Para ello, utilizaron palabras clave mediante términos MeSH (del inglés, Medical Subject Headings) (Tabla 1). Una vez finalizada la búsqueda general, se comenzó una más específica, haciendo uso de los operadores booleanos (AND/OR/NOT), por ejemplo, “Ovary AND Cancer AND Gene editing”. Para la búsqueda sobre edición génica, marcadores tumorales y CRISPR/Cas únicamente se analizaron estudios publicados desde el año 2015.

Tabla 1. Descriptores utilizados para la búsqueda bibliográfica. Elaboración propia.

<i>Palabra Clave: DeCS</i>	<i>MeSH</i>
<i>Ovario</i>	Ovary
<i>Cáncer</i>	Cancer, Neoplasm
<i>Marcador Tumoral</i>	Tumor Biomarker
<i>Edición génica</i>	Gene Editing
<i>CRISPR/Cas</i>	CRISPR-Cas System, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

5.4. *Criterios de inclusión y exclusión*

- Inclusión:
 - Artículos escritos en castellano y/o inglés que relacionen la edición génica vía CRISPR/Cas y el cáncer de ovario.
- Exclusión:
 - Artículos no disponibles.
 - Trabajos de Fin de Grado o de Máster.
 - Tesis Doctorales.
 - Artículos que relacionan la edición génica vía CRISPR/Cas con otros tipos de cáncer
 - Artículos que no hagan uso de la herramienta de edición génica CRISPR/Cas para avanzar en el conocimiento del cáncer de ovario.

5.5. *Extracción y análisis de datos*

- De cada artículo se analizará, a parte de la herramienta de edición génica:
 - El objetivo: Si se analiza la metástasis, el origen o la resistencia a los tratamientos del CO.
 - Los marcadores: Si son oncogenes o si son genes supresores de tumores.
 - Edición génica: la herramienta aplicada, y su vehículo de entrada en las células.

6. RESULTADOS

Mediante la estrategia de búsqueda descrita previamente, se encontró un total de 105 artículos, pero únicamente 32 de ellos se pre-seleccionaron tras la lectura de sus resúmenes. Tras su lectura, se observó que algunos artículos se repetían entre las distintas bases de datos, por lo que dichas repeticiones se contaron como una única. Por lo tanto, y descartando también los artículos que no hacían uso de la herramienta CRISPR/Cas para avanzar en la investigación del CO, en total se escogieron 16 artículos (Tabla 2).

A continuación, se clasifican y sintetizan los resultados dependiendo del objetivo del análisis, de la naturaleza de los genes analizados y del vehículo de entrada para que se diera la edición génica (Figura 4).

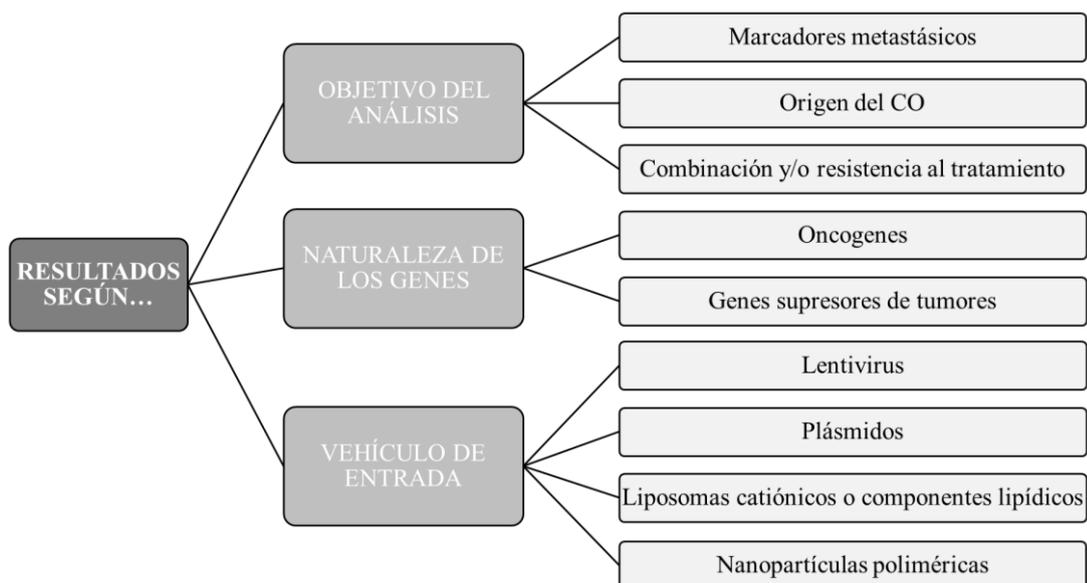


Figura 4. Estrategia de clasificación de los resultados obtenidos. Elaboración propia.

6.1. Según el objetivo del análisis

a) Marcadores metastásicos:

La gran mayoría de los artículos analizados trató de identificar genes implicados en la proliferación, migración e invasión del CO, ya sea activándola o inhibiéndola^{10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18}. Además, varios de los artículos se centraron en marcadores metastásicos del Carcinoma Seroso de Alto Grado (COSAG), ya que se trata del tipo de CO más agresivo y letal. Tanto el equipo de Walton como el de Löhmußaar analizaron el gen *Trp53*, un gen murino homólogo al *Tp53* humano, cuyas mutaciones se encuentran en prácticamente todos los casos de COSAG^{10, 19}. Ambos grupos silenciaron mediante CRISPR/Cas9 el gen en modelos de ratón y obtuvieron líneas celulares de COSAG. Walton también silenció *Brca2*, y observó que las células cancerígenas proliferaban más rápido que las dobles mutantes *Trp53*^{-/-}/*Brca2*^{-/-}¹⁰. Por otro lado, el equipo de Löhmußaar, mediante el silenciamiento complementario de otros genes tales como *Brcal*, *Nf1* y *Pten*, observó que la mayoría de los COSAG se originaban en las Trompas de Falopio, con distinto comportamiento a los originados en la corteza externa del ovario¹⁹.

Dos de los artículos fijaron su atención en las células madre cancerígenas del ovario (CMCO) debido a su capacidad de regeneración y resistencia a los tratamientos. Si bien ya se conocen ciertos marcadores de CMCO, los mecanismos por los que se auto-renuevan todavía son objeto de estudio^{11, 12}. Mediante CRISPR/Cas9, el equipo de Karmakar consiguió silenciar *hPaf1/PD2* y observó una disminución significativa del porcentaje de CMCO, pudiéndose así tratar de una futura diana terapéutica para evitar recidivas¹¹. Ling *et al.*, por otro lado,

observaron mediante un modelo celular murino que Nanog se sobre-expresaba en células de CO, y que su expresión podría ser promovida mediante el receptor de andrógenos (RA), el cual podría tratarse de un oncogén en este tipo de patologías¹².

Por último, los equipos de Ji, He, Sheta, Liu y Chehade determinaron que MTF1, DNMT1, GALNT3/T6, ATAD2 y MNRR1 se sobre-expresaban en CO, respectivamente, por lo que silenciarlos mediante CRISPR/Cas9 disminuirían las tasas de proliferación de células metastásicas, con la consecutiva reducción de los potenciales oncogénicos del CO y, por lo tanto, un aumento en las tasas de supervivencia y disminución en las tasas de recidiva ^{13, 14, 15, 18, 20}. Por el contrario, los equipos de Li y Xu determinaron que el silenciamiento mediante edición génica de IL20RA e ITK, respectivamente, aumentaba la proliferación de las células metastásicas ^{16, 17}.

b) Origen del CO:

La transición epitelio-mesénquima (TEM) se trata de un proceso biológico crucial en los distintos tipos de cáncer, en el que las células pierden su polaridad y sus uniones célula-célula, adquiriendo así propiedades migratorias e invasivas. Por primera vez, Ji *et al.* identificaron en 2018 que el gen MTF1 contribuía al CO, ya que hasta el momento solo se conocía su función como factor promotor de la supervivencia celular. Observaron que MTF1 se sobre-expresaba en CO, y que su pérdida provocaba una inhibición de la TEM y de la proliferación de las células de esta patología¹³.

