



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología.
Facultat de Medicina y Odontología.**

**ESTUDIO CLÍNICO, HISTOPATOLÓGICO,
INMUNOHISTOQUÍMICO Y CITOGÉNÉTICO DE LOS
TUMORES MESENQUIMALES UTERINOS DE
MÚSCULO LISO. BÚSQUEDA DE DIANAS
TERAPÉUTICAS**

Tesis doctoral presentada por Nuria Santonja López, médico especialista en Anatomía Patológica; para optar al título de Doctor en Medicina por la Universidad de Valencia.

Programa de doctorado: Obstetricia y Ginecología II, código: 290F.

Directores de la tesis: Dr. Samuel Navarro Fos, Dra. Rosa Noguera Salvá y
Dr. José Juan Santonja Lucas.

Valencia, Septiembre 2015.

D. Samuel Navarro Fos, Catedrático de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia. Jefe Clínico en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Dña. Rosa Noguera Salvá, Catedrático de Histología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia.

D. José Juan Santonja Lucas, Profesor titular de Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia. Jefe de servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital General Universitario de Valencia.

CERTIFICAN QUE:

La presente tesis doctoral “Estudio clínico, histopatológico, inmunohistoquímico y citogenético de los tumores mesenquimales uterinos de músculo liso. Búsqueda de dianas terapéuticas” ha sido realizada por Nuria Santonja López, Médico especialista en Anatomía Patológica, en el Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, y en el Departamento de Patología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, bajo nuestra dirección, y reúne todos los requisitos para su depósito y lectura.

Y para que así conste, firman la presente en Valencia, Septiembre de 2015.

Fdo: D. Samuel Navarro Fos

Fdo: Dña. Rosa Noguera Salvá

Fdo: D. José Juan Santonja Lucas

Dña. Núria Santonja López, médico especialista en Anatomía Patológica del Hospital General Universitario de Castellón de la Plana

CERTIFICA QUE:

-Es Miembro del Grupo de Investigación Traslacional de Tumores Sólidos Pediátricos del INCLIVA (Instituto de Investigación Sanitaria).

-Este trabajo fue subvencionado en parte por la Conselleria de Sanitat con la ayuda: “Factores predictivos de evolución en pacientes afectas de tumores mesenquimales fusocelulares uterinos de la Comunidad Valenciana”.

Referencia: CS2010-AP-125

Fecha de inicio: 01/01/010

Fecha de fin: 13/11/2010

Investigador principal: Rosa Noguera Salvá

Investigadores: Samuel Navarro Fos, Marta Piqueras Franco, **Nuria Santonja López** y Eva Villamón Ribate.

- Este trabajo ha sido parcialmente comunicado en los siguientes Congresos:

Comunicación en el 12th European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Solid Tumors. Nijmegen, The Netherlands. 3-6 de junio de 2010. “Analysis of p16 gene and protein status in Malignant Mixed Müllerian tumors of the uterus”. **Nuria Santonja**, Marta Piqueras, Rosa Noguera, Samuel Navarro.

Comunicación en el Congreso Europeo de Histología e Histopatología. Termis EU 2011 Annual Meeting. Granada, 7-10 de Junio 2011. “Expresión inmunohistoquímica de dianas terapéuticas en tejido uterino adulto y fetal”. **Nuria Santonja**, Marta Piqueras, Irene Tadeo, Rosa Noguera, Samuel Navarro.

Comunicación en el XXV Congreso de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y División Española de la International Academy of Pathology, XX Congreso de la Sociedad Española de Citología y I Congreso de la Sociedad Española de Patología Forense. Zaragoza, 18 a 21 de mayo de 2011 “Expresión inmunohistoquímica de dianas terapéuticas en tumores mesenquimales uterinos”. Samuel Navarro, **Nuria Santonja**, Marta Piqueras, Rosa Noguera.

Comunicación en el XXV Congreso Europeo de Anatomía Patológica, "Cell cycle markers and hormone therapeutic targets in uterine smooth muscle tumors, an immunohistochemical approach". Lisboa Agosto-Septiembre 2013. **Nuria Santonja**, Samuel Navarro.

Comunicación en el XXVII Congreso Nacional SEAP-IAP, XXII Congreso Nacional SEC, III Congreso Nacional SEPAF. Santander 19 - 23 Mayo, 2015. "Estudio de los patrones clinicopatológicos, inmunohistoquímicos y genéticos en tumores mesenquimales de músculo liso uterinos". **Santonja N**, Martín-Vañó S., de Marco Sola, G, Navarro S, Noguera R.

Agradecimientos

Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda de mucha gente, que durante estos 5 años han estado a mi lado.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis, su dedicación, ya que sin su ayuda no estaría en estos momentos escribiendo estas líneas. A Rosa Noguera, por su espíritu luchador, su empatía y su carácter perfeccionista y constante, siempre dispuesta a animarme y ayudarme. Muchas gracias, Rosa, por lo que he aprendido de ti, no sólo en lo profesional, también en lo personal. A Samuel Navarro, por todo lo que me enseñaste no sólo en estos 5 años, también durante toda la residencia, por aceptar dirigirme la tesis y tener paciencia. A mi padre, por impulsarme hacia la investigación, y enseñarme a no cerrar ninguna puerta a mí alrededor.

Agradecer también a la Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer, RTICC (RD06/0020/0102; RD12/0036/0020), a la Conselleria de Sanitat y al INCLIVA por el soporte concedido a este trabajo.

Por supuesto al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, “mi hogar”, donde daba gusto llegar a las 7 de la mañana un día cualquiera, o un día festivo, y encontrar tanta vida. Al que siempre será mi jefe, Antonio Ferrández, por tantas frases sabias. A todos los adjuntos Octavio Burgués, Jaume Ferrer, Carlos Monteagudo, Pilar Soriano Miguel Cerdá, Mari Carmen Sánchez, y residentes, ya todos especialistas, para los que no tengo palabras suficientes de agradecimiento, a Liria, Mje, Paco, Empar, Ana, Adriana, Vero, Andrea, Mari, Jaime; que forman parte de mi familia, y estuvieron siempre cerca, durante tantas horas de trabajo, haciendo amenos los malos momentos y divertidos los buenos.

De forma especial darle las gracias a las personas que me ayudaron a empezar desde cero este trabajo, a Bruno Casal Pardal, que me ayudó a recuperar tantos bloques y a repetir tantos cortes; siempre haciéndome reír. A Elisa Alonso Yuste, que estuvo a mi lado para realizar la técnica de inmunohistoquímica y el FISH, siempre con una sonrisa, una técnico excepcional.

Muchas gracias a mis amigos, Silvia, quién me ayudó tantas veces que no podría contabilizarlas; la primera tesis que leí y que escuché, siempre dispuesta a dedicarme su tiempo, por ser una maestra, y una amiga. A Patri, y a Jose Antonio, dos grandes investigadores, de los de verdad, por enseñarme a hacer muchas cosas con muy poco, gracias por vuestro entusiasmo, por vuestro apoyo. A Vicen, por ese empujón final, y hacer realidad mis ideas, con lo difícil que es entenderme a veces. A Teresa, por compartir tantos ratos de estudio, de estrés, por enseñarme a convertir un escrito, en una tesis. Gracias Liria, por estar siempre cerca y sacar lo mejor de mí, por compartir risas y lágrimas, el trabajo y la vida. A Patricia, a Vero, a Mje, a Fernando, a Judith, a Marco, a Nuria, a Silvia, por vuestra amistad.

A todas las grandes investigadoras del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología, en especial a Marta Piqueras, que me enseñó a no desesperarme con el FISH y me ayudó en innumerables ocasiones. A Irene Tadeo, una persona adorable siempre dispuesta a encontrar soluciones. A Susana Martín, que tuvo tanta paciencia.

Al la Unidad de Genotipado y Diagnóstico Genético del INCLIVA, en especial a Griselda de Marco por colaborar en mi trabajo y enseñarme tantas cosas.

Finalmente quiero dar las gracias a mi familia, por quererme y cuidarme tanto, a Santi, por ese amor incondicional, en los buenos y no tan buenos momentos, sufridor más que nadie de mis largas tardes de trabajo, sin ningún reproche; te quiero. A mis abuelas y mis tíos, a mis primas, siempre animándome a seguir adelante. A mis hermanas, y a mis padres, a ellos 4 en especial les dedico este trabajo, por enseñarme tanto y por haberme guiado hasta donde estoy. A mi hija, gracias, por haberme hecho feliz en la recta final de este trabajo, y haberme enseñado a relativizar y priorizar.

A mi hija, a mis hermanas, a mi madre, a
las pacientes... a las mujeres.

ÍNDICE

Índice	13
Abreviaturas utilizadas	15
Resumen	17
1. Introducción	25
1.1 Generalidades	27
1.2 Visión histórica	30
1.3 Epidemiología, manifestaciones clínicas e imagen radiológica	32
1.4 Caracterización histopatológica	34
1.4.1 Morfología macroscópica y microscópica	34
1.4.2 Clasificación de los leiomiomas uterinos	36
1.4.3 Clasificación de los leiomiomas uterinos	40
1.4.4 Inmunohistoquímica	42
1.4.5 Diagnóstico diferencial	50
1.4.6 Alteraciones citogenéticas	56
1.4.7 Predisposición genética y patología asociada	60
1.5 Factores pronósticos	61
1.6 Tratamiento	62
1.6.1 Cirugía	62
1.6.2 Quimioterapia, radioterapia y hormonoterapia	63
2. Hipótesis y objetivos	67
3. Material y métodos	71
3.1 Pacientes y muestras	73
3.2 Revisión clínico-patológica de los casos	75
3.3 Micromatrices tisulares (TMAs)	85
3.4 Técnicas inmunohistoquímicas	88
3.5 Estudio citogenético	91
3.5.1 Hibridación in situ fluorescente (FISH)	91
3.5.2 Arrays de polimorfismos de un único nucleótido o secuencia única (SNP)	99
3.6 Análisis estadístico	106
3.7 Árbol de clasificación para ayuda al diagnóstico	108

3.8 Limitaciones del estudio	110
4. Resultados	113
4.1 Hallazgos clinicopatológicos	115
4.2 Hallazgos inmunohistoquímicos	125
4.3 Hallazgos citogenéticos	161
4.3.1 Resultados de FISH	161
4.3.2 Resultados de los SNP	192
4.4 Relación entre los hallazgos clínicos y citogenéticos	196
4.5 Relación entre los hallazgos inmunohistoquímicos y citogenéticos	197
4.6 Asociación del intervalo libre de enfermedad y los parámetros clínicos y anatomopatológicos	200
4.7 Asociación del intervalo libre de enfermedad y los hallazgos inmunohistoquímicos y citogenéticos	204
4.8 Relación entre los hallazgos clínicos, anatomopatológicos y la supervivencia global	209
4.9 Relación entre los hallazgos inmunohistoquímicos y la supervivencia global	212
4.10 Relación entre los hallazgos inmunohistoquímicos y citogenéticos y la supervivencia global	214
4.10 Correlación entre los hallazgos citogenéticos y la supervivencia global	215
4.12 Árbol de toma de decisión en la ayuda al diagnóstico	218
5. Discusión	221
5.1 Hallazgos clínico-patológicos	223
5.2 Hallazgos inmunohistoquímicos	229
5.3 Hallazgos citogenéticos	246
5.4 Árbol de toma de decisión de ayuda al diagnóstico	249
6. Conclusiones	251
7. Anexos	255
8. Bibliografía	297

Abreviaturas utilizadas:

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AJCC: American Joint Committee of Cancer

CEP: Centromer enumeration probe (sonda centromérica)

CGA: Campos de gran aumento

CNLOH: Copy neutral loss of heterocygosity (número de copia neutro con pérdida de heterocigosidad)

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DIU: Dispositivo intrauterino

DM: Diabetes mellitus

DL: Dislipemia

EMA: Antígeno Epitelial de Membrana

FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization (Hibridación in situ fluorescente)

FSCA: Focal segmental chromosome aberration (aberración cromosómica focal segmentaria)

FSH: Hormona folículoestimulante

FDA: Food and Drug Administration

FvW: Factor von Willebrand

GIST: Tumor del estroma gastrointestinal

Gnrh: Hormona estimulante de las gonadotropinas.

Hb: Hemoglobina

H&E: Hematoxilina-eosina

HMG: High mobility group

HTA: Hipertensión arterial

IGF: Factor de crecimiento insulínico

IGFR: Receptor del factor de crecimiento insulínico

IHQ: Inmunohistoquímica

ILE: Intervalo libre de enfermedad

IVO: Instituto Valenciano de Oncología

kDa: Kilodalton

LH: Hormona luteinizante

LM: Leiomioma

LMA: Leiomioma atípico

LMC: Leiomioma celular

LME: Leiomioma especial

LMS: Leiomiosarcoma

LMU: Leiomioma usual

LSI: Indicador de locus específico

MSKCC: Memorial Sloan-Kettering Center. New York, USA

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Tampón fosfato salino

PDGFR: Receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PECAM: Molécula de adhesión de la plaqueta a célula endotelial

PEComa: Tumor de células epitelioides perivascular

PET: Tomografía por emisión de positrones

RCC: Reordenamientos cromosómicos complejos

RREE: Receptores de estrógenos

RRPP: Receptores de progesterona

RCC: Reordenamientos complejos cromosómicos

SEE: Sarcoma del estroma endometrial

SG: Supervivencia global

SNP: Polimorfismos de nucleótido simple

SOP: Síndrome del ovario poliquístico

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences (Paquete estadístico para las Ciencias Sociales)

TAC: Tomografía axial computerizada

T.ADY: Tejido adyacente

TMA: micro matrices tisulares

TMM: Tumor mixto mulleriano

UC: Útero control

UF: Útero fetal

Resumen:

INTRODUCCIÓN

Los tumores mesenquimales más frecuentes en el útero, son los leiomiomas (LM). Esta patología tiene numerosas consecuencias médicas y sociales, siendo la causa más frecuente de histerectomía condicionando, en ocasiones, la fertilidad. Por otro lado su contrapartida maligna, poco frecuente, los leiomiomas (LMS), son tumores agresivos, con escasas posibilidades terapéuticas tras la cirugía, y con una elevada mortalidad. En la mayor parte de los casos, los LMS uterinos no surgen de un LM previo, sino que son lesiones malignas de entrada.

Ambas entidades están relacionadas con las fibras musculares lisas del miometrio y presentan algunas semejanzas morfológicas e inmunohistoquímicas (IHQ).

Desde el punto de vista anatomopatológico, criterios como el pleomorfismo, el recuento mitótico, y la presencia de necrosis coagulativa son importantes en el diagnóstico diferencial. Asimismo, el crecimiento infiltrativo, y la invasión vascular son caracteres sugestivos de malignidad, y, aunque de forma aislada, ningún criterio es definitivo de malignidad, el conjunto de todos ellos permite en la mayor parte de los casos el correcto diagnóstico histopatológico.

A nivel inmunohistoquímico (IHQ), ambos grupos de tumores presentan marcadores de diferenciación de músculo liso (actina, desmina y h-caldesmon); los LM suelen presentar positividad frente a receptores de estrógenos (RREE) y menos frecuentemente a receptores de progesterona (RRPP), siendo únicamente un tercio de los LMS positivos frente a estos receptores hormonales. Otros hallazgos IHQ, como la expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis (Bcl-2, Bax), del ciclo celular (p21, p27, p16 y p53) o de proliferación (ki67) apoyan el diagnóstico de malignidad. El receptor de tirosinquinasa c-kit (CD117) suele ser negativo tanto en los LM como LMS, aunque se han visto casos positivos en ambos grupos, con un patrón de positividad diferente y sin relación con la mutación del gen *c-kit* ni con la supervivencia.

En cuanto a las alteraciones genéticas, los LM uterinos son procesos clonales en los que aproximadamente el 60% de los casos no presentan alteraciones cromosómicas. El 40% restante presenta cambios genéticos no específicos de estos tumores, predominando la traslocación entre los cromosomas 12 y 14, deleciones de cromosoma 7,

reorganizaciones de 6p21 y trisomías del cromosoma 12. Los LMS en cambio suelen tener genotipos inespecíficos más complejos observándose en un subgrupo, mutaciones somáticas en el exón 2 de la subunidad 12 del complejo mediador (gen *MED12*), sugiriendo su desarrollo sobre un LM previo.

Mientras que el pronóstico de los LM es excelente, en los LMS es poco favorable. El factor pronóstico fundamental en estos últimos tumores es el estadio quirúrgico, siendo también significativa la edad y la invasión vascular. Algunos estudios han sugerido como valor pronóstico independiente, la expresión de receptores hormonales, y de las proteínas p53, ki67 y Bcl-2.

El tratamiento de los LM depende de múltiples factores. La clínica, localización, tamaño tumoral, la edad y los deseos reproductivos de la paciente, llevan a decidir entre un abanico muy amplio de tratamientos. El tratamiento de los LMS uterinos, de entrada, es quirúrgico aunque completándolo en función del estadio, con la radioterapia (RT) y la quimioterapia (QT).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra hipótesis se basa en la existencia de patrones diferentes en LM y LMS uterinos que intervienen en su comportamiento distinto y su pronóstico diferente.

Nuestro objetivo principal es encontrar las características clínicas, histopatológicas, inmunohistoquímicas y citogenéticas que nos permitan no sólo diagnosticar los tumores mesenquimales de músculo liso uterinos, sino realizar un pronóstico más certero e incluso poder predecir posibles dianas terapéuticas eficaces.

RESULTADOS

La mediana de **edad** de presentación de los LMS uterinos fue de 56,6 años, frente a la de los grupos de LM, que estuvieron entre los 42 años en los leiomiomas celulares (LMC) y los 48 años en los leiomiomas usuales (LMU). La mayor parte de los LMS uterinos se diagnosticaron en la menopausia, mientras que los LM predominaron en mujeres fértiles.

El **tamaño tumoral** fue mayor en los LMS frente a los LM, con una media de 9,38 cm (en un rango entre 0,5 y 20 cm) y 5,6 cm (en un rango entre 0,5 y 11 cm)

respectivamente. Un tamaño tumoral de 10 cm o superior, supuso un criterio de mal pronóstico en los LMS.

Mientras que los grupos de LM presentaron en todos los casos un **recuento mitótico** por debajo de 10 mitosis en 10 campos de gran aumento (CGA), en el 70% de los LMS se evidenció un número de mitosis por encima de 10 mitosis en 10 CGA. Encontramos que un conteo mitótico por encima de 15 era un factor de mal pronóstico en los LMS ($p < 0,05$).

El índice proliferativo con la expresión de **ki-67**, fue superior en el grupo de los LMS frente a los grupos de tumores benignos, así como frente al grupo control.

Se observó mayor expresión de **Bcl-2** en los LM frente a los LMS; en cambio, otro marcador de apoptosis, **Bax**, no presentó diferencias notables entre los grupos tumorales.

Las proteínas relacionadas con el ciclo celular **p53**, **p16** y **p21**, se expresaron de forma significativa en mayor medida en los tumores malignos.

Otras proteínas como el c-kit, c-erb-B2 y β -catenina, también se expresaron más frecuentemente en los tumores malignos.

Los **receptores hormonales** estudiados, estrógenos y progesterona se encontraron en todos los tumores benignos y en la mitad de los casos de LMS.

Los **hallazgos citogenéticos** en los LM y LMS fueron muy diferentes. Con la sonda Urovysion, en los controles de miometrio sano y en los LM no observamos ningún cambio numérico de los cromosomas 3, 7 ni 17 ni en el locus específico 9p21. Sin embargo, todos los LMS, a excepción de un caso, presentaron alteraciones cromosómicas numéricas. La más frecuente fue la ganancia del cromosoma 3, en un 87,5% de los casos, seguida de la ganancia del cromosoma 17, en un 62,5% de los casos, y ganancias de 7 en un 37,5% de los casos. No observamos pérdidas numéricas en estos cromosomas 3, 7 y 17. Así mismo, el 37,5% de los LMS presentaron ganancias del locus 9p21, y un único caso presentó pérdida de esta región (6,3%). En el estudio con la técnica de SNP llevado a cabo en 7 casos, incluyendo 3 leiomiomas atípicos (LMA) y 4 LMS pudimos observar numerosas alteraciones cromosómicas segmentarias. En los 3 LMA, los cambios cromosómicos segmentarios detectados por SNP afectaban a un máximo de 2 cromosomas aunque con múltiples rupturas, independientemente del tamaño tumoral. En los 3 LMS estudiados, los cambios cromosómicos segmentarios detectados afectaban a un número muy variable de cromosomas (hasta un máximo de 9), estando en relación el número de cromosomas afectados con cambios segmentarios y el tamaño tumoral.

En cuanto a la relación de las variables estudiadas con el intervalo libre de enfermedad (ILE) y la supervivencia global (SG) en el grupo de los LMS, el escaso número de casos sólo permite valorar de forma orientativa los resultados. Se observó una tendencia a un mayor ILE en pacientes con tumores positivos frente a las proteínas p53 y c-kit y una tendencia a una mayor SG en aquellos casos que combinaban tumores con un número de mitosis inferior a 15 en 10 CGA y un tamaño tumoral inferior a 10 cm. En el estudio computacional, observamos con tres modelos distintos, que utilizando dos variables, el número de mitosis combinado con la expresión de c-kit, p53 o ki67 el programa permitía con una precisión aproximada del 80%, diferenciar correctamente LM y LMS.

CONCLUSIONES

La edad al diagnóstico y el tamaño pueden permitir al clínico sospechar si se trata de un tumor mesenquimal benigno o maligno de forma inicial, consideramos como factores de riesgo de malignidad una edad por encima de 50 años y un tamaño tumoral por encima de 10 cm.

A nivel anatomopatológico, un recuento de más de 10 mitosis en 10 CGA es un criterio importante de malignidad.

Vemos adecuado, por los resultados obtenidos en este trabajo, realizar estudios de expresión de ki67, Bcl-2, p53, p16, p21, c-kit y RRPP, como marcadores de diagnóstico diferencial. Sería interesante estudiar la relación entre la expresión de c-kit y el ILE y de parámetros como la edad, el tamaño, el número de mitosis y su relación con la SG en los LMS.

Genéticamente, utilizando la técnica de FISH, son frecuentes las alteraciones numéricas encontradas en los cromosomas 3, 7 y 17, así como del locus 9p21 en los LMS, a diferencia de lo observado en los LM. Los estudios realizados con la técnica de SNP mostraron alteraciones cromosómicas segmentarias variadas tanto en los LMA como en los LMS, observándose una relación entre el tamaño tumoral y el número de cromosomas con alteraciones segmentarias únicamente en los LMS.

Summary:

INTRODUCTION

The most common mesenchymal tumors in the uterus are leiomyomas (LM). This condition has numerous medical and social consequences, being the most common cause of hysterectomy, and sometimes conditioning fertility. On the other hand, the leiomyosarcoma (LMS), are aggressive and rare tumors, with few therapeutic options after surgery, and with high mortality. In most cases, uterine LMS not arise from a previous LM but are malignant lesions from the beginning. Both entities have are related to the smooth muscle fibers of the myometrium and have some morphological and immunohistochemical (IHQ) similarities.

Morphologically, criteria as pleomorphism, mitotic count, and the presence of coagulative necrosis are essential in the differential diagnosis. Also, the infiltrative growth, and vascular invasion features are suggestive of malignancy. Although isolated results are not definitive criterion of malignancy, the set of all data permits in most cases the correct histopathological diagnosis.

At immunohistochemistry (IHQ) level, both groups of tumors express differentiation markers of smooth muscle (actin, desmin and h-caldesmon); the LM usually present positivity for estrogen receptor (RREE) and less frequently for progesterone receptor (RRPP), with only a third of the LMS positive against these hormone receptors. Other IHQ findings as the positivity for apoptosis regulatory proteins (Bcl-2, Bax), cell cycle (p21, p27, p16 and p53) or proliferation (Ki67) proteins support the diagnosis of malignancy. The *c-kit* is often negative for both LM and LMS, although there have been positive cases in both groups, with a different pattern of positivity and unrelated to the *c-kit* gene mutation or survival.

Regarding genetic alterations in uterine LM was found to be clonal processes in which approximately 60% of cases not present chromosomal alterations. The remaining 40% have no specific genetic tumor changes where predominates translocation between chromosomes 12 and 14, deletions of chromosome 7, 6p21 reorganizations and trisomy of chromosome 12. LMS however often have more complex nonspecific genotypes, being observed in a tumor subset genetic changes, somatic mutations in exon 2 of the mediator complex subunit 12 (*MED12* gene), suggesting its development in a previous LM.

While the prognosis of LM is excellent, in the LMS it is unfavorable. The primary risk factor in these tumors is surgical stage and also significant age and vascular invasion. Some studies have suggested as an independent prognostic value, the hormone receptor and protein p53, Ki67 and Bcl-2 expression.

The treatment of the LM depends on multiple factors. Clinic aspects, location, tumor size, age and reproductive expectatives of the patient, leading to decide between a very wide range of treatments. The treatment of uterine LMS is surgical, and/or complemented with radiotherapy (RT) and chemotherapy (QT) depending of the stage.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

Our hypothesis was based on the existence of different patterns between uterine LMS and LM that generate their different behavior and prognosis.

Our main objective is to find the clinical, histological, immunohistochemical and cytogenetic characteristics that allows us to not only diagnose mesenchymal uterine smooth muscle tumors, but a more accurate prognosis and even to predict effective therapeutic targets.

RESULTS

The median age of onset of uterine LMS was 56.6 years, compared to the LM groups, who were among the 42 years in the cellular leiomyomas (LMC) and 48 years in the usual leiomyomas (LMU). Most of uterine LMS presented in menopause, while LM predominated in fertile women.

Tumor size was higher in the LMS versus LM, with an average of 9.38 cm (range 0.5 to 20 cm) and 5.6 cm (range 0.5 to 11 cm) respectively. A tumor size of 10 cm or more, was a criterion of poor prognosis in the LMS.

While LM groups showed in all cases a mitotic count below 10 mitoses in 10 high power fields (HPF), 70% of the LMS presented a number of mitosis above 10 in 10 CGA. We found that mitotic count above 15 was a poor prognostic factor in the LMS ($p < 0.05$).

The proliferation index, highlighted with ki-67 was higher in the group of LMS versus groups of benign tumors and compared to the control group.

Increased expression were observed of Bcl-2 in the LM against the LMS, however, another marker of apoptosis, Bax, presented no significant differences between groups.

Proteins related to cell cycle p53, p16 and p21 were expressed significantly in a greater extent in malignant tumors.

Other proteins such as c-kit, c-erb-B2 and β -catenin, also are more frequently expressed in malignant tumors.

The estrogen and progesterone receptors were found in all benign tumors and in half of the LMS.

Cytogenetic findings of LM and LMS were very different. With UroVysion probe in the healthy myometrium and in the LM we did not observe any numerical change of chromosomes 3, 7 or 17 or the specific locus 9p21. However, the entire group of LMS, except for one case, presented numerical chromosomal abnormalities. The most frequent was the gain of chromosome 3 in 87.5% of cases, followed by the gain of chromosome 17, in 62.5% of cases, and gain of chromosome 7 in 37.5% of cases. We observed no numerical chromosomal losses of chromosomes 3, 7 or 17. Likewise, 37.5% of LMS presented gain of 9p21 locus, and one case had loss of this region (6.3%). In the study with the technique SNP carried out in 7 cases, including 3 atypical leiomyomas (LMA) and 4 LMS we could observe numerous segmental chromosomal alterations. In the 3 LMA, studied segmental chromosomal changes detected by SNP affected up to 2 chromosomes but with multiple breaks, regardless of tumor size. In the 3 studied LMS, segmental chromosomal changes, detected, affected a variable number of chromosomes (up to 9), being related the number of affected chromosomes with segmental changes and tumor size.

Regarding the relationship of these studied variables with the disease-free interval (ILE) and overall survival (SG), the small number of cases only allows evaluating the results orientation in the group of LMS. A higher ILE tendency was observed with positive tumors against p53 and c-kit protein and a trend towards increased SG when combining tumors with fewer than 15 mitosis in 10 CGA and tumor size less than 10 cm. In the computational study, we observed with three different models, that using two variables, the number of mitosis combined with the expression of c-kit, p53 or Ki67 the program allowed with an accuracy of 80% correctly classify between LM and LMS.

CONCLUSIONS

Age at diagnosis and size tumor can allow the clinician to suspect whether it is a benign or malignant mesenchymal tumor at initial level, we consider as risk factors for malignancy an age above 50 years old and a tumor size above 10 cm.

Regarding pathologic aspects, a count of more than 10 mitosis in 10 CGA is an important criterion for malignancy.

We consider appropriate, by the results obtained in this work, IHQ studies of expression of Ki67, Bcl-2, p53, p16, p21, c-kit and RRPP, as markers for differential diagnosis. It would be interesting to study the relationship between the expression of c-kit and the ILE and parameters such the age, the size, the number of mitosis and its relationship with the SG in the LMS.

Genetically, using FISH technique, there are frequent numerical alterations found on chromosomes 3, 7 and 17, and the 9p21 locus in the LMS, unlike that observed in LM. Studies with SNP technique showed segmental chromosomal alterations varied both in LMA and LMS, showing a relationship between tumor size and number of chromosomes with segmental alterations only in the LMS.

1. INTRODUCCIÓN

“La única cosa peor a empezar algo y fracasar... es no empezar algo”. Seth Godin

1.1 GENERALIDADES:

En el desarrollo embriológico del aparato genital femenino son fundamentales el mesonefros y los conductos mesonéfricos de Wolff, que derivan del mesodermo intermedio, de los segmentos torácicos superiores a los lumbares superiores (L3). El tracto genital se diferencia después de las gónadas. A mediados del segundo mes de desarrollo (semana 5 a 8), el mesonefros da lugar a un órgano ovoide voluminoso a cada lado de la línea media. Como la gónada en desarrollo está situada en el lado interno del mesonefros, el relieve producido por ambos órganos se denomina cresta urogenital [1, 2].

Los conductos paramesonéfricos de Müller aparecen (en el embrión de 4 a 5 mm de longitud) como una invaginación longitudinal del epitelio celómico superficial en la cara anterolateral de la cresta urogenital y se rodea de una capa de mesénquima espláncico. En un principio en los conductos paramesonéfricos se identifican tres porciones: una porción craneal vertical que desemboca en el celoma, una porción horizontal que cruza el conducto mesonéfrico, y una porción caudal vertical que se fusiona con la correspondiente del lado opuesto. Las dos primeras porciones se transforman en la trompa de Falopio, mientras que de la última porción, o caudal, deriva el conducto uterino y la parte más alta de la vagina. Con el transcurso del tiempo, el mesénquima que rodea los conductos paramesonéfricos constituye la túnica muscular del útero, o miometrio, y el estroma endometrial, así como su revestimiento peritoneal. La formación de la estructura uterina, vagina, trompas y cérvix viene determinada por la interacción estroma-epitelio [1, 2].

Los estrógenos, que provienen tanto de la madre como de la placenta (los ovarios embrionarios, a diferencia de los testículos no forman hormonas esteroideas), intervienen en la diferenciación sexual, estimulando a los conductos paramesonéfricos a formar las trompas uterinas, el útero, el cérvix y la porción superior de la vagina, sin embargo su papel en la diferenciación de los derivados Mullerianos es limitada, pues experimentalmente en los ratones manipulados que no expresan receptores de estrógenos ($Er\alpha$ y $Er\beta$) la diferenciación es normal aunque postnatalmente los órganos derivados quedan hipoplásicos [1-3].

El cuerpo uterino es un órgano en forma de pera, alojado en la pelvis mayor (figura 1). A la sección presenta 3 capas, el endometrio formado por epitelio glandular de células columnares, cuyo origen es el epitelio celómico que tapizó los conductos de Müller, y el estroma muy celular constituido por células fusiformes, monomorfas de núcleos redondeados u ovoides de cromatina fina y nucleolo inaparente, cuyo origen es el mesénquima mesonéfrico subyacente; el miometrio, formado principalmente por músculo liso en haces entrecruzados en distintas capas

(figura 2 y 3) de células fusiformes de núcleos ovoides de bordes romos y la serosa, formada por peritoneo y parametrios.

