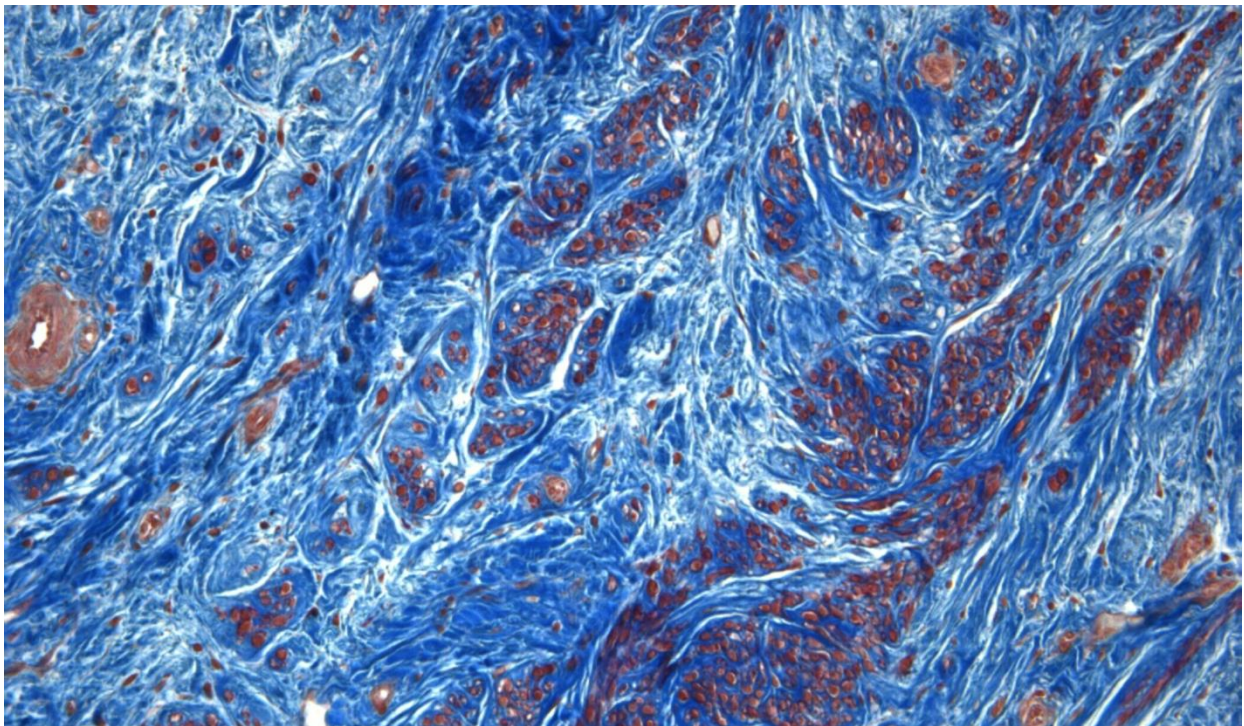


Estudio cualitativo y cuantitativo de la matriz extracelular de leiomioma y miometrio. Efecto del tratamiento con acetato de Ulipristal.

Qualitative and quantitative study of the extracellular matrix of leiomyoma and myometrium. Effect of treatment with Ulipristal acetate.



Julio 2020

Trabajo de Fin de Grado

Elena Mesa Provecho

Tutorizado por:

Dra. Aixa Rodríguez Bello y Dr. Ricardo Reyes Rodríguez

ÍNDICE

Resumen/Abstract	1
Introducción	2
Objetivos	7
Material y métodos	8
Material	8
Métodos.....	9
Procesado de las muestras	9
Tinciones histológicas	11
Técnicas inmunohistoquímicas	12
Observación de muestras.....	15
Análisis cuantitativo.....	15
Resultados	16
Análisis histológico y cuantitativo	16
Análisis inmunohistoquímico	18
Análisis de la presencia de células cebadas	21
Discusión	22
Conclusiones/Conclusions	26
Bibliografía	28
Agradecimientos	32

RESUMEN

Los leiomiomas son tumores benignos de músculo liso miometrial. Se caracterizan por un aumento y desregulación de la matriz extracelular (MEC), en relación con el miometrio, incluyendo cambios en la expresión de algunos de sus componentes como el colágeno I y la metaloproteinasa-2 (MMP2). Actualmente se desconoce le etiología de estos tumores, aunque algunos estudios sugieren que pueden tener su origen en un proceso inflamatorio. El acetato de ulipristal (UPA)

es un fármaco que reduce el volumen de los leiomiomas al favorecer la reducción de MEC actuando como modulador de los receptores de progesterona, hormona que favorece la proliferación y la formación de MEC. Tanto histológica como inmunohistoquímicamente comprobamos que no hubo, en el material analizado, diferencias significativas entre la MEC de miometrio y de leiomioma. El tratamiento con UPA redujo la MEC del leiomioma sin observarse cambios en la distribución de colágeno I o MMP2. El miometrio de las pacientes tratadas con UPA también mostró una reducción en el porcentaje de MEC además de cambios en la distribución celular de ambas proteínas.

Palabras clave: leiomioma, matriz extracelular, colágeno I, metaloproteinasa-2, células cebadas.

ABSTRACT

Leiomyomas are benign myometrial smooth muscle tumours. They are characterized by an increase and deregulation of the extracellular matrix (ECM), in relation to the myometrium, including changes in the expression of some of its components such as collagen I and metalloproteinase-2 (MMP2). Currently the etiology of these tumours is unknown, although some studies suggest that they may have their origin in an inflammatory process. Ulipristal acetate (UPA) is a drug that reduces the volume of leiomyomas by promoting the reduction of ECM by acting as a modulator of progesterone receptors, a hormone that promotes the proliferation and formation of ECM. Both histologically and immunohistochemically we found that there were no significant differences between the ECM of myometrium and leiomyoma in the analysed material. Treatment with UPA reduced the ECM of leiomyoma without observing changes in the distribution of collagen I or MMP2.

Key words: leiomyoma, extracellular matrix, collagen I, metalloproteinase-2, mast cells.

INTRODUCCIÓN

El útero es el órgano de mayor tamaño del aparato reproductor femenino, se trata de un órgano muscular hueco localizado en la cavidad pélvica menor. Histológicamente consta de 3 capas bien diferenciadas: el endometrio, es la capa más interna, constituida por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado y ciliado; el miometrio, constituido por haces de fibras musculares lisas rodeados de tejido conectivo; y la capa serosa, una membrana que recubre parcialmente el órgano.

Dentro de las neoplasias ginecológicas, los leiomiomas, neoplasias del músculo liso del miometrio, representan los tumores benignos más frecuentes en las mujeres en edad reproductiva (Islam *et al.*, 2013); pudiéndose observar en más del 70% de las mujeres (Buttram Jr y Reiter, 1981; Cramer y Patel, 1990). Aunque son ampliamente conocidos por otros nombres como: fibromas, miomas, miofibroma, fibromiomas o leiomiofibromas, el término leiomioma es quizás el más acertado, ya que hace referencia a cualquier tipo de tumor de carácter benigno originado a partir de células musculares lisas (Blake, 2007).

Los leiomiomas son tumores monoclonales, es decir, se originan a partir de una única célula madre miometrial. Esto significa, que en los casos en los que en una paciente se dan varios de estos tumores, cada uno de ellos proviene de la transformación de células madre de manera independiente (Serdar y Balun, 2013) y pueden presentar por tanto características diferenciales.

Macroscópicamente, los leiomiomas son masas de aspecto redondeado, pseudoencapsulados y de color perlino que presentan tamaño variable, desde 1 mm hasta 30 cm. Además, se dan frecuentemente de manera múltiple.

Atendiendo al lugar que ocupan en el útero y la proyección de su crecimiento, podemos clasificar a los miomas en: intramurales, aquellos que se localizan en el miometrio; submucosos, cuyo crecimiento se proyecta hacia la cavidad del útero; y serosos, cuando sobresalen de la capa serosa, creciendo hacia el exterior, dentro de la cavidad peritoneal. Tanto los miomas submucosos como serosos se pueden proyectar sobre un pedículo unido al miometrio de origen, en cuyo caso se denominan leiomiomas pediculados (Figura 1.)

Esta clasificación está planteada para aquellos leiomiomas considerados típicos por sus características celulares y su crecimiento lento. Sin embargo, existen leiomiomas que presentan diferencias en su estructura celular, su histología o su comportamiento clínico. Entre estos

encontramos: los leiomiomas atípicos, caracterizados por presentar atipias fundamentalmente en su núcleo; los leiomiomas celulares (LC), determinados por su alta densidad celular y su escasa matriz; y los leiomiomas mitóticamente activos o de crecimiento rápido (LMMA), que presentan un mayor índice de proliferación celular, lo que induce a un crecimiento acelerado del tumor (Arleo *et al.*, 2015).

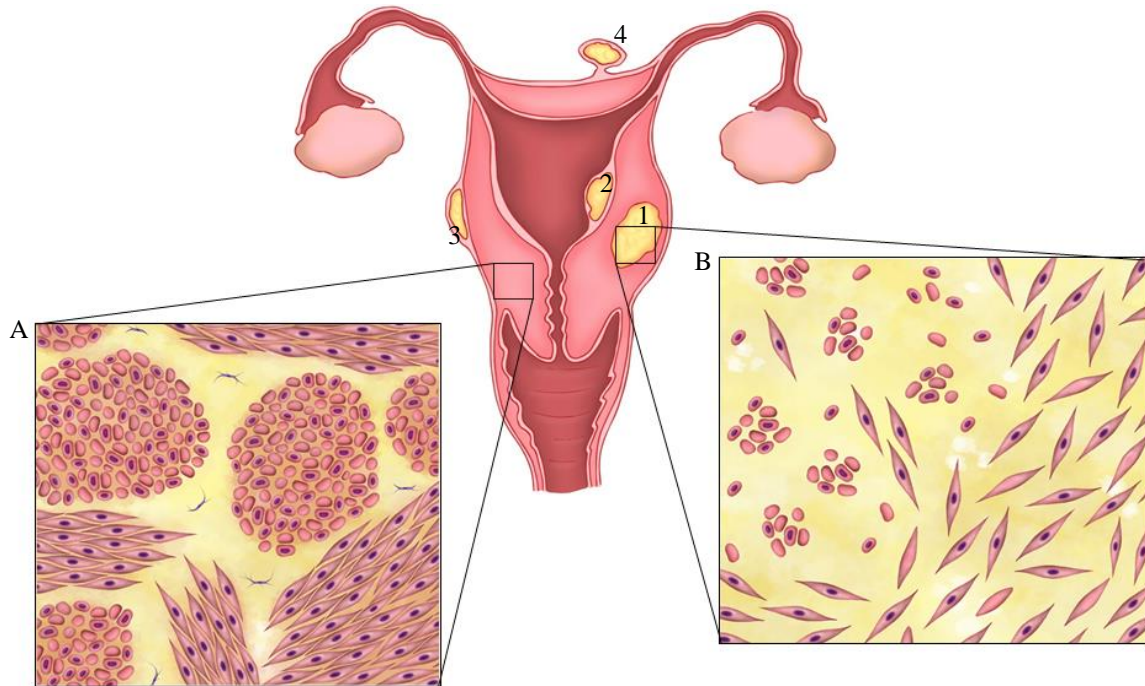


Figura 1. Tipos de leiomiomas. 1. Mioma intramural; 2. Mioma submucoso; 3. Mioma seroso; 4. Mioma seroso pediculado. **A. Esquema histología tejido miometrial;** Células musculares agrupadas en paquetes de gran tamaño rodeados de MEC **B. Esquema histológico leiomioma;** Células agrupadas en pequeños grupos o aisladas rodeadas de MEC

Microscópicamente, están formados por células musculares bien diferenciadas dispuestas en haces que se encuentran entrelazados por una cantidad abundante de matriz extracelular (MEC) (Arleo *et al.*, 2015) (Figura 2.).

