

**Efecto de Ganirelix en cultivos organotípicos de
miomas uterinos en presencia de hormonas
ováricas**

**Effect of Ganirelix on organotypic cultures of
uterine leiomyoma under the influence of
ovarian steroids**

Trabajo de Fin de Grado

RAQUEL MARÍA SUÁREZ LÓPEZ

Tutorizado por María Teresa Acosta Almeida y Ana Salas Pérez

Grado en Biología. Junio 2020

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	1
Introducción.....	3
Etiología y desarrollo de los leiomiomas uterinos.....	3
Tratamientos existentes	6
Cultivos organotípicos para el estudio de leiomiomas uterinos	7
Hipótesis	8
Objetivos.....	9
Materiales y métodos.....	9
Obtención de las muestras biológicas	9
Cultivo organotípico y ensayo del fármaco	10
Tinción histológica	12
Extracción de ARN y proteínas.....	12
Limpieza del ARN con DNasa y cuantificación del ARN	14
Cuantificación de proteínas	14
PCR cuantitativa (qPCR) y Western Blot	15
Resultados	18
Tinción histológica	18
Cuantificación de ARN y proteínas	20
Discusión.....	24
Conclusiones	27
Conclusions	27
Agradecimientos	28
Bibliografía.....	28

Resumen

Los leiomiomas uterinos son los tumores benignos más frecuentes del aparato reproductor femenino que afectan a un gran porcentaje de mujeres en edad reproductiva. En ocasiones, esta patología provoca la aparición de síntomas que reducen la calidad de vida de las pacientes, por lo que es necesario la aplicación de tratamientos que permita extirpar o reducir el tamaño de los miomas. La administración de antagonistas de GnRH constituye una de las terapias farmacológicas más utilizadas para la reducción de estos tumores, aunque su aplicación a nivel sistémico provoca efectos secundarios no deseados que limitan la duración del tratamiento. Recientemente, se ha demostrado que la aplicación de antagonistas de GnRH directamente sobre cultivos tradicionales de leiomioma inhibe su crecimiento y estimula el proceso apoptótico, lo cual se debe a la capacidad de estos medicamentos de interactuar de manera competitiva con los receptores de GnRH presentes en estos tejidos. En este estudio, investigamos el efecto de Ganirelix, un antagonista de GnRH, sobre la proliferación y apoptosis en cultivos organotípicos de leiomioma bajo la influencia de las hormonas ováricas en condiciones fisiológicas similares a las presentes durante la fase proliferativa y la fase secretora del ciclo ovulatorio.

Palabras clave: fibroma, leiomioma, cultivo organotípico, estrógeno, progesterona, análogo de GnRH, Ganirelix, apoptosis.

Abstract

Uterine leiomyomas are the most frequent benign tumors of the female reproductive system, affecting a large proportion of women in reproductive age. Occasionally, this pathology causes severe symptoms that negatively affects the quality of life of patients. Therefore, therapies aimed at reducing tumor size or surgical removal of tumor are needed. GnRH antagonists are widely used as a non-invasive treatment to reduce the size of myomas, although they cause undesirable secondary effects that limits their systemic use to a short period of time. Recent studies demonstrated that GnRH antagonists inhibit growth and triggers apoptosis in leiomyoma cells under culture

through competitive binding to GnRH receptors expressed in tumor tissues. In this study, we tried to assess the effect of Ganirelix, a GnRH antagonist, on cell proliferation and apoptosis using organotypic cultures of uterine leiomyoma under the influence of ovarian steroids, simulating the physiological conditions of the proliferative and the secretory phases of the menstrual cycle.

Keywords: fibroid, leiomyoma, organotypic culture, estrogen, progesterone, GnRH analogue, Ganirelix, apoptosis.

Introducción

Los leiomiomas uterinos, también denominados fibromas uterinos, son los tumores benignos más frecuentes en mujeres en edad reproductiva, con una incidencia del 40% en mujeres caucásicas y del 60% en mujeres de raza negra en torno a los 35 años, que se eleva al 70% y más del 80% respectivamente a los 50 años (Pavone *et al.*, 2018). A menudo, la presencia de estos tumores pasa inadvertida por la ausencia de síntomas, que se manifiestan en el 15-30% de las mujeres con leiomiomas y afectan a la calidad de vida de estas (Serdar & Bulun, 2013).

Entre la sintomatología asociada a esta patología se incluye dolor en el área lumbar, fatiga, dolor abdominal, sangrado excesivo durante la menstruación y dificultades durante la concepción y el embarazo (Neri *et al.*, 2019). La severidad de estos síntomas depende del número, tamaño y localización de los tumores, que alteran la anatomía y funcionalidad de los tejidos del útero (Zepiridis *et al.*, 2016; Sohn *et al.*, 2018). Por ejemplo, los fibromas submucosos, que crecen hacia la cavidad uterina, suelen estar asociados a sangrado menstrual abundante y anemia, así como problemas de implantación del embrión y complicaciones del embarazo y el parto; mientras que los miomas subserosos, que se desarrollan hacia la cavidad peritoneal, pueden provocar síntomas de tipo compresivo solo si alcanzan cierto tamaño, como molestias abdominales, disuria y estreñimiento. Por otro lado, los fibromas intramurales, que se desarrollan en el miometrio, también afectan a la capacidad reproductiva (Eldar-Geva *et al.*, 1998; Serdar & Bulun, 2013; Ali & Al-Hendy, 2017; Neri *et al.*, 2019). Además, la aparición de estos síntomas no solo es debido a la masa y tamaño de los leiomiomas, sino también a la producción de moléculas de señalización que alteran la actividad de los tejidos adyacentes al tumor (Zepiridis *et al.*, 2016).

Etiología y desarrollo de los leiomiomas uterinos

Los leiomiomas uterinos tienen un origen monoclonal a partir de células madre somáticas del miometrio. Aunque todavía no se han establecido con exactitud aquellos mecanismos que provocan la transformación de células normales en células iniciadoras de leiomiomas, parece que son varios los factores implicados en el origen y expansión de estos tumores, tales como alteraciones genéticas, epigenéticas e influencia de

hormonas sexuales y factores de crecimiento (Islam *et al.*, 2013). Con respecto al desarrollo de los leiomiomas, se ha observado que estos tumores son especialmente sensibles a la presencia de hormonas ováricas, que estimulan la proliferación de las células de mioma y una producción excesiva de matriz extracelular (ECM por sus siglas en inglés), lo cual concuerda con el hecho de que estos tumores aparecen solamente después de la menarquia y experimentan una regresión después de la menopausia (Serdar & Bulun, 2013).

A nivel histológico, los leiomiomas destacan por la presencia de un exceso de matriz extracelular de carácter fibroso desorganizado, razón por la cual estos tumores también reciben el nombre de fibromas. En comparación con los tejidos no afectados del miometrio, se ha comprobado que en los leiomiomas existe sobreexpresión de genes que codifican diversos componentes de la matriz extracelular, tales como colágeno, fibronectinas, lamininas, proteoglicanos, integrinas y proteasas involucradas en la remodelación de la matriz extracelular (Islam *et al.*, 2018). Además, se ha observado que los leiomiomas presentan una disposición y orientación anormal de las fibras de colágeno con respecto al miometrio. Esta excesiva acumulación de matriz extracelular, aparte de provocar la aparición de los síntomas asociados a la alteración anatómica del útero, también actúa como reservorio de factores de crecimiento que, al liberarse durante los procesos de remodelado de la matriz extracelular, activan diversas vías de transducción que conducen, en última instancia, al desarrollo y expansión del tumor (Koohestani *et al.*, 2013; Islam *et al.*, 2018).

Como ya se mencionó anteriormente, los leiomiomas uterinos dependen de las hormonas ováricas, estrógeno y progesterona, para su desarrollo y mantenimiento. En las células de leiomioma, se ha comprobado que existe una sobreexpresión de los receptores de estrógeno (ER α y ER β) en comparación con el miometrio sano, lo cual justifica su mayor sensibilidad a la presencia de esta hormona en el medio. Asimismo, también se ha observado que estos tumores presentan mayores cantidades de aromatasa, una enzima clave en el proceso de conversión de andrógenos en estradiol (E₂), de manera que los leiomiomas son capaces de producir suficiente estrógeno para mantener su crecimiento. La acción del estrógeno incluye la activación de la expresión

de diversos genes implicados en la patogénesis de los leiomiomas, tales como factores de crecimiento, colágenos y receptores de estrógeno y progesterona (Borahay *et al.*, 2015; Moravek *et al.*, 2015; Salas *et al.*, 2020). Por otro lado, también se ha observado que existe una mayor cantidad de receptores de progesterona en las células de leiomioma con respecto al miometrio no afectado (Tsigkou *et al.*, 2015). La progesterona es responsable del desarrollo del tumor, ya que estimula la proliferación celular y la acumulación de matriz extracelular al modular la expresión de diversos factores de crecimiento, como EGF y PCNA, y moléculas implicadas en inhibir el proceso de apoptosis (Borahay *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2016).