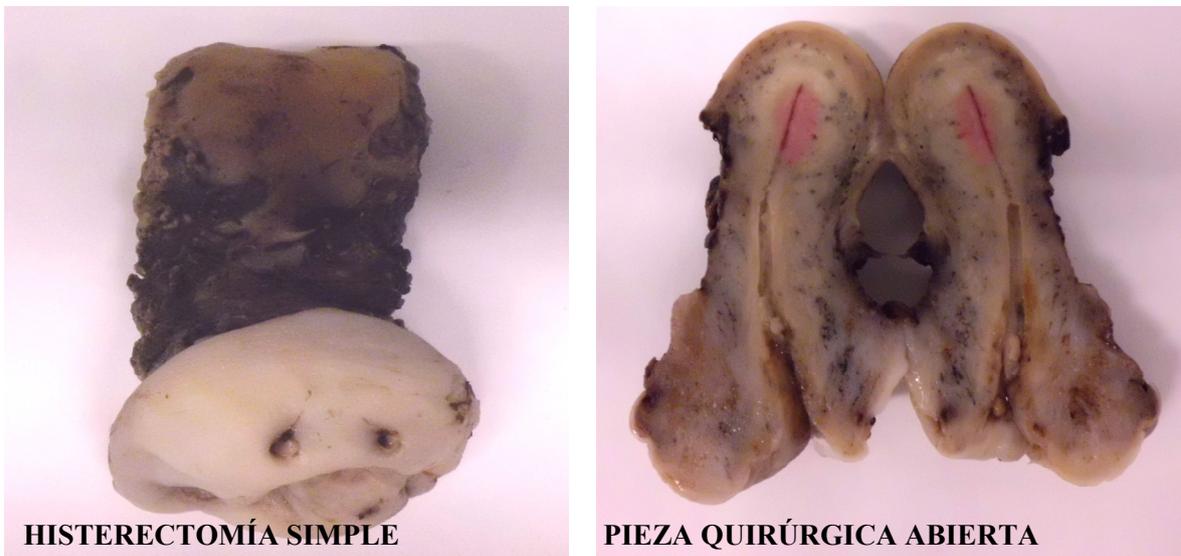


Figura 1: Imágenes macroscópicas del útero

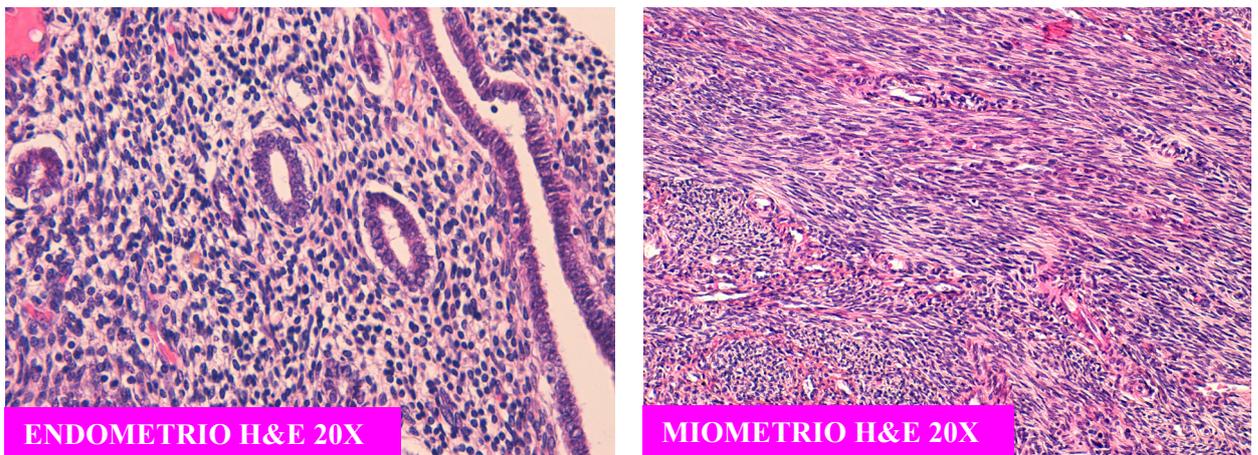


Figura 2: Imágenes microscópicas con Hematoxilina-Eosina (H&E) del tejido uterino

El útero está irrigado por las arterias uterinas, ramas de la arteria hipogástrica e innervado por los plexos hipogástrico superior e inferior. El drenaje linfático se dirige principalmente a los ganglios linfáticos ilíacos internos y externos y obturadores y después, hacia los paraaórticos. Está sometido a partir de la menarquia y hasta la menopausia a estímulos constantes y cíclicos hormonales, preparándolo para una posible concepción. Además tiene propiedades excepcionales para poder llevar a término el embarazo y llevar a cabo tras el parto, la posterior recuperación de los tejidos. A partir de la menopausia los estímulos hormonales son mucho menores (no ausentes), dejando de ser cíclicos [2].

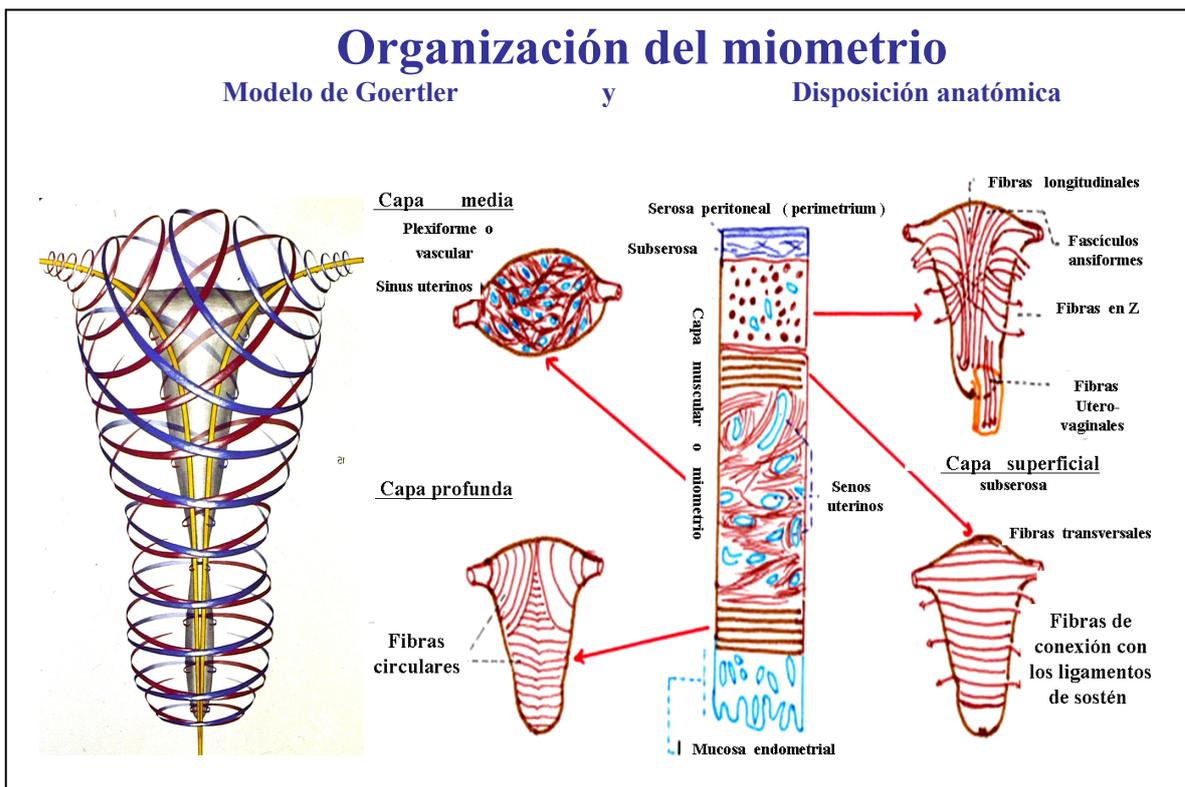


Figura 3: Organización del miometrio

A nivel central, la corteza cerebral manda estímulos al hipotálamo. El núcleo arqueado, situado en la fosita olfatoria posterior, segrega de forma pulsátil un decapeptido, GnRh (hormona estimulante de las gonadotropinas) que estimula la hipófisis, provocando la secreción de LH y FSH, glucoproteínas segregadas por las células gonadotropas (basófilas) de la hipófisis anterior.

1.2 VISIÓN HISTÓRICA

En referencia a los tumores mesenquimales, los **LM uterinos** son tumores benignos conocidos desde hace más de doscientos años, aunque a pesar de ello las causas de su aparición permanecen poco claras y su patogenia está sólo parcialmente aclarada [4]. La nuliparidad, la raza afroamericana, la diabetes mellitus, la hipertensión y la obesidad, son factores de riesgo conocidos [5-7], mientras que el papel de los anticonceptivos hormonales sigue estando poco claro.

Los sarcomas uterinos son tumores conocidos desde el siglo XIX. El primer caso fue descrito en 1860 por C.Mayer, siendo Virchow quien realizó la descripción microscópica [8]. Posteriormente se describieron más casos aislados o en pequeñas series como Keegar y cols en 1871 con 9 casos. Todos ellos mantenían la uniformidad en la clínica, apareciendo con sangrado y/o dolor abdominal, siendo tratados quirúrgicamente con histerectomía y doble anexectomía. Macroscópicamente se describieron como tumores mal delimitados y claramente infiltrantes, con una histología característica de células fusocelulares con escasa matriz intercelular y acompañado todo ello de un mal pronóstico, asociado en alguna ocasión con metástasis. Hasta el año 1901 estos tumores se clasificaron según su origen, ya fuese en la mucosa, en la pared del cuerpo uterino, o en el cérvix recogiendo series de estas localizaciones de hasta 144 casos, la más amplia de Williams y cols en 1894 [8].

Los **LMS** uterinos se definieron a principios del siglo pasado, como un grupo delimitado de sarcomas uterinos. En 1905 Pequand describió de forma sencilla las diferentes variedades de sarcomas uterinos [9], considerando que prácticamente todos los LMS surgían de la transformación maligna de LM preexistentes. Describió también que los sarcomas podían aparecer en el tejido muscular liso sin un tumor preexistente, y realizó un listado de las diferentes teorías del origen de estas neoplasias: 1- Proliferación del tejido conectivo intramuscular. 2- Proliferación de los vasos sanguíneos o linfáticos. 3-Transformación de las fibras musculares. En un principio, estos tumores se clasificaron en el grupo llamado “leiomioblastomas” definido según Mallory como “tumores de origen mesenquimal en el que las células tienden a diferenciarse en células musculares lisas” siguiendo unos criterios morfológicos básicos. En este grupo de “leiomioblastomas” se encontraban los LM, de crecimiento lento, y diferenciación perfecta y los LMS, de crecimiento rápido con un elevado número de mitosis, y diferenciación menos evidente, observando su agresividad local y su capacidad metastásica, más frecuentemente por vía linfática, y en menor grado por vía hemática [10]. En los primeros trabajos, ciertas características, como los signos de invasión en un LM

fueron datos concluyentes de malignidad [11]. Más adelante se establecieron numerosos criterios para diferenciar tanto los LM y los tumores de musculo liso con potencial de malignidad incierto de los LMS así como para clasificar los LMS en diferentes grados, utilizando datos morfológicos (densidad celular, pleomorfismo, hiper cromatismo, anaplasia, multinucleación, mitosis, necrosis, etc.). Fue Evans en 1920 el primero en documentar la importancia del número de mitosis, poniendo en relevancia la importancia del diagnóstico histológico y de la toma de muestras. [9, 12]. Actualmente sabemos que menos del 5% de los LMS surgen de una transformación maligna de un LM preexistente [13] .

De los tejidos uterinos surgen multitud de tumores, los más frecuentes son los LM, tumores benignos de músculo liso, que histológicamente pueden encontrarse en el 70 % de las mujeres próximas a la menopausia. Otros muchos tienen carácter maligno, surgiendo:

- **del componente epitelial** de la mucosa endometrial: Adenocarcinomas, que son los cánceres ginecológicos pélvicos más frecuentes y constituyen el 95% de las neoplasias malignas uterinas. Otros tumores menos frecuentes son los tumores mixtos mullerianos (TMM) también llamados carcinosarcomas (reconocido ya su origen epitelial).

- **del componente estromal** de la mucosa endometrial, surgen los sarcomas del estroma endometrial (SEE) que representan aproximadamente el 20 % de los sarcomas de localización uterina, son lesiones de bajo grado; otros tumores monofásicos son los sarcomas endometriales indiferenciados, neoplasias de alto grado, representando aproximadamente el 6% de los sarcomas uterinos [14].

- **de las fibras musculares**, los LMS que constituyen el 40-50 % de los sarcomas uterinos.

-**de otros componentes del mesénquima**, como los vasos sanguíneos o de los linfáticos, (angiosarcomas) aunque muy poco frecuentes en estas localizaciones. Y los de origen desconocido como los PEComas, tumores raros, asociados en alrededor del 9% de los casos a la esclerosis tuberosa.

1.3 EPIDEMIOLOGIA, MANIFESTACIONES CLÍNICAS E IMAGEN RADIOLÓGICA

Los LM son los tumores ginecológicos más frecuentes. Son neoplasias originadas en el miometrio uterino con una etiología incierta. Se presentan según las series hasta en el 70% de las mujeres en edad fértil [5] en las piezas de histerectomía, y en necropsias, estimándose su incidencia basada en la clínica hasta en el 33% y en las exploraciones por imagen hasta en el 50% de este grupo de edad. Estas neoplasias, aunque benignas producen una morbilidad significativa. Pueden ser de gran tamaño y múltiples observándose un promedio en algunos estudios de 6,5 tumores por útero [5]; y aunque muchos LM son asintomáticos, un tercio pueden producir, según su localización, diferente sintomatología como menorragia y anemia sobretodo en los submucosos, y debido al efecto masa local sobre todo los de mayor tamaño, incontinencia urinaria, hidronefrosis, dolor y molestias pélvicas o estreñimiento. Los de localización submucosa se caracterizan por presentar metrorragias, problemas de infertilidad, abortos de repetición [15], y si coinciden con un embarazo aumenta el riesgo de partos pretérmino [16]; siendo estos tumores la causa más frecuente de histerectomía [17, 18], teniendo un coste elevado para la sanidad. Los LM tienen una etiología incierta en la que convergen la predisposición genética, las acciones hormonales incluyendo la menarquia precoz [19], el aumento del índice de masa corporal y la nuliparidad [20-22]. Hay otros factores de riesgo como la diabetes, la hipertensión, la obesidad [5, 6], o el predominio en mujeres de raza negra [7]. También el consumo de alcohol y la cafeína se asocian con un aumento del riesgo de LM uterinos [23, 24].

El diagnóstico primario es clínico, los casos asintomáticos son hallazgos casuales en una revisión ginecológica o en exploraciones por imagen realizadas por otras patologías.

La ecografía pélvica, en especial la ecografía transvaginal, los identifica con facilidad, como masas de ecogenicidad variable, más frecuentemente hipoecoicas, de límites precisos. Su aglomeración puede confundir en su número y localización. La ecografía transvaginal contrastada con la perfusión intrauterina de suero fisiológico (la sonohisterografía) permite definir bien a los LM submucosos, cuya masa resalta entre el suero fisiológico, pudiendo diferenciarse de los pólipos endometriales si se estudia la vascularización con Doppler color, pues el pólipo tiene un eje central vascular en tanto que los miomas presentan una vascularización periférica. En ambos casos las resistencias al flujo sanguíneo son elevadas, propias de los procesos benignos. En la histerosalpingografía los LM submucosos se presentan como una alteración de llenado de la cavidad uterina, semejante a la de los pólipos endometriales.

La mejor opción para una correcta visualización y determinación de su número, tamaño y localización es la resonancia magnética [25], observándose una masa homogénea, bien delimitada de baja señal [26].

Los LMS son los sarcomas uterinos más frecuentes representando el 40-50% del total de sarcomas uterinos y el 1-3% de todas las neoplasias malignas uterinas [27]. Estos tumores suelen ser únicos, excepcionales en mujeres jóvenes, su frecuencia aumenta a partir de los 45 años, pero la mayoría afectan a mujeres postmenopáusicas, con una edad media de entre 51 a 56 años [14, 28]. Su presentación clínica inicial es similar a la de los LM uterinos: metrorragias (56%), masa pélvica palpable (54%), y dolor pélvico (22%), y muy rara vez se presentan con clínica de rotura uterina y hemoperitoneo. Los LMS son tumores muy agresivos con tendencia a la recidiva local y las metástasis, aunque raramente se extienden a los ganglios linfáticos [28]. Su etiopatogenia en relación con los LM no está clara aunque algunos LMS pudieran provenir de una transformación maligna de LM atípicos (LMA) o mitóticamente activos, en los que se observa un idéntico patrón de inactivación del cromosoma X en la porción benigna y la sarcomatosa. Seguramente la mayoría de los LMS surgen como tales desde el inicio, sin relación a LM preexistentes, aunque existe una minoría que proceden de una malignización de lesiones previas [29]. Esta hipótesis se sostiene por el reciente estudio de microRNAs en los cuales el perfil de expresión entre los LM y LMS es diferente [30, 31].

Los hallazgos por resonancia magnética de los LMS suelen ser una gran masa heterogénea, con imagen hiperintensa en T2 que suele indicar zona de necrosis. La hemorragia es frecuente y se pueden encontrar calcificaciones. A veces, los LMS pueden mostrar una masa homogénea de baja señal similar a la de un LM [26, 32]. También se han visto otros signos por imagen para diferenciar los LM de los LMS, como la vascularización por Doppler (aumentada, heterogénea y de baja resistencia), la TAC (en la identificación de metástasis a distancia) o el PET (por el metabolismo acelerado de las células sarcomatosas), aunque siempre se necesita la confirmación histopatológica para el diagnóstico de certeza.

1.4 CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA

1.4.1: MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA

Los LM uterinos son tumores bien delimitados, no encapsulados, aunque la presión de su crecimiento en el miometrio adyacente genera un espacio virtual que actúa como pseudocápsula. Son frecuentemente múltiples y de tamaño variable, habitualmente entre 3 a 5 cm [2]. Presentan una consistencia fibrosa, de coloración blanquecina y aspecto arremolinado, constituidos mayoritariamente por células fusiformes, homogéneas, de citoplasma eosinófilo mal delimitado, núcleo ovoide de bordes romos y nucleolo inconspicuo, que crecen en haces entrecruzados, observándose raramente necrosis y mitosis [33] (figura 4). Son tumores benignos de células musculares lisas, y contienen abundante matriz extracelular constituida por colágeno, fibronectina y proteoglicanos [34, 35]. En algunos casos la celularidad puede ser epitelioides o presentar aspecto serpinginoso. Además no es extraño observar aéreas de degeneración mixoide o zonas de esclerosis.

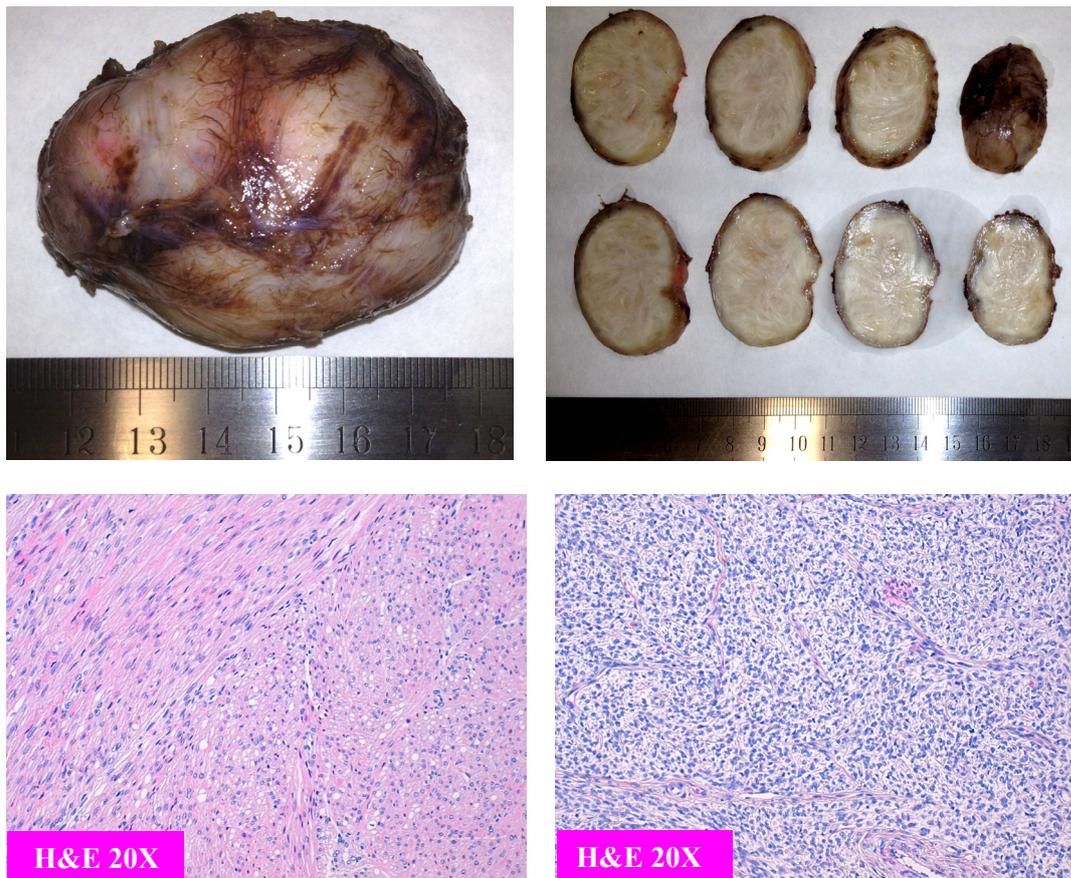


Figura 4: Imágenes macroscópicas y microscópicas del leiomioma uterino

Los LMS uterinos son usualmente masas únicas, presentan macroscópicamente un aspecto irregular, carnosos, blandos “en carne de pescado”, de coloración amarillenta a grisácea, observándose microscópicamente aspecto infiltrativo, con bordes mal delimitados. Algunas veces se pueden detectar macroscópicamente áreas de hemorragia e incluso de necrosis. El diagnóstico anatomopatológico de LMS se efectúa con 3 hallazgos: la atipia citológica; basándonos en el pleomorfismo, la irregularidad nuclear, la hiper cromasia y el tamaño de los nucléolos; la necrosis tumoral, y el número de mitosis [2, 36].

La celularidad es frecuentemente fusiforme, heterogénea y pleomórfica, de núcleos grandes, con atipia celular que puede variar de leve a intensa (figura 5) y en gran parte de los casos un alto índice mitótico (superior a 15 mitosis en 10 CGA) con mitosis atípicas y necrosis coagulativa. En los LMS de células fusiformes convencionales, el diagnóstico se puede realizar cumpliendo dos de los tres criterios morfológicos siguientes: atipia citológica de moderada a severa, necrosis tumoral, y ≥ 10 mitosis en 10 CGA [37]. En cambio para los LMS mixoides o LMS epitelioides no se requiere un gran recuento mitótico. La distribución perivascular de la celularidad tumoral viable suele ser característica de la necrosis tumoral que no hay que confundirla con áreas de infarto [12].

Además, los LMS suelen presentar alguno de estos datos clinicopatológicos: edad peri o postmenopáusia, extensión extrauterina, gran tamaño (superior a 10 cm), y crecimiento muy rápido [38]. Aunque no es lo más frecuente, se pueden encontrar LMS surgiendo de LM uterinos, con zonas claramente benignas y áreas de transformación con criterios objetivos de malignidad por lo que es de vital importancia el correcto muestreo, tomando material de las diferentes zonas observadas (como áreas de hemorragia, necrosis, degeneración mixoide) [12] y al menos una muestra por cm^2 de tumor en todas las lesiones uterinas, incluso sin sospecha de malignidad.

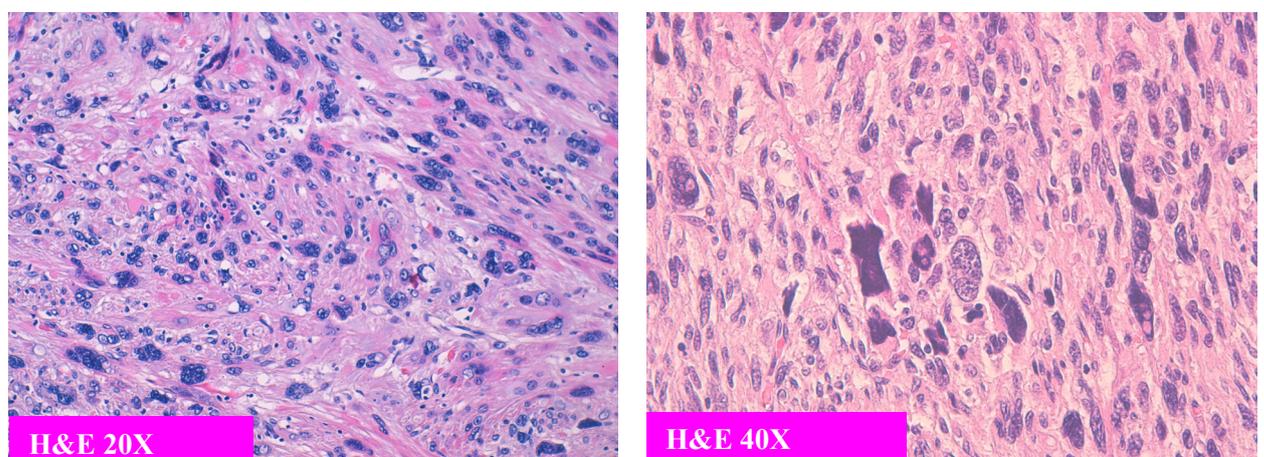


Figura 5: Imágenes microscópicas de leiomyosarcomas uterinos

1.4.2 CLASIFICACIÓN DE LOS LEIOMIOMAS UTERINOS

Los LM uterinos (figura 6) se clasifican en primer lugar por su **localización anatómica**, lo que condiciona la clínica y el tratamiento. Así pues tenemos:

-LM submucosos: localizados bajo del endometrio, con una clínica frecuente de sangrados y de infertilidad.

-LM intramurales: que suelen expresarse clínicamente por menorragias, no suelen alcanzar grandes tamaños pero comprometen la fertilidad.

-LM subserosos: frecuentemente asintomáticos, pero si alcanzan grandes tamaños pueden provocar un abombamiento del hemiabdomen inferior y síntomas compresivos (polaquiuria, tenesmo rectal pesadez) y dolor abdominal. No provocan ni menorragias ni metrorragias.

También existe una **tipificación histológica** basándose en las características histopatológicas de la celularidad y del estroma, utilizándose desde la densidad celular (LM celulares), la morfología celular (LM epitelioides, LM atípicos o pleomórficos), la vascularización, el predominio de algún componente del estroma y los cambios degenerativos (angioleiomiomas, LM mixoides, lipoleiomiomas), y la cantidad de mitosis (LM mitóticamente activos).

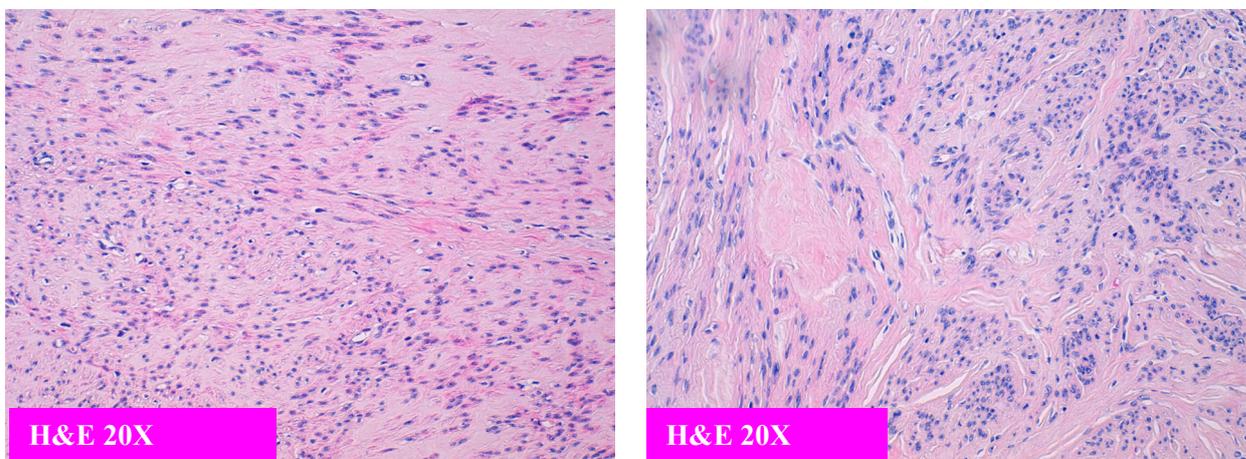


Figura 6: Imágenes microscópicas de leiomioma uterino usual

Subtipos histopatológicos específicos de LM [2]:

-**LM mitóticamente activo.** Se observan en mujeres premenopáusicas. Hay que tener en cuenta que en la fase secretora, en el embarazo y con la toma de progestágenos aumenta la actividad mitótica en los LM [12]. La toma de progestágenos produce en los LM un aumento de la actividad mitótica superior a la inducida por los tratamientos que combinan estrógenos y progestágenos. El LM mitóticamente activo presenta en general un recuento mitótico de entre 5 y 9 mitosis en 10 CGA, aunque excepcionalmente pueden tener entre 10 y 15 mitosis en 10

CGA y en alguna serie se han descrito hasta 19 mitosis en 10 CGA [39-41]. Este tumor no tiene atipia citológica significativa. Puede presentar en la superficie endometrial ulceración con necrosis en la superficie endometrial y cambios reactivos y regenerativos asociados ya que habitualmente es submucoso, aunque no se observa necrosis tumoral. Es raro detectar en estos tumores más de 20 mitosis en 10 CGA, y no marca un peor pronóstico, aunque este hallazgo clasifica a este tumor como un “LM con aumento de la actividad mitótica, siendo la experiencia limitada”, aunque algunos autores prefieren incluirlo en los tumores de musculo liso de incierto potencial de malignidad [42].

-Leiomoma apopléjico. Se observa en mujeres en edad fértil, con la toma de anticonceptivos orales, en el embarazo o en el post-parto [43-45]. Existen hemorragias múltiples de morfología estrellada junto a zonas hipercelulares, edema, cambios quísticos y un discreto aumento de la actividad mitótica cerca de estas zonas. No tiene mitosis atípicas ni atipia celular significativa y suelen presentar los bordes netos. La isquemia produce una densa eosinofilia citoplasmática con aumento de la relación núcleo-citoplasma, aumento de la actividad mitótica y cambios mixoides focales. Fuera de las zonas de isquemia el aspecto es similar al de un LM convencional [36].

-Leiomoma celular (LMC). Presenta haces celulares densos de células musculares con escaso colágeno (figura 7). Se pueden observar empalizadas de núcleos que recuerdan los Cuerpos de Verocay del schwannoma. La hipercelularidad puede plantear el diagnostico diferencial con el LMS, pero el recuento mitótico es muy bajo [46], menor de 5 mitosis en 10 CGA, no presenta necrosis tumoral y no tiene atipia citológica. En el diagnóstico diferencial con los tumores del estroma endometrial, los núcleos fusiformes, los citoplasmas alargados, el patrón de la reticulina y la ausencia de la distribución uniforme de los vasos sanguíneos nos pueden ayudar.

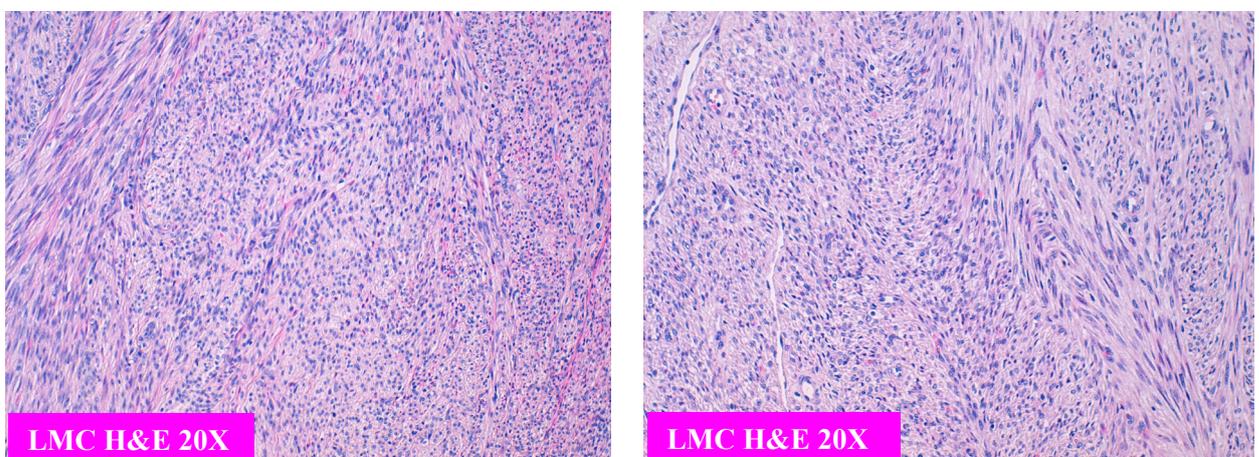


Figura 7: Imágenes microscópicas de leiomiomas celulares

-Leiomoma atípico (LMA). Presenta atipia citológica, a veces marcada, con células gigantes atípicas, mono o multinucleadas, fenómenos de cariorexis, nucleolo prominente y pseudoinclusiones nucleares. El recuento mitótico está habitualmente por debajo de 5 mitosis en 10 CGA, aunque se han observado hasta 7 mitosis en 10 CGA [47]. Las células multinucleadas suelen tener una distribución parcheada, raramente difusa, dificultando el diagnóstico. Fuera de estas zonas se observa escasa atipia citológica, sin necrosis y un recuento mitótico muy bajo (con menos de 2 mitosis en 10 CGA) [47]. El pronóstico de este tumor es excelente.

-Leiomoma epiteliode. Aquí se engloban los leiomioblastomas, los LM de células claras y los LM plexiformes. Son de coloración amarillenta a grisácea y pueden contener áreas de hemorragia y necrosis. Suelen ser lesiones únicas y las células son variables, de redondeadas a poligonales formando nidos o cordones. Tiene pocas mitosis y no se observa atipia celular significativa [2, 48]. Las características de los diversos subtipos son las siguientes:

-Leiomioblastomas, están formados por células redondeadas con citoplasma eosinofílico.

-LM de células claras, presentan células poligonales de citoplasmas netos y claros, de contenido glucógeno y escasamente lipídico sin mucina.

-LM plexiformes, son grupos o cordones de células redondeadas con escaso a moderado citoplasma, junto con zonas de LM convencional [2]

- LM mixoide. Es blando, gris, gelatinoso y translúcido, usualmente bien delimitado, con abundante material mixoide entre las células musculares, sin mitosis ni atipia citológica [12].

-LM vascular. Presenta numerosos vasos sanguíneos de gran calibre con paredes musculares prominentes [2].

-Lipoleiomoma. Contiene abundante tejido adiposo en su interior, y si además contiene numerosos vasos sanguíneos se denomina angioliipoleiomoma [2].

-No hay que olvidar entidades como los LM con otros elementos, menos frecuentes: los LM con células hematopoyéticas presenta una infiltración por esta celularidad, generalmente, sin causa conocida. A veces se pueden observar focos de hematopoyesis extramedular sin patología sistémica acompañante [49], la presencia de histiocitos [50], eosinófilos [51] y sobre todo linfocitos puede llevar al diagnóstico diferencial con un linfoma [52]. También se pueden producir abscesos por infección bacteriana.

-La leiomiomatosis difusa es una patología poco frecuente, observándose numerosos LM pequeños (de hasta 3 cm, aunque muchos son menores de 1 cm) que aumentan el tamaño uterino [2].

