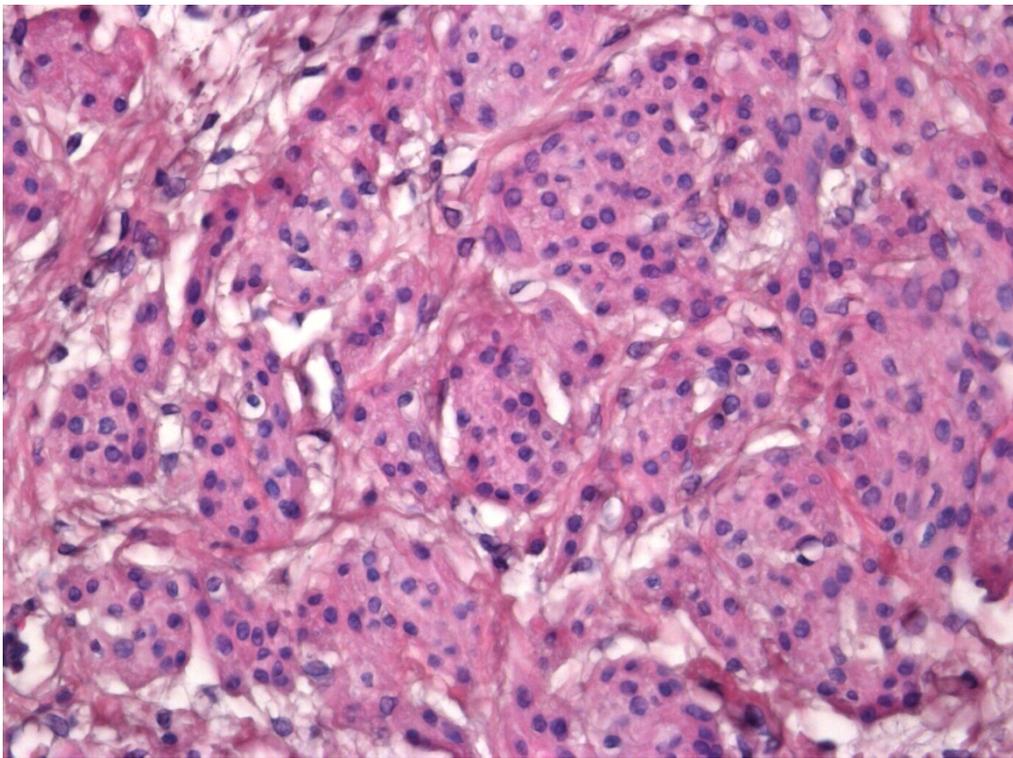




Sección de Biología
Universidad de La Laguna

Inflamación miometrial y desarrollo de leiomiomas uterinos

Myometrial inflammation and development of uterine leiomyomas



Trabajo de Fin de Grado
Carlota Benedicto Marrero

Tutorizado por Ricardo Reyes Rodríguez y Aixa Rodríguez Bello

Grado en Biología. Junio 2021

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	1
Introducción	2
Objetivos	6
Materiales y Métodos	7
1. Procesado de las muestras	7
2. Análisis histológico	8
a. Tinción hematoxilina-eritrosina	8
b. Tinción Tricrómico de Masson	9
c. Tinción Azul de Toluidina	9
3. Inmunohistoquímica	10
a. Antisueros y anticuerpos primarios	11
b. Anticuerpos secundarios	12
4. Deshidratación y montaje	12
5. Análisis de las muestras	12
a. Análisis semicuantitativo	13
Resultados	14
1. Análisis de la matriz extracelular (MEC) en miometrio y leiomioma de pacientes control y tratadas con UPA	14
2. Análisis de la presencia del Colágeno I en miometrio y leiomioma de pacientes control y tratadas con UPA	16
3. Análisis de las células cebadas en miometrio y leiomioma de pacientes control y tratadas con UPA	17
4. Análisis de la presencia de macrófagos (células CD68-ir) en miometrio y leiomioma de pacientes control y tratadas con UPA	19
5. Análisis de la presencia de miofibroblastos como indicadores de inflamación crónica y producción de fibrosis anormal en miometrio y leiomioma de pacientes control y tratadas con UPA	21
6. Análisis de la presencia de Ki67 en miometrio y leiomioma de pacientes control y tratadas con UPA	22
Discusión	24
Conclusiones	28
Conclusions	29
Bibliografía	30

Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis tutores Ricardo y Aixa por ayudarme y acompañarme durante todo el periodo de realización de este trabajo. También a las compañeras del departamento de Biología Celular, María del Carmen, Ana, Natalia y Laurette por acogerme tan bien en el departamento durante el periodo de trabajo en el laboratorio.

Por otro lado, dar las gracias también a mis padres, mi hermana Alba y mis amigas Gloria, Andrea y Adriana, por estar a mi lado siempre y animarme no solo durante la realización de este trabajo sino en estos cuatro años de carrera.

Y finalmente, a mis compañeros de clase, en especial Nacho, Pável y Silvia ya que esta carrera no habría sido lo mismo sin ustedes.

¡Muchísimas gracias!

Resumen

Los leiomiomas uterinos son los tumores benignos de origen miometrial más comunes del tracto reproductor femenino. Se caracterizan por un aumento de matriz extracelular (MEC) y un mayor índice de proliferación, en relación con el miometrio, siendo promovidos por procesos de inflamación crónica e influencia hormonal. Nuestro objetivo fue estudiar y comparar, en miometrio y leiomioma de pacientes control y tratadas con acetato de ulipristal (UPA), un modulador selectivo de los receptores de progesterona (SPRMs), la MEC y sus características, la presencia de células proinflamatorias y profibróticas, además de la proliferación celular. En las pacientes control, la MEC es más abundante en el leiomioma que en el miometrio, mientras que la presencia de colágeno I y macrófagos no muestra diferencias. El número de células cebadas y miofibroblastos es superior en el leiomioma, y las células Ki67-ir más abundantes en el miometrio. El tratamiento con UPA redujo la MEC y el colágeno I en ambos tejidos, disminuyó células cebadas y macrófagos, contrariamente a lo observado en el tejido miometrial, y aumentó ligeramente las células Ki67-ir en el leiomioma. Además, provocó la aparición de miofibroblastos en el miometrio y un aumento de los mismos en el leiomioma. En conclusión, en las muestras analizadas, el tratamiento con UPA redujo la MEC y algunas de las células inflamatorias mientras que aumentó la proliferación celular y la presencia de miofibroblastos, en el leiomioma. En el miometrio indujo la presencia de miofibroblastos, además de aumentar la presencia de células proinflamatorias.

Palabras clave: leiomioma, miometrio, matriz extracelular, inflamación crónica, colágeno, miofibroblastos, células cebadas, macrófagos, proliferación celular.

Abstract

Uterine leiomyomas are benign tumors of myometrial origin and the most common in the female reproductive tract. They are characterized by an increase in extracellular matrix (ECM) and a higher rate of proliferation, in relation to the myometrium, being promoted by processes of chronic inflammation and hormonal influence. Our objective was to study and compare, in myometrium and leiomyoma of control patients and treated with ulipristal acetate (UPA), a selective progesterone receptors modulator (SPRM), the ECM and its characteristics, the presence of proinflammatory and profibrotic cells, in addition to cell proliferation. In control patients, the ECM is more abundant in the leiomyoma than in the myometrium, while the presence of collagen I and macrophages shows no differences. The number of mast cells and

myofibroblasts is higher in leiomyoma, and Ki67-ir cells most abundant in the myometrium. UPA treatment reduced the ECM and collagen I in both tissues, decreased mast cells and macrophages, in contrast to what was observed in myometrial tissue, and slightly increased Ki67-ir cells in leiomyoma. In addition, it caused the appearance of myofibroblasts in the myometrium and an increase in them in leiomyoma. In conclusion, in the samples analyzed, UPA treatment reduced ECM and some of the inflammatory cells while increased cell proliferation and the presence of myofibroblasts in leiomyoma. In the myometrium it induced the presence of myofibroblasts, in addition to increasing the presence of proinflammatory cells.

Keywords: leiomyoma, myometrium, extracellular matrix, chronic inflammation, collagen, myofibroblasts, mast cells, macrophages, cell proliferation.

Introducción

Los leiomiomas uterinos, también conocidos como miomas o fibromas, son los tumores benignos más comunes del tacto reproductor femenino (Lewis *et al.*, 2018) y están compuestos por células de músculo liso, acompañadas de tejido conjuntivo con fibroblastos y una cantidad variable de matriz extracelular (MEC) (Stewart *et al.*, 2016). Estos tumores pueden darse en más del 70% de las mujeres que se encuentran en edad reproductiva, siendo las de origen afroamericano las que presentan mayor incidencia, así como peor sintomatología (Islam *et al.*, 2018). Sin embargo, a pesar del elevado número de mujeres afectadas por los leiomiomas, solo del 20 al 30% de ellas presentan síntomas (Lewis *et al.*, 2018) que incluyen, generalmente, sangrado uterino excesivo, dolor o presión en el área pélvica, infertilidad y complicaciones durante el embarazo (Islam *et al.*, 2018). No obstante, los síntomas, al igual que la clasificación de los leiomiomas, pueden variar dependiendo del tamaño y la localización del tumor en el útero. En la *Figura 1* se muestran los diferentes tipos de leiomiomas uterinos en función de su localización anatómica en el útero, pedunculados, intracavitarios, submucosos, subserosos e intramurales (Lewis *et al.*, 2018), siendo estos últimos los más frecuentes. Existen diversos factores de riesgo que pueden promover el desarrollo de los leiomiomas uterinos como la edad avanzada y la raza o etnia, al igual que la nuliparidad, la obesidad, antecedentes familiares, el tiempo desde el último embarazo o la dieta (Lewis *et al.*, 2018).

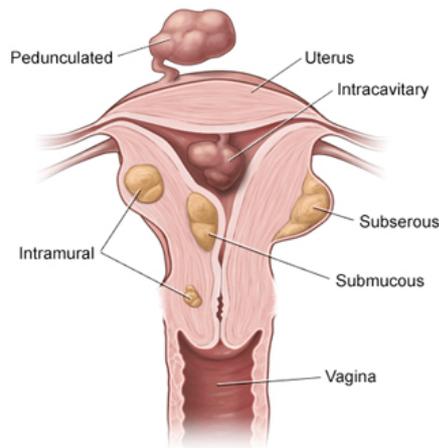


Figura 1. Esquema de las posibles localizaciones de los miomas en el útero

A pesar de su alta incidencia y al aumento de investigación sobre estos tumores en las últimas décadas (Brüggmann, 2018), los leiomiomas siguen siendo la principal causa de histerectomía, extracción total del útero, o miomectomía, que consiste en la extirpación de los miomas (Shin *et al.*, 2018), con los riesgos y efectos negativos que estas técnicas implican en la vida de la mujer (Islam *et al.*, 2018). Además, la miomectomía presenta un riesgo de recidiva del 11% cuando se extirpan miomas solitarios y del 26% o superior cuando se extraen múltiples miomas, en un periodo de 10 a 30 meses (Lewis *et al.*, 2018). Es por ello por lo que se necesitan tratamientos médicos más eficaces y menos invasivos que permitan la conservación del útero.

A pesar de que los cambios moleculares y celulares que desencadenan el crecimiento del tumor no son bien conocidos, estudios genéticos recientes exponen que los leiomiomas son tumores monoclonales, es decir, que surgen de alteraciones genéticas en una única célula madre somática del miometrio, lo que podría ser el origen de la enfermedad (Courtoy *et al.*, 2015). Estas alteraciones pueden ocurrir en múltiples lugares del genoma, es decir, cada mioma puede surgir de diferentes alteraciones por lo que pacientes sometidas a miomectomía son propensas a desarrollar otros leiomiomas (Courtoy *et al.*, 2015). Sin embargo, en algunos casos, los leiomiomas carecen de alteraciones genéticas, lo que también sugiere que los factores externos a nivel hormonal y celular contribuyen al desarrollo de los tumores y a la alta incidencia en mujeres en edad reproductiva (Fujisawa & Castellot, 2014).