Una de las características distintivas de los leiomiomas, es la excesiva acumulación de los componentes de la MEC que forman parte del tejido conjuntivo que rodea a las fibras musculares; colágenos, fibronectinas, lamininas y proteoglicanos (Herndon *et al.*, 2016; Malik *et al.*, 2012). La abundancia de estos les confiere a estas neoplasias características típicas de fibrosis, lo que justifica que usualmente se denominen fibromas.

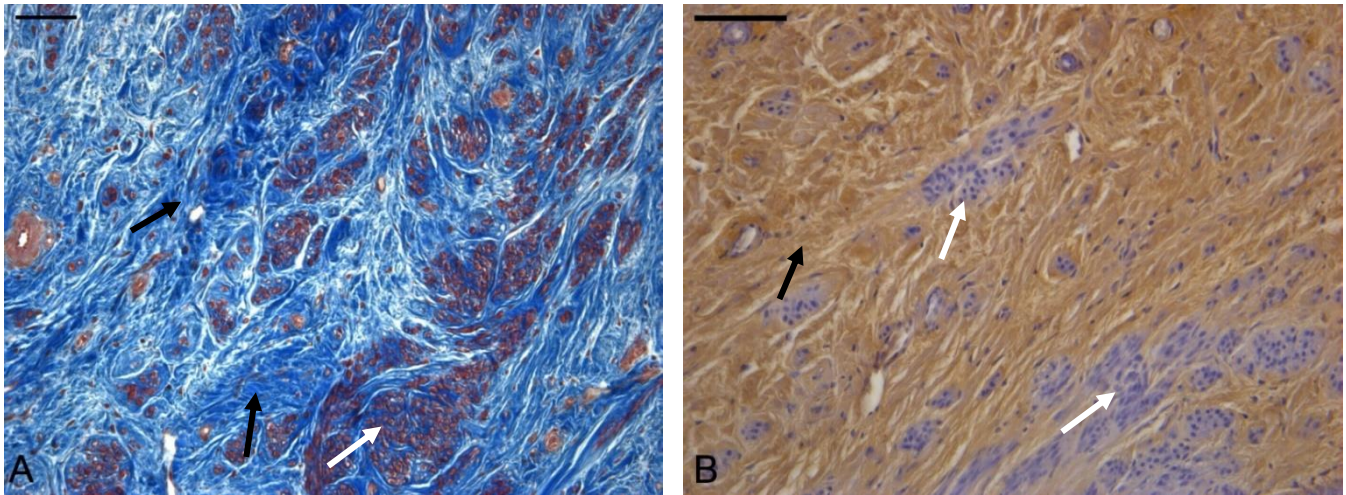


Figura 2. Estructura histológica del leiomioma. Se observan agrupaciones de células musculares (flechas blancas) rodeadas de MEC (flechas negras). **A.** Tinción tricrómica de Masson; células en rojo, MEC en azul. **B.** IHQ de colágeno I; células en violeta (contrateñido de núcleos con hematoxilina), MEC en marrón (revelado con DAB). Barra de escala: 100 μ m.

La mayor cantidad de MEC es un factor determinante en el crecimiento de los leiomiomas. La gran acumulación de sus componentes genera estrés osmótico y desencadena mecanismos de mecanotransducción. De esta manera, se activan vías de señalización que dan como resultado un aumento de la proliferación celular y de la síntesis de MEC (Islam *et al.*, 2018)

En la última década, numerosos estudios han determinado que la acumulación y regulación de MEC depende de factores de crecimiento (Islam *et al.*, 2014) , citoquinas (Wang *et al.*, 2015) y hormonas esteroideas (Qiang *et al.*, 2014).

Se ha observado que además de la acumulación de componentes de la MEC, existen modificaciones en la estructura y disposición de estos; concretamente esto ha sido documentado en las fibras de colágeno (Iwahashi y Muragaki, 2011; Leppert *et al.*, 2006; Malik *et al.*, 2010). También en esta proteína se ha reportado una presencia y expresión significativamente mayor en leiomioma respecto al miometrio adyacente (Iwahashi y Muragaki, 2011; Iwahashi *et al.*, 2011). Hay evidencias que muestran que, de los distintos componentes de la matriz, es el aumento de colágeno el que contribuye al aumento de matriz extracelular en los leiomiomas, específicamente el colágeno tipo I. Así, Carrino *et al.*, 2012, mostraron que la expresión de colágeno I en leiomiomas era superior a la observada en miometrio (Carrino *et al.*, 2012).

En tejidos normales, como el miometrio, hay un equilibrio entre la formación y degradación de la MEC. Esta degradación es llevada a cabo por un tipo de enzimas endopeptidasas dependientes de Zinc (Islam *et al.*, 2018), las metaloproteinasas (MMPs). Tanto en miometrio como en leiomioma,

las células del músculo liso sintetizan y secretan cantidades de varios tipos de estas MMPs: MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9. Dos de estas, la MMP2 y MMP9, conocidas como gelatinasas, son especialmente abundantes en la matriz de los leiomiomas (Wolańska *et al.*, 2004). Numerosos estudios indican que existe una expresión diferencial de estas enzimas en leiomioma y miometrio, destacando particularmente la elevada expresión de metaloproteínasa-2 (MMP2) en los leiomiomas, sugiriendo posiblemente un papel dominante de esta proteína en el desarrollo de estos tumores (Korompelis *et al.*, 2015; Wolańska *et al.*, 2004)

El desconocimiento de los procesos que inician la formación de leiomiomas ha llevado a plantear distintas hipótesis. En los últimos años se ha planteado que la fibrosis típica del leiomioma puede tener su origen en los procesos inflamatorios que afectan al miometrio (Islam *et al.*, 2018).

En condiciones normales, la inflamación promueve la diferenciación de miofibroblastos, células especializadas que al activarse por lesión tisular, inflamación, hipoxia y/o estrés oxidativo, promueven la reparación del tejido mediante la producción de proteínas de la matriz; cuando el daño ya ha sido reparado, los miofibroblastos desaparecen por apoptosis (Desmouliere *et al.*, 1995). Sin embargo en casos en los que existe inflamación crónica, los miofibroblastos persisten y continúan la producción de componentes de la MEC provocando la fibrosis (Powell *et al.*, 1999; Tomasek *et al.*, 2002) (Figura 3.).

Se ha visto que los miofibroblastos pueden diferenciarse a partir de fibroblastos, células madre e incluso células musculares del miometrio (Feng *et al.*, 2017; Protic *et al.*, 2016) Esta diferenciación depende de una gran variedad de mediadores como: factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y quimioquinas (Feng *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2014; Tomasek *et al.*, 2002; Wipff *et al.*, 2007; Wynn, 2007; Yang *et al.*, 2016)

En el útero, los procesos reproductivos como la ovulación, la menstruación e implantación, pueden desencadenar respuestas inflamatorias crónicas. Así mismo, las infecciones, lesiones, estrés, presencia de dispositivos intrauterinos, cesáreas y presencia de proteínas reproductoras masculinas (Wegienka, 2012) pueden aumentar esta respuesta inflamatoria.

Dado que prácticamente todas las mujeres se han visto sometidas a algunos de estos factores, pero que no todas padecen de miomas, parece evidente que el proceso inflamatorio no puede producir por sí solo el desarrollo de leiomiomas, por lo que se teoriza también con una serie de factores genéticos y epigenéticos que influyen en este proceso (Gallagher y Morton, 2016) (Yang *et al.*, 2016).

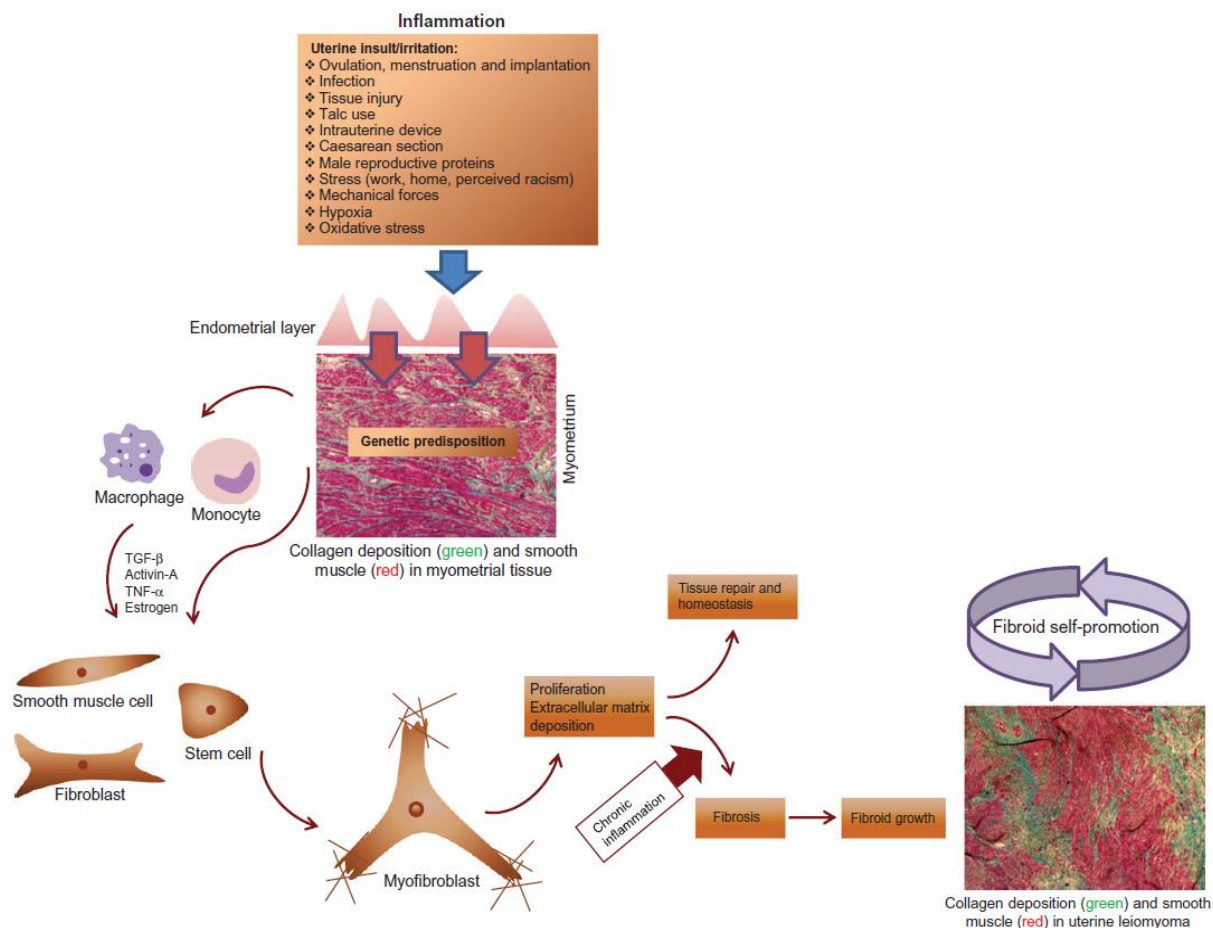


Figura 3. Origen de los leiomiomas según la hipótesis del proceso inflamatorio (Islam *et al.*, 2018)

Se ha estudiado en leiomioma la presencia de células capaces de liberar factores proinflamatorios, como las células cebadas y los macrófagos. Si bien estas células no se han relacionado directamente con el proceso de formación de estos tumores, si se ha encontrado un aumento de las mismas en algunos de sus tipos, como los leiomiomas celulares, respecto de los leiomiomas típicos (Protic *et al.*, 2016).

