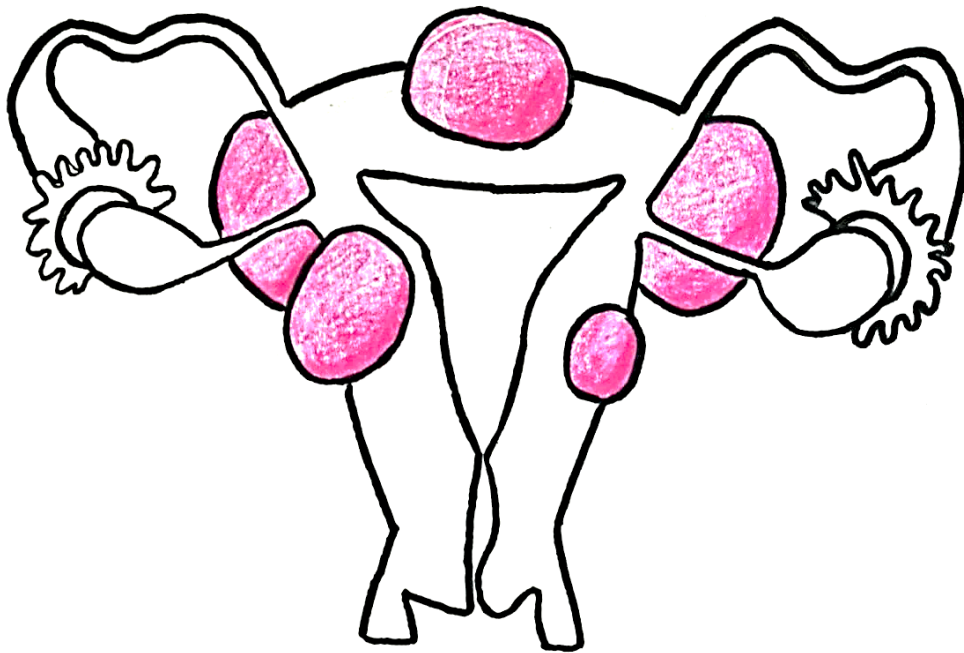


## Componentes de la matriz extracelular en los leiomiomas uterinos. Acción del acetato de ulipristal

---

Components of the extracellular matrix in uterine leiomyomas. Action of ulipristal acetate



Trabajo de Fin de Grado

**Sara Santana Rivero**

Tutorizado por Aixa Rodríguez Bello y Ricardo Reyes Rodríguez

Grado en Biología

Julio 2020

# ÍNDICE

Resumen .....	1
Abstract .....	1
Introducción .....	2
Objetivos .....	3
Material y métodos.....	4
Leiomiomas uterinos .....	4
Características histológicas .....	4
Teorías sobre el origen .....	5
Composición de la matriz extracelular.....	6
Colágeno .....	6
Fibronectina.....	8
Lamininas .....	8
Proteoglicanos .....	8
Metaloproteinasas de matriz e inhibidores de metaloproteinasas .....	10
Factores proinflamatorios en el desarrollo y crecimiento del leiomioma uterino .....	11
Factor de crecimiento transformante- $\beta$ .....	11
Factor de crecimiento epidérmico .....	13
Factor de crecimiento derivado de plaquetas .....	13
Factor de crecimiento similar a la insulina.....	14
Factor de crecimiento de fibroblastos .....	15
Factor de crecimiento endotelial vascular .....	15
Activina A .....	16
Factor de necrosis tumoral .....	16
Papel de los miofibroblastos en el desarrollo de los leiomiomas uterinos .....	16
Función reguladora de los micro ARN y hormonas ováricas sobre la matriz extracelular de los leiomiomas .....	19
Micro ARN.....	19
Estrógenos .....	20
Progesterona.....	21
Tratamientos y matriz extracelular.....	22
Efecto de los moduladores selectivos del receptor de progesterona en el desarrollo de los leiomiomas uterinos .....	23
Acetato de ulipristal .....	24
Conclusiones .....	26
Conclusions .....	27
Bibliografía .....	27

## **RESUMEN**

El leiomioma uterino (LU) es la neoplasia benigna más común del aparato reproductor femenino, presentando una alta prevalencia durante la edad reproductiva. Clínicamente los leiomiomas pueden presentarse con una gran variedad de síntomas como dolor intenso y hemorragias. La morbilidad causada por estos tumores está directamente relacionada con el aumento de su tamaño. Los datos existentes indican que la acumulación excesiva de matriz extracelular (MEC) estructuralmente desordenada en los leiomiomas contribuye a su crecimiento. Asimismo, varios factores como los micro ARNs, las hormonas ováricas, la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos (MFB), los factores de crecimiento y las citocinas también se han relacionado con su desarrollo, por su acción sobre la MEC. Hasta ahora la cirugía sigue siendo la opción definitiva para el tratamiento de esta patología, por lo que es necesario el desarrollo de un tratamiento médico eficaz. El acetato de ulipristal (UPA) se ha considerado uno de los tratamientos más prometedores por su papel modulador de los receptores de progesterona, la cual juega un papel fundamental en el desarrollo y crecimiento del LU. Esta revisión se centra en el papel de la matriz extracelular y de factores que actúan sobre ella en el desarrollo del leiomioma, además, se analizará el papel del acetato de ulipristal sobre los componentes de la matriz.

*Palabras clave: acetato de ulipristal, factores de crecimiento, hormonas ováricas leiomiomas uterinos, matriz extracelular.*

## **ABSTRACT**

Uterine leiomyoma (UL) is the most common benign neoplasm of the female reproductive system, presenting a high prevalence during reproductive age. Clinically, leiomyomas can present a wide variety of symptoms such as severe pain and bleeding. The morbidity caused by these tumors is directly related to the increase in their size. Existing data indicates that excessive accumulation of structurally disordered extracellular matrix (ECM) in leiomyomas contributes to their growth. Likewise, several factors such as micro RNAs, ovarian hormones, fibroblast differentiation into myofibroblasts, growth factors and cytokines have also been related to their development, due to their action on the ECM. Until now, surgery remains the definitive option for the treatment of this pathology, which is why the development of effective medical treatment is necessary. Ulipristal acetate (UPA) has been considered one of the most promising treatments, due to its modulating role of progesterone receptors, which plays a

fundamental role in the development and growth of UL. This review focuses on the role of the extracellular matrix and the factors that act on them in the development of the leiomyoma, as well as the role of ulipristal acetate on the components of the matrix.

*Key words: extracellular matrix, growth factors, ovarian hormones, ulipristal acetate, uterine leiomyomas.*

## **INTRODUCCIÓN**

Los leiomiomas uterinos son neoplasias benignas extremadamente comunes, que han sido identificados y estudiados en todo el mundo, mostrando una incidencia del 60% en mujeres en edad reproductiva (Malik *et al.* 2010; Protic *et al.* 2016). Se utilizan, generalmente, varias terminologías para designar a este tumor uterino como: miofibroma, fibromioma, leiomiofibroma, leiomioma, fibroma y mioma. El término "fibroma" es el menos preciso, sin embargo, es el término de diagnóstico más utilizado en la literatura científica y laica. El término "leiomioma" describe con precisión esta neoplasia y se refiere a cualquier tumor benigno originado a partir del músculo liso (Blake, 2007). Muchos factores de riesgo se han asociado con la presencia de estos tumores, entre ellos: la edad, la obesidad, factores genéticos, raza negra o el número de hijos. No obstante, se desconocen los cambios moleculares y celulares precisos que promueven el desarrollo y crecimiento de los LUs (Murase *et al.* 1999; Islam *et al.* 2018).

Una característica distintiva de los LUs es la acumulación excesiva de componentes de la matriz extracelular, incluidas las fibras de colágeno, fibronectinas, lamininas y proteoglicanos. Varios estudios indican que en los LUs la acumulación y función de MEC está regulada por factores de crecimiento, citocinas y hormonas esteroideas. También se sabe que los LUs expresan enzimas proteolíticas, como las metaloproteinasas de matriz (MMP) e inhibidores de metaloproteinasas (TIMP) que juegan papeles clave en la remodelación de la MEC (Sozen & Arici, 2002; Islam *et al.* 2018).

Dentro del útero, los leiomiomas uterinos pueden crecer completamente dentro del compartimento miometrial (LU intramural), sobresalir a través de la superficie serosa del útero en la cavidad peritoneal (LU suberoso) o proyectarse en la cavidad uterina (LU submucoso) (Blake, 2007). En función de su localización uterina se pueden encontrar numerosas clasificaciones de LU en la literatura, no obstante, la clasificación más empleada actualmente es la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y

Obstetricia) (Figura 1). La clasificación de los LUs es de importancia clínica ya que los síntomas y el tratamiento varían entre los distintos subtipos (Munro *et al.* 2011).

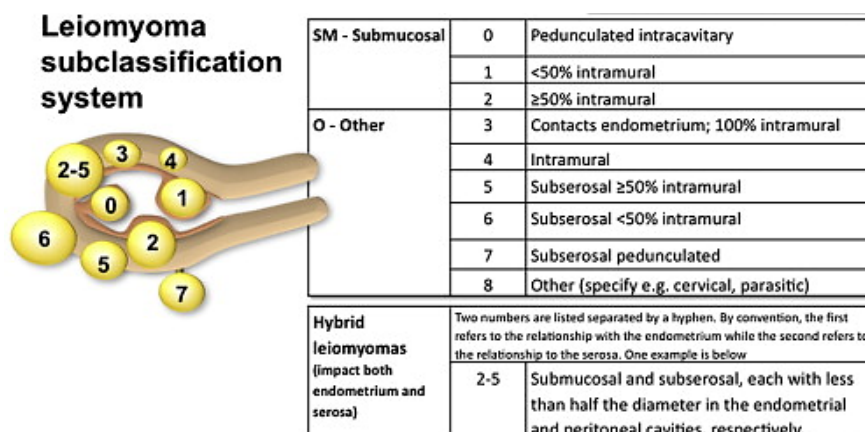


Figura 1. Clasificación de los LUs de acuerdo con el sistema de clasificación FIGO. Tomada de Munro *et al.* (2011).

Por último, los síntomas comunes asociados con estas neoplasias son: sangrado irregular y excesivo, anemia, molestias pélvicas, disfunciones intestinales y de la vejiga, sensación de presión en la parte inferior del abdomen, dolor durante las relaciones sexuales, infertilidad y aborto recurrente (Ciarmela *et al.* 2011). Las principales opciones de tratamiento para los LUs incluyen: intervenciones quirúrgicas y tratamiento farmacológico. Debido a la falta de tratamientos farmacológicos efectivos, la cirugía ha sido la elección principal para el tratamiento del LU. Sin embargo, actualmente, los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRHa) y los moduladores selectivos del receptor de progesterona (SPRM), son las terapias farmacológicas más utilizadas, en cuanto a la reducción del volumen de los LUs y la mejoría sintomática (Islam *et al.* 2018; Sohn *et al.* 2018).

## OBJETIVOS

Debido a la importante contribución de la MEC al volumen y crecimiento del LU, es fundamental estudiar el control preciso del metabolismo de la MEC en los leiomiomas para poder comprender la patología y el desarrollo de estos tumores benignos. Teniendo esto en cuenta, el **objetivo general** de este trabajo es llevar a cabo una revisión bibliográfica que permita conocer el papel que juegan los componentes de la MEC y las modificaciones de estos que ocurren durante el desarrollo de los leiomiomas. Para la consecución del mismo se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos:

- 1- Analizar los distintos componentes de la MEC y su importancia en los LUs.