Comúnmente, la proliferación celular descontrolada es lo que contribuye al aumento del tamaño de los tumores, sin embargo, en el caso de los leiomiomas, esta proliferación solo contribuye parcialmente. Los leiomiomas uterinos presentan aspectos típicos de fibrosis (Fujisawa & Castellot, 2014), en donde el aumento del tamaño del tumor se debe principalmente a la

acumulación excesiva de MEC. Los componentes de la MEC que principalmente contribuyen al aumento del volumen del mioma son el colágeno, la fibronectina, la laminina y los proteoglicanos (Islam *et al.*, 2018). El proceso de acumulación de MEC constituye un evento crítico en el desarrollo del tumor ya que es lo que le proporciona una estructura rígida al mioma, causante de algunos de los síntomas comentados anteriormente, además de activar procesos de mecanotransducción (Islam *et al.*, 2018), en los que estímulos mecánicos son transformados en señales bioquímicas; de esta forma, el aumento de la rigidez del tejido lleva a la activación de cascadas de señalización vía integrinas y otros mediadores (Islam *et al.*, 2018), que, como resultado producen un aumento en la proliferación celular, una disminución en la apoptosis y un aumento en la expresión de genes implicados en la formación y remodelación de la MEC (Islam *et al.*, 2018). Además, como se ha indicado en diferentes estudios, la funcionalidad de la MEC y su acumulación está regulada por factores de crecimiento, citoquinas, hormonas esteroideas (Islam *et al.*, 2018), alteraciones genéticas y epigenéticas (Courtoy *et al.*, 2015), así como metaloproteinasas (MMPs), que son enzimas proteolíticas producidas por el propio mioma, e inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs) (Islam *et al.*, 2018), que tienen un importante papel en la remodelación de la matriz (Bourboulia & Stetler-Stevenson, 2010).

Otro componente de gran importancia en el desarrollo de la fibrosis, son los miofibroblastos, células mesenquimales cuya diferenciación es inducida por la acción de factores de crecimiento como TGF- β s y activina-A (Islam *et al.*, 2018), y que presentan un fenotipo intermedio entre célula muscular lisa y fibroblasto (Islam *et al.*, 2018); así, diferentes investigadores han encontrado células que presentaban α -actina de músculo liso (α -SMA) y carecían de desmina, así como gran cantidad de colágeno en tejido de leiomioma, lo que corrobora la presencia de estas células en los tumores y su papel en la deposición de la MEC (Islam *et al.*, 2018).

Los miofibroblastos participan en los procesos comunes de inflamación produciendo MEC y promoviendo los procesos de reparación y la homeostasis de los tejidos (Wynn, 2007) y una vez cumplen su función, son eliminados por apoptosis (Islam *et al.*, 2018). Sin embargo, durante la edad fértil de la mujer, diferentes procesos como la ovulación, la menstruación o la implantación pueden crear lesiones fisiológicas en el útero, que, sumado a los eventos reproductivos, fuerzas mecánicas, hipoxia y estrés oxidativo pueden provocar un estado de inflamación crónica en el útero (Islam *et al.*, 2018). Cuando se alcanza este estado, los miofibroblastos se vuelven resistentes a la eliminación por apoptosis y generan MEC de forma continua y excesiva resultando en una fibrosis patológica, en la que el fibroma promueve su

propio crecimiento (Islam *et al.*, 2018). Por lo tanto, la inflamación crónica miometrial, influida por diferentes factores, puede constituir una de las principales causas que motiven el desarrollo de los miomas uterinos (Figura 2)

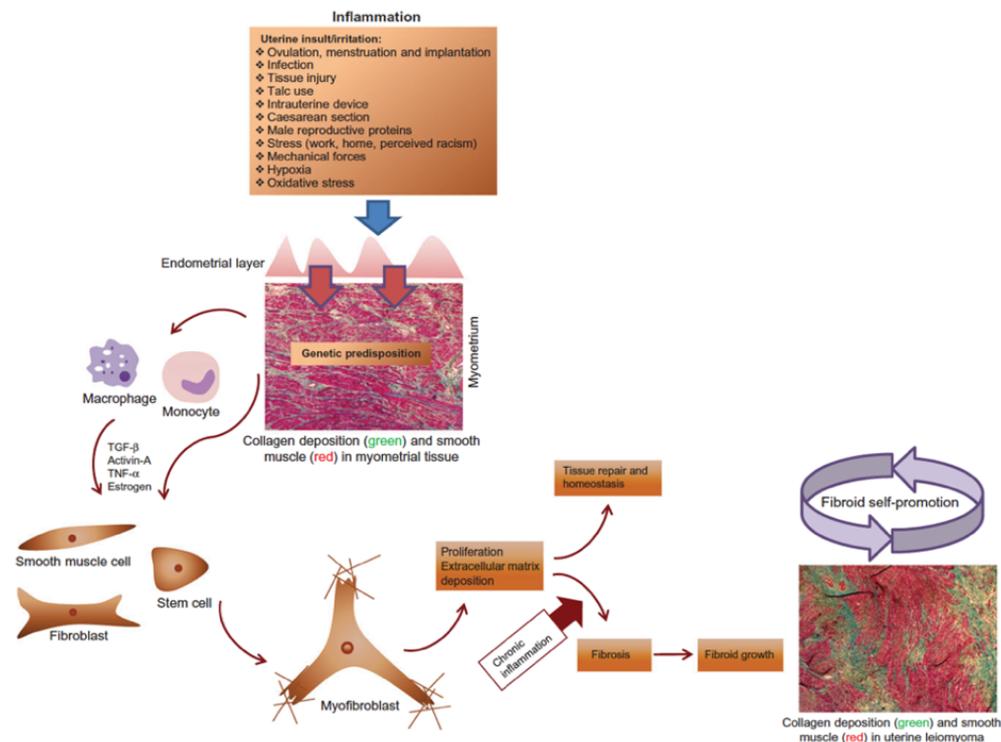


Figura 2. Desarrollo de los miomas uterinos por inflamación crónica miometrial. Tomada de (Islam *et al.*, 2018)

La hormonas gonadales progesterona y estrógenos tienen un papel fundamental en el desarrollo y crecimiento de estos tumores a través de la producción de MEC, si bien los estrógenos estimulan la expresión de receptores de progesterona (RP), esta última constituye el principal promotor del crecimiento del tumor (Courtoy *et al.*, 2015). Es por ello por lo que diversos estudios se centran en el desarrollo de medicamentos que disminuyan la influencia hormonal para así reducir la carga de esta enfermedad (Lewis *et al.*, 2018). De esta forma, las terapias hormonales están dirigidas a inhibir o modular los niveles de estrógenos y progesterona a través de los análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), inhibidores de aromatasa, antiprogestágenos y moduladores selectivos de los receptores de progesterona (SPRMs) (Lewis *et al.*, 2018). Un ejemplo de estos medicamentos es el Acetato de Ulipristal (UPA), que es un modulador selectivo de los receptores de progesterona, que se caracteriza por tener una alta afinidad por los receptores de esta hormona, y del cual estudiaremos sus efectos a nivel histológico en este trabajo. Dependiendo del tejido y del contexto celular, los SMPRs pueden actuar como antagonista o agonista uniéndose a los receptores de progesterona y permitiendo el reclutamiento de coactivadores o correpresores (Courtoy *et al.*, 2015).

Según algunos estudios, el UPA induce la expresión de MMPs y disminuye la expresión de TIMPs en células de leiomioma, pero no de miometrio (Shin *et al.*, 2018); lo que favorece la degradación de la MEC. Sin embargo, pese a la eficacia en reducir el tamaño del tumor, el UPA se utiliza principalmente como tratamiento preoperatorio para paliar síntomas de dolor y sangrado, ya que se ha observado que los leiomiomas vuelven a crecer meses después tras la interrupción del tratamiento con UPA, lo que hace necesaria la cirugía para eliminar el tumor (Shin *et al.*, 2018).

Como podemos deducir de los diferentes estudios analizados, los tratamientos disponibles están dirigidos principalmente a reducir la sintomatología producida por los leiomiomas, pero no existen tratamientos que tengan como dianas factores desencadenantes, o que fomenten el desarrollo, de estas neoplasias. En este sentido, vemos que dos elementos importantes en el desarrollo de los leiomiomas son la MEC y los procesos de inflamación crónica del miometrio, con lo que estudios enfocados en los mecanismos y factores que gobiernan ambos procesos, permitirán dilucidar nuevas dianas potenciales para nuevos tratamientos al igual que una mejor comprensión del desarrollo de esta enfermedad.

Objetivos

En base a lo expuesto anteriormente y teniendo en cuenta la importancia de la inflamación crónica como desencadenante de la deposición aberrante de MEC, nos hemos planteado como objetivo general, estudiar en muestras pareadas de miometrio y leiomioma las características de la matriz extracelular atendiendo a la presencia de elementos proinflamatorios comparando con muestras pareadas de pacientes tratadas con acetato de ulipristal (UPA). Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- a. Estudiar las características de la MEC, su extensión y componentes específicos, concretamente colágeno tipo I, en miometrio y leiomioma.
- b. Estudiar en la matriz extracelular de miometrio y leiomioma, la presencia de tipos celulares relacionados con procesos inflamatorios, como células cebadas y macrófagos.
- c. Estudiar la presencia de miofibroblastos como indicadores de inflamación crónica y de producción de fibrosis “anormal o patológica” en miometrio y leiomioma.
- d. Estudiar en las mismas secciones el índice de proliferación celular, mediante la presencia de Ki-67 en células musculares

- e. Comparar los resultados obtenidos, en cada uno de los puntos, en las muestras de pacientes control y pacientes tratadas con UPA.

Materiales y Métodos

Para la realización de este trabajo se utilizaron muestras de archivo pertenecientes a pacientes control del proyecto GIM-ULI-2014-01 “Efecto celular y molecular del acetato de ulipristal (ESMYA) (PGL 4001) sobre el útero de mujeres tratadas por miomas mediante un estudio clínico prospectivo de casos control”, en el cual las muestras de mioma y miometrio adyacente fueron obtenidas de pacientes diagnosticadas de miomas uterinos con alta sintomatología y sometidas a histerectomía después de varios meses sin ningún tipo de tratamiento hormonal.

Se analizaron un total de 12 muestras; 6 parejas formadas, cada una, por una muestra de miometrio sano y otra de leiomioma uterino, tres de ellas control y tres pertenecientes a pacientes tratadas con UPA.

Dichas muestras fueron obtenidas por la Dra. Delia Báez Quintana, perteneciente al servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de Canarias (HUC) y miembro del equipo de investigación y procesadas en el laboratorio de anatomía patológica de la Facultad de Medicina de la ULL.

1. Procesado de las muestras

Partiendo de las muestras ya fijadas e incluidas en bloques de parafina, se realizaron 6 cortes de 5 µm de grosor a partir de cada bloque, utilizando un microtomo Thermo Scientific Shandon Finesse 325. Las secciones se montaron sobre portaobjetos adherentes tratados con polilisina en placa calefactora a 37°C. Para el secado total, las secciones, se almacenaron en estufa a 37°C durante, al menos, 24 horas.

Una vez secos y previamente a la realización de las diferentes técnicas histológicas, se llevó a cabo el desparafinado e hidratación de los cortes (*Tabla 1*).

Protocolo de desparafinado e hidratación	
Reactivo	Duración (minutos)

Xilol I	15
Xilol II	15
Xilol III	15
Alcohol 100°	5
Alcohol 96°	5
Alcohol 70°	5
Agua destilada	2 x 5 minutos

Tabla 1. Protocolo de desparafinado e hidratación.

2. Análisis histológico

Para el estudio de la composición, características y estructura histológica de las diferentes muestras se llevaron a cabo diferentes técnicas de tinción.

En primer lugar, se realizó la tinción topográfica de Hematoxilina-eritrosina (H-Er) (*Tabla 2*), que nos permite observar los núcleos celulares teñidos en tonos de color azul o púrpura gracias a la hematoxilina, que es un colorante básico y tiñe estructuras ácidas; y el citoplasma y otras estructuras extracelulares en tonos rosados debido a la eritrosina, que es un colorante ácido y, por tanto, tiñe estructuras básicas

Por otro lado, para el estudio del tejido conjuntivo y de la distribución de la MEC, se utilizó la tinción histoquímica Tricrómico de Masson (*Tabla 3*), que, como su nombre indica, utiliza tres colorantes: la hematoxilina de Weigert, la fucsina ácida y el azul de anilina que tiñen los núcleos celulares, el citoplasma celular y las fibras de colágeno, respectivamente.

Además, para la detección de células cebadas, relacionadas con los procesos de inflamación, se realizó la tinción de Azul de Toluidina (*Tabla 4*), que es un colorante metacromático, es decir, que, al unirse a determinados elementos de los tejidos, puede cambiar de color. Gracias a esta propiedad, podemos diferenciar las células cebadas ya que sus gránulos se observan en tonos violetas.