A pesar de la gran incidencia de esta neoplasia en la población, actualmente la cirugía continúa siendo el tratamiento más utilizado por su eficacia; dejando en segundo plano a los fármacos, principalmente utilizados para paliar los efectos de los miomas sintomáticos o bien recetados como tratamientos preoperatorios.

La extracción completa del útero, histerectomía, sigue siendo hoy en día el tratamiento más efectivo y frecuente, pues evidentemente, garantiza que no haya recurrencia, al contrario de lo que sucede con la miomectomía (extracción de los miomas vía laparoscópica, histeroscópica o laparotomía). En España, la cirugía sigue siendo la terapia más utilizada (Monleón *et al.*, 2018).

Teniendo en cuenta el papel de las hormonas, fundamentalmente de la progesterona, en el desarrollo de los leiomiomas, induciendo la proliferación y la deposición de matriz (Qiang *et al.*, 2014), actuar sobre la modulación de sus vías de señalización, representa una posibilidad para terapias farmacológicas. Así, el acetato de Ulipristal (UPA) es un modulador selectivo del receptor de progesterona (SPRM) que potencialmente modula la actividad proapoptótica y proliferativa de las células leiomiomatosas (Bourdet *et al.*, 2015). Desde 2012, el UPA ha sido uno de los fármacos más utilizados como tratamiento preoperatorio para facilitar la cirugía. Su acción está condicionada por su capacidad de unión a los receptores de progesterona (RP). Esta unión provoca el inicio de una cascada de mediadores que tiene efecto sobre la MEC y que finalmente inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis en el fibroma (Lewis *et al.*, 2018; Rabe *et al.*, 2018). El papel de estos fármacos en la reducción del volumen de los leiomiomas ha sido ampliamente documentado y es por ello que, en las últimas décadas, se ha aceptado el uso de este fármaco para facilitar su extracción quirúrgica o en aquellos casos que se desea preservar la fertilidad.

Aunque todavía no se conoce el mecanismo por el cual el tratamiento con UPA favorece la reducción del tamaño de los leiomiomas, algunas investigaciones tanto *in vitro* (Morikawa *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008) como *in vivo* (Courtoy *et al.*, 2015) han documentado un aumento de la expresión y actividad de MMP2, favoreciendo la degradación de MEC (sobre todo tras una exposición prolongada al fármaco), así como una reducción en la expresión de colágeno I (Cox *et al.*, 2018). Estos autores, si bien describen diferencias en la expresión de colágeno por medio de coloraciones específicas, no encuentran diferencias significativas inmunohistoquímicamente.

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la importancia de la matriz extracelular en el crecimiento de los leiomiomas, y los escasos trabajos que demuestren histológica o cuantitativamente la mayor cantidad de dicha matriz en relación con el miometrio adyacente, el objetivo general de este trabajo consistió en la caracterización de la MEC en leiomioma y miometrio adyacente. Esto se hizo desde un punto de vista histológico y mediante el análisis cuantitativo y cualitativo tanto de mujeres sin ningún tipo de tratamiento como con muestras procedentes de mujeres que habían sido tratadas con UPA con el fin de compararlas.

Para ello nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la presencia diferencial de matriz extracelular en leiomioma y miometrio, tanto en pacientes sin tratamiento como en pacientes tratadas con ulipristal, mediante técnicas de coloración específica y análisis de áreas.
2. Estudiar inmunohistoquímicamente la presencia y distribución celular de colágeno I en leiomioma y miometrio adyacente de pacientes sin tratamiento y en pacientes tratadas con UPA.
3. Analizar inmunohistoquímicamente la presencia y distribución de la enzima MMP2 en leiomioma y miometrio adyacente de pacientes sin tratamiento y en pacientes tratadas con UPA.
4. Analizar la presencia de células cebadas en leiomioma respecto al miometrio en pacientes sin tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

Para la realización de este trabajo se utilizaron muestras de archivo de leiomioma y miometrio adyacente provenientes de pacientes que habían sido sometidas a una miomectomía o histerectomía por leiomiomas sintomáticos en el Hospital Universitario de Canarias (HUC), y después del consentimiento informado de las mismas.

Se estudiaron en total 23 muestras, de las cuales 16 fueron pareadas (leiomioma y miometrio adyacente de 8 pacientes).

De las 16 muestras pareadas, 6 pertenecían a pacientes sin tratamiento, tomadas como control, y 10 pertenecían a pacientes tratadas con acetato de ulipristal; la pauta de tratamiento fue de 5 mg administrados durante tres meses previa cirugía. Además de las muestras pareadas, se analizaron 7 muestras de leiomiomas de diferentes tipos incluyendo un leiomioma de crecimiento rápido. El trabajo está encuadrado en parte, en un proyecto de investigación que ha obtenido previamente la aprobación del Comité Ético del HUC.

MÉTODOS

1. PROCESADO DE LAS MUESTRAS

A. Fijación e inclusión

Todas las muestras fueron fijadas en formol acuoso al 10% e incluidas en parafina según el protocolo llevado a cabo en los laboratorios de Anatomía Patológica y Biología Celular.

PROTOCOLO DE INCLUSIÓN EN PARAFINA

<u>Deshidratación</u> Tras la fijación mediante formol acuoso, se lleva a cabo una deshidratación que permitiese posteriormente a la parafina penetrar en el tejido. Este paso consiste en sumergir las muestras en distintos líquidos anhidridos que sean miscibles en agua, alcoholes de graduación creciente, durante determinados periodos de tiempo	Alcohol 90%	2x1 hora
	Alcohol 96%	3x1 hora
	Alcohol 100%	3x1 hora
	Alcohol 100% (tolueno 1:1)	45 minutos
<u>Aclarado</u> Impregnación de la parafina por un disolvente	Tolueno	45 minutos
<u>Penetración de la parafina</u> A continuación, se sumerge el tejido en la parafina líquida	Parafina I	3 horas
	Parafina II	2x 12 horas
<u>Realización del bloque</u> Finalmente, para realizar los bloques, se utilizan moldes metálicos y cassettes de plástico. Se cubrió el tejido a incluir con parafina líquida sobre el cassette y se delimitó con el molde. Una vez sólido, se desmoldo, quedando el bloque de parafina con el tejido unido al cassette, permitiendo el posterior enganche del bloque al microtomo		

Tabla 1. Protocolo de inclusión en parafina

B. Microtomía

Las muestras se cortaron a 5 μm de grosor utilizando un microtomo Thermo Shandon Finesse 325. El montaje de las secciones se realizó utilizando una disolución de albumina (0'5 ml de solución madre en 35 ml de agua destilada), en una placa calefactora a 37°C.

Los cortes se secaron en una estufa a 37°C durante al menos 24 horas. Una vez secos, antes de realizar las distintas técnicas sobre ellos, fueron desparafinados y rehidratados.

C. Desparafinado e hidratación

DESPARAFINADO E HIDRATACIÓN

Tratamiento (Reactivos)	Tiempo
1. Toluol I	15 minutos
2. Toluol II	15 minutos
3. Toluol III	15 minutos
4. Alcohol 100%	5 minutos
5. Alcohol 96%	5 minutos
6. Alcohol 70%	5 minutos
7. Agua destilada	5 minutos
8. Agua destilada	5 minutos

Tabla 2. Protocolo de desparafinado e hidratación

D. Deshidratación y montaje

Una vez desarrolladas las técnicas de coloración se procedió a la deshidratación y el montaje con Eukit de las muestras.

DESHIDRATACIÓN Y MONTAJE

Reactivos	Tiempo
1. Alcohol 96%	1 minuto
2. Alcohol 100% I	4 minutos
3. Alcohol 100% II	4 minutos
4. Toluol I	4 minutos
5. Toluol II	4 minutos
Montaje con Eukit	

Tabla 3. Protocolo de deshidratación y montaje

2. TINCIONES HISTOLÓGICAS

Para estudiar las características histológicas se utilizaron las siguientes técnicas de coloración:

A. Tinción topográfica con hematoxilina-eritrosina.

Esta tinción nos permite obtener una imagen general del tejido ya que tiñe todas las estructuras de este. Nos permite diferenciar fácilmente los núcleos, teñidos de azul por la hematoxilina (basófila), del citoplasma y las estructuras extracelulares, que adoptan el color rosado de la eritrosina.

B. Tinción con Azul de Toluidina

Esta tinción fue utilizada para la localización de células cebadas por sus propiedades metacromáticas

C. Tinción tricrómica de Masson

Esta tinción permite observar específicamente las fibras de colágeno además de teñir el resto de las estructuras tisulares. Como su nombre indica, utiliza tres colorantes; la hematoxilina de Weigert, tiñe los núcleos celulares, la fucsina ácida, un colorante aniónico, tiñe el citoplasma celular y, por último, el azul de anilina que tiñe las fibras de colágeno. Mediante esta técnica podemos ver específicamente la distribución de la MEC.

D. Contrateñido de núcleos con Hematoxilina

Tras la realización de la técnica inmunohistoquímica (IHQ) que se detallará en el próximo apartado, con el fin de mejorar y facilitar su observación e interpretación, se realizó un contrateñido de los núcleos usando hematoxilina modificada.

a) TINCIÓN HEMATOXILINA-ERITROSINA

Reactivos	Tiempo
1. Hematoxilina de Harris	2 minutos
2. Agua corriente	5 minutos
3. Agua destilada	2 minutos
4. Eritrosina al 1%	1-2 minutos
5. Lavado rápido en agua destilada	

b) TINCIÓN AZUL DE TOLUIDINA

Reactivos	Tiempo
1. Azul de Toluidina al 0,5%	4 minutos
2. Agua destilada	1 minuto

Tabla 4. Protocolo tinción Hematoxilina-Eritrosina

Tabla 5. Protocolo tinción Azul de Toluidina

c) TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON

Reactivos	Tiempo
Desparafinado e hidratación	
1. Solución de Bouin 75 ml de solución acuosa saturada de ácido pícrico, 25 ml de formol (37-40%) y 5 ml de ácido acético glacial.	20 horas
2. Agua corriente	5 minutos
3. Agua destilada	1 minuto
4. Hematoxilina férrica de Weigert	10 minutos
5. Agua corriente	5 minutos
6. Agua destilada	1 minuto
7. Solución Biebrich escarlata-fucsina ácida 90 ml de Escarlata de Biebrich al 1% ;9 ml de fucsina ácida al 1%; 1 ml de ácido acético glacial.	1 minuto
8. Lavado rápido en agua destilada	
9. Ácido fosfofúngstico- ácido fosfomolibdico al 5%	2 minutos
10. Lavado rápido en agua destilada	
11. Azul de Anilina al 2,5%	5 minutos
12. Agua destilada	1 minuto
13. Ácido acético glacial al 1%	4 minutos

Tabla 6. Protocolo tinción de Masson

3. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Este método permite la detección de proteínas/péptidos de interés en el tejido por medio de una reacción antígeno-anticuerpo, usando anticuerpos que reconocen específicamente el antígeno deseado.