Por otra parte, el COSAG es el CO más letal conocido ya que, a la hora de ser diagnosticado, suele ser en estadios tardíos. Tal y como se ha presentado en el grupo a) del apartado, el equipo de Lõhmussaar no solo analizó la metástasis en esta patología, sino que también determinó su origen en las Trompas de Falopio y observó un comportamiento diferente al originado en la corteza ovárica externa¹⁹.

c) Combinación y/o resistencia al tratamiento:

Cinco de los artículos analizaron genes de forma combinada^{21, 22, 23, 24, 25}. La técnica Combi-GEM-CRISPR (del inglés, *Combinational Genetics En Masse CRISPR*) permitió analizar simultáneamente combinaciones de alteraciones genéticas específicas para observar de qué manera dichas variaciones genéticas o epigenéticas daban forma a los distintos fenotipos neoplásicos. De hecho, resultó que la inhibición combinada de KDM4C/BRD4 y KDM6B/BRD4 redujo el crecimiento tumoral en CO²¹. En 2018, el equipo de He presentó al mundo la segunda versión de la herramienta, CombiGEM-CRISPR v.2.0, con la que se

analizó el crecimiento tumoral mediante la administración sinérgica de los medicamentos Olaparib, AZA, Seliciclib y Sirolimus, y la coadministración del Guadecitabine y Talazoparib, que también era capaz de suprimir el crecimiento tumoral en la enfermedad. Además, pudieron aplicar otras combinaciones terapéuticas contra otros tipos de patologías²⁰.

El equipo de Iyer realizó cambios muy similares a los de Löhmußaar en ratones: desarrolló un modelo murino con el fenotipo del COSAG mediante el silenciamiento combinado de Trp53, Brca1, Pten y Nf1. Además, generaron otras modificaciones genóticas como la sobreexpresión de Myc, esta vez con el fin de generar el COSAG y así poder identificar la folistatina como causante de la resistencia a inhibidores de puntos de control inmunitario, los cuales ayudan a los linfocitos a destruir células cancerosas²³.

Hace dos años, el equipo de Lu consiguió de forma pionera transfectar de forma sinérgica la herramienta CRISPR/dCas9 acompañado de tratamientos quimioterapéuticos. CRISPR/dCas9 se diferencia de CRISPR/Cas9 en que los dominios de corte quedan inactivados, por lo que es capaz de regular la expresión de los genes mediante cambios provisionales en el genoma. El equipo consiguió activar la expresión de CT45, un antígeno cuya expresión se relacionó directamente con una mayor sensibilidad a la quimioterapia basada en platino Pt(II). Por lo tanto, iniciaron una estrategia novedosa para el tratamiento sinérgico e individualizado que podría tratar el CO mediante edición génica y quimioterapia²⁴.

El año pasado, el equipo de Coelho probó por primera vez la función de más de 30 genes relacionados tanto con el fitness celular como con la respuesta a los inhibidores de la enzima poli ADP ribosa polimerasa (PARPi). Estos últimos provocan la apoptosis de las células cuando estas sufren de una deficiencia en la reparación homóloga del ADN. El equipo insistió en el estudio del fitness celular para tomar la decisión clínica adecuada, sobre todo en los casos en los que se desconoce si hay o no resistencia al platino²⁵.

Por último, cabe mencionar que los artículos publicado por los equipos de Walton, Karmakar y He también tratan este tema, por lo que su objetivo de análisis está repartido a partes iguales entre el grupo a) y el c) de este apartado^{10, 11, 20}.

6.2. Según la naturaleza de los genes:

a) Oncogenes:

Son distintos los genes que se han visto relacionados con la activación y/o aumento en la velocidad tumoral/metastásica. Entre ellos se encuentran la combinación KDM4C/BRD4 y KDM6B/BRD4²¹, hPaf1¹¹, Nanog promovido por RA¹², MTF1¹³, DNMT1²⁰, GALNT3/T6¹⁴, ATAD2¹⁵, MNRR1¹⁸. El silenciamiento de estos mediante edición génica vía CRISPR/Cas9 ha resultado en la disminución en la proliferación de las células de CO.

b) Genes supresores de tumores:

Por el contrario, el silenciamiento de otros genes tales como P53¹⁰, Brca1¹⁹, Nf1¹⁹, Pten¹⁹, IL20RA¹⁶ e ITK¹⁷ han mostrado un aumento en la proliferación. Por lo tanto, se les podría considerar genes supresores de tumores. La baja expresión de CT45 también se relaciona con una menor tasa de supervivencia en pacientes con CO, pero en este caso es a causa de una mayor sensibilidad a tratamientos quimioterápicos basados en el platino Pt(II)²⁴.

6.3. Según el vehículo de entrada

a) Lentivirus:

La mayoría de los autores se decantó por este vehículo para la edición génica con CRISPR/Cas9. El lentivirus es un tipo de retrovirus con una capacidad de 10 kb de carga que es capaz de infectar tanto células en división como quiescentes (Figura 5A)²⁶. Los distintos grupos que se decantaron por el lentivirus como vehículo de entrada de CRISPR/Cas9 realizaron tres rondas de selección, inyectándoles a los ratones las células metastásicas, sacrificándolos unos días después, aislando de éstos dichas células, volviéndolas a inyectar en otro ratón... hasta completar las tres rondas. Ji *et al.*, dirigió una nickasa lentiviral de CRISPR/Cas9 a su secuencia diana¹³. El equipo de Liu generó lentivirus a partir de células 293T co-transfectadas, mediante Lipofectamine 3000, de dos plásmidos recombinados de lentiCRISPRv2¹⁵. Tanto Li *et al.* como Xu *et al.* y Wong *et al.* generaron lentivirus con la biblioteca GeCKO v2 de humano y los infectaron en las células diana^{16, 17, 21}. Los equipos de Zhou y el de Coelho, por otro lado, dirigieron de manera eficiente la biblioteca de gRNA por parejas mediante lentivirus^{22, 25}.

b) Plásmidos

El ADN plasmídico (pADN) no se degrada con facilidad, puede ser amplificado en grandes cantidades y puede ser fácilmente modificado. Por ello, un número de artículos parecido a los que se decantaron por lentivirus, pero algo menor, hicieron uso de esta herramienta para

dirigir CRISPR/Cas9. La entrada del pADN a la célula diana puede darse tanto mediante métodos químicos (el pADN desnudo o en liposomas) como mediante métodos físicos (por microinyección o electroporación). Una vez el plásmido entra en la célula, penetra en el núcleo y mediante señales de localización celular, comienza la transcripción del ARN mensajero (mARN) que codificará la endonucleasa Cas9 y el sgARN (Figura 5B)^{10, 12, 18, 26}. Los equipos de Walton, Karmakar, Sheta, Chehade e Iyer editaron los genes de interés de sus trabajos con la herramienta CRISPR/Cas9 en pDNA, haciendo uso de sus respectivos sistemas de transfección recomendados por los fabricantes ^{10, 11, 14, 18, 23}. Ling *et al.* y Liu *et al.*, por otra parte, hicieron uso de un plásmido dentro de una cápsula de lentivirus, por lo que sus artículos podrían estar también en el grupo anterior^{12, 15}.