Las tinciones descritas se desarrollaron siguiendo los protocolos expuestos a continuación:

a. Tinción hematoxilina-eritrosina

Protocolo de tinción Hematoxilina-Eritrosina	
Reactivo	Duración

Desparafinado e hidratación	
Hematoxilina de Harris	2 minutos
Agua corriente	5 minutos
Agua destilada	2 minutos
Eritrosina al 1%	1-2 minutos
Agua destilada	Lavado rápido

Tabla 2. Protocolo de tinción Hematoxilina-Eritrosina.

b. Tinción Tricrómico de Masson

Protocolo de tinción Tricrómico de Masson	
Reactivo	Duración
Desparafinado e hidratación	
Solución de Bouin <i>Solución acuosa saturada de ácido pícrico (75 ml), Formol 37-40 % (25 ml) y ácido acético glacial (5 ml)</i>	20 horas
Agua corriente	5 minutos
Agua destilada	1 minuto
Hematoxilina férrica de Weigert	10 minutos
Agua corriente	5 minutos
Agua destilada	1 minuto
Solución de Biebrich escarlata-fucsina ácida <i>Escarlata de Biebrich 1% (90 ml), fucsina ácida 1% (9 ml), ácido acético glacial (1ml)</i>	1 minuto
Agua destilada	Lavado rápido
Ácido fosfofúngstico- ácido fosfomolibdico al 5%	2 minutos
Agua destilada	Lavado rápido
Azul de Anilina al 2,5%	5 minutos
Agua destilada	1 minuto
Ácido acético glacial al 1%	4 minutos

Tabla 3. Protocolo de tinción Tricrómica de Masson

c. Tinción Azul de Toluidina

Protocolo de tinción Azul de Toluidina	
Reactivo	Duración
Azul de Toluidina al 0,5%	4 minutos
Agua destilada	1 minuto

Tabla 4. Protocolo de tinción Azul de Toluidina

3. Inmunohistoquímica

Además del estudio de las muestras mediante los métodos de tinción convencional, también se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico. Gracias a este método podemos detectar proteínas de interés a nivel celular y tisular mediante el uso de anticuerpos dirigidos específicamente contra dichas proteínas o antígenos dando lugar a la reacción antígeno-anticuerpo, la cual podemos detectar de diferentes maneras.

En este trabajo, para la detección de la reacción antígeno-anticuerpo, utilizamos dos métodos inmunohistoquímicos indirectos, un método inmunoenzimático, la inmunoperoxidasa, y la inmunofluorescencia. En el método inmunoenzimático, el anticuerpo primario se une de manera específica al antígeno correspondiente en el tejido, sin embargo, esta interacción aún no es detectable. Para poder observar estas interacciones, utilizamos un anticuerpo secundario que se va a unir al anticuerpo primario y, que, además, se encuentra biotinilado; esto va a permitir que la estreptavidina, conjugada con la enzima peroxidasa, se una al anticuerpo secundario biotinilado. Por último, la interacción de la enzima con su sustrato, el peróxido de hidrógeno va a dar como producto de la reacción agua (H₂O) y oxígeno atómico (O[•]). Este oxígeno liberado provoca la oxidación del cromógeno 3'3-diaminobenzidina (DAB) que formará un precipitado de color marrón, visible al microscopio e indicador de la interacción del anticuerpo con el antígeno de interés. Tanto el peróxido de hidrógeno como la DAB forman parte de la sustancia reveladora utilizada al final del protocolo.

En el caso del método de inmunofluorescencia, el anticuerpo secundario utilizado para detectar la interacción antígeno-anticuerpo primario presenta un fluorocromo. De esta forma, mediante un microscopio de fluorescencia se excitan estas moléculas con luz a una determinada longitud de onda y estas emiten luz a una longitud de onda mayor lo que, haciendo uso del filtro adecuado en cada caso, nos permite observar las interacciones antígeno-anticuerpo en la muestra.

A continuación, se muestra el protocolo general para la realización de la tinción inmunohistoquímica (Tabla 5).

Protocolo para tinción inmunohistoquímica	
Reactivo	Duración
Desparafinado e hidratación	
Lavado con TBS 1X <i>Tris Buffer Saline pH 7,4</i>	2 x 5 minutos
Desenmascarar <i>Incubación secciones en TC (Tampón Citrato pH 6)</i>	5 minutos a 90°C
Lavado con TBS 1X <i>Tris Buffer Saline pH 7,4</i>	2 x 5 minutos
Bloqueo de sitios de unión inespecíficos <i>Incubación con Caseína 0,5% o SBF (Suero Bovino Fetal) en TBS</i>	30 minutos
Lavado con TBS 1X <i>Tris Buffer Saline pH 7,4</i>	3 x 5 minutos
Lavado con TBS-Tritón X-100 0,2% <i>Disolución Tritón X-100 al 0,2% en TBS</i>	10 minutos
Incubación con anticuerpo primario (a) específico a disolución apropiada en TBS-Tritón X-100	24 horas a T ^a ambiente
Lavado con TBS 1X <i>Tris Buffer Saline pH 7,4</i>	3 x 10 minutos
Lavado con TBS-Tritón X-100 0,2% <i>Disolución Tritón X-100 al 0,2% en TBS</i>	10 minutos
Incubación con anticuerpo secundario (b) a dilución apropiada en TBS-Tritón X-100	1 hora
Lavado con TBS 1X <i>Tris Buffer Saline pH 7,4</i>	3 x 5 minutos
Lavado con TBS-Tritón X-100 0,2% <i>Disolución Tritón X-100 al 0,2% en TBS</i>	10 minutos

Continuación del protocolo para el método inmunoenzimático	
Incubación con Streptavidina-Peroxidasa <i>En dilución 1/1000 en TBS-Tritón X-100</i>	1 hora
Lavado con TBS 1X <i>Tris Buffer Saline pH 7,4</i>	3 x 5 minutos
Lavado con Tris-HCl pH 7,6	5 minutos
Revelado <i>Solución de 3'3-Diaminobenzidina al 0,02% y H₂O₂ al 0,02% en Tris-HCl pH 7,6</i>	
Parar revelado y lavar con TBS 1X	

Tabla 5. Protocolo para tinción de inmunohistoquímica

a. Antisueros y anticuerpos primarios.

Para estudiar la presencia de las diferentes proteínas en las distintas muestras se utilizaron los siguientes antisueros policlonales:

- Anti Human-CD68 pAb obtenido de conejo a dilución 1/100
- Anti Bovine-Collagen Type I pAb a dilución 1/100.
- Anti Human-Ki67 pAb a dilución 1/150
- Anti Human CD34 pAb a dilución 1/100.
- Anti Human α -SMA mAb a dilución 1/100.

b. Anticuerpos secundarios

- Donkey anti Rabbit IgG Biotin a dilución 1/1000.
- Estreptavidina conjugada con peroxidasa a dilución 1/1000.
- Goat anti Rabbit IgG conjugado a Cy3 a dilución 1/300
- Goat anti mouse IgG Alexa 488 a dilución 1/300

4. Deshidratación y montaje

Una vez finalizadas las técnicas de tinción, y previo al estudio de las muestras en el microscopio óptico se llevó a cabo la deshidratación y el montaje con Eukitt de las muestras, siguiendo el protocolo mostrado a continuación (Tabla 6).

Protocolo de deshidratación y montaje	
Reactivo	Duración (minutos)
Alcohol 96°	1
Alcohol 100° I	4
Alcohol 100° II	4
Xilol I	4
Xilol II	4
Montaje con Eukitt	

Tabla 6. Protocolo de deshidratación y montaje

5. Análisis de las muestras

Las muestras se estudiaron utilizando un microscopio óptico Leica DM4000 B, con lámpara de fluorescencia (Leica ebq 100. ISOLATED). La captura de imágenes y el análisis de las mismas se realizó utilizando la cámara digital Leica DFC300 FX y el software de análisis de imagen Leica Q-Win (Leica, Barcelona, España), respectivamente.

a. Análisis semicuantitativo

I. Contaje de células cebadas

Con el objetivo de comparar del número de células cebadas entre el leiomioma y el miometrio sano, se llevó a cabo un conteo celular de las muestras teñidas con Azul de Toluidina.

II. Contaje de macrófagos

Con el objetivo de comparar el número de macrófagos entre el leiomioma y el miometrio sano, se realizó un contaje de células CD68-inmunoactivas (CD68-ir) en las muestras analizadas mediante inmunohistoquímica.

III. Análisis de la expresión de la proteína Ki67

Con el objetivo de comparar el nivel de proliferación celular en las muestras de leiomioma y miometrio sano, se llevó a cabo un contaje de células Ki67-inmunoactivas (Ki67-ir) en las muestras analizadas.

Para llevar a cabo los contajes, se tomaron 6 fotografías con el objetivo de 40x de distintas zonas de cada muestra, elegidas al azar. Luego, se realizó el conteo de células en cada campo fotografiado utilizando el software libre de procesamiento de imagen ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland).

IV. Cálculo de áreas

Mediante ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland) se midió el área correspondiente a la MEC y al Colágeno I inmunoactivo (Col I-ir) en muestras de leiomioma y miometrio sano. Además, se compararon los dos tejidos tanto en pacientes sin tratamiento como en pacientes tratadas con UPA. Para ello, se tomaron 6 fotografías con el objetivo de 20x de diferentes campos de las muestras, elegidos al azar, y luego se analizaron mediante el software libre de procesamiento de imagen ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland).

V. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se compararon mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA I). Para ello se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS Statistic 27.0 (SPSS Inc., Chicago, IL,

E.E.U.U). Los resultados se expresan como media \pm DE y se consideran diferencias estadísticamente significativas valores de $p < 0,05$.

Resultados

1. Análisis de la matriz extracelular (MEC) en miometrio y leiomioma de pacientes control y tratadas con UPA

a. Pacientes control

Cualitativamente, los resultados obtenidos con la tinción de Masson mostraron diferencias en la distribución y proporción de la MEC respecto de las células musculares, entre el tejido miometrial y el leiomiomatoso. Como podemos observar en la Figura 3.I, las células de músculo liso del miometrio se encuentran agrupadas en grandes paquetes bien definidos y rodeados por MEC. Sin embargo, en el leiomioma (Figura 3.II), las células de músculo liso se distribuyen desorganizadamente en paquetes más pequeños o incluso de forma aislada y, además, se encuentran rodeadas por mayor cantidad de MEC.

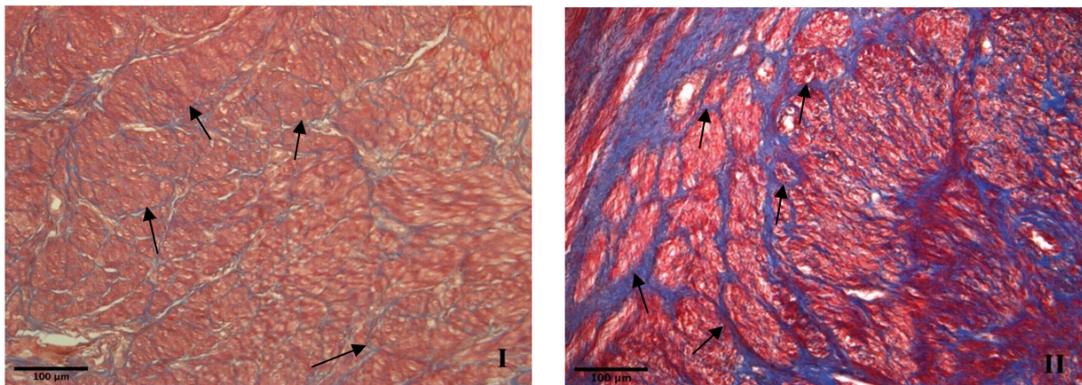


Figura 3. Distribución de la MEC en miometrio (I) y leiomioma (II) en pacientes control. Tinción tricrómica de Masson: células musculares lisas en rojo y MEC en azul. Paquetes de células musculares indicados con flechas. Barra de escala: 100 µm.

a. Pacientes tratadas con UPA

Después del tratamiento con UPA, las células de músculo liso en el tejido miometrial se encuentran agrupadas en paquetes, de la misma forma que en pacientes control, pero con una apariencia menos organizada. En el caso del tejido leiomiomatoso, la distribución celular sigue siendo similar a la que se observó en las muestras de pacientes control, pero la cantidad de MEC aparece reducida, al igual que en el tejido miometrial (Figura 4).