Se ha utilizado el método inmunoenzimático indirecto, mediante anticuerpos secundarios marcados con el complejo biotina-estreptavidina conjugada con peroxidasa. El anticuerpo primario, se une de manera específica pero indetectable a su antígeno mientras que el anticuerpo secundario que se encuentra biotinilado se asociará al anticuerpo primario. En un segundo paso, la estreptavidina

conjugada con peroxidasa, formará un complejo con la biotina. La enzima peroxidasa al ser incubada con su sustrato, el peróxido de hidrógeno lo reducirá donando sus electrones a un revelador cromógeno, en este caso la diaminobencidina (DAB), que cambiará a un color marrón al oxidarse y precipitará haciendo visible la presencia del anticuerpo.

A. Protocolo

TECNICA INMUNOHISTOQUÍMICA

Reactivos	Tiempo
Desparafinado e hidratación	
1. Lavado con Tampón Tris 0,05M (TBS); Trizma Base 0.05M, NaCl (0.9%) pH 7.4.	10 minutos
2. Desenmascaramiento. En tampón citrato sódico (pH=6) a 90°C	5 minutos
3. Lavado con Tampón Tris	10 minutos
4. Lavado con Tampón Tris	10 minutos
5. Saturación de bloqueo con Disolución de Caseína al 0.5% Para evitar uniones inespecíficas	10 minutos
6. Lavado con Tampón Tris	10 minutos
7. Lavado con Tampón Tris	10 minutos
8. Lavado con Tampón Tris con Tritón al 0.2%	10 minutos
9. Anticuerpo primario diluido en Tampón Tris con Tritón al 0.2%	12 horas
10. Lavado rápido con Tampón Tris	
11. Lavado con Tampón Tris	10 minutos
12. Lavado con Tampón Tris	10 minutos
13. Lavado con Tampón Tris	10 minutos
14. Lavado con Tampón Tris con Tritón al 0,05%	10 minutos
15. Anticuerpo secundario biotinado diluido en Tampón Tris con Tritón al 0,05%	1 hora

16. Lavado con Tampón Tris	5 minutos
17. Lavado con Tampón Tris	5 minutos
18. Lavado con Tampón Tris	5 minutos
19. Lavado con Tampón Tris con Tritón al 0,05%	5 minutos
20. Estreptavidina marcada con peroxidasa en una dilución 1/1000 con Tampón Tris con Tritón al 0,05%	1 hora
21. Lavado con Tampón Tris	5 minutos
22. Lavado con Tampón Tris	5 minutos
23. Lavado con Tampón Tris-Clorhídrico	5 minutos
24. Revelado (DAB)	
25. Lavado con Tampón Tris-Clorhídrico	2 minutos
26. Lavado con Tampón Tris	5 minutos
27. Lavado con Tampón Tris	5 minutos
28. Lavado con Tampón Tris	5 minutos
29. Contrateñido	
30. Deshidratación y montaje	

Tabla 7. Protocolo IHQ

B. Anticuerpos primarios

Se utilizaron antisueros policlonales comerciales:

- Anti-colágeno I. Desarrollado en ratón; dilución 1/100 Tris-Tritón al 0,2%
- Anti-metaloproteinasa-2. Desarrollado en ratón; dilución 1/100 Tris-Tritón al 0,2%

C. Anticuerpos secundarios

- Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG *Jackson Immuno Resear.* Desarrollado en cabra; dilución 1/1000 en tampón Tris-Tritón al 0,05 %
- Estreptavidina marcada con peroxidasa; dilución 1/1000 en tampón Tris-Tritón al 0,05 %

D. Revelador

Como ya se ha comentado, el revelador utilizado fue una disolución al 0,05% de DAB y al 0,01% de peróxido de hidrógeno en tampón Tris-clorhídrico, que se dejó actuar sobre la muestra durante 1-5 minutos hasta que se observó la coloración marrón característica.

La especificidad de la inmunorreacción se comprobó realizando un control negativo sustituyendo el antisuero específico por tampón.

4. OBSERVACIÓN DE MUESTRAS

La observación de las muestras se realizó mediante el microscopio óptico Leica DM4000B (Leica Microsystems, Germany). Para la captura de imágenes se usó una cámara digital Leica DFC300FX, acopladas al software Leica Q-Win (Leica, Barcelona, España) para el tratamiento y análisis de imagen.

5. ANÁLISIS CUANTITATIVO

A. Cuantificación de células cebadas

Con el fin de comparar el número de células cebadas del leiomioma con el miometrio adyacente, se realizó un conteo celular mediante el software de procesamiento de imágenes ImageJ (ImageJ.1 64-bit Java 1.8.0_112).

Se tomaron 6 fotografías a 40x de 6 zonas distintas de cada muestra elegidas al azar, procurando que no hubiera superposición. De estas fotografías se contó tanto el número de células cebadas como el número total de muestras para así conocer la proporción de las primeras.

Los datos obtenidos se compararon mediante análisis de la varianza de una vía (ANOVA I) para estimar la significación de los resultados. Para ello se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS Statistic 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, E.E.U.U)

B. Cálculo de áreas

Mediante el software ImageJ se llevó a cabo una estimación del porcentaje de matriz extracelular en muestras de leiomioma y miometrio adyacente. En este caso, se compararon los dos tejidos tanto en pacientes sin tratamiento como en pacientes tratadas con UPA.

Para ello se tomaron fotografías de al menos 4 campos a 40x de cada una de las muestras. La elección de los campos fue aleatoria evitando que hubiese superposición de zonas.

Los datos obtenidos se sometieron a tratamiento estadístico con el software IBM SPSS 25.0, mediante un test ANOVA I, para poner de manifiesto el nivel de significación de los resultados.

RESULTADOS

1. Análisis histológico y cuantitativo de la matriz extracelular en leiomioma y miometrio pareado

A. Histológicamente

A.1. En pacientes sin tratamiento

Los resultados indican que existen diferencias tanto en la distribución como en la abundancia de MEC entre el tejido tumoral y el tejido miometrial adyacente.

La tinción de Masson nos muestra que histológicamente el miometrio está constituido por grandes paquetes de células del músculo liso rodeados de MEC (Figura 4. A). En este tejido también se observó la presencia de células embebidas en la matriz, posiblemente fibroblastos. Por otra parte, en el leiomioma, predominan las zonas en las que las células musculares no forman paquetes, sino que se encuentran aisladas o, en menor medida, formando parte de pequeños grupos celulares que muestran un aspecto esponjiforme (Figura 4. B)

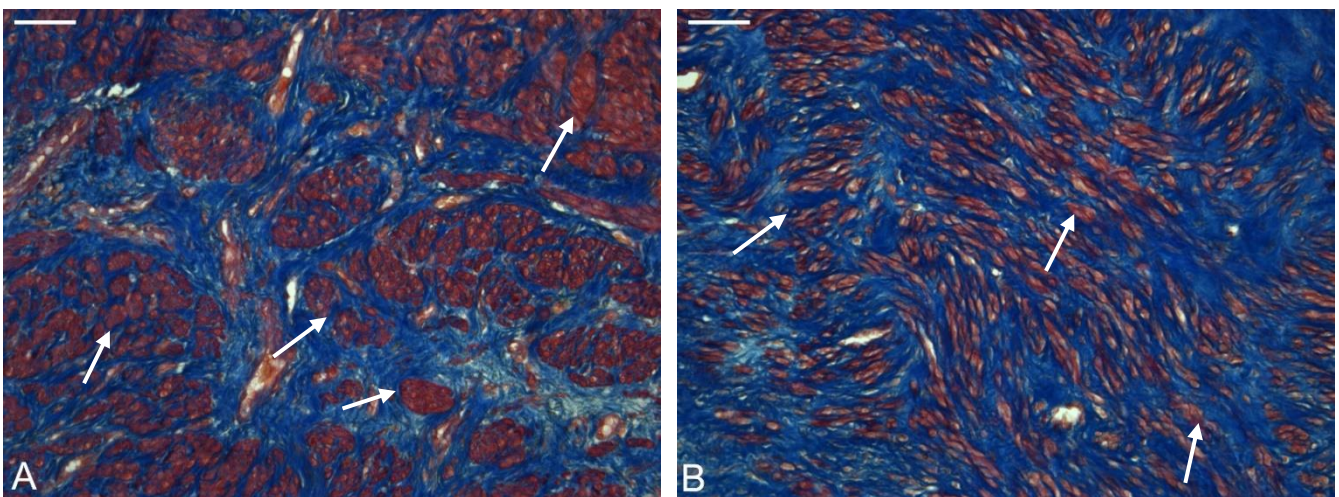


Figura 4. Distribución de la MEC en miometrio (A) y leiomioma (B) de pacientes sin tratamiento. A y B: MEC en azul; Células en rojo **A.** Células musculares en paquetes grandes y bien definidos (flechas) rodeados de MEC **B.** Grupos pequeños y células aisladas (flechas) rodeadas de MEC. Tinción tricrómica de Masson. Barra de escala: 100 μ m.

A.2. En pacientes tratadas con UPA

En el tejido de pacientes tratadas con UPA durante 12 semanas, se observaron diferencias evidentes respecto a las pacientes que no recibieron ningún tipo de tratamiento.

El tejido miometrial tras el tratamiento con UPA muestra, además de los paquetes de células musculares (como los observados en condiciones normales), zonas con elevada densidad celular y apariencia desorganizada (Figura 5. A). Por su parte, el tejido tumoral muestra una estructura similar a la observada en las pacientes no tratadas, con células musculares aisladas o en pequeños grupos rodeados de matriz (Figura 5. B).

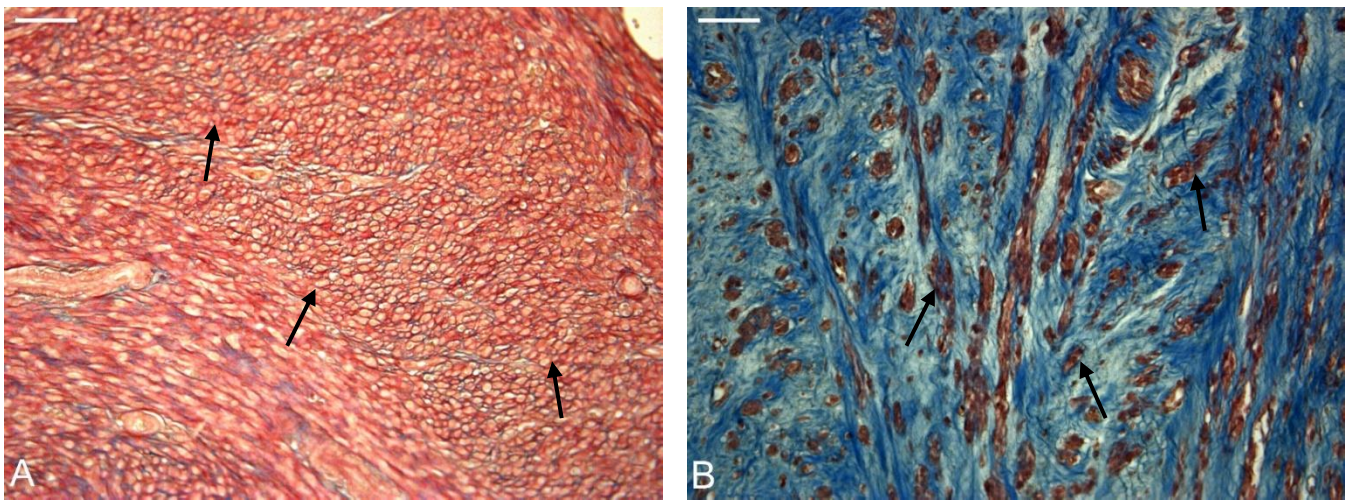
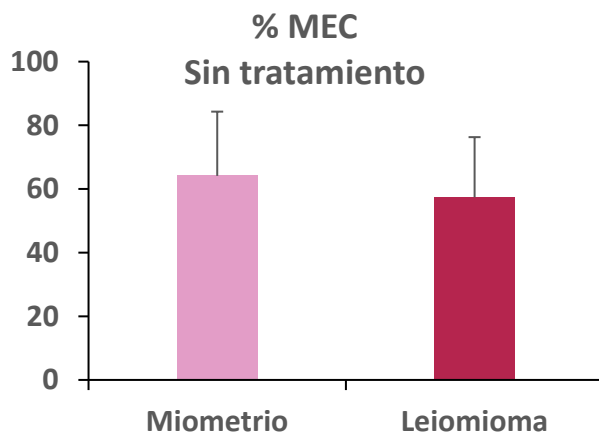


Figura 5. Distribución de la MEC en miometrio (A) y leiomioma (B) de pacientes tratadas con UPA. A y B: MEC en azul; Células en rojo. A. Células musculares no agrupadas (flechas) con reducida cantidad de MEC. B. Grupos pequeños y células aisladas (flechas) rodeadas de MEC. Tinción tricrómica de Masson. Barra de escala: 100 µm.