Otra característica llamativa de los leiomiomas uterinos es la presencia de alteraciones genéticas que podrían contribuir a la iniciación y desarrollo de estos. Las anomalías genéticas más frecuentes se corresponden con mutaciones en el gen *MED12* y traslocaciones o sobreexpresión del gen *HMGA2*. Se ha observado que entre el 50 y el 85% de los tumores presentan mutaciones en *MED12*, la mayoría de ellas situadas en el exón 2 (Galindo *et al.*, 2018; Mello *et al.*, 2018). *MED12* (*Mediator complex subunit 12*, por sus siglas en inglés) es un componente del Complejo Mediador, que interactúa con la ARN polimerasa II y regula el inicio de la transcripción, el crecimiento celular y la diferenciación, por lo que la presencia de mutaciones en este gen podría estar relacionada con la alteración del desarrollo y de los patrones de expresión de las células que dan lugar a los leiomiomas (Mello *et al.*, 2018).

Por otro lado, *HMGA2* (*high-mobility group AT-hook 2*, por sus siglas en inglés) es un factor de transcripción que induce cambios conformacionales en la estructura de la cromatina, lo cual afecta a los procesos de crecimiento, diferenciación, apoptosis y transformación celular (Galindo *et al.*, 2018). En torno al 40-50% de los leiomiomas uterinos presentan anomalías citogenéticas detectables, de las cuales un 20% corresponden a reordenaciones cromosómicas que se producen corriente arriba del promotor del gen *HMGA2*, provocando una sobreexpresión de este en los tumores que presentan esta anomalía. Sin embargo, también se ha observado una mayor expresión de este gen con respecto al miometrio sano en leiomiomas en los que esta alteración se encontraba ausente, por lo que se ha planteado la existencia de otros mecanismos

reguladores de la expresión de este gen, como la actuación de microARNs (Mello *et al.*, 2018). Destaca también el hecho de que ambas alteraciones genéticas, la mutación en *MED12* y la reordenación cromosómica en *HMGA2*, son mutuamente excluyentes (Mäkinen *et al.*, 2017). Sin embargo, a la luz de recientes estudios se ha observado la presencia de mutaciones en *MED12* y sobreexpresión de *HMGA2* de manera simultánea en un mismo tumor (Galindo *et al.*, 2018; Mello *et al.*, 2018).

Tratamientos existentes

Hasta la fecha, el tratamiento definitivo para la eliminación de los leiomiomas uterinos es la histerectomía, pero esta no resulta una opción deseable para las mujeres que desean tener hijos. Por ello, ha sido necesario buscar tratamientos alternativos, ya sea métodos conservativos como la miomectomía o técnicas menos invasivas, como la embolización de arterias uterinas y la aplicación de ultrasonidos de alta intensidad, las cuales, sin embargo, no están exentas de riesgo y no garantizan que no se produzca un rebrote del tumor (Neri *et al.*, 2019). Por otro lado, la administración de fármacos constituye una opción preferible para aquellas mujeres que desean evitar los procesos de cirugía y mantener su capacidad reproductiva. El objetivo de estos medicamentos es reducir la influencia de las hormonas ováricas sobre los leiomiomas y, de esta manera, inhibir el crecimiento y expansión del tumor. No obstante, por el momento el empleo de estos fármacos suele limitarse a un corto período de tiempo debido a los efectos secundarios que provocan, y normalmente se recetan como terapia preoperatoria para reducir el tamaño de los tumores y mejorar los síntomas asociados a esta patología. Además, tras la suspensión del tratamiento, los leiomiomas recuperan en poco tiempo su tamaño inicial (Ali & Al-Hendy, 2017). Algunos de los medicamentos más utilizados son los moduladores selectivos del receptor de progesterona, los análogos de GnRH y los inhibidores de aromatasa.

Los agonistas de GnRH fueron los primeros fármacos que se utilizaron para el tratamiento de los leiomiomas uterinos. Su administración a nivel sistémico provoca una estimulación inicial de las células gonadotrópicas de la hipófisis, que posteriormente concluye con la inhibición del eje hipofisario-gonadal. De esta manera, se reduce la cantidad de hormonas ováricas circulantes, lo cual permite que se reduzca el tamaño de

los tumores y el alivio de los síntomas asociados. Sin embargo, esta reducción drástica del nivel de estrógenos induce una serie de efectos secundarios característicos de la menopausia, desde sofocos y sequedad vaginal hasta consecuencias más graves, como desmineralización y pérdida de densidad ósea, por lo que la duración de estos tratamientos es limitada. Por otro lado, los antagonistas de GnRH actúan mediante inhibición competitiva de los receptores de GnRH hipofisarios, por lo que se consigue una inhibición inmediata del eje hipofisario-gonadal, al contrario que en el caso de los agonistas de GnRH, lo cual permite una menor duración del tratamiento en comparación con estos últimos (Parsanezhad *et al.*, 2012).

Desde hace años se sabe de la presencia de receptores de GnRH en tejidos no hipofisarios, incluidos los leiomiomas uterinos (Parker *et al.*, 2007). Esto implica que las células en los que estos receptores están presentes son capaces de responder a la acción de GnRH y sus análogos. De hecho, se ha comprobado que la aplicación local de análogos de GnRH sobre cultivos de leiomiomas uterinos provoca una inhibición de la proliferación en las células que conforman estos tumores y un mayor nivel de apoptosis, además de inhibir la expresión de genes que codifican componentes de la matriz extracelular, la cual es un elemento clave en la formación de estos tumores (Chen *et al.*, 2005; Britten *et al.*, 2012; Malik *et al.*, 2016). Por tanto, el desarrollo de sistemas eficaces y seguros para aplicar estos fármacos a nivel local en el propio tumor constituye una opción interesante, ya que de esta manera se conseguiría tratar los leiomiomas evitando los efectos secundarios que provoca su aplicación sistémica.

Cultivos organotípicos para el estudio de leiomiomas uterinos

El desarrollo de modelos en los que se pueda estudiar la fisiología de los leiomiomas uterinos, así como su respuesta ante distintos factores, tales como la aplicación hormonas ováricas y fármacos, resulta esencial para la comprensión de los mecanismos mediante los cuales se originan y expanden, así como para la realización de ensayos preclínicos con tratamientos potencialmente eficaces y seguros para su administración a mujeres con este tipo de tumores. En este sentido, los primeros modelos utilizados para el estudio de los leiomiomas uterinos estaban basados en animales, como la rata EKER o los xenotransplantes, que tienen el inconveniente de no representar de manera

fiel las condiciones en que se encuentran estos tumores en el organismo humano, además de que la respuesta de estos a los fármacos difiere entre los modelos animales y su aplicación en humanos (Ishikawa *et al.*, 2010). Por otra parte, también se han utilizado cultivos en 2D de células de leiomiomas humanos para realizar estas investigaciones, pero tampoco constituyen modelos idóneos para estos estudios debido a que se requiere inmortalizar las células para poder cultivarlas, lo cual puede alterar sus características fenotípicas, así como eliminar la matriz extracelular junto con las complejas interacciones que se establecen entre sus componentes y las células de leiomioma (Fiebitz *et al.*, 2012). Recientemente, se ha conseguido establecer un modelo organotípico para el estudio de los leiomiomas uterinos mediante la colocación de láminas de tejido obtenidas de leiomiomas sobre soportes de alginato en unas condiciones de incubación concretas. Por medio de este sistema de cultivo en 3D, se logró conservar la arquitectura y características histológicas del tejido original hasta 7 días después de comenzar el cultivo, el mantenimiento de los receptores de estrógeno y progesterona durante este tiempo, cuya rápida pérdida es uno de los problemas de los cultivos 2D, la conservación de células portadoras de mutaciones en los genes drivers *MED12* y *HMGA2* y la respuesta del tumor a hormonas ováricas (Salas *et al.*, 2020). Gracias a este tipo de cultivo organotípico, es posible conservar la matriz extracelular del tumor, junto con la compleja red de interacciones que se establecen entre esta y las células que componen los leiomiomas uterinos. Este modelo es el que se ha empleado para realizar los experimentos en que se basa el presente trabajo.

Hipótesis

En estudios previos del equipo de investigación, se observó que la aplicación del antagonista de GnRH Ganirelix en cultivos organotípicos de leiomiomas provocó una disminución de la proliferación celular y una inducción del proceso de apoptosis, siendo mayor su eficacia cuando se aplicó a una concentración de 10^{-8} mol/L. De comprobarse que el fármaco genera estos efectos sobre el tumor incluso en presencia de las hormonas ováricas, cuyos niveles fluctúan a lo largo de las distintas fases del ciclo menstrual, la encapsulación y aplicación local del medicamento sobre el propio

leiomioma podría constituir una opción de tratamiento efectiva y libre de los efectos secundarios que se derivan de la administración sistémica de este fármaco.

Objetivos

A partir de la hipótesis planteada, el objetivo del experimento consiste en determinar el efecto de la aplicación de Ganirelix sobre la proliferación celular, la apoptosis y la acumulación de matriz extracelular en cultivos organotípicos de leiomiomas sometidos a la influencia de hormonas ováricas en concentraciones fisiológicas similares a las de la fase proliferativa y la fase secretora.

Materiales y métodos

Obtención de las muestras biológicas

Las muestras se tomaron de tres pacientes de 44, 47 y 52 años sometidas a histerectomía durante los meses de septiembre y octubre de 2019. Previamente, se obtuvo el consentimiento informado de las pacientes para la recogida de muestras mediante un formulario aprobado por el comité ético del Hospital Universitario de La Candelaria (CHUNSC_2018_63).