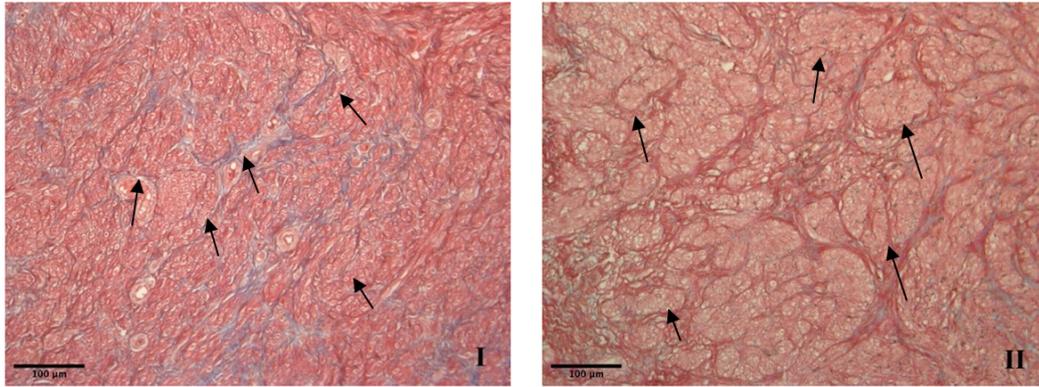
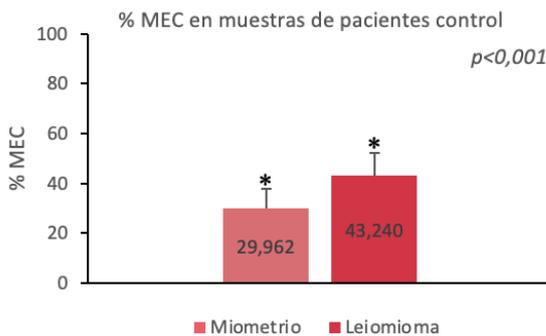
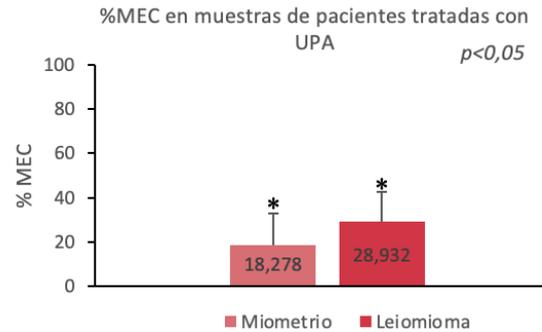


Figura 4. Distribución de la MEC en miometrio (I) y leiomioma (II) en pacientes tratadas con UPA. Tinción tricrómica de Masson: células musculares lisas en rojo y MEC en azul. Paquetes de células musculares indicados con flechas. Barra de escala: 100 μm.

El análisis semicuantitativo de los resultados muestra que el porcentaje de área ocupada por la MEC, en muestras de pacientes control, es mayor en el tejido leiomiomatoso que en el miometrial, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Gráfica 1). Tras el tratamiento con UPA, se observa una reducción proporcional en el porcentaje de MEC en ambos, manteniéndose la diferencia. Al igual que en las pacientes control, esta diferencia es estadísticamente significativa (Gráfica 2).

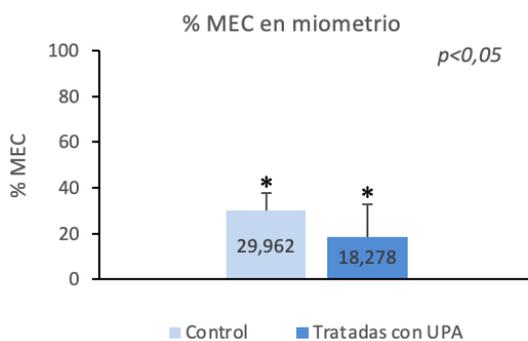


Gráfica 1. Porcentaje de MEC en miometrio (rosado) y leiomioma (rojo) en muestras de pacientes control.

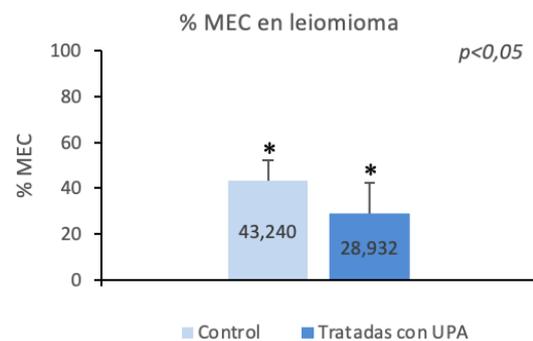


Gráfica 2. Porcentaje de MEC en miometrio (rosado) y leiomioma (rojo) en muestras de pacientes tratadas con UPA

Las gráficas 3 y 4 muestran las diferencias en los porcentajes de MEC en el miometrio y el leiomioma, en las pacientes control y tratadas con UPA, siendo la reducción en ambos tejidos tras el tratamiento de un 11,68% en el miometrio y de un 14,31% en el leiomioma.



Gráfica 3. Porcentaje de MEC en miometrio en muestras de pacientes control (azul claro) y tratadas con UPA (azul)



Gráfica 4. Porcentaje de MEC en leiomioma en muestras de pacientes control (azul claro) y tratadas con UPA (azul)

2. Análisis de la presencia del Colágeno I en miometrio y leiomioma de pacientes control y tratadas con UPA

a. Pacientes control

El análisis inmunohistoquímico del Colágeno tipo I (Col I) muestra que esta proteína está presente de forma diferencial en el tejido miometrial y leiomiomatoso. Mientras en el miometrio se observa inmunorreactividad sobre todo en la MEC, rodeando a los paquetes de células musculares (Figura 5.I), en el leiomioma (Figura 5.II), vemos que esta proteína también está presente en las células musculares.

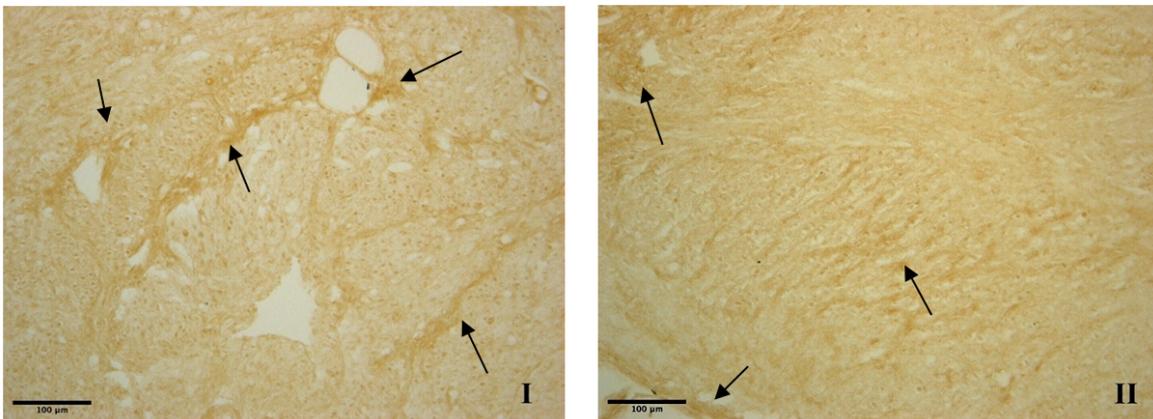


Figura 5. Distribución de Colágeno I en miometrio (I) y leiomioma (II) en pacientes control. Inmunohistoquímica (revelado con DAB). Zonas de expresión de Colágeno I señaladas con flechas. Barra de escala: 100 µm.

a. Pacientes tratadas con UPA

Después del tratamiento con UPA, la inmunorreacción del Colágeno I es similar a la observada en las muestras de pacientes control. En la Figura 6.I podemos ver en el tejido miometrial la presencia de colágeno I fundamentalmente en la MEC, mientras que, en el tejido leiomiomatoso (Figura 6.II) se detecta tanto en la MEC como en las células musculares, aunque en un porcentaje más reducido que en las muestras de pacientes control

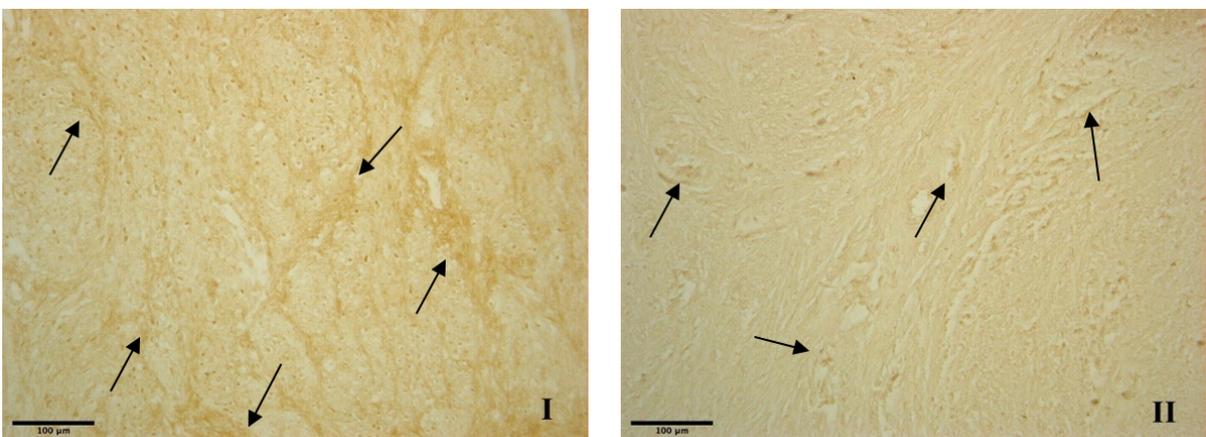
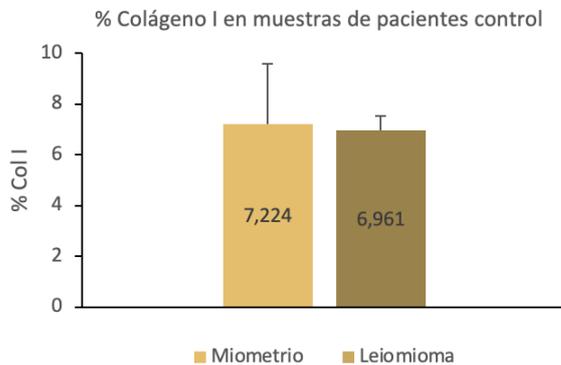
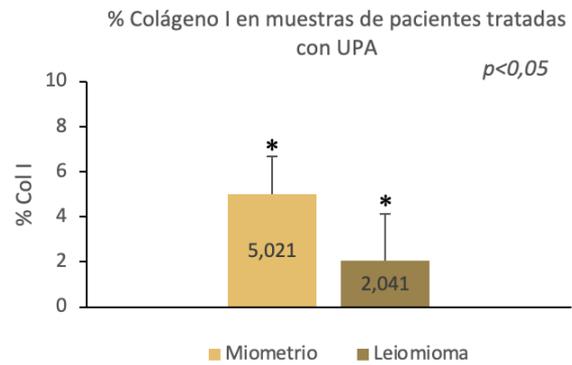


Figura 6. Distribución de Colágeno I en miometrio (I) y leiomioma (II) en pacientes tratadas con UPA. Inmunohistoquímica (revelado con DAB). Zonas de expresión de Colágeno I señaladas con flechas. Barra de escala: 100 µm.