- 2- Estudiar la transformación de fibroblastos en MFB y de los factores que regulan la fisiología de la MEC como: factores de crecimiento, micro ARNs u hormonas ováricas durante el proceso de crecimiento de los LUs.
- 3- Revisar la acción del fármaco acetato de ulipristal sobre los componentes de la matriz extracelular de los leiomiomas uterinos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para la realización de este trabajo se identificaron publicaciones primarias de investigación y se revisaron artículos relacionados con la matriz extracelular y tratamientos médicos del LU publicados en inglés hasta el año 2019, utilizando la siguiente estrategia. Se realizó una búsqueda exhaustiva en PubMed, Web of Science y el Punto Q utilizando las siguientes palabras clave solas o en combinación con “uterine leiomyoma and extracellular matrix”: collagen, proteoglycan, estrogen, progesterone, myofibroblast, pharmacological treatment, entre otros. Después de leer los títulos y los resúmenes, los artículos fueron seleccionados de acuerdo con la relevancia del tema. El número final de estudios a los que se hizo referencia en esta revisión fue 74.

## **LEIOMIOMAS UTERINOS**

### **Características histológicas**

Los leiomiomas uterinos son tumores benignos compuestos por paquetes arremolinados de células musculares lisas separados por cantidades variables de tejido conectivo fibroso. Los LUs surgen a partir de la musculatura uterina (miometrio), son monoclonales, por lo que, cada tumor se desarrolla de forma independiente, y su tamaño es variable, desde tumores microscópicos hasta tumores grandes que llenan el abdomen, variando en tamaño desde 1mm a 30 cm (Murase *et al.* 1999; Blake, 2007).

Los estudios realizados a microscopía óptica revelan que, anatómicamente, los LUs, se componen de fascículos de células musculares lisas con abundante citoplasma y núcleos uniformes en forma de huso, con poco pleomorfismo celular o actividad mitótica (<5/10 hpf), que han perdido su orientación lineal y paralela (Figura 2) (Blake, 2007; Malvasi *et al.* 2012; Flake *et al.* 2013). También están caracterizados, por presentar una excesiva MEC, con respecto al miometrio, que representa una parte sustancial de su volumen y está, compuesta por una acumulación desmesurada de: colágenos, fibronectinas, lamininas y proteoglicanos (Vilos *et al.* 2015; Islam *et al.* 2018), siendo probable el papel de los miofibroblastos en su formación (Islam *et al.* 2018). Además, cabe destacar que, a pesar de su elevada rigidez, los LUs presentan un aumento de la

vascularización y del contenido de líquidos en relación con el miometrio adyacente (Norian *et al.* 2012).

A nivel ultraestructural, se ha observado que las fibras de colágeno, de tamaño variable, presentan una estructura y orientación anormal (Leppert *et al.* 2004) lo que sugiere una alteración en la regulación de su formación. Las fibras de colágeno no presentan la organización en paralelo propia del miometrio sano. Asimismo, las células musculares presentan: escaso retículo endoplasmático rugoso, pocas mitocondrias con aberraciones morfológicas y agrupamiento de orgánulos a los extremos del núcleo, que a su vez se alarga a lo largo del eje celular (Wortham *et al.* 2006; Islam *et al.* 2018). En cuanto a la pseudocápsula, estructura neurovascular que rodea al leiomioma y lo separa del miometrio periférico (Tinelli *et al.* 2012), la microscopía electrónica muestra que sus células presentan características similares a las células del músculo liso uterino ya que se encuentra formada fundamentalmente por fibras musculares comprimidas, que se cree que formaban parte del miometrio y que ahora forman una estructura diferente que rodea y comprime al LU (Malvasi *et al.* 2012; Tinelli *et al.* 2018).

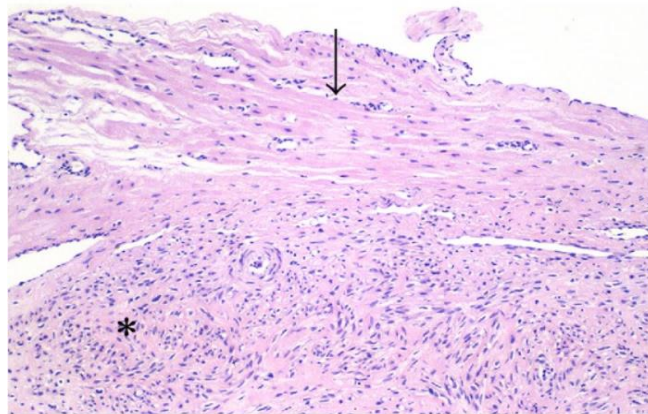


Figura 2. Corte histológico de LU, teñido con hematoxilina-eosina donde se aprecia la pérdida de orientación paralela de las fibras musculares. La orientación lineal paralela de las células del músculo liso miometrial (→) contrasta con la disposición desordenada y desorganizada de las células tumorales (\*). Tomada de Flake *et al.* (2013).

## Teorías sobre el origen

A pesar del gran impacto en la salud pública, se sabe poco sobre la etiología de los LUs. El aspecto más importante “el iniciador”, así como los cambios moleculares y celulares que conducen al desarrollo y crecimiento de estos tumores siguen siendo desconocidos. No obstante, se han propuesto varias teorías acerca de su origen:

Por un lado, una de las hipótesis establece que el aumento de los niveles de estrógeno y progesterona en el miometrio da como resultado un aumento de la tasa mitótica, lo que puede contribuir a la formación del LU al aumentar la probabilidad de

multiplicación de mutaciones somáticas (Medikare *et al.* 2011). Sin embargo, Santamaria *et al.* (2018), proponen que las anomalías genéticas / epigenéticas inducidas por factores ambientales, así como la exposición a las hormonas ováricas podrían alterar el patrón de expresión génica y la función de las células madre miometriales indiferenciadas, lo que llevaría a la formación de una población de células proliferantes, llamadas células iniciadoras de tumores, dando lugar a la formación del leiomioma uterino.

Por otro lado, un estudio reciente realizado por Islam *et al.* (2018), propone que el origen del LU es la consecuencia de una respuesta inflamatoria inadecuada que conduce a una excesiva fibrosis en el desarrollo de la cual jugarían un papel importante los miofibroblastos. Estos investigadores proponen que los eventos reproductivos, los estímulos nocivos, las fuerzas mecánicas, la hipoxia y el estrés oxidativo pueden crear un estado inflamatorio crónico en el útero, que conduce a un aumento de los factores de crecimiento, las citocinas y las hormonas esteroideas en el sitio de la lesión. El aumento de las moléculas anteriormente citadas contribuiría a la activación y diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos que, en un estado inflamatorio normal, comenzarían a producir MEC para promover procesos de reparación en los tejidos y posteriormente se eliminarían por apoptosis. Sin embargo, en la inflamación crónica, propuesta por estos autores, los miofibroblastos se volverían resistentes, a la eliminación por apoptosis y producirían cantidades excesivas de MEC, lo que llevaría a la transformación fibrótica del tejido (Fletcher *et al.* 2013).

## **Composición de la matriz extracelular**

Los leiomiomas uterinos están formados por una matriz extracelular desorganizada y excesiva (Malik *et al.* 2010), presentando hasta un 50% más de MEC que el tejido miometrial adyacente (Barker *et al.* 2016). Además, se cree que la propia MEC sobreproducida puede jugar un papel dinámico en los procesos metabólicos que conducen al crecimiento tumoral, al influir en la proliferación y diferenciación celular, además de servir como depósito de factores de crecimiento y citocinas (Sozen & Arici, 2002). Los componentes de la MEC que contribuyen al aumento del volumen en LU son: colágeno, fibronectinas, lamininas y proteoglicanos (Fujisawa & Castellot, 2014).

### *Colágeno*

Las moléculas de colágeno son macromoléculas estructurales, concretamente glucoproteínas insolubles que tienen una conformación característica de triple hélice. Las fibras de colágeno son el componente principal de la MEC y contribuyen a la estabilidad



y al mantenimiento de la integridad estructural de los tejidos. Además de su papel en la cicatrización y la fibrosis, se sabe que los colágenos regulan la migración celular, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia mediante la señalización a través de receptores de la superficie celular (Van Der Rest & Garrone, 1991; Islam *et al.* 2018).

Como en la mayoría de los tejidos la MEC del tejido uterino, ya sea miometrio o LU, contiene una cantidad sustancial de colágeno (Fujisawa & Castellot, 2014). Malik *et al.* (2010) observaron que la concentración de fibras de colágeno en los LUs, tanto pequeños como grandes, es superior a la del miometrio. De hecho, los LUs pequeños (definidos como <10 g) presentaban una mayor concentración de colágeno en comparación con los LUs grandes (definidos como > 100g), lo que sugiere que la expresión de MEC excesiva es un evento fenotípico temprano.

Los primeros estudios de Stewart y Nowak (1994) mostraron que los tipos de colágeno I y III estaban regulados al alza en el leiomioma en comparación con el miometrio. Posteriormente, se observó que, además, de la sobreexpresión de colágeno I y III, también se producía una mayor expresión de colágeno tipo V a nivel de proteína en los LUs (Islam *et al.* 2013). Asimismo, varios estudios confirman hallazgos similares en leiomiomas e informan de que el exceso de MEC se debe tanto a una sobreproducción de colágeno como a una disminución en la descomposición de este (Fujisawa & Castellot, 2014). De manera que, la sobreexpresión de varios genes de colágeno causa alteraciones graves en su procesamiento, lo que resulta en fibrillas mal formadas. En los leiomiomas, las fibrillas de colágeno mal formadas están anormalmente orientadas entre sí, dispuestas de forma no paralela y desorganizada (Figura 3) y pueden contribuir al tejido fibrótico extremadamente duro de estos tumores (Leppert *et al.* 2004).

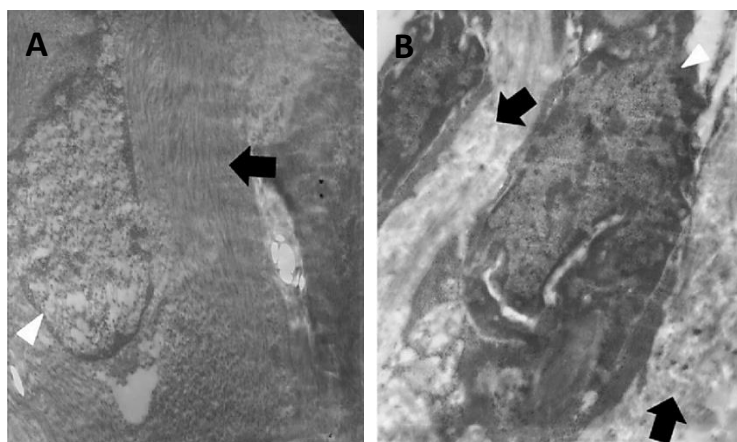


Figura 3. Comparación de la organización de fibrillas de colágeno en la MEC de miometrio y leiomioma mediante microscopía electrónica. (A) Miometrio. Las fibrillas de colágeno están bien alineadas, como lo muestra la flecha negra. El núcleo se denota con la punta de flecha blanca. (B) LU. Las fibrillas de colágeno están alineadas al azar y ampliamente espaciadas, como se muestra por las flechas negras. Tomada de Leppert *et al.* (2014).