- La leiomiomatosis intravenosa y el LM con invasión vascular, son muy poco frecuentes. Son tumores benignos que crecen en el interior de estructuras venosas, extendiéndose hasta la vena cava en más del 10% de las pacientes, pudiendo llegar hasta el corazón [53-55]. Por este peculiar crecimiento el diagnóstico diferencial morfológico con el LMS es fundamental.

-El LM metastatizante benigno consiste en la presencia de LM en localizaciones a distancia, procedentes de un LM uterino. Se encuentran más frecuentemente en el pulmón, aunque también se han descrito en ganglios linfáticos y abdomen. Algunos serán la consecuencia de LM intravenosos [56], otros serán la consecuencia de la proliferación multifocal de musculo liso intra y extrauterino [57]. Los hallazgos citogenéticos sugieren un origen monoclonal entre los tumores uterinos y pulmonares, interpretándose los tumores pulmonares como metastásicos [58].

1.4.3 CLASIFICACIÓN DE LOS LEIOMIOSARCOMAS UTERINOS

Al igual que en los LM, los LMS uterinos se pueden clasificar por sus **características histopatológicas**. El LMS más frecuente es el de células fusiformes y suele tener atipia citológica y más de 10 mitosis en 10 CGA y/o necrosis tumoral. En cambio, los de morfología epitelioides o mixoides se diagnostican con un menor recuento mitótico. Los epitelioides presentan células redondas a poligonales, y citoplasma eosinófilo o claro [59]. Los LMS mixoides presentan un estroma mixoide muy abundante, con aisladas células fusiformes [60].

La clasificación histopatológica de los LMS uterinos queda esquematizada en la tabla 1 que sigue:

Tabla 1: Clasificación histopatológica de los leiomiomas uterinos [31, 61-63].

Subtipo histológico	Criterios diagnósticos	Características adicionales
Células fusiformes (usual)	Atipia citológica moderada a severa. ≥10 mitosis por 10 CGA o necrosis tumoral.	
Epitelioides	Atipia moderada a severa y ≥5 mitosis en 10 CGA o necrosis tumoral y ≥5 mitosis 10CGA.	>50% de las células epitelioides
Mixoides	Atipia moderada a severa o ≥2 mitosis en 10 CGA o necrosis tumoral.	Hipocelular, tinción estroma con azul alcian. Usualmente bordes infiltrativos.
Otros	Cualquiera de los subtipos puede tener áreas con elementos cordones sexuales-like, células xantomatosas, rabiomioblastos, células gigantes osteoclastos-like y lipoblastos.	

CGA: campos de gran aumento

El grado de la neoplasia (según la celularidad, la diferenciación, el pleomorfismo, la presencia de necrosis y el número de mitosis) es importante para el pronóstico. Sin embargo, no hay acuerdo en relación con el mejor sistema de clasificación. El *American Joint Committee of*

Cancer (AJCC) establece 3 grados (bajo, intermedio y alto), mientras que el *Memorial Sloan-Kettering Center* (MSKCC) considera 2 grados (bajo y alto). La ausencia de criterios morfológicos consensuados para establecer el diagnóstico de LMS de bajo grado, hace que este diagnóstico no sea frecuente [37].

El factor que mejor define el pronóstico clínico de las tumoraciones malignas uterinas es su **estadío** quirúrgico, donde los criterios definidos por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) en 2009 son los más utilizados; a pesar de esto, las clasificaciones de la AJCC y el MSKCC han mostrado ser mejores predictores a nivel pronóstico en estudios recientes [64-66]. En la tabla 2 observamos la comparación entre la antigua clasificación de la FIGO de los LMS uterinos y la nueva clasificación para los LMS. En esta nueva clasificación se incorporaron nuevos parámetros, ya que los LMS tienen un comportamiento biológico distinto al de los carcinomas uterinos. A pesar de ello, se ha observado en estudios recientes como el de Lim y cols en 2012 que ninguno de los dos sistemas es ideal para la clasificación en cuatro fases clínicas con correlación con la SG [67].

Tabla 2: Estadíaje antiguo y nuevo de la FIGO [67].

ESTADÍO	ANTIGUA FIGO	NUEVA FIGO
I	Tumor limitado a útero IA: confinado a endometrio IB Invasión < del 50% de la pared miometrial IC \geq invasión del 50% de la pared miometrial.	Tumor limitado al útero IA inferior o igual a 5 cm IB mayor de 5 cm
II	Tumor afectando a cérvix IIA extensión al epitelio endocervical o glándulas IIB infiltración del estroma endocervical	Extensión a pelvis IIA afectación anexial IIB extensión extrauterina a tejidos pélvicos
III	Extensión fuera del útero IIIA invasión de la serosa y/o anexos y/o células tumorales en ascitis o lavado peritoneal IIIB extensión directa a vagina IIIC metástasis pélvica y/o en ganglios linfáticos paraaórticos	Invasión de tejidos abdominales (no solo protrusión abdominal) IIIA en una localización IIIB en más de una localización IIIC metástasis en ganglios paraaórticos y/o pélvicos
IV	IVA invasión de la mucosa vesical y/o mucosa intestinal IVB metástasis a distancia	IVA invasión de vejiga y/o recto IVB metástasis a distancia

1.4.4 INMUNOHISTOQUÍMICA

Los LM en el diagnóstico convencional no suelen necesitar técnicas IHQ, siendo suficiente el estudio morfológico con H&E. Estos tumores benignos mantienen los marcadores de diferenciación de músculo liso, siendo actina de músculo liso, desmina, h-caldesmán positivos (al menos 2 de ellos) y histona deacetilasa 8 [68]. Tienen una dependencia hormonal y frecuentemente una positividad intensa y difusa frente a RREE, siendo menos intensa la positividad frente a RRPP. También suelen expresar WT-1, y receptores de oxitocina. La positividad frente a ki67 suele ser inferior al 5% mostrando un bajo índice de proliferación en la mayor parte de los LM.

Los LMS suelen expresar marcadores de músculo liso como desmina, h-caldesmán, actina de músculo liso e histona deacetilasa 8 [68], aunque algunos tipos de LMS como el epitelioides o el mixoides pueden ser negativos para algunos de dichos marcadores [37]. Pueden expresar CD10 y marcadores epiteliales, como la citoqueratina y el antígeno epitelial de membrana (EMA), siendo más frecuente dichas expresiones en el tipo epitelioides. Hasta un 60% estos tumores expresan también receptores hormonales (estrógenos, progesterona y andrógenos) [69-75], sirviendo la positividad frente a RREE para apoyar un origen ginecológico del tumor [76], pero el porcentaje es significativamente menor al hallado en los LM uterinos. En algunos estudios se vio que la expresión de RRPP y receptores de andrógenos parecían estar asociados con el intervalo libre de enfermedad (ILE), aunque sin observarse correlación con la SG [71]. Se ha descrito también en otros estudios una expresión de ki67 en estos tumores mayor a la observada en su variante benigna [77].

Entre un 25-47% de los LMS sobreexpresan también la proteína p53, algo que no se ha observado en los LM convencionales, y muy puntualmente en algunos casos de LMA [77-79]. Se ha observado una diferencia significativa en la expresión de marcadores de las proteínas reguladoras de la apoptosis y del ciclo celular, como Bcl-2, Bax, p21, p27 y p53 [80]. La sobreexpresión de p16 se ha utilizado para diferenciar entre lesión benigna y maligna en los tumores de músculo liso, siendo difusa en los LMS [81, 82].

Hasta un 90% de los LMS y un 50% de los tumores estromales uterinos de malignidad indeterminada presentan expresión de fascina (proteína de unión a la actina que participa en la formación de haces de microfilamentos), siendo ésta excepcional en los LM, y por tanto sirviendo de marcador para diagnósticos complicados [83, 84].

Estudios recientes han demostrado la relación entre la expresión de ki67 y el pronóstico, con una disminución de la SG, sin observarse relación significativa con la expresión de p53, p16 y CD163 [85]. En estas neoplasias ha sido estudiada la expresión de c-kit, escasas veces positivo,

y en esos casos no se observa mutación del oncogén, así como la expresión de CD99, inhibina, calretinina, HMB-45 y Melan-A, todos ellos negativos en la mayoría de los casos [86]. Adams y cols en 2007 describieron en un grupo heterogéneo de sarcomas uterinos, que incluía SEE, LMS y carcinosarcomas, la negatividad inmunohistoquímica frente a c-kit, siendo negativos o muy débilmente positivos frente a PDGFR β . Por otra parte, encontraron una positividad intensa en el 70% de los casos frente a PDGFR α , con el miometrio y el endometrio sano negativos frente a esta proteína [87]. Se ha publicado la positividad tanto en el miometrio sano como en los tumores de músculo liso de receptores de oxitocina, siendo de ayuda en el diagnóstico diferencial con los SEE, ya que en estos últimos no expresan estos receptores [88]. Jeffers y cols en 1995 pusieron en evidencia la sobreexpresión del protooncogen *c-myc* mediante estudios inmunohistoquímicos en muchos LMS y en la mayoría de los TMM, teniendo algunos tumores benignos de músculo liso una sobreexpresión evidente, con un patrón diferente al de los tumores malignos. Esta sobreexpresión tiene un significado incierto y no se correlacionó con la SG [89]. Finalmente, se ha observado positividad intensa frente a PDGFR α en un porcentaje destacable de casos, siendo negativos en general o de tinción débil frente a PDGFR β [87]. Se ha hecho hincapié en la positividad de los sarcomas uterinos (incluyendo SEE, LMS y TMM) para la calpaina 6, y su negatividad en el tejido sano, sin observarse relación con la SG ni con el estadio [90].

A continuación realizaremos una revisión bibliográfica de distintos anticuerpos que podrían ser de utilidad en el diagnóstico o líneas de investigación para posibles terapias en los distintos grupos de neoplasias mesenquimales de músculo liso uterinas.

1. Proliferación:

Ki67. El antígeno ki67 es una proteína nuclear codificada por un gen localizado en el cromosoma 10; definida por su reactividad con el anticuerpo monoclonal MIB-1 (ki67), se han identificado dos isoformas de 345 y 395 kDa [91]. Presentan función relacionada con la reorganización de la cromatina, determinando la actividad proliferativa celular; se expresa en todas las células en cualquier fase del ciclo celular, excepto la fase G0 (fase quiescente de la célula) [92], así que es un marcador del potencial de las células para la división mitótica, poniendo en evidencia el índice de proliferación celular [93, 94]. Durante la interfase, el antígeno se localiza en el núcleo, mientras que durante la mitosis la proteína se detecta en la superficie de los cromosomas. La proteína se degrada rápidamente al pasar al estado de reposo, y no se observa expresión de ki67 durante la reparación de ADN [95].

Wong y cols en 2003 analizaron el valor pronóstico del marcador de proliferación ki67 en GIST del estómago comparándolo con el número de mitosis, siendo este último mejor predictor [96]. Aunque es un excelente marcador nuclear de las células en ciclo proliferativo, los estudios

comparativos frente al índice mitótico efectuado en tinción por H&E no ofrecen resultados ventajosos, superponiéndose entre sí, por lo que puede ser un medio de confirmación en aquellos casos en que el recuento del índice mitótico evaluado con H&E presente dificultades.

2. Apoptosis:

Bcl-2. Es un proto-oncogén localizado en la membrana del retículo endoplasmático, en la envoltura nuclear y en otras membranas como las de las mitocondrias. Esta proteína está codificada por un gen localizado en el cromosoma 18, y se observa una intensa expresión en muchas leucemias y linfomas de células B debido a la traslocación del gen *Bcl-2* a cromosomas diferentes. La función de la proteína es evitar la apoptosis, por lo que en neoplasias su sobreexpresión evita la muerte celular [97, 98]. Asimismo, esta proteína puede promover la angiogénesis en algunos tumores por medio de la activación de los genes *HIF1* y *VEGF* [99]. A diferencia de otros oncogenes estudiados hasta la fecha, *Bcl-2* no está implicado en el control de la proliferación celular sino en el bloqueo de la muerte celular, más específicamente de los procesos de contracción citoplasmática, condensación nuclear, desorganización de la membrana citoplasmática y ruptura endonucleolítica del ADN.

Bax (Bcl-2 associated X protein). Es una proteína cuyo gen codificador se encuentra en el cromosoma 19. Gen pro-apoptótico, que pertenece a la familia *Bcl-2* con quien posee una gran homología, aunque Bax carece del dominio BH4. Esta proteína participa en la ruta de la apoptosis al asociarse con el complejo del poro de la mitocondria que participa en la regulación del calcio. La proteína Bax, al unirse a este complejo, induce su apertura y rotura de la membrana con la liberación de moléculas proapoptóticas como el citocromo C [100, 101]. Su expresión se ve incrementada por la proteína supresora tumoral p53.

3. Ciclo celular:

p53. También llamado “el guardián del genoma”, este gen se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y codifica un factor de transcripción nuclear de 53.7 KDa, es decir, un modulador que puede activar o desactivar genes de gran importancia. Este gen detiene el ciclo celular ante un daño del ADN (figura 8). Es un gen supresor tumoral que participa de forma importante en el ciclo celular y la apoptosis [102]. Alrededor del 50% de los tumores tienen mutaciones en el *p53*. El producto del gen es una proteína nuclear que participa en el control del ciclo celular, apoptosis y en el mantenimiento de la estabilidad genómica. La proteína p53 de tipo natural o “wild type”, está presente en una amplia variedad de células normales, pero tiene una vida media muy corta, y por lo tanto, sólo está presente en cantidades muy pequeñas [103],

generalmente por debajo de los niveles de detección de los métodos inmunocitoquímicos [104]. La proteína mutada es más estable y tiene una vida media mayor que la de la proteína normal, se acumula y se detecta por las técnicas IHQ [103]. Se encuentra sobreexpresada en muchos tumores, por la inactivación de p53, por la pérdida de un alelo o por una mutación [105] y se existe relación entre la expresión de p53 y la agresividad tumoral; sin embargo la sobreexpresión de p53 de forma aislada no es sinónimo de malignidad por si mismo [105]. En general, los datos pronósticos no dependen únicamente de marcadores del ciclo celular como son la p53, MDM2 y p16, cuya expresión es variable [106].

Ciclina D1. Es una proteína de 36 kDa. El gen que la codifica está situado en el cromosoma 11 en la localización 11q13. Sintetizada a partir de prooncogenes, participa en el ciclo celular como inhibidora. La ciclina D1 forma parte de la regulación del ciclo celular y de la transformación oncogénica de las células de los mamíferos. La sobreexpresión de esta proteína se ha demostrado en gran variedad de tumores. La puesta en evidencia IHQ de esta proteína es de gran utilidad especialmente en la identificación de los linfomas de células del manto [107-109].

p16. Es una proteína de 16 KDa codificada por el gen *CDKN2A* [110] localizado en el brazo corto del cromosoma 9 (9p21). Es una proteína supresora de tumores, reguladora del ciclo celular como complejo inhibidor 2A de la quinasa dependiente de ciclina CDK4 y CDK6 conjuntamente con p14 y p15. El p16 es un efector en la vía de la proteína supresora de retinoblastoma (Rb); por lo que en células normales se expresa y en las cancerígenas se pierde, asociado a cambios genéticos en el locus específico.

p21. Es una proteína de 21kDa que pertenece a la familia Cip/Kip dependiente de inhibidores ciclina quinasa. Este gen se localiza en el cromosoma 6 (6p21.2), está regulado por el gen supresor *p53* y codifica una proteína inhibidora de la quinasa dependiente de ciclina. p21 regula la progresión de la fase S del ciclo celular. La reducción o total ausencia de expresión de p21 se ha observado en tumores de líneas celulares que carecían de p53 o que contenían una p53 mutada no funcionante. Además, numerosos estudios han revelado la disminución de la expresión de p21 en cánceres humanos, incluyendo neoplasias gástricas, de vesícula biliar, colorrectal, o de endometrio [111, 112].

p27. Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina. Codifica una proteína de la familia Cip/Kip. Está relacionada con el ciclo celular y la progresión de la fase G1 a la S [113, 114]. P27 muestra similitudes estructurales y funcionales con la proteína p27 [113]. Los niveles y la actividad de la proteína p27 están regulados por inhibidores de crecimiento de citoquinas incluyendo el factor de crecimiento transformante beta ($TGF\beta$) y esto otorga una importante relación entre los reguladores extracelulares y el ciclo celular [114]. Su función es predominantemente disminuir la división celular. La pérdida de la función de p27 puede contribuir a la oncogénesis y a la progresión tumoral. Algunos estudios implican a esta proteína como regulador de la resistencia

a drogas en tumores sólidos y sugieren que antagonistas hacia esta diana podrían ser útiles en el tratamiento de determinadas neoplasias [115]. Además, se ha observado la utilidad de su determinación IHQ como factor pronóstico en neoplasias como el carcinoma de mama, colon, estómago, pulmón o pituitaria [116-122].

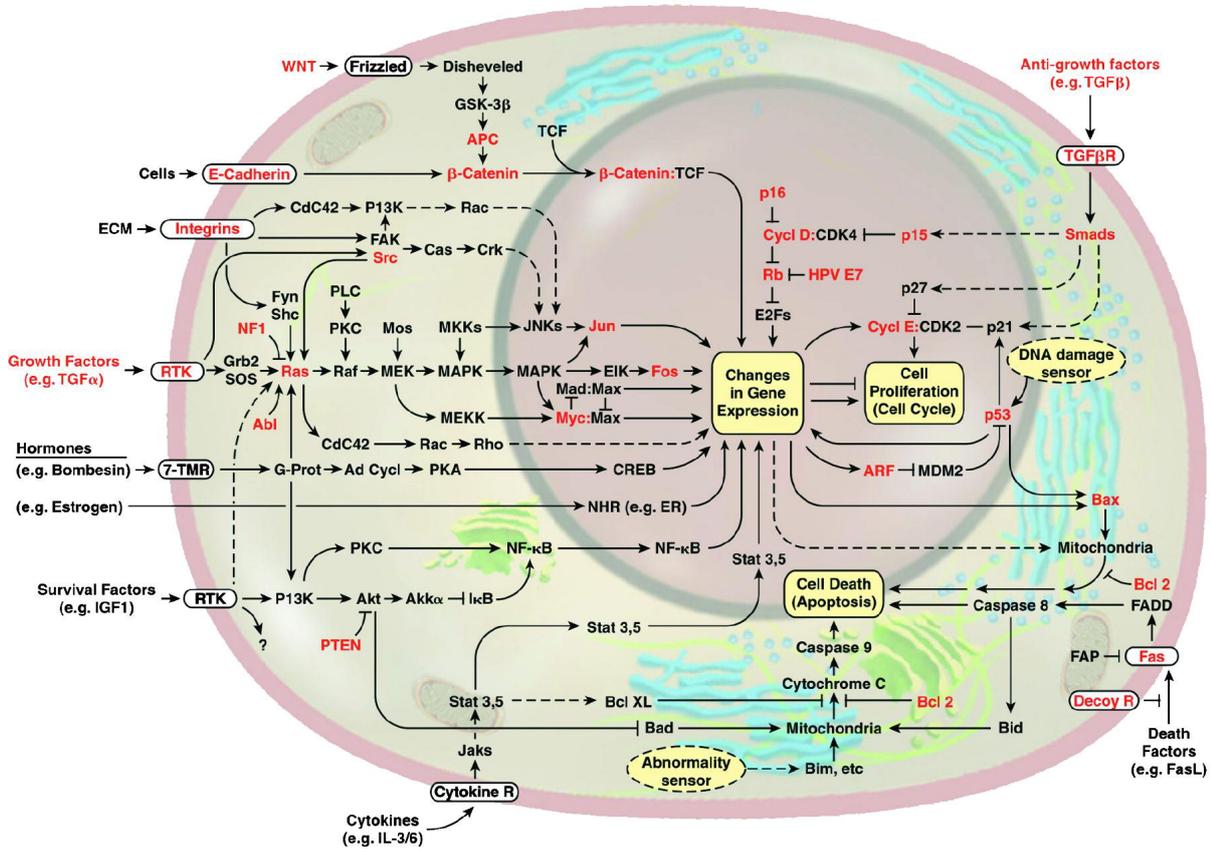


Figura 8: Esquema abreviado del ciclo celular [123]

4. Dianas terapéuticas:

C-kit. El gen *c-kit* se localiza en el cromosoma 4 (4q12). Es una molécula CD (CD117) receptor de citoquinas, tirosina quinasa tipo III, expresado en la membrana de las células madre hematopoyéticas así como en otros tipos de células como las células intersticiales de Cajal, y en diversos tumores como los GIST [124], seminomas, tumor de Ewing, etc., tiene una función antiapoptótica, de proliferación y diferenciación. Algunos fármacos utilizados frente a esta alteración genética son por ejemplo Imatinib (Glivec®), Sunitinib (Sutent®), Axitinib (Inlyta©), Pazopanib (Votrient®).

PDGFRα. El gen *PDGFRα*, localizado en el cromosoma 4 (4q12), presenta un tamaño de 65 Kb con 23 exones. Codifica una proteína glucosilada con actividad tirosinquinasa de 40 kDa.

Tiene un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con dos subdominios (uno de unión ATP y uno catalítico donde se produce la fosfotransferencia). La activación de esta proteína promueve también la activación de la fatidil-inositol 3 quinasa. Se expresa en los cuerpos ganglionares del plexo mientérico y en las células de Schwann pero no se observa expresión IHQ en las células intersticiales de Cajal. Tratamientos comercializados frente a esta proteína son por ejemplo Imatinib (Glivec®), Sunitinib (Sutent®), Axitinib (Inlyta©), Pazopanib (Votrient®).

IGFR-1. Codificado por un gen situado en el cromosoma 19, es un receptor tirosina quinasa de membrana responsable de los efectos de crecimiento de IGF-1 e IGF-2, que presenta una mayor afinidad frente a IGF-1. IGF-1 es uno de los activadores de la vía AKT más potentes, siendo un estimulador de la proliferación [125, 126] y del crecimiento celular y un inhibidor de la muerte celular programada. Todas las células del organismo presentan influencia de IGF-1, en especial en músculo, cartílago, hueso, hígado, riñón, células nerviosas, piel y pulmón. Se ha observado la implicación de esta proteína en múltiples neoplasias como mama, pulmón y próstata [127, 128]. Se han sintetizado algunos fármacos que tienen como diana terapéutica IGFR-1, entre otros, los anticuerpos monoclonales R1507, Ganitumab, Figitumumab, en estudios sobre sarcomas de Ewing, con resultados modestos aunque esperanzadores [124].

C-erb-B2. El gen HER2 es un proto-oncogén situado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21-q22). Da lugar a un receptor de membrana tirosinquinasa, una glicoproteína de 185 kDa, relacionada con la transducción de la señal en vías importantes de crecimiento y diferenciación celular. Esta oncoproteína es muy similar en su estructura a EGFR. Se puede sobreexpresar en numerosos tumores como el de mama, ovario, estómago, colorrectal, pancreático y endometrial. La sobreexpresión del receptor del HER2/neu en el cáncer se observa en 30% de las neoplasias de mama invasivas y prevé una posible resistencia al tamoxifeno y es sensible al anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptin) que se dirige contra el dominio extracelular del receptor HER2/neu [129], aumentando la tasa de supervivencia de estas pacientes. La sobreexpresión de este gen se puede suprimir por la activación de otros genes y la utilización de Herceptin. La expresión de la proteína está regulada por los estrógenos; el estradiol y el tamoxifeno, actuando a través de los RREE disminuyen la actividad de HER2/neu. Otros tratamientos comercializados frente a HER2 son Pertuzumab (Omnitarg®) y Lapatinib (Tyverb®).

5. Transición epitelio mesénquima:

E-caderina (ivomorulina). Es una glicoproteína transmembrana, una molécula de adhesión celular [130] que juega un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad epitelial. El gen de la *E-caderina* se encuentra en el cromosoma 16 (16q22.1)

Slug. Es un gen situado en el cromosoma 8 (8q11.21), que codifica la “zinc finger protein” de la familia de los factores transcripcionales Snail, reprime la transcripción del gen de la *E-caderina* y es un mediador de la transición epitelio mesénquima. Además se ha asociado con un peor pronóstico en algunas neoplasias debido a su posible papel en la migración, invasión y metástasis de las células tumorales [131, 132].

Snail. El gen situado en el cromosoma 8, actúa como factor de transcripción. La familia de los transcriptores Snail está implicada en el desarrollo embriológico, la diferenciación mesodérmica, la apoptosis y la transición epitelio-mesénquima neoplásica [133].

La sobreexpresión de los transcriptores Snail y Slug causa inactivación de la E-caderina en la transición epitelio-mesénquima, y de igual modo, la represión de estos, resulta en una activación de la E-caderina induciendo la transición epitelial-mesenchimal [134]

βcatenina. Gen situado en el cromosoma 3. La βcatenina es una molécula de adhesión celular y un activador transcripcional de los puntos terminales de la señalización de la vía Wnt mediante la formación de complejos con las proteínas de uniones al DNA como los factores de transcripción de células T (TCF) y activadores linfoides (LEF) [135, 136]. La vía Wnt/βcatenina induce la transición epitelio-mesénquima mediante la activación de Slug y la estabilización de Snail a través de la inhibición de su fosforilación y su degradación [137].

AKT. Proteína serina/treonina quinasa, inicialmente descrita como oncogen. El gen *AKT1* está directamente relacionado con el ciclo celular, inhibiendo los procesos de apoptosis. La activación de AKT puede promover la proliferación y supervivencia de las células con mutaciones, favoreciendo la proliferación celular, la progresión del ciclo celular y la transición epitelio-mesénquima. La producción de AKT en las células epiteliales conlleva dos efectos básicos en el estado de la E-caderina: la represión de la transcripción de la E-caderina, probablemente por una activación de la expresión del Snail; y mínimas cantidades de E-caderina producidas por las células que se concentran en las organelas perinucleares debido a una activación de AKT de la proteína Rab5 terminando todo ello en una transición epitelio-mesénquima [138]. *AKT* está también implicado en la angiogénesis y el desarrollo tumoral. El locus de *AKT1* se encuentra en el cromosoma 14 en la localización 14q32.32 y el *AKT2* en cromosoma 19 en la localización 19q13.1-q13.2.

6. Estatus hormonal:

Receptores de estrógenos (RREE). Pertencen a un grupo de receptores nucleares que son activados por la hormona denominada 17β estradiol. Se han descrito dos tipos de RREE: el de la familia de receptores nucleares y el receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPR30). En nuestro trabajo, se hace referencia al primer grupo, a los RREEα, cuyo gen (*ESR1*) se encuentra situado en el cromosoma 6 (6q25.1). Su importancia fundamental se aprecia en el carcinoma

mamario, donde es un parámetro en la predicción del pronóstico y de la respuesta al tratamiento endocrino. En los tumores malignos de mama se realiza su determinación de rutina en los laboratorios de Anatomía Patológica. En nuestro estudio es importante, ya que está demostrada la relación entre el aparato genital femenino y muchos de sus tumores y el estatus hormonal, sirviendo como tejidos control para la técnica IHQ tanto las células no tumorales del endometrio, miometrio, ovario y el tejido mamario [139].

Receptores de progesterona (RRPP). También conocidos como NR3C3 (receptor nuclear subfamilia 3, grupo C, miembro 3), son receptores esteroideos que se unen específicamente a la progesterona. En los seres humanos están codificados por un único gen situado en el cromosoma 11 en la localización 11q22 [140, 141] y tienen 2 formas principales A y B que se diferencian por su peso molecular [141]. Al igual que los RREE, los RRPP están íntimamente relacionados con el pronóstico y tratamiento de los carcinomas mamarios, por lo que se realiza su determinación de rutina en el diagnóstico de estas neoplasias. Así mismo, la expresión de ambos receptores hormonales ayuda en el diagnóstico diferencial de los adenocarcinomas endometrioides y los carcinomas serosos papilares, siendo escasamente positivos en estos últimos [86].

7. Angiogénesis e hipoxia:

CD31. Llamada también PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule), la codifica un gen situado en el cromosoma 17. Esta proteína se encuentra en la superficie de células endoteliales, plaquetas, macrófagos, células de Kupffer, megacariocitos, neutrófilos, osteoclastos y células NK. También se expresa en tumores, mayoritariamente de estirpe vascular y hematopoyética. Es una proteína de membrana miembro de la familia de las inmunoglobulinas, que media en la adhesión celular. Se expresa en células endoteliales adultas y embrionarias. Está relacionada con la emigración transendotelial de los neutrófilos, y está subexpresada tras la extravasación en los tejidos inflamados. Este marcador ayuda en la evaluación de la densidad vascular tumoral [142].

CD34. El CD34 es una glicoproteína transmembranosa con un peso molecular de aproximadamente 115 kDa, el gen que la codifica se encuentra en el cromosoma 1 (1q32). Inicialmente se detectó en las células linfohematopoyéticas, precursoras de la serie mieloide y presentes en la médula ósea; este antígeno se observa también en el endotelio vascular, en las células dendríticas de la dermis superficial, en el endoneuro, en subpoblaciones de fibroblastos y en diversos tumores de partes blandas como sarcoma de el Kaposi, 50% de angiosarcomas, dermatofibrosarcoma protuberans, GIST, lipomas atípicos y fusocelulares y el tumor fibroso solitario. El tipo de marcaje es similar al del CD117. CD34 un antígeno de células precursoras del sistema hematopoyético cuya detección a través de la IHQ puede ser útil para identificar

células leucémicas y tumores vasculares [139], pero igualmente ha servido para precisar el diagnóstico de numerosos tumores de partes blandas con apariencia fusocelular .

8. Otros:

CD44. Esta proteína es una molécula de adhesión transmembrana de 85-90 KDa, y el gen *CD44* se localiza en el cromosoma 11 (11p13). Es un receptor celular de superficie para el hialuronato lo que sugiere su papel en la regulación celular, en las interacciones entre célula y sustrato y en el proceso de la migración celular [143]. Se expresa en multitud de células: en las células hematopoyéticas, en los monocitos, los granulocitos, los eritrocitos, en las células B y T maduras [144], también en las células epiteliales, fibroblastos, células del Sistema Nervioso Central, células del sistema músculo esquelético, y en distintas neoplasias [145, 146]. Además se ha observado en algunos estudios que la expresión de algunas isoformas de CD44 se relaciona con la progresión tumoral y la capacidad metastásica [147, 148].

OCT3/4. Factor de transcripción, miembro de la familia POU. Esta proteína se expresa en células madre embrionarias y su pérdida se asocia con la pérdida de pluripotencia. Este marcador es útil para algunos tumores de células germinativas y para establecer el origen de célula germinativa en tumores metastásicos de primario desconocido. OCT3/4 junto a SOX2 forman un complejo regulador que mantiene el estado de pluripotencialidad celular, al controlar la expresión de ciertos genes [149]. El gen está ubicado en el cromosoma 6 (6p21.33).

1.4.5 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

Las dificultades para el diagnóstico diferencial desde el punto de vista anatomopatológico entre los tumores mesenquimales uterinos, se presentan sobre todo cuando la técnica de biopsia es el legrado. Esta técnica menos invasiva que la histerectomía o la tumorectomía y algunas veces punto de partida para el diagnóstico, presenta limitaciones por proporcionar muestras escasas y parciales. Es importante un amplio muestreo de las lesiones, en especial de las zonas inusuales [12] (al menos una muestra por centímetro cuadrado de lesión), respetar los criterios estrictos para el diagnóstico de los LMS, consultar la historia clínica, y utilizar técnicas IHQ en los casos necesarios.

El diagnóstico diferencial de la mayor parte de las lesiones se realiza con la técnica histológica convencional de H&E, valorando en estos tumores la morfología celular, el pleomorfismo, la actividad mitótica, la presencia o no de necrosis y por supuesto la sospecha clínica. Distinguir los LMS de los LM es determinante para el tratamiento y el pronóstico [12].

La contribución de las técnicas IHQ en casos complejos es limitada. La expresión de MIB-1 (ki67) y p53 es mayor en LMS que en LM, siendo menor la expresión de receptores hormonales (estrógenos y progesterona) y Bcl-2 en LMS, pero a pesar de todo no siempre ayudan al diagnóstico morfológico. La disminución de la expresión de receptores hormonales (estrógenos y progesterona) ayudan en el diagnóstico diferencial entre los LMS uterinos y LM celulares y bizarros. El número de mastocitos puede ser de ayuda en el diagnóstico diferencial de los LMS uterinos con una alta sensibilidad y especificidad [139, 150]. La angiogénesis marcada con CD34 y CD31, también suele ser menor en lesiones benignas.

A continuación introducimos los tumores de músculo liso con los que pueden existir problemas a la hora del diagnóstico diferencial, resumidos en la tabla 3.

En el caso de los **LM mitóticamente activos**, se observa un aumento de la actividad mitótica en el tumor sin otra característica que lo distinga de un LM convencional. Suele ocurrir en mujeres en edad fértil, asociándose a la fase secretora del ciclo, al embarazo o al uso de terapia hormonal exógena. Macroscópicamente, tiene un aspecto homogéneo y suele ser submucoso a diferencia del LMS (2/3 son intramurales). Lo más importante es que aún con la presencia de actividad mitótica, estos LM no presentan atipia citológica (o muy discreta). Pueden tener zonas de necrosis mucosa, inflamación y cambios reactivos o regenerativos, pero no suelen apreciarse necrosis tumoral [2, 12].

El **LM celular (LMC)**, por el aumento de la densidad celular y en muy pocos casos por la presencia de atipia citológica focal, puede presentar un problema diagnóstico con el LMS convencional. Usualmente no existe atipia citológica y la actividad mitótica es muy baja. Tampoco presenta áreas de necrosis [46].

El **LM apopléjico (o hemorrágico)** puede presentar problemas de diagnóstico diferencial con el LMS tradicional. Es un LMC con áreas de hemorragia, cambios quísticos y mixoides y zonas de isquemia, asociando alteraciones morfológicas en esas zonas como aumento de la eosinofilia, aumento del tamaño nuclear e incremento de la actividad mitótica. El número de mitosis raramente supera las 8 mitosis en 10 CGA, y se limita a las zonas adyacentes a las áreas de isquemia, por lo que hay que valorar zonas más alejadas, para comprobar que la apariencia es la de un LM tradicional, con nula o escasa actividad mitótica y ausencia de atipia.