Semicuantitativamente, el porcentaje de área Col I-ir que detectamos en el tejido miometrial y el leiomiomatoso no muestra diferencias en las pacientes control (Gráfica 5). Sin embargo, en las pacientes tratadas con UPA, se observa mayor porcentaje de área Col I-ir en el tejido miometrial, respecto al leiomiomatoso, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Gráfica 6)

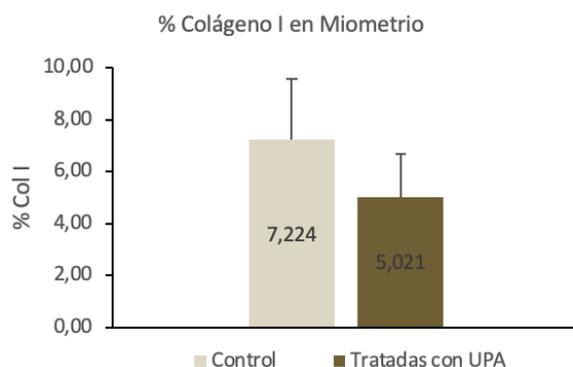


Gráfica 5. Porcentaje de Colágeno I en miometrio (amarillo) y en leiomioma (verde oscuro) en muestras de pacientes control

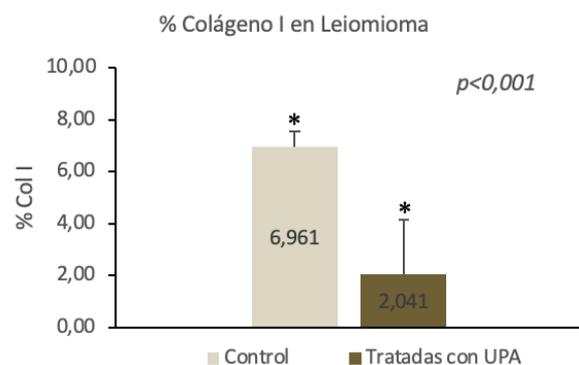


Gráfica 6. Porcentaje de Colágeno I en miometrio (amarillo) y en leiomioma (verde oscuro) en muestras de pacientes tratadas con UPA

El tratamiento con UPA en ambos tejidos, miometrio y leiomioma, produce una disminución en el porcentaje de área Col I-ir, siendo de un 2,2% en el miometrio y de un 4,92% en el leiomioma. Si bien en el miometrio (Gráfica 7) las diferencias no son estadísticamente significativas, si lo son en el leiomioma (Gráfica 8).



Gráfica 7. Porcentaje de Colágeno I en miometrio en muestras de pacientes control (beige) y tratadas con UPA (marrón)



Gráfica 8. Porcentaje de Colágeno I en leiomioma en muestras de pacientes control (gris) y tratadas con UPA (marrón)

3. Análisis de las células cebadas en miometrio y leiomioma de pacientes control y tratadas con UPA

a. *Pacientes control*

En las muestras de pacientes control se observan diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células cebadas entre el miometrio y el leiomioma (Figura 7), siendo mayor el número de estas en el tejido leiomiomatoso. (Gráfica 9).

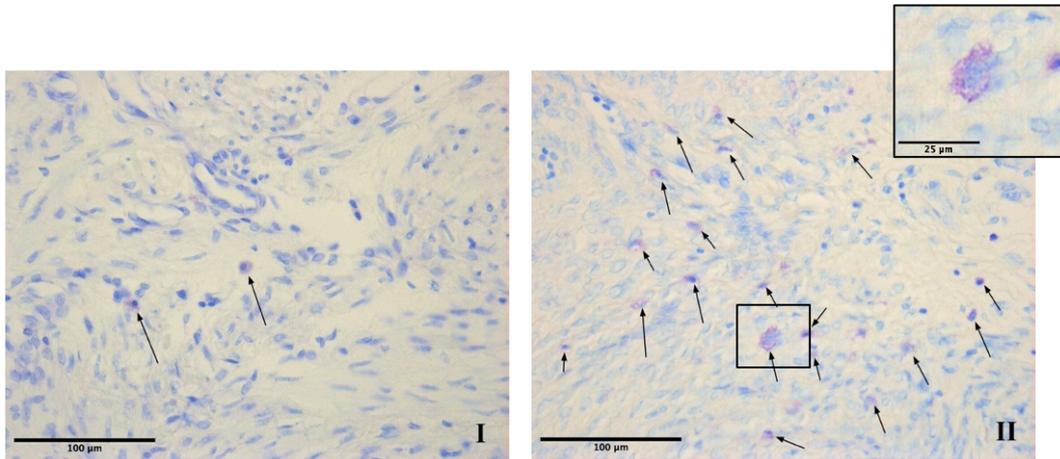


Figura 7. Células cebadas en miometrio (I) y leiomioma (II) control, indicadas con flechas. Tinción Azul de Toluidina. Barra de escala: 100 µm, inserto 25 µm.

a. Pacientes tratadas con UPA

Después del tratamiento con UPA, el número de células cebadas disminuye en el leiomioma y aumenta ligeramente en el miometrio, con respecto a las pacientes control. Comparando ambos tejidos (Figura 8), el número de células cebadas continúa siendo ligeramente superior en el leiomioma (Gráfica 10).

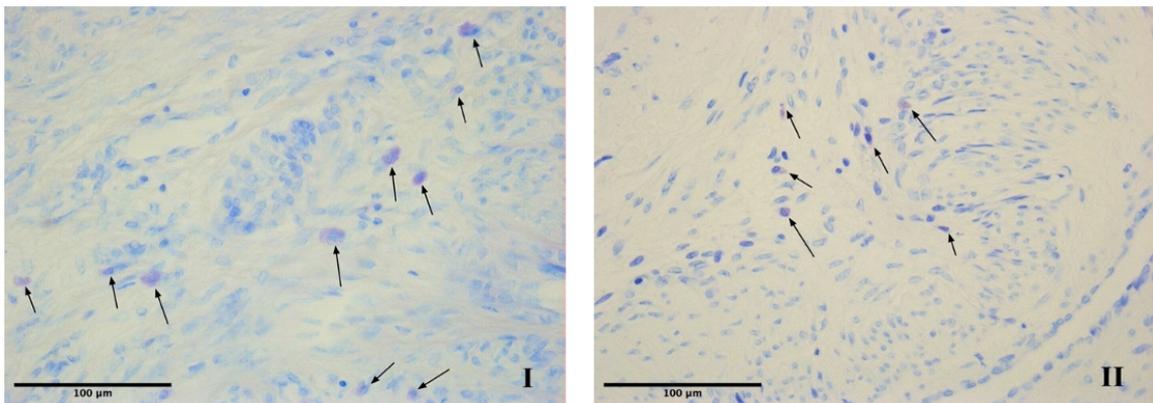
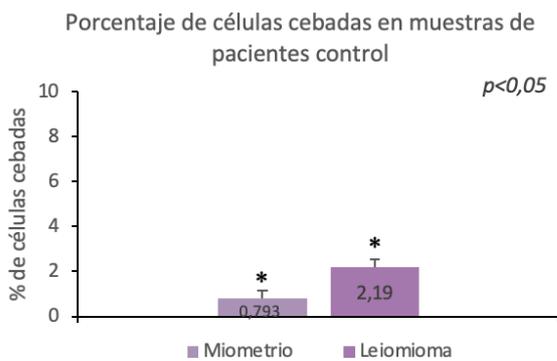
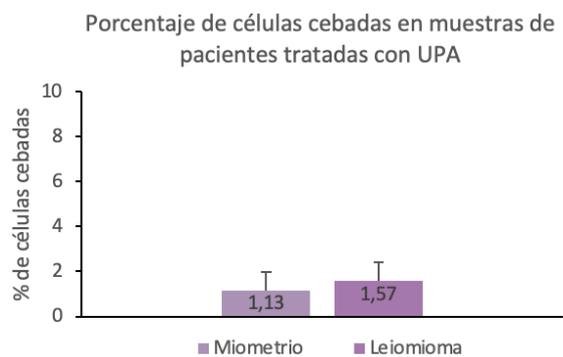


Figura 8. Células cebadas en miometrio (I) y leiomioma (II) tratados con UPA, indicadas con flechas. Tinción Azul de Toluidina. Barra de escala: 100 µm

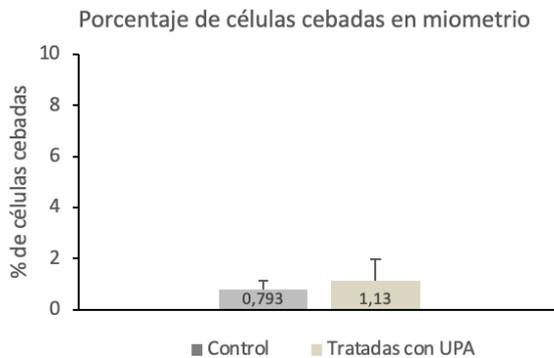


Gráfica 9. Porcentaje de células cebadas en miometrio (lila) y leiomioma (morado) en muestras de pacientes control.

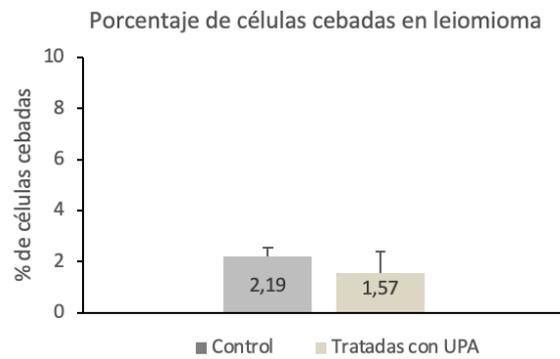


Gráfica 10. Porcentaje de células cebadas en miometrio (lila) y leiomioma (morado) en muestras de pacientes tratadas con UPA

Si realizamos un análisis comparativo en ambos tejidos, podemos ver que, en el caso del miometrio, existe un aumento del 0,34% en el porcentaje de células cebadas después del tratamiento con UPA, mientras que en el tejido leiomiomatoso la proporción de células cebadas se reduce en un 0,62% (Gráficas 11 y 12). En ninguno de los dos casos, las diferencias son estadísticamente significativas.



Gráfica 11. Porcentaje de células cebadas en miometrio control (gris) y tratado con UPA (beige)



Gráfica 12. Porcentaje de células cebadas en leiomioma control (gris) y tratado con UPA (beige)

4. Análisis de la presencia de macrófagos (células CD68-ir) en miometrio y leiomioma de pacientes control y tratadas con UPA.

a. *Pacientes control*

Cualitativamente, la presencia de macrófagos (células CD68-ir) es variable entre las diferentes muestras analizadas (Figura 9), no pudiéndose determinar claramente las diferencias entre miometrio y leiomioma. De igual forma, el análisis semicuantitativo no muestra diferencias significativas entre ambos tejidos, si bien la presencia de inmunorreactividad para esta proteína es ligeramente superior en el leiomioma. (Gráfica 13).

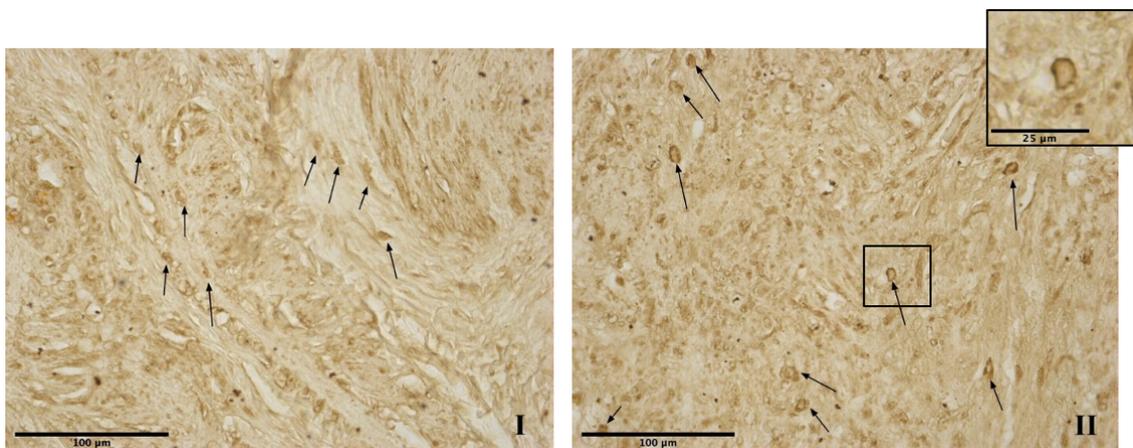


Figura 9. Macrófagos (células CD68-ir) en miometrio (I) y leiomioma (II) control, indicados con flechas. Inmunohistoquímica (revelado con DAB). Barra de escala: 100 µm, inserto 25 µm.

a. Pacientes tratadas con UPA

En las muestras de pacientes tratadas con UPA, el análisis cualitativo (Gráfica 14) y semicuantitativo (Figura 10), muestra diferencias estadísticamente significativas en el número de células CD68-ir entre el miometrio y el leiomioma, siendo el miometrio el que mayor número presenta.