### *Fibronectina*

La fibronectina es una glicoproteína matricelular que juega un papel integral en la mediación de las interacciones celulares, la adhesión y la proliferación celular (Pankov & Yamada, 2002). Se encarga de unir las células a una variedad de componentes de la MEC (como el colágeno, la fibrina y la heparina) a través de la interacción con receptores de membrana específicos, como las integrinas (Islam *et al.* 2018). Los niveles de expresión de ARNm de fibronectina son bastante variables en la fisiopatología miometrial. En el año 2000, Arici y Sozen encontraron un nivel elevado de expresión de fibronectina en el leiomioma en comparación con el miometrio adyacente. La fibronectina y el colágeno tipo I forman un andamio que promueve la fibrosis excesiva en el LU. Además, los sitios de unión a factores de crecimiento en las fibronectinas proporcionan una gran fuente de almacenamiento de estos factores en la MEC de los LUs (Fujisawa & Castellot, 2014).

### *Lamininas*

Las lamininas son proteínas multidominio heterotriméricas, que forman parte de la lámina basal y que están compuestas por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Domogatskaya *et al.* 2012). Estas proteínas multidominio presentan regiones de unión para el colágeno, la fibronectina y las integrinas, y pueden influir en la adhesión celular, el crecimiento, la morfología, la diferenciación, la migración, la aglutinación y el ensamblaje de la MEC (Kleinman *et al.* 1985; Islam, *et al.* 2018). Así, el aumento de la concentración de lamininas también es un sello distintivo de las enfermedades fibróticas. En comparación con las células miometriales, se ha observado una cantidad elevada de lamininas totales en las células de leiomioma. Malik *et al.* (2012) demostraron un aumento de la expresión de las subunidades de integrina  $\beta 1$  e integrina  $\alpha 6$  (principales receptores de lamininas en la superficie celular), así como, de laminina  $5\alpha$ , laminina  $5\beta$  y laminina  $5\gamma$  en las células de leiomioma en comparación con las células de miometrio.

### *Proteoglicanos*

Los proteoglicanos, son glucoproteínas formadas por una proteína central con cadenas laterales de glicosaminoglicanos (GAGs) (Leppert *et al.* 2014). Los proteoglicanos individuales interactúan específicamente con otros componentes de la MEC, como el colágeno, la laminina y la fibronectina, así como, con factores de crecimiento y citocinas. Estas interacciones pueden afectar al crecimiento celular, la migración, la adhesividad y la diferenciación, y muchas de estas funciones parecen

depender de las cadenas laterales de GAG (Berto *et al.* 2001). Los GAGs son cadenas largas de heteropolisacáridos no ramificados compuestos de unidades repetidas de disacáridos (Islam *et al.* 2018), dentro de estos los más comunes son: ácido hialurónico, queratán sulfato, condritín sulfato, dermatán sulfato y heparán sulfato (Ly *et al.* 2012). En 2001 Berto *et al.* observaron que, en el miometrio, el principal GAG sulfatado es el dermatán sulfato con pequeñas cantidades de condroitín sulfato y heparán sulfato, mientras que en el LU los principales GAG son el condroitín sulfato y el dermatán sulfato (Malik *et al.* 2010).

Por un lado, se cree que la decorina y el versicano afectan al crecimiento del LU, al modular la actividad del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) en el microambiente celular del LU (Barker *et al.* 2016). La decorina es un pequeño proteoglicano de dermatán sulfato que regula el ensamblaje de la MEC al unirse a la fibronectina y al colágeno a través de su proteína central (Fiedler *et al.* 2008; Islam *et al.* 2018). Las evidencias disponibles sugieren que el LU contiene menos decorina que el tejido miometrial, y dado que esta puede actuar como un antagonista de la señalización de TGF- $\beta$ , esto puede causar un aumento de su señalización y promover la fibrosis (Islam *et al.* 2018). El versicano, es un proteoglicano de condroitín sulfato que afecta a la adhesión y a la migración celular, en parte, a través del aumento de la señalización de TGF- $\beta$ . Diversos autores han demostrado expresiones más elevadas de versicano en leiomiomas en comparación con el miometrio (Malik *et al.* 2010; Barker *et al.* 2016).

Por otro lado, los niveles de expresión de las trombospondinas y de las fibromodulinas también han sido estudiados en LUs. Las trombospondinas son proteoglicanos conocidos por sus propiedades antiangiogénicas y su capacidad para modular las interacciones célula-matriz (Bornstein *et al.* 2004). Se ha observado que la expresión de trombospondina 1 se encuentra disminuida en LUs y que, además, su menor expresión promueve la activación de TGF- $\beta$  (Malik *et al.* 2010). La fibromodulina es un pequeño proteoglicano de queratán sulfato que presenta una notable homología con la decorina y que tiene la capacidad de unirse a los colágenos y de influir en la tasa de fibrogénesis (Font *et al.* 1998; Islam *et al.* 2018). Levens *et al.* (2005) informaron de que la fibromodulina se sobreexpresa a nivel de ARNm y proteína en el leiomioma en comparación con el tejido miometrial.

### *Metaloproteinasas de matriz e inhibidores de metaloproteinasas*

La base para la fibrosis uterina posiblemente implica no solo un aumento en la deposición de la MEC sino también una disminución en la degradación de esta (Sozen & Arici, 2002). El control de la renovación de la MEC y su degradación se produce en concierto con la acción de enzimas proteolíticas conocidas como metaloproteinasas de matriz e inhibidores tisulares de MMP (Morikawa *et al.* 2008).

Las MMPs, denominadas colectivamente matrixinas, representan una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que se agrupan en colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas y MT-MMP. Son proteínas multidominio que participan en la degradación de la MEC y, por tanto, también juegan un papel importante en la migración celular, el crecimiento, la diferenciación, la apoptosis y las respuestas inflamatorias (Visse & Nagase, 2003; Morikawa *et al.* 2008; Leppert *et al.* 2014). En cambio, los TIMPs son inhibidores endógenos que inhiben eficazmente la actividad enzimática al unirse al dominio catalítico de las MMPs y, en consecuencia, son importantes reguladores del recambio de MEC, la remodelación de tejidos y el comportamiento celular (Xu *et al.* 2008; Brew & Nagase, 2010).

La expresión y la regulación hormonal de MMPs y TIMPs, así como sus interacciones con citocinas en LUs y otros tejidos uterinos, han sido de reciente interés en investigación (Morikawa *et al.* 2008). Las evidencias disponibles indican que varias MMPs y TIMPs son expresadas diferencialmente tanto a nivel de ARNm como de proteína en LUs en comparación con el miometrio. Entre las MMPs estudiadas, la expresión de las MMPs-1, -2, -3, -9, -11, -14, -16 y -24 es elevada, mientras que la expresión de las MMPs -7, -19 y -25 disminuye en LUs (Islam *et al.* 2018). También, se ha observado que la expresión de la MMP-1, MMP-2 y MMP-3 es más elevada en LUs grandes. Sin embargo, la expresión de la MMP-1 es menor en LUs pequeños, a diferencia de la expresión de la MMP-3 que es elevada tanto en LUs pequeños como grandes y además actúa como activador de otras MMPs como la MMP-1 y la MMP-9. Asimismo, se ha demostrado que el crecimiento de los LUs está relacionado con el aumento de la actividad de la MMP-2 (Halder *et al.* 2013). Un estudio reciente mostró que el aumento de la degradación y remodelación de la MEC a través de la actividad de la MMP-2 conduce a una fuerte liberación de factores de crecimiento unidos a MEC (Fujisawa & Castellot, 2014). No obstante, con respecto a los TIMPs se ha informado de que los

niveles circulantes del TIMP-1 están significativamente elevados en el LU en comparación con el miometrio (Islam *et al.* 2018).

Además, algunas MMPs pueden afectar directa o indirectamente a las funciones de varias citocinas que juegan un papel clave en los procesos de inflamación y reparación, incluido el interferón- $\beta$ , el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y TGF- $\beta$ 1. Las MMPs pueden regular la biodisponibilidad de los factores angiogénicos secuestrados por la MEC. Por ejemplo, el VEGF asociado a la MEC se moviliza mediante la escisión promovida por las MMPs-1, -3, -7, -9, -16 y -19 de las proteínas de la MEC de unión a VEGF. Las MMPs también permiten la liberación proteolítica de otros factores de crecimiento atrapados en la MEC como FGF o TGF- $\beta$  que pueden mostrar fuertes propiedades mitogénicas (Islam *et al.* 2018). Así, se ha observado que, en los LUs, las MMPs -2, -3 y -7 degradan la decorina de la MEC promoviendo la liberación y consecuente activación de TGF- $\beta$  (Rodríguez *et al.* 2010). En general, las evidencias disponibles sugieren que una desregulación de los niveles de las MMPs y de los TIMPs pueden desempeñar un papel crítico en la formación de una MEC más fibrosa en el leiomioma (Islam *et al.* 2018).

## **Factores proinflamatorios en el desarrollo y crecimiento del leiomioma uterino**

Aunque la contribución directa de la inflamación constitutiva al desarrollo del leiomioma sigue siendo especulativa, existen evidencias considerables en apoyo a la participación de mediadores proinflamatorios y profibróticos en la patogénesis de los LUs. Varios estudios han demostrado la expresión de una gran cantidad de factores de crecimiento y citocinas con propiedades proinflamatorias y profibróticas en los LUs (Chegini, 2010).

### *Factor de crecimiento transformante- $\beta$*

TGF- $\beta$  es un polipéptido dimérico que presenta tres isoformas denominadas TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, y es probablemente el factor de crecimiento más estudiado en LUs en los últimos años (Sozen & Arici, 2002; Islam *et al.* 2018). Su función principal parece ser la de modular el desarrollo y la proliferación celular, actuando como inhibidores o estimuladores, así como, regular la síntesis de muchos de los componentes de la MEC que conducen a la fibrosis (Sozen & Arici, 2002).

Las células del músculo liso del miometrio y del LU expresan ARNm y proteínas para cada una de las tres isoformas de TGF- $\beta$ , así como para los receptores TGF- $\beta$ R-1 y TGF- $\beta$ R-2 (Islam *et al.* 2018). En un estudio, donde las células del músculo liso del leiomioma y del miometrio se mantuvieron en un estado de reposo, se observó una mayor tasa de síntesis de las tres isoformas en los LUs en comparación con el miometrio, así como, también se informó de una mayor expresión de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 en comparación con TGF- $\beta$ 2, en el LU, y un mayor nivel de ARNm y una mayor respuesta mitogénica de TGF- $\beta$ 3, en comparación con TGF- $\beta$ 1 en los LUs (Chegini, 2010).

Por un lado, se ha postulado que TGF- $\beta$  probablemente desempeñe un papel importante en el aumento de la expresión y el depósito de MEC en los LUs, o en la inhibición de genes relacionados con la degradación de la MEC (Islam *et al.* 2013; Fujisawa & Castellot, 2014). Ignotz y Massague (1986) descubrieron que TGF- $\beta$  estimula la expresión de fibronectina y colágeno, además de ayudar a su incorporación a la MEC. Concretamente TGF- $\beta$ 3 parece aumentar la expresión de ARNm de COL 1A1 del factor de crecimiento del tejido conectivo, de la fibronectina y del versicano en las células del LU (Islam *et al.* 2018). Algunos estudios sugieren que la función promotora de fibronectina del TGF- $\beta$  podría explicarse, al menos en parte, sobre la base de su efecto inhibitorio sobre la MMP-3 y la MMP-7, cuya función, es degradar la fibronectina. Asimismo, se ha observado que, TGF- $\beta$ 1 aumenta la expresión del TIMP-1 y disminuye la expresión la MMP-1 y la MMP-3, favoreciendo así un estado de antidegradación de la MEC y por tanto de fibrosis (Fujisawa & Castellot, 2014).