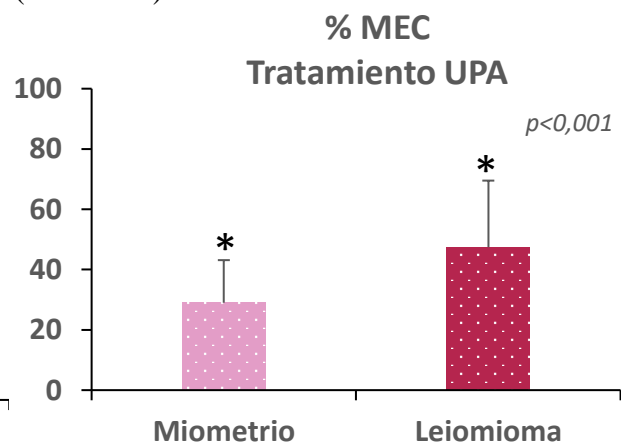
B. Cuantitativamente

B.1. En pacientes sin tratamiento

En cuanto a la cuantificación de los porcentajes de MEC, los resultados mostraron que existe una mayor cantidad de MEC en el miometrio adyacente frente al leiomioma; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Gráfica 1.).



Gráfica 1. Porcentaje de MEC en miometrio, rosa pálido, y leiomioma, rosa oscuro; sin tratamiento.

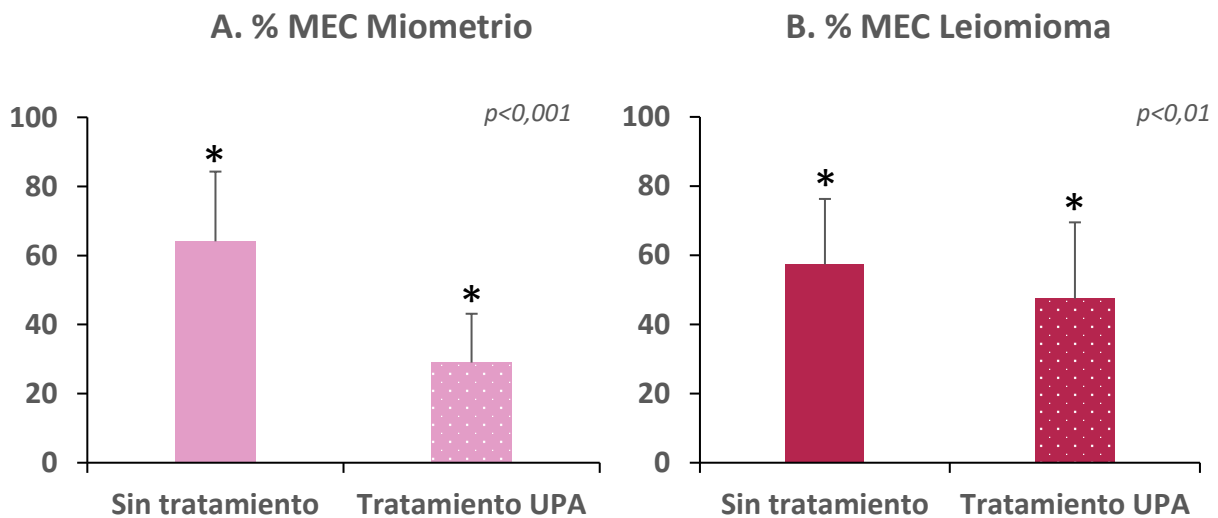


Gráfica 2. Porcentaje de MEC en miometrio, rosa pálido, y leiomioma, rosa oscuro; en pacientes tratadas con UPA.

B.2. En pacientes tratadas con UPA

En las pacientes tratadas con UPA, se observó una cantidad mayor y estadísticamente significativa de MEC en el tejido leiomiomatoso frente al miometrio pareado (Gráfica 2).

Por otro lado, al realizar un análisis comparativo entre la MEC del tejido leiomiomatoso de pacientes sin tratamiento y de pacientes tratadas con UPA, se observó que, tras el tratamiento, los leiomiomas mostraban un 10,3% menos de MEC que los tumores no tratados (Gráfica 3. A). Asimismo, en el miometrio, se observó una reducción de MEC del 35,1 % después del tratamiento con UPA (Gráfica 3. B).



Gráfica 3. Porcentaje de MEC en miometrio (A) y leiomioma (B), en muestras sin tratamiento y tratadas.

2. Análisis inmunohistoquímico en leiomioma y miometrio pareado

A. Inmunodetección de colágeno I

A.1. En pacientes sin tratamiento

El análisis inmunohistoquímico muestra que esta proteína se expresa diferencialmente en el miometrio y en el tejido leiomiomatoso.

En el miometrio, se observaron células inmunorreactivas para el colágeno en el tejido conjuntivo. La inmunorreacción fue tanto nuclear como citoplasmática (Figura 6.). Además, también se observó inmunorreacción en la MEC.

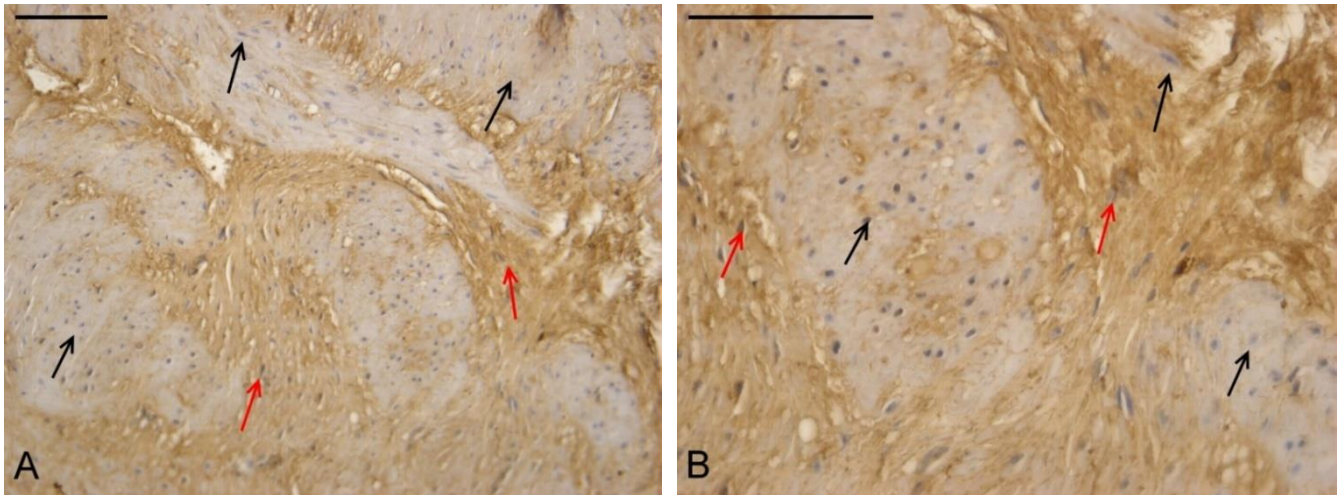


Figura 6. Distribución y localización del colágeno I en miometrio sin tratamiento (A y B). No se observa presencia de colágeno en las células musculares (flechas negras). Sin embargo, la reacción es intensa en los fibroblastos (flechas rojas), tanto en el citoplasma como en el núcleo. Inmunorreacción de colágeno I en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 100 μ m.

En el tejido leiomiomatoso, además de los fibroblastos y la MEC, también fueron inmunorreactivas para el colágeno I las células musculares con inmunorreacción localizada en el citoplasma (Figura 7. A). La reacción fue especialmente abundante en las zonas de aspecto esponjiforme, en las cuales también se observaron núcleos inmunorreactivos (Figura 7. B; inserto).

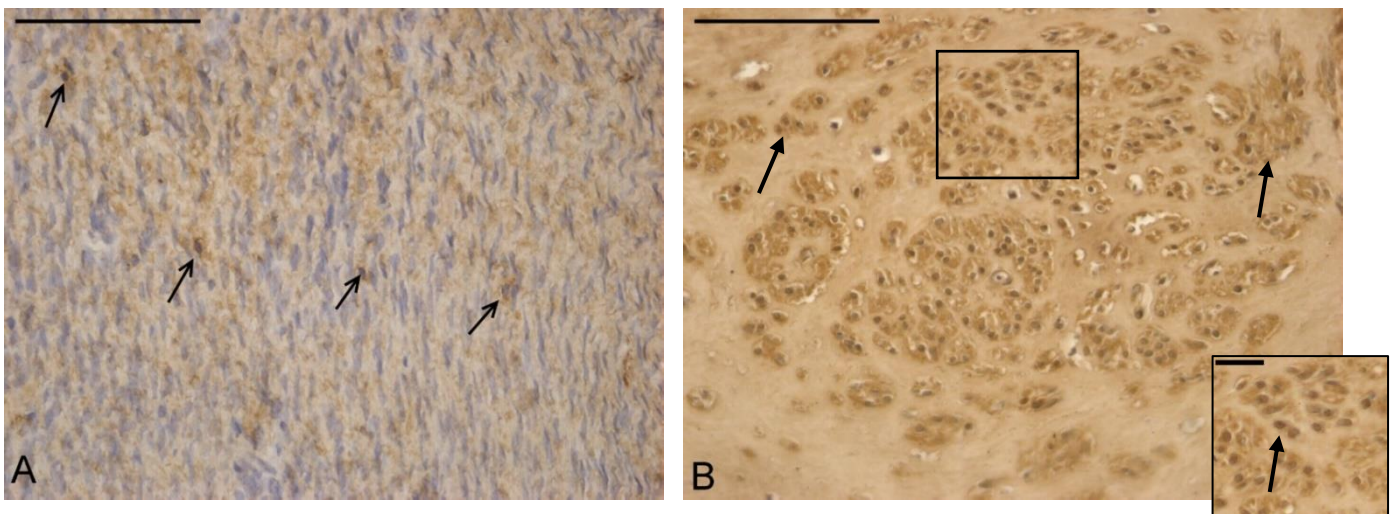


Figura 7. Distribución y localización del colágeno I en leiomioma sin tratamiento (A y B). A. Se observa presencia de colágeno I en el citoplasma de células musculares (flechas). B. Células musculares agrupadas con elevada presencia de colágeno en citoplasma y núcleo (flechas) (inserto). Inmunorreacción de colágeno I en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 100 μ m. Barra de escala del inserto: 20 μ m

A.2. En pacientes tratadas con UPA

Después del tratamiento con UPA, el tejido miometrial difirió notablemente en relación con lo observado en pacientes no tratadas, hallándose células musculares inmunorreactivas para el

colágeno con localización citoplasmáticas. En contraposición, no se observaron diferencias en la inmunorreactividad para esta proteína en el tejido tumoral (Figura 8.).