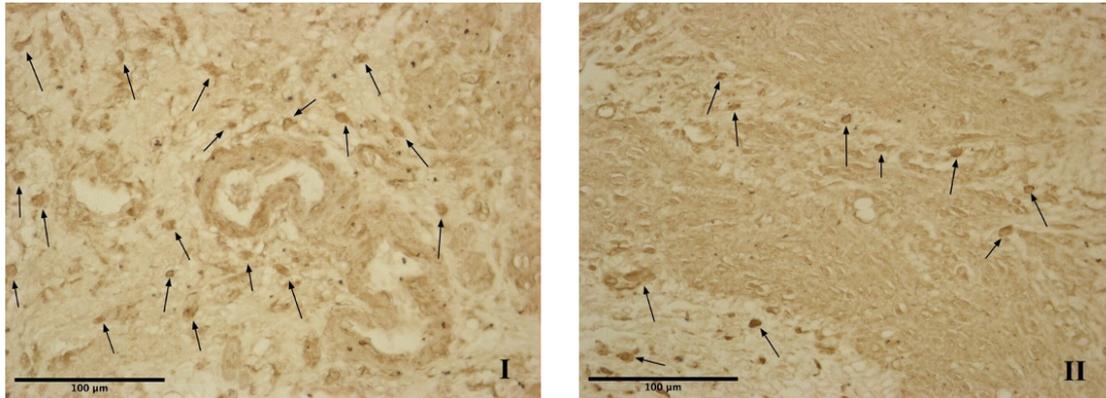
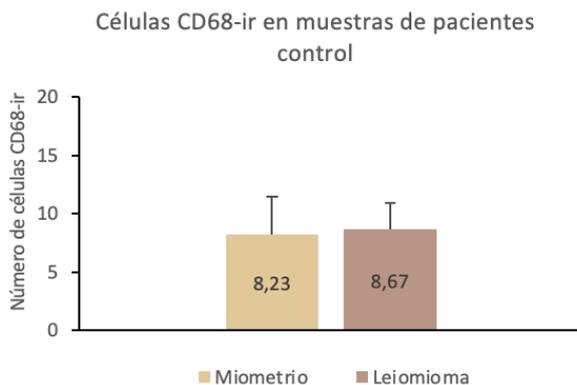
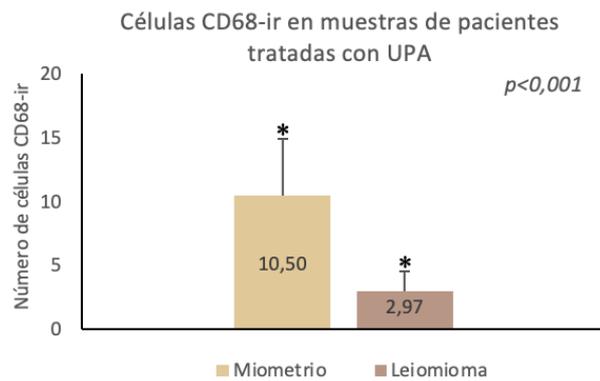


Figura 10. Macrófagos (células CD68-ir) en miometrio (I) y leiomioma (II) tratados con UPA, indicados con flechas. Inmunohistoquímica (revelado con DAB). Barra de escala: 100 µm.

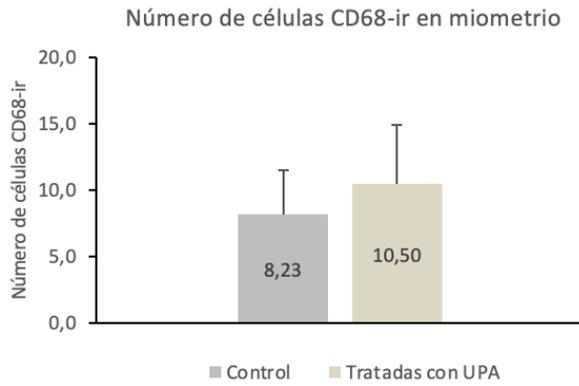


Gráfica 13. Número medio de macrófagos (células CD68-ir) en miometrio (beige) y leiomioma (marrón) control.

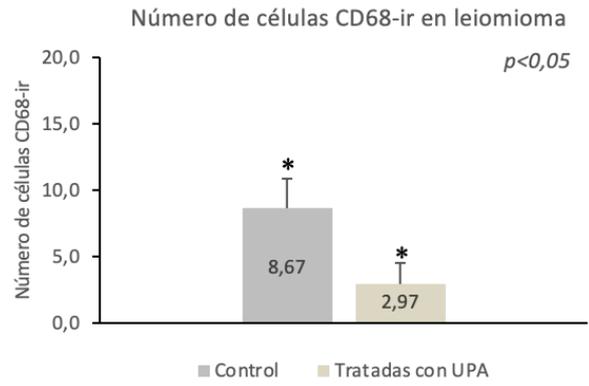


Gráfica 14. Número medio de macrófagos (células CD68-ir) en miometrio (beige) y leiomioma (marrón) tratados con UPA.

Comparando el tejido miometrial y leiomiomatoso por separado (Gráfica 15 y 16), podemos observar que, tras el tratamiento con UPA, tiene lugar un aumento del número de células CD68-ir en el miometrio, mientras que en el leiomioma se produce una notable disminución. Mientras que las diferencias que encontramos en el miometrio sin y con tratamiento no son estadísticamente significativas, si lo son en el leiomioma.



Gráfica 15. Número medio de macrófagos (células CD68-ir) en miometrio en muestras control (gris) y tratadas con UPA (beige).



Gráfica 16. Número medio de macrófagos (células CD68-ir) en leiomioma en muestras control (gris) y tratadas con UPA (beige).

5. Análisis de la presencia de miofibroblastos como indicadores de inflamación crónica y producción de fibrosis anormal en miometrio y leiomioma de pacientes control y tratadas con UPA.

El análisis de células CD34-ir/ α SMA-ir pone de manifiesto la presencia de miofibroblastos en la MEC del miometrio y el leiomioma, en las muestras de pacientes control (Figura 11) y tratadas con UPA (Figura 12). Cualitativamente, no se observan miofibroblastos en el tejido miometrial de pacientes control, mientras que si se observan en el tejido leiomiomatoso (Figura 11).

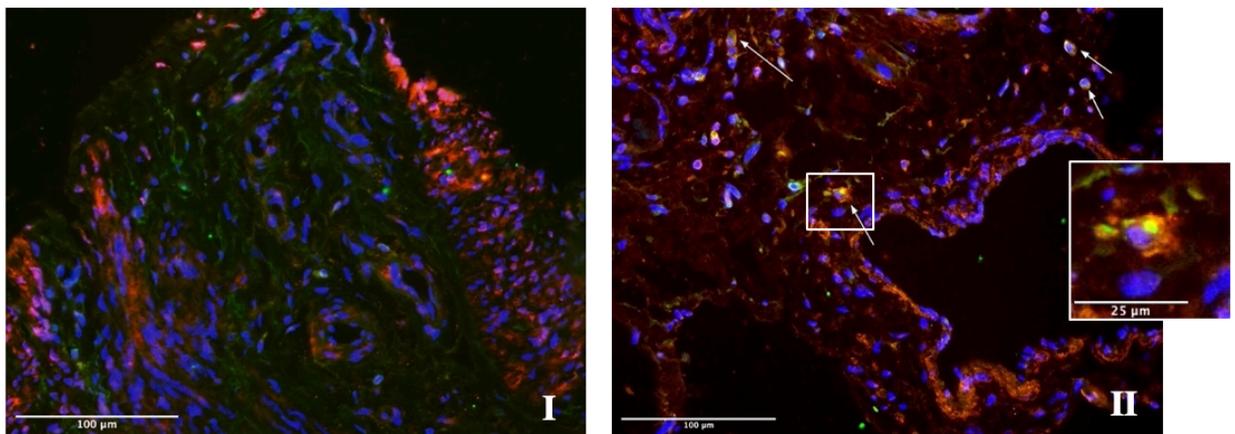


Figura 11. Tejido miometrial (I) y de leiomioma (II), de pacientes control, analizado mediante inmunofluorescencia. α -Actina de músculo en rojo, MEC en verde y núcleos celulares en azul (DAPI). Miofibroblastos indicados con flechas. Barra de escala: 100 μ m, inserto 25 μ m.

Por el contrario, tras el tratamiento con UPA, se observan miofibroblastos tanto en el tejido miometrial como leiomiomatoso, siendo más abundantes en este último (Figura 12)

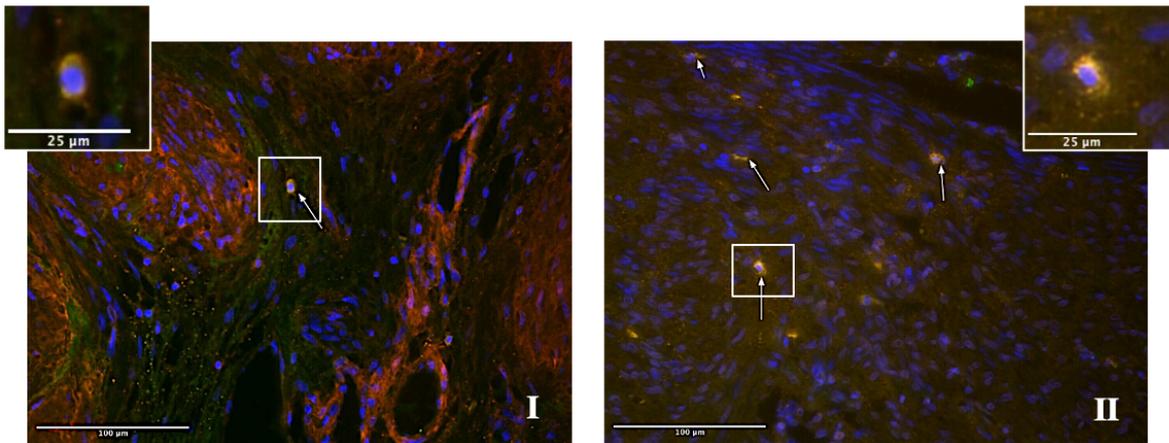


Figura 12. Tejido miometrial (I) y de leiomioma (II), de pacientes tratadas con UPA, analizado mediante inmunofluorescencia. α -Actina de músculo en rojo, MEC en verde y núcleos celulares en azul (DAPI). Miofibroblastos indicados con flechas. Barra de escala: 100 μ m, insertos 25 μ m.

6. Análisis de la presencia de Ki67 en miometrio y leiomioma de pacientes control y tratadas con UPA.

a. Pacientes control

Cualitativamente, tanto el tejido miometrial como el leiomiomatoso, presentan células Ki67-ir. La inmunorreactividad se observa tanto en el núcleo como en el citoplasma, siendo el tejido leiomiomatoso el que presenta un mayor número de células con inmunorreacción nuclear, así como mayor intensidad en la inmunorreacción, comparado con el tejido miometrial (Figura 13). El análisis semicuantitativo muestra que el número de células Ki67-ir es mayor en el miometrio que en el leiomioma siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Gráfica 17).

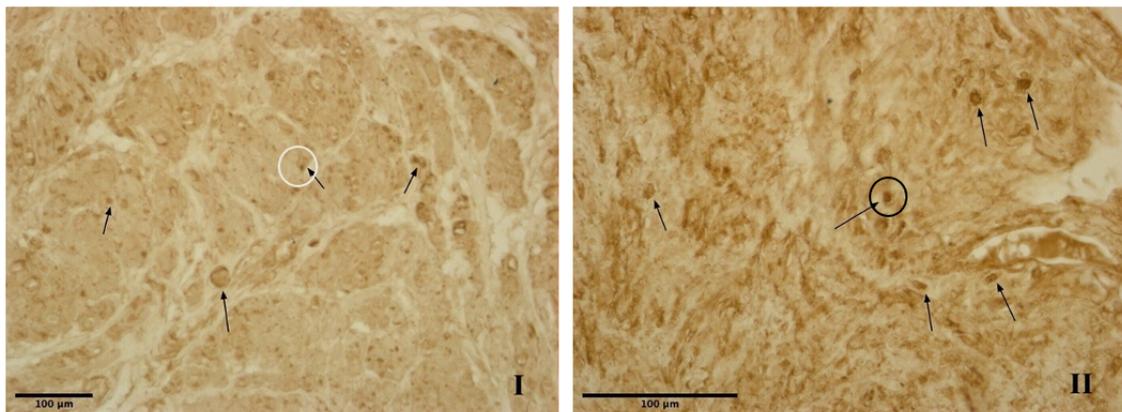


Figura 13. Expresión de la proteína Ki67 en miometrio (I) y leiomioma (II) en pacientes control. Inmunohistoquímica (revelado con DAB). Células inmunorreactivas señaladas con flechas. Círculo negro: célula con inmunorreacción nuclear. Círculo blanco: célula con inmunorreacción citoplasmática. Barra de escala: 100 μ m.

b. Pacientes tratadas con UPA

En las pacientes tratadas con UPA, tanto el tejido miometrial como el leiomiomatoso presentan células Ki67-ir, aunque en este caso, la intensidad de la inmunorreacción es mayor en el

miometrio que en el leiomioma (Figura 14). El análisis semicuantitativo muestra resultados similares a los obtenidos en las pacientes control, siendo el tejido miometrial el que presenta mayor número de células Ki67-ir (Gráfica 18). El análisis estadístico muestra que las diferencias observadas son estadísticamente significativas.