Por otro lado, existen evidencias sólidas que indican que la unión de TGF- $\beta$  a su receptor inicia la señalización a través de varias vías intracelulares en los LUs (Fujisawa & Castellot, 2014). Este factor de crecimiento puede activar las vías MAPK / ERK / Smad y regular la expresión de diferentes genes cuyos productos pueden influir en el crecimiento y la regresión del LU (Islam *et al.* 2013). Por ejemplo, Smad fosforilada se incrementó significativamente en los LUs cuando se co-cultivó con fibroblastos y se expuso a TGF- $\beta$  en comparación con miometrio. En cambio, al bloquear Smad y PI3K / AKT, se condujo a una disminución significativa en la expresión de colágeno y fibronectina, y depósito de MEC. Asimismo, se sabe que la señalización de Integrina-MEC a través de MAPK / ERK aumenta la expresión de proteínas específicas de la MEC y promueve la proliferación celular, y TGF- $\beta$ 3 parece estar también implicado en el aumento de la fosforilación de MAPK / ERK en LUs (Fujisawa & Castellot, 2014).

### *Factor de crecimiento epidérmico*

Los miembros de la familia EGF, incluidos EGF, TGF- $\alpha$  y EGF de unión a heparina (HB-EGF), sirven como factores mitogénicos y de diferenciación para varios tipos de células. Estos, desempeñan un papel clave en el proceso de curación de heridas y en la fibrosis tisular ejerciendo su señalización a través de la unión con el receptor transmembrana EGFR. Se ha informado de que tanto el leiomioma como el miometrio expresan EGF, TGF- $\alpha$  y HB-EGF (Chegini, 2010; Ciarmela *et al.* 2011).

EGF es un polipéptido que tiene actividad mitogénica en varios tejidos reproductivos (Sozen & Arici, 2002), donde aumenta la proliferación celular, la adhesión y la migración de fibroblastos. Se ha observado que EGF se sobreexpresa en el tejido leiomiomatoso en comparación con el miometrio. Además, se cree que EGF induce la proliferación celular y la síntesis de ADN en el LU a través de la activación transitoria de la vía EGFR-MAPK (Islam *et al.* 2013; Fujisawa & Castellot, 2014). No obstante, Moore *et al.* (2000) realizaron un estudio a partir del cual concluyeron que TGF- $\alpha$  y su receptor, se expresan más intensamente en los leiomiomas uterinos, en comparación con los LUs, en ratones, por lo que, TGF- $\alpha$  puede ser considerado como un biomarcador de malignidad, así como, desempeñar un papel crítico en el aumento de la proliferación de células tumorales del músculo liso uterino. Por el contrario, HB-EGF muestra una expresión disminuida en los LUs en relación con el miometrio (Ciarmela *et al.* 2011). Así Wang *et al.* (2005) sugieren que HB-EGF desempeña un papel en la estimulación de la proliferación celular del LU y del miometrio, ejerciendo probablemente una mayor influencia en el crecimiento del miometrio.

### *Factor de crecimiento derivado de plaquetas*

La familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) consta de cuatro homodímeros, PDGF-AA, -BB, -CC y -DD, y un heterodímero, PDGF-AB (Islam *et al.* 2018). Estas isoformas activan las respuestas celulares a través de los receptores PDGF-Ra y PDGF-Rb y son expresadas por una gran variedad de células incluidas las células del músculo liso, los fibroblastos, los miofibroblastos, las plaquetas y los macrófagos (Chegini, 2010). En el año 2010 Moore *et al.* descubrieron que la expresión de PDGF aumenta significativamente en los leiomiomas en comparación con el miometrio. Los niveles de proteína de PDGF-AA, -BB y -CC se encuentran sobreexpresados en los LUs (Islam *et al.* 2018). Asimismo, las evidencias también sugieren que la expresión de los receptores de PDGF también es significativamente mayor

en la superficie de las células del músculo liso fibroide, por lo que en los LUs la señalización de PDGF también es mayor (Fujisawa & Castellot, 2014).

Estudios recientes muestran que PDGF estimula la síntesis de proteínas, aumenta la expresión de colágeno tipo I y modula la tasa de proliferación en las células de miometrio y leiomioma, así como, acelera la progresión del ciclo celular en el LU en comparación con el miometrio (Ciarmela *et al.* 2011; Koohestani *et al.* 2013). El tratamiento de células de LU con PDGF conduce a un aumento de MAPK / ERK fosforilado y a un incremento significativo en el número de células en fase S. De manera que, aunque PDGF no aumenta directamente la deposición de MEC en los LUs, el aumento general en el número de células conduce a una mayor expresión total de los componentes de la MEC, lo que contribuye a su crecimiento (Koohestani *et al.* 2013).

#### *Factor de crecimiento similar a la insulina*

La vía de señalización del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) parece ser una de las vías más importantes responsables del crecimiento de los LUs (Peng *et al.* 2009). Los IGF son péptidos multifuncionales que consisten en dos ligandos, IGF-1 e IGF-2, que se unen a dos receptores de superficie celular IGF-IR e IGF-IIR. Se sabe que la unión de IGF-1 a su receptor específico IGF-IR, afecta a la mitogénesis y a la supervivencia celular (Sozen & Arici, 2002). IGF-IR utiliza IRS-1 / Shc como adaptadores inmediatos que en última instancia pueden conducir a la activación de la vía de supervivencia celular IRS / PI3K / AKT o la vía de proliferación celular Shc / Ras / Grb2 / MAPK (Yu *et al.* 2008).

Varios estudios muestran que la expresión de IGF-1 e IGF-IR están regulados al alza tanto en tumores fibroides como en las células de los LUs (Moore *et al.* 2010). Yu *et al.* (2008) descubrieron que los LUs expuestos a niveles elevados de IGF-1 tenían tasas de proliferación celular significativamente más rápidas en comparación con el tejido normal. Se considera que el IGF-1 aumenta la proliferación celular en el LU mediante la activación de la vía MAPK (Islam *et al.* 2013), así como, aumenta la supervivencia celular al inhibir la apoptosis debido a que, la unión de IGF-1 a IGF-IR, en los LUs también conduce a la fosforilación corriente abajo de la proteína IRS-1. La fosforilación de IRS-1 en última instancia promueve la fosforilación de AKT, que fosforila y bloquea una variedad de proteínas proapoptóticas e induce la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Yu *et al.* 2008; Fujisawa & Castellot, 2014). Además, se ha informado de que los niveles de ARNm de IGF-2, son más altos en el LU en comparación con el miometrio



(Sozen & Arici, 2002). Un estudio reciente mostró que la isoforma IGF-2 puede estar contribuyendo al crecimiento del LU, sin embargo, la función y regulación de IGF-2 en los LUs es en gran parte desconocida (Peng *et al.* 2009; Fujisawa & Castellot, 2014).

#### *Factor de crecimiento de fibroblastos*

Los miembros mejor estudiados de la familia FGF son el factor de crecimiento de fibroblastos ácido (FGFa) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFb), cuya actividad biológica se encuentra mediada por los receptores FGFR (Ciarmela *et al.* 2011). Estos factores están involucrados en una amplia gama de funciones biológicas y de señalización, incluido el desarrollo embrionario, la neovascularización, la proliferación celular y la tumorigénesis (Fujisawa & Castellot, 2014). Se ha observado que FGFa y FGFb son los FGF predominantes en el miometrio y en el LU (Moore *et al.* 2010). Los niveles de proteína FGFa parecen correlacionarse con el tamaño de los LUs y su presencia es significativamente más alta, incluso en los LUs pequeños en comparación con el miometrio. También, se ha observado que la expresión de FGFb y de sus receptores FGFR-1 y FGFR-2 se encuentra elevada en el LU en relación con el miometrio. En ambos tejidos la concentración de FGFb es significativamente mayor a la de FGFa, lo que sugiere la importancia de esta isoforma en la fisiopatología uterina (Sozen & Arici, 2002; Fujisawa & Castellot, 2014). Así, Moore *et al.* (2010) informaron de que la mayor expresión de FGFb en el LU se correlaciona con mayores tasas de proliferación celular. Asimismo, otros estudios han demostrado, que la activación por FGFb de MAPK aumenta la expresión de colágeno tipo I y la proliferación celular en tejidos fibróticos (Fujisawa & Castellot, 2014).

#### *Factor de crecimiento endotelial vascular*

VEGF pertenece a una familia de genes que incluye VEGF-A, -B, -C, -D y al factor de crecimiento placentario (Chegini, 2010). El VEGF estimula la actividad angiogénica que es responsable del crecimiento activo de los tumores. El ARNm de VEGF y los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 se han identificado en las células del músculo liso tanto del miometrio como de leiomiomas. Además, se ha informado de una expresión de VEGF-A más fuerte en el LU con respecto al miometrio, lo que podría indicar que la angiogénesis local puede ser importante para el desarrollo y crecimiento de estos tumores (Ciarmela *et al.* 2011; Ciarmela *et al.* 2014).

## *Activina A*

La Activina A es un factor de crecimiento formado por la unión de 2 subunidades de inhibina, perteneciente a la familia del TGF- $\beta$ . Los datos experimentales han demostrado que los niveles de expresión de activina A son más altos en el LU en comparación con el miometrio (Ciarmela *et al.* 2011). Además, la activina A puede inducir la fosforilación de Smad2 y Smad3 en las células de miometrio y leiomioma, lo que sugiere que el papel fibrótico de la activina A está mediado, al menos en parte, por la activación de la vía de señalización Smad 2/3 (Islam *et al.* 2018). Recientemente se ha informado sobre el papel profibrótico de la activina A al descubrir que ésta aumenta significativamente la expresión de ARNm de fibronectina, colágeno1A1, versicano y VEGF-A en células del LU, en comparación con los controles no tratados, lo cual apoya el papel profibrótico de este factor en los LUs (Ciarmela *et al.* 2014; Islam *et al.* 2014).

## *Factor de necrosis tumoral*

El factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) es una citocina pleiotrópica que desempeña un papel importante en el control de la inflamación, la inmunidad, el crecimiento, la diferenciación celular y la apoptosis (Islam *et al.* 2018). Se ha encontrado una mayor expresión de TNF- $\alpha$  en los LUs en relación con el miometrio, lo que sugiere que este juega un papel importante en su patogénesis (Islam *et al.* 2013). Wang *et al.* (2015) informaron de que TNF- $\alpha$  puede regular al alza los niveles de proteína y ARNm de la MMP-2 en las células de los LUs. Estudios recientes afirman que también puede aumentar la expresión del ARNm de activina A en células de miometrio y del LU. Asimismo, se ha demostrado que TNF- $\alpha$  puede tener un efecto proliferativo y probiótico en los LUs mediado, por la activación de la vía de señalización ERK 1/2 (Wang *et al.* 2015; Islam *et al.* 2018).

Además de estas citocinas y factores de crecimiento, existen otros factores menos estudiados, como el péptido relacionado con la hormona paratiroidea, el factor estimulante de colonias granulocito-macrófagos, la proteína quimiotáctica de monocitos-1 y la endotelina-1 que también han sido implicados o hipotetizados en la fisiopatología de los LUs (Islam *et al.* 2013).

## **Papel de los miofibroblastos en el desarrollo de los leiomiomas uterinos**

Los MFBs son células especializadas que representan una subpoblación de fibroblastos con un fenotipo similar al de las células del músculo liso, debido a que

expresan  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) en su citoesqueleto. La función biológica de los MFBs es producir MEC (sobre todo colágeno de tipo I y III) para restaurar la integridad funcional de los tejidos después de una lesión y luego desaparecer por apoptosis (Protic *et al.* 2016). Sin embargo, cuando el estímulo nocivo responsable de la lesión persiste, se observa un depósito excesivo de MEC y la presencia continuada de los MFBs. Este exceso de deposición de MEC conduce al desarrollo de fibrosis orgánica (Micallef *et al.* 2012).