De cada una de las pacientes, se tomaron dos especímenes, uno correspondiente al mioma extraído (L16, L17 y L18) y otro al miometrio libre de tumores (M16, M17 y M18). Los tres miomas fueron clasificados como intramurales y medían entre 6 y 14 cm.

Tras el proceso de cirugía, las muestras fueron sumergidas en solución salina balanceada de Hank (HBSS) suplementada con anfotericina B (0,25 µg/mL), penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich). A continuación, se transportaron las muestras en hielo al laboratorio para su procesamiento en condiciones estériles.

En el laboratorio, se cortaron los bloques de tejido de forma manual en tiras de 0,5 cm de ancho x 0,5 cm de alto aproximadamente, que luego fueron sumergidas en una cubeta con HBSS frío y estéril suplementado con antibióticos y antimicótico para proceder al corte de láminas de unos 500 µm mediante un vibratomo (Vibroslice NVSLM1, World Precision Instruments).

De cada espécimen de mioma y miometrio pareado se tomaron dos muestras el mismo día de la extracción del tumor, correspondientes al tiempo cero (T0). Una de ellas fue sumergida en RNAlater para la extracción de ácidos nucleicos y proteínas, y la otra fue depositada en formol para su posterior tinción histológica e inmunohistoquímica.

Cultivo organotípico y ensayo del fármaco

El cultivo de las láminas de tejido se llevó a cabo en placas de 6 pocillos, en cada uno de los cuales se colocaron dos discos de alginato de aproximadamente 1 mm de grosor y 6 mm de diámetro como soporte para el crecimiento del cultivo. Las láminas de tejido, de 5 x 5 mm aproximadamente, se dispusieron sobre estos soportes y sobre ellas se añadió una gota de medio de cultivo para crear una delgada lámina de líquido que permitiera, al mismo tiempo, mantener la humedad del explante y garantizar la correcta oxigenación de las células del tejido. Se colocaron dos láminas de tejido por pocillo.

Previamente, con el objetivo de eliminar la influencia de las hormonas sexuales provenientes de las pacientes sobre las muestras extraídas, se cultivaron las láminas de tejido en 1 mL de medio de cultivo DMEM libre de rojo fenol (Lonza) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS por sus siglas en inglés) tratado con carbón activado (Lonza), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 2 mM de L-Glutamina (Sigma-Aldrich) durante 24 horas. A partir de ese momento, se realizó un cambio de medio en el cual se añadió a cada pocillo 1 mL de una mezcla de medio fresco junto con el tratamiento correspondiente, proceso que se llevó a cabo diariamente.

La preparación de los tratamientos que incluían hormonas ováricas se llevó a cabo a partir de soluciones stock preparadas previamente en condiciones estériles y almacenadas a -20 °C. La concentración final de las mismas en 1 mL de cultivo fue de $3,6 \times 10^{-8}$ mol/L de 17β-estradiol (E2, Sigma-Aldrich) y $2,58 \times 10^{-8}$ mol/L de medroxiprogesterona acetato (P4, Sigma-Aldrich). En el caso de los tratamientos que incluían el fármaco Ganirelix (Orgalutrán, 0,25 mg/0,5 mL), este se añadió al cultivo en una concentración de 10^{-8} mol/L. Tanto en el control negativo, sin estimulación hormonal ni aplicación de fármaco, como en el resto de los tratamientos la concentración de etanol, agente utilizado como vehículo para disolver las hormonas, fue del 0.0005%.

La toma de muestras se realizó en los tiempos 6 (T6) y 9 (T9), correspondientes a 7 y 10 días totales de cultivo, respectivamente. Tal y como se observa en la Figura 1, en cada uno de los tiempos se utilizaron dos placas de cultivo. Una de ellas contenía, por pocillo, una lámina de tejido destinada a la extracción de ácidos nucleicos y proteínas (marcada con la letra R en la figura, debido a que posteriormente serían depositadas en RNAlater) y otra a su tinción histológica (marcada con una F, por su posterior almacenamiento en formol), mientras que la otra placa contenía exclusivamente réplicas de las láminas que serían colocadas en RNAlater. En total, se cultivaron 48 piezas por mioma.

Se establecieron seis tratamientos distintos, tal y como se describe a continuación. Los tres primeros representaban las condiciones del tejido sin aplicación de fármaco. El primer pocillo, correspondiente al control negativo (designado como EtOH en la Figura 1), solo contenía etanol utilizado como vehículo, al segundo pocillo (marcado como E2) se le añadió estrógeno con el objetivo de recrear las condiciones hormonales de la fase proliferativa del ciclo menstrual y al tercer pocillo (designado como E2+P4) se le añadió estrógeno y progesterona en concentraciones similares a las presentes en la fase secretora. Los otros tres tratamientos incluían la adición de fármaco. A uno de ellos solo se le añadió el fármaco (marcado con F), mientras que los otros dos pretendían simular los efectos de la adición del fármaco bajo las condiciones hormonales de la fase proliferativa (pocillo marcado con E2+F) y la fase secretora (pocillo designado como E2+P4+F).

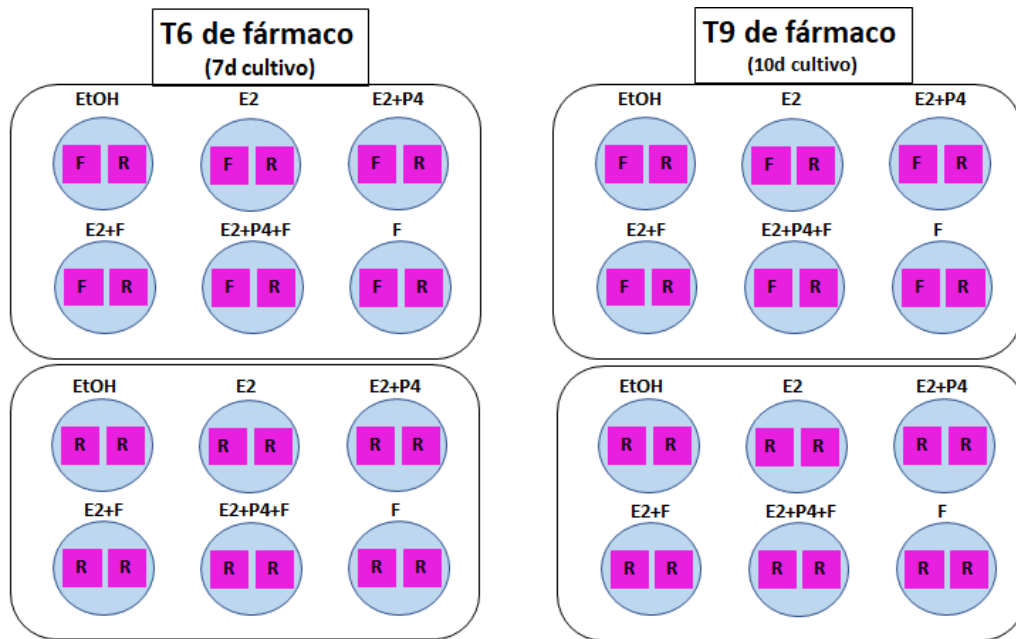


Figura 1. Diseño del cultivo organotípico de los miomas L16, L17 y L18. Se indican los dos tiempos a los que se tomaron las muestras, así como los tratamientos aplicados en cada pocillo y el destino posterior de cada lámina, descritos en el texto.

Tinción histológica

Para la comprobación del estado histológico del tejido, se llevó a cabo una tinción con hematoxilina de Harris y eritrosina de las láminas que habían sido conservadas en formol. En primer lugar, se realizó la inclusión en parafina de las muestras, para luego cortarlas en secciones de 3 μm de grosor. Posteriormente, se procedió a su desparafinado, hidratación y tinción con hematoxilina y eritrosina según un protocolo de tinción estándar (Feldman & Wolfe, 2014).

Extracción de ARN y proteínas

En primer lugar, se trocearon las piezas de mioma con un bisturí y se introdujeron en tubos de matriz de lisis D (MP Biomedicals), a los que previamente se había añadido 500 μL de Tritidy G (PanReac AppliChem). A continuación, se realizó una homogeneización mediante FastPrep-24 5G (MP Biomedicals) en dos pulsos de 30 segundos a velocidad de 6 m/s, con reposo de 5 minutos en hielo entre cada pulso para evitar la degradación del ARN. Tras dejar los tubos 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 100 μL de cloroformo a cada uno y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 12.000 g durante 15 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$ y se

pasó la fase acuosa a un tubo limpio para precipitar el ARN, añadiendo 1 volumen de isopropanol y dejando precipitar a -20 °C toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos, se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 80%, se volvió a centrifugar a 7500 g durante 5 minutos, se dejó secar el pellet y, finalmente, se resuspendió en 25 µL de Agua-DEPC (Sigma-Aldrich).

Por otro lado, la fase fenólica se trató para precipitar las proteínas en todas las muestras. A esta fase fenólica se le añadieron 150 µL de etanol 100%, se agitó con vórtex y se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 2000 g durante 5 minutos a 4 °C, tras lo cual el sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se le añadieron 2 volúmenes de isopropanol para precipitar las proteínas. El pellet fue desechado a excepción de las muestras L16T0, L17T0 y L18T0, en las que se mantuvo para la extracción de ADN tal y como se explica más abajo. Tras agitar en vórtex las proteínas y dejar incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente, se realizó una centrifugación de 10 minutos a 12.000 g y 4 °C, tras la cual se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µL de etanol al 95%. A continuación, se centrifugó de nuevo a 8000 g durante 5 minutos y se lavó el pellet con 250 µL de etanol, se repitió este paso de centrifugación y, finalmente, se retiró el sobrenadante y se dejaron secar los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadieron 100 µL de tampón de lisis (20 mM EDTA, 140 mM NaCl, 5% SDS, 100 mM Tris pH = 8,0) a los tubos para solubilizar las proteínas y se incubaron a 50 °C durante varias horas. Finalmente, se almacenaron los tubos a -20 °C.