Algunos LM convencionales tratados con análogos de la GnRH para disminuir el tamaño y facilitar la resección quirúrgica, pueden presentar áreas de necrosis isquémica pero sin aumento de la actividad mitótica, ni atipia citológica [151-153].

El **LMA (o bizarro)** puede suponer un problema diagnóstico frente al LMS convencional. Este tumor presenta células atípicas, gigantes, muchas veces multinucleadas. Esta celularidad se presenta la mayor parte de las veces en zonas parcheadas, a diferencia del LMS convencional que presenta atipia difusa, y no se observan áreas de necrosis. Aparte de algunas células muchas veces “monstruosas”, en resto de las células no presentan prácticamente atipia citológica. Hay que tener un especial cuidado con la cariorrexis y no confundirla con figuras de mitosis, que en algunos casos se encuentra por encima de las 7 mitosis en 10 CGA. Técnicas IHQ como la expresión de ki67 y p53 pueden resultar útiles [154].

El **LM mixoide** presenta como el LMS mixoide una apariencia macroscópica similar, blanda y gelatinosa. El examen microscópico con bordes bien delimitados, hipocelularidad, escasa atipia y bajo índice mitótico puede llevarnos a un diagnóstico erróneo. Sin la presencia de necrosis o atipia severa, un recuento de 2 o más mitosis en 10 CGA es la clave del diagnóstico de LMS mixoide. El tamaño tumoral mayor de pocos centímetros en un tumor mixoide, los márgenes infiltrativos y la presencia de mitosis tienen que hacernos pensar en un tumor potencialmente agresivo [155].

El **LM epitelioide**, puede tener áreas de hemorragia, y son de coloración grisácea-amarillenta, y de menor consistencia que los LM convencionales. Sus células redondas o poligonales, y la disposición en cordones o nidos generan algunas veces problemas diagnósticos en cuanto a tumores epiteliales se refiere, sobre todo en muestras parciales. Sin embargo, la escasa o nula atipia citológica y la ausencia de mitosis así como de necrosis tumoral, permiten el diagnóstico diferencial. También son de ayuda las técnicas IHQ para comprobar el carácter miogénico de la celularidad [156, 157].

El **LM con masiva infiltración linfoide** puede simular algunas veces un linfoma debido a la gran cantidad de células linfoides que puede albergar [52]. Mediante el estudio clínico, morfológico y en muchas ocasiones, con el apoyo de técnicas IHQ, se descarta el carácter clonal del infiltrado linfocitario.

La **leiomiomatosis peritoneal diseminada** es poco frecuente, se presenta como múltiples nódulos (generalmente de menos de 1cm) en la superficie peritoneal de mujeres en edad fértil, constituidos por células musculares lisas o miofibroblásticas. El diagnóstico diferencial con un tumor maligno es frecuente, sobre todo en el momento del hallazgo, que suele ser intra operatorio. El tamaño, la cantidad de lesiones y la edad de la paciente suelen sugerir benignidad. El examen microscópico revelará la escasa o nula atipia citológica. También presenta

dependencia hormonal que es la base del tratamiento con agonistas GnRH [158]. Han sido descritos algunos casos de leiomiomatosis peritoneal diseminada maligna [159].

El **LM benigno metastatizante**, al igual que la **leiomiomatosis intravascular** puede propiciar el diagnóstico diferencial con el LMS por su localización a distancia y en vasos venosos respectivamente. Sin embargo, con el análisis microscópico, la falta de criterios morfológicos de malignidad permite el diagnóstico en la mayor parte de los casos [2].

La leiomiomatosis intravascular presenta microscópicamente celularidad muscular en cantidad variable, con frecuentes áreas de hialinización y fibrosis. Cualquiera de los subtipos de LM puede estar presente, como el celular, el atípico o el epiteliode, sin observarse criterios histopatológicos definitivos de malignidad, y sin que esto cambie el pronóstico. El examen microscópico es usualmente suficiente para realizar el diagnóstico diferencial con una invasión vascular por un LMS [2].

Otra patología a tener en cuenta es la linfangioleiomiomatosis, es muy poco frecuente y puede afectar a diversos órganos, sobre todo al pulmón, ocurre principalmente en mujeres en edad fértil. Al microscopio no muestra hallazgos citopatológicos de malignidad y las técnicas IHQ con marcadores musculares y receptores hormonales puede ser de utilidad.

Los **LMS epitelioides** pueden simular otros muchos tumores incluyendo carcinomas primarios y metastásicos, melanomas, tumores trofobásticos, tumores del estroma endometrial, o tumores con diferenciación de cordones sexuales. Para diferenciar el LMS epiteliode de carcinomas, primarios o metastásicos, la recomendación es realizar un panel IHQ que incluya diferentes marcadores epiteliales y musculares como CAM 5.2, CKAE1/AE3, desmina, h-caldesmón, y actina de músculo liso, siendo los marcadores epiteliales más difusos e intensos en los tumores epiteliales, y además hay que tener en cuenta que los tumores musculares epitelioides pueden perder la expresión difusa de la desmina y del h-caldesmón [139]. Lo más útil es un muestreo exhaustivo para localizar áreas de tumor epitelial diferenciado, y negatividad a las tinciones musculares antigénicas específicas [12].

Otros tumores menos frecuentes que pueden presentar un diagnóstico difícil frente a los LMS epitelioides son los **PEComas**, siendo estos últimos positivos frente a Melan A y HMB45, observándose una trama vascular delicada. El **melanoma** metastásico también puede suponer un problema diagnóstico debido a su morfología. El melanoma no expresa marcadores musculares y es positivo frente a S100, HMB-45 y Melan A, lo que facilitará junto a la historia clínica el diagnóstico [12].

Un diagnóstico diferencial se presenta entre los **tumores del estroma endometrial** y los tumores de músculo liso. Los LMC se pueden confundir con los nódulos del estroma endometrial y los patrones IHQ de los SEE, LM y LMS se pueden superponer. La actina de músculo liso se puede expresar tanto en los tumores del estroma como en las neoplasias musculares aunque estas últimas expresan desmina. Las proteínas h-caldesmán, actina y tropomiosina también pueden ayudar en el diagnóstico diferencial, siendo el antígeno h-caldesmán el más específico para distinguir la diferenciación muscular. El antígeno CD10 por su parte es positivo más frecuentemente en las células estromales, aunque no es específico y se puede detectar también en tumores musculares. Algunos estudios colocan como más específicos para el diagnóstico diferencial entre tumores del estroma endometrial y LMC los antígenos CD10, h-caldesmán y CD44v3, además de la utilidad del conteo de los mastocitos como otro criterio morfológico [139, 160]. También se ha visto la expresión de receptores de oxitocina en los tumores de músculo liso, así como en el miometrio sano, siendo usualmente negativos en los SEE [88]. Recientemente se han publicado algunos trabajos con SEE, LMS uterinos y LM uterinos, observándose que la transgelina (actina de la familia de las calponinas) puede ayudar a distinguir entre los SEE y los tumores musculares uterinos, y que la expresión proteica de estatmina 1 se detecta con mayor frecuencia en los sarcomas (tanto SEE como en los LMS uterinos) que en los LM [161, 162].

Davidson y cols en 2012 observaron las diferencias a nivel genético entre los SEE y los LMS útiles para el diagnóstico diferencial entre LMS y SEE como la sobreexpresión de *SLCA7A10/ASC1*, *EFNB3*, *CCND2*, *ECELI*, *ITM2A*, *NPW*, *PLAG1* y *GCGR* en los SEE; y en los LMS uterinos la sobreexpresión de *CDKN2A* (*p16*, localizado en 9p21), *FABP3* (*fatty acid binding protein*, localizado en 1p33-p32), *TAGLN* (*Transgelin*, localizado en 11q23.2), *JPH2* (*Junctophilin 2*, localizado en 20q13.12), *GEM* (*GTP binding overexpressed in skeletal muscle*, localizado en 8q13-q21), *NAV2* (*Neuron Navigator 2*, localizado en 11q15.1) y *RAB23* (miembro de la familia de oncogenes *RAS*, localizado en 6p11) [163].

Los sarcomas uterinos monofásicos (SEE, rhabdomyosarcomas, LMS) suelen ser fáciles de diferenciar de los TMM, sin embargo, si no se muestrean bien las zonas epiteliales, se pueden confundir con sarcomas. Así, el adenocarcinoma endometriode con componente fusocelular puede simular un TMM [164].

Aunque no es frecuente, tener que realizar el diagnóstico diferencial entre una neoplasia de músculo liso ginecológica y un **tumor del estroma gastrointestinal** (GIST) su semejanza es un hecho. En estos casos, diferentes autores recomiendan utilizar el estudio IHQ con CD34 y c-kit, ya que son frecuentemente negativos en los tumores musculares, y en los escasos casos positivos para la proteína c-kit, no se ha visto mutación del gen [139].

Tabla 3: Diagnóstico diferencial en tumores de músculo liso benignos [165]

Variantes de leiomioma que pueden simular malignidad.	Proliferaciones de músculo liso con patrón de crecimiento inusual.
- Leiomioma mitóticamente activo	- leiomiomatosis peritoneal diseminada
- Leiomioma celular	- leiomioma benigno metastatizante
- Leiomioma hemorrágico y con cambios inducidos por hormonas.	- leiomiomatosis intravascular
- Leiomioma atípico	- linfangioleiomiomatosis.
- Leiomioma mixoide	
- Leiomioma epiteliode	
- Leiomioma con masiva infiltración linfoide	

1.4.6 ALTERACIONES CITOGÉNÉTICAS.

Las causas de la aparición y desarrollo de los LM uterinos son en gran parte una incógnita, a pesar de los numerosos estudios epidemiológicos, moleculares y citogenéticos que apoyan su predisposición genética. Cada LM uterino es un proceso clonal independiente [166-168], fueron los primeros tumores en los que el gen de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se utilizó para demostrar que eran neoformaciones de origen clonal [169], siendo consideradas en algunos estudios, neoplasias monoclonales dependientes de estrógenos [170].

Más de la mitad de estos tumores no presentan alteraciones genéticas, observándose en un 40-50% aproximadamente alteraciones no randomizadas (aleatorias) [171, 172] únicas o escasas y específicas de este tumor [173], sin tener cariotipos complejos. La variedad de alteraciones cromosómicas que incluyen traslocaciones, deleciones, trisomías y otras, sugieren diferentes mecanismos genéticos y moleculares para la formación y el crecimiento de los LM uterinos. Una variedad de subgrupos citogenéticos ha sido descrita según los distintos mecanismos de acción; los que con más frecuencia se dan son: las traslocaciones entre los cromosomas 12 y 14, los reordenamientos en el brazo largo del cromosoma 12, las deleciones en el brazo largo del cromosoma 7 con una pérdida de función de genes supresores [174], las trisomías del cromosoma 12 con aumento de la carga cromosómica y los reordenamientos en el brazo corto del cromosoma 6 [13, 170, 175-177].

Un 20% de los LM uterinos con alteraciones cromosómicas presentan reordenamientos de 12q14-q15 y mayoritariamente son t(12; 14)(q15; q23-24). El gen implicado en 12q15 es *HMGA2* y causa su sobreexpresión [170, 178]. Se ha observado su reordenamiento en los LM plexiformes, y únicamente en el 10% de los LM usuales (LMU), así como la expresión aberrante de su proteína que se observa en el 27% de los LMU [179, 180]. El *HMGA2* es un miembro de la familia *HMG* (high mobility group) que actúa como un factor arquitectural en diversos procesos celulares como la diferenciación, la muerte celular, el crecimiento y la proliferación [181, 182]. También se ha analizado la alteración del gen *RAD51*, localizado en 14q24.1 [183, 184]. Otros cromosomas que pueden estar implicados en la traslocación de 12q14-q15 son los cromosomas 1, 2, 4, 5, 8, 10, 22 y X [185, 186].

Una deleción intersticial del cromosoma 7, más frecuentemente involucrando las bandas q22-q32 ocurre en alrededor del 20% de los LM con cariotipo anormal [187].

Otras anomalías que pueden aparecer de forma más infrecuente incluyen reordenamientos de los cromosomas X, del cromosoma 1 como t(1;2)(p36;p24) [188], de los cromosomas 3, 13 y 10 [189].

El reordenamiento de 6p21 aparece en menos del 10% de los LM con cariotipo anormal, e incluye traslocaciones con 14q23-q24 e inversiones [190]. Otro miembro de la familia *HMGA*,

el *HMGAI*, que se localiza en el 6p21 está implicado también en reordenamientos cromosómicos en los LM uterinos [191]. Además, se ha demostrado que los LM que presentan alteraciones en el 12q15 y en 6p21 hiperexpresan frecuentemente *HMGI-C* o *HMGI-(Y)*.

La presencia de una trisomía del cromosoma 12 causa sobreexpresión del *HMGA2*, que contribuye al desarrollo de LM uterinos a través de un mecanismo similar al de la presencia de t(12; 14)(q15; q23-24).

En el 5% de los LM con cariotipo anormal, se han observado reestructuraciones que implican al brazo largo del cromosoma 10. La mayoría son traslocaciones balanceadas entre el 10q 22 y una multitud de cromosomas, incluyendo los cromosomas 4, 6, 12 y 17 [192]; y con menos frecuencia la del (10)(q22q24) [185].

Además se han observado en estos tumores, fenómenos parecidos a la cromotripsis, “reordenamientos cromosómicos complejos” (RCC) que consisten en la aparición de múltiples rupturas cromosómicas que ocurren en un solo evento y suponen una forma de génesis tumoral distinta a la adquisición progresiva de alteraciones cromosómicas, con reestructuraciones intra e intercromosómicos [193].

También se han contemplado como factor patogénico en el desarrollo de estos tumores, la participación de ciertos polimorfismos en genes de las citoquinas [194-197]. En algunos estudios se ha observado más concretamente la relación de los genes *IL4* y *TNFA* con un aumento del riesgo para el desarrollo de LM uterinos, tras observar los polimorfismos de genes de las citoquinas, Th1/Th2 [18].

También se ha descrito en estudios más recientes, que la baja expresión del gen alcohol deshidrogenasa 1 (*ADH 1*) se observa en los LM únicos en comparación con el miometrio control, siendo este un gen implicado en la transformación de la matriz extracelular. Esta baja expresión no presentó correlación con la historia familiar, el número de lesiones, ni la historia de lactancia acumulada [198].

Otros genes estudiados, podrían tener implicación en el desarrollo de los LM uterinos, como *CULT 1*, un gen supresor, localizado en 7q22 [199, 200].

Se ha descrito la presencia tanto en LM como en LMS uterinos de la mutación de *MED12*, un componente del complejo mediador, envuelto en la regulación global y genoespecífica transcripcional, observándose hasta en el 70% de los LM, incluyendo LMU con mayor frecuencia [201-205], LMC y LMA [201]. Estos estudios buscaron esta misma alteración en LMS de otras localizaciones sin éxito, por lo que parece ser una alteración específica de estos tumores mesenquimales uterinos [27]. En resumen, estas mutaciones de *MED12* se dan con más frecuencia en LMU y menos frecuentemente en variantes histológicas de LM uterinos o LMS uterinos, sin observarse en ningún caso en tumores de músculo liso extrauterinos [201]. Además, estudios recientes como el de Bertsch y cols en 2014, observaron que la mutación de

MED12 y la mutación de *HMG2* son excluyentes la una de la otra, formando parte cada una de una vía de tumorigénesis [206].

En la tabla 4 se presentan las alteraciones cromosómicas más frecuentemente descritas.

Tabla 4: Variaciones citogenéticas más frecuentes en los leiomiomas uterinos

Citogenética de los leiomiomas uterinos.	
60-50% 46 XX	
40-50% alteraciones citogenéticas	
t (12; 14) (q15; q23-24)	(20%)
del (7) (q22q32)	(20%)
t(1;2)(p36;p24)	
Reorganización del 6p21	(10%)
trisomía 12	
Reordenamiento del 10q22	(5%)
reordenamiento del 13q21-22	
deleción de 3q	

Los LMS se asocian con cariotipos complejos, presentando numerosas ganancias y pérdidas cromosómicas, y alteraciones estructurales [207]. En 1993 Laxman observó en un grupo de 14 sarcomas uterinos (5 LMS, 4 SEE y 5 TMM), anormalidades en los cromosomas 1, 7 y 11, considerando una asociación de estas alteraciones con la etiopatogenia de los sarcomas uterinos, y concretamente las alteraciones genéticas en la región 11q22 específicas de los tumores malignos de músculo liso [208]. Suelen ser tumores esporádicos, aunque las mutaciones en el gen de la fumarato hidratasa parecen estar en relación con la aparición de estos tumores aunque también con la de los LM [209, 210]. En 2009, Mittal y cols en una serie de 18 de los 26 LMS uterinos, de los cuales 5 de ellos presentaban zonas de LMC, 4 de ellos zonas de LMA, 4 de ellos áreas de LMA celular y 5 de ellos zonas de LMU. Casi todas las alteraciones genéticas observadas en las zonas de LM, estuvieron presentes en el LMS en cada uno de los casos. En los LMS hubo alteraciones adicionales, predominando las pérdidas sobre las ganancias. Las zonas de LM presentaron ganancias en los cromosomas 1, 6 y 12; afectando los genes *JUN*, *CSK1*, *FYN*, *K-Ras* y *ELK3*. Presentaron pérdidas en los cromosomas 2, 9, 16, 17 y 22, con afectación de los genes *p16*, *p14ARF*, *Endoglin*, *p53* y *PDGFβ*. Las alteraciones adicionales encontradas en los LMS fueron tanto ganancias, en los cromosomas 8 y X, afectando los genes *MYC* y

miRNA-221; como pérdidas en los cromosomas 4, 8, 13, 14 y 17, afectando los genes *ING2*, *LOXL2*, *RB-1*, *TTF-1*, y *p53* respectivamente, así como pérdidas en el cromosoma 11 [211].

Se ha observado en los LMS uterinos la sobreexpresión de productos genéticos que regulan múltiples funciones celulares y la proliferación como UBE2C, Aurora A and B kinase, TPX2 and Polo-like kinase 1 [212]. De hecho Aurora A inhibe la proliferación e induce la apoptosis en LMS uterinos tanto in vivo como in vitro. Aunque algunos de estos tumores expresan c-kit en el fenotipo IHQ, no se ha encontrado ninguna mutación de este gen [213]. Adams y cols en 2007 observaron la positividad IHQ frente a PDGFR α en los distintos grupos de sarcomas uterinos sin asociar mutaciones de los exones 12 ni 18 del PDGFR α [87], aunque los receptores de la tirosina-quinasa como PDGFR α y IGFR-1 se encuentran sobreexpresados en LMS uterinos y pueden ayudar a la señalización de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) [87, 214, 215]. La proteína mTOR, está implicada en el control del inicio de la transcripción des ARNm, organización del citoesqueleto celular de la actina, tráfico de membrana, formación de ribosomas y regulación del crecimiento, proliferación y apoptosis celular, y es además la principal diana de la Rapamicina [124, 216]. Como hemos comentado en algunos LMS donde se han observado áreas de aspecto benigno, tanto en esas zonas como en el resto del tumor se han detectado mutaciones somáticas en el exón 2 de *MED12* en el cromosoma Xq13.1, sugiriendo que un subgrupo de estos tumores se desarrolla sobre LM preexistentes [217]. Asimismo se han descrito ganancias de 17p (8 casos de 21) [218] y pérdidas en la región 9p21.3 [219]. Otros estudios realizados para efectuar el diagnóstico diferencial entre LMS y SEE describieron diferencias importantes entre estos dos grupos de neoplasias, observándose la sobreexpresión de genes como *CDKN2A*, *FABP3*, *TAGLN*, *JPH2*, *GEM*, *NAV2* y *RAB23* en LMS a diferencia de los SEE. Los 100 genes sobreexpresados con mayor frecuencia en LMS incluían los que codifican cadenas ligeras de miosina (*MYLK* y *MYL9*) , caldesmón (*CALDI*), y actina A (*ACTN1*) , pero no los que codifican desmina o actina [163]. Raish y cols en 2012 en un análisis con “arrays” de CGH y con PCR encontraron en un grupo de 15 LMS un promedio de 8,4 y 16,6% de ganancias y pérdidas cromosómicas respectivamente, encontrándose alteraciones en todos los casos, siendo numerosas las regiones con ganancia o pérdida. Las regiones con mayor nivel de ganancia fueron 1q23.3, 7p14.2, 7q34-36, 13q34 y 16p13.3. Por otro lado, las regiones con mayor pérdida homocigótica fueron 2q21.1-23.2, 12q23.3, 4q21.22, 4q34.3, 11q24.2, 12q23.3, 13q13.1, 13q21.33 y 14q24.3 [220].

1.4.7 PREDISPOSICION GENÉTICA Y PATOLOGÍA ASOCIADA

Gran variedad de estudios apoyan la predisposición genética de los LM uterinos. Un análisis de agregación familiar demostró que las mujeres con familiares en primer grado afectas de LM tienen un riesgo 2,5 veces mayor de desarrollar estos tumores, la odds ratio aumenta a un 5,7 después de seleccionar los casos de aparición temprana de estos tumores [221], estudio que concuerda con otros anteriores como los dos de Kurbanova y cols en 1989, y el de Vikhlyaeva y cols en 1995 [222-224] en los que se observaron rasgos influenciados por la genética con un debut más temprano [225]. Se apreció que las mujeres americanas de origen africano tenían de 3 a 9 veces más frecuentemente LM uterinos y de forma más precoz que las mujeres americanas de origen caucásico, demostrándose que esto se debía a la diferente etnia y que no estaba relacionado con el estatus socioeconómico ni con otros factores como la paridad o el modo de vida [7, 226, 227]. En segundo lugar se vio en el registro de histerectomías de Australia una predisposición familiar de esta patología, encontrándose 2 veces más intervenciones por esta patología en gemelas monocigóticas que en gemelas dicigóticas. También Vikhlyaeva y cols en 1995 en un estudio de 97 familias, y Pedeutour y cols en 1999 observaron esta predisposición familiar [224, 227], al igual que en otros estudios como el de Tredar y cols y Luoto y cols en 2000 [228, 229].

Numerosos síndromes hereditarios con neoplasias malignas se asocian con una predisposición a la aparición de LM. Parece existir una asociación genética entre el carcinoma de células renales [230, 231] y la leiomiomatosis familiar hereditaria. Este síndrome está causado por mutaciones heterocigóticas en la línea germinal de la fumarato hidratasa que codifica una fumarasa de los ciclos de los ácidos tricarbóxicos [232]. En estos síndromes se incluyen la leiomiomatosis hereditaria (presentando LM múltiples uterinos y cutáneos) y el carcinoma de células renales, la esclerosis tuberosa compleja, y el síndrome de Birt-Hogg-Dube. El origen embriológico común del aparato genitourinario podría explicar esta asociación [233].

Se estima que el riesgo de progresión de un LM uterino a LMS es menor del 0,1% [234]. El hallazgo frecuente del reordenamiento 1p13-pter en los LMS se ha encontrado también en un subgrupo citogenético de LM con pérdida del brazo corto del cromosoma 1 (del (1)(p11p36) siendo mayoritariamente LMC [235], observándose que los LM que presenta esta alteración se aproximaban más genéticamente a los LMS que a los LM sin esta alteración [236], lo que nos llevaría a pensar que los LMS podrían derivar de este tipo histológico concreto y muy poco frecuente, susceptible de transformación maligna [235]. Otros estudios sugieren también que la traslocación t (10; 17) está asociada a esta transformación maligna en algunos LM [237, 238], como única alteración en el LMS o asociada a otras.

En los LMS uterinos, no se ha descrito una predisposición genética concluyente, ni síndromes asociados claros.

1.5 FACTORES PRONÓSTICOS

Los LM uterinos tienen un pronóstico excelente en la mayor parte de los casos. Menos de la mitad dan clínica, y los problemas asociados son secundarios al tamaño que alcanzan, comprimiendo los órganos vecinos, al aumento de la hemorragia menstrual a metrorragias o a problemas de fertilidad. Otras veces, los tumores subserosos y pediculados, pueden alcanzar tamaños enormes sin otra clínica que la palpación de la tumoración. Algunos tumores pediculados pueden desprenderse y quedar como tumoraciones libres en la cavidad abdominal, tras obtener nueva vascularización desde el omento mayor. Algunos de los problemas sobre la vida de las pacientes derivan de las complicaciones de los tratamientos que se lleven a cabo, mucho de ellos para la preservación de la función reproductora uterina [239-243].

Existe una entidad específica, el LM benigno metastatizante, que tiene la capacidad de migrar a distancia, más frecuentemente a nivel pulmonar, más frecuentemente en mujeres con historia de cirugía pélvica y ocasionalmente produce complicaciones mortales.

El LMS uterino es un tumor muy agresivo con un pronóstico malo, con una SG a los 5 años del 15-25% [161]. Se considera en muchos estudios como factor pronóstico principal el estadio quirúrgico, siendo la supervivencia a los 5 años en los estadios I y II del 25-70% [161], y aunque no queda del todo claro la habilidad de los diferentes sistemas de clasificación para establecer el pronóstico, algún estudio sugiere que es el estadio de la AJCC la que predice mejor el pronóstico frente a la FIGO [65]. Por otro lado, el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, ha sugerido una nueva clasificación introduciendo variables como el tamaño tumoral, el grado histológico, la invasión de cérvix, o la extensión extrauterina y el índice mitótico [244] que muestra, en algún estudio, un valor pronóstico superior al de las anteriores clasificaciones [66]. Por otro lado, observaron en análisis multivariable que tanto el estadio inicial, la edad al diagnóstico menor de 50 años, la ausencia de invasión vascular y el bajo índice mitótico se asocian a una mayor supervivencia; sin embargo no se observa un valor significativo con respecto a la supervivencia de la edad de la menopausia ni de la terapia adyuvante (RT/QT). Además, en estos mismos estudios se observó que en el grupo de tumores con invasión vascular, tanto la edad como el estadio y la invasión vascular tienen valor independiente en la supervivencia, y en cambio el recuento mitótico elevado sólo tiene valor independiente en el estadio I [244, 245].

Se ha comprobado que como variables independientes, la expresión IHQ de los receptores hormonales (estrógenos y progesterona), p53, y ki67 tienen un valor pronóstico en los LMS, perdiéndose este valor en los estudios multivariables [139]. Sí que se ha visto una relación entre la expresión de RRPP y receptores de andrógenos y el intervalo libre de enfermedad (ILE), sin observarse una correlación entre esta expresión y la SG [71]. D'Angelo y cols en 2011

apuntaron como valor pronóstico el tamaño tumoral (\geq de 10cm) y la actividad mitótica (\geq 20 por CGA) sin observar en este estudio una relación entre la SG y la edad del paciente, la necrosis tumoral, el estadio, la atipia nuclear, o el tratamiento postquirúrgico. Tampoco vieron que tuviera un valor pronóstico el índice de expresión de p53, p16 o CD163. Sí que detectaron un impacto en el pronóstico de la expresión de ki67 (índice de proliferación) y de Bcl-2 asociándose este último a un mejor pronóstico [85]. Los factores pronósticos de los LMS intrauterinos han sido siempre controvertidos; en estudios anteriores, como el de Abeler y cols en 2009 establecieron como únicos factores pronóstico el tamaño tumoral y el índice mitótico [14]. Pautier y cols en 2000 apuntaron como factores pronósticos más fiables en primer lugar el estadio tumoral y en segundo lugar el índice mitótico [246]. Avdalyan y cols intentaron establecer en 2012 una relación entre una mayor densidad de microvascularización tumoral y peritumoral, el grado tumoral, y la SG sin encontrar una clara relación entre ellos [142].

1.6 TRATAMIENTO

En los LM uterinos el tratamiento es individualizado en función de la clínica, la localización, el tamaño tumoral, la edad de la paciente y los deseos genésicos de ésta. No se recomienda el tratamiento de rutina de los LM asintomáticos [247]. Las posibilidades de tratamiento son tan amplias que van desde la acupuntura hasta la histerectomía [248]. Las guías más recientes son las guías nacionales francesas [247, 249], siendo semejantes a las de la Sociedad Europea de Menopausia y Andropausia [250]. En cuanto al tipo de cirugía, la fragmentación o “morcelación” se está cuestionando. Se realiza por vía laparoscópica, y la FDA (Food and Drug Administration) la desaconsejó en 2014 ya que aunque las posibilidades de encontrar un LMS en lo que se sospechaba que era un LM es muy baja (del orden del 0,28%), las posibilidades de diseminación del LMS y el cambio de estadio y pronóstico son reales [251].

Sin embargo en el caso de los LMS, la cirugía es la norma, realizando una histerectomía total siendo mucho más controvertido el manejo posterior.

1.6.1 CIRUGÍA

En pacientes premenopáusicas, la tumorectomía (laparotómica, laparoscópica o histeroscópica, según tamaño y localización) puede ser de elección para preservar la fertilidad e incluso mejorarla y evitar partos pretérmino y abortos, en especial en los LM submucosos con componente intracavitario [247]. En pacientes con la fertilidad satisfecha y clínica importante la cirugía de elección es la histerectomía total o subtotal con preservación de los anejos, menos recomendada está la miomectomía. La histerectomía puede ser por vía vaginal, abdominal o

laparoscópica, dependiendo del tamaño uterino. Dado que los tumores no tienen carácter maligno, en ocasiones, para disminuir el riesgo terapéutico, se proponen terapias conservadoras, entre otras la embolización transarterial del LM, o los ultrasonidos de alta intensidad guiados por resonancia magnética.

El tratamiento quirúrgico de los LMS uterinos consiste en una histerectomía total, y la resección tumoral extrauterina si la hubiese. La extensión quirúrgica, con linfadenectomías pélvicas y paraaórticas, recomendables en las tumoraciones malignas de estirpe epitelial, permiten aquí también establecer con precisión el estadio pero no aportan beneficio terapéutico. Además, hay que tener en cuenta que muchos LMS se diagnostican tras intervenciones quirúrgicas, y dado que la afectación ganglionar no es frecuente, la reintervención puede no ser necesaria; asimismo, la anexectomía tampoco influye en el pronóstico [252].

1.6.2- QUIMIOTERAPIA (QT), RADIOTERAPIA (RT) Y HORMONOTERAPIA

Los análogos de la GnRh se utilizan frecuentemente en el tratamiento de los LM uterinos, sobre todo los de mayor tamaño, administrados de forma continua, inhiben la liberación de gonadotropinas, y la esteroidogénesis ovárica, disminuyendo el tamaño y la vascularización de estos tumores. Estos agentes, aprobados por la FDA, se utilizan frecuentemente de forma preoperatoria para reducir el sangrado vaginal y corregir la anemia [253]. Terapias como los moduladores de los RREE (Raloxifeno), las antiprogesterinas (mifepristona, azoprisnil, acetato de telapristona, Ulipristal), los inhibidores de la aromataza (Letrozole), carbegolide, danazol y gestriona han sido estudiados para el tratamiento de estos tumores, con diversos grados de éxito [254]. En este momento sólo el Ulipristal, un modulador de los RRPP está aprobado para la preparación prequirúrgica.

Estos tumores benignos, se pueden favorecer en muchos casos de tratamientos hormonales ya que suelen ser hormono-dependientes, la colocación de dispositivos intrauterinos (DIU) con levonorgestrel, que fue desarrollado en primer lugar como anticonceptivo (DIU MIRENA), que bloquea la proliferación del endometrio reducen la secreción de FSH y LH, suprime la actividad cíclica endometrial y disminuye en más del 90% los sangrados [255, 256], aunque sin observarse reducción del tamaño tumoral [257]. Otros tratamientos en estudio son la vitamina D que ha demostrado inhibir el crecimiento e inducir la apoptosis en LM in vitro [257, 258] o la Epigallocatechin gallate, extracto de té verde, del grupo de las bioflavonas con efecto antioxidante y antiinflamatorio, que han demostrado inhibición del crecimiento de tumores como el carcinoma de mama [259], o el carcinoma de próstata [260] y que en los LM uterinos ha demostrado disminuir la proliferación e inducir la apoptosis en modelos animales y en modelos in vitro [261, 262].

Estos tratamientos menos agresivos que la cirugía pueden ser un primer paso en muchos casos, ahorrando así un método cruento y proporcionando una disminución de la sintomatología [263]. Asimismo, existen estudios recientes de tratamientos con agonistas de las gonadotropinas en LM metastatizantes para evitar cirugías no-ginecológicas agresivas[264]. Los LM que requieren tratamiento quirúrgico han demostrado relación con el patrón de los ciclos menstruales. Las inyecciones de acetato de medroxiprogesterona parecen servir en algunos estudios, tanto en la prevención como en el tratamiento de los LM [265].

En los LMS uterinos, el uso de terapias neoadyuvantes es controvertido. La QT actual de primera línea con doxorubicina o docetaxel/gemcitabina se utiliza en lesiones con mayor riesgo de recidivas [266, 267], para recurrencias o progresión de la enfermedad mostrando unas tasas de respuesta del 19 al 30% [268-270] aunque no se observa un aumento de la SG y sí generalmente, una más alta toxicidad. Se ha demostrado la resistencia de estos tumores a cisplatino [271]. En pacientes con sarcomas uterinos en estadio I, se ha observado un beneficio significativo el asociar cirugía (histerectomía total con doble anexectomía y linfadenectomía paraaórtica) y QT [272-274], teniendo que tener en cuenta la buena tolerancia de algunos fármacos y la toxicidad y mala tolerancia de otros [275]. En nuevos estudios, se ha observado que la suma de un inhibidor de la angiogénesis (bevacizumab) al tratamiento con QT estándar no se acompaña de una mejoría de la SG [276]. Por otro lado, hay que tener en cuenta en las distintas QT utilizadas, su eficacia limitada y en las toxicidades de las mismas (tabla 5).

Tabla 5: Agentes quimioterápicos utilizados en leiomiomas y otros sarcomas uterinos, y toxicidades encontradas [277].