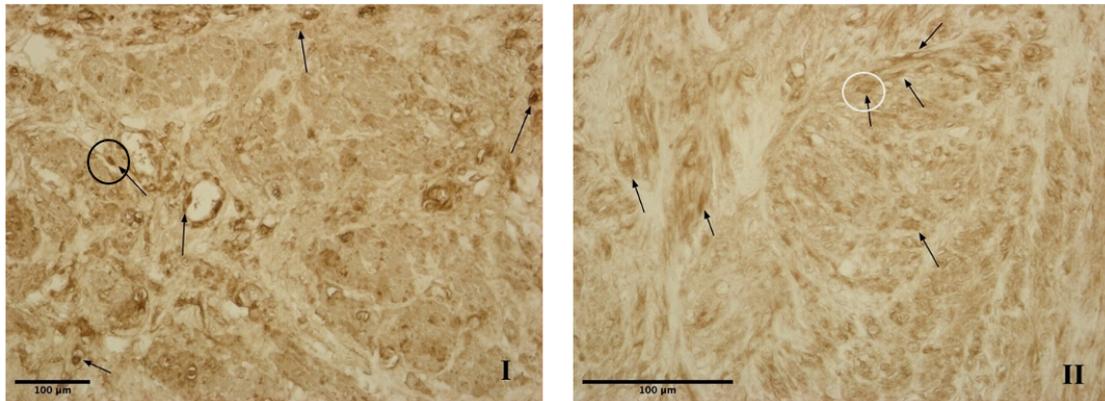
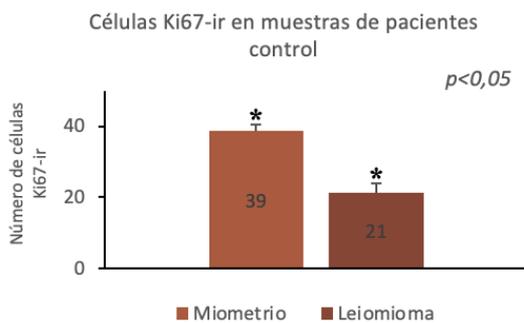
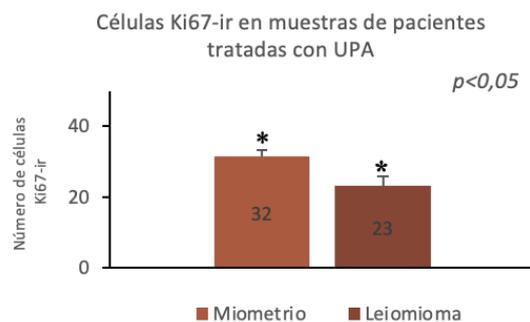


Figura 14. Expresión de la proteína Ki67 en miometrio (I) y leiomioma (II) en pacientes tratadas con UPA. Inmunohistoquímica (revelado con DAB). Células inmunorreactivas señaladas con flechas. Círculo negro: inmunorreacción nuclear. Círculo blanco: inmunorreacción citoplasmática. Barra de escala: 100 µm.

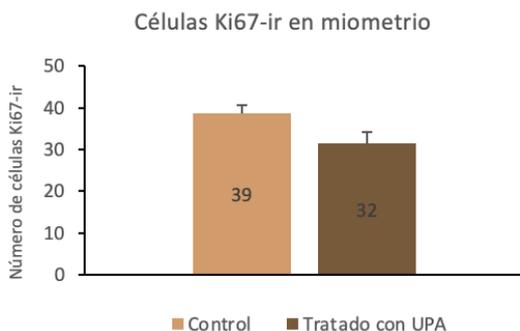


Gráfica 17. Número medio de células Ki67-ir en miometrio (marrón claro) y leiomioma (marrón oscuro) en muestras de pacientes control.

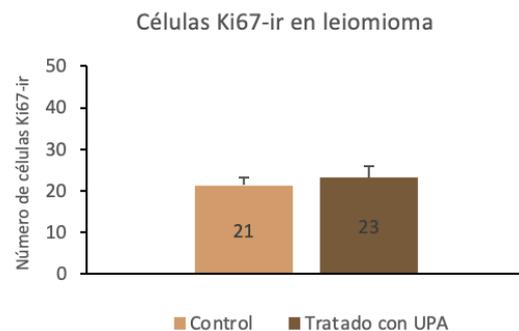


Gráfica 18. Número medio de células Ki67-ir en miometrio (marrón claro) y leiomioma (marrón oscuro) en muestras de pacientes tratadas con UPA

Cuando se comparan miometrio y leiomioma por separado (Gráficas 19 y 20), vemos que el tratamiento con UPA provoca una ligera disminución en el número de células Ki67-ir en el miometrio, mientras que en el leiomioma ocurre lo contrario.



Gráfica 19. Número medio de células Ki67-ir en miometrio en muestras de pacientes control (marrón claro) y tratadas con UPA (marrón oscuro)



Gráfica 20. Número medio de células Ki67-ir en leiomioma en muestras de pacientes control (marrón claro) y tratadas con UPA (marrón oscuro)

Discusión

Las principales aportaciones de este trabajo han sido: en leiomioma y miometrio adyacente de pacientes control: 1. Confirmar que la MEC es más abundante en el leiomioma que en el miometrio adyacente si bien esto no se corresponde con una diferencia significativa en la presencia de colágeno I. 2. En cuanto a la presencia de células proinflamatorias, hubo diferencias significativas en la presencia de células cebadas, más abundantes en leiomioma, pero no en la presencia de macrófagos. De la misma forma los miofibroblastos sólo estuvieron presentes en el tejido leiomiomatoso. 3. El número de células Ki67-ir fue significativamente mayor en el miometrio que en el leiomioma.

Después del tratamiento con UPA, en las muestras de leiomioma y miometrio adyacente estudiadas observamos una respuesta diferencial al medicamento. Si bien la MEC y el colágeno I se redujeron en ambos tejidos, las células cebadas aumentaron ligeramente en el miometrio disminuyendo en el leiomioma, de la misma forma que los macrófagos y los miofibroblastos. Por otro lado, las células Ki67-ir disminuyeron ligeramente en el miometrio mientras que aumentaron en el leiomioma.

Como se muestra en la literatura, la mayor acumulación de MEC en el tejido leiomiomatoso en comparación con el miometrial, es una de las principales características que presentan estas neoplasias (Islam et al., 2018). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que, a nivel general, el porcentaje de área ocupada por la MEC es significativamente mayor en el tejido leiomiomatoso. Nuestros resultados coinciden con lo observado por numerosos autores sobre la presencia de MEC en leiomiomas, mayoritaria en relación a las células musculares presentes en el tejido (Malik *et al.*, 2010).

Algunos estudios como el de Flake et al. en 2018 sobre la histología de los leiomiomas, muestran que la estructura organizada y la orientación paralela de las células musculares en el miometrio sano, contrasta con la disposición desorganizada de estas células en el leiomioma, al igual que la cantidad de MEC que las rodea. Esto parece estar en relación con los cambios fenotípicos de las células musculares leiomiomatosas durante el desarrollo del tumor. Nuestros resultados guardan relación con estos hechos ya que observamos que las células musculares del miometrio presentan una orientación similar y se disponen en grupos bien diferenciados, y rodeados por MEC; mientras que en el tejido leiomiomatoso los grupos de células presentan

una estructura desorganizada, en algunos casos incluso se presentan de forma aislada, y la cantidad de MEC circundante es mayor.

Algunos autores (Fujisawa & Castellot, 2014), consideran que el aumento en la deposición de MEC se debe a una sobreproducción de colágeno I, uno de los principales componentes de la MEC. Es por ello, que esta proteína es más abundante en el tejido leiomiomatoso (Leppert et al., 2004) que en el tejido miometrial. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron una cantidad mayor de colágeno I en el tejido miometrial, si bien la diferencia con el tejido leiomiomatoso no fue estadísticamente significativa.

El desarrollo de los leiomiomas a partir del miometrio puede originarse en respuesta a un estado de inflamación crónica en este tejido, con la participación de diferentes células y factores proinflamatorios (Chegini, 2010). Estos factores y células implicadas en la inflamación, como las células cebadas y los macrófagos, fueron estudiados por Protic et al. en 2016. En este estudio, los autores vieron que la presencia de células cebadas era mayor en el tejido leiomiomatoso que en el miometrial, diferencias que no eran significativas debido a la variabilidad entre las muestras procedentes de distintos pacientes. Estos investigadores también mostraron que el número de macrófagos era mayor en el tejido leiomiomatoso que en el miometrial, lo cual refuerza la teoría de que estas células juegan un papel importante en los mecanismos que promueven el desarrollo de los leiomiomas (Protic *et al.*, 2016). En cuanto a nuestros resultados, el análisis semicuantitativo mostró un aumento, estadísticamente significativo, del número de células cebadas en el tejido leiomiomatoso, en comparación con el miometrial. No obstante, al examinar las muestras individualmente, la presencia de células cebadas fue variable tanto entre las muestras de miometrio como de leiomioma, lo que puede deberse a la variabilidad y heterogeneidad de los leiomiomas (Protic *et al.*, 2016). Los resultados mostraron que el número de macrófagos presente en el tejido leiomiomatoso fue mayor que en el tejido miometrial, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa; no obstante, es destacable el elevado número de macrófagos presentes en el miometrio, lo que podría ser debido a que se trata de miometrio adyacente, próximo al tumor, lo que fue también observado por Protic et al. en 2016. En conjunto, los resultados obtenidos también indican la presencia de un estado inflamatorio en el miometrio que podría dar lugar a la formación de leiomiomas.

Los miofibroblastos juegan un papel importante en el desarrollo de fibrosis patológica, ya que son los responsables de la producción excesiva de MEC, promoviendo el crecimiento del tumor (Islam et al., 2018). Es por ello por lo que en este trabajo analizamos la presencia de estas células en las muestras de miometrio y leiomioma; como resultado, observamos que el tejido miometrial de pacientes control carecía de miofibroblastos, si bien estaban presentes en el tejido leiomiomatoso. La presencia de estas células en el leiomioma apoyaría el hecho de que un mal funcionamiento de los miofibroblastos, que resulta en la sobreproducción de MEC, contribuiría al desarrollo del tumor (Protic *et al.*, 2016).

Otro aspecto estudiado en este trabajo fue el nivel de proliferación celular existente en el miometrio y el leiomioma, para ello analizamos inmunohistoquímicamente la presencia del antígeno Ki67, marcador de proliferación celular y, por tanto, del crecimiento del tumor (Li et al., 2015). Curiosamente, los resultados obtenidos mostraron un número significativamente mayor de células Ki67-ir en el tejido miometrial comparado con el leiomiomatoso. Este resultado se contradice con lo expuesto por diferentes autores (Li et al., 2015; Eulálio Filho et al., 2019), los cuales coinciden en que la mayor expresión de este antígeno, y, por tanto, la tasa más alta de proliferación celular tiene lugar en el tejido leiomiomatoso. Sin embargo, el estudio realizado por Flake et al. en 2018, propone la hipótesis de que el nivel de proliferación celular está relacionado con la fase de crecimiento en la que se encuentra el leiomioma, de esta forma, explican que la actividad mitótica del tumor es más frecuente en aquellos de pequeño tamaño, mientras que en los de gran tamaño la tasa de proliferación celular se ve reducida, lo que podría explicar los resultados obtenidos, al haber analizado tumores de gran tamaño.

Actualmente, los tratamientos disponibles para el manejo clínico de los leiomiomas se basan en modular la influencia de determinadas hormonas, como la progesterona, debido a su implicación en la proliferación celular y, por lo tanto, en el desarrollo y crecimiento del tumor (Szydłowska et al., 2021). Uno de los fármacos más utilizados es el UPA, un modulador selectivo de los receptores de progesterona (SPRMs), cuya eficacia, en tratamientos a largo plazo, disminuye el volumen del tumor, principalmente debido a la reducción de la MEC y del índice de proliferación celular (Shin et al., 2018; Szydłowska et al., 2021; Courtoy *et al.*, 2015).