Para las muestras en las que se obtuvo el ADN, el pellet obtenido tras la centrifugación de la fase fenólica se lavó con 500 µL de citrato sódico 0.1 M/10% etanol y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó la mezcla a 2.000 g durante 5 minutos y se repitió el proceso de lavado y centrifugación. Posteriormente, se disolvió el ADN en 100 µL de Tris-EDTA 1X, pH = 8 (Sigma-Aldrich), se agitó con vórtex y se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos para precipitar los restos celulares, mientras que el sobrenadante, que contenía el ADN, se guardó a -20 °C.

Limpieza del ARN con DNasa y cuantificación del ARN

Con el objetivo de eliminar de la muestra obtenida de ARN cualquier resto de ADN que hubiera podido quedar, se trató con DNasa I libre de RNasa (Promega). Para ello, se realizó una mezcla de 10 μL tampón 10X, 1 μL de RNasin (40 $\text{u}/\mu\text{L}$), 10 μL de DNasa (1 $\text{u}/\mu\text{L}$) y 54 μL de Agua-DEPC por cada muestra de 25 μL de ARN, con lo que al final resultaba un volumen de 100 μL por tubo de reacción. A continuación, se incubaron los tubos en un termociclador de pre-PCR modelo MultiGene II (Labnet) a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadió a cada uno de los tubos 100 μL de una mezcla de fenol/cloroformo en proporción 3:1, se mezcló mediante vórtex y se centrifugó durante 5 minutos a 18.000 rpm a 4 °C. Después, se recogió el sobrenadante y se le añadió 10 μL de acetato sódico (3 M, pH 5.2) y 300 μL de etanol absoluto y se dejó precipitar toda la noche a -80 °C.

Al día siguiente, se centrifugaron los tubos a 18.000 g y 4 °C durante 15 minutos, tras lo cual se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 80%. Después de volver a centrifugar a 18.000 g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet para, a continuación, resuspenderlo en 25 μL de Agua-DEPC. Finalmente, se realizó la cuantificación a partir del valor de absorbancia del ARN mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

Cuantificación de proteínas

Para realizar la cuantificación de las proteínas extraídas, se utilizó el kit de ensayo de proteínas Pierce Micro BCA (Thermo Fisher Scientific). Previamente, se diluyeron las muestras de proteínas 200 veces y se elaboró una curva patrón con un gradiente de concentraciones de BSA de entre 0,5 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El reactivo de trabajo (WR) se preparó con 25 partes de reactivo MA (carbonato sódico, bicarbonato sódico y tartrato de sodio en 0,2 N de NaOH), 24 partes de reactivo MB (solución al 4% ácido bicinónico en agua) y 1 parte de reactivo MC (solución de sulfato cúprico al 4% en agua pentahidratado). Las muestras se colocaron en una placa de 96 pocillos, en la cual se añadieron primero 150 μL del reactivo de trabajo a cada pocillo y, seguidamente, 150 μL de cada muestra. Posteriormente, se incubó la placa a 37 °C durante dos horas, tras lo cual se midió la

absorbancia de las muestras a 562 nm en el lector de placas EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer).

PCR cuantitativa (qPCR) y Western Blot

Por cuestión de tiempo, no fue posible realizar la cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa y Western Blot tal y como se tenía planeado, por lo que a continuación se detallarán brevemente los marcadores que se pretendían analizar para cada uno de los métodos.

Por un lado, mediante la técnica de Western Blot se pretendía analizar el nivel de expresión génica de los marcadores recogidos en la Tabla 1, los cuales presentan relación con el proceso de proliferación y apoptosis. Se indica, además, los anticuerpos primarios y secundarios que se utilizarían para detectar cada una de estas proteínas.

Marcador	Anticuerpo primario (1)	Anticuerpo secundario (2)	Casa comercial	Tamaño esperado (kDa)
Bcl-2	Mouse IgG1	Anti-mouse IgGk-HRP	Santa Cruz Biotechnology (1 y 2)	26
PCNA	Mouse IgG2a	Anti-mouse IgGk-HRP	Santa Cruz Biotechnology (1 y 2)	35
Caspasa-3	Rabbit IgG	Goat anti-rabbit IgG	Abcam (1) y Bethyl (2)	17
PARP	Rabbit IgG	Goat anti-rabbit IgG	ThermoFisher (1) y Bethyl (2)	135 85 (cleaved)
Beta actina (control)	Mouse IgG1	Anti-mouse IgGk-HRP	Santa Cruz Biotechnology (1 y 2)	43

Tabla 1. Marcadores que se pretendían estudiar mediante el ensayo de Western Blot en las muestras extraídas, junto con los anticuerpos destinados a su detección, la casa comercial que los suministra y el tamaño esperado de las proteínas detectadas. En el caso de la enzima poli-(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), el anticuerpo aplicado detecta tanto la proteína íntegra como PARP rota (cleaved). La beta actina se utiliza como proteína control para normalizar los valores de los otros marcadores.

Por otro lado, se habría realizado la retrotranscripción del ARN extraído y purificado para, posteriormente, someter el ADNc obtenido a un proceso de PCR cuantitativa con el objetivo de determinar el nivel de expresión génica de los marcadores recogidos en la Tabla 2, los cuales se corresponden con genes que codifican componentes de la matriz

extracelular, marcadores de apoptosis y el gen driver *HMGA2*. En este último caso, se pretendía comparar el nivel de expresión de este gen en los miomas con respecto a su miometrio pareado. Con respecto al gen driver *MED12*, se deseaba comprobar, mediante amplificación y secuenciación del ADN extraído a T0, si existía mutación de este gen en los miomas estudiados y, de ser así, si se encontraba en un estado de homocigosis o de heterocigosis, en cuyo caso la amplificación del ADNc obtenido permitiría saber cuál de los alelos se estaba expresando.

Además, en la tabla se incluyen los dos genes de expresión constitutiva o *housekeeping*, *PUM1* (*Pumilio homolog 1*, por sus siglas en inglés) y *GNB2L1* (*Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like-1*, por sus siglas en inglés) que se habrían utilizado para normalizar los valores de expresión génica de los genes diana, puesto que presentan una expresión estable independientemente del tratamiento aplicado (Cañete *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2014).

Gen	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	Longitud del amplicón (pb)
Matriz extracelular			
<i>COL1A1</i>	GAGGGCCAAGACGAAGACATC	CAGATCACGTCATCGACAAC	140
<i>FN1</i>	GAGAATAAGCTGTACCATCGCAA	CGACCACATAGGAAGTCCCAG	200
<i>DPT</i>	TGACAGACAATGGAACACTACGC	TGCTGTAGCGACAACAGTAAAA	203
<i>VCAN</i>	GAAGGCTTGTTGGACGTTGG	ACGGAATCCATAAGTCTGACTC	193
Apoptosis			
<i>APAF1</i>	AGGCTAAAGACCGTCTCCGC	GCTTCAACACCCAAGAGTCCC	94
<i>BAX</i>	TGGGCTGGACATTGGACTTCC	CCGCCACAAAGATGGTCACG	175
<i>BBC3 (PUMA)</i>	AGCCAAACGTGACCACTAGC	CACGGGCAGAGCACAGGATT	179
<i>BCL2L1 (BCL-XL)</i>	TTGGATCCAGGAGAACGGCG	TGAAGCGTTCCTGGCCCTTT	92
<i>BIRC5 (SURVIVIN)</i>	GGACCACCGCATCTCTACATTCA	AGTCTGGCTCGTTCTCAGTGG	116
<i>CASP1</i>	TATGCCTGTTCTGTGATGTGG	CTCTTTCAGTGGTGGGCATCTG	97
<i>CASP3</i>	ACCAAAGATCATACATGGAAGCG	CCCTGAGGTTTGCTGCATCG	176
<i>CASP8</i>	GCCTGAGAGAGCGATGTCCT	TGAGGCATCTGTTTCCCATGT	112
<i>FAS</i>	ACACTGTGACCCTTGACCA	AGAAGACAAAGCCACCCCAAGT	117
<i>FASLG</i>	TCCGAGAGTCTACCAGCCAGAT	CCAGAGGCATGGACCTTGAGT	141
<i>TNFRSF10A/DR4</i>	ATCGGCTCAGGTTGTGGAGG	CACCTGTCAAATCTGCCGGC	187
<i>TNFRSF10B/DR5</i>	TCACAGTTGCAGCCGTAGTCT	AGCTTCTGTCCACACGCTCA	132
<i>TNFSF10 (TRAIL)</i>	CCCTGCTGGCAAGTCAAGTG	TTGCTTCTCCTCTGGTCCCA	176
Genes drivers y housekeeping			
<i>HMGA2</i>	AGAGTCCCTCTAAAGCAGCTCA	CAACTGCTGCTGAGGTAGAAATCG	196
<i>MED12-TUR-F y 3R</i>	TTCTAACGTGCCCCCTTGTT	GTTGGAAGTATCTTGGCAGG	352
<i>MED12 Int1F/Int2R</i>	GCCCTTTCACCTGTTCTCT	TGTCCTATAAGTCTTCCAACC	291
<i>PUM1</i>	GACGCTATGGTGGACTACTTCT	TGGAACGCACCTGATGTTCTG	142
<i>GNB2L1</i>	GAGTGTGGCCTTCTCCTCTG	GCTTGCAGTTAGCCAGGTTTC	224

Tabla 2. Marcadores que se pretendían analizar mediante qPCR. Se incluye la secuencia de los cebadores forward y reverse utilizados para amplificar cada uno de estos genes, así como la longitud del amplicón obtenido. Los genes *housekeeping* *PUM1* y *GNB2L1* se utilizaron para normalizar los valores de qPCR. Todos los marcadores se amplificaron a partir de ADNc a excepción de *MED12 Int1F/Int2R*, que se amplificó a partir de ADN.