AGENTE	NEOPLASIA	TOXICIDAD ASOCIADA
GENTAMICINA	LMS	Toxicidad pulmonar
IFOSFAMIDA	LMS, TMM, SEE	Cistitis hemorrágica, encefalopatía
DOXORUBICINA	LMS, SEE	Toxicidad cardíaca, neutropenia
TRABEDECTINA (ET-743)	LMS	Supresión de médula ósea, Síndrome de fuga capilar
MEGESTROL	LMS, SEE	Tromboembolismo venoso
INHIBIDORES DE LA AROMATASA	LMS, SEE	Osteoporosis

LMS: leiomiomas, TMM: Tumor Mixto Mulleriano, SEE: sarcomas del estroma endometrial

Por esto, algunos estudios, como el nuestro, intentan encontrar dianas para terapias alternativas. En algún trabajo reciente se observó que la curcumina, ingrediente activo derivado de la cúrcuma, inhibe el crecimiento de las células del LMS, sospechándose que este efecto se realizaba a través de la inhibición de la vía AKT-m TOR (ya que la activación de esta vía por la pérdida de PTEN provoca un aumento en la formación de LMS en ratones). En cambio en este estudio la rapamicina, un inhibidor específico de mTOR no indujo la apoptosis de las células cultivadas in vitro de LMS humanos [278]. En otros estudios se ha observado que algunas pacientes responden a tratamiento hormonal, aunque no es habitual utilizar estos tratamientos. Se han descrito casos con positividad IHQ frente a c-kit, habitualmente citoplasmática, pero no suele existir mutación ni fosforilación del oncogen KIT, por lo que el tratamiento con imatinib sería inefectivo [279]. El estudio de ERBB2 en los sarcomas uterinos ha demostrado que la positividad en la mayoría de los casos es débil, sin embargo en algunos estudios se ha observado sobreexpresión de ERBB2, teniendo que considerarse en estos casos esta diana terapéutica [129].

En los LMS, el uso de RT pélvica post-cirugía está discutida, mientras que en algunos estudios no ha demostrado un mejor control de la enfermedad regional [280], en otras la asocian mayoritariamente a una buena terapia adyuvante en el control local pudiendo ser útil para el tratamiento de recidivas locales aunque no se ha demostrado una mejora de la SG debido al elevado número de metástasis a distancia [281-283].

Aunque algunos LMS expresan positividad frente a receptores hormonales, la terapia hormonal no se ha estudiado aún adecuadamente. Algún estudio ha mostrado un mejor pronóstico en los LMS que respondían al tratamiento hormonal, utilizando inhibidores de la aromatasa, aunque solo presentaron respuesta un 9% de las casos (de 34 casos), y todas las respuestas fueron parciales [284].

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

“Los objetivos no sólo son necesarios para motivarnos. Son esenciales para mantenernos vivos”. Robert H. Schuller

Nuestra hipótesis general de estudio es la existencia de patrones fenotípicos, inmunohistoquímicos y genotípicos diferentes entre el miometrio sano, los LM uterinos y los LMS uterinos que pueden ser detectables por técnicas inmunohistoquímicas y de genética molecular y por tanto ser utilizados como claves para su caracterización concreta y su diagnóstico diferencial.

Nuestro objetivo principal es hallar los patrones distintivos entre los diferentes tumores mesenquimales de músculo liso estudiados, LM uterinos y LMS uterinos, claves para su diagnóstico diferencial, así como datos fenotípicos y genotípicos que pudieran ser utilizadas como futuras dianas terapéuticas.

Los objetivos concretos son:

-Asociar los datos clínicos de las pacientes con el estudio de las características histopatológicas celulares y arquitectónicas, la expresión inmunofenotípica, y las alteraciones numéricas de los cromosomas 3, 7 y 17 y del locus específico 9p21 de sus tumores, así como con el perfil pangenómico de los tumores con diagnóstico complejo.

-Evaluar la clasificación de datos a partir de los resultados obtenidos en la aplicación de algoritmos basados en árboles de decisión, para determinar si esta técnica de clasificación puede ser de utilidad en el diagnóstico y posterior tratamiento médico.

Por todo ello nos proponemos caracterizar en un pequeño grupo de tumores malignos de músculo liso uterinos, en su frecuente variante benigna así como en el tejido miometrial correspondiente a úteros de mujeres sanas:

- Las características clínicas.
- El patrón inmunofenotípico estudiando marcadores de proliferación, apoptosis, proteínas de ciclo celular, dianas terapéuticas, marcadores de la transición epitelio-mesénquima y vascularización.
- Las posibles variaciones numéricas de los cromosomas 3, 7 y 17, y del locus específico 9p21.
- El perfil cromosómico completo con SNP.

Con todos estos datos, y con ayuda de la bibliografía recopilada, intentaremos dar algo más de luz a toda la zona de grises existente entre los tumores benignos y malignos uterinos de músculo liso.

3. MATERIAL Y METODOS

“Lo mejor fue encontrar en el camino tantas manos dispuestas a enseñarme nuevas formas de hacer las cosas”. N.S.

3.1 PACIENTES Y MUESTRAS

Este estudio está constituido por 122 casos que comprenden 76 tumores mesenquimales uterinos de músculo liso incluyendo 16 LMS y 60 LM; 13 úteros control (UC) (úteros sanos de mujeres adultas, procedentes de histerectomías por prolapso y sin otra patología ginecológica tras estudio histopatológico), 14 úteros de origen fetal, de edades gestacionales entre 13 y 40 semanas, y 19 muestras de miometrio sano adyacente a la lesión tumoral incluyendo 13 LM, de los cuales 6 eran LMU, 3 LMC y 4 LME junto con 6 LMS.

La procedencia de las piezas quirúrgicas y necrópsicas es el Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV). Este estudio fue aprobado por el Comité Ético del HCUV.

El material se ha ordenado en 3 grupos básicos, con 5 subgrupos totales: (figura 9)

1. Tejidos uterinos no neoplásicos:
 - 13 úteros de mujeres sin lesiones tumorales.
 - 14 úteros fetales sin lesiones histopatológicas.
 - 19 muestras de tejido sano adyacente a lesiones tumorales.

2. Tumorações mesenquimales uterinas de músculo liso benignas:
 - 30 LMU.
 - 14 LM con alguna característica especial excluyendo LMC (5 plexiformes, 5 atípicos, 2 mitóticamente activos, 1 epitelioides, y 1 con patrón vascular).
 - 16 LMC.

3. Tumorações mesenquimales uterinas de músculo liso malignas:
 - 16 LMS (12 de alto grado y 4 de bajo grado).

Todos los casos habían sido fijados en formaldehído al 4% y se encontraban incluidos en parafina. Se sacaron los casos completos del archivo del servicio de Anatomía Patológica revisando las H&E, e identificando los bloques de parafina. Se revisaron todos los casos para comprobar los criterios morfológicos e IHQ. Se seleccionaron las dos zonas más representativas, intentando que estuvieran lo mejor preservadas posible y sin zonas de necrosis. Realizamos, ayudados de las H&E, el marcaje de las zonas seleccionadas sobre los bloques de parafina. Después, efectuamos una micromatriz tisular por cada subgrupo. Posteriormente realizamos las secciones necesarias para los estudios inmunohistoquímico y molecular (40 secciones de 3 micras). Para el estudio histopatológico e IHQ utilizamos 5 de las 7 matrices,

incluyendo las 4 matrices tisulares tumorales y la matriz del útero control que incluía tejido miometrial sano. El estudio citogenético con FISH, precisó para la correcta interpretación de la presencia anómala de ganancias y pérdidas de señales, del ajuste de los puntos de corte del número de las señales debido a la presencia de núcleos truncado y a la superposición nuclear. Para ello, incluimos el estudio de la matriz del tejido uterino fetal y la matriz de tejidos miometriales no infiltrados adyacentes a distintos casos tumorales (muestra de tejido a 0,5 cm de distancia del tumor, evaluado con H&E), que nos permitieron ajustar el efecto de corte y superposición nuclear en la organización plexiforme muscular y por tanto valorar el diferente tamaño y morfología de sus secciones nucleares así como las variables secciones nucleares de las células epiteliales endometriales.

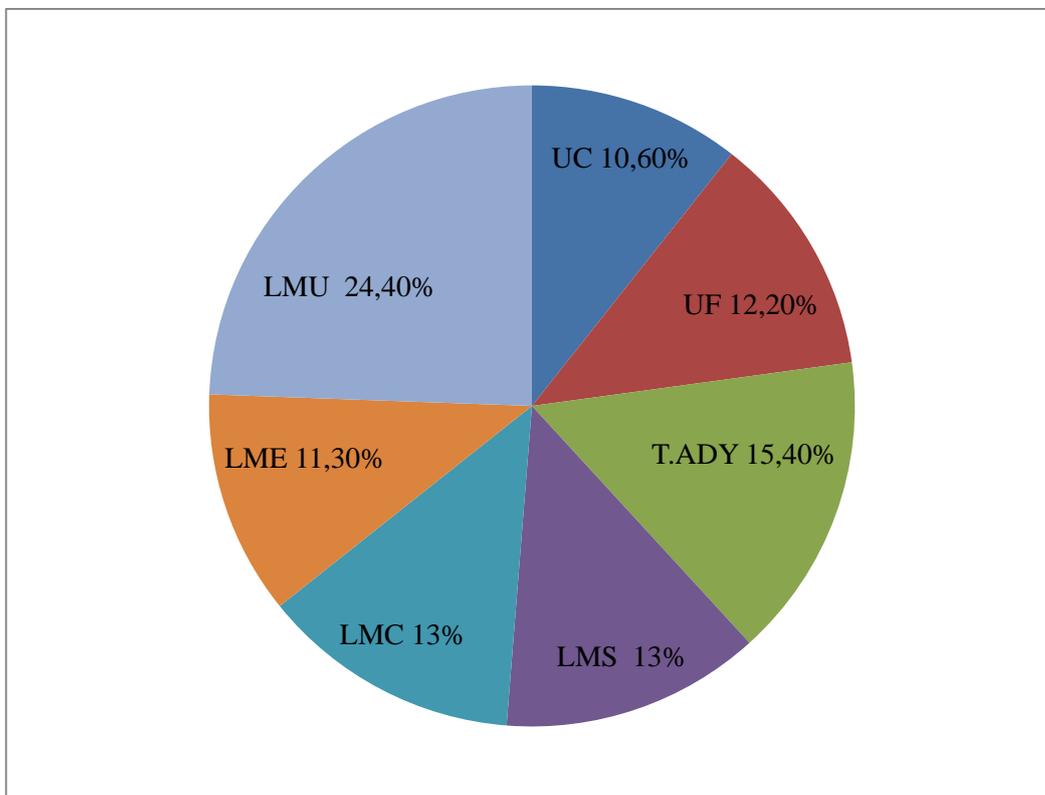


Figura 9: Diagrama de la distribución de los grupos del estudio

UC: útero control, UF: útero fetal, T.ADY: tejido adyacente, LMS: leiomiomas celulares, LMC: leiomiomas especiales, LME: leiomiomas usuales.

3.2 REVISIÓN CLÍNICO PATOLÓGICA DE LOS CASOS

El estudio clínico está basado en el análisis de las historias clínicas de las pacientes depositadas en el Archivo Central del HCUV (figuras 11 y 12). Se consultaron 2 historias clínicas del grupo de LMS, de pacientes que recibieron, tras la cirugía, el seguimiento en el Instituto Valenciano de Oncología (IVO) para determinar la evolución. Se han valorado los parámetros referentes a la situación clínica de las pacientes que a continuación describimos. De las 89 pacientes, incluyendo todas aquellas pertenecientes a los grupos tumorales y las que forman el grupo de útero control (tabla 6), 2 historias clínicas no pudieron ser recuperadas, ambas del grupo de los LMS, teniéndose esto en cuenta en el análisis estadístico. Una única paciente falleció en el grupo de los LME, no estando la causa de la muerte relacionada con la patología de nuestro estudio.

Se recogieron los datos que se muestran a continuación en una tabla con las muestras anonimizadas (tablas 6 a 10):

-Edad. Se valoró en años el momento en que se emitió el informe anatomopatológico. Obtenida de la fecha de nacimiento y la fecha del diagnóstico, se realizó el estudio estadístico dividiendo a las pacientes en 4 grupos de edad: 1) entre 20 y 35 años; 2) entre 36 y 50 años; 3) entre 51 y 65 años y 4) mayores de 65 años.

-Paridad. Referencia a la paridad al diagnóstico. Se dividieron principalmente en 2 grupos: 1) nulíparas; 2) con gestaciones previas. También se tomaron los datos del número de gestaciones, partos, abortos y cesáreas.

-Menopausia. Se documentó si ya estaba establecida la menopausia en el momento del diagnóstico, y si así era, se tomó el dato de la edad de la menopausia.

-Síntomas de presentación. 1) Sangrado; 2) Dolor-pesadez; 3) Dolor y sangrado; 4) Prolapso; 5) Asintomático; 6) Infertilidad.

-Tamaño tumoral. Se consideró el diámetro mayor en centímetros en el estudio macroscópico de la pieza quirúrgica.

- Analítica. Parámetros bioquímicos destacados al diagnóstico: hemoglobina (Hb), recuento leucocitario, marcadores tumorales.

-Tratamiento: 1) quirúrgico (Q), 2) cirugía y quimioterapia (QT), 3) cirugía, quimioterapia y radioterapia (RT), 4) cirugía y radioterapia.

-Diagnóstico anatomopatológico. Se revisaron todos los casos para una correcta selección de los mismos, reevaluando los nuevos criterios en la clasificación de los leiomiomas. Se revisaron todos los casos incluyendo las técnicas IHQ complementarias realizadas en el momento del diagnóstico.

Parámetros morfológicos analizados:

-**Atipia citológica:** 0) ausencia; 1) leve; 2) moderada; 3) severa

-**Mitosis.** Se tomó como referencia el número de mitosis en el conjunto del tumor, y se procedió a buscar mitosis en los tumores en los que este dato no fue evaluado en el momento del diagnóstico. Asimismo se comprobó la existencia o ausencia de figuras de mitosis en los miometrios control. El recuento mitótico se realizó según recomienda la OMS en 10 CGA a 40X.

-**Otros.** Antecedentes personales y familiares de interés (oncológicos, patología ginecológica, alteraciones hormonales o genéticas).

En el grupo de los LMS se analizaron además estos datos:

-**Localización del tumor:** 1) útero, 2) otros.

-**Tipo de tumor:** primario/recidiva/metástasis

-**Necrosis:** sí; no

-**Grado:** bajo grado; alto grado

-**FIGO.** Se utilizaron los criterios actuales.

-**Recurrencia.** En meses y localización.

-**Intervalo libre de enfermedad (ILE).** En meses.

-**Supervivencia (SG).** Éxito o supervivencia en el momento de la última revisión del paciente o revisión de la historia clínica (en meses).



Figura 10 y 11: Imágenes de los archivos de los bloques de parafina y de las historias clínicas del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Tabla 6: Datos clínicos del miometrio control de úteros adultos

UC	EDAD	PARIDAD	MENOPAUSIA	SINTOMAS
1	70	2	50	Prolapso
2	62	2	54	Prolapso
3	81	6	52	Prolapso
4	71	4	52	Prolapso
5	52	2	No	Prolapso
6	68	2	45	Prolapso
7	60	6	51	Prolapso
8	66	2	39	Prolapso
9	48	4	No	Prolapso
10	66	3	51	Prolapso
11	58	3	50	Prolapso
12	48	6	No	Prolapso
13	42	1	No	Prolapso

UC: útero control

Tabla 7: Datos clínico-patológico del grupo de leiomiomas usuales

LMU	EDAD	PARIDAD	MENOPAUSIA	STM	ANALÍTICA	TAMAÑO (cm)	ANTECEDENTES
1	37	0	No	Infertilidad	Hb: 10,1	6,5	Leiomiomatosis
2	40	3	No	Sangrado	Normal	6	Leiomiomatosis
3	36	1	No	Infertilidad	Normal	4,5	Endometriosis
4	34	1	No	-	Normal	10	
5	40	2	No	Sangrado	Normal	9	DM2
6	41	0	No	-	Normal	6	
7	41	1	No	Sangrado	Normal	6	Leiomiomatosis, obesidad
8	34	0	No	-	Normal	9,5	Leiomiomatosis
9	37	0	No	-	Normal	2	
10	75	4	46	Prolapso	Normal	2,2	Leiomiomatosis, HTA, DM2
11	66	3	53	Prolapso	Normal	1,8	HTA
12	69	2	57	Prolapso	Normal	2,8	HTA, DL
13	45	1	No	Dolor	Normal	2	Leiomiomatosis
14	48	0	No	-	Normal	6	Leiomiomatosis, ca. de mama
15	46	2	No	Sangrado	Normal	3,5	
16	48	2	No	Sangrado	Hb: 11,4;	4	HTA, DL
17	67	4	57	Sangrado	Normal	2,1	HTA
18	68	3	50	Prolapso	Normal	2,1	
19	60	4	56	Dolor+sangrado	Normal	9,8	HTA, DM2
20	49	2	No	Sangrado	Hb: 8,1	5,7	Leiomiomatosis, HTA
21	48	2	No	Dolor	Hb: 11	8	Leiomiomatosis, HTA

LMU	EDAD	PARIDAD	MENOPAUSIA	STM	ANALÍTICA	TAMAÑO (cm)	ANTECEDENTES
22	78	2	52	Prolapso	Normal	0,5	HTA
23	66	3	50	Prolapso	Normal	3,7	
24	74	6	53	Prolapso	Normal	2	
25	58	2	50	Prolapso	Normal	1,5	
26	34	0	No	-	Normal	5	Leiomiomatosis
27	36	0	No	Infertilidad	Normal	6	Leiomiomatosis, endometriosis
28	31	0	No	-	Hb: 9,6	11	Leiomiomatosis
29	55	1	53	Sangrado	Normal	2	Leiomiomatosis
30	59	3	50	Sangrado	↑LDL	2	Ca de mama bilateral

LMU: leiomioma usual, STM: síntoma, -: asintomático, DM2: diabetes mellitus tipo 2, HTA: hipertensión arterial, DL; dislipemia, Ca de mama: carcinoma de mama

Tabla 8: Datos clínico-patológicos del grupo de leiomiomas celulares

LMC	EDAD	PARIDAD	MENOPAUSIA	STM	ANALÍTICA	TAMAÑO (cm)	ANTECEDENTES
1	43	3	No	Dolor+sangrado	Leucocitosis	3,5	
2	39	3	No	Dolor	Normal	4,5	Fibroadenoma de mama, pólipo endocervical
3	51	2	No	Sangrado	Normal	5	
4	30	1	No	Dolor	Normal	7	
5	33	0	No	Infertilidad	Hb: 11,8	2,5	
6	29	0	No	Dolor	CEA: 185	4	
7	42	1	No	-	Normal	6,4	
8	33	0	No	Infertilidad	Normal	7,5	
9	33	1	No	Dolor	Normal	8	
10	45	3	No	Sangrado	Normal	8	Alteraciones menstruales
11	81	1	42	Prolapso	Normal	0,7	Osteoporosis, HTA
12	47	2	No	Sangrado	Hb: 11,6	7	Leiomiomatosis
13	28	1	No	Sangrado	Hb: 8,5	7	Leiomiomatosis, raza negra
14	45	0	No	Sangrado	Hb: 9, Leucocitosis	3,6	
15	43	2	No	-	Normal	7,5	Leiomiomatosis
16	46	1	No	Dolor +sangrado	Leucocitosis	7,5	

LMC: leiomioma celular, STM: síntomas, -: asintomático, Hb: hemoglobina, HTA: hipertensión arterial

Tabla 9: Datos clínico-patológicos del grupo de leiomiomas especiales

LME	EDAD	PAR	MENOP	STM	ANALITICA	TAM (cm)	ATIPIA	MIT 10CGA	SUBTIPO	ATCD
1	25	0	No	Sangrado	Hb: 11,8	8	sí	1	atípico	
2	45	3	No	Sangrado	Hb: 11,8	3	sí	2	atípico	Adenomiosis, FA mamario
3	52	5	51	Prolapso	Normal	5	sí	0	atípico	
4	22	0	No	-	Normal	7	sí	1	atípico	SOP
5	43	0	No	Sangrado	Normal	8	no	7	Mitóticamente activo	Leiomiomatosis
6	43	0	No	Sangrado	Normal	3	no	8	Mitóticamente activo	Leiomiomatosis
7	50	0	No	Sangrado	Normal	10	sí	0	atípico	Leiomiomatosis
8	49	0	No	Sangrado	Normal	11	no	0	plexiforme	Leiomiomatosis
9	48	2	No	-	Hb: 10	1,5	no	0	vascular	
10	33	4	No	-	Normal	2,5	mínima	0	epiteliode	
11	50	4	No	Sangrado	Normal	10	no	0	plexiforme	Leiomiomatosis
12	37	0	No	Infertilidad	Normal	8	no	0	plexiforme	SOP
13	55	3	52	-	↑LDL	5	no	0	plexiforme	
14	40	2	No	-	Normal	9,4	no	0	plexiforme	Leiomiomatosis

LME: leiomioma especial, PAR: paridad, MENOP: menopausia; STM: síntomas, MIT: mitosis, ATCD: antecedentes, -: asintomático, Hb: hemoglobina, FA: fibroadenoma, SOP: síndrome del ovario poliquístico

Tabla 10: Datos clínico-patológicos del grupo de leiomiomas.

LMS	EDAD	PAR	MENOP	STM	TAM (cm)	ATIPIA	NECROSIS	MITOSIS	GRADO	FIGO
1	66	2	48	Sangrado	5,3	severa	si	16-20	Alto	4
2	42	2	no	Sangrado	6	severa	si	6-10	Alto	1
3	80	1	50	Dolor	20	severa	si	16-20	Alto	4
4	47	4	no	Prolapso	0,5	moderada	no	6-10	Bajo	1
5	72	4	47	Dolor	9	severa	si	11-15	Alto	1
6	61	-	51	Sangrado	6	severa	si	>20	Alto	1
7	73	4	50	Sangrado	6,5	severa	no	>20	Alto	1
8	43	3	no	-	1,8	moderada	si	6-10	Bajo	1
9	39	3	no	Sangrado	6	severa	si	6-10	Alto	1
10	53	3	51	Sangrado	9	moderada	no	>20	Bajo	1
11	81	4	52	Dolor	10	severa	si	11-15	Alto	1
12	48	2	no	Dolor	6	severa	si	≤5	Alto	4
13	79	1	48	Dolor+sangrado	20	leve	si	>20	Bajo	1
14	53	-	-	Dolor	13	severa	si	16-20	Alto	1
15	60	1	50	Dolor	15	moderada	si	16-20	Alto	2
16	44	1	no	Dolor	16	moderada	si	>20	Alto	4

LMS: leiomioma, PAR: paridad, MENOP: menopausia, STM: síntomas, TAM: tamaño,
-: asintomático

Tabla 10 (cont): Datos clínico-patológicos del grupo de leiomiomas.

LMS	ANALÍTICA	LOCALIZACIÓN	TTO	RECURRENCIA	ILE (meses)	SG (meses)	ATCD
1	Normal	Útero	Cirugía	pulmón	0	7	HTA, DM, DL
2	Ausente	Útero	Cirugía + RT	No	288	288	
3	Ausente	Útero	Cirugía	Abdomen	5	5	
4	Normal	Útero	Cirugía	No	261	261	
5	Lipasa 400	Útero	Cirugía	No	97	97	DL, osteoporosis
6	Ausente	Útero	Cirugía	No	102	102	
7	Normal	Útero	Cirugía	Pulmón	2	12	Ca. de Mama
8	Leucocitosis	Útero	Cirugía	No	125	125	
9	Hb: 7,8; HTO: 26, Pla: 310	Útero	Cirugía + QT	subcutánea	28	173	
10	Normal	Útero	Cirugía	No	160	160	
11	Leucocitosis	Útero	Cirugía	Pulmón e hígado	5	12	Ca de Mama
12	Hb: 9,8; HTO: 28; Pla: 622	Abdominal (recidiva local)	Cirugía + QT + RT	Abdominal	19	79	Leiomiomatosis
13	↑LDH: 257; FE49, Ferritina 44.	Útero	Cirugía	Pulmón	19	22	Miocardopatía hipertrófica. Edema agudo de pulmón.
14	Ausente	Útero	Cirugía	No	210	210	
15	Normal	Útero	Cirugía + QT	Abdominal	1,5	2	Leiomiomatosis, HTA, DM
16	Hb: 9,6;	Abdominal (extrauterino al diagnóstico)	Cirugía * QT	Abdominal	0	27	FIV con extracción de ovocitos, ACO

LMS: leiomioma, TTO: tratamiento, ILE: intervalo libre de enfermedad, SG: supervivencia global, ATCD: antecedentes, QT: quimioterapia, RT; radioterapia, HTA: hipertensión arterial, DM: diabetes mellitus, DL: dislipemia, Ca: carcinoma, FIV: fecundación in vitro, ACO; anticonceptivos orales

También fueron revisadas las historias clínicas de las 14 pacientes de las que se obtuvieron las muestras de útero fetal (tabla 11), tomándose como datos clínicos la edad materna, la edad

gestacional, el tipo de aborto (natural o provocado), la presencia de alteraciones genéticas conocidas y/o malformaciones.

Tabla 11: Datos clínico-patológico del grupo de úteros fetales

UF	EDAD MATERNA	EDAD GESTACIONAL	TIPO DE ABORTO	MALFORMACIONES O ALTERACIONES GENÉTICAS
1	25	23	Parto prematuro extremo. Muerte periparto.	no
2	-	37	Espontáneo. Asistolia intraútero.	no
3	-	24	espontáneo	no
4	-	21	Parto prematuro extremo. Muerte intraparto. (gemelar)	no
5	17	27	espontáneo	Polimalformado/sin estudio genético Anaencéfalo+polihidramnios
6	-	36	Muerte intraparto. Aspiración líquido amniótico. Hemorragia cerebral masiva.	no
7	34	30	Muerte intraparto. Anoxia.	no
8	25	22	espontáneo	no
9	-	24	Parto prematuro extremo. Muerte periparto.	no
10	-	27	espontáneo	no
11	37	20	espontáneo	no
12	-	34	Parto prematuro. Muerte periparto.	no
13	35	17	Espontáneo. corioamnionitis	no
14	32	19	espontáneo	no

UF: útero fetal

Además se tomaron 19 muestras de tejido adyacente al tejido tumoral que procedían de seis LMU (LMU nº 10, 11, 13, 16, 18 y 30); tres LMC (LMC nº 3, 10 y 15); cuatro LME (LME nº 2, 7, 11 y 13), y seis LMS (LMS nº 2, 4, 6, 10, 11 y 14).

3.3 MICROMATRICES TISULARES (TMAS).

Para los estudios retrospectivos, se utilizaron TMAs. El método consiste en colocar cuidadosamente, cilindros de un número elevado de tejidos tumorales en un único bloque de parafina, de forma conjunta y ordenada, permitiendo así el procesamiento de todos los tumores y tejidos no tumorales bajo las mismas condiciones técnicas con varios cilindros representativos de la totalidad de cada muestra a estudiar [285, 286] (figura 13 y 14)

La metodología empleada consiste en incluir en bloques de parafina receptores los casos tumorales. Para el presente estudio, construimos 7 micromatrices tisulares incluyendo todos los casos retrospectivos elegidos; de aquellos en los que fue posible elegir dos zonas diferentes del bloque que contenían tumor para una mejor valoración.

Protocolo para la construcción de las micromatrices tisulares.

Una vez preparado el material (bloques de parafina dadores) así como la puesta a punto de las medidas en los ejes X e Y en el tissue arrayer utilizado para la construcción de micromatrices (MTA-1 *Manual Tissue Arrayer*, Beecher Instruments, USA), procedimos a la construcción de las mismas siguiendo los pasos que a continuación describimos:

1-Recogida de bloques y preparaciones: Previo a la construcción de la micromatriz tisular, se recogieron todos los bloques de los casos, y los controles, y se seleccionaron las laminillas teñidas con H&E de cada bloque eligiendo las zonas más representativas y mejor conservadas. A continuación, enfrentamos el porta de H&E con el bloque correspondiente, para identificar el área señalada previamente.

2-Diseño de la matriz: se realizaron 7 matrices tisulares que incluían los casos a estudiar junto con un control tisular no tumoral de reactividad conocida. El diámetro de los cilindros en nuestro estudio fue de 1mm. Confeccionamos plantillas identificando la posición exacta de cada muestra en la matriz.

3-Construcción de la matriz: Primero alisamos la superficie del bloque receptor antes de empezar a introducir los cilindros de las áreas seleccionadas previamente de los diferentes tumores a estudiar, desgastando un poco la parafina en el micrótopo para que todos los cilindros tuvieran el mismo ángulo. Colocamos el bloque receptor en la base del instrumento y lo aseguramos correctamente. Elegimos el juego de agujas apropiado, en este caso de 1 mm de diámetro. Situamos a la izquierda la más gruesa que toma el cilindro de tejido del bloque dador y, a la derecha, la que hará el agujero en el bloque receptor. Ajustamos a cero los micrómetros que marcan la alineación de las filas y columnas de los cilindros. Hicimos primero el agujero en el bloque receptor, rotando el émbolo de aguja para profundizar, aproximadamente 3 mm. A continuación colocamos el bloque de tejido donante sobre el puente, cambiamos de aguja y

tomamos el tejido tumoral demarcado. Retiramos el puente con el bloque donante e incluimos el cilindro de tejido exactamente encima del agujero hecho en la parafina, sin hundirlo. Pusimos encima del hueco un portaobjetos para alisar la superficie del cilindro y nivelarla con la parafina. Cambiamos la medida del micrómetro a la siguiente posición para hacer el agujero con la aguja respectiva. Comenzamos poniendo el tejido que servirá de testigo de acuerdo a la ubicación en la plantilla. Así sucesivamente hasta incluir todos los casos.

4- Una vez finalizada la construcción de la micromatriz tisular, llevamos el bloque receptor de parafina a la estufa de 37° C durante 24 horas, lo cual permitió que la parafina de los cilindros del tejido se adhieran mejor a la parafina del bloque receptor (Figura.12).

5- Se realizaron las secciones necesarias para el estudio de cada micromatriz tisular de 3 micras de espesor, dejando cada corte flotar en un baño libre de proteínas a 40°C, recogido sobre la cara positiva de un portaobjetos con poli-lisina (DAKO), dejándolo secar al aire, y pasándolo por ultimo a secar a 56°C durante toda la noche para posterior tinción con H&E, realización de pruebas de IHQ (figura 13) y de FISH. Colocamos una vez realizados los cortes, una lámina portaobjetos para proteger los bloques de las micromatrices tisulares. Almacenamos los cortes realizados en un lugar fresco y seco, a oscuras, ordenadas en clasificadores por grupos y perfectamente rotuladas con el nombre de la matriz y el número de laminilla. Previamente para la realización de todas las técnicas se realiza la desparafinación del tejido, incubando las muestras a 60°C durante 20 minutos y sumergiendo los portaobjetos en xilol (Merck co) 10 minutos, pasándolos en segundo lugar a xilol nuevo. Tras esto se deshidrató el tejido sumergiendo los portaobjetos en etanol 96% 5 minutos repitiendo con etanol al 100% otras 2 veces 5 minutos, introduciéndolos por ultimo en agua destilada.

TINCIÓN DE H&E:

La H&E es la tinción histológica convencional, con la que hemos valorado la calidad de la muestra (presencia de celularidad tumoral suficiente, mitosis, áreas representativas). Detallamos el protocolo utilizado para esta tinción a continuación.

Sumergimos los portas en Hematoxilina de Harris durante 5 minutos y enjuagamos posteriormente en agua destilada durante 2 minutos. Posteriormente sumergimos las muestras en ácido clorhídrico al 0,5% (Merck co) durante un breve segundo, y lavamos con agua corriente y posteriormente con hidróxido de amonio (Merck co). Nuevamente realizamos un pase rápido por agua corriente. Sumergimos en Eosina durante 4 minutos y lavamos con agua corriente (inmersiones rápidas). Deshidratamos de nuevo con pases en etanol (70°/80°/90°) aproximadamente durante 30 segundos cada uno. Finalmente aclaramos con xilol durante 1

minuto y montamos con entellan® y cubreobjetos para la correcta conservación y observación al microscopio.