c) Liposomas catiónicos o componentes lipídicos

Los liposomas catiónicos llevan décadas siendo utilizados como herramienta para la transfección del ADN y para inserción de medicamentos en la célula diana. Además, las nanopartículas lipídicas se consideran una potencial herramienta para que el sistema CRISPR/Cas9 penetre en la célula, ya que no constan de una bicapa lipídica continua y de un centro acuoso, sino que están mayormente compuestas de componentes lipídicos tales como fosfolípidos naturales, colesterol y polietilenglicol (Figura 5C) ²⁶. El equipo de He consiguió transfectar las células diana con un liposoma catiónico no-viral, en cuyo interior se encontraba el plásmido con la información necesaria para la co-expresión de Cas9 y del gRNA²⁰. Por otro lado, el equipo de Löhmußar integró el gRNA en sus células diana mediante componentes lipídicos¹⁹.

d) Nanopartículas poliméricas

De los 16 artículos analizados, el del equipo de Lu en 2021 fue el único que hizo uso de una nueva técnica para insertar en la célula no solo el sistema CRISPR/dCas9, sino también el tratamiento quimioterapéutico necesario. Lo presentó como una novedosa estrategia que combinaba la terapia génica con quimioterapia, de forma sinérgica e individualizada contra el CO de, incluso, mayor capacidad de transfección que la herramienta Lipofectamine 6000 (Figura 5D) ²⁴.

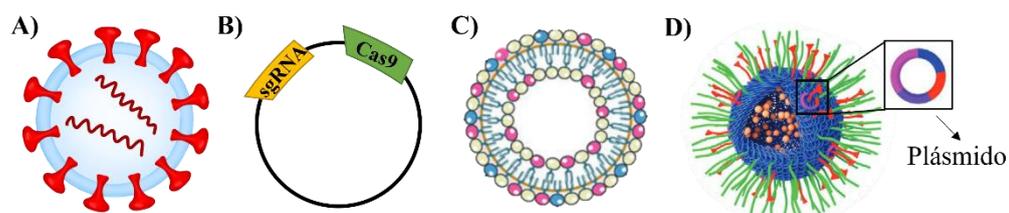


Figura 5. Vehículos utilizados en los artículos de los resultados. Lentivirus (A), plásmido desnudo (B), componentes lipídicos (C) y nanopartículas poliméricas (D). Adaptado de Li *et al.*²⁶ (A, C) y Lu *et al.*²⁴ (D). Elaboración propia (B).

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos tras la búsqueda manual. Resultados en orden cronológico. Elaboración propia.

	Referencia	Gen	Vehículo	Conclusiones
1	CRISPR/Cas9-Mediated Trp53 and Brca2 Knockout to Generate Improved Murine Models of Ovarian High-Grade Serous Carcinoma (Walton <i>et al.</i> , 2016) 10	Trp53 Brca2	P-OUT-R	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de p53 aumenta el crecimiento de tumores ortotópicos de Carcinoma seroso de alto grado. • Células <i>Trp53^{-/-}</i>; <i>Brca2^{-/-}</i> presentan menor crecimiento que las células <i>Trp53^{-/-}</i>.
2	Multiplexed barcoded CRISPR-Cas9 screening enabled by CombiGEM (Wong <i>et al.</i> , 2016) 21	KDM4C KDM6B BRD4	L-OUT-H	<ul style="list-style-type: none"> • El uso de la tecnología CombiGEM-CRISPR puede acelerar la identificación de nuevas combinaciones de medicamentos. • Inhibición combinada de KDM4C/BRD4 y KDM6B/BRD4 reduce el crecimiento tumoral en CO.
3	hPaf1/PD2 interacts with OCT3/4 to promote self-renewal of ovarian cancer stem cells (Karmakar <i>et al.</i> , 2017) 11	hPaf1/ PD2	P-OUT-H	<ul style="list-style-type: none"> • hPaf1 se sobre-expresa en CMCO: podría tratarse de una diana terapéutica para evitar recidivas.
4	Nanog interaction with the androgen receptor signaling axis induce ovarian cancer stem cell regulation: studies based on the CRISPR/Cas9 system (Ling <i>et al.</i> , 2018) 12	Nanog	P-OUT-H- IN-R	<ul style="list-style-type: none"> • Nanog se sobre-expresa en células del CO. • RA podría tratarse de un oncogén promoviendo la expresión de Nanog en las CMCO.
5	A Three-Way Combinatorial CRISPR Screen for Analyzing Interactions among Druggable Targets (Zhou <i>et al.</i> , 2018) 22	RFP GFP BFP	L-OUT-H- IN-R	<ul style="list-style-type: none"> • La tecnología CombiGEM-CRISPR v.2.0 también analiza las interacciones por parejas de los genes diana y mejorar la protección frente a otros fenotipos patológicos.
6	Knockout of MTF1 Inhibits the Epithelial to Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer Cells (Ji <i>et al.</i> , 2018) 13	MTF1	L-OUT-H	<ul style="list-style-type: none"> • MTF1 se sobre-expresa en el CO y se asocia con baja supervivencia y alta tasa de recidivas. • Pérdida de MTF1 aumenta la expresión de KLF4, inhibe TEM y proliferación en CO.
7	In Vivo Ovarian Cancer Gene Therapy Using CRISPR-Cas9 (He <i>et al.</i> , 2018) 20	DNMT1	P-LC- OUT- H- IN-R	<ul style="list-style-type: none"> • La inactivación de DNMT1 mediante liposomas catiónicos induce la necrosis en células de CO, ya sea en tumores sensibles al Paclitaxel como los resistentes al mismo.
8	The polypeptide GALNT6 Displays Redundant Functions upon Suppression of its Closest Homolog GALNT3 in Mediating Aberrant O-Glycosylation, Associated with Ovarian Cancer Progression (Sheta <i>et al.</i> , 2019) 14	GALNT3 GALNT6	P-OUT-H- IN-R	<ul style="list-style-type: none"> • El doble silenciamiento de GALNT3/T6 podría reducir los potenciales oncogénicos en COE. • Inhibidores combinados de GALNT3 y T6 podrían ser de gran valor para crear nuevos tratamientos contra el COE.
9	Assessing the origin of high-grade serous ovarian cancer	Trp53	CL-OUT-	<ul style="list-style-type: none"> • Silenciamientos en Trp53, Brca1, Nf1 y Pten muestran