Como ya se ha mencionado anteriormente, los LUs se consideran un trastorno fibrótico compuesto por células musculares lisas y una MEC significativa (Protic *et al.* 2016). Moore *et al.* (2010) revelaron que los MFBs derivados del LU humano estimulan la proliferación de las células leiomiomas y la producción de colágeno tipo I, así como también activan la señalización de TGF- $\beta$  en cocultivos. Por tanto, estos investigadores concluyeron que las interacciones entre las células musculares lisas del LU y los MFBs podrían ser importantes para el crecimiento de tales tumores como resultado de su impacto en la producción de factores de crecimiento y proteínas de la MEC.

Se ha informado de que varios tipos de células, incluidos los fibroblastos, los fibrocitos, las células madre del músculo liso, células del músculo liso y las células endoteliales, adquieren el fenotipo de MFB en una gran variedad de órganos, y, por tanto, algunos investigadores sugieren que la transformación miofibroblástica en los LUs, podría ocurrir a partir de fibroblastos, células madre del músculo liso y células del músculo liso (Hinz *et al.* 2007). Así en un estudio reciente se identificaron numerosos fibroblastos CD34+ en miometrio y leiomioma. Las células fibroblásticas CD34+ se comportan como progenitores de células madre mesenquimales y juegan un papel importante en la cicatrización de heridas, reparación de tejidos y formación de estroma tumoral. Cuando estas células se activan, promovidas, por ejemplo, por un estímulo inflamatorio, pierden la expresión de CD34 y pueden adquirir la expresión de  $\alpha$ -SMA dando lugar a MFB. Protic *et al.* (2016) informaron de la presencia de células  $\alpha$ -SMA positivas y desmina negativas, así como, de una gran cantidad de colágeno dentro del tejido del LU lo que respalda la existencia de miofibroblastos en la MEC de estos tumores.

La diferenciación de los MFBs depende de la tensión en la matriz y de una variedad de mediadores solubles como factores de crecimiento, hormonas esteroideas y citocinas. El jugador central de la diferenciación de los MFBs es el TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  es la citocina más importante que activa los fibroblastos y su acción depende de la presencia

local del dominio ED-A de fibronectina. De manera que la activación de la señalización de TGF- $\beta$  a través de la vía Smad 2/3 promueve la expresión de  $\alpha$ -SMA en los fibroblastos que, como consecuencia, se activan y diferencian (Figura 4). Recientemente se ha informado de que la reticulación de la MEC puede promover aún más la transición miofibroblástica de las células. Como se comentó anteriormente, a parte del TGF- $\beta$ , la activina A también juega un papel importante en la reparación de los tejidos y en la fibrosis. Por consiguiente, tanto el TGF- $\beta$  como la activina A, se expresan altamente en el LU (donde son capaces de mejorar la síntesis de componentes de la MEC), esto apoya aún más sus roles en la diferenciación de MFB (Zheng *et al.* 2014; Islam *et al.* 2018).

Por un lado, estudios recientes sugieren que el aumento del estrés mecánico en los tejidos puede inducir la activación de los fibroblastos y su diferenciación en miofibroblastos (Figura 4). Las fuerzas mecánicas al llegar a la membrana de los fibroblastos activan a las integrinas que actúan como receptores. Como consecuencia se promueve la activación de múltiples vías de señalización intracelular, incluidas las que involucran a MAPK, Rho y el factor nuclear  $\kappa$ B. En general, estas cascadas de señalización conducen a la regulación del gen objetivo de  $\alpha$ -SMA a nivel de la transcripción génica (Zheng *et al.* 2014). La activación de los fibroblastos, inducida por fuerzas mecánicas, podría jugar un papel crítico en el desarrollo de los leiomiomas ya que, el microambiente de la MEC de los LUs se caracteriza por un aumento del estrés mecánico, que podría favorecer la diferenciación miofibroblástica (Norian *et al.* 2012; Zheng *et al.* 2014).

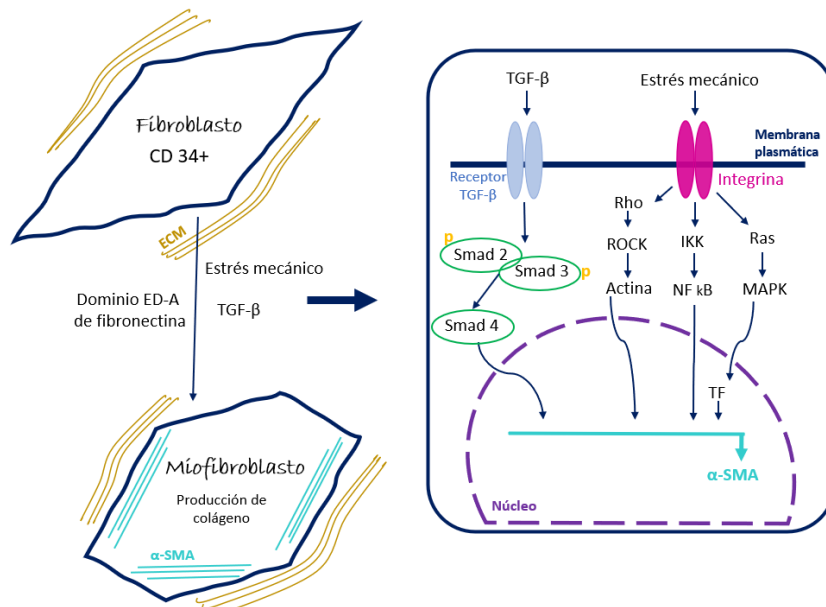


Figura 4. Diferenciación de fibroblastos en MFB. Las fuerzas mecánicas y TGF- $\beta$  promueven la activación de varias vías de señalización que incluyen: la familia Rho, IKK, MAPKp38 y Smad que regulan la expresión de  $\alpha$ -SMA. Modificado de Zheng *et al.* (2014)

Por otro lado, se ha informado de que el estrógeno y la progesterona aumentan la proliferación tanto de células del LU como de MFBs en comparación con grupos no tratados (Islam *et al.* 2018). Algunos estudios han demostrado que el estrógeno podría estimular la activación de fibroblastos CD90+ (marcador específico de fibroblastos) y promover la expresión de la proteína de activación de fibroblastos (FAP), un marcador específico de fibroblastos activos (Guo *et al.* 2015). Asimismo, Luo *et al.* (2014) se centraron en explorar el papel de la activación de fibroblastos mediada por estrógenos en la patogénesis del LU. Estos observaron que, en los LUs, después de la estimulación con estrógenos, se mejoró la actividad proliferativa de los fibroblastos y se aumentó la expresión de FAP, de MEC y de factores de crecimiento, así como, que el silenciamiento de la expresión de FAP puede inhibir los efectos biológicos mediados por los estrógenos. De manera que, estos autores concluyeron que el estrógeno promueve la proliferación de los LUs a través de la activación de fibroblastos y que, por lo tanto, los fibroblastos activados pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de los LUs.

## **Función reguladora de los micro ARN y hormonas ováricas sobre la matriz extracelular de los leiomiomas**

### *Micro ARN*

Los micro ARN (o miARN) son pequeños ARN no codificantes (~22-nt) que regulan la expresión génica postranscripcional. Al unirse al extremo 3'-UTR de los ARNm, los miARN evitan la producción de proteínas al inducir la degradación del ARNm y/o reprimir la traducción (Islam *et al.* 2018). A través de este mecanismo, desempeñan un papel central en varias actividades celulares como: la diferenciación, la proliferación, la apoptosis, la respuesta inflamatoria y el recambio tisular (Chuang *et al.* 2012). Varios investigadores han demostrado que, además de la expresión diferencial de genes entre LU y miometrio, también existe una expresión diferencial de miARN (Marsh *et al.* 2016). Además, se ha informado de la expresión de una gran cantidad de miARN en los LUs, lo que implica que sus funciones reguladoras son clave en muchas de las actividades celulares centrales para el establecimiento y posterior crecimiento de estos tumores (Xiaoping & Chegini, 2008).

El perfil de expresión de los miARN en los LUs muestra una firma única que parece no solaparse con la mayoría de los tumores malignos. Específicamente, miR-93 y miR-106b, que regulan directa o indirectamente la expresión de un número significativo

de genes, incluidos el factor tisular de plaquetas (F3) e IL8, se expresan diferencialmente en el LU en comparación con el miometrio (Santamaria & Taylor, 2014). Así, dada la función reguladora de F3 e IL8 en diversas actividades celulares, incluida la inflamación y el recambio tisular, esto sugiere que la expresión alterada de miR-93 / 106b puede tener un impacto significativo en estos procesos, que son clave para el crecimiento de los LUs y los síntomas asociados (Chuang *et al.* 2012a). Asimismo, se ha observado que los LUs expresan niveles muy bajos de miR-200c en relación con el miometrio, cuya sobreexpresión, se sabe que también reduce los niveles de ARNm y proteínas de IL8 y que además reprime la expresión de TIMP2 y VEGF-A entre otros, en los LUs (Chuang *et al.* 2012b; Chuang & Khorram, 2014).

Recientemente, Marsh *et al.* (2016) demostraron que los LUs presentan niveles disminuidos de los miembros de la familia miARN-29 (miR-29a, -29b y -29c) en relación con el miometrio y establecieron que la subexpresión de miARN-29 promueve un aumento del colágeno en el LU. Asimismo, se ha informado de que miR-15 se encuentra sobreexpresado en los LUs y aunque aún no se ha determinado si tiene la capacidad de regular específicamente la descomposición de la MEC o si está involucrado en otras actividades celulares, como apoptosis, angiogénesis o migración, en los LUs, se sabe que es capaz de inhibir la expresión de las MMPs-2,-9 y -14 (Guan *et al.* 2016).

### *Estrógenos*

Las evidencias acumuladas respaldan que el estrógeno se encuentra estrechamente relacionado con la tumorigénesis y el crecimiento de los LUs. Esta hormona, ejerce sus efectos fisiológicos en las células, al unirse a sus receptores nucleares específicos: ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Varios estudios han demostrado que el ARNm de ER $\alpha$  y de ER $\beta$  se expresa en el miometrio y en el leiomioma, así como, que los niveles de ARNm de ER $\alpha$  y ER $\beta$  son más elevados en este último (Maruo *et al.* 2004). Se considera que el estrógeno puede estimular la proliferación celular en los LUs mediante la regulación de la expresión de factores de crecimiento y / o activando vías de señalización (Islam *et al.* 2013).

El estrógeno regula positivamente la expresión de PDGF en las células de los LUs (Figura 5) e influye negativamente en la expresión de activina A y miostatina en los explantes de miometrio humano (Islam *et al.* 2013). Swartz *et al.* (2005), concluyeron en su estudio que el aumento de IGF-1 en las células de los LUs es el resultado de una mayor expresión de este factor, relacionada con la exposición al estrógeno. Asimismo, se ha observado que la secreción de TGF- $\beta$  aumenta significativamente en respuesta al

tratamiento con estrógenos tanto en leiomiomas como en fibroblastos del músculo liso en comparación con los controles no tratados (Islam *et al.* 2018).