Resultados

Tinción histológica

Mediante el análisis histológico de las secciones de mioma, fue posible estudiar la evolución de los tejidos a lo largo del tiempo y bajo cada uno de los tratamientos aplicados. En la Figura 2, puede observarse la comparación de una sección de mioma correspondiente a T0 con respecto a los controles negativos (OH) de los tiempos 6 y 9. En ellos puede observarse la morfología típica de estos tejidos, es decir, la presencia de células de núcleos fusiformes y una abundante cantidad de matriz extracelular, aunque a medida que avanza el tiempo de cultivo se aprecia una pérdida gradual de la estructura del mioma así como del número y morfología de las células con respecto al mioma inicial.

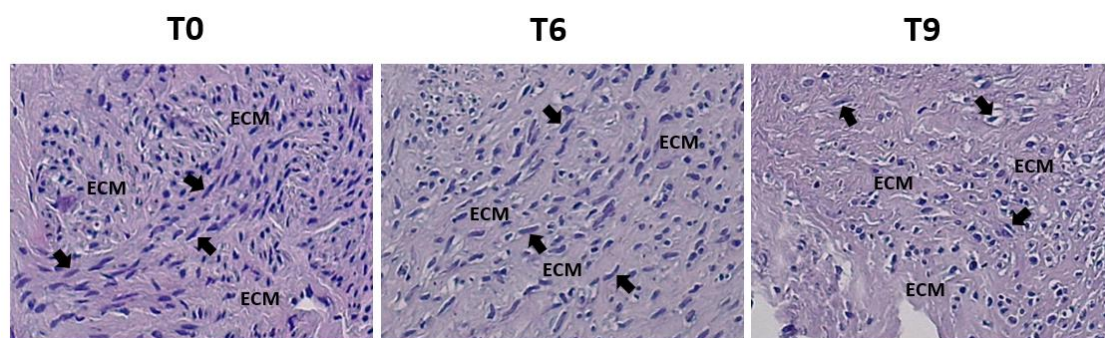


Figura 2. Microfotografías a 20x de secciones del mioma L17 teñidas con hematoxilina-eritrosina correspondientes a T0 y a los controles negativos de los tiempos 6 y 9. Los núcleos celulares aparecen teñidos de violeta (señalados con flechas) y el citoplasma y la matriz celular de rosado.

En las muestras tratadas con fármacos, independientemente de si se les aplicó o no tratamiento hormonal, pudo observarse la presencia de núcleos con acumulación de eosina y picnosis características del proceso apoptótico, en el que se produce una condensación de la cromatina nuclear, tal y como se señala en la Figura 3. Además, al analizar las secciones que recibieron solamente tratamiento hormonal, sin adición de fármaco, se puede apreciar que la estructura tisular y la morfología celular típica de estos tejidos se mantiene de manera más duradera en las muestras que fueron tratadas con estrógeno y progesterona, en comparación con las que fueron tratadas exclusivamente con estrógenos, en las cuales llama la atención la presencia de algunos núcleos picnóticos.

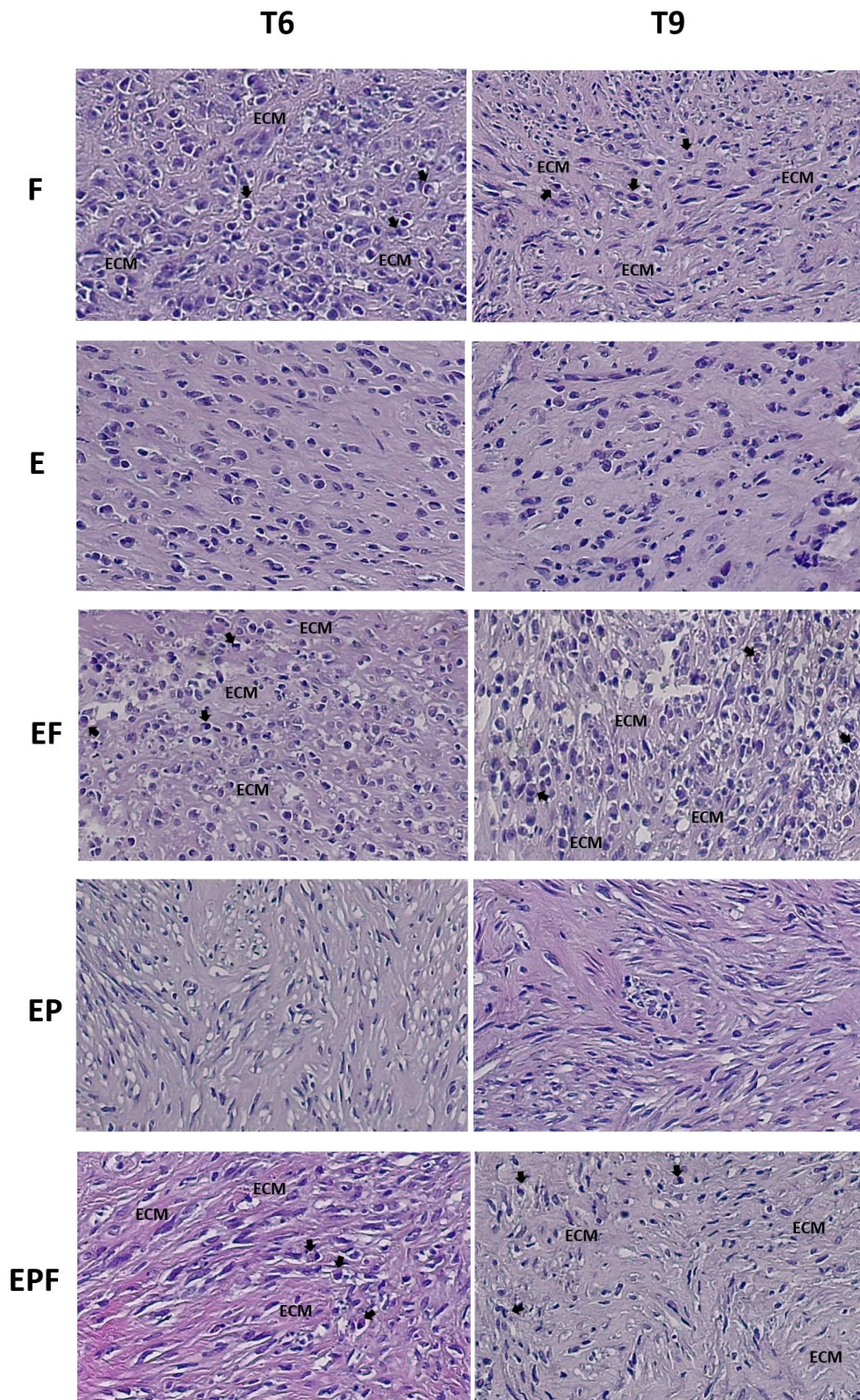


Figura 3. Microfotografías a 20X de las muestras del mioma L17 de cada uno de los tratamientos con fármaco y hormonas de T6 y T9. En las secciones a las que se les aplicó el fármaco, las flechas señalan los núcleos en los que se aprecia una acumulación de eosina (color rojizo). E = E₂, P = P₄, F = fármaco (Ganirelix).

Cuantificación de ARN y proteínas

A continuación, se recogen las tablas de datos referentes a la extracción y cuantificación del ARN y las proteínas obtenidas. En el caso de las muestras correspondientes a T0, se incluyen también los valores cuantificados para las secciones de miometrio pareado de cada uno de los miomas, tanto para el ARN (Tabla 1) como para las proteínas (Tabla 5). Cabe destacar que el protocolo empleado ha sido optimizado de manera que sea posible extraer ADN, ARN y proteínas a partir de una misma muestra con la suficiente calidad y cantidad de todos ellos.

En primer lugar, con respecto a los valores de ARN cuantificados, llama la atención las concentraciones relativamente elevadas que pudieron obtenerse a partir de muestras tan pequeñas, así como su grado de pureza, que se establece mediante los ratios A260/A280 y A260/A230 determinados por el espectrofotómetro. El primer ratio permite comprobar si la muestra se encuentra contaminada por proteínas, las cuales presentan un pico de absorbancia a 280 nm, mientras que el segundo parámetro permite establecer si están presentes contaminantes que absorben a 230 nm, como sales caotrópicas y fenoles utilizados durante el proceso de extracción. En el caso de la relación A260/A280, la obtención de valores cercanos a 2 indica que la muestra de ARN presenta un adecuado nivel de pureza, mientras que el valor de A260/A230 obtenido debe encontrarse entre 1,5 y 2,2. En las Tablas 1-4, se observa que la mayoría de las muestras presentan unos ratios que se adecúan a las condiciones descritas, por lo que se puede afirmar que la pureza del ARN extraído mediante este protocolo es bastante buena.