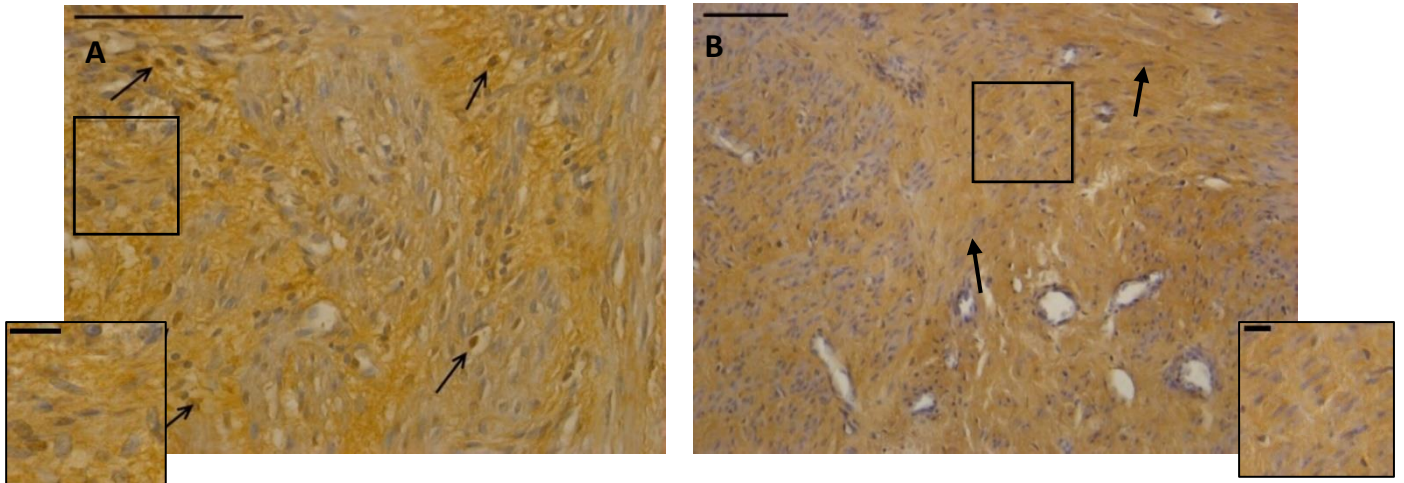


Figura 8. Distribución y localización del colágeno I miometrio (A) y leiomioma (B) tras el tratamiento con UPA.
A. Colágeno en citoplasma de células musculares (inserto); Fibroblastos con colágeno en núcleo y citoplasma (flechas). **B.** Colágeno en citoplasma de células musculares (flechas e inserto). Inmunorreacción de colágeno I en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 100 µm. Barra de escala del inserto: 20 µm

B. Inmunodetección de metaloproteínasa-2

B.1. En pacientes sin tratamiento

Los resultados de la inmunodetección de MMP2, evidenciaron la presencia de esta enzima en las células musculares del tejido miometrial y tumoral; así como su ausencia en la MEC.

En el miometrio se observó una inmunorreactividad desigual en el tejido, con zonas y paquetes de células musculares con reacción intensa y zonas con reacción débil o nula (Figura 10. A). En el caso del leiomioma se vio una mayor cantidad de la proteína en relación con el miometrio, especialmente en las áreas con agrupaciones espongiiformes. (Figura 10. B; Figura 11.).

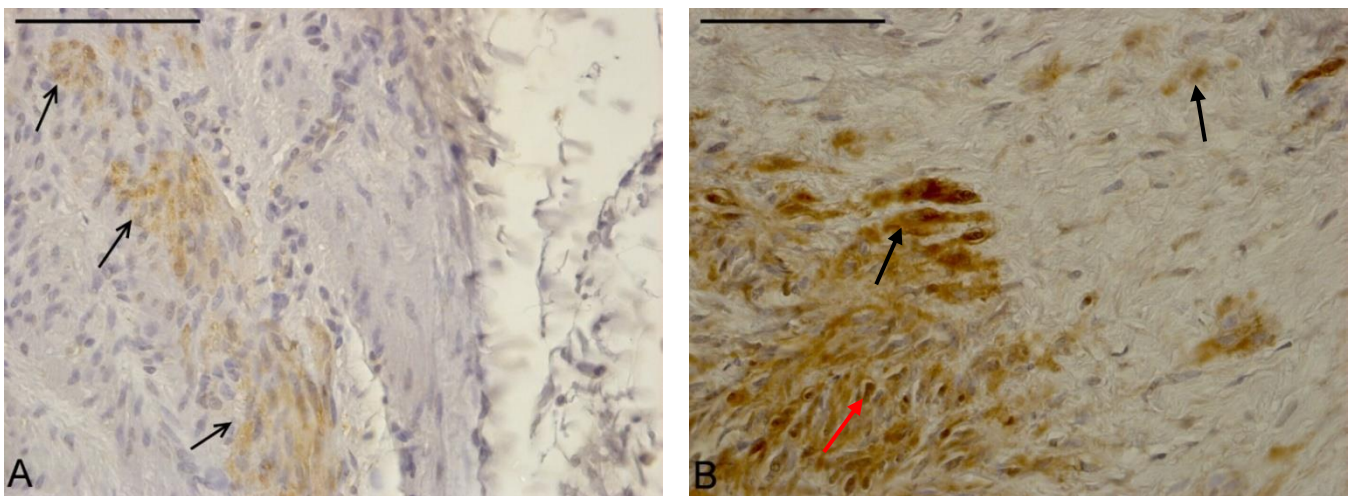


Figura 10. Distribución y localización de MMP2 en miometrio (A) y leiomioma (B) en pacientes sin tratamiento. En ambos casos la reacción se da en el interior de las células. **A.** Reacción débil en el citoplasma celular (flechas negras) **B.** Inmunorreacción intensa (flechas negras); Inmunorreacción en el núcleo (flechas rojas). Inmunorreacción de metaloproteínasa-2 en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 100 µm.

El tejido leiomiomatoso tras el tratamiento con UPA, no mostro diferencias respecto a lo observado en las muestras no tratadas. Las principales diferencias se observaron en el miometrio tratado, el cual presentó una inmunorreacción escasa localizada en células aisladas (Figura 12).

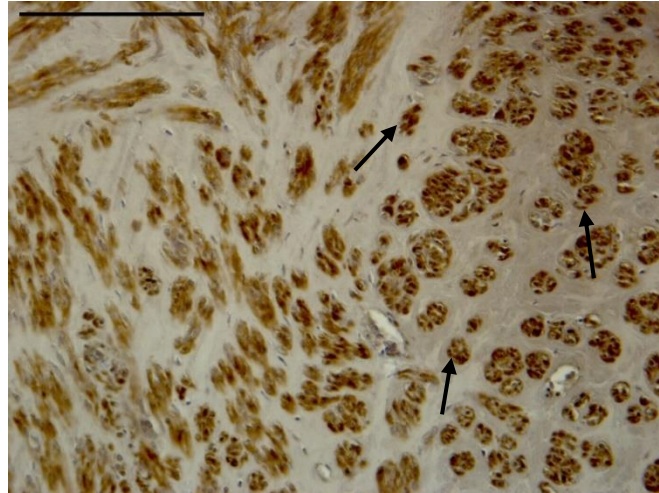


Figura 11. Distribución y localización de MMP2 en leiomioma sin tratamiento. Reacción intensa de MMP2 en paquetes de células musculares de aspecto esponjiforme (flechas). Inmunorreacción de metaloproteinasa-2 en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 100 μ m.

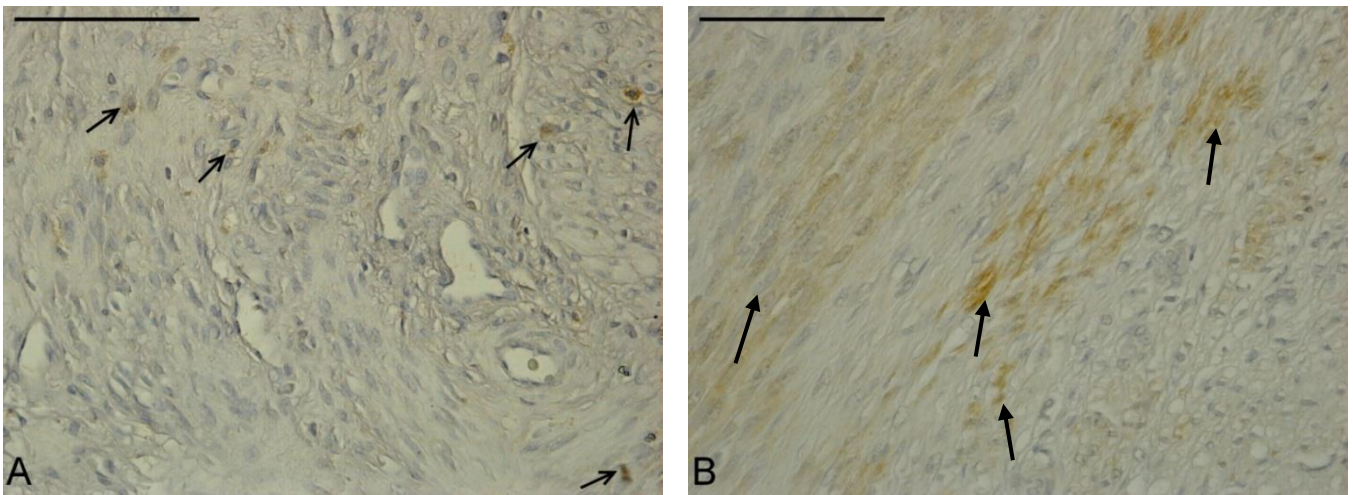
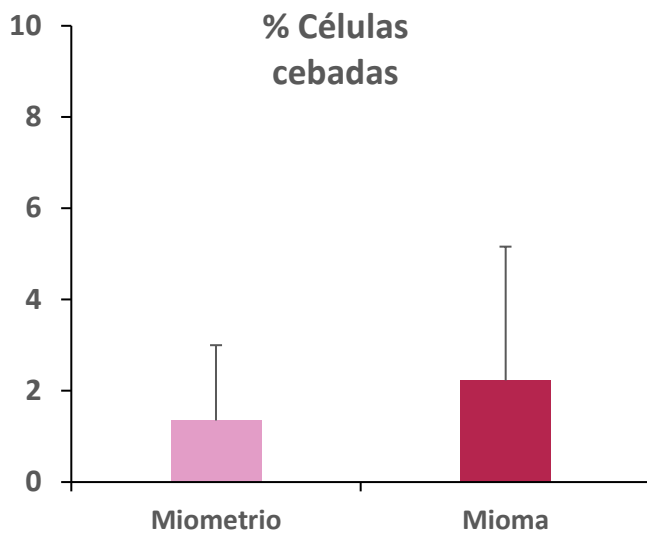


Figura 12. Distribución y localización de MMP2 en miometrio (A) y leiomioma (B) en pacientes tratadas con UPA. A. Células aisladas con expresión de MMP2 (flechas negras). B. Reacción más intensa y abundante de MMP2. Inmunorreacción de metaloproteinasa-2 en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 100 μ m.