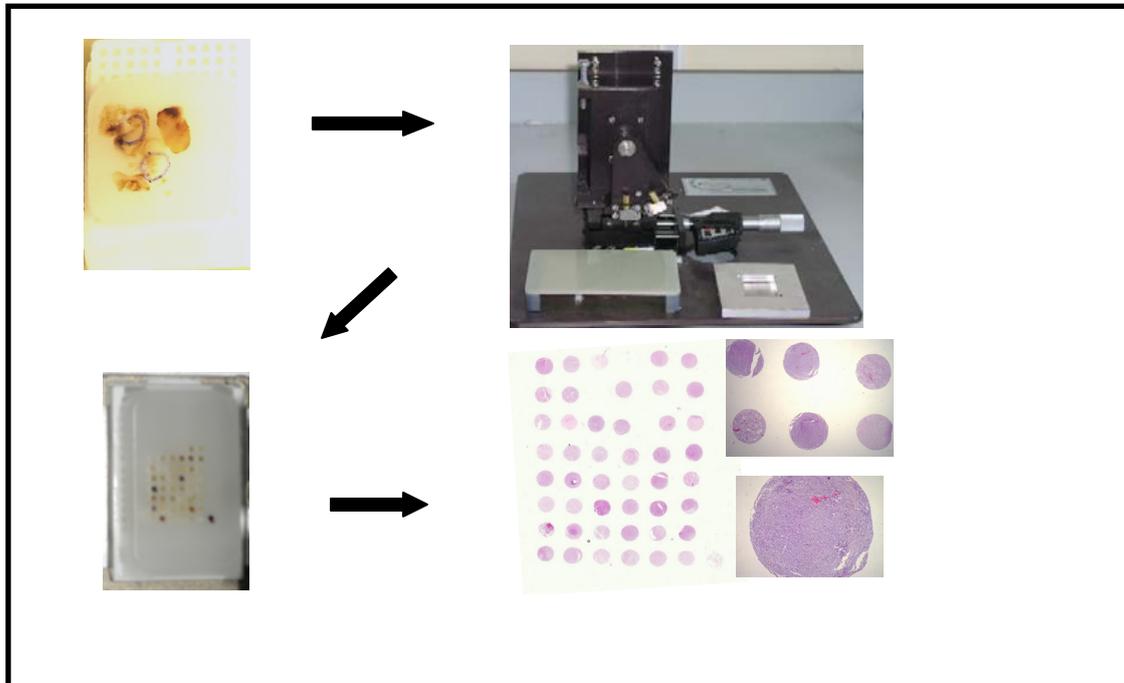


Figura 12: Imagen representativa del bloque con el tumor y la selección del área más representativa marcada para posteriormente introducirla en el array con el tissue arrayer, posteriormente se realiza una H&E

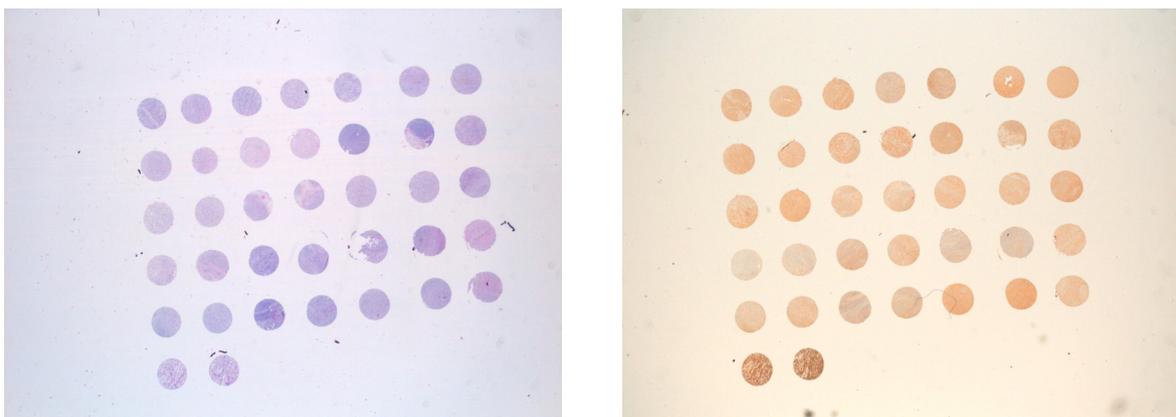


Figura 13: Imágenes de cortes de micromatriz de leiomioma celular tras tinción con H&E y un marcador inmunohistoquímico (PDGFR α).

3.4 TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

Para la realización correcta de las técnicas IHQ, en primer lugar se llevó a cabo un conteo celular abarcando todo el diámetro del cilindro tumoral como un todo (100%). Se consideró una reacción positiva ante el anticuerpo cuando la célula, tumoral o normal, mostró tinción marrón a nivel del compartimiento específico o diana para cada anticuerpo: nuclear, citoplasmática o membranosa, como se indica en la tabla para cada marcador (tabla 13).

Se realizó la determinación de 23 marcadores IHQ en 5 matrices tisulares, incluyendo las matrices con lesiones tumorales y la matriz de útero control adulto manteniéndose exactamente las mismas condiciones en todas ellas. Se evaluó el rango (porcentaje de celularidad tumoral positiva), el patrón (homogéneo o heterogéneo) y la intensidad de la tinción en 21 de las técnicas IHQ (tabla 12). Para las dos técnicas restantes, CD31 y CD34 se evaluó de esta misma forma la positividad en las células tumorales y mediante un patrón cualitativo (+, ++, +++ y ++++) además de la cantidad de vascularización presente en el tejido estudiado, teniéndose en cuenta la dimensión y morfología vascular. Estos datos se trasladaron a una tabla Excel y Access.

Tabla 12: Variables estudiadas y puntos de corte para el estudio inmunohistoquímico

Rango: 0) de 0-10%; 1) de 11 a 30%; 2) de 31 a 75%; 3) de 76 a 100%.

Patrón : 1) homogéneo; 2) heterogéneo; 3) focal

Intensidad: 1) débil; 2) moderado; 3) intenso.

Realización de las técnicas en máquina DAKO AUTOSTAINER (DAKO CORPORATION)

En primer lugar, las muestras se desparafinaron e hidrataron, se incluyeron los portaobjetos con los cortes de tejido en la estufa 37°C 30 minutos y posteriormente se sumergieron en xilol y alcohol. En segundo lugar se llevó a cabo el lavado con agua. Después, se realizó el desenmascaramiento antigénico:

Colocamos en la olla a presión a 1,5 atmosferas, 3 minutos, en tampón citrato (pH 6.0), y después, lavamos con agua.

A partir de este punto la técnica se realizó de forma automatizada en la máquina DAKO AUTOSTAINER (DAKO CORPORATION).

Finalmente, realizamos la deshidratación con alcohol y xilol y montamos los portas con entellan®.

Todas las muestras fueron evaluadas por la doctoranda y revisadas posteriormente por un patólogo experto (Dr. Samuel Navarro), teniendo en cuenta la localización correcta de la tinción y descartando artefactos producidos por difusión. Aquellos resultados discordantes entre los dos evaluadores fueron reevaluados y analizados en detalle.

Se tomó nota de posibles reacciones cruzadas y de patrones de tinción particulares.

Tabla 13: Anticuerpos, diluciones, clonalidad, localización de los anticuerpos y casa comercial.

Antígeno	Monoclonal/ policlonal	Clon	Dilución	Localización Ag	Pretratamiento	Casa comercial
Ki-67	Monoclonal	MIB-1	1/50	Nuclear	Tampón citrato	Dako
Bcl 2	Monoclonal	3.1	1/50	Citoplasma	Tampón citrato	Novocastra
Bax	Policlonal		1/50	Citoplasma	Tampón citrato	Dako
P53	Monoclonal	DO-7	1/50	Nuclear	Tampón citrato	Dako
Ciclina D1	Monoclonal	SP4	1/50	Nuclear	Tampón ciclina/ Baño 40'	Neomarkers
P16	Monoclonal	INK4A	1/50	Nuclear	Tampón citrato	Cintec
P21	Monoclonal	SX118	1/25	Nuclear	Tampón ciclina/ Baño 40'	Dako
P27	Monoclonal	SX53 G8	1/50	Nuclear	Tampón citrato	Dako
c-kit	Policlonal		1/50	Citoplasma- membrana	Tampón citrato	Dako
PDGFRα	Policlonal		1/100	Citoplasma- Membrana	Tampón citrato	Santa Cruz Biot.
IGFR 1α	Monoclonal	1H7	1/50	Citoplasma	Tampón citrato	Santa Cruz Biot.
c-erb-B2	Monoclonal	RTJ1	1/50	Membrana	Tampón citrato	Novocastra
E caderina	Monoclonal	36B5	1/20	Membrana	Tampón citrato	Novocastra
slug	Policlonal		1/100	Nuclear/citoplasma	Tampón citrato	Agent
snail	Policlonal		1/100	Nuclear/ citoplasma	Tampón citrato	Agent
β catenina	Monoclonal	E-5	1/500	Citoplasma	Tampón citrato	Santa Cruz Biot.
AKT	Policlonal		1/400	Nuclear	Tampón citrato	Santa Cruz
RREE	Monoclonal	6F11	1/40	Nuclear	Tampón citrato	Novocastra
RRPP	Monoclonal	1A6	1/30	Nuclear	Tampón citrato	Novocastra
CD31	Monoclonal	1A10	1/20	Citoplasma	Tampón citrato	Novocastra
CD34	Monoclonal	Qbend- 10	1/50	Citoplasma	Tampón citrato	Novocastra
CD44	Monoclonal	DF14- 85	1/50	Citoplasma	Tampón citrato	Dako
OCT3/4	Monoclonal	N1NK	1/100	Citoplasma	Tampón citrato	Novocastra

3.5 ESTUDIO CITOGENÉTICO:

3.5.1 FISH

Realizamos la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) para la detección de anomalías cuantitativas en los centrómeros de los cromosomas 3, 7, 17 y en la región 9p21. La FISH utiliza sondas de ADN marcadas con un fluoróforo para detectar anomalías génicas o cromosómicas. En primer lugar, la muestra de ADN (cromosomas metafásicos o núcleos en interfase) fue desnaturalizada (separando las hebras complementarias de la estructura del ADN). A la muestra desnaturalizada se le añadió la sonda, marcada con un fluoróforo, que se unió al ADN de la muestra en el sitio diana. Posteriormente, en la hibridación, se volvió a formar una doble hélice de ADN. Observamos entonces la señal emitida por la sonda mediante el microscopio de fluorescencia Olympus BX41 (Ver figura 14).

Para ello utilizamos el Kit UROVISION (Abbott Molecular, USA) que presenta 4 sondas de ácidos nucleicos marcadas con fluorescencia, complementarias a regiones específicas de los cromosomas 3, 7, 9 y 17. Estas 4 sondas se visualizaron a longitudes de onda diferentes, emitiendo colores distintos que se observan a través de 4 filtros distintos. La sonda del centrómero del cromosoma 3 localizada en 3p11.1-q11.1, y denominada Vysis CEP 3, se visualizó en rojo; la sonda del centrómero del cromosoma 7, localizada en 7p11.1-q11.1, y denominada Vysis CEP 7, se visualizó en verde; la sonda del centrómero 17 localizada en 17p11.1-q11.1 y denominada Vysis CEP 17 se visualizó en aguamarina, y la sonda específica del locus 9p21 denominada Vysis LSI p16 se visualizó en amarillo (figura 15).

Con esta técnica detectaremos aneuploidías de los cromosomas 3, 7 y 17, y ganancias o pérdidas del locus específico 9p21.

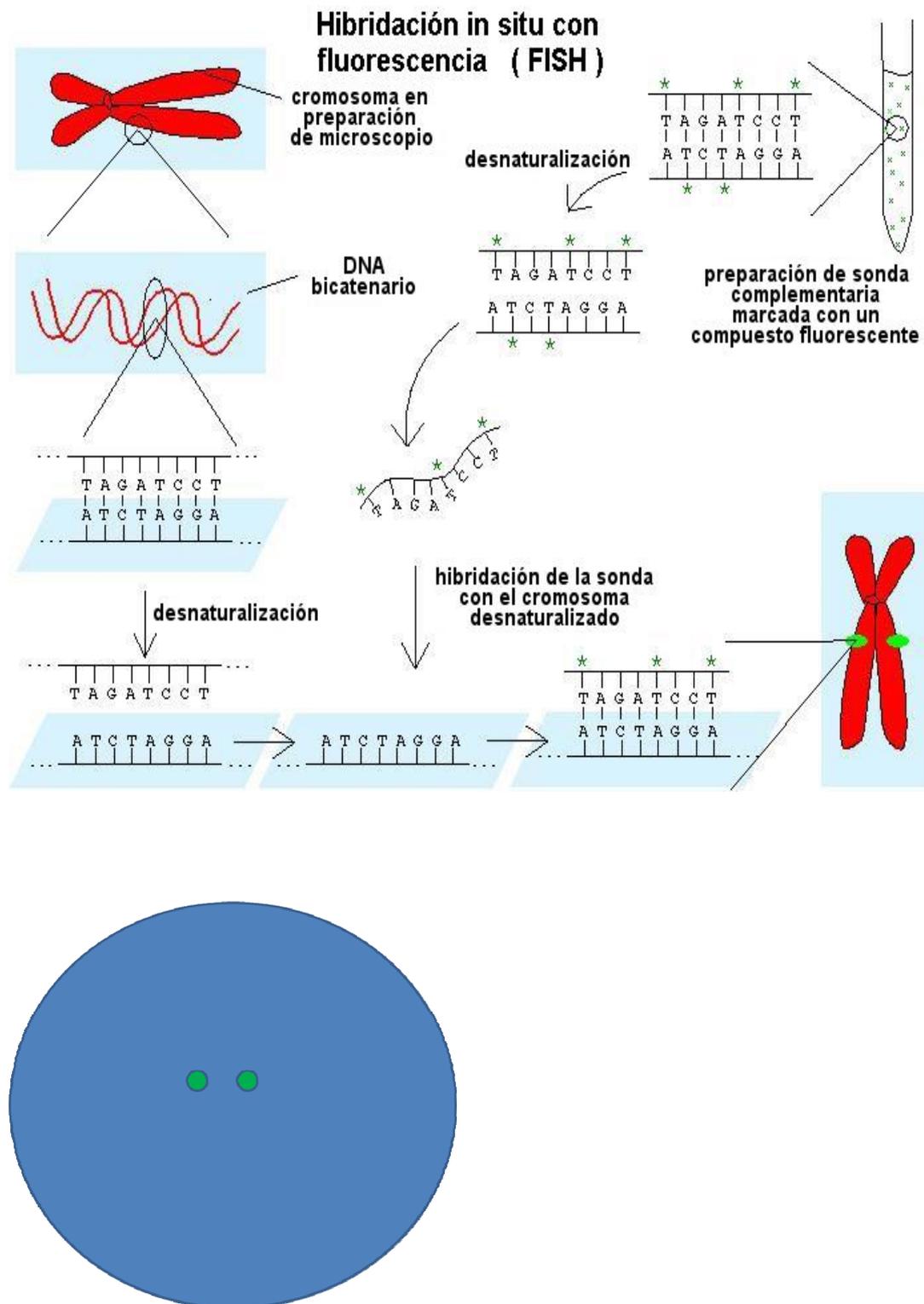


Figura 14: Esquema de la técnica de FISH referido a un cromosoma (<http://biomodel.uah.es>) y esquema en núcleo disómico.

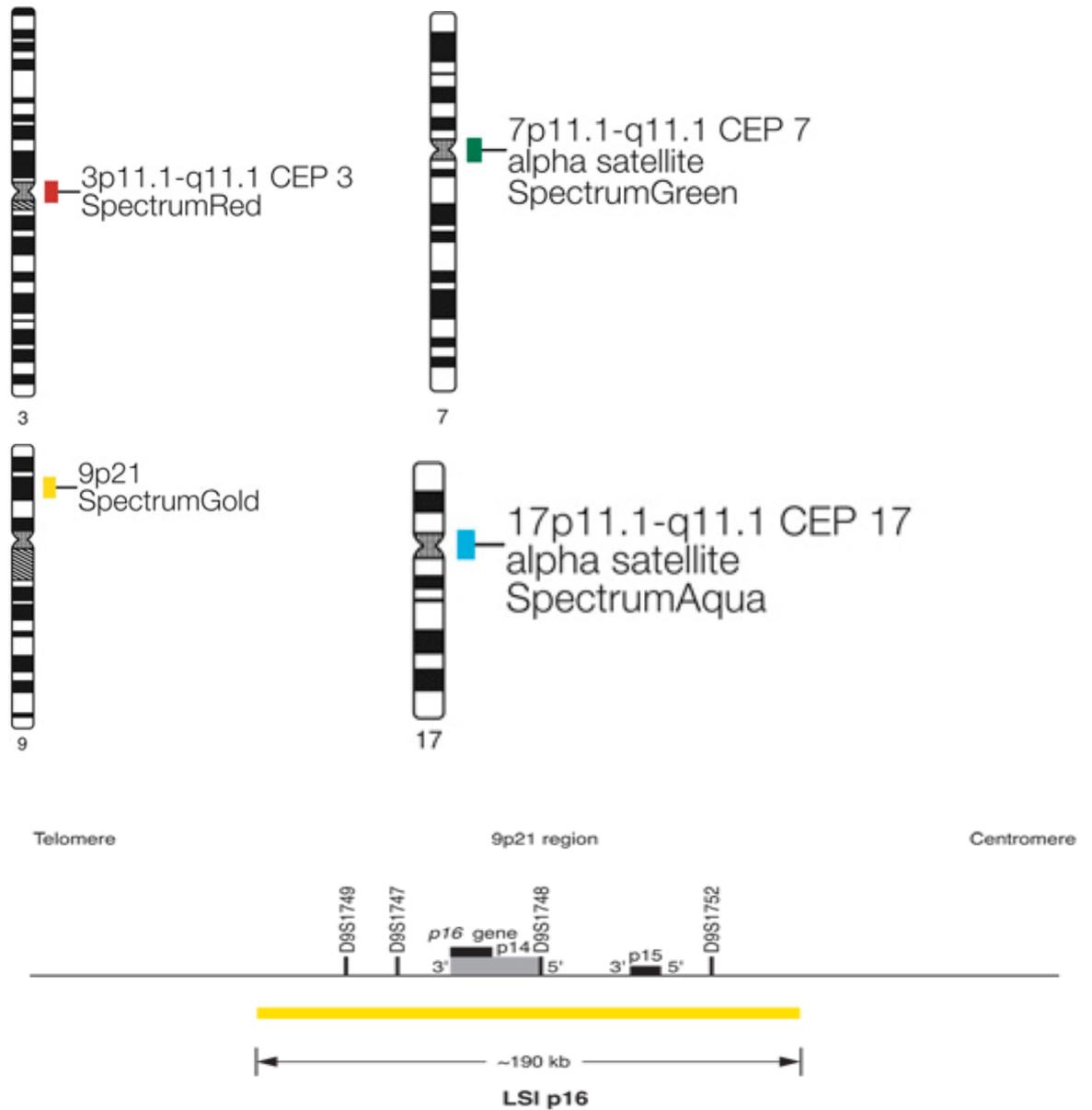


Figura 15: Ideograma de las regiones cromosómicas analizadas mediante la sonda de Urovysion (fuente www.abbottmolecular.com)

Protocolo para la realización de la técnica de FISH.

Una vez preparado el material ya desparafinado se procede a la realización de la técnica, siguiendo las instrucciones del proveedor (Abbott molecular, USA)

1-Pretratamiento:

En primer lugar, sumergimos los secciones realizados en tampón citrato al 1% (DAKO) y lo introducimos en autoclave 3 minutos a 1 atmósfera. Lo dejamos enfriar a temperatura ambiente y lavamos los cortes en primer lugar con agua corriente y posteriormente con agua destilada.

2-Digestión enzimática:

En este paso se realiza un baño a 37°C durante 15 minutos en proteinasa K (50mg/ml) y posteriormente realizamos un lavado en tampón SSC 2% durante 5 minutos.

3-Fijación:

Sumergimos los portaobjetos en formol al 10% durante 10 minutos y lo lavamos posteriormente con tampón SSC al 2% durante 5 minutos.

4- Desnaturalización e hibridación:

Colocamos la sonda sobre el tejido cubriéndolo en su totalidad, colocando posteriormente un cubreobjetos sobre el tejido y sellamos con pegamento (fixogum). Tras esto colocamos el portaobjetos sobre la placa térmica (thermobrite) a 90°C durante 4 minutos, para desnaturalizar y lo dejamos hibridando durante 16 a 20 horas a 37°C en placa térmica.

5- Lavados post-hibridación:

Lavamos las muestras en tampón SSC al 2% con NP40 al 0,3% (Nonidet 40), durante 2 minutos a 72°C.

6-Contratinción:

Para finalizar, cubrimos el tejido con 10 µl de DAPI (Abbott molecular Inc) y lo cubrimos con un cubreobjetos, sellándolo con pegamento y se colocándolo en nevera a 4°C en oscuridad durante 30 minutos.

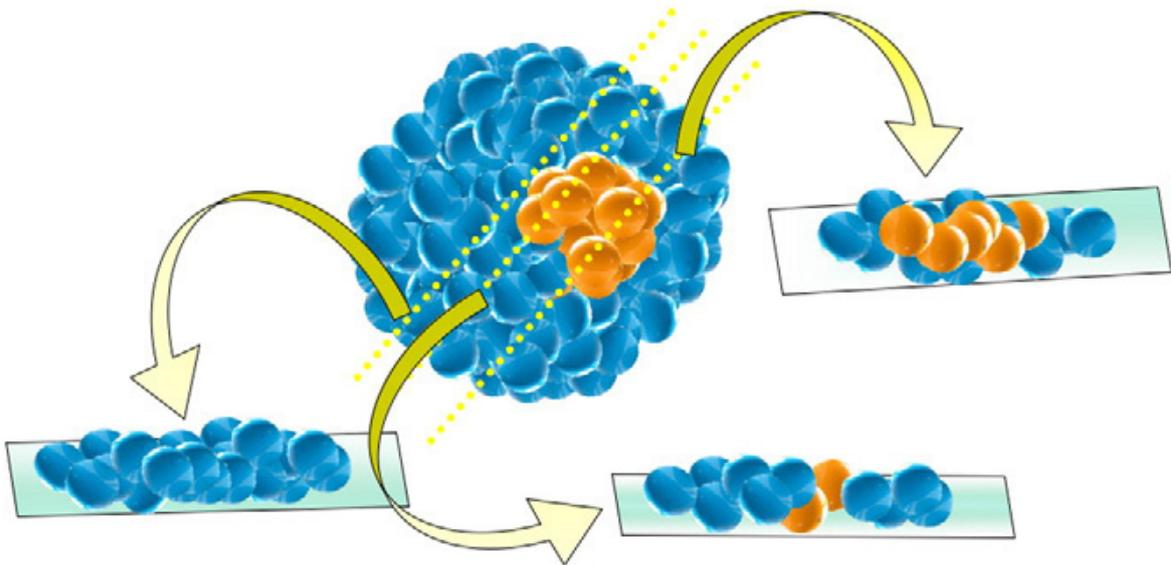
Visualización e interpretación de las señales:

En primer lugar se comprobó la correcta realización de la técnica visualizándose en células no superpuestas la nitidez de las señales y la visualización de todas ellas en cada uno de los filtros. Posteriormente se contaron en cada muestra un mínimo de 100 células, teniendo en

cuenta la posible superposición de las señales y la limitación de la técnica en parafina (por ejemplo: el corte de células con la desaparición de una o más señales).

La visualización de las señales se llevó a cabo con el microscopio Olympus BX41. En primer lugar nos situamos en el cilindro que deseamos valorar. Para facilitar la orientación en una matriz de cilindros se utilizan los controles, siendo estos los primeros que debemos localizar. Una vez localizados y con la plantilla delante, comprobar el número de filas y de casos en cada fila, anotar si se perdió algún cilindro o cualquier otra incidencia. Entonces nos situamos en el primer cilindro a estudiar. Teniendo en cuenta que el tejido estudiado es una sección en parafina de tejido fijado, el número de células es muy superior a una impronta o una extensión tumoral. Además, se disponen de una forma mucho más compacta. Y lo más importante, los núcleos presentes están en su mayoría truncados. Por ellos intentamos analizar la señal de las diferentes sondas cromosómicas, en el mayor número de núcleos, los más grandes posible y aislados, de morfología alargada (con bordes romos), para evaluar las señales en cortes nucleares longitudinales, que aportan una mayor área de estudio y adecúan el contaje. Cuando el número de núcleos con la morfología previamente descrita eran insuficientes para realizar el contaje adecuado, realizamos el contaje en núcleos más redondeados propios de un corte transversal, así como núcleos ovalados con bordes más puntiagudos que indican un corte más oblicuo. Tuvimos en cuenta el empaquetamiento celular de algunos tumores, como en los LMC, contando mayor número de células para evitar, en lo posible, el efecto de núcleos yuxtapuestos. Con todos estos condicionantes, se procedió a establecer un protocolo estándar para la valoración de las señales presentes en los cilindros, teniendo en cuenta protocolos previamente publicados [287-289].

- La principal desventaja de la aplicación de la técnica de FISH sobre secciones de parafina es el efecto de corte introducido, es decir, una proporción de los núcleos observados están seccionados. No olvidemos que los tumores tienen volumen además de poder existir una heterogeneidad clonal intratumoral como se puede observar en la figura 16. Para mejorar la visualización de las señales presentes en el núcleo y su contaje, se analizaron varios planos mediante el micrométrico. Hay que tener en cuenta que las células musculares lisas miden de 5 a 10 micras de diámetro y de 30 a 200 micras de longitud, con un núcleo de 3 a 8 micras de diámetro. Además en algunos tumores como en los LMC y en los LMS, la presencia de nucléolos prominentes nos sirvió como referencia a la hora de definir los límites y dirección de corte de los núcleos observados.



Patrones resultantes:

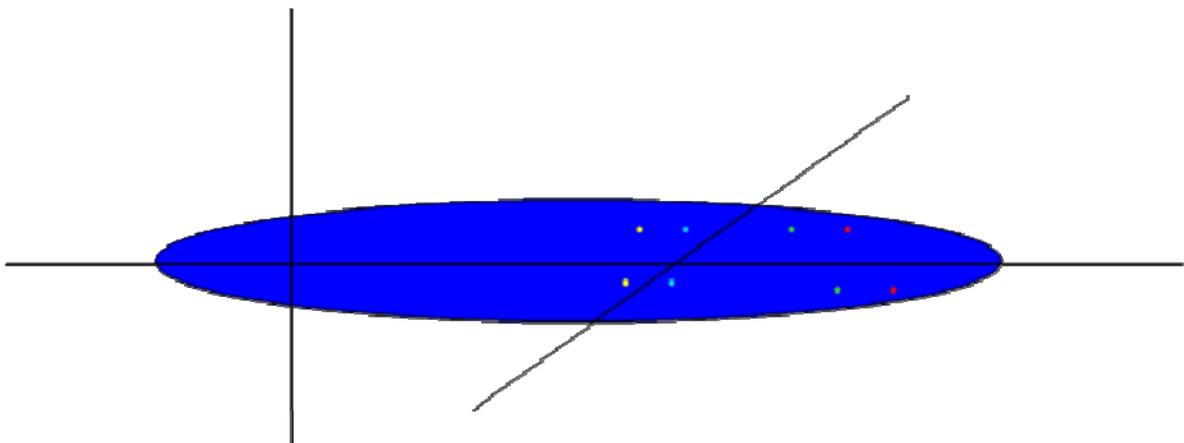


Figura 16: Imagen tridimensional de la lesión con distintas poblaciones celulares [290] y patrones resultantes por el efecto corte.

-Se realizó la visualización de cada señal siempre en un filtro individual, para evitar errores de conteo, ya que cada fluorocromo tiene una longitud de onda específica.

- Debido a la complejidad de los tumores, se tuvo en cuenta la frecuente superposición de los núcleos y se intentó en la medida de lo posible evitarla y contar núcleos sueltos.

- Se consideró que los núcleos sin alteraciones genéticas (normales) fueron aquellos que presentaban dos copias de cada uno de las sondas utilizadas. En cambio, aquellos núcleos que presentaban un número mayor (ganancias) o menor de dos (pérdidas) copias fueron considerados alterados (ver figura 17).

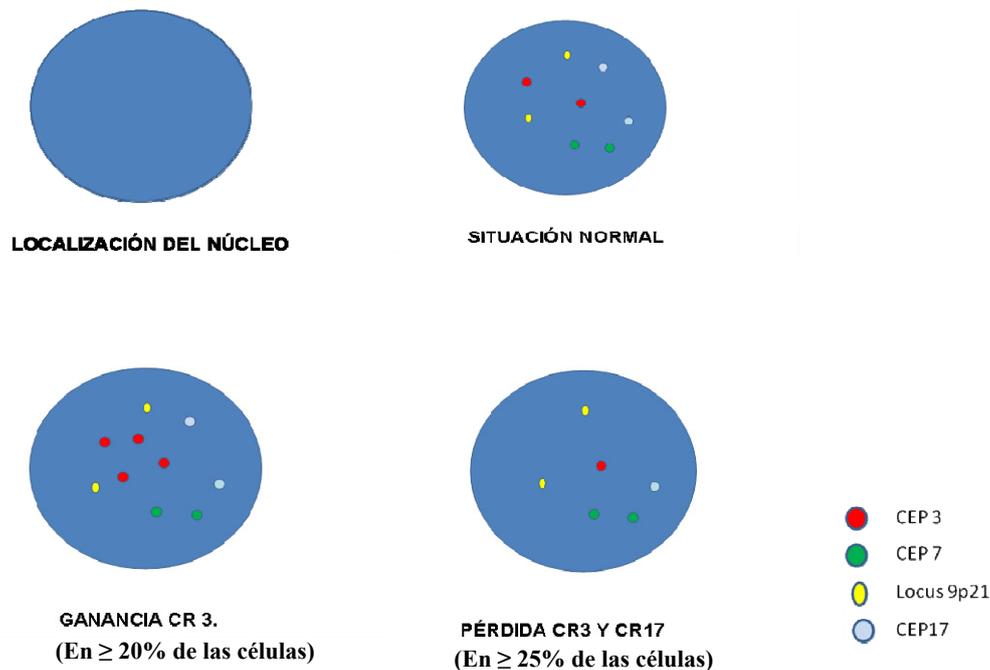


Figura 17: Esquema de la evaluación por FISH

- Se contaron un mínimo de 100 núcleos en cada cilindro. Se anotó el número de señales de cada núcleo y por cada sonda y se dividió entre el número total de células (100). Así se obtuvo la media de señales por célula de cada una de las sondas y por cada muestra. Además anotamos el tamaño y forma de la celularidad visualizada para eliminar en la medida de lo posible los errores por efecto del corte y/o superposición. Esta evaluación se realizó de igual manera en todas las muestras. Los valores obtenidos en los tejidos sanos se utilizaron de punto de corte para la evaluación en los tejidos tumorales (ver tabla 14).

- Se evaluaron por separado cada uno de los cilindros de una misma muestra tumoral. El diagnóstico final correspondió a la media de señales de todos los cilindros pertenecientes a una misma muestra tumoral.

Tomamos como referencia principal los resultados obtenidos en el miometrio de los úteros control, ayudándonos de los puntos de corte de los úteros fetales y del tejido adyacente a la hora de comparar morfología, dirección de la sección del núcleo, y empaquetamiento celular.

En el útero fetal, al ser células más pequeñas, poligonales y redondeadas, existía un efecto corte menor, lo que nos sirvió a la hora de evaluar los núcleos con cortes transversales. También utilizamos los resultados del tejido control localizado en cada una de las matrices tisulares, compuestos por tejido renal, tejido hepático y tejido esplénico, donde la celularidad muy juxtapuesta nos ayudó a evaluar el empaquetamiento dado predominantemente en los LMC.

Por otro lado, se observó la presencia de las distintas señales en las células de las estructuras sanas, como los vasos sanguíneos, de menor tamaño pero con morfología asimismo elongada para valorar el efecto de sección por el corte.

Se tomó como punto de corte para definir las ganancias cromosómicas o génicas en el tejido tumoral, los resultados obtenidos en todos los tejidos sanos, y los resultados de todos los observadores. Así se utilizó como criterio de ganancia numérica cromosómica (3,7 y 17) o de región cromosómica (9p), por encima del nivel máximo de falsos positivos (menos y más de dos señales por núcleo) en el útero control, que se aproximaba con la media de señales únicas en este tejido más tres veces su desviación estándar. En cambio para valorar las pérdidas de las señales, fuimos más estrictos, como recomienda la literatura para el FISH en parafina en tumores de células fusiformes. Tuvimos en cuenta la morfología y empaquetamiento celular, el tamaño nuclear, el grosor y la dirección del corte. En los contajes de células con núcleo ovalado, cortado longitudinalmente, el punto de corte para la valoración de deleciones lo situamos en el 30%. En los casos de núcleos cortados de forma oblicua, o transversal, y en aquellos de pequeño tamaño, el punto de corte fue del 40% para todas las señales. Todas las muestras fueron evaluadas por la doctoranda y revisadas al menos por una experta (Dra. Marta Piqueras) en diagnóstico genético por FISH del Laboratorio de Patología Molecular del Dpto. de Patología (figura 18). Los casos dudosos fueron todos ellos revisados por otro experto en diagnóstico con FISH (Dra. Rosa Noguera).

Tabla 14: Resultados en las diferentes sondas en el UC y puntos de corte para la valoración de ganancias de las señales en el tejido tumoral.

Región cromosómica	Medias de señales únicas en UC	Desviación estándar del cambio numérico de las señales en UC	Punto de corte para diagnóstico de en tejido tumoral
CEP 3	12 (± 2)%	2%	Mayor del 20%
CEP 7	17 (± 3)%	3%	Mayor del 25%
LSI 9p21	21 (± 2)%	2%	Mayor del 25%
CEP 17	18 (± 2)%	2%	Mayor del 25%

UC: Útero control, CEP3: sonda del centrómero del cromosoma 3, CEP7: sonda del centrómero del cromosoma 7, CEP17; sonda del centrómero del cromosoma 17, LSI 9p21: sonda localizada en el locus específico 9p21

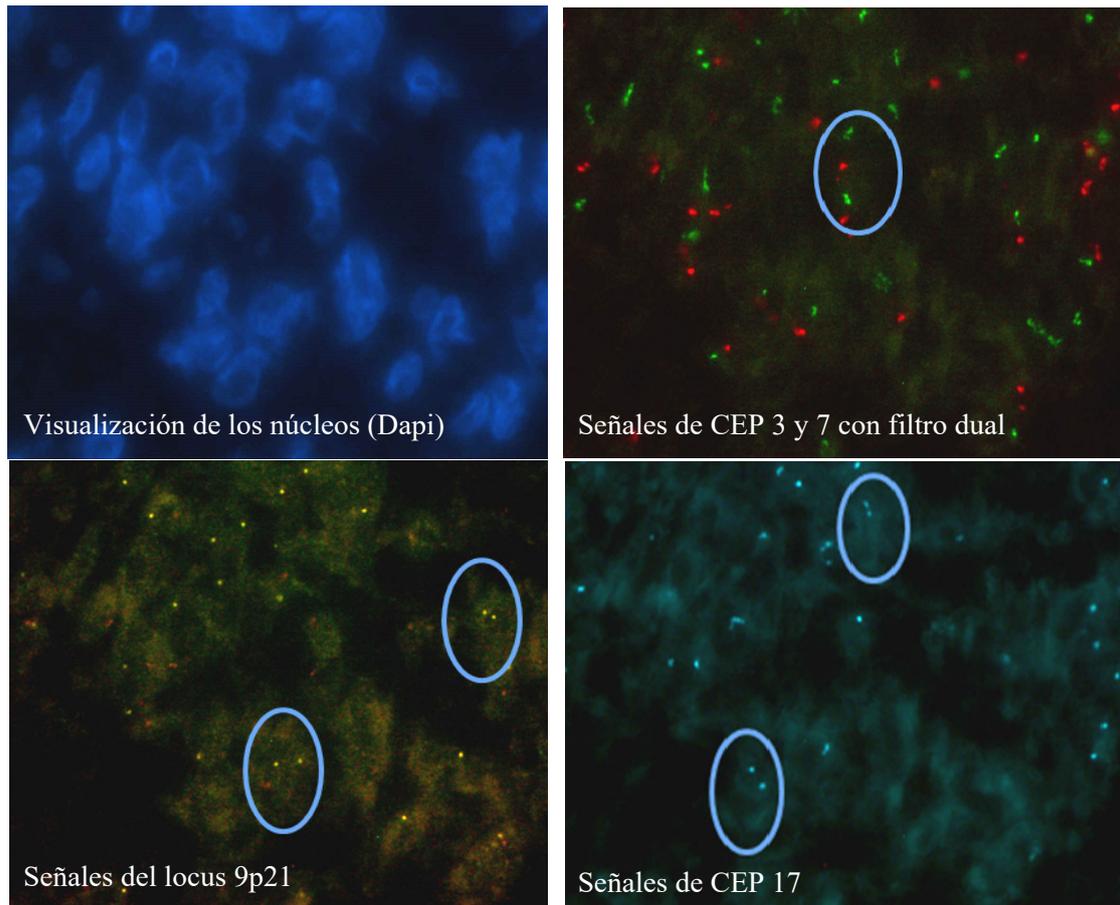


Figura 18: Visualización en el microscopio de inmunofluorescencia

3.5.2 ARRAY DE POLIMORFISMOS DE ÚNICO NUCLEÓTIDO (SNP)

Realizamos en 7 casos (3 LMA y 4 LMS; 3 de bajo grado y uno de alto grado con delección de p16) un estudio de variaciones genéticas a lo largo del genoma por tratarse de casos de diagnóstico complejo con suficiente material almacenado y buena calidad de ADN. Usamos un sistema de genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que cubre 299.140 marcadores del genoma.