Varios autores afirman, que el estrógeno desencadena la activación rápida y transitoria de la vía MAPK en las células de los LUs, así como, también es capaz de aumentar la fosforilación de varias proteínas intracelulares posteriores, como GAP (proteína activadora de GTPasa), PI3K, PLC $\gamma$  (fosfolipasa-C $\gamma$ ) y ERK 1/2 (Islam *et al.* 2013; Islam *et al.* 2018). Nierth-Simpson *et al.* (2009) observaron que los estrógenos promueven un aumento rápido en los niveles de ERK 1/2 fosforilado a través de un mecanismo dependiente de ER en células del LU. Por consiguiente, los resultados de este estudio sugirieron que la activación rápida de ERK 1/2 mediada por los estrógenos puede aumentar la sensibilidad de las células de los LUs a la proliferación. Por último, se ha informado de que esta hormona disminuye significativamente la expresión de la proteína p53 en los LUs (Islam *et al.* 2013). La proteína supresora de tumores p53 es una fosfoproteína nuclear que cumple un papel importante en la multiplicación y supresión de células cancerosas. Los estrógenos, por tanto, pueden estimular el crecimiento de los leiomiomas en parte al disminuir los niveles de proteína p53 y suprimir las funciones normales de esta (Maruo *et al.* 2004).

### *Progesterona*

Varias líneas de investigación han otorgado un papel crítico a la progesterona en la patogénesis de los leiomiomas. Esta hormona, ejerce sus acciones fisiológicas en las células al interactuar con sus receptores específicos: PR-A y PR-B que se expresan tanto en los LUs como en el miometrio. Se ha demostrado que los contenidos de PR-A y PR-B son más altos en los leiomiomas en comparación con el miometrio adyacente, con un dominio significativo de PR-A sobre PR-B. Así, se considera que, la acción de la progesterona a través de PR aumenta el volumen de los LUs induciendo la proliferación celular y la acumulación de MEC (Maruo *et al.* 2004; Islam *et al.* 2018).

Barker *et al.* (2016) probaron los efectos de la progesterona en la expresión de decorina en el LU en comparación, con el miometrio, en diferentes etapas del ciclo menstrual y descubrieron que la progesterona disminuye la expresión de ARNm de la decorina (proteoglicano encargado de inhibir la actividad de TGF- $\beta$ ) en las células de leiomioma (Islam *et al.* 2018). De manera que, estos investigadores concluyeron que la decorina reducida, promovida por la progesterona, puede establecer un microambiente local que fomente un ciclo de retroalimentación positiva inducida por TGF- $\beta$  que

conduzca a un aumento de la proliferación celular y al depósito de MEC que, a su vez, promueva aún más la señalización de TGF- $\beta$  (Barker *et al.* 2016).

Análogamente, la progesterona también contribuye a la promoción del crecimiento de los LUs a través del aumento de la expresión de EGF, TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 3 y a su supervivencia a través de la regulación de la expresión de la proteína Bcl-2 (Figura 5). Se ha informado de que la progesterona produce un aumento de la expresión de Bcl-2, que prolonga la supervivencia celular al impedir la apoptosis. Sin embargo, esta hormona también puede ejercer un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y la supervivencia del LU a través de la disminución de la expresión de IGF-1. Esto sugiere que la progesterona puede tener acciones duales en el crecimiento del LU: una es la acción para estimular y otra es la acción para inhibir el crecimiento del leiomioma (Maruo *et al.* 2004; Islam *et al.* 2013).

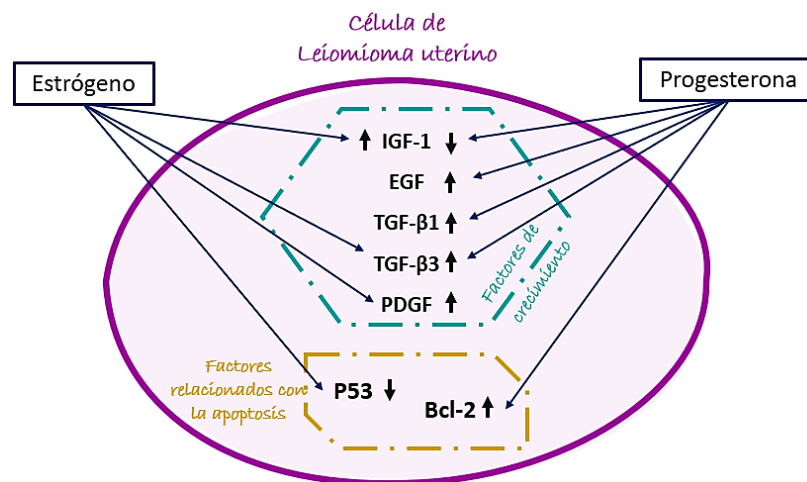


Figura 5. Regulación de la expresión de factores de crecimiento y factores relacionados con la apoptosis en células de LU, por las hormonas ováricas. ↑ = efecto estimulante; ↓ = efecto inhibitorio. Modificado de Maruo *et al.* (2004)

## Tratamientos y matriz extracelular

La mayoría de los LUs son asintomáticos y no requieren terapia. No obstante, aproximadamente el 30% de las mujeres con LUs necesitan tratamiento debido a síntomas que afectan a su calidad de vida, como sangrado menstrual excesivo y anemizante, dolor abdominal, síntomas de presión y / o infertilidad (Donnez & Dolmans, 2016). Las oportunidades actuales de tratamiento para los LUs son principalmente quirúrgicas (Fujisawa & Castellot, 2014). La histerectomía se ha considerado durante mucho tiempo el tratamiento quirúrgico estándar para los LUs intramurales y submucosos sintomáticos (Donnez & Dolmans, 2016). Sin embargo, esta opción quirúrgica no es adecuada para pacientes que desean permanecer fértiles. La miomectomía es otra opción quirúrgica,



adecuada para las mujeres que desean mantenerse fértiles y retener el útero. Desafortunadamente, esta intervención se asocia con una morbilidad significativa que incluye hemorragia, formación de adherencias, lesión intestinal y tiene una tasa de recurrencia entre un 10% y un 15%, por lo que las mujeres que se someten a una miomectomía eventualmente requieren de una histerectomía posterior. Asimismo, se han agregado nuevas tecnologías para el tratamiento del LU, incluida la embolización de la arteria uterina, la ecografía focalizada guiada por resonancia magnética, la oclusión laparoscópica de la arteria uterina y la criólisis. No obstante, los resultados obtenidos a partir de estos procedimientos no son satisfactorios debido a una tasa de complicaciones significativa, aunque hay pruebas sólidas de una reducción inicial de los síntomas, estancias hospitalarias más cortas y retornos más rápidos al trabajo (Ciarmela *et al.* 2011; Vilos *et al.* 2015).

A pesar de que el tratamiento del LU ha sido clásicamente el quirúrgico, hoy en día debemos ser capaces de poder ofrecer a la paciente un panorama con mayor número de opciones (Fábregues & Peñarrubia, 2002). Hasta hace poco, los tratamientos médicos han tenido un valor limitado debido a su eficacia moderada y / o efectos adversos asociados (Vilos *et al.* 2015). Por ejemplo, el agonista de la GnRH se usa ampliamente como terapia efectiva a corto plazo para el tratamiento del LU, con la finalidad de reducir su volumen y restaurar los niveles de hemoglobina en mujeres sintomáticas. Sin embargo, este tratamiento también tiene inconvenientes que incluyen una profunda deficiencia de estrógenos y una disminución de la densidad mineral ósea (Ciarmela *et al.* 2011). Es por ello, por lo que actualmente, los científicos han dado la máxima prioridad a la exploración de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de los LUs. Existen evidencias de ensayos preclínicos y clínicos, así como, de estudios histológicos y farmacológicos, de que la progesterona y sus receptores juegan un papel clave en el crecimiento de los LUs, por lo que, en los últimos años han surgido nuevas terapias, en las cuales, se modula la vía de la progesterona mediante el uso de moduladores selectivos de su receptor (Donnez & Dolmans, 2016).

#### *Efecto de los moduladores selectivos del receptor de progesterona en el desarrollo de los leiomiomas uterinos*

Los SPRM también conocidos con el nombre de “antiprogestinas” son compuestos sintéticos que ejercen un efecto agonista o antagonista sobre los receptores de progesterona. Su actividad mixta depende del reclutamiento de cofactores que regulan

la transcripción de una determinada vía genómica, así como, de las interacciones no genómicas con otras vías de señalización. Cuatro miembros de la familia de SPRM han sido investigados en ensayos clínicos de fase II: mifepristona, asoprisnilo, acetato de ulipristal y acetato de telapristona y todos ellos han demostrado disminuir el tamaño del LU y reducir el sangrado (Donnez & Dolmans, 2016; Donnez *et al.* 2018).

La mifepristona, representa el prototipo SPRM, siendo el primero en ser sintetizado y utilizado clínicamente. Varios estudios han demostrado que la mifepristona puede reducir el volumen de los LUs y aliviar los síntomas relacionados con esta patología, como la hipermenorrea, la pérdida de sangre menstrual, el dolor o la presión pélvica, la anemia y la dismenorrea. Sin embargo, este tratamiento produce algunos efectos secundarios incluidos: sofocos, náuseas, debilidad, dolor abdominal y flujo vaginal, así como, aumenta el riesgo de desarrollar hiperplasia endometrial lo cual hace que se replantee si su uso es seguro (Islam *et al.* 2018). Por el contrario, Morikawa *et al.* (2008), estudiaron la acción del asoprisnilo en los LUs y confirmaron que este tratamiento disminuye significativamente la proliferación celular y la expresión de colágeno tipo I y III en el LU en comparación con el miometrio también tratado. Además, se ha demostrado que disminuye la expresión de factores de crecimiento implicados en la deposición de MEC en el LU, incluidos IGF y TGF- $\beta$ 3. Sin embargo, el tratamiento con asoprisnilo no ha obtenido buenos resultados en los ensayos clínicos de fase III debido a su modesta eficacia y efectos secundarios significativos, y, por tanto, no está aprobado para uso clínico (Fujisawa & Castellot, 2014). No obstante, la última antiprogestina estudiada en ensayos clínicos, acetato de ulipristal, ha mostrado resultados prometedores en términos de eficacia y seguridad (Donnez & Dolmans, 2016).

#### *Acetato de ulipristal*

El acetato de ulipristal, también conocido como CDB-2914, es un modulador selectivo del receptor de progesterona que se une a los receptores de progesterona A y B con alta afinidad. El uso de este medicamento ha sido aprobado en Europa y Canadá para el tratamiento preoperatorio de los LUs. UPA tiene un impacto directo en los leiomiomas, disminuyendo su tamaño y reduciendo el sangrado excesivo, mejorando los síntomas relacionados con esta patología y la calidad de vida de los pacientes. Si bien este tratamiento se asocia con algunos efectos secundarios como: sofocos, dolor / molestias en los senos y dolores de cabeza, sin embargo, en los ensayos clínicos no se ha observado un aumento de su incidencia en ciclos repetidos. Además, es importante destacar que

algunos autores informan de que UPA podría estar asociado con cambios fisiológicos endometriales que consisten en dilatación glandular quística benigna, pero estos no se han asociado hasta la fecha con un mayor riesgo de hiperplasia endometrial o malignidad (Donnez *et al.* 2018; Islam *et al.* 2018). Donnez *et al.* (2015) demostraron que, la incidencia de hiperplasia endometrial después de dos ciclos de tratamiento con UPA era <1%, lo que es consistente con la frecuencia esperada, en mujeres con sangrado uterino anormal.