3. Análisis de la presencia de células cebadas en leiomioma respecto del miometrio en pacientes sin tratamiento.

El análisis tanto cualitativo como cuantitativo de la presencia de células cebadas en miometrio y leiomioma mostró diferencias, aunque estas no fueron significativas (Gráfica 4.). De forma general

se observan más células cebadas en el tejido leiomiomatoso, aunque existe una gran variabilidad entre muestras.



Gráfica 4. Porcentaje de células cebadas de miometrio, rosa pálido, y leiomioma, rosa oscuro.

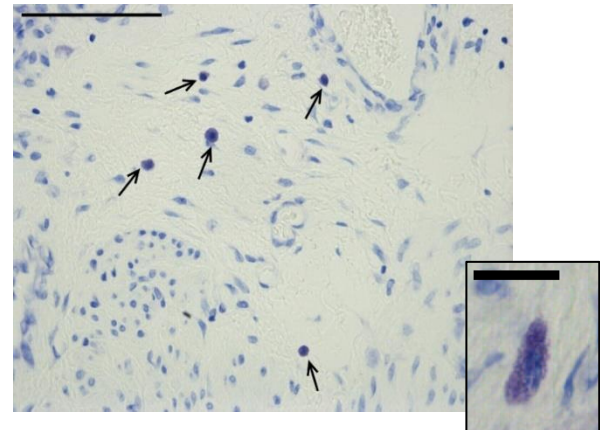


Figura 13. Células cebadas en miometrio (flechas). Tinción Azul de Toluidina. Barra de escala: 100 µm. Barra de escala del inserto: 20 µm.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo, ponen en manifiesto los siguientes hallazgos: en primer lugar, que si bien hubo diferencias en lo que respecta a la distribución de la MEC del tejido leiomiomatoso y miometrial, las diferencias no fueron ni histológica ni cuantitativamente significativas; en segundo lugar, que hubo diferencias notables en la localización del colágeno I y la MMP2 en las muestras pareadas de miometrio y leiomioma; y, en tercer lugar, que no fue significativa la diferencia entre el tejido tumoral y el miometrio adyacente en cuanto al número de células cebadas.

Por otro lado, los resultados obtenidos de las muestras de pacientes tratadas con UPA evidenciaron un efecto distinto del medicamento sobre las características histológicas de leiomioma y miometrio en relación con las muestras no tratadas.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la presencia de una mayor cantidad de MEC en el tejido leiomiomatoso en comparación con el tejido miometrial, considerándose este hecho una de las características distintivas de los leiomiomas (Malik *et al.*, 2012). En el presente trabajo, el análisis cuantitativo global e individual no mostró diferencias significativas en la abundancia de MEC entre leiomioma y miometrio. En lo que respecta a los resultados individuales, al comparar

las muestras pareadas, observamos una mayor, pero no significativa cantidad de MEC en el leiomioma. No obstante, aunque no fueron estadísticamente significativos, los resultados globales mostraron un mayor porcentaje de MEC en miometrio frente a leiomioma. Este resultado se contrapone a la afirmación de que existe una acumulación excesiva de MEC en el leiomioma respecto al miometrio (Arici y Sozen, 2000).

Por otro lado, el análisis histológico mostró diferencias en la disposición de la MEC y en la organización de las células del músculo liso. En el miometrio se observaron generalmente paquetes de células musculares bien definidos rodeados de MEC. Mientras que, en el leiomioma, predominaron las zonas con células aisladas y/o pequeños grupos de células embebidos en el tejido conjuntivo. Estas zonas observadas en los leiomiomas pueden estar en relación con lo planteado por Flake *et al.* (2013 y 2018); los cuales propusieron que tales diferencias podrían ser consecuencia de una transformación fenotípica de los miocitos del leiomioma (Flake *et al.*, 2018; Flake *et al.*, 2013). En base a su hipótesis, dicha transformación provocaría el aumento de la síntesis de componentes de la MEC por parte de estas células, teniendo como resultado el depósito de matriz a su alrededor, y su consecuente aislamiento.

Como componente principal de la MEC, la presencia de colágeno I ha sido ampliamente documentada en múltiples publicaciones haciendo siempre alusión a su mayor abundancia en leiomioma respecto al tejido miometrial (Iwahashi *et al.*, 2011; Leppert *et al.*, 2006; Malik *et al.*, 2010). A pesar de ello, nuestros resultados del análisis inmunohistoquímico no mostraron una abundancia diferencial de esta glucoproteína en leiomioma y miometrio.

El presente estudio muestra por primera vez la distribución celular y subcelular del colágeno I en estos tejidos, encontrando que, a nivel celular, los resultados de nuestro trabajo muestran evidencias sobre la diferente localización de la inmunorreacción en el tejido miometrial en relación con el leiomiomatoso. En el miometrio se observó reacción en la MEC del tejido conjuntivo, así como en los fibroblastos, mientras que las células musculares resultaron inmunonegativas. Por el contrario, en el leiomioma las células musculares fueron inmunopositivas con inmunorreacción fundamentalmente citoplasmática y en ocasiones también nuclear. La presencia de colágeno I en el interior de las células musculares del leiomioma sugiere la síntesis de esta proteína por parte de las mismas.

Las metaloproteinasas, junto con sus inhibidores juegan un papel fundamental en el desarrollo de los fibromas. Los resultados del presente trabajo en relación con la MMP2 muestran un incremento de la inmunorreacción en células del leiomioma con localización citoplasmática y nuclear. Esto concuerda con los hallazgos de numerosas investigaciones que indican un aumento de expresión de

esta proteína en el tejido tumoral (Korompelis *et al.*, 2015; Wolańska *et al.*, 2004), que se puede interpretar como una desregulación de los procesos de remodelación de la MEC.

La inmunorreacción fue especialmente intensa tanto para el colágeno I como para la MMP2 en el citoplasma y núcleo de las células musculares de algunas zonas de leiomioma intramural y submucoso. Estas zonas se caracterizan por la presencia de grupos de células que, junto con la MEC que los rodeaba, presentaban un aspecto esponjiforme. Agrupaciones similares fueron descritas como uno de los estadios finales del desarrollo de leiomiomas por Flake *et al.* (2013, 2018). Según estos investigadores, estas zonas esponjiformes se observan cuando existe una atrofia de las células musculares con una síntesis aumentada de elementos de la MEC por parte de estas. El aislamiento que provoca la deposición de dichos componentes a su alrededor provoca isquemia y consecuentemente la muerte celular, dejando huecos en la matriz que le otorgan ese aspecto de esponja. Aunque en este estudio se pueden ver zonas con lo que podría ser el estadio anterior a la muerte celular (con síntesis amplificada de proteínas de la matriz), en ningún caso se observaron células muertas o huecos.

En la actualidad, numerosos estudios indican la implicación de las respuestas inflamatorias crónicas como desencadenantes de la formación de leiomiomas (Wynn, 2007). En 2016, Protic *et al.* estudiaron la presencia de células proinflamatorias como las células cebadas y los macrófagos en estos tejidos. Sus resultados mostraron una notable presencia de células cebadas en el tejido miometrial, sobre todo en el miometrio adyacente al leiomioma, pero con una gran variabilidad entre muestras. También observaron que en ciertos tipos de leiomioma la presencia de estas células era más abundante.

En lo que respecta a nuestros resultados, el análisis de las células cebadas mostró la gran variabilidad existente entre las distintas muestras. Esto se reflejó en el análisis cuantitativo que no resultó ser estadísticamente significativo al comparar el miometrio con el leiomioma a pesar de la aparente diferencia entre ambos tejidos. De acuerdo a la investigación de Protic *et al.* (2016), la presencia diferencial de las células cebadas en las muestras analizadas podría deberse al tipo de leiomioma; o a la distinta fase del desarrollo de estos tumores (Flake *et al.*, 2013). En este sentido, nuestros resultados mostraron una mayor cantidad de células cebadas en el tejido miometrial de las pacientes con leiomiomas intramurales y subserosos; y en el tejido leiomiomatoso cuando el leiomioma fue submucoso. La abundancia de estas células, capaces de liberar factores proinflamatorios en el miometrio, sugiere la existencia en este tejido de una desregulación en la homeostasis de la MEC que puede crear susceptibilidad al desarrollo de nuevos leiomiomas o favorecer el crecimiento de los ya existentes.

Dada la importancia de la progesterona en el desarrollo de los leiomiomas (Patel *et al.*, 2015) tanto a nivel de proliferación celular como de deposición de MEC, numerosas investigaciones han centrado sus esfuerzos en desarrollar fármacos moduladores de sus vías de señalización, moduladores selectivos de receptores de progesterona.

Entre este tipo de fármacos, el más reciente y ampliamente utilizado es el UPA, un modulador de los receptores de progesterona que según numerosos estudios reduce el volumen de los leiomiomas (Donnez *et al.*, 2016; Ferrero *et al.*, 2018). Muchos estudios atribuyen la reducción del volumen de estos tumores tras el tratamiento con UPA, a la reducción de la MEC o de la cantidad de colágeno I sobre el leiomioma. Si bien los resultados del presente estudio indican una reducción del 10,3 % de MEC en leiomiomas tratados en comparación con los no tratados; los resultados inmunohistoquímicos no mostraron menor presencia de colágeno en los leiomiomas tratados en comparación con los no tratados. Estos datos pueden ser debidos al corto periodo de tratamiento (Courtoy *et al.*, 2015) además de al distinto comportamiento de los leiomiomas que, incluso perteneciendo a una misma paciente, pueden generar distintas respuestas al fármaco. En cuanto a la MMP2, aunque los escasos estudios *in vivo* muestran el aumento de su expresión como consecuencia del tratamiento con UPA (Courtoy *et al.*, 2015; Cox *et al.*, 2018; Shin *et al.*, 2018), en nuestro estudio el tejido leiomiomatoso tratado no mostró una inmunorreactividad diferencial en relación con el tejido sin tratamiento.

Por otro lado, este trabajo pone de manifiesto que el tratamiento con UPA ejerce un efecto diferencial en el tejido leiomiomatoso y miometrial adyacente. El porcentaje de MEC en el tejido miometrial se redujo un 35,1 % -frente al apenas 10% del leiomioma- en comparación con el tejido no tratado. Además, en el miometrio, se observó presencia de células musculares inmunorreactivas para el colágeno I y una reducción de la inmunorreactividad del tejido a la MMP2 en relación con el miometrio de pacientes sin tratamiento. Con estas evidencias se puede interpretar que incluso a pesar de la reducción del porcentaje de MEC y del volumen de los leiomiomas, el efecto de este fármaco sobre el miometrio puede generar cierta susceptibilidad al desarrollo de nuevos leiomiomas o a su recidiva tras su extirpación.