El objetivo fue la detección de cambios en el número de copias genéticas, pérdidas y ganancias y de frecuencia de alelos de dichos marcadores. Este trabajo se realizó en colaboración con la Unidad de Genotipado y Diagnóstico Genético del INCLIVA. Seleccionamos los bloques de parafina con mayor cantidad de material y más representativos de la lesión.

Extracción de ADN.

Cortamos 5 secciones de 10 μm teniendo en cuenta que se necesita un mínimo de 60% de celularidad tumoral para obtener resultados.

Para realizar la extracción de DNA se añadieron 500 µL de P-Buffer en cada uno de los tubos con las muestras correspondientes. Agitamos con un vortex 15'' para una correcta homogeneización. Seguidamente se incubaron las muestras a 90°C durante 15 minutos en un baño para eliminar la parafina. A continuación se incubaron las muestras a 56°C.

Se añadieron 12,5 µL de solución de proteinasa K y se prosiguió con la digestión del tejido a 56°C durante toda la noche en un baño con agitación.

Una vez digeridos *overnight* se centrifugaron las muestras a 13000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos.

Se añadieron dos volúmenes de etanol al 100% y 0,1 volúmenes de NaAc 3M a la solución de digestión y se dejó el ADN precipitar toda la noche a -20°C. Seguidamente, se centrifugaron los tubos a 13000 rpm 30' minutos y seguidamente se eliminó el sobrenadante. Se realizó un lavado de la muestra con 500 µL de etanol al 70%. Se centrifugaron las muestras a 13000rpm 15', y se eliminó el sobrenadante. Para finalizar se diluyó el ADN con agua destilada o Milli-Q.

La concentración de ADN se midió utilizando un espectrofotómetro NanoDrop.

Realizamos el protocolo Infinium HD Assay Ultra de Illumina siguiendo el protocolo del fabricante (<http://www.illumina.com>):

Cuantificación de ADN mediante PicoGreen.

Cuantificamos el ADN de doble cadena con el reactivo Quant-iT™ PicoGreen® (Invitrogen) que permite cuantificar a partir de 25 pg / ml de ADN de doble cadena (50 pg de ADN bicatenario en un volumen de ensayo 2 ml) con un espectrofluorómetro y longitudes de onda de excitación y emisión de fluoresceína. Realizamos una curva standard con un ADN control y luego extrapolamos las concentraciones de las muestras de esa curva.

Para realizar el estudio fueron necesarios al menos 200ng de ADN por muestra.

Control de calidad del ADN extraído

Antes de amplificar el ADN extraído, evaluamos su calidad. En primer lugar se preparó el control positivo QC Template Reagent (Illumina) (QCT) a 1ng/ µl (5 µl de QCT + 495 µl de Agua (GIBCO) y diluimos el ADN de las muestras a una concentración de 1ng/µL con TE1X (Sigma). Se preparó una mezcla de 5µl 2x qPCR Master Mix+ 1µl QC Primer Reagent (Illumina) (QCP) (cebadores)+ 2µl DiH2O. Se dispensaron 8 µl de la mezcla en cada pocillo y se centrifuga a 280xg. Seguidamente se añadieron 2 µl de la dilución de las muestras (1ng/ µl) y del QCT diluido y se volvió a centrifugar.

A continuación y una vez realizado el MIX de PCR se introdujo la placa en el equipo que realiza la PCR cuantitativa (Lightcycler 480 de Roche).

Realizamos los siguientes ciclos a 95°C durante 3 minutos, 95°C 30 segundos, 57°C 30 segundos y 72°C 30 segundos, realizando estos 3 últimos pasos 40 veces.

Tras esto, analizamos los datos con el método 2nd Derivate Max de Roche, que calculó el promedio de Cp (ciclo en el que se empieza a diferenciar el ruido de la amplificación) para cada muestra y los QCT en una columna. Se calculó la diferencia en Cp entre las muestras y los QCT (ΔC_p). Sólo en aquellas muestras que tuvieron una $\Delta C_p < 5$.

Se realizó el genotipado de las muestras con HD FFPE de Infinium (Illumina):

Restore FFPE:

Se realizó una amplificación con 4-8 μ l de la muestra y se dispensaron 4 μ l de NaOH 0.1N a cada una, y posteriormente se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se añaden 34 μ l de Primer Pre Restore Reagent (Illumina) (PPR) y 38 μ l de AMR a cada muestra, y luego, se incubaron a 37 °C durante 1 hora.

Se añadieron 5 volúmenes de Zymo DNA Binding Buffer (Zymo purification kit, realizado siguiendo las indicaciones del fabricante) a cada muestra (~400 μ l), se centrifugaron 30 segundos a 10.000 g y se descartó el sobrenadante.

Después, se añadieron 200 μ l de DNA Wash Buffer a la columna y se centrifugaron 30 segundos a 10.000 xg descartando el sobrenadante.

Repetimos el paso anterior. Se añadieron 13 μ l de Elution Restore Buffer Reagent (Illumina) (ERB) directamente sobre el filtro, y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron 30 segundos a 10.000 g y se recuperó el sobrenadante. Se continuó, incubando 2 minutos a 95°C y seguidamente a 4°C durante 5 min.

Tras este último paso, se añadió 10 μ l de Convert Master Mix (Illumina) (CMM) a cada muestra, se dio un vortex 1 minutos y se centrifugó 280 xg 1min. Seguidamente, se incubaron a 37 °C 1 hora, se centrifugaron a 280 xg 1min. Se añadieron 5 volúmenes de Zymo DNA Binding Buffer a cada muestra (100 μ l) se pasaron a una nueva columna. Se centrifugaron las muestras 30 seg. 10.000 xg y se descartó el sobrenadante, se añadieron 200 μ l de DNA Wash Buffer a la columna y se centrifugaron 30 segundos a 10.000 xg descartando el sobrenadante. Repetimos este último paso.

Finalmente, se añadieron 10 μ l de agua directamente sobre el filtro, se incubaron las muestras durante 5 min. a temperatura ambiente, se centrifugaron 30 segundos a 10.000 xg y se recuperó el sobrenadante, donde eluye el DNA de interés. Este DNA es el que utilizaremos para empezar el protocolo de los HumanCytoSNP-12 DNA BeadChips.

Amplificación e incubación de ADN

Las muestras de ADN se desnaturalizaron y neutralizaron para iniciar la amplificación.

Se agregaron 200 ng de los ADNs a estudiar. A continuación, se añadieron 0,1N NaOH para desnaturalizar el ADN y el reactivo RPM (Illumina) para neutralizarlo. Añadiendo finalmente Multi-Sample Amplification Master Mix (Illumina) (MSM).

Se dispensan 20 µl MA1 (Illumina) en los pocillos de la placa MSA5 que contienen las muestras. Se volvieron a añadir 0,4 µl de 0,1N NaOH en cada pocillo y se selló.

Después, se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se dispensaron 68 µl de RPM en cada pocillo de la placa MSA5 con las muestras y se añadieron 75 µl de MSM en ellos, y se sellaron.

El ADN desnaturalizado (en la placa MSA5) se amplificó isotérmicamente en un paso que dura toda la noche (20-24 horas a 37°C). Todo el genoma se amplifica uniformemente, aumentando la cantidad de ADN para poder realizar el Infinium HD Assay Ultra (Illumina).

La fragmentación del ADN amplificado se realizó gracias a procesos enzimáticos controlados, evitando con ciertos mecanismos el exceso de fragmentación.

Se añaden 50 µl del reactivo FMS (Illumina) a cada muestra y se colocó la placa sellada a 37°C 1h.

Seguidamente se añadió 100 µl del reactivo PM1 (Illumina) a la placa MSA5 y se selló. Se incubó a 37°C durante 5 min. Tras esto, se centrifugó a 280xg a 22°C durante 1 min. Se añadieron 300 µl de 2-propanol al 100% en cada muestra. Se selló con una nueva tapa, y se mezcló bien, y se incubó a 4°C durante 30 min. Se centrifugó a 3000xg a 4°C durante 20 minutos, se eliminó la placa, y se decantó el sobrenadante dando la vuelta rápidamente a la placa MSA5 sobre un papel absorbente, eliminando los restos de líquido. Después se dejó durante 1 h. a temperatura ambiente para el secado del pellet.

Una vez secado el pellet se resuspendió el ADN en 30 µl de buffer de hibridación (RA1).

Se taparon las muestras con un film de aluminio sellado con calor. Incubando durante 1 hora a 48°C.

Hibridación en un BeadChip (Illumina)

Se utilizó un BeadChip para la hibridación del ADN resuspendido en el paso anterior. En la superficie del chip se encontraban dispuestas las microesferas de sílice (beads) con los oligonucleótidos pre-sintetizados adheridos, específicos de locus de cada SNP a estudiar (50Mer, secuencia génica específica de 50 bases) que actuaban como primers/sondas que se unen de manera complementaria al ADN de la muestra, hibridándose así al chip (figura 19). Se cargó cada una de las muestras en su sección correspondiente en el chip. Se incubaron toda la noche a 48°C para la hibridación del ADN en estudio con los oligos específicos de locus.

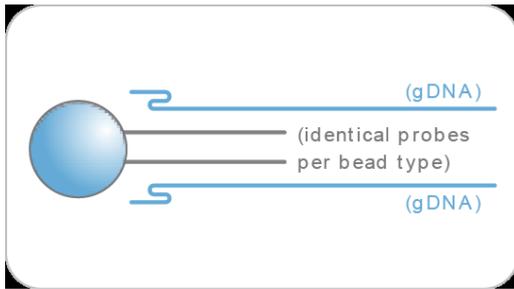


Figura 19: Hibridación del ADN en el BeadChip

Se colocó la placa resuspendida MSA5 a 95°C durante 20 minutos para desnaturalizar las muestras y durante esos 20 minutos, se preparó la cámara de hibridación añadiendo 400µl de PB2 (Illumina) en el reservorio para humidificar y atemperar a T ambiente.

La placa MSA5 se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos, y se centrifugó a 280xg. Tras este paso, se retiró el papel de aluminio. Se cargaron 15 µl de cada muestra de ADN en la sección seleccionada para dichas muestras.

A continuación se incubaron los chips 16 a 24 horas a 48°C.

El ADN que no hibridó o no lo hizo de manera específica fue eliminado por lavados manuales en un baño de agua circulante a 44°C, y el BeadChip se preparó para su tinción y extensión.

Se realizaron dos lavados de los chips con el buffer PB1 (Illumina). Luego, se ensamblaron los chips de tal manera que se formará un reservorio en un extremo para el agregar los reactivos del siguiente paso.

A continuación se realizó la extensión, donde se incorporaron nucleótidos marcados con fluoróforos a partir del primer hibridado al DNA (figura 20).

Tras la hibridación, el reactivo RA1 (Illumina) se utilizó para lavar la muestra de ADN no hibridada o que hibridaron de forma no específica, añadiéndose 150µl de RA1 y dejando incubar 30 segundos, este paso se repitió 5 veces. Se añadieron 450µl de reactivo XC1 (Illumina) y 450µl de reactivo XC2 (Illumina) para acondicionar la superficie del BeadChip para la extensión y tras cada uno se dejó incubar durante 10 minutos. Después, se añadieron 200µl de reactivo TEM (Illumina) y se dejó incubar durante 15 minutos, este reactivo se dispensó en las cámaras de flujo para realizar la extensión de una sola base de los cebadores hibridados con ADN en el BeadChip. Esta reacción incorpora nucleótidos marcados en los cebadores extendidos. Se añadieron 450µl de 95% formamida / 1 mM EDTA, y se dejó incubar un minuto, para eliminar el ADN hibridado. Después se neutralizó utilizando 450µl de XC3 (Illumina), se incubó 1 minuto y se repitió este paso otra vez. Todos los pasos descriptos se realizan en un baño de agua circulante a 44°C.

Tras este último paso, los cebadores extendidos pasaron por un proceso de tinción de múltiples capas en el bastidor de la cámara. A continuación, se añadieron 450µl de XC3, se incubaron

durante 1 minuto y se repitió este paso otra vez. Al pasar 5 minutos se añadieron 250µl de ATM y se dejaron incubar durante 10 minutos. Después se añadieron 450µl de XC3, incubando durante 1 minuto y se repitió este paso otra vez.

Se esperaron 5 minutos, y se añadieron 250µl de STM, incubando 10 minutos. Se añadieron 450µl de XC3, incubando 1 minuto y se repitió este paso cuatro veces más.

A continuación, las cámaras de flujo se desmontaron. Los BeadChips se lavaron en el reactivo PB1, y luego se recubrieron con reactivo XC4 y se dejaron secar. Se añadieron 250µl de STM y se incubaron durante 10 minutos. Finalmente, se dejó secar una hora a temperatura ambiente a 508 mm Hg en un desecador de vacío.

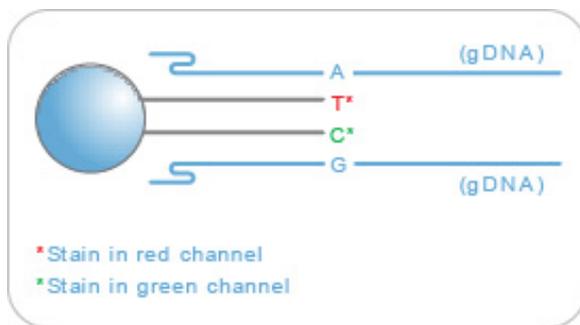


Figura 20: Extensión y tinción

Usando el equipo HiScanSQ de Illumina (HumanCytoSNP-12 DNA Analysis BeadChip de Illumina Inc, San Diego (CA)), se procedió a excitar mediante láser a los fluoróforos presentes en las bases únicas de los SNPs testeados en los BeadChips, para realizar un escaneado de la fluorescencia emitida por éstos, obteniendo las imágenes digitalizadas de las luces emitidas por estos fluoróforos (figura 21).

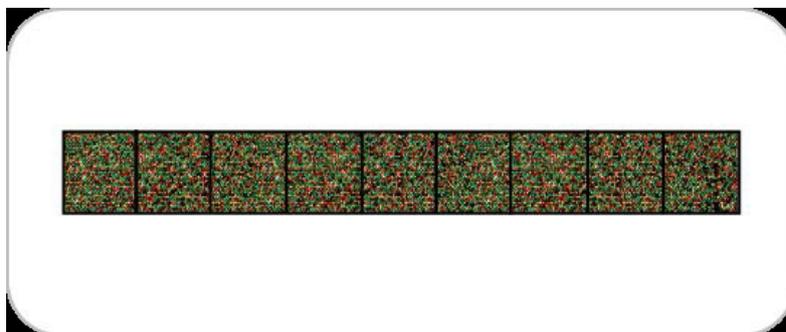


Figura 21: Resultado del BeadChip tras el proceso

Los datos obtenidos se analizaron en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Patología de la Universidad de Valencia, bajo la dirección de la Dra. Rosa Noguera Salvá. Se utilizaron 3 softwares, GenomeStudio (Illumina), Karyostudio (Illumina) y UCSC genome browser (UCSC Genome Bioinformatics) para el análisis y visualización de los resultados obtenidos de forma gráfica. Los 2 primeros son específicos para utilizar con Infinium (Illumina).

El software de análisis de datos GenomeStudio (www.illumina.com) nos permitió visualizar y analizar los datos representando los resultados con puntos de color (rojo = AA, púrpura = AB, azul = BB). Este software permite la normalización y agrupación de datos, para poder interpretar los resultados obtenidos, visualizando pérdidas de heterocigosidad (LOH), ganancias y pérdidas segmentarias, amplificaciones, variación en el número de copias.

KaryoStudio es una aplicación de software independiente del software GenomeStudio de Illumina que realiza también automáticamente la normalización y análisis de datos de alteraciones cromosómicas (www.support.illumina.com), utilizando también puntos para la representación de los datos (figura 22), y generando posteriormente informes para la interpretación de estos resultados. Está orientado hacia la búsqueda de las alteraciones a partir de 75kb y realiza pruebas cruzadas de los cambios cromosómicos encontradas con información de bases de datos públicas.

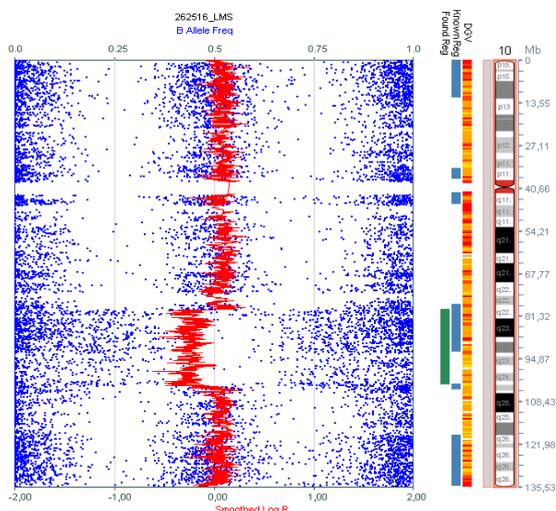


Figura 22: Representación de datos obtenidos con KaryoStudio (Illumina)

UCSC Genome Browser es un navegador on-line del genoma de la Universidad de California, Santa Cruz (UCSC). Nos ofreció el acceso a numerosos datos del genoma, no solo humano, también de otras especies, resultando una herramienta interactiva, para el análisis y visualización de datos (www.genome.ucsc.edu).

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron utilizando el paquete informático SPSS versión 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

1. Análisis Univariante. Estadística descriptiva

El primer paso para el estudio estadístico fue el análisis, en forma descriptiva, de las variables. Para las continuas (numéricas), se trabajó con la media, mediana, desviación estándar, junto con su valor máximo y mínimo. Las categóricas se trataron con las frecuencias, tanto absolutas como relativas, y con diagramas de barras y sectores.

2. Estadística Bivariante. Estadística inferencial

Para realizar el estudio bivalente, llevamos a cabo dos tipos de pruebas: las denominadas “**pruebas paramétricas**”, en las que la población estudiada sigue una distribución normal, y las “**pruebas no paramétricas**”, que no son aplicables cuando la población que se desea analizar es demasiado pequeña, o la información disponible es insuficiente para comprobar la hipótesis de normalidad. Las pruebas estadísticas aplicadas dependen del tipo y distribución estadística de la variable, tamaño de la muestra implicada y distribución de los casos en la correspondiente tabla de contingencia. En concreto, se utilizaron las siguientes pruebas:

-Prueba χ^2 de independencia, test exacto de Fisher y v de Cramer Se utilizó como prueba de asociación o dependencia entre dos variables categóricas. Realizamos para las tablas 2x2 en el estudio comparando 2 grupos frente a una variable con 2 categorías el χ^2 de independencia siempre y cuando en todas las casillas hubiese al menos 5 casos, si esto no se cumplía tomamos el p valor del test exacto de Fisher. En las tablas comparando todos los grupos, o más de 2 grupos, tomamos el p valor de la v de Cramer.

Realizamos el estudio por un lado de todos los grupos y posteriormente, 2 a 2 entre el grupo de LMS y los distintos grupos tumorales (LMU, LMC y LME), siendo el número de casos más homogéneo (en el grupo de LMU se tomaron 16 muestras de forma aleatoria para cada estudio). Además se realizó de 2 formas, la primera separando en 2 grupos los resultados de cada variable según su estado, positivo/negativo en el caso de las técnicas inmunohistoquímicas, y alterado/no alterado en el caso de la citogenética; y en segundo lugar por rangos en las técnicas inmunohistoquímicas.

-Análisis de la progresión libre de enfermedad y supervivencia global (SG) mediante el método de supervivencia de Kaplan-Meier. Permite estudiar el comportamiento de la supervivencia. Esta metodología permite contrastar si los diferentes niveles de un determinado factor producen o no curvas de supervivencia significativamente distinta utilizando el test del logaritmo del rango. La elección de esta prueba concreta está fundamentada en un elevado número de casos censurados (libres de enfermedad o vivos). La variable “Intervalo libre de enfermedad (ILE)” está definida como el tiempo total, expresado en meses, que transcurren desde el diagnóstico del tumor hasta que el paciente presenta un evento de recurrencia (ILR) o metástasis a distancia (ILM), o hasta el último control del seguimiento en que constata que el paciente permanece vivo; siendo también analizada la “supervivencia global” que es el tiempo total en meses hasta que se fallece a causa de la enfermedad estudiada. La curva de supervivencia representa la posibilidad de que un paciente permanezca libre de enfermedad un determinado tiempo tras el diagnóstico. El objetivo es obtener, mediante probabilidades condicionadas, una descripción más precisa de la evolución de la progresión de la enfermedad a lo largo del tiempo. La particularidad del método de Kaplan-Meier frente a otras técnicas de cálculo de supervivencia es que las probabilidades se calculan en los instantes concretos de tiempo en que los pacientes recaen, metastatizan o fallecen, si hablamos de supervivencia global. El estudio global de supervivencia y el intervalo libre de enfermedad se realizó de 2 formas, la primera separando en 2 grupos los resultados de cada variable según su estado, positivo/negativo en el caso de las técnicas inmunohistoquímicas, y alterado/no alterado en el caso de la citogenética; y en segundo lugar por rangos en las técnicas inmunohistoquímicas. Este estudio se realizó únicamente en el grupo de los leiomiomas.

-El nivel de significatividad empleado en todos los análisis es el habitual del 5% ($\alpha=0,05$). Cualquier valor de probabilidad **inferior a 0,05** es indicativo de una relación estadísticamente significativa, muy significativo $p<0,01$ y altamente significativo $p<0,005$; contrariamente no es significativo una p **superior a 0,05**.

3.7 ARBOL DE CLASIFICACIÓN PARA AYUDA AL DIAGNÓSTICO

Con el objetivo de analizar de forma conjunta qué aportación al diagnóstico pueden hacer los distintos parámetros estudiados, se implementó un análisis de clasificación multivariante mediante el software WEKA (Waikato Environment for Knowledge Analysis) [291, 292], una herramienta que permite el análisis masivo de datos mediante los algoritmos de clasificación más relevantes, principalmente los provenientes del aprendizaje automático (“Machine Learning Algorithms”) (<http://www.cs.waikato.ac.nz/ml/index.html>). Para ello, se utilizó el algoritmo de clasificación J48 [293].

El J48 es un algoritmo de clasificación para variables cualitativas que construye un árbol de toma de decisión según la información que aporta la variable (<http://docs.ochem.eu>) Los árboles de decisión son un modelo de clasificación utilizado en la inteligencia artificial, cuya principal característica es su aporte visual a la toma de decisiones El árbol intenta dividir el conjunto de datos en subconjuntos como resultado de la elección de una variable para dividir los datos. El árbol se inicia eligiendo una variable de prueba (nodo raíz), y posteriormente se divide el conjunto en 2 o más subconjuntos, para cada división se genera un nuevo nodo (con una nueva variable), y así sucesivamente. Cuando en el nodo existen únicamente objetos con un mismo grupo (en nuestro caso, de un mismo diagnóstico), se termina el árbol (hoja).

El primer paso de los algoritmos de “machine learning” consiste en utilizar un set de muestras modélico de los grupos que queremos distinguir, denominado "training set", que es con el que el modelo va a aprender a reconocer los distintos grupos que pretendemos clasificar, sabiendo en todo momento a qué grupo corresponde cada muestra.

Incluimos una matriz de datos con tantas columnas como muestras y tantas filas como variables (parámetros medidos), le indicamos al modelo qué muestras pertenecen a qué grupo real conocido del set de muestras modélico. De modo que el algoritmo conoce el diagnóstico anatomopatológico de cada muestra, las agrupa y compara con el resto de grupos aprendiendo a distinguirlas. El modelo se testa a sí mismo dejando fuera a muestras conocidas del entrenamiento, como si no conociera a la clase a la que pertenecen, y valorando su capacidad de acierto al testarlas de forma ciega. A esta forma de validación interna del modelo se le denomina "crossvalidation" y con ella la aplicación calcula la probabilidad de acierto y error evaluando la sensibilidad y especificidad del modelo para la variabilidad real de nuestros datos.

El J48 aprende la variabilidad del set de entrenamiento y construye un árbol de toma de decisión que tiene una probabilidad de acierto y de error para predecir la clase a la que pertenece una muestra nueva desconocida, es por ello que estos algoritmos son muy valiosos a la hora de poder ser aplicados en el diagnóstico clínico [293].

Este algoritmo construye un árbol a partir de datos. Se construye al ir agregando nodos o ramas que minimicen la diferencia entre los datos. Con el propósito de clasificación, J48 prueba cada

uno de las variables hasta que encuentra una hoja, intentando clasificar correctamente los casos restantes.

El training set va a servir de modelo para intentar distinguir entre dos clases: LMS (LS n=16) y LM (nonLS, n=21).

El conjunto de datos seleccionado contiene 19 variables incluyendo variables clínicas; como la sintomatología, la medida del tumor (medida), la edad al diagnóstico (intervalos), y la presencia de la menopausia (presenciamenop); variables histopatológicas como el número de mitosis (Nmitos); y variables inmunohistoquímicas, como el rango de positividad frente a ki67 (KI67R), Bcl-2 (BCL2R), p53 (P53R), p16 (P16R), p21 (P21R), p27, c-Kit (CKITR), snail (SNAILR), β catenina (BCATR), AKT (AKTR), RREE (RRESTRR) y RRPP (PROGR), así como la intensidad de p21 (P21I) y p27 (P27I).

Para balancear las dos clases, realizamos 3 modelos a partir de 37 muestras, entre las que se incluyeron 16 LMS y 21 LM, tomando para este grupo 7 LMU, 7 LMC y 7 LME en muestras aleatorias para cada modelo evitando así el desbalanceo de los datos y manteniendo la proporción equitativa de los tres subgrupos que engloba nonLS.

Se obtuvo un resumen del modelo generado por el algoritmo J48 que contenía:

- Árbol generado con las variables utilizadas por el modelo y el número de muestras asociadas a cada hoja.
- Estadísticas de la cross-validación con 10 interacciones (aciertos, errores, y parámetros).
- Matriz de confusión con la clase predicha en las columnas y la clase real en las filas.

3.8 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

En la recogida de material

La búsqueda inicial para decidir la inclusión de los casos en el estudio se realizó con el programa informático Patwin (versión 3). La inclusión se limitó a los resultados informatizados, y posteriormente se realizó una búsqueda manual en los archivos antiguos clínicos y anatomopatológicos.

Algunos casos se excluyeron por no localizar de muestras en el banco de bloques tumorales incluidos en parafina y no ser concluyentes los hallazgos en el material restante, o por la duda razonable en el diagnóstico ante los criterios histopatológicos actuales.

Otro motivo de exclusión fue, teniendo en cuenta que muchos de los casos elegidos tenían más de 5 años de archivo, se encontraron bloques rotos, pérdidas de sustancia, etc.

La fijación inicial de las muestras es importante para estudios posteriores, para evitar problemas por exceso de fijación, o por falta de la misma, así como por excesivo calor en la elaboración del bloque de parafina o prolongado almacenamiento de cortes de parafina. se comprobó el estado de todas las muestras recogidas.

La toma de muestras representativas de tumor es crucial para un estadiaje y un diagnóstico correcto [294]. Tendremos en cuenta que hubo muestras parciales (legrados y metástasis) sin tejido representativo de tumor principal.

En determinados casos, la antigüedad de las historias, no digitalizadas, ha conllevado que algunos datos se pierdan, y que haya sido difícil de seguir la sucesión de los hechos debido a la falta de datos.

En el estudio IHQ

Como todas las tinciones inmunohistoquímicas se efectúan en secciones procedentes de tumores incluidos en parafina se debe tener en cuenta algunas circunstancias que pueden alterar el resultado dando lugar a un falso negativo. Los problemas más frecuentes pueden ser debidos a:

- Biopsias endoscópicas de tamaño pequeño en que el tejido es muy limitado y se produce difusión de la inmunotinción o mala distribución del anticuerpo.
- Exceso o falta de fijación.
- Posibles reacciones cruzadas, con falsa positividad, debido a acúmulos de proteínas.
- Falsos negativos por recuperación antigénica inadecuada

En el estudio citogenético

En el estudio con FISH, al ser realizado en muestras incluidas en parafina se debe tener en cuenta el tamaño y morfología celular y los distintos tipos de imágenes que podemos obtener en relación a la dirección de la sección.

Así mismo hay que considerar que la densidad celular dependiendo de los tejidos tumorales puede generar frecuente solapamiento celular, con núcleos aparentemente más irregulares, pseudolobulares y/o elípticos.

En la visualización de señales fluorescentes de las regiones cromosómicas concretas, los tamaños diferentes y con variaciones individuales (zonas pericentroméricas con versátil cantidad de heterocromatina) y la dificultad de observación dependiendo de los distintos fluorocromos empleados, han de ser considerados. Por ejemplo el centrómero del cromosoma 3 visualizado con CEP 3 es mucho más grande y variable que los centrómeros de los cromosomas 7 y 17; y todos ellos son mucho más grandes que el locus específico 9p21. Además, el color rojo es más fácilmente visible frente al amarillo y el verde.

Por otro lado, en la realización de SNP, la calidad y la cantidad de ADN en muestras antigua, a veces hiperfijadas, puede no ser óptimo para la obtención de resultados.

En el estudio estadístico

Las limitaciones son las propias de estos estudios y están relacionadas con:

- La elaboración de los niveles de corte (cut-off) para una correcta interpretación de los hallazgos.
- La coherencia práctica de los hallazgos matemáticos. Hay que tener en cuenta que la escasez de casos en alguno de los grupos, puede llevar a resultados “falsamente” significativos.
- La coherencia en los estudios a la hora de poner en relación dos o más variables.

4. RESULTADOS

"No todo lo que cuenta puede ser cuantificado, y no todo lo que puede ser cuantificado cuenta". Albert Einstein

4.1 HALLAZGOS CLÍNICO PATOLÓGICOS

El estudio incluye un total de 89 casos diagnosticados entre 1985 y 2010, pertenecientes al HCUV.

Se trata de una **serie retrospectiva** de tumores mesenquimales de músculo liso uterinos reevaluados por 2 patólogos expertos (NS y SN). La serie está compuesta por un total de 60 LM, incluyendo 30 LMU y 30 LM con alguna característica especial: incluyendo 16 LMC y un grupo de 14 LME en el que se agruparon 5 LM plexiformes, 5 LMA, 2 LM mitóticamente activos, 1 LM epitelioides, y 1 LM con patrón vascular; y 16 LMS (4 de bajo grado y 12 de alto grado); así como 13 miometriosis control.

Se procede a comparar algunos hallazgos clínicos y anatomopatológicos para observar las diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio.

Además realizamos un estudio paralelo, 2 a 2, entre el grupo de LMS frente a los distintos grupos tumorales (LMU, LMC y LME), para evitar el sesgo del número de casos y valorar la significación de los resultados.

Los tumores benignos se localizaron en el útero, mientras que en el grupo de los tumores malignos, 14 correspondían a lesiones intrauterinas, y 2 de las lesiones resultaron metástasis locoregionales en el momento del diagnóstico (peritoneales) de LMS uterinos, ambos de alto grado.

EDAD:

Los LMS se presentaron en edades más avanzadas respecto a todos los grupos de LM, predominantemente en pacientes peri o post-menopáusicas, aunque hasta un 37,5% de casos estuvieron por debajo de los 51 años. En los grupos de LM, los LMU se presentaron en mujeres de mayor edad respecto a los LMC y LME, observándose una mediana de edad en los LMU de 48 años, y en los LMC y LME una mediana de edad de 42,5 y 44 años respectivamente.

Los LMS presentaron una mediana de edad de 56,5 años, y únicamente un caso se encontraba por debajo de los 40 años de edad (39 años) (tabla 15).

Tabla 15 Resumen de los datos descriptivos de la edad al diagnóstico en todos los grupos.