	Concentración (ng/ μ L)	A260/A280	A260/A230
L16T0	293,64	2,02	1,93
M16T0	406,38	2,12	2,13
L17T0	588,25	2,03	2,04
M17T0	399,79	2,07	2,01
L18T0	457,56	2,08	2,02
M18T0	783,49	2,14	2,09

Tabla 3. Datos de la cuantificación de ARN en las muestras correspondientes al T0 de cada muestra de mioma y miometrio, obtenidas mediante espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Se incluye la concentración de ARN en ng/ μ L y los ratios de pureza de las muestras cuantificadas.

	T6			T9		
	Concentración	A260/A280	A260/A230	Concentración	A260/A280	A260/A230
OH	253,88	2,05	1,92	540,83	1,76	2,02
	296,55	2,03	1,95	-	-	-
	289,01	2,01	1,86	-	-	-
F	390,56	1,85	1,98	382,1	1,9	2,08
	122,09	1,94	1,67	-	-	-
	275,69	1,82	2	-	-	-
E	259,98	1,99	2,03	148,92	1,96	1,86
	110,61	1,9	1,95	-	-	-
	413,62	1,89	2,12	-	-	-
EF	352,79	1,85	2,11	585,73	1,95	1,96
	140,67	1,9	1,71	-	-	-
	195,51	1,99	1,92	-	-	-
EP	303,65	1,99	1,93	378,32	1,99	1,89
	241,47	1,99	1,86	-	-	-
	261,38	2,01	1,79	-	-	-
EPF	504,62	2,06	1,85	202,7	1,95	1,78
	166,22	1,92	1,57	-	-	-
	398,2	2,01	1,83	-	-	-

Tabla 4. Datos de la cuantificación de ARN correspondientes a las muestras de L16 a T6 y T9 para cada uno de los tratamientos. Para T9 solo se incluye una réplica de cada tratamiento, ya que la placa en que se encontraban las otras dos se contaminó con un hongo y tuvo que ser desechada. Se recoge la concentración en ng/ μ L y los ratios de pureza.

	T6			T9		
	Concentración	A260/A280	A260/A230	Concentración	A260/A280	A260/A230
OH	239,93	2,07	2,03	186,3	2,05	1,92
	101,07	1,99	2,02	369,28	2,09	1,98
	264,13	2,04	1,89	419,89	2,08	1,94
F	307,77	2,06	2,01	278,03	2,1	1,91
	250,59	2,03	2,05	198,06	2,05	2,03
	152,93	2	1,85	131,97	2,04	1,82
E	211,55	2,03	2,14	179,43	2,06	1,99
	200,68	1,97	1,97	371,93	2,04	1,98
	243,58	2,01	2,06	302,69	2,09	2,06
EF	338,32	2,09	2,11	118,41	2,05	1,92
	247,63	2	1,93	290,82	2,08	1,94
	245,37	2,05	2,12	309,88	2,05	1,98
EP	307,94	2,05	1,94	139,78	2,02	1,83
	348,05	2,02	1,97	254,78	2,02	1,86
	247,59	2,01	1,82	203,46	2,05	1,99
EPF	172,55	2,01	1,86	317,28	2,08	1,86
	195,84	2	2,03	187,83	2,05	1,87
	144,45	1,97	1,68	195,98	2	1,8

Tabla 5. Datos de la cuantificación de ARN correspondientes a las muestras del mioma L17 a T6 y T9 para cada uno de los tratamientos. Se recoge la concentración en ng/ μ L y los ratios de pureza.

	T6			T9		
	Concentración	A260/A280	A260/A230	Concentración	A260/A280	A260/A230
OH	148,73	2,05	2,02	225,45	2,04	2,04
	327,09	2,1	2,02	104,08	1,91	2,07
	255,7	2,08	2,06	-	-	-
F	311,53	2,12	2,04	163,24	1,99	1,71
	401,63	2,1	2	740,1	2,06	2,11
	288,91	2,11	2,04	566,74	2,1	2,07
E	358,65	2,1	2,07	26,64	1,56	1,98
	520,29	2,08	2,09	411,38	2,07	2,06
	326,95	2,09	2	22,4	1,61	2,07
EF	419,73	2,1	2,04	137,99	1,89	2,03
	409,87	2,09	2,03	439,83	2,05	2,1
	305,61	2,1	2,04	348,47	2,03	2,05
EP	275,97	2,08	2,01	83,76	1,85	2,08
	345,78	2,1	2,06	215,76	2,04	2,1
	357,56	2,1	2,05	256,78	2,04	2,08
EPF	113,59	2,04	1,97	130,16	1,98	2,04
	138,15	2,04	1,83	419,58	2,07	2,09
	430,15	2,09	2,02	305,15	2,06	2,04

Tabla 6. Datos de la cuantificación del ARN de las muestras de L18 a T6 y T9 para cada uno de los tratamientos. Se recoge la concentración en ng/ μ L y los ratios de pureza.

En cuanto a las proteínas, se adjuntan las tablas de valores expresados como concentración de proteínas (μ g/ μ L) en las muestras analizadas, tanto de los miomas y miometriosis a T0 (Tabla 5) como de las muestras de T6 y T9 sometidas a los distintos tratamientos (Tabla 6). Cabe destacar que el kit Micro BCA empleado para realizar la cuantificación es bastante sensible a la presencia de pequeñas cantidades de proteínas en las muestras, lo cual permite detectar y determinar el contenido proteico de muestras relativamente pequeñas o diluidas. Además, este kit es compatible con un amplio rango de productos presentes en la mayoría de las soluciones que se utilizan para resuspender proteínas, a diferencia de otros kits. Asimismo, mediante este método se obtienen curvas patrón con valores de correlación (R^2) cercanos a 1, lo cual nos permite estimar la concentración de proteínas de una muestra en base a su absorbancia a partir de la ecuación de la recta obtenida, siempre que su valor caiga dentro del rango de concentraciones que se han utilizado para elaborar la curva patrón. La Figura 4 muestra una de estas gráficas calculadas durante la cuantificación de las proteínas de las distintas muestras.

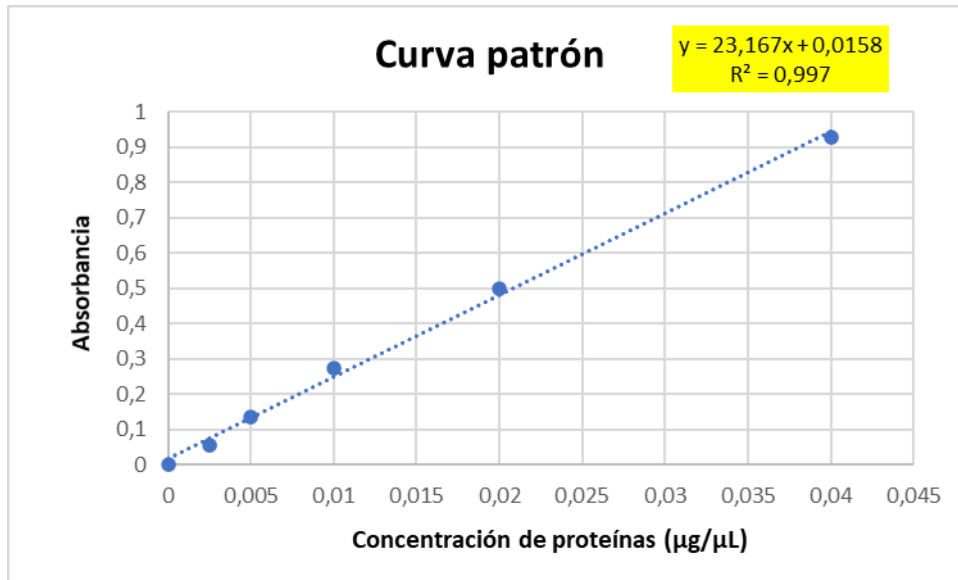


Figura 4. Curva patrón elaborada para la cuantificación de las proteínas contenidas en las muestras correspondientes a L18T6 para los distintos tratamientos. En la esquina superior derecha se observa la ecuación de la recta obtenida y el valor de correlación (R^2)

	Concentración de proteínas (µg/µL)
L16T0	4,19
M16T0	3,64
L17T0	2,53
M17T0	2,42
L18T0	1,96
M18T0	2,70

Tabla 7. Datos de la cuantificación de proteínas correspondientes a las muestras de miomas y miometriosis de T0, expresados como concentración de proteínas.