A pesar de la enorme incidencia de los leiomiomas en la población y el efecto sobre la calidad de vida de millones de mujeres, hoy en día, todavía se desconocen las causas que los generan, así como los mecanismos implicados. Este hecho, llevó a Brüggmann *et al.* en 2018 a examinar la investigación a nivel global de los leiomiomas uterinos con el fin de valorar su eficacia. Este estudio mostró un gran aumento del número de publicaciones por año en las últimas 3 décadas. Entre los países más activos en la investigación de leiomiomas, encontramos a EE.UU. a la cabeza, con más

de 2000 publicaciones al año, seguido por Reino Unido, Alemania y Japón, con unas 400 publicaciones. España por su parte, no superó las 90 publicaciones anuales (Brüggmann *et al.*, 2018) Estos autores concluyeron que, a pesar de estos favorables datos, la investigación continúa siendo insuficiente. Tomando como base el presente trabajo y la bibliografía consultada, podemos deducir que la causa de la ineficacia de la investigación sobre los leiomiomas puede ser en gran medida las limitaciones que presentan los trabajos en este campo como, por ejemplo, el reducido número de muestras y su heterogeneidad, así como la falta de investigaciones que aúnen resultados moleculares con resultados histológicos y celulares.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se deducen las siguientes conclusiones:

1. Histológicamente, se observaron diferencias entre el leiomioma y el miometrio adyacente en cuanto a la organización del tejido muscular y distribución de la MEC.
2. Cuantitativamente no se observaron diferencias significativas entre la MEC del tejido leiomiomatoso y el miometrial.
3. La inmunorreacción para el colágeno I confirmó la similitud de la MEC entre el tejido leiomiomatoso y el miometrial. A nivel celular, sin embargo, la distribución de la inmunorreacción para el colágeno I mostró células musculares inmunorreactivas sólo en el tejido leiomiomatoso, con localización citoplasmática.
4. La inmunorreacción de MMP2 se observó en el citoplasma de las células musculares existiendo diferencias en su expresión entre el miometrio y el leiomioma, siendo mayor en este último.
5. El tratamiento con UPA provocó una reducción en la cantidad de MEC del leiomioma y miometrio respecto a los tejidos no tratados, siendo especialmente significativa en el tejido miometrial.
6. El tratamiento con UPA afectó a la expresión de colágeno I y MMP2 en el miometrio adyacente en relación con el tejido no tratado, mientras que apenas hubo cambios en el leiomioma. En el miometrio, se observó inmunorreacción citoplasmática para el colágeno en las células musculares y se redujo la inmunorreactividad para la MMP2.

7. El número de células cebadas no mostró diferencias significativas entre el tejido tumoral y el tejido miometrial; posiblemente debido a la variabilidad que existe entre los distintos tipos de leiomioma

CONCLUSIONS

1. Histologically, differences were observed between leiomyoma and adjacent myometrium in terms of muscle tissue organization and ECM distribution.
2. Quantitatively, there were not significant differences observed between ECM from the leiomyomatous tissue and myometrial tissue.
3. Immunoreaction for collagen I confirmed the similarity of the ECM between leiomyomatous and myometrial tissue. However, at a cellular level the distribution of the collagen I immunoreaction showed immunoreactive muscle cells in the leiomyomatous tissue with cytoplasmatic location.
4. Immunoreaction for MMP2 was observed in the muscle cell cytoplasm showing differences in expression between leiomyoma and myometrium, being higher in myometrium.
5. UPA treatment triggered a reduction in the amount of ECM in the leiomyoma and myometrium regarding untreated tissues, being especially significant in the myometrial tissue.
6. UPA treatment affected collagen I and MMP2 expression in the adjacent myometrium regarding the untreated tissue, meanwhile there was not any changes in leiomyoma. Cytoplasmatic immunoreaction for collagen was observed in the muscle cells of the myometrium and immunoreaction for MMP2 decreased.
7. The number of mast cells did not show significant differences between cancerous and myometrial tissue; possibly caused by the variability between the different types of leiomyomas.

BIBLIOGRAFÍA

- Arici, A., & Sozen, I. (2000). Transforming growth factor- β 3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. *Fertility and sterility*, 73(5), 1006-1011.
- Arleo, E. K., et al. (2015). Review of leiomyoma variants. *American journal of roentgenology*, 205(4), 912-921.
- Blake, R. E. (2007). Leiomyomata uteri: hormonal and molecular determinants of growth. *Journal of the National Medical Association*, 99(10), 1170.
- Bourdet, A. T., Luton, D., & Koskas, M. (2015). Clinical utility of ulipristal acetate for the treatment of uterine fibroids: current evidence. *International journal of women's health*, 7, 321.
- Brüggmann, D., et al. (2018). The uterine fibroid/myoma tumour: analysis of the global research architecture using density-equalizing mapping. *Reproductive biomedicine online*, 36(2), 227-238.
- Buttram Jr, V. C., & Reiter, R. C. (1981). Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology, and management. *Fertility and sterility*, 36(4), 433.
- Carrino, D. A., et al. (2012). Proteoglycans of uterine fibroids and keloid scars: similarity in their proteoglycan composition. *Biochemical Journal*, 443(2), 361-368.
- Courtoy, G. E., et al. (2015). In vivo mechanisms of uterine myoma volume reduction with ulipristal acetate treatment. *Fertility and sterility*, 104(2), 426-434. e421.
- Cox, J., et al. (2018). Ulipristal acetate and extracellular matrix production in human leiomyomas in vivo: a laboratory analysis of a randomized placebo controlled trial. *Reproductive Sciences*, 25(2), 198-206.
- Cramer, S. F., & Patel, A. (1990). The frequency of uterine leiomyomas. *American journal of clinical pathology*, 94(4), 435-438.
- Desmouliere, A., et al. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American journal of pathology*, 146(1), 56.
- Donnez, J., et al. (2016). The place of selective progesterone receptor modulators in myoma therapy. *Minerva ginecologica*, 68(3), 313.
- Feng, L., et al. (2017). Biochemical pathways and myometrial cell differentiation leading to nodule formation containing collagen and fibronectin. *Current Protein and Peptide Science*, 18(2), 155-166.
- Ferrero, S., Vellone, V. G., & Barra, F. (2018). Pharmacokinetic drug evaluation of ulipristal acetate for the treatment of uterine fibroids. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 14(1), 107-116.
- Flake, G. P., et al. (2018). The Life Cycle of the Uterine Fibroid Myocyte. *Current obstetrics and gynecology reports*, 7(2), 97-105.
- Flake, G. P., et al. (2013). The natural history of uterine leiomyomas: light and electron microscopic studies of fibroid phases, interstitial ischemia, inanisosis, and reclamation. *Obstetrics and gynecology international*, 2013.
- Gallagher, C. S., & Morton, C. C. (2016). *Genetic association studies in uterine fibroids: risk alleles presage the path to personalized therapies*. Paper presented at the Seminars in reproductive medicine.
- Herndon, C. N., et al. (2016). Global transcriptome abnormalities of the eutopic endometrium from women with adenomyosis. *Reproductive Sciences*, 23(10), 1289-1303.
- Islam, M. S., et al. (2014). Role of activin-A and myostatin and their signaling pathway in human myometrial and leiomyoma cell function. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(5), E775-E785.
- Islam, M. S., et al. (2018). Extracellular matrix in uterine leiomyoma pathogenesis: a potential target for future therapeutics. *Human reproduction update*, 24(1), 59-85.
- Islam, M. S., et al. (2013). Complex networks of multiple factors in the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Fertility and sterility*, 100(1), 178-193.
- Iwahashi, M., & Muragaki, Y. (2011). Increased type I and V collagen expression in uterine leiomyomas during the menstrual cycle. *Fertility and sterility*, 95(6), 2137-2139.

- Iwahashi, M., et al. (2011). Immunohistochemical analysis of collagen expression in uterine leiomyomata during the menstrual cycle. *ExpErimEntal and thErapEutic mEdicinE*, 2(2), 287-290.
- Korompelis, P., et al. (2015). Expression of vascular endothelial factor-A, gelatinases (MMP-2, MMP-9) and TIMP-1 in uterine leiomyomas. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 53(9), 1415-1424.
- Leppert, P. C., Catherino, W. H., & Segars, J. H. (2006). A new hypothesis about the origin of uterine fibroids based on gene expression profiling with microarrays. *American journal of obstetrics and gynecology*, 195(2), 415-420.
- Lewis, T. D., et al. (2018). A comprehensive review of the pharmacologic management of uterine leiomyoma. *BioMed research international*, 2018.
- Luo, N., et al. (2014). Estrogen-mediated activation of fibroblasts and its effects on the fibroid cell proliferation. *Translational Research*, 163(3), 232-241.
- Malik, M., et al. (2010). *Why leiomyomas are called fibroids: the central role of extracellular matrix in symptomatic women*. Paper presented at the Seminars in reproductive medicine.
- Malik, M., Segars, J., & Catherino, W. H. (2012). Integrin β 1 regulates leiomyoma cytoskeletal integrity and growth. *Matrix Biology*, 31(7-8), 389-397.
- Monleón, J., et al. (2018). Epidemiology of uterine myomas and clinical practice in Spain: An observational study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 226, 59-65.
- Morikawa, A., et al. (2008). Selective progesterone receptor modulator asoprisnil down-regulates collagen synthesis in cultured human uterine leiomyoma cells through up-regulating extracellular matrix metalloproteinase inducer. *Human Reproduction*, 23(4), 944-951.
- Patel, B., et al. (2015). Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. *Human reproduction update*, 21(2), 155-173.
- Powell, D., et al. (1999). Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 277(1), C1-C19.
- Protic, O., et al. (2016). Possible involvement of inflammatory/repair processes in the development of uterine fibroids. *Cell and tissue research*, 364(2), 415-427.
- Qiang, W., et al. (2014). Down-regulation of miR-29b is essential for pathogenesis of uterine leiomyoma. *Endocrinology*, 155(3), 663-669.
- Rabe, T., et al. (2018). Selective progesterone receptor modulators for the medical treatment of uterine fibroids with a focus on ulipristal acetate. *BioMed research international*, 2018.
- Serdar, E., & Balun, M. (2013). Uterine fibroids. *N Engl J Med*, 369, 1344-1355.
- Shin, S. J., et al. (2018). Ulipristal acetate induces cell cycle delay and remodeling of extracellular matrix. *International journal of molecular medicine*, 42(4), 1857-1864.
- Tomasek, J. J., et al. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(5), 349-363.
- Wang, Y., et al. (2015). Differential effects of tumor necrosis factor- α on matrix metalloproteinase-2 expression in human myometrial and uterine leiomyoma smooth muscle cells. *Human Reproduction*, 30(1), 61-70.
- Wegienka, G. (2012). Are uterine leiomyoma a consequence of a chronically inflammatory immune system? *Medical hypotheses*, 79(2), 226-231.
- Wipff, P.-J., et al. (2007). Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix. *The Journal of cell biology*, 179(6), 1311-1323.
- Wolańska, M., et al. (2004). Matrix metalloproteinases of human leiomyoma in various stages of tumor growth. *Gynecologic and obstetric investigation*, 58(1), 14-18.
- Wynn, T. A. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of clinical investigation*, 117(3), 524-529.
- Xu, Q., et al. (2008). Progesterone receptor modulator CDB-2914 induces extracellular matrix metalloproteinase inducer in cultured human uterine leiomyoma cells. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 14(3), 181-191.
- Yang, Q., et al. (2016). The mechanism and function of epigenetics in uterine leiomyoma development. *Reproductive Sciences*, 23(2), 163-175.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a todo el departamento de Biología Celular, especialmente a mis tutores, Aixa y Ricardo, por acompañarme, ayudarme y guiarme incluso por más tiempo del que estaba previsto.

Gracias Raquel por ayudarme a dar forma a las ideas de mi cabeza; sin duda eres la mejor ilustradora científica que conozco.

Gracias a mi familia y amigos por soportarme todo este tiempo, darme aliento cuando lo necesité y reprenderme cuando lo merecí.

El último agradecimiento va para ti Miguel, por ayudarme a mantener la calma y arrastrarme hasta aquí incluso cuando no ponía de mi parte.

Este trabajo, tal y como es, no habría sido posible sin la ayuda de todos ustedes.

Muchísimas gracias.