Se ha observado que UPA reduce el tamaño de los LUs mediante la inhibición de la proliferación, la estimulación transitoria de la apoptosis y la remodelación de la MEC, en mujeres con leiomiomas sintomáticos tratados. Durante la fase temprana del tratamiento la apoptosis se ve facilitada por la represión temporal de la survivina, un inhibidor de la apoptosis. Asimismo, la reducción en el volumen de los LUs también se correlaciona con niveles altos de MMPs y, por el contrario, con niveles bajos de TIMPs lo que sugiere que el equilibrio MMP / TIMP juega un papel importante en la disminución del volumen del LU (Donnez *et al.* 2018). En el año 2008 Xu *et al.* descubrieron que en las células de LU cultivadas y sometidas a un tratamiento con UPA, aumenta significativamente el contenido de proteínas EMMPRIN, MMP-1 y MMP-8 y los niveles de ARNm de MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9, al tiempo que disminuyen los niveles de ARNm y proteína de TIMP-1 y TIMP-2, así como el contenido de colágeno tipo I y III sin efectos comparables en las células de miometrio cultivadas.

Recientemente se ha informado de que UPA deteriora la señalización de TGF- $\beta$  en las células de leiomioma, al reducir la expresión de TGF- $\beta$ 3 (ARNm y proteína) lo que resulta en una reducción de la vía de señalización canónica de TGF- $\beta$ , así como, también promueve un aumento significativo de la expresión de la proteína fibrilina, que puede servir para unir complejos inactivos de TGF- $\beta$  (Lewis *et al.* 2019). Además, Ciarmela *et al.* (2014) realizaron un estudio in vitro donde se demostró otro posible mecanismo de acción de UPA, como inhibidor de la expresión y función de la activina A en células de leiomioma cultivadas, lo que se tradujo también en una reducción de fibronectina y de VEGF-A. Estos últimos descubrimientos acreditan aún más la posible influencia de UPA en la reducción de la MEC del tumor y de su vascularización. Sin embargo, se ha observado que en el 20% de los casos, los LUs no responden a UPA (Figura 6) y su volumen permanece estable o continúan creciendo. Una respuesta deficiente a UPA se asocia con una baja actividad de MMPs y niveles más altos de catenina delta-2 que, como

la  $\beta$ -catenina, podrían indicar la proliferación y la supervivencia a través de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (Donnez *et al.* 2018).

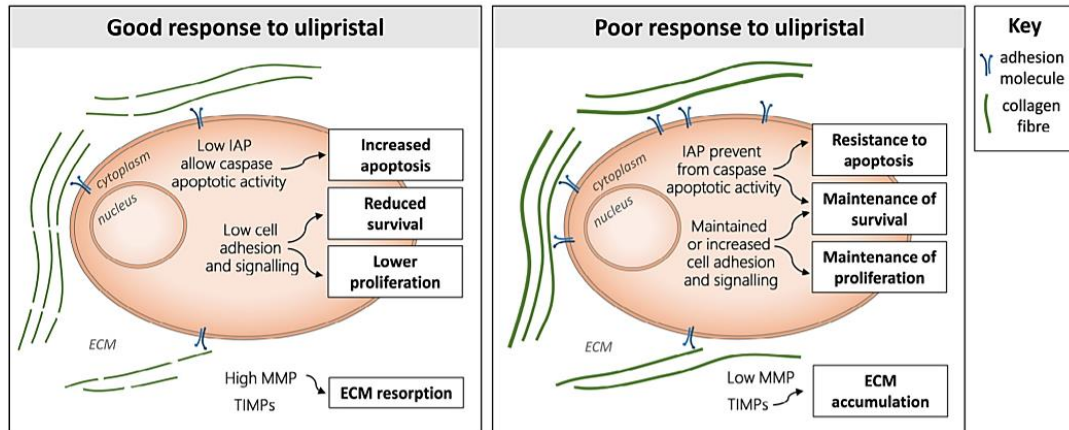


Figura 6. Respuesta molecular de los LUs a UPA. Una buena respuesta se asocia con niveles más bajos de inhibidores de apoptosis (IAP), adhesión celular reducida y valores altos de MMP, lo que resulta en apoptosis, tasas de supervivencia más bajas, proliferación menos extensa y reabsorción de MEC. En caso de una respuesta leve, los niveles altos de IAP previenen la actividad apoptótica y aseguran la supervivencia. La adhesión celular mantenida o aumentada media la supervivencia e induce la proliferación celular. Los niveles bajos de MMP no pueden reabsorber la MEC rica en colágeno a medida que se acumula. Tomada de (Donnez *et al.* 2018).

## CONCLUSIONES

De esta revisión se extraen las siguientes conclusiones:

1. Es evidente que los factores de crecimiento y las citocinas se consideran efectores potenciales de las acciones de los estrógenos y la progesterona en el crecimiento y la progresión del LU. Todos juntos controlan varios procesos biológicos como la proliferación celular, la remodelación de la MEC, la angiogénesis y la apoptosis, que son eventos importantes para el crecimiento del leiomioma.
2. Asimismo, la deposición excesiva de MEC en los LUs también puede producirse como resultado del aumento del número de miofibroblastos en estos tumores. El incremento del estrés mecánico, los estrógenos, TGF- $\beta$  y activina A parecen jugar un papel clave en la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos en los LUs.
3. Por último, a pesar de que los tratamientos farmacológicos para los LUs han tenido un valor limitado, actualmente varios ensayos clínicos han demostrado que el acetato de ulipristal tiene un impacto directo en los leiomiomas. Este tratamiento disminuye el tamaño de los LUs y reduce el sangrado excesivo, así como, es capaz de mejorar los síntomas relacionados con esta patología y la calidad de vida de las pacientes.

## CONCLUSIONS

The following conclusions are drawn from this review:

1. It is evident that growth factors and cytokines are considered potential effectors of the actions of estrogens and progesterone on the growth and progression of UL. Together they control various biological processes such as cell proliferation, ECM remodeling, angiogenesis, and apoptosis, which are important events for the growth of leiomyoma.
2. Moreover, excessive deposition of ECM in the ULs can also occur as a result of the increase in the number of myofibroblasts in these tumors. Because increased mechanical stress, estrogens, TGF- $\beta$ , and activin A appear to play a key role in the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts in ULs.
3. Finally, despite the fact that pharmacological treatments for ULs have been of limited value, currently, several clinical trials have shown that ulipristal acetate has a direct impact on leiomyomas. This treatment reduces the size of the ULs and reduces excessive bleeding, as well as being able to improve the symptoms related to this pathology and the quality of life of the patients.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Arici, A. & Sozen, I. (2000). Transforming growth factor- $\beta$ 3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. *Fertil Steril*, 73, 1006-1011.
2. Barker, N., Carrino, D., Caplan, A., Hurd, W., Liu, J., *et al.* (2016). Proteoglycans in Leiomyoma and Normal Myometrium: Abundance, Steroid Hormone Control, and Implications for Pathophysiology. *Reprod Sci*, 23, 302-309.
3. Berto, A., Oba, S., Michelacci, Y. & Sampaio, L. (2001). Galactosaminoglycans from normal myometrium and leiomyoma. *Braz J Med Biol Res*, 34, 633-637.
4. Blake, R. E. (2007). Leiomyomata Uteri: Hormonal and Molecular Determinants of Growth. *J Natl Med Assoc*, 99, 1170-1184.
5. Bornstein, P., Agah, A., & Kyriakides, T. (2004). The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 1115-1125.
6. Brew, K. & Nagase, H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*, 1803, 55-71.
7. Chegini, N. (2010). Proinflammatory and Profibrotic Mediators: Principal Effectors of Leiomyoma Development as a Fibrotic Disorder. *Semin Reprod Med*, 28, 180-203.
8. Chuang, T., & Khorram, O. (2014). miR-200c Regulates IL8 Expression by Targeting IKBKB: A Potential Mediator of Inflammation in Leiomyoma Pathogenesis. *PLoS One*, 9.
9. Chuang, T., Luo, X., Panda, H., & Chegini, N. (2012a). miR-93/106b and Their Host Gene, MCM7, Are Differentially Expressed in Leiomyomas and Functionally Target F3 and IL-8. *Mol Endocrinol*, 26, 1028-1042.
10. Chuang T., Panda, H., Luo, X., & Chegini, N. (2012b). miR-200c is aberrantly expressed in leiomyomas in an ethnic-dependent manner and targets ZEBs, VEGFA, TIMP2, and FBLN5. *Endocr Relat Cancer*, 19, 541-556.
11. Ciarmela, P., Carrarelli, P., Islam, S., Janjusevic, M., Zupi, E., Tosti, C., *et al.* (2014). Ulipristal Acetate Modulates the Expression and Functions of Activin A in Leiomyoma Cells. *Reprod Sci*, 21, 1120 - 1125.
12. Ciarmela, P., Islam, S., Reis, F., Gray, P., Bloise, E., *et al.* (2011). Growth factors and myometrium: biological effects in uterine

- fibroid and possible clinical implications. *Hum Reprod Update*, 17, 772-790.
13. Domogatskaya, A., Rodin, S., & Tryggvason, K. (2012). Functional Diversity of Laminins. *Annu. Rev. Cell Dev Biol*, 28, 523-553.
  14. Donnez, J., & Dolmans, M. (2016). Uterine fibroid management: from the present to the future. *Hum Reprod Update*, 22, 665-686.
  15. Donnez, J., Hudecek, R., Donnez, O., Matule, D., Arhendt, H., *et al.* (2015). Efficacy and safety of repeated use of ulipristal acetate in uterine fibroids. *Fertil Steril*, 103, 519-527.
  16. Donnez, J., Courtoy, G., Donnez, O., & Dolmans, M. (2018). Ulipristal acetate for the management of large uterine fibroids associated with heavy bleeding: a review. *Reprod Biomed Online*, 37, 216-223.
  17. Fábregues, F., & Peñarrubia, J. (2002). Mioma uterino. Manifestaciones clínicas y posibilidades actuales de tratamiento conservador. *Med Integral*, 40, 190-195.
  18. Fiedler, L., Schonherr, E., Waddington, R., Niland, S., Seidler, G., *et al.* (2008). Decorin Regulates Endothelial Cell Motility on Collagen I through Activation of Insulin-like Growth Factor I Receptor and Modulation of  $\alpha 2 \beta 1$  Integrin Activity. *J Biol Chem*, 283, 17406–17415.
  19. Flake, G., Moore, A., Sutton, D., Kissling, G., Horton, J., *et al.* (2013). The Natural History of Uterine Leiomyomas: Light and Electron Microscopic Studies of Fibroid Phases, Interstitial Ischemia, Inanosis, and Reclamation. *Obstet Gynecol Int*, 2013.
  20. Fletcher, N., Saed, M., Abu-Soud, H., Al-Hendy, A., Diamond, M., *et al.* (2013). Uterine fibroids are characterized by an impaired antioxidant cellular system: potential role of hypoxia in the pathophysiology of uterine fibroids. *J Assist Reprod Genet*, 7, 969-974.
  21. Font, B., Eichenberger, D., Goldschmidt, D., Boutillon, M., & Hulmes, D. (1998). Structural requirements for fibromodulin binding to collagen and the control of type I collagen fibrillogenesis. *Eur. J. Biochem*, 254, 580-587.
  22. Fujisawa, C., & Castellot, J. (2014). Matrix production and remodeling as therapeutic targets for uterine leiomyoma. *J. Cell Commun*, 8, 179-194.
  23. Guan, Y., Guo, L., Zukerberg, L., Rueda, B. R., & Styer, A. K. (2016). MicroRNA-15b regulates reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) expression in human uterine leiomyoma. *Reprod Biol Endocrinol*, 14.
  24. Guo, J., Zheng, L., Chen, L., Luo, N., Yang, W., *et al.* (2015). Lipopolysaccharide activated TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway of fibroblasts from uterine fibroids. *Int J Clin Exp Pathol*, 8, 10014-10025.
  25. Halder, S., Osteen, G., & Al-Hendy, A. (2013). Vitamin D3 inhibits expression and activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human uterine fibroid cells. *Hum Reprod*, 28, 2407–2416.
  26. Hinz, B., Phan, S., Thannickal, V., Galli, A., Bochaton-Piallat, M., *et al.* (2007). Biological Perspectives; The Myofibroblast; One Function, Multiple Origins. *Am J Pathol*, 170, 1807-1816.
  27. Igotz, R., & Massagué, J. (1986). Transforming Growth Factor-B Stimulates the Expression of Fibronectin and Collagen and Their Incorporation into the Extracellular Matrix. *J Biol Chem*, 261, 4337-4345.
  28. Islam, S., Potric, O., Stortoni, P., Grechi, G., Lamanna, P., *et al.* (2013). Complex networks of multiple factors in the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Fertil Steril*, 100, 178-193.
  29. Islam, S., Catherino, W. H., Protic, O., Janjusevic, M., Gray, P. C., *et al.* (2014). Role of Activin-A and Myostatin and Their Signaling Pathway in Human Myometrial and Leiomyoma Cell Function. *J Clin Endocrinol Metab*, 99.
  30. Islam, M., Ciavattini, A., Petraglia, F., Castellucci, M. & Ciarmela, P. (2018). Extracellular matrix in uterine leiomyoma pathogenesis: a potential target for future therapeutics. *Hum Reprod Update*, 24, 59-85.
  31. Kleinman, H., Cannon, F., Laurie, G., Hassell, J., Aumailley, M., *et al.* (1985). Biological activities of laminin. *J cell Biochem*, 27, 317-325.
  32. Koohestani, F., Braundmeier, A., Mahdian, A., Seo, J., Bi, J., *et al.* (2013). Extracellular Matrix Collagen Alters Cell Proliferation and Cell Cycle Progression of Human Uterine Leiomyoma Smooth Muscle Cells. *PLoS One*, 8.
  33. Leppert, P., Baginski, T., Prupas, C., Catherino, W., Pletcher, S., *et al.* (2004). Comparative ultrastructure of collagen fibrils in uterine leiomyomas and normal myometrium. *Fertil Steril*, 82, 1182-1187.
  34. Leppert, P. C., Jayes, F. L., & Segars, J. H. (2014). The Extracellular Matrix Contributes to Mechanotransduction in Uterine Fibroids. *Obstet Gynecol Int*, 2014.
  35. Levens, E., Luo, X., Ding, L., Williams, R., & Chegini, N. (2005). Fibromodulin is expressed in leiomyoma and myometrium and regulated by gonadotropin-releasing