	using CRISPR-modification of mouse organoids (Löhmußaar <i>et al.</i> , 2020) 19	Brca1 Nf1 Pten	R-IN-R- OUT-H	que la mayoría de los COSAG se originan en las Trompas de Falopio, con un comportamiento diferente a los COSAG originados en la corteza externa ovárica.
10	ATAD2 predicts poor outcomes in patients with ovarian cancer and is a marker of proliferation (Liu <i>et al.</i> , 2020) 15	ATAD2	L-OUT-H	<ul style="list-style-type: none"> • Deleción de ATAD2 disminuye la tasa de proliferación de células de CO. • ATAD2 podría utilizarse como marcador tumoral diagnóstico en CO primarios
11	A systematic CRISPR screen reveals an IL-20/IL20RA-mediated immune crosstalk to prevent the ovarian cancer metastasis (Li <i>et al.</i> , 2021) 16	IL20RA	L-OUT-H- IN-R	<ul style="list-style-type: none"> • IL20RA parece ser un supresor de la metástasis transcelómica en CO, en la que se ha perdido IL-18 maduro. • IL-18 recombinante podría suprimir la metástasis de CO deficiente en IL20RA.
12	Cytotoxic lymphocytes-related gene ITK from a systematic CRISPR screen could predict prognosis of ovarian cancer patients with distant metastasis (Xu <i>et al.</i> , 2021) 17	ITK	L-OUT-H- IN-R	<ul style="list-style-type: none"> • ITK podría ser un supresor tumoral en el CO, con importante relación expresión/pronóstico de los pacientes • ITK también podría formar parte de la función inmune.
13	Genetically Defined Syngeneic Mouse Models of Ovarian cancer as Tools for the Discovery of combination immunotherapy (Iyer <i>et al.</i> , 2021) 23	FST	P-OUT-H- IN-R	<ul style="list-style-type: none"> • El gen codificante de la folistatina (FST) podría ser un marcador del bloqueo a los puntos de control inmunitarios.
14	Reduction-Sensitive Fluorinated-Pt(IV) Universal Transfection Nanoplatfom Facilitating CT45-Targeted CRISPR/dCas9 Activation for Synergistic and Individualized Treatment of Ovarian Cancer (Lu <i>et al.</i> , 2021) 24	CT45	NP-OUT- R-IN-R	<ul style="list-style-type: none"> • CRISPR/dCas9 tiene los dominios con actividad nucleasa inactivados, por lo que es dirigido al ADN diana sin cortarlo. • La técnica PtUTP-F puede inducir la expresión de CT45 mediante CRISPR/dCas9 y así aumentar la sensibilidad a tratamientos antineoplásicos basados en Pt(II).
15	Overlapping gene dependencies for PARP inhibitors and carboplatin response identified by functional CRISPR-Cas9 screening in ovarian cancer (Coelho <i>et al.</i> , 2022) 25	ATM MUS81 NBN Brca2 RAD51B CDK12	L-OUT-H	<ul style="list-style-type: none"> • Los efectos potenciales sobre el fitness celular causados por la edición génica y los PARPi podrían resultar en una malinterpretación de los resultados. • CDK12 es una diana terapéutica potencial en COE.
16	MNRR1 is a driver of ovarian cancer progression (Chehade <i>et al.</i> , 2023) 18	MNRR1	P-OUT- R/H-IN-R	<ul style="list-style-type: none"> • MNRR1 es una proteína de expresión heteróloga: su función mejora la respiración mitocondrial, pero también evita el proceso pro-apoptótico. • Silenciar MNRR1 puede atrasar la metástasis del CO.

Abreviaturas:

IN: In vivo

OUT: In vitro

P: Plásmido

L: Lentivirus

CL: Componente lipídico

LC: Liposoma catiónico

NP: Nanopartículas poliméricas

En resumen, en este trabajo se han expuesto dieciséis artículos, publicados desde el año 2016, que relacionan la edición génica vía CRISPR/Cas9 (y sus diversas aplicaciones) con el tratamiento, cura potencial y/o aumento del conocimiento del cáncer de ovario, una de las patologías ginecólogo-oncológicas más letales. Para ello, en los artículos se ha aplicado dicha herramienta con el objetivo de disminuir, silenciar, promover o aumentar la expresión de genes, observando como resultado un cambio en los sujetos de estudio. De toda la información que se presentaba en los artículos, éstos se han clasificado y analizado según el objetivo de su análisis – si trataban de estudiar marcadores metastásicos, el origen de la patología o la combinación y/o resistencia a tratamientos antineoplásicos-, según la naturaleza de los genes -si se trataba de oncogenes o de genes supresores de tumores-, y según el vehículo de entrada de la herramienta de edición génica a las células, tanto humanas (*in vitro*) como de ratón (*in vivo* e *in vitro*).

7. ARGUMENTACIÓN CRÍTICA

Los dieciséis artículos analizados han tratado marcadores relacionados con el CO, poniendo de manifiesto que la ciencia todavía trabaja sin descanso en conocer más sobre él tanto a nivel molecular como anatómico. Los autores se han mostrado exitosos y con grandes expectativas de futuro en la investigación biomédica de este cáncer. Además, se han analizado distintos vehículos de entrada de la herramienta de edición, mostrando de la misma forma que existen diversos protocolos efectivos para alcanzar su objetivo.

Por el contrario, no se han expuesto las desventajas de cada técnica, ni se ha relacionado la edición génica con la fertilidad, problema al que las pacientes oncológicas ya se enfrentan. Ling sí que explica, por ejemplo, que la sobreexpresión de Nanog estaría promovida por el RA, lo que llevaría a reevaluar la terapia de CMCO desde una perspectiva hormonal¹². Además, a pesar de que la utilización de CRISPR/Cas9 para curar el CO parezca algo verdaderamente conveniente, en los artículos tampoco se ha mencionado la controvertida bioética relacionada con la aplicación de la edición génica en humanos. Por ello, a

continuación, se presenta la discusión respecto a los aspectos mencionados (y no mencionados) en los artículos.

7.1. Manejo clínico del cáncer de ovario

Debido a que la investigación hasta ahora predomina en ratones, es necesario ver hasta qué punto la edición génica relacionada con el CO podría ser capaz de promover un avance científico beneficioso en humanos²⁷. El término genérico “cáncer de ovario” esconde una gran variabilidad de tipos histológica y molecularmente diferentes, lo cual explica la necesidad de aplicar distintos tipos de tratamientos. No obstante, la resistencia a la quimioterapia, así como las recidivas, siguen siendo uno de los retos a los que la oncología se enfrenta hoy en día⁶. Existen varios tipos de respuesta a la quimioterapia en el cáncer de ovario: Cáncer sensible al platino, cáncer resistente al platino, cáncer persistente y cáncer refractario⁴. Se menciona, incluso, que las CMCO presentan un papel importante en la progresión y metástasis de este tipo de cáncer⁴. Por ello, se trata continuamente de identificar, diagnosticar, tratar y prevenir las enfermedades neoplásicas, o simplemente, nuevas formas de tratamiento que produzcan menos efectos secundarios.

Entre los marcadores metastásicos analizados, no se ha encontrado ninguna coincidencia con los expuestos en The Human Protein Atlas, pero sí con los patrones genéticos/moleculares expuestos en el artículo de Del Pozo⁵, lo cual no es un resultado desfavorable. De hecho, a pesar de que en dicha plataforma se exponen numerosos genes de pronóstico tanto favorable como desfavorable del CO (Anexo [10.3](#)), los analizados en los artículos son potenciales marcadores, necesitando de distintos ensayos clínicos para formar parte de la lista. Además, tal y como se ha expuesto en la Introducción, ha habido coincidencia con alteraciones ya conocidas en genes, tales como Tp53, Brca1-2 y Pten, entre otros⁵, lo cual sugiere que los resultados analizados van por un camino prometedor. Por último, un estudio de hace 4 años estimó que, al mes, se publicaban unos 60 genes supresores de tumores de distintos tipos de cáncer, y que algunos oncogenes en CO funcionaban como genes supresores de tumores en otros tipos de cáncer²⁹. Esto, por lo tanto, demuestra la necesidad de estudiar en mayor profundidad los potenciales marcadores de los 16 artículos analizados.

7.2. Desventajas de CRISPR/Cas9: Obstáculos y cortes no deseados

A pesar del potencial demostrado por este sistema en edición génica, también existen limitaciones que aseguran la necesidad de investigación y mejora del mismo. Existen distintos

obstáculos que CRISPR/Cas9 podría encontrarse en su camino desde la inoculación *in vivo* a la secuencia diana: desde la degradación, opsonización, fagocitosis del vehículo y fallo en la extravasación del capilar sanguíneo, aprisionamiento en la matriz extracelular o confinamiento local en el exterior celular, hasta el fallo en la liberación intracelular del vehículo y síntesis de los componentes en el citoplasma o, incluso, dificultad a la hora de encontrar la secuencia diana^{7,9}.