	L16		L17		L18	
	T6	T9	T6	T9	T6	T9
OH	1,24	2,25	1,12	1,78	0,96	0,80
	1,61	-	1,08	1,67	1,70	1,77
	2,00	-	1,39	1,97	1,08	-
F	2,48	1,53	2,29	1,83	1,79	1,20
	1,63	-	1,41	1,31	1,69	3,08
	1,75	-	1,78	1,92	1,40	1,66
E	1,82	2,00	1,53	1,28	2,38	0,60
	1,16	-	1,76	1,60	1,93	2,16
	1,36	-	1,63	1,94	1,66	1,43
EF	1,66	3,19	1,80	1,23	1,74	1,27
	2,05	-	2,41	1,61	2,82	1,86
	1,22	-	1,02	2,20	1,60	2,03
EP	1,65	1,67	2,62	0,88	1,79	0,63
	2,10	-	2,37	1,68	1,50	1,24
	2,15	-	2,07	1,26	2,24	1,38
EPF	2,48	1,33	2,67	1,88	0,90	1,48
	1,63	-	1,07	1,53	0,56	1,97
	1,75	-	0,97	1,47	1,80	1,95

Tabla 8. Datos de la cuantificación de proteínas de las secciones correspondientes a los tres miomas L16, L17 y L18 para cada uno de los tratamientos a T6 y T9, expresados como concentración de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$). En el caso de las muestras correspondientes a L16T9, solo se ofrecen los resultados de una réplica de cada tratamiento, ya que las placas que contenían las otras réplicas se contaminaron con un hongo y tuvieron que ser desechadas.

Discusión

Este trabajo tenía como objetivo principal determinar si un fármaco ampliamente usado para tratar a las pacientes sintomáticas con fibromas, y que *in vivo* reduce considerablemente el tamaño del tumor, ejerce un efecto directo sobre cultivos organotípicos de miomas, donde están presentes todas las células tumorales, así como la abundante ECM (Salas *et al.*, 2020). Además, dado que la mayoría de los miomas crecen y suelen extirparse en edad premenopáusica, era fundamental determinar si el efecto del fármaco se mantenía en presencia de las condiciones fisiológicas características del ciclo menstrual, con una fase proliferativa dominada por estrógenos y una fase secretora dominada por la progesterona.

A partir del análisis preliminar de las secciones de mioma teñidas con hematoxilina-eritrosina, parece que efectivamente el fármaco ejerce un efecto proapoptótico sobre estos fibromas, determinado por la mayor presencia de núcleos picnóticos en aquellas

muestras expuestas al fármaco, tanto solo como en presencia de las hormonas ováricas. Este análisis cualitativo a nivel histológico debería comprobarse con un ensayo TUNEL, que permitirá cuantificar el grado de apoptosis en las diferentes condiciones ensayadas. A nivel molecular, existen estudios previos usando cultivos tradicionales donde se han testado antagonistas de GnRH. Así, se ha comprobado que la adición del fármaco Cetrorelix sobre cultivos *in vitro* de células de leiomioma reduce la expresión de PCNA (Chen *et al.*, 2005). Esta proteína, cuyos niveles aumentan considerablemente durante la fase S del ciclo celular, presenta una expresión incrementada en los fibromas uterinos en comparación con el miometrio sano, alcanzando niveles mayores en la fase secretora que en la fase proliferativa (Shimomura *et al.*, 1998). Además, se ha observado que la aplicación de estrógenos y progesterona sobre células de leiomioma en cultivos *in vitro* provoca un aumento de la expresión de PCNA (Shimomura *et al.*, 1998; Maruo *et al.*, 2000), lo cual demuestra que estas hormonas sexuales son esenciales para el crecimiento de los leiomiomas uterinos. Por tanto, resulta de gran importancia averiguar el efecto de Cetrorelix sobre la proliferación celular en presencia de las hormonas ováricas.

Por otro lado, se ha visto que Cetrorelix aumenta la expresión de ARNm de marcadores apoptóticos como *FAS*, *BAX* y *CASPASA-3*, por lo que también promueve la apoptosis en las células de leiomioma (Chen *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2005). Asimismo, se ha observado un aumento de los niveles de poli(adenosina 5'-difosfato-ribosa) polimerasa (PARP) rota debido a la actividad proteolítica de caspasa-3, cuyos niveles aumentan durante el proceso apoptótico. PARP es una enzima implicada en procesos de replicación y reparación del ADN, así como en la transcripción y la apoptosis (Bouchard *et al.*, 2003). Durante este último proceso, PARP es inactivada por caspasa-3, por lo cual el aumento de los niveles de PARP rota provocado por la aplicación de antagonistas de GnRH sugiere que el proceso apoptótico desencadenado en las células de leiomioma es causada, al menos en parte, por la activación de la ruta de las caspasas (Chen *et al.*, 2005). Además, con respecto a la proteína inhibidora de la apoptosis BCL-2, se ha visto que Cetrorelix disminuye su expresión (Kwon *et al.*, 2005). Esta proteína está presente en grandes cantidades en células de leiomiomas en comparación con el miometrio sano,

y sus niveles son mayores durante la fase secretora en comparación con la fase proliferativa, al igual que sucede con PCNA (Maruo *et al.*, 2000). Además, en cultivos *in vitro* de células miomatosas, la aplicación de progesterona estimula considerablemente la expresión de este marcador antiapoptótico, en comparación con los controles y con las células tratadas con estrógenos (Matsuo *et al.*, 1997; Maruo *et al.*, 2000). Esto implica que la progesterona, hormona predominante en la fase secretora, juega un papel relevante en el desarrollo y crecimiento de los leiomiomas uterinos mediante la prolongación de la supervivencia celular producida por la sobreexpresión de BCL-2. Nuevamente, sería interesante determinar si Cetorelix es capaz de regular la expresión tanto de BCL-2 como del resto de marcadores apoptóticos en presencia de las hormonas sexuales.

Finalmente, otros estudios han investigado la capacidad de los antagonistas de GnRH para inhibir la excesiva producción de matriz extracelular que caracteriza a los fibromas uterinos. En este sentido, se ha observado que la aplicación de Cetorelix sobre células de leiomioma en cultivos *in vitro* reduce considerablemente la expresión de colágeno tipo 1, fibronectina y versicano (Britten *et al.*, 2012). Posteriormente, se investigó el efecto de este fármaco sobre cultivos 3D de líneas celulares de leiomiomas inmortalizadas en presencia de hormonas ováricas. Los resultados indican que los niveles de colágeno tipo 1, fibronectina y versicano aumentan considerablemente en presencia de las hormonas ováricas, sobretodo cuando se aplican estrógeno y progesterona conjuntamente, y que el antagonista de GnRH Cetorelix reduce de manera significativa las cantidades de estas proteínas componentes de la ECM incluso en presencia de las hormonas (Malik *et al.*, 2016). Estas observaciones sugieren que el crecimiento de los leiomiomas uterinos puede verse incrementado durante la fase secretora del ciclo ovulatorio, cuando se encuentran presentes tanto estrógeno como progesterona, y que la aplicación de antagonistas de GnRH directamente sobre estos tumores tiene un efecto inhibitorio sobre su desarrollo.

Con respecto al presente estudio, el análisis molecular de los marcadores seleccionados en las muestras de ARN y proteínas extraídas permitirá confirmar o refutar estas observaciones y comprobar si existen diferencias significativas en la expresión de estos

marcadores en los tejidos sometidos a los distintos tratamientos. De esta manera, podrá determinarse si la adición de Ganirelix en explantes *ex vivo* de los tumores resulta una alternativa eficaz para el tratamiento de los leiomiomas, así como comprobar si el efecto del fármaco se encuentra influido por las diferentes condiciones hormonales que se establecen a lo largo del ciclo ovulatorio. Estos hallazgos podrían sentar las bases que condujeran a una futura administración local de estos fármacos para, de esta manera, evitar los efectos secundarios no deseados que provoca su aplicación sistémica y, por tanto, aumentar la seguridad del tratamiento.

Conclusiones

- I. La estructura histológica en cultivos organotípicos de leiomiomas uterinos se mantuvo relativamente estable hasta los 10 días de cultivo.
- II. En presencia de hormonas ováricas, especialmente estrógenos y progesterona, la morfología de los tejidos pareció mantenerse más estable a los 10 días de cultivo, con mayor número de células y menor número de núcleos picnóticos en comparación con los controles.
- III. La aplicación del fármaco Ganirelix sobre cultivos organotípicos de leiomioma pareció aumentar la presencia de núcleos picnóticos en estos tejidos incluso en presencia de hormonas ováricas.
- IV. El protocolo utilizado para la extracción conjunta de ácidos nucleicos y proteínas permitió obtener ARN de gran pureza, así como cantidades de proteínas relativamente grandes.

Conclusions

- I. The architecture of organotypic culture tissue slices obtained from uterine leiomyoma remained stable for up to 10 days of culture.
- II. Ovarian steroids, specially estrogen and progesterone, seemed to preserve tissue morphology for up to 10 days of culture, with greater cell numbers and fewer pyknotic nuclei than controls.

- III. The GnRH antagonist Ganirelix seemed to increase pyknotic nuclei in organotypic culture of fibroid slices, even under the influence of ovarian steroids.
- IV. The protocol we used to simultaneously extract and purify nucleic acids and proteins allowed to obtain highly pure RNA, as well as large quantities of proteins.

Agradecimientos

Me gustaría dar las gracias a la Dra. Teresa Acosta Almeida por permitirme participar en este proyecto y por ofrecerme una solución cuando no fue posible continuar con la parte experimental del trabajo debido al comienzo del confinamiento, además de estar ahí para resolver cualquier duda que tuviera con respecto a la redacción del proyecto. Asimismo, agradezco infinitamente a Ana Salas Pérez por enseñarme con paciencia y dedicación las diversas técnicas que utilizamos en el laboratorio, y por su disposición a resolver todas las dudas que me fueron surgiendo a lo largo del camino.