- hormone analogue therapy and TGF- $\beta$  through Smad and MAPK-mediated signalling. *Mol Hum Reprod*, 11, 489-494.
36. Lewis, T., Malik, M., Britten, J., Parikh, T., Cox, J., *et al.* (2019). Ulipristal acetate decreases active TGF- $\beta$ 3 and its canonical signaling in uterine leiomyoma via two novel mechanisms. *Fertil Steril*, 111, 806-815.
  37. Luo, N., Guan, Q., Zheng, L., Qu, X., Dai, H., *et al.* (2014). Estrogen-mediated activation of fibroblasts and its effects on the fibroid cell proliferation. *Transl Res*, 163, 232-241.
  38. Ly, M., Leach III, F. E., Laremore, T. N., Toida, T., Amster, I. J., *et al.* (2012). The proteoglycan bikunin has a defined sequence. *Nat Chem Biol*, 7, 827-833.
  39. Malik, M., Norian, J., McCarthy-Keith, D., Britten, J., & Catherino, W. H. (2010). Why Leiomyomas Are Called Fibroids: The Central Role of Extracellular Matrix in Symptomatic Women. *Semin Reprod Med*, 28, 169-179.
  40. Malik, M., Segars, J., & Catherino, W. H. (2012). Integrin  $\beta$ 1 regulates leiomyoma cytoskeletal integrity and growth. *Matrix Biol.*, 31, 389-397.
  41. Malvasi, A., Cavallotti, C., Morroni, M., Lorenzi, T., Dell'Edera, D., Nicolardi, G., & Tinelli, A. (2012). Uterine fibroid pseudocapsule studied by transmission electron microscopy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 162, 187-191.
  42. Marsh, E., Steinberg, M., Parker, J., Wu, J., Chakravarti, D., *et al.* (2016). Decreased expression of microRNA-29 family in leiomyoma contributes to increased major fibrillar collagen production. *Fertil Steril*, 106, 766-772.
  43. Maruo, T., Ohara, N., Wang, J., & Matsuo, H. (2004). Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum Reprod Update*, 10, 207-220.
  44. Medikare, V., Kandukuri, L., Ananthapur, V., Deenadayal, M., & Nallari, P. (2011). The Genetic Bases of Uterine Fibroids; A Review. *J Reprod Infertil*, 12, 181-191.
  45. Micallef, L., Vedrenne, N., Billet, F., Coulomb, B., Darby, I., *et al.* (2012). The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5.
  46. Moore, A., He, H., Yoshida, A., Rico, P. J., Haseman, K., *et al.* (2000). Transforming growth factor- $\alpha$ , epidermal growth factor receptor, and PCNA immunorexpression in uterine leiomyosarcomas and leiomyomas in B6C3F1 mice. *Exp Toxicol Pathol*, 52, 195-200.
  47. Moore, A., Yu, L., Swartz, D., Zheng, X., Wang, L., *et al.* (2010). Human uterine leiomyoma-derived fibroblasts stimulate uterine leiomyoma cell proliferation and collagen type 1 production and activate RTKs and TGF beta receptor signaling in coculture. *Cell Commun Signal*, 8.
  48. Morikawa, A., Ohara, N., Xu, Q., Nakabayashi, K., DeManno, D. 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. *Hum Reprod*, 23, 944-951.
  49. Munro, M., Critchley, H., Broder, M., & Fraser, I. (2011). FIGO classification system (PALM-COEIN) for causes of abnormal uterine bleeding in nongravid women of reproductive age. *Int J Gynaecol Obstet*, 113, 3-13.
  50. Murase, E., Siegelman, E., Outwater, E., Perez-Jaffe, L., & Tureck, R. (1999). Uterine Leiomyomas: Histopathologic Features, MR Imaging Findings, Differential Diagnosis, and Treatment. *RadioGraphics*, 19, 1179-1197.
  51. Nierth-Simpson, E., Martin, M., Chiang, T., Melnik, L., Rhodes, L., *et al.* (2009). Human Uterine Smooth Muscle and Leiomyoma Cells Differ in Their Rapid  $17\beta$ -Estradiol Signaling: Implications for Proliferation. *Endocrinology*, 150, 2436-2445.
  52. Norian, J., Owen, C., Taboas, J., Korecki, C., Tuan, R., *et al.* (2012). Characterization of tissue biomechanics and mechanical signaling in uterine leiomyoma. *Matrix Biol*, 31, 57-65.
  53. Pankov, R., & Yamada, K. (2002). Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*, 115, 3861-3863.
  54. Peng, L., Wen, Y., Han, Y., Wei, A., Shi, G., *et al.* (2009). Expression of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF signaling: molecular complexity in uterine leiomyomas. *Fertil Steril*, 91, 2664-2675.
  55. Protic, O., Toti, P., Islam, S., Occhini, R., Giannubilo, S., *et al.* (2016). Possible involvement of inflammatory/repairative processes in the development of uterine fibroids. *Cell Tissue Res*, 364, 415-427.
  56. Rodríguez, D., Morrison, C., & Overall, C. (2010). Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim et Biophys Acta*, 1803,39-54.

57. Santamaria, X., & Taylor, H. (2014). MicroRNA and gynecological reproductive diseases. *Fertil Steril*, 101, 1545-1551.
58. Santamaria, X., Mas, A., Cervelló, I., Taylor, H., & Simon, C. (2018). Uterine stem cells: from basic research to advanced cell therapies. *Hum Reprod Update*, 24, 673-693.
59. Sohn, G., Cho, S., Kim, Y., Cho, C., Kim, M, *et al.* (2018). Current medical treatment of uterine fibroids. *Obstet Gynecol Sci*, 61, 192-201.
60. Sozen, I., & Arici, A. (2002). Interactions of cytokines, growth factors, and the extracellular matrix in the cellular biology of uterine leiomyomata. *Fertil Steril*, 78, 1-12.
61. Stewart, E., Friedman, A., Peck, K., & Nowak, R. (1994). Relative overexpression of collagen type I and collagen type III messenger ribonucleic acids by uterine leiomyomas during the proliferative phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 79, 900-906.
62. Swartz, C., Afshari, C., Yu, L., Hall, K., & Dixon, D. (2005). Estrogen-induced changes in IGF-I, Myb family and MAP kinase pathway genes in human uterine leiomyoma and normal uterine smooth muscle cell lines. *Mol Hum Reprod*, 11, 441-450.
63. Tinelli, A., Kosmas, I., Mynbaev, O., Favilli, A., Gimbrizis, G., *et al.* (2018). Submucous Fibroids, Fertility, and Possible Correlation to Pseudocapsule Thickness in Reproductive Surgery. *Biomed Res Int*, 2018.
64. Tinelli, A., Malvasi, A., Hurst, B., Tsin, D., Davila, F., *et al.* (2012). Surgical Management of Neurovascular Bundle in Uterine Fibroid Pseudocapsule. *JLS*, 16, 119-129.
65. Van Der Rest, M., & Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *FASEB J.*, 5, 2814-2823.
66. Vilos, G., Allaire, C., Laberge, P., & Leyland, N. (2015). The Management of Uterine Leiomyomas. *J Obstet Gynaecol Can*, 37, 157-178.
67. Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92, 827-839.
68. Wang, J., Ohara, N., Takekida, S., Xu, Q., & Mauro, T. (2005). Comparative effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on the growth of cultured human uterine leiomyoma cells and myometrial cells. *Hum Reprod*, 20, 1456-1465.
69. Wang, Y., Feng, G., Wang, J., Zhou, Y., Liu, Y., *et al.* (2015). Differential effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on matrix metalloproteinase-2 expression in human myometrial and uterine leiomyoma smooth muscle cells. *Hum Reprod*, 30, 61-70.
70. Wortham, N. C., Biochem, M., Alam, A., Barclay, E., Pollard, P. J., *et al.* (2006). Aberrant expression of apoptosis proteins and ultrastructural aberrations in uterine leiomyomas from patients with hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma. *Fertil Steril*, 86, 961-971.
71. Xiaoping, L., & Chegini, N. (2008). The Expression and Potential Regulatory Function of MicroRNAs in the Pathogenesis of Leiomyoma. *Semin Reprod Med*, 26, 500-514.
72. Xu, Q., Ohara, N., Liu, J., Amano, M., Sitruk-Ware, R., *et al.* (2008). Progesterone receptor modulator CDB-2914 induces extracellular matrix metalloproteinase inducer in cultured human uterine leiomyoma cells. *Mol Hum Reprod*, 14, 181-191.
73. Yu, L., Saile, K., Swartz, C., He, H., Zheng, X., *et al.* (2008). Differential expression of receptor tyrosine kinases (RTKs) and IGF-I pathway activation in human uterine leiomyomas. *Mol Med*, 14, 264-275.
74. Zheng, L., Cai, F., GE, I., Biskup, E., & Cheng, Z. (2014). Stromal fibroblast activation and their potential association with uterine fibroids. *Oncol Lett*, 8, 479-486.