La entrada del vehículo es, en efecto, un proceso considerablemente tedioso. Además, existen distintas posibilidades de incluir los componentes del sistema de edición. Si bien la entrada de la ribonucleoproteína gARN/Cas9 parece lo más sensato, introducir directamente una molécula tan grande a través de la membrana celular podría suponer un gran reto. Por ello, su introducción es posible ya sea mediante ADN o mRNA, para que así resulte en la expresión de la proteína dentro de la propia célula diana. Los vehículos de entrada también presentan tanto ventajas como desventajas: los vectores lentivirales tienen una eficiencia de entrada alta y menor inmunogenicidad que otros vehículos virales, pero se integran de forma aleatoria en el genoma y la probabilidad de que sucedan cortes no deseados aumenta. Los liposomas/componentes lipídicos son sencillos de diseñar, seguros y con una gran capacidad de carga. Por el contrario, son fácilmente digeridos por el hígado. Las nanopartículas poliméricas también se transforman de manera sencilla y su liberación es controlable. No obstante, el constructo polimérico de carga no es fácil de elaborar, y su aplicación es muy limitada^{9, 26}.

Por otro lado, si bien lo más probable es que, una vez en el núcleo, CRISPR/Cas9 encuentre la secuencia diana y edite el locus de interés, los cortes no deseados (conocidos como *off-targets*) en secuencias del genoma diferentes a la secuencia diana todavía mantienen a la comunidad científica ocupada, ya que se tratan de la principal preocupación a la hora de relacionar CRISPR con aplicaciones terapéuticas⁹. La secuencia PAM puede ser una de las razones de los cortes *off-target* induciendo la ruptura de secuencias de ADN que no son completamente complementarias. Además, muchos de los otros efectos *off-target* se deben a la expresión sostenida de Cas9 en las células, lo cual podría potenciar la inserción de otras mutaciones. Los efectos *off-target*, por último, podrían incluso generar múltiples variantes alélicas tras el corte, algo que podría acarrear consecuencias desde inocuas hasta catastróficas²⁷.

7.3. Edición génica: Aplicaciones presentes y futuras de CRISPR

Actualmente existen distintos ensayos clínicos que aplican la herramienta en humanos, especialmente relacionados con ciertas condiciones genéticas hereditarias, tales como la hemofilia, la anemia de células falciformes y la beta-talasemia, así como en el caso de la amiloidosis cardíaca por transtirretina, la amaurosis congénita de Leber y la anemia perniciosa, entre otras⁹. Todos ellos están diseñados para editar células o tejidos específicos sin afectar a células germinales²⁷. Además, a pesar de que algunas de las enfermedades humanas pueden tratarse mediante modificaciones génicas *in vivo*, la gran mayoría requerirán la entrada de Cas9 y del gRNA, por lo que se necesitan métodos que aseguren dicha entrada específica y eficiente al órgano, tejido y/o células diana⁷.

Asimismo, la inactivación de un gen deletéreo puede no ser suficiente para suprimir su efecto patológico²⁶. Por ello, al relacionar la edición génica con patologías tan complejas como el CO, se necesitan maquinarias incluso más avanzadas que le doten a Cas9 de nuevas funciones. A partir del sistema CRISPR original, se han desarrollado otros sistemas como CRISPR/dCas9, cuyo potencial efecto *off-target* es menos peligroso que el causado por una rotura no deseada de doble hebra²⁴.

CRISPR/dCas9 presenta sus propios derivados reversibles, tales como CRISPR Activation (CRISPRa), el cual se trata de una sobreexpresión transcripcional de genes endógenos mediante el reclutamiento mediado por dCas9 de dominios de activación transcripcional (Figura 6A), o CRISPR Interference (CRISPRi), el cual reprime la transcripción sin romper el ADN, por lo que se evita la toxicidad relacionada con la ruptura del mismo (Figura 6B)²⁶.

Por otro lado, el sistema de *screening* Combi-GEM-CRISPR, es una maquinaria capaz de analizar paralelamente combinaciones de alteraciones genéticas específicas con el fin de observar cómo dichas variaciones genéticas o epigenéticas dan forma a los distintos fenotipos neoplásicos. De hecho, el equipo que la diseñó trabajó con pares de genes capaces de inhibir la proliferación celular en el CO, presentando este sistema al mundo como un avance potencial en el estudio de los distintos fenotipos y, así, distintas combinaciones de medicamentos y resistencia a los mismos, de una variedad de enfermedades humanas⁹.

Si bien lo mencionado previamente es ventajoso en enfermedades multifactoriales, numerosas enfermedades genéticas están causadas por mutaciones en un único gen, por lo que su tratamiento a nivel génico no consistiría en cortar la hebra de ADN, sino en reemplazar la base nucleotídica mutada por la original. Para ello, existen herramientas de Edición de Bases

(del inglés, *Base Editing*) capaces de provocar una sustitución nucleotídica, mediante la acción de citidinas deaminasas (que convierten la citosina (C) en uracilo (U), que se reemplaza por timina (T) en el núcleo, resultando en una sustitución a timina-adenina (T-A)) (Figura 6C) o la de las adeninas deaminasas, que catalizan la conversión de la adenina (A) a ionsina (I), resultando así en la conversión de A-T a G-C (Figura 6C).

Las herramientas de Edición de Bases, contrariamente, presentan una importante desventaja: no producen ni inserciones ni deleciones. Por ello, se ha desarrollado una herramienta conocida como Prime Editing que es capaz de realizar diversos cambios en el ADN tales como transiciones, transversiones, deleciones, inserciones... Esta herramienta convierte la Cas9 en la nickasa nCas9, de actividad endonucleasa con corte en una sola hebra de ADN. Así, con ayuda de la Transcriptasa inversa, se genera la hebra editada (Figura 6D)²⁶.

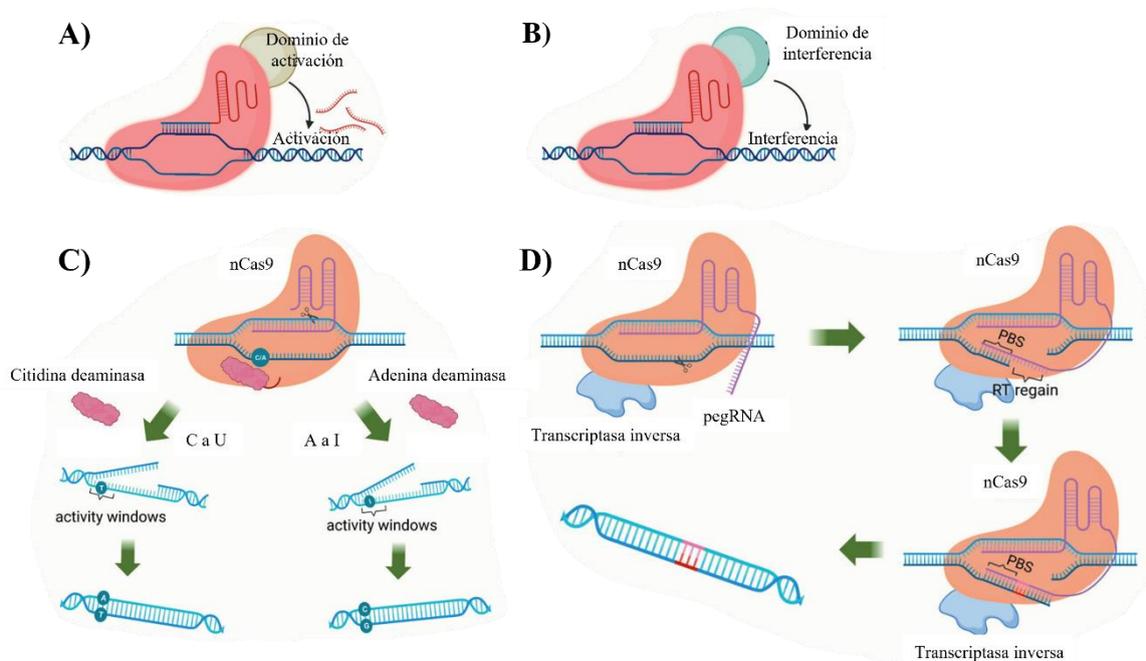


Figura 6: Aplicaciones de CRISPR. **A)** CRISPRa. **B)** CRISPRi. **C)** Base Editing. **D)** Prime Editing. Adaptados de Li *et al.*, 2023²⁶.