Escasa o nula información ha sido, sin embargo, reportada en cuanto a la acción del tratamiento con UPA en miometrio. En algunos casos, Cox et al. 2018, los investigadores no observaron ningún efecto, al menos en la presencia de Col I, del tratamiento sobre el miometrio. En el

presente trabajo, con pacientes tratadas durante un periodo corto de tiempo, se analizaron los efectos de este medicamento en el tejido miometrial y leiomiomatoso. Los resultados del tratamiento con UPA mostraron una disminución significativa en el porcentaje de MEC de un 11,68% y de un 14,31% en el miometrio y leiomioma, respectivamente. De igual forma, se redujo el porcentaje de colágeno I en un 2,20% en miometrio y un 4,92% en el leiomioma tras el tratamiento con UPA, siendo la disminución en el leiomioma, estadísticamente significativa. A pesar de estos cambios, el tamaño de los leiomiomas se redujo levemente o no presentó reducción después del tratamiento.

Un dato interesante obtenido en este trabajo es la diferencia observada entre miometrio y leiomioma en cuanto a la presencia de células proinflamatorias después del tratamiento con UPA. El número de células cebadas se vio ligeramente afectado por la administración del UPA; en el caso del tejido miometrial, la presencia de estas células aumentó en un 0,34%, mientras que en el tejido leiomiomatoso se redujo en un 0,62%. En ninguno de los casos las diferencias fueron significativas. En cuanto a los macrófagos, el tratamiento con UPA provocó un aumento no significativo en el número de células CD68-ir en el miometrio, mientras que en el leiomioma tuvo lugar una disminución significativa de estas células. Aún observando el efecto del tratamiento con UPA en ambos tejidos, en la actualidad, el papel de los SPRMs en la reducción de la fibrosis es algo incierto. No obstante, un estudio reciente realizado por Lewis et al., en 2019, demuestra que el tratamiento con UPA puede inhibir la fibrosis del leiomioma al reducir los niveles de TGF- β 3 activo y disminuir la señalización a través de la vía canónica. Los resultados obtenidos respaldan este hecho ya que el UPA provoca una disminución del número de macrófagos en el leiomioma, siendo el TGF- β el principal factor de crecimiento liberado por estas células (Protic et al., 2016).

Otro tipo celular importante en la producción de fibrosis, son los miofibroblastos que se encuentran presentes en el tejido leiomiomatoso (Islam et al., 2018); a pesar de ello, debido al efecto de reducción de la MEC causado por el tratamiento con UPA, se podría pensar que la presencia de estas células se viese reducida tras el tratamiento, sin embargo, nuestros resultados muestran la presencia de estas células tanto en el tejido leiomiomatoso como interesantemente, en el tejido miometrial, después del tratamiento. El proceso de diferenciación de los miofibroblastos que tiene lugar durante la producción de fibrosis, está inducido por factores de crecimiento como los TGF- β s y la Activina-A (Islam et al., 2018); por lo que los resultados obtenidos podrían estar relacionados con lo expuesto por Lewis et al. (2019). Así, si el

tratamiento con UPA no interrumpe la vía de señalización de TGF- β 3, la formación de los miofibroblastos seguiría siendo posible, y por ello se encuentran en el tejido tratado.

En último lugar, otro de los efectos que se conoce bien del tratamiento con UPA, es la disminución de la proliferación celular mediante la estimulación de la apoptosis y el aumento de la expresión de las proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular (Szydłowska et al., 2021). Por el contrario, los resultados muestran un aumento, no significativo, en el número de células Ki67-ir en el tejido leiomiomatoso tras el tratamiento con UPA, lo que podría estar causado por el corto periodo de tratamiento, que no influye prácticamente en el crecimiento del leiomioma, además de la distinta respuesta observada en distintas pacientes y/o en distintos leiomiomas (Courtoy *et al.*, 2015).

En conjunto, los resultados obtenidos y la bibliografía consultada muestran que, a pesar de la alta incidencia, la investigación sobre los leiomiomas sigue siendo insuficiente ya que aun se desconocen los mecanismos exactos que desencadenan la formación del tumor, aunque existen numerosas hipótesis sobre este proceso. En lo que respecta a nuestro trabajo, parece existir una relación entre la inflamación miometrial y la producción de fibrosis, pudiendo ser una de las vías principales que dan lugar al desarrollo de los leiomiomas, junto con la influencia hormonal.

Conclusiones

Las conclusiones extraídas del presente trabajo han sido las siguientes:

1. El tejido miometrial y leiomiomatoso presentan diferencias en cuanto a la organización de las células de músculo liso y la distribución de la MEC. Además, el leiomioma presenta un porcentaje significativamente superior de MEC que el miometrio sano.
2. El porcentaje de área Col I-ir no mostró diferencias entre el tejido miometrial y leiomiomatoso, aunque si se observaron diferencias en su distribución en el tejido.
3. El tejido leiomiomatoso mostró un mayor número de células cebadas que el miometrial. Asimismo, la presencia de estas células mostró variabilidad entre las muestras.
4. La presencia de macrófagos (células CD-68-ir) fue similar en miometrio y leiomioma.
5. La presencia de miofibroblastos en pacientes control solo se observó en el leiomioma.
6. El número de células Ki67-ir fue mayor en el tejido miometrial. No obstante, en el tejido leiomiomatoso la intensidad de la inmunorreacción fue superior.

7. El tratamiento con UPA causó una disminución significativa en el porcentaje de MEC tanto en el tejido miometrial como leiomiomatoso. De la misma forma, la presencia de colágeno I también se redujo, tras el tratamiento, principalmente en el leiomioma.
8. En el tejido leiomiomatoso, el tratamiento con UPA provocó una reducción en el número de células cebadas y de macrófagos, aunque ambas aumentaron ligeramente en el tejido miometrial.
9. Los miofibroblastos en muestras de pacientes tratadas con UPA no sólo estuvieron presentes en el leiomioma, sino también en tejido miometrial.
10. Tras el tratamiento con UPA se observó un ligero aumento del número de células Ki67-ir en el tejido leiomiomatoso, mientras que en el tejido miometrial disminuyeron.

Conclusions

The conclusions drawn from this work have been the following:

1. Myometrial and leiomyomatous tissue have differences in the organization of smooth muscle cells and the distribution of the ECM. In addition, leiomyoma has a significantly higher percentage of ECM than healthy myometrium.
2. The percentage of Col I-ir area showed no differences between myometrial and leiomyomatous tissue, although differences in tissue distribution were observed.
3. Leiomyomatous tissue showed a higher number of mast cells than myometrial. The presence of these cells also showed variability between the samples.
4. The presence of macrophages (CD68-ir cells) was similar in myometrium and leiomyoma.
5. The presence of myofibroblasts in control patients was only observed in leiomyoma.
6. The number of Ki67-ir cells was higher in the myometrial tissue. However, in leiomyomatous tissue the intensity of the immunoreaction was higher.
7. UPA treatment caused a significant decrease in the percentage of ECM in both myometrial and leiomyomatous tissue. Similarly, the presence of collagen I was also reduced, after treatment, mainly in leiomyoma.
8. In leiomyomatous tissue, UPA treatment led to a reduction in the number of mast cells and of macrophages, although both increased slightly in the myometrial tissue.
9. Myofibroblasts in samples from patients treated with UPA were not only present in leiomyoma, but also in myometrial tissue.
10. After UPA treatment, a slight increase in the number of Ki67-ir cells in leiomyomatous tissue was observed, while in myometrial tissue they decreased.

Bibliografia

- Bourbouli, D., & Stetler-Stevenson, W. G. (2010). Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Seminars in Cancer Biology*, 20(3), 161-168. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.05.002>
- Brüggmann, D., Louwen, F., Braun, T., Klingelhöfer, D., Bauer, J., Bendels, M. H., Bundschuh, M., Quarcoo, D., Jaque, J., Wanke, E. M., & Groneberg, D. A. (2018). The uterine fibroid/myoma tumour: Analysis of the global research architecture using density-equalizing mapping. *Reproductive BioMedicine Online*, 36(2), 227-238. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.10.112>
- Chegini, N. (2010). Proinflammatory and Profibrotic Mediators: Principal Effectors of Leiomyoma Development as a Fibrotic Disorder. *Seminars in Reproductive Medicine*, 28(03), 180-203. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1251476>
- Courtoy, G. E., Donnez, J., Marbaix, E., & Dolmans, M.-M. (2015). In vivo mechanisms of uterine myoma volume reduction with ulipristal acetate treatment. *Fertility and Sterility*, 104(2), 426-434.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.04.025>
- Cox, J., Malik, M., Britten, J., Lewis, T., & Catherino, W. H. (2018). Ulipristal Acetate and Extracellular Matrix Production in Human Leiomyomas In Vivo: A Laboratory Analysis of a Randomized Placebo Controlled Trial. *Reproductive Sciences*, 25(2), 198-206. <https://doi.org/10.1177/1933719117728802>
- Eulálio Filho, W. M. N., Soares, E. A. S., Lima, M. S. O., Brazil, E. D. do N., Rodrigues, R. M. de M., Zeron, R. M. C., Silva, B. B., & Costa, P. V. L. (2019). Evaluation of KI-67 expression in uterine leiomyoma and in healthy myometrium: A pilot study. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 65(12), 1459-1463. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.65.12.1459>
- Flake, G. P., Moore, A. B., Sutton, D., Flagler, N., Clayton, N., Kissling, G. E., Hall, B. W., Horton, J., Walmer, D., Robboy, S. J., & Dixon, D. (2018). The Life Cycle of the Uterine Fibroid Myocyte. *Current Obstetrics and Gynecology Reports*, 7(2), 97-105. <https://doi.org/10.1007/s13669-018-0241-7>
- Fujisawa, C., & Castellot, J. J. (2014). Matrix production and remodeling as therapeutic targets for uterine leiomyoma. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 8(3), 179-194. <https://doi.org/10.1007/s12079-014-0234-x>
- 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. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx032>
- Leppert, P. C., Baginski, T., Prupas, C., Catherino, W. H., Pletcher, S., & Segars, J. H. (2004). Comparative ultrastructure of collagen fibrils in uterine leiomyomas and normal myometrium. *Fertility and Sterility*, 82, 1182-1187. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.04.030>
- Lewis, T. D., Malik, M., Britten, J., Parikh, T., Cox, J., & Catherino, W. H. (2019). Ulipristal acetate decreases active TGF- β 3 and its canonical signaling in uterine leiomyoma via two novel mechanisms. *Fertility and Sterility*, 111(4), 806-815.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.12.026>
- Lewis, T. D., Malik, M., Britten, J., San Pablo, A. M., & Catherino, W. H. (2018). A Comprehensive Review of the Pharmacologic Management of Uterine Leiomyoma. *BioMed Research International*, 2018, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2018/2414609>
- Li, L. T., Jiang, G., Chen, Q., & Zheng, J. N. (2015). Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Molecular Medicine Reports*, 11(3), 1566-1572. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2914>
- Malik, M., Norian, J., McCarthy-Keith, D., Britten, J., & Catherino, W. (2010). Why Leiomyomas Are Called Fibroids: The Central Role of Extracellular Matrix in Symptomatic Women. *Seminars in Reproductive Medicine*, 28(03), 169-179. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1251475>
- Protic, O., Toti, P., Islam, M. S., Occhini, R., Giannubilo, S. R., Catherino, W. H., Cinti, S., Petraglia, F., Ciavattini, A., Castellucci, M., Hinz, B., & Ciarmela, P. (2016). Possible involvement of inflammatory/reparative processes in the development of uterine fibroids. *Cell and Tissue Research*, 364(2), 415-427. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2324-3>
- Shin, S., Kim, J., Lee, S., Baek, J., Lee, J., Cho, C., & Ha, E. (2018). Ulipristal acetate induces cell cycle delay and remodeling of extracellular matrix. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3779>
- Stewart, E. A., Laughlin-Tommaso, S. K., Catherino, W. H., Lalitkumar, S., Gupta, D., & Vollenhoven, B. (2016). Uterine fibroids. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 16043. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.43>
- Szydłowska, I., Grabowska, M., Nawrocka-Rutkowska, J., Piasecka, M., & Starczewski, A. (2021). Markers of Cellular Proliferation, Apoptosis, Estrogen/Progesterone Receptor Expression and Fibrosis in Selective Progesterone Receptor Modulator (Ulipristal Acetate)-Treated Uterine Fibroids. *Journal of Clinical Medicine*, 10(4), 562. <https://doi.org/10.3390/jcm10040>