También quiero dar las gracias a mi familia, que siempre ha estado a mi lado para ayudarme y apoyarme en los momentos más difíciles de la carrera.

Bibliografía

- Ali, M., & Al-Hendy, A. (2017). Selective progesterone receptor modulators for fertility preservation in women with symptomatic uterine fibroids. *Biology of Reproduction*, 97(3), 337-352. doi:10.1093/biolre/iox094
- Almeida, T. A., Quispe-Ricalde, A., Montes de Oca, F., Foronda, P., & Hernández, M. (2014). A high-throughput open-array qPCR gene panel to identify housekeeping genes suitable for myometrium and leiomyoma expression analysis. *Gynecologic Oncology*, 134, 138-143. doi:10.1016/j.ygyno.2014.04.012
- Borahay, M. A., Al-Hendy, A., Kilic, G., & Boehning, D. (2015). Signaling pathways in leiomyoma: understanding pathobiology and implications for therapy. *Molecular Medicine*, 21, 242-256. doi:10.2119/molmed.2014.00053
- Bouchard, V. J., Rouleau, M., & Poirier, G. (2003). PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Experimental Hematology*, 31(6), 446-454. doi:10.1016/s0301-472x(03)00083-3
- Britten, J. L., Malik, M., Levy, G., Mendoza, M., & Catherino, W. (2012). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist leuprolide acetate and GnRH antagonist cetrorelix acetate directly inhibit leiomyoma extracellular matrix production. *Fertility and Sterility*, 98(5), 1299-1307. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.07.1123
- Cañete, H., Dorta, H., Hernández, M., Cejudo Román, A., Candenás, L., Pinto, F., . . . Almeida, T. (2013). Differentially regulated expression of neurokinin B (NKB)/NK3 receptor system

- in uterine leiomyomata. *Human Reproduction*, 28(7), 1799-1808.
doi:10.1093/humrep/det128
- Chen, W., Yoshida, S., Ohara, N., Matsuo, H., Morizane, M., & Maruo, T. (2005). Gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix down-regulates proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor expression and up-regulates apoptosis in association with enhanced poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase expression. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(2), 884-892.
doi:10.1210/jc.2004-1591
- Eldar-Geva, T., Meagher, S., Healy, D., MacLachlan, V., Breheny, S., & Wood, C. (1998). Effect of intramural, subserosal, and submucosal uterine fibroids on the outcome of assisted reproductive technology treatment. *Fertility and Sterility*, 70(4), 687-691.
doi:10.1016/S0015-0282(98)00265-9
- Feldman, A. T., & Wolfe, D. (2014). Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. En C. E. Day, *Histopathology: Methods and Protocols* (Vol. 1180, págs. 31-43). New York: Humana Press. doi:10.1007/978-1-4939-1050-2_3
- Fiebitz, A., Fritsch, M., Reichelt, U., Ruester, C., Chiantera, V., Vercellino, G., . . . Mechsner, S. (2012). Optimized culture conditions for tissue explants of uterine leiomyoma. *Clinical Laboratory*, 58(11-12), 1153-1164. doi:10.7754/Clin.Lab.2012.111117
- Galindo, L. J., Hernández-Beeftink, T., Salas, A., Jung, Y., Reyes, R., Montes de Oca, F., . . . Almeida, T. (2018). HMGA2 and MED12 alterations frequently co-occur in uterine leiomyomas. *Gynecologic Oncology*, 150, 562-568. doi:10.1016/j.ygyno.2018.07.007
- Ishikawa, H., Ishi, K., Serna, V., Kakazu, R., Bulun, S., & Kurita, T. (2010). Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. *Endocrinology*, 151(6), 2433-2442. doi:10.1210/en.2009-1225
- Islam, M. S., Ciavattini, A., Petraglia, F., Castellucci, M., & Ciarmela, P. (2018). Extracellular matrix in uterine leiomyoma pathogenesis: a potential target for future therapeutics. *Human Reproduction Update*, 24(1), 59-85. doi:10.1093/humupd/dmx032
- Islam, M. S., Protic, O., Stortoni, P., Grechi, G., Lamanna, P., Petraglia, F., . . . Ciarmela, P. (2013). Complex networks of multiple factors in the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Fertility and Sterility*, 100(1), 178-193.
doi:10.1016/j.fertnstert.2013.03.007
- Koohestani, F., Braundmeier, A., Mahdian, A., Seo, J., Bi, J., & Nowak, R. (2013). Extracellular matrix collagen alters cell proliferation and cell cycle progression of human uterine leiomyoma smooth muscle cells. *PLoS ONE*, 8(9), 1-15.
doi:10.1371/journal.pone.0075844
- Kwon, J., Park, K., Park, Y., & Cho, N. (2005). Effect of cetrorelix acetate on apoptosis and apoptosis regulatory factors in cultured uterine leiomyoma cells. *Fertility and Sterility*, 84(5), 1526-1528. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.06.022
- Mäkinen, N., Kämpjärvi, K., Frizzel, N., Bützow, R., & Vahteristo, P. (2017). Characterization of MED12, HMGA2, and FH reveals molecular variability in uterine smooth muscle tumors. *Molecular Cancer*, 16(101), 1-8. doi:10.1186/s12943-017-0672-1
- Malik, M., Britten, J., Cox, J., Patel, A., & Catherino, W. (2016). Gonadotropin-releasing hormone analogues inhibit leiomyoma extracellular matrix despite presence of gonadal hormones. *Fertility and Sterility*, 105(1), 214-224.
doi:10.1016/j.fertnstert.2015.09.006
- Maruo, T., Matsuo, H., Samoto, T., Shimomura, Y., Kurachi, O., Gao, Z., . . . Johansson, E. (2000). Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Steroids*, 65, 585-592.

- Matsuo, H., Maruo, T., & Samoto, T. (1997). Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *82*(1), 293-299.
- Mello, J. B., Barros-Filho, M., Abreu, F., Cirilo, P., Domingues, M., Pontes, A., & Rogatto, S. (2018). MicroRNAs involved in the HMGA2 deregulation and its co-occurrence with MED12 mutation in uterine leiomyoma. *Molecular Human Reproduction*, *24*(11), 556-563. doi:10.1093/molehr/gay037
- Moravek, M. B., Yin, P., Ono, M., Coon, V. J., Dyson, M. T., Navarro, A., . . . Bulun, S. (2015). Ovarian steroids, stem cells and uterine leiomyoma: therapeutic implications. *Human Reproduction Update*, *21*(1), 1-12. doi:10.1093/humupd/dmu048
- Neri, M., Melis, G. B., Giancane, E., Vallerino, V., Pilloni, M., Piras, B., . . . Mais, V. (2019). Clinical utility of Elagolix as an oral treatment for women with uterine fibroids: a short report on the emerging efficacy data. *International Journal of Women's Health*, *11*, 535-546. doi:10.2147/IJWH.S185023
- Parker, J. D., Malik, M., & Catherino, W. (2007). Human myometrium and leiomyomas express gonadotropin-releasing hormone 2 and gonadotropin-releasing hormone 2 receptor. *Fertility and Sterility*, *88*(1), 39-46. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.11.098
- Parsanezhad, M. E., Jahromi, B., & Parsa-Nezhad, M. (2012). Medical management of uterine fibroids. *Current Obstetrics and Gynecology Reports*, *1*, 81-88. doi:10.1007/s13669-012-0008-5
- Patel, A., Malik, M., Britten, J., Cox, J., & Catherino, W. (2016). Mifepristone inhibits extracellular matrix formation in uterine leiomyoma. *Fertility and Sterility*, *105*(4), 1102-1110. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.12.021
- Pavone, D., Clemenza, S., Sorbi, F., Fambrini, M., & Petraglia, F. (2018). Epidemiology and risk factors of uterine fibroids. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 3-11. doi:10.1016/j.bpobgyn.2017.09.004
- Salas, A., López, J., Reyes, R., Évora, C., Montes de Oca, F., Báez, D., . . . Almeida, T. (2020). Organotypic culture as a research and preclinical model to study uterine leiomyomas. *Scientific Reports*, *10*(1), 5212-5223. doi:10.1038/s41598-020-62158-w
- Serdar, E., & Bulun, M. (2013). Uterine fibroids. *The New England Journal of Medicine*, *369*(14), 1344-1355. doi:10.1056/NEJMra1209993
- Shimomura, Y., Matsuo, H., Samoto, T., & Maruo, T. (1998). Up-regulation by progesterone of proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor expression in human uterine leiomyoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *83*(6), 2192-2198.
- Sohn, G. S., Cho, S., Kim, Y., Cho, C., Kim, M., & Lee, S. (2018). Current medical treatment of uterine fibroids. *Obstetrics & Gynecology Science*, *61*(2), 192-201. doi:10.5468/ogs.2018.61.2.192
- Tsigkou, A., Reis, F., Lee, M., Jiang, B., Tosti, C., Centini, G., . . . Petraglia, F. (2015). Increased progesterone receptor expression in uterine leiomyoma: correlation with age, number of leiomyomas, and clinical symptoms. *Fertility and Sterility*, *104*(1), 170-175. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.04.024
- Zepiridis, L., Grimbizis, G., & Tarlatzis, B. (2016). Infertility and uterine fibroids. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, *34*, 66-73. doi:10.1016/j.bpobgyn.2015.12.001