Si bien el futuro de la edición génica vía CRISPR/Cas9 es prometedor, el campo ya se enfrenta de forma exitosa a los retos que su aplicación *ex vivo* conllevan: desde la dificultad en la producción de células editadas para cada uno de los pacientes como las limitaciones logísticas del trasplante de dichas células en los órganos y el gran coste que ello puede acarrear. La aplicación *in vivo* de CRISPR/Cas9 evitaría, al menos, los dos primeros, convirtiendo la edición génica en un punto de inflexión⁹. En los próximos diez años, se espera que la investigación y aplicación de la edición génica continúe avanzando y se combine con la tecnología de Machine Learning, de imagen de células vivas e, incluso, una secuenciación del

ADN más rápida y barata. Se aplicarán las plataformas de CRISPR hasta ahora investigadas con impacto en el día a día, aumentando el número de estudios clínicos. Quizás, el futuro de CRISPR estará relacionado con la protección de la salud, convirtiéndose, por ejemplo, en un profiláctico contra enfermedades neurodegenerativas o cardiovasculares. En agricultura, los productos generados mediante CRISPR tales como los órganos porcinos para su trasplante en humanos o arroz resistente a sequías podrían ser parte de la rutina⁹.

7.4. Bioética

7.4.1. Aplicación de la edición génica en humanos.

Otro tema a tratar es, en esencia, la bioética relacionada con la edición génica en humanos. Hoy en día todavía se debate sobre los retos científicos y técnicos que estas nuevas tecnologías afrontarían, así como sobre las consecuencias inciertas que tiene romper ambas hebras del ADN²⁶. Otra de las razones por las que la edición génica en humanos es tan debatida es la Mejora de la Raza. Si bien estos términos han sido conocidos a lo largo de la historia, es ahora cuando la ciencia podría ser capaz de hacerlo realidad. Lo que en un principio podría parecer inocuo, una solución frente a enfermedades hereditarias, no se aleja tanto de la idea de poder elegir, a gusto de cada uno, ciertos fenotipos que se consideren “superiores”²⁸.

Por otro lado, actualmente, modificar voluntariamente el genoma humano en línea germinal/embrionaria es ilegal a nivel mundial, si bien el debate está sobre la mesa²⁷. De hecho, en un principio, parece beneficioso poder eliminar la posibilidad de padecer determinadas enfermedades hereditarias graves. Sin embargo, para poder editar el genoma de los embriones se necesitan unas condiciones y plataformas eficaces y seguras que garanticen la seguridad de los mismos, y que aseguren que no terminarán dañándolos.

7.4.2. Edición génica como Técnica de Reproducción Asistida

Tal y como se ha comentado, los estudios clínicos actuales de CRISPR en humanos no afectan a células germinales, pero la idea de que lo hagan, o que pueda aplicarse esta herramienta de edición génica en ellas o en embriones, ya está sobre la mesa. Las pacientes oncológicas se enfrentan a problemas relacionados con la infertilidad post-quimioterapia. Además, al tratarse de un cáncer perteneciente al sistema reproductor, muchas de ellas son tratadas con ooforectomías, por lo que terminan sin uno o ambos ovarios. Si bien se les ofrece la posibilidad de vitrificar sus ovocitos previos al tratamiento, nadie les puede asegurar que no se trate de células afectadas por el cáncer, o portadoras del mismo o de alguna otra

enfermedad. En ese caso, la edición génica aplicada a los embriones generados a partir de dichos ovocitos podría resultar de gran utilidad.

A pesar de que la experimentación con embriones animales es algo que ya es una realidad, el número de artículos sobre la edición génica de embriones humanos es muy bajo, mayormente debido al bajo número de embriones donados con fines de investigación en CRISPR. Además, muchos países prohíben la creación de embriones para uso exclusivo en investigación, y muchos otros regulan muy estrictamente su uso²⁸.

Existen argumentos a favor y en contra respecto a la edición de la línea germinal. Por un lado, las personas con argumentos en contra ponen de manifiesto sus preocupaciones por los problemas técnicos y éticos asociados a estas tecnologías. Además, exponen la existencia de una desigualdad económica en el acceso a las mismas²⁷. Por último, creen que las tecnologías de edición génica no respetarían la autonomía del futuro bebé, ya que sería imposible obtener su consentimiento informado²⁸.

Contrariamente, los argumentos a favor de estas tecnologías no solo refutan los argumentos en contra, sino que exponen nuevas ideas. Respondiendo al punto en contra relacionado con el consentimiento informado por parte del futuro bebé, las personas que se encuentran a favor de la aplicación génica en embriones humanos ponen de manifiesto que los embriones sometidos a Diagnóstico Genético Pre-implantacional (DGP) tampoco firman un consentimiento informado, y no es algo que haya evitado el uso de la técnica. Además, con el uso de la edición génica se permitiría la corrección de embriones con mutaciones para su posterior transferencia en el útero, pudiendo hasta eliminar completamente ciertas enfermedades familiares. Como la técnica ofrece la oportunidad de editar diferentes loci al mismo tiempo, podrían curarse enfermedades poligénicas o incluso reducirse la sensibilidad a enfermedades multifactoriales. Por último, defienden su uso en casos en los que la pareja ya tienen un niño enfermo que necesita un trasplante, ya que podría generarse un embrión completamente compatible con su hermano²⁸.

Si bien para determinar qué embriones habrían de ser modificados genéticamente, estos tendrían que ser analizados mediante DGP. El mejor momento para editar su genoma y evitar mosaicismo tendría que ser en estado de cigoto, por lo que los embriones tendrían que editarse a ciegas, previos a ser analizados con DGP²⁸. Esta falta de coherencia, en efecto, es una de las cuestiones que se debaten todavía.

El primer caso de modificación génica embrionaria de naturaleza clínica sucedió hace 5 años en China. En noviembre del 2018, el científico He Jiankui presentó al mundo, en la Segunda Cumbre Internacional sobre la edición genética en humanos, las primeras mellizas resultantes de la aplicación de CRISPR a nivel embrionario, nacidas a partir de una fecundación *in vitro*. El investigador hubo transferido los embriones de estas niñas, previamente modificados genéticamente mediante CRISPR, a mujeres; engañándolas tanto a ellas y a sus parejas como a los ginecólogos encargados de las transferencias. Al primer grupo les aseguró que se trataba del único tratamiento posible y, al segundo, no les comentó que habían sido genéticamente editados. Además, el experimento de edición génica ni siquiera obtuvo resultados: se pretendía inactivar el gen CCR5, el cual codifica para un co-receptor utilizado por el VIH para entrar en los linfocitos humanos. Lo que no les dijo a los padres es que se trataba de un procedimiento totalmente innecesario para el caso, ya que en 2018 ya existían eficientes técnicas de lavado seminal para pacientes portadores del virus, y las consiguientes técnicas de Fecundación *In Vitro* (FIV). El investigador, orgulloso de su proeza, grabó una serie de vídeos explicando cómo su avance científico se comparaba al de la FIV. Poco después del Congreso, una tercer bebé resultante de un embrión modificado nació en paradero no divulgado. Marx relata en su artículo que se trata de una violación ética que debería ser ampliamente analizada y discutida. De la misma forma, las consecuencias de la edición génica sobre la salud tanto física como mental de las niñas, no del todo conocida, es otro de los aspectos a considerar³⁰.

En resumen, la aplicación, en humanos, de la herramienta de edición génica basada en CRISPR/Cas y sus variaciones presenta tanto ventajas como desventajas, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Si bien las utilidades a corto, medio y largo plazo del sistema podrían ser revolucionarias, los aspectos bioéticos que su aplicación en humanos supone todavía están sobre la mesa. Sea como fuere, la herramienta parece prometedora para aumentar el conocimiento en el CO, si bien se necesitan más ensayos clínicos que respalden la idea.

8. CONCLUSIONES

1. El cáncer de ovario (CO) es una de las distintas variaciones patológicas de dicho órgano, y presenta numerosos tipos y subtipos según su origen, su clínica anatómico-molecular, estadificación y respuesta al tratamiento.
2. Los 16 artículos analizados presentan resultados prometedores en relación con el avance en el conocimiento del CO, ya sea con nuevos marcadores pro- y anti-apoptóticos como

con herramientas de *screening* y estrategias combinatorias de edición génica y quimioterapia.

3. La edición génica vía CRISPR/Cas representa una herramienta potencial de gran utilidad en la prevención de las recidivas y la resistencia al tratamiento del CO.
4. A pesar de los numerosos inconvenientes técnicos y debates bioéticos del sistema de edición génica en humanos, sus aplicaciones ofrecen un futuro esperanzador tanto en la biomedicina del cáncer como en otros campos.

9. BIBLIOGRAFÍA

¹ Tejedor, J. A. G. (2023) Anatomía y fisiología de la función ovárica. Ovulación. En De la Blanca, P., Director (Dir.), *Tratado de Esterilidad e Infertilidad Humana*, pp. 23-33. Editorial Panamericana.

² Hoare B. S. y Khan Y. S. (2022) *Anatomy, Abdomen and Pelvis: Female Internal Genitals*. [Actualizado el 25 de Julio de 2022]. Editorial: StatPearls Publishing. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554601/#_NBK554601_pubdet

³ Huang, J., Chan, W. C., Ngai, C. H., Lok, V., Zhang, L., Lucero-Prisno III, D. E., ... & NCD Global Health Research Group of Association of Pacific Rim Universities (APRU). (2022). Worldwide burden, risk factors, and temporal trends of ovarian cancer: A global study. *Cancers*, 14(9), 2230. DOI: 10.3390/cancers14092230

⁴ Miree, O., Srivastava, S. K., Dasgupta, S., Singh, S., Rocconi, R., y Singh, A. P. (2021). Current and futuristic roadmap of ovarian cancer management: an overview. En Schatten, H., editor (ed.), *Ovarian Cancer: Molecular & Diagnostic Imaging and Treatment Strategies*, pp. 1-19. Editorial Springer. DOI: 10.1007/978-3-030-73359-9_1

⁵ Del Pozo, S. D., Leal, V. L., Martín, P. J. C., García, Á. T., Mancebo, G., Moreno, J. L. S. I., ... y Rosales, A. L. (2022). Cáncer de ovario 2022. En *Progresos de obstetricia y ginecología: revista oficial de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia*, 65(3), pp. 90-131.

⁶ O'Shea, A. S. (2022). Clinical staging of ovarian cancer. En Kreeger, P. K., editor (ed.), *Ovarian Cancer: Methods and Protocols*, 2424(1), pp. 3-10. Editorial Humana Press. DOI: 10.1007/978-1-0716-1956-8_1

⁷ Khalil, A. M. (2020). The genome editing revolution. *Journal of genetic engineering and*

biotechnology, 18(1), 1-16. DOI: 10.1186/s43141-020-00078-y

⁸ Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, 337(6096), 816-821. DOI: 10.1126/science.1225829

⁹ Wang, J. Y., & Doudna, J. A. (2023). CRISPR technology: A decade of genome editing is only the beginning. *Science*, 379(6629), eadd8643. DOI: 10.1126/science.add8643

¹⁰ Walton, J., Blagih, J., Ennis, D., Leung, E., Dowson, S., Farquharson, M., ... & McNeish, I. A. (2016). CRISPR/Cas9-mediated Trp53 and Brca2 knockout to generate improved murine models of ovarian high-grade serous carcinoma. *Cancer research*, 76(20), 6118-6129. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1272

¹¹ Karmakar, S., Seshacharyulu, P., Lakshmanan, I., Vaz, A. P., Chugh, S., Sheinin, Y. M., ... & Ponnusamy, M. P. (2017). hPaf1/PD2 interacts with OCT3/4 to promote self-renewal of ovarian cancer stem cells. *Oncotarget*, 8(9), 14806. DOI: 10.18632/oncotarget.14775

¹² Ling, K., Jiang, L., Liang, S., Kwong, J., Yang, L., Li, Y., ... & Liang, Z. (2018). Nanog interaction with the androgen receptor signaling axis induce ovarian cancer stem cell regulation: studies based on the CRISPR/Cas9 system. *Journal of ovarian research*, 11(1), 1-16. DOI: 10.1186/s13048-018-0403-2

¹³ Ji, L., Zhao, G., Zhang, P., Huo, W., Dong, P., Watari, H., ... & Zheng, J. (2018). Knockout of MTF1 inhibits the epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Journal of Cancer*, 9(24), 4578. DOI: 10.7150/jca.28040

¹⁴ Sheta, R., Bachvarova, M., Macdonald, E., Gobeil, S., Vanderhyden, B., & Bachvarov, D. (2019). The polypeptide GALNT6 displays redundant functions upon suppression of its closest homolog GALNT3 in mediating aberrant O-glycosylation, associated with ovarian cancer progression. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2264. DOI: 10.3390/ijms20092264

¹⁵ Liu, Q., Liu, H., Li, L., Dong, X., Ru, X., Fan, X., ... & Liu, J. (2020). ATAD2 predicts poor outcomes in patients with ovarian cancer and is a marker of proliferation. *International Journal of Oncology*, 56(1), 219-231. DOI: 10.3892/ijo.2019.4913

- ¹⁶ Li, J., Qin, X., Shi, J., Wang, X., Li, T., Xu, M., ... & Shi, Y. (2021). A systematic CRISPR screen reveals an IL-20/IL20RA-mediated immune crosstalk to prevent the ovarian cancer metastasis. *Elife*, *10*, e66222. DOI: 10.7554/eLife.66222
- ¹⁷ Xu, M., Huang, S., Chen, J., Xu, W., Xiang, R., Piao, Y., & Zhao, S. (2021). Cytotoxic lymphocytes-related gene ITK from a systematic CRISPR screen could predict prognosis of ovarian cancer patients with distant metastasis. *Journal of Translational Medicine*, *19*(1), 1-12. DOI: 10.1186/s12967-021-03119-3
- ¹⁸ Chehade, H., Purandare, N., Fox, A., Adzibolosu, N., Jayee, S., Singh, A., ... & Alvero, A. B. (2023). MNRR1 is a driver of ovarian cancer progression. *Translational Oncology*, *29*, 101623. DOI: 10.1016/j.tranon.2023.101623
- ¹⁹ Löhmußaar, K., Kopper, O., Korving, J., Begthel, H., Vreuls, C. P., van Es, J. H., & Clevers, H. (2020). Assessing the origin of high-grade serous ovarian cancer using CRISPR-modification of mouse organoids. *Nature communications*, *11*(1), 2660. DOI: 10.1038/s41467-020-16432-0
- ²⁰ He, Z. Y., Zhang, Y. G., Yang, Y. H., Ma, C. C., Wang, P., Du, W., ... & Wei, Y. Q. (2018). In vivo ovarian cancer gene therapy using CRISPR-Cas9. *Human gene therapy*, *29*(2), 223-233. DOI: 10.1089/hum.2017.209
- ²¹ Wong, A. S., Choi, G. C., Cui, C. H., Pregernig, G., Milani, P., Adam, M., ... & Lu, T. K. (2016). Multiplexed barcoded CRISPR-Cas9 screening enabled by CombiGEM. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(9), 2544-2549. DOI: 10.1073/pnas.1517883113
- ²² Zhou, P., Chan, B. K., Wan, Y. K., Yuen, C. T., Choi, G. C., Li, X., ... & Wong, A. S. (2020). A three-way combinatorial CRISPR screen for analyzing interactions among druggable targets. *Cell reports*, *32*(6), 108020. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108020
- ²³ Iyer, S., Zhang, S., Yucel, S., Horn, H., Smith, S. G., Reinhardt, F., ... & Weinberg, R. A. (2021). Genetically Defined Syngeneic Mouse Models of Ovarian Cancer as Tools for the Discovery of Combination Immunotherapy Genetically Defined High-Grade Serous Ovarian Cancer Models. *Cancer Discovery*, *11*(2), 384-407. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-0818
- ²⁴ Lu, H., Zhang, Q., He, S., Liu, S., Xie, Z., Li, X., & Huang, Y. (2021). Reduction-Sensitive Fluorinated-Pt (IV) Universal Transfection Nanoplatform Facilitating CT45-Targeted

CRISPR/dCas9 Activation for Synergistic and Individualized Treatment of Ovarian Cancer. *Small*, 17(41), 2102494. DOI: 10.1002/sml.202102494

²⁵ Coelho, R., Tozzi, A., Disler, M., Lombardo, F., Fedier, A., López, M. N., ... & Heinzelmann-Schwarz, V. (2022). Overlapping gene dependencies for PARP inhibitors and carboplatin response identified by functional CRISPR-Cas9 screening in ovarian cancer. *Cell Death & Disease*, 13(10), 909. DOI: 10.1038/s41419-022-05347-x

²⁶ Li, T., Yang, Y., Qi, H., Cui, W., Zhang, L., Fu, X., ... & Yu, T. (2023). CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 36. DOI: 10.1038/s41392-023-01309-7

²⁷ Nestor, M. W., & Wilson, R. L. (2022). Brief Introduction to CRISPR Cas9. En *Anticipatory Ethics and the Use of CRISPR in Humans* (pp. 1-24). Springer. DOI: 10.1007/978-3-030-98368-0

²⁸ López-Morató, M., Sánchez, M., & Rueda, J. (2021). La edición del genoma humano en la línea germinal: actualización de investigación básica y preclínica, consideraciones éticas y posible candidato para sustituir PGT en las clínicas. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana*, 38(4 Octubre-Noviembre-Diciembre). Recuperado a partir de <https://revistafertilidad.com/index.php/rif/article/view/48>

²⁹ Lever, J., Zhao, E. Y., Grewal, J., Jones, M. R., & Jones, S. J. (2019). CancerMine: a literature-mined resource for drivers, oncogenes and tumor suppressors in cancer. *Nature methods*, 16(6), 505-507. DOI: 10.1038/s41592-019-0422-y

³⁰ Marx, V. (2021). The CRISPR children. *Nat Biotechnol*, 39, 12. DOI: 10.1038/s41587-021-01138-5

10. ANEXOS

10.1. Tipología del cáncer de ovario.

Anexo 10.1. Tipos de CO. Adaptado de Del Pozo y de O'Shea ^{5,6}.

<i>Tipo</i>	Subtipo
<i>De células germinales</i>	Disgerminoma Saco de Yolk/ Tumor de seno endodérmico Carcinoma embrionario Coriocarcinoma

	Teratoma
	Mixto
<i>De células del estroma de los cordones sexuales</i>	Células de la granulosa
	Tecoma
	Fibroma
	De Sertoly-Leydig
<i>Epitelial</i>	Carcinoma seroso
	De bajo grado
	De alto grado
	Mucinoso
	Endometrioides
	De células claras

10.2. Estadificación del cáncer de ovario.

Anexo 10.2. Estadificación del CO según el sistema de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO). Adaptado de O'Shea [6](#).

<i>Estadío</i>	Tipo	Descripción
<i>I: Confinado en un/ambos ovario/s o trompa/s de Falopio</i>	IA	En un ovario o en una trompa de Falopio.
	IB	En los dos ovarios o en las dos trompas de Falopio.
	IC	En uno o ambos ovarios o trompas de Falopio y: <ul style="list-style-type: none"> - IC1: El tejido se rompió durante la cirugía. - IC2: El tejido se rompió antes de la cirugía o el tumor se sitúa en la superficie del/de los ovario/s. - IC3: Presencia de células malignas en el fluido de la cavidad peritoneal o en los lavados abdominales o pélvicos.
<i>II: En un/ambos ovario/s o trompa/s de falopio y se ha extendido a otros órganos pélvicos o hay presencia de cáncer peritoneal primario</i>	IIA	Invasión en trompas de Falopio, útero u ovarios.
	IIB	En la superficie externa o con invasión en órganos pélvicos cercanos como la vejiga, colon sigmoide o el recto.
<i>III: Propagación al peritoneo extrapélvico y/ con metástasis en nódulos linfáticos retroperitoneales</i>	IIIA1	Nódulos linfáticos retroperitoneales positivos de ≤ 10 mm (i) o > 10 mm (ii).
	IIIA2	Implicación peritoneal extrapélvica microscópica con/sin nódulos linfáticos retroperitoneales positivos.
	IIIB	Metástasis peritoneal extrapélvica macroscópica ≤ 2 cm con/sin nódulos linfáticos retroperitoneales positivos. Incluye propagación a la cápsula del hígado o bazo.
	IIIC	Metástasis peritoneal extrapélvica macroscópica > 2 cm con/sin nódulos linfáticos retroperitoneales positivos. Incluye propagación a la cápsula del hígado o bazo.

<i>IV: Metástasis distante excluyendo el peritoneo</i>	IVA	Efusión pleural con citología positiva.
	IVB	Metástasis parenquimatosa hepática y/o esplénica, metástasis extra-abdominal, incluyendo nódulos linfáticos.

10.3. Genes asociados al cáncer de ovario.

Anexo 10.3. Genes con una mayor asociación significativa al cáncer de ovario. Recuperado de www.proteinatlas.org.

<i>Diagnóstico</i>	GENES		
<i>Favorable</i>	MRS2	UBE2L3	PRR3
	ZNF429	KLHDC9	UBE2T
	TDP2	AP1S2	CCDC160
	CXCL11	MAGOHB	SNRPD1
	GPR27	AADAC	NOL7
	MED19	FMC1	TERF2IP
	C18orf21	FAM166B	
	ACOT13	ZNF85	
<i>Desfavorable</i>	EMP1	AGFG1	SLC39A13
	PI3	RPL7A	SOGA1
	FAM20C	UNC5B	FAM98C
	FCGBP	CST4	RPS6KA2
	TGFBI	FANCD2	KRT7
	RCBTB1	RIPK4	MRC2
	PPTC7	DAGLB	
	TIMP3	PC	