	Media	Mediana	Desv.Estandar	Mín	Max
UC	60,92	62	11,071	42	81
LMU	50,67	48	14,387	31	78
LMC	41,75	42,50	12,71	28	81
LME	42,29	44	9,965	22	55
LMS	58,81	56,5	14,721	39	81

UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

Comparamos la distribución de la edad de presentación entre los grupos tumorales (figura 23). Se observó que el 13,3% de los LMU (4 casos), el 37,5% de los LMC (6 casos) y el 21,4% de los LME (3 casos) presentaban una edad al diagnóstico por debajo de los 36 años. En este rango de edad no se encontró ningún caso de LMS. En el rango de edad entre los 36 y los 50 años de edad, se encontraban el 43,3% de los LMU (13 casos), el 50% de los LMC (8 casos) y el 64,3% de los LME (9 casos), siendo el rango de edad más frecuente para el conjunto de estos tumores benignos. Además, en este rango de edad se encontraron el 37,5% de los LMS (6 casos). Entre los 51 y los 65 años, ya entrando en la edad media de la menopausia, se encontraron el 16,7% de los LMU (5 casos), el 6,3% de los LMC (1 caso) y el 14,3% de los LME (2 casos), observándose el 25% de los LMS (4 casos). En el grupo de los LMS, fue a partir de este rango de edad en el que aumentó la incidencia. Y finalmente, se observaron un 26% de casos de LMU (8 casos), un 6,3% de los LMC (1 caso) y un 40% de los LMS (6 casos) por encima de los 65 años de edad, sin observarse ningún caso de LME. Estos datos resultaron significativos ($p \approx 0,039$). La edad de presentación de los LMS estuvo por encima de los 36 años en toda nuestra serie, concretamente en nuestros casos la paciente de menor edad tenía 39 años (LMS de alto grado), seguida de una paciente de 42 años (LMS de alto grado).

Edad al diagnóstico

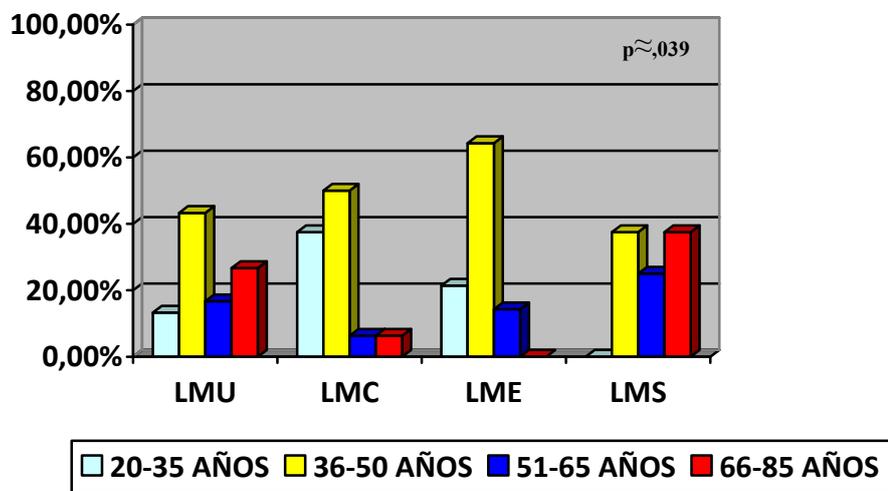


Figura 23: Diagrama de barras de grupos de edades por diagnóstico

LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

Al comparar 2 a 2 la edad al diagnóstico entre el grupo de LMS y LMU, no se observó una relación estadísticamente significativa ($p \approx 0,314$), ya que ambos grupos se distribuyeron de forma más homogénea en los distintos rangos de edad. Los LMU son el tipo de LM más frecuente, en nuestra serie se presentaron en edades más avanzadas en comparación con el resto de LM. Al realizar este estudio entre los LMS y los LMC y entre los LMS y los LME, sí encontramos una relación estadísticamente significativa, $p \approx 0,009$; y $p \approx 0,017$ respectivamente. Como podemos observar, en nuestro estudio, los LMU presentaron un 42,7% diagnosticado en mujeres por encima de los 50 años de edad. Sin embargo, los LMC y los LME, fueron diagnosticados en mujeres más jóvenes.

SINTOMATOLOGÍA

Las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron el sangrado y/ o el dolor, tanto en los LM como en el grupo de LMS. El sangrado se observó en 10 LMU (en uno de ellos asociado a dolor), en 7 LMC (en 2 de ellos asociado a dolor), en 7 LME y en 7 LMS (en 2 asociado a dolor). El dolor, se presentó como síntoma en la mitad de los casos de LMS, siendo menos frecuente en los LM. Sólo en dos de los casos de LMS fue un hallazgo casual, siendo este caso un LMS de bajo grado de 0,5cm, intervenida por prolapso uterino, y otro asintomático de 1,8 cm también de bajo grado. Sin embargo, 7 LMU, 2 LMC y 5 LME fueron asintomáticos, y 8 LMU, 1 LMC y 1 LME fueron intervenidos por clínica de prolapso uterino. La clínica de infertilidad

se observó únicamente en los tumores benignos ya que los LMS son más propios de edades más avanzadas; este síntoma se detectó en 3 LMU, 2 LMC y un LME (figura 24). Estos hallazgos clínicos presentaron una correlación estadísticamente significativa ($p \approx 0,037$) con el diagnóstico anatomopatológico.

Sintomatología

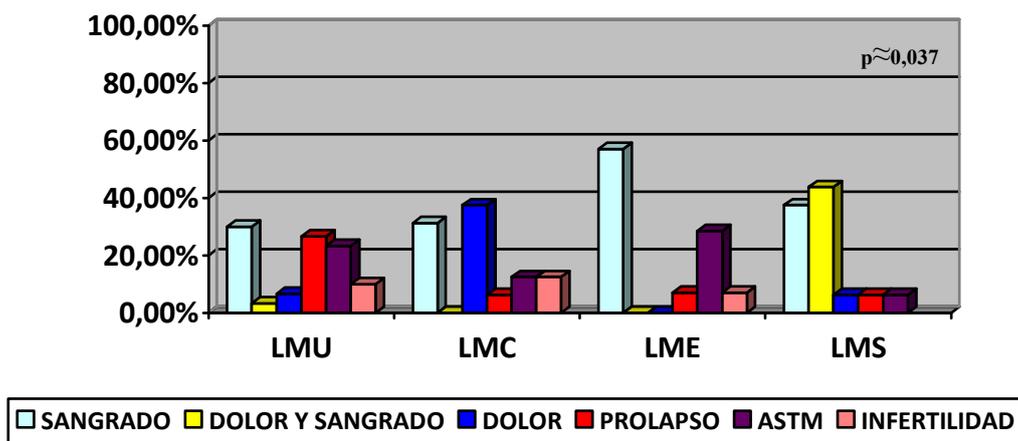


Figura 24: Diagrama de barras de la sintomatología por grupo de diagnóstico
LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

En el estudio 2 a 2, no se observó una relación estadísticamente significativa en la sintomatología de debut entre los LMS y los LMC ($p \approx 0,612$), ello debido a que en ambos grupos el sangrado en primer lugar, y el dolor, con o sin sangrado fueron los síntomas más frecuentes (en más del 60% de los casos). Sin embargo en el grupo de LME frente al de LMS, observamos una aproximación a la significación ($p \approx 0,051$) y sí que resultó significativa la relación entre la sintomatología de los LMS y los LMU ($p \approx 0,021$).

MENOPAUSIA

En el momento del diagnóstico histopatológico la gran mayoría de los tumores benignos fueron diagnosticados antes de la menopausia, en concreto, un 60% de los LMU, un 93,8% de los LMC, y un 85,7% de los LME. (figura 25). Por otro lado, el 40% de los tumores malignos se diagnosticaron en mujeres premenopáusicas, sin contar en nuestro estudio con un caso en el que no se pudo establecer este dato, teniendo la paciente al diagnóstico 53 años (perimenopausia).

La mediana de la menopausia en las pacientes en el grupo de LMS fueron los 48 años, con un máximo de 52 años.

Los casos estudiados en mujeres no menopáusicas fue de 18 (60%) en el grupo de LMU, 15 (93,8%) LMC, 12 (85,7%) LME y 6 (40%) de LMS.

Hay una relación entre la presencia de la menopausia en el momento del diagnóstico y el diagnóstico histopatológico, debido a que, los LMS son más frecuentes en mujeres de mayor edad, mientras que los LM son propios de la edad fértil, sobre todo los de características especiales (LME y LMC), con una distribución más homogénea en los distintos rangos de edad.

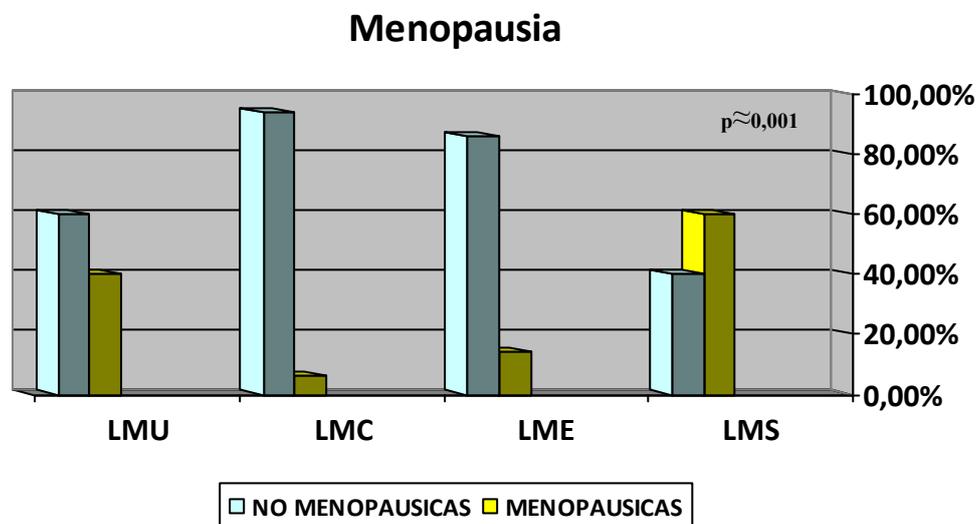


Figura 25: Diagrama de barras de la existencia de la menopausia por diagnóstico
UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiomasarcomas

Esta relación entre la presencia de menopausia y el diagnóstico, se observó tanto entre los LME y los LMS ($p \approx 0,021$) como entre los LMS y los LMC ($p \approx 0,002$). Sin embargo no obtuvimos un resultado significativo entre los LMS y los LMU ($p > 0,05$), aunque seguían siendo los tumores benignos más frecuentes en mujeres premenopáusicas.

PARIDAD

Hay que tener en cuenta que debido a que la incidencia de los LMS se encuentra en una edad avanzada, y que por lo tanto, las pacientes con este tipo de tumor ya han cumplido sus deseos genésicos, es difícilmente comparable esta variable con los grupos de LM que se suelen diagnosticar en mujeres jóvenes, muchas de ellas sin haber gestado aún en el momento del diagnóstico, y algunas de ellas con clínica de infertilidad por esta causa (·LMU, 2 LMC y 1 LME).

Se observó una relación estadísticamente significativa entre la presencia o ausencia de gestaciones previas y el diagnóstico histopatológico, sin entrar en el estudio detallado del número de gestaciones ($p \approx 0,006$) (figura 26). Todos los individuos del grupo control habían tenido al menos una gestación (100%), así como los 14 de 16 individuos estudiados del grupo de los LMS (100%). Por otra parte, el 73,3% de las pacientes del grupo de LMU, el 75% de las pacientes del grupo de los LMC y el 50% de las pacientes de los LME también habían gestado en el momento del diagnóstico histopatológico. Estas diferencias podrían explicarse por la edad al diagnóstico de las diferentes patologías, así como por la menor cantidad de casos de LMS respecto a los grupos de LM, por lo que no parece ser un dato relevante en nuestro estudio. Serían necesarias series más amplias y un estudio más exhaustivo de las diferentes variables.

La mediana de gestaciones al diagnóstico fue mayor en el grupo de LMS y el grupo control frente a los grupos de LM. Los LMS presentaron una mediana de 2,5 embarazos frente a los 2 de los LMU, los 1 de los LMC y los 1 de los LME (tabla 16).

En nuestra serie hubo 2 casos de LMS de alto grado en los que no disponíamos de este dato, por lo que no se incluyeron en este estudio.

Tabla 16: Resumen de los datos de paridad en todos los grupos

	Media	Mediana	Desv.Estandar	Mín	Max
UC	3,31	3	1,75	1	6
LMU	1,80	2	1,54	0	6
LMC	1,44	1	1,153	0	3
LME	1,64	1	1,865	0	5
LMS	2,5	2,5	1,225	1	4

UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiomas

Paridad al diagnóstico

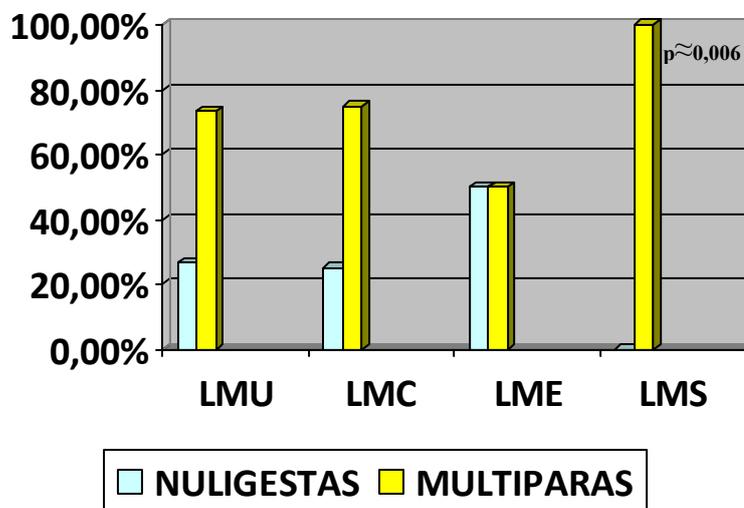


Figura 26: Diagrama de barras de la paridad en cada grupo
LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

En el estudio 2 a 2 entre los LMU y los LMS así como entre los LME y los LMS, se observó una relación estadísticamente significativa entre la paridad y el diagnóstico anatomopatológico ($p \approx 0,041$) y ($p \approx 0,003$) respectivamente, secundario a la mayor edad de presentación de los LMS. Sin embargo, no obtuvimos una relación significativa entre el grupo de LMC y los LMS ($p \approx 0,205$).

ANALÍTICA SANGUÍNEA AL DIAGNÓSTICO

Recopilamos de las historias clínicas algunos datos en las analíticas sanguíneas al diagnóstico, como los valores de hemoglobina (Hb), la presencia de leucocitosis, o la presencia de marcadores tumorales. Los hallazgos más frecuentes en todos los grupos tumorales fueron una analítica sanguínea normal, seguida de la Hb inferior a 12, y la presencia de leucocitosis, sin observarse relación estadística entre estos hallazgos y el diagnóstico anatomopatológico. Entre los casos sin alteraciones en la analítica preoperatoria tuvimos 24 LMU, 9 LMC, 10 LME, y 5LMS. Además 4 analíticas preoperatorios no se encontraron en las historias clínicas de las pacientes del grupo de los LMS. Un caso de LMC (nº6) presentó una elevación de marcadores tumorales (CEA), y un LMS (nº13) presentó un aumento de LDH. No encontramos relación estadística ni en el estudio global ni en los estudios 2 a 2.

TAMAÑO TUMORAL MÁXIMO

La mediana del tamaño tumoral fue mayor en el grupo de los LMS siendo de 7,75 cm frente a los 4,25 cm de los LMU, los 6,65 cm de los LMC y los 7,5 cm de los LME, como queda reflejado en la tabla 17.

También hay que señalar que el tamaño máximo de los LMS fue prácticamente el doble que el de los grupos de tumores benignos con 20 cm frente a 11 cm respectivamente.

Tabla 17: Resumen de los datos del tamaño tumoral máximo en todos los grupos

	Media	Mediana	Desv.Estandar	Mín	Max
LMU	4,77	4,25	2,98	0,5	11
LMC	5,63	6,65	2,19	0,7	8
LME	6,52	7,5	3,16	1,5	11
LMS	9,38	7,75	5,89	0,5	20

LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

El tamaño tumoral en el grupo de los LMS, fue mayor a 5 cm en aproximadamente el 90% de los casos. Los LME y los LMC también tuvieron unas dimensiones mayores a los LMU. (figura 27). Se observó una relación estadísticamente significativa entre el tamaño de la lesión y el diagnóstico anatomopatológico ($p \approx 0,021$).

Con un tamaño menor de 2 cm se observaron un 10% de los LMU, un 6,3% de LMC (un caso), un 7,1% de LME (un caso de LM con patrón vascular), y un 12,5% de LMS (2 casos, uno de ellos de 0,5 cm y otro de 1,5 cm ambos de bajo grado). Con un tamaño entre 2 y 5 cm se encontraron un 46,7% de los LMU, un 31,3% de LMC y un 35,7% de LME (5 casos, incluyendo, un LM epiteloide, un LM mitóticamente activo, un LMA y 2 LM plexiformes). Con un tamaño de entre más de 5 a menos de 10 cm se encontraron un 36,7% de los LMU, un 62,5% de LMC, 35,7% de LME (5 casos incluyendo, 3 LMA, un LM mitóticamente activo, y un LM plexiforme), y el 50% de LMS. Con un tamaño mayor o igual a 10 cm se encontraron en 6,7% de LMU, un 21,4% de LME (3 casos incluyendo 2 LM plexiformes y un LMA), y un 37,5% de LMS, siendo 6 casos, que incluyen un LMS de bajo grado y 5 LMS de alto grado.

Tamaño tumoral

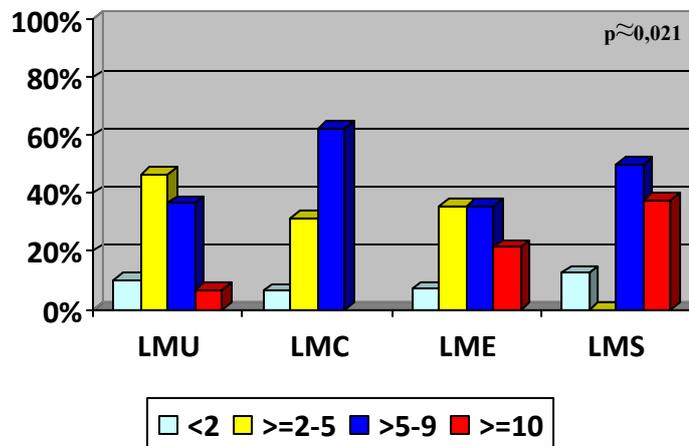


Figura 27: Diagrama de barras del tamaño tumoral por diagnóstico
 LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

En los estudios con 2 a 2, obtuvimos una relación significativa entre el tamaño tumoral y el diagnóstico anatomopatológico, tanto en el estudio entre los LMS frente a los LMU ($p \approx 0,007$), y los LMS frente a los LMC ($p \approx 0,020$); los LMS presentaban un mayor tamaño, con valores por encima de los 10 centímetros en casi el 40% de los casos. No se obtuvo esta relación al enfrentar LMS y LME ($p \approx 0,331$). Los LMS y los LME fueron lesiones de mayor tamaño frente a los LMU y LMC en nuestra serie.

MITOSIS

Los tumores benignos se caracterizaron por tener un conteo inferior a 5 mitosis en 10 CGA, exceptuando dos casos de LM mitóticamente activos que presentaron un recuento mitótico entre 6 y 10 mitosis en 10 CGA (con 8 y 7 mitosis respectivamente). Los LMS, tumores agresivos que presentan usualmente altos índices de proliferación con numerosas figuras mitóticas, presentaron en nuestra serie recuentos de mitosis superiores a los observados en los LM, apreciándose únicamente en 3 casos un recuento mitótico inferior a 6 mitosis (un LMS de alto grado con 5 mitosis, y una metástasis peritoneal con 5 mitosis) (figura 28 y 29).

Se demostró una relación estadísticamente significativa entre el recuento mitótico y el diagnóstico ($p < 0,001$). Con un recuento mitótico en 10 CGA de entre 0-5 mitosis se encontraron todos los miometrios control, todos los LMU y LMC, el 85,7% de los LME y el 12,5% de los LMS. Con un recuento mitótico entre 6-10 mitosis en 10 CGA se detectaron un 14,3% de LME (siendo los 2 casos diagnosticados de LM mitóticamente activos), y el 12,5% de los LMS. El

18,8% de los casos de LMS presentaron un recuento de entre 11-15 mitosis en 10 CGA, el 25% de los casos de entre 16-20 mitosis en 10 CGA y el 31,3% de más de 20 mitosis en 10 CGA

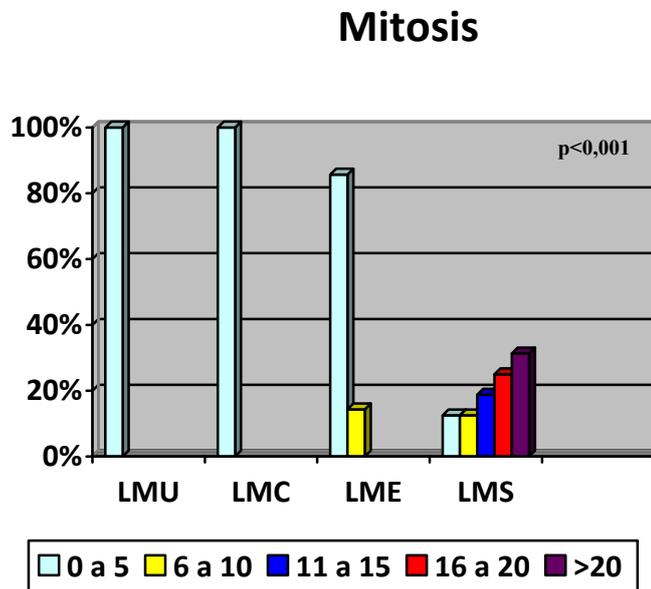


Figura 28: Diagrama de barras del número de mitosis en 10 CGA por diagnóstico
 UC: útero control LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

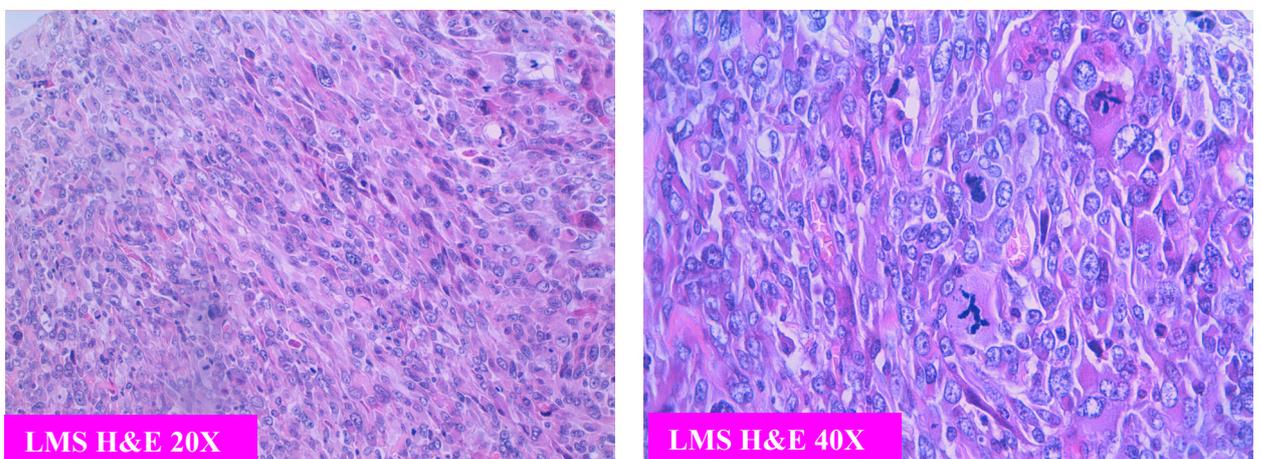


Figura 29: Imágenes de H&E de algunos de los tumores estudiados poniéndose en evidencia algunas figuras de mitosis
 LMS: leiomiosarcoma

En los estudios 2 a 2 entre grupos, observamos una relación altamente significativa en todos ellos, siendo entre LMS y LMU ($p<0,001$), entre LMS y LMC ($p<0,001$), y entre LMS y LME ($p\approx 0,001$). Esta relación, eliminando el sesgo por el número de individuos por grupo, hace

altamente significativa la relación entre el número de mitosis y el diagnóstico, observándose que un recuento por encima de 10 mitosis en 10 CGA es un dato muy sugestivo de LMS por sí mismo.

4.2 HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

En nuestra serie realizamos en los 4 grupos tumorales un panel de 23 técnicas inmunohistoquímicas para valorar las diferencias significativas entre nuestros grupos de estudio en cuanto a proliferación (ki67), apoptosis (Bcl-2 y Bax), ciclo celular (p53, ciclina D1, p16, p21 y p27), las dianas terapéuticas (c-kit, PDGFR α , IGFR1, c-erb-B2), marcadores de transición epitelio-mesénquima (e-caderina, Slug, Snail, β catenina y AKT), status hormonal (RREE y RRPP), marcadores de hipoxia y angiogénesis (CD31 y CD34), y otros marcadores como el CD44 y el OCT3/4. Agrupamos los resultados de las técnicas inmunohistoquímicas (rangos de positividad) para los grupos de LMU, LMC, LME, LMS y UC en los anexos 1 a 5 respectivamente.

El estudio estadístico se realizó de dos maneras, una inicial, comparando la expresión de cada proteína en todos los grupos respetando los rangos de positividad, y la intensidad, y en segundo lugar, un estudio por estado, dividiendo la expresión de la técnica inmunohistoquímica en positivo/ negativo, considerando negativos los casos con una positividad inferior al 11% de las células tumorales.

Además, no sólo realizamos el estudio estadístico comparando todos los grupos, sino comparando 2 a 2 entre el grupo de LMS y los distintos grupos tumorales de LM (LMU, LMC y LME), para evitar el sesgo del número de individuos por grupo.

A continuación se procede a destacar los principales resultados de los marcadores IHQ utilizados correlacionándolos con los diferentes diagnósticos de nuestro estudio

PROLIFERACIÓN

Ki67

El índice de proliferación puesto en evidencia con ki67 fue más elevado en los LMS (figura 30 y 31). Dentro de este grupo, no observamos diferencias significativas entre los de bajo y alto grado, siendo el caso con mayor expresión de ki67 un LMS de bajo grado. Los LM mitóticamente activos presentaron todos ellos un índice de proliferación próximo al 10%. El resto de los LM presentó un índice de proliferación muy bajo, inferior al 2%.

Se observó una correlación altamente significativa entre el rango de expresión de Ki67 y el diagnóstico ($p < 0,005$).

En todos los LMU, LME, y LMC, y el 18,8% de los LMS (2 de bajo grado y 1 de alto grado) presentaron un rango de ki67 entre el 0-10%. El 25% de los LMS (1 de bajo grado y 3 de alto grado) presentaron un rango de expresión entre el 11-30%. El 50% de los LMS (1 LMS de bajo grado y 7 LMS de alto grado) presentaron un rango de positividad entre el 31-75%; y un 6,3% de los LMS (1 caso de alto grado) presentaron un índice de positividad de ki67 entre el 76-100% de las células respectivamente.

Ki67

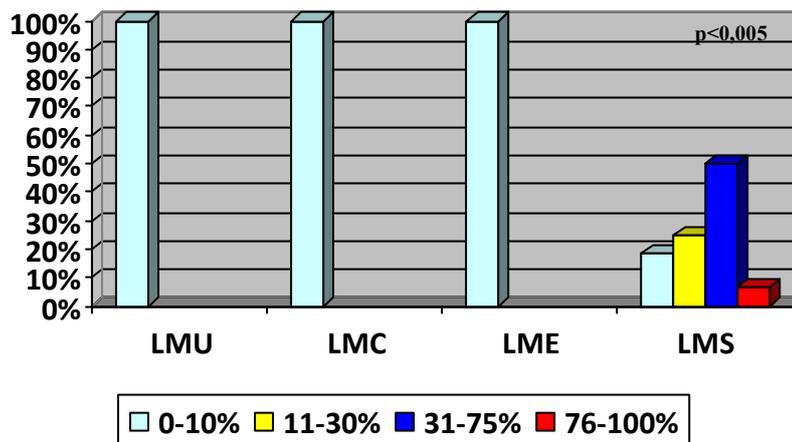


Figura 30: Diagrama de barras de los resultados del rango de ki67 por grupos
 LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

En cambio, el patrón de positividad y la intensidad de la positividad no resultaron estadísticamente significativos ($p \approx 0,277$ y $p \approx 0,095$ respectivamente), siendo en la práctica totalidad de los casos un patrón homogéneo y una intensidad moderada a fuerte.

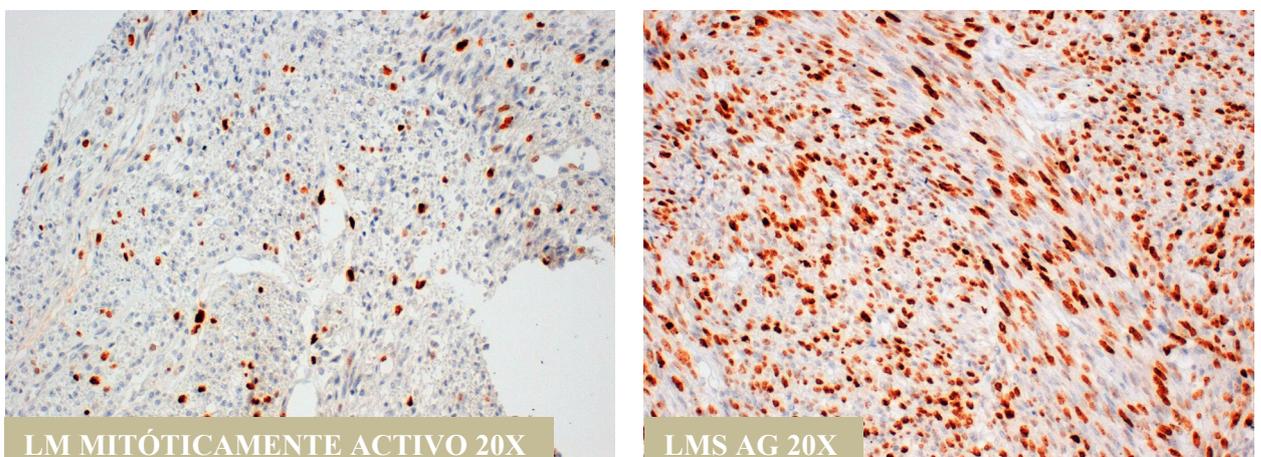


Figura 31: Imágenes de la expresión de ki67 en distintos tumores
 LMU: leiomioma, LMS: leiomiosarcoma

En los estudios 2 a 2 por rangos, comparando la expresión de ki67 entre los LMS y cualquier grupo de LM también obtuvimos resultados altamente significativos ($p < 0,001$). La positividad del ki67 en un rango por encima del 11-30%, es altamente sugestivo de un diagnóstico de LMS. Además de esto, en el estudio por estado (positivo/negativo), todos los estudios 2 a 2 entre los grupos fueron significativos ($p < 0,005$), así como el realizado de todos los grupos ($p < 0,001$).

También analizamos la relación en el grupo de los LMS entre la expresión de ki67 con otras proteínas como p53, p16, p21, p27, c-kit, y los receptores hormonales (tanto de estrógenos como de progesterona). Encontramos una relación próxima a la significación ($p \approx 0,054$) entre la expresión de ki67 y los RRPP. Así, los casos con mayor índice de proliferación perdían la expresión de RRPP con mayor frecuencia que los casos con menor índice de proliferación. Sin embargo el resto de proteínas, así como el tamaño tumoral no presentaron relación estadística con el ki67.

APOPTOSIS

Bcl-2

Los tumores mesenquimales de músculo liso tanto malignos como benignos, así como el miometrio control expresaron frecuentemente esta proteína. Sin embargo, esta positividad fue mayor en el miometrio control y en los tumores benignos en nuestra serie (figuras 32 y 33), siendo más heterogénea en los LMS. Fue excepcional una expresión por debajo del 30% de la celularidad tumoral en los grupos de LM.

La expresión de Bcl-2 tuvo una correlación altamente significativa ($p < 0,005$) entre el rango de expresión de Bcl-2 y el diagnóstico anatomopatológico. En un rango de entre el 0-10% de expresión se observó un 7,7% del miometrio control, un 31,3% de LMS (5 casos, 4 de alto grado y 1 de bajo grado). En un rango de entre el 11-30% de positividad se encontraron un 7,7% de casos control, un 3,3% de los LMU y un 25% de LMS (4 casos todos ellos de alto grado). En un rango de entre el 31-75% se encontraron un 7,7% de casos control, un 46,7% de los LMU, un 37,5% de los LMC, un 28,6% de los LME, y un 12,5% de LMS. En un rango de entre 76-100% de células positivas se encontraron un 76,9% de los casos control, un 50% de los LMU, un 62,5% de los LMC, un 71,4% de los LME, y un 31,3% de LMS.

Bcl2

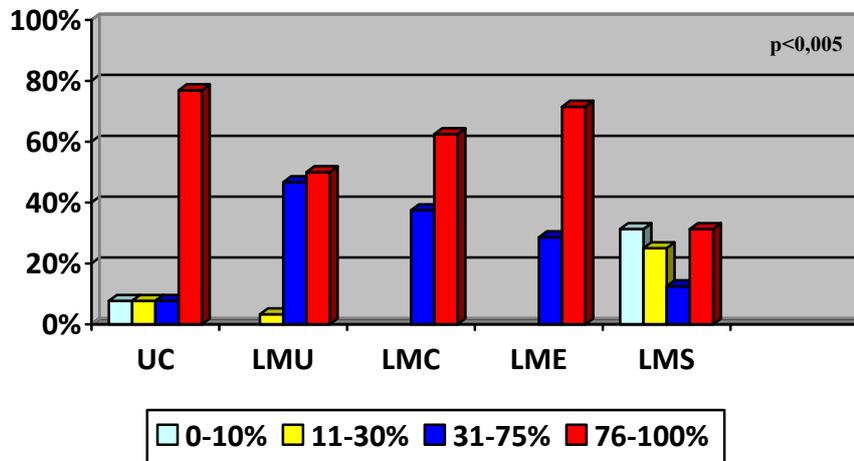


Figura 32: Diagrama de barras de los resultados del rango de Bcl-2 por grupos
 UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

Por el contrario, el patrón de positividad y la intensidad no resultaron estadísticamente significativas ($p \approx 0,329$ y $p \approx 0,207$ respectivamente), siendo un patrón homogéneo y una intensidad predominantemente moderada en todos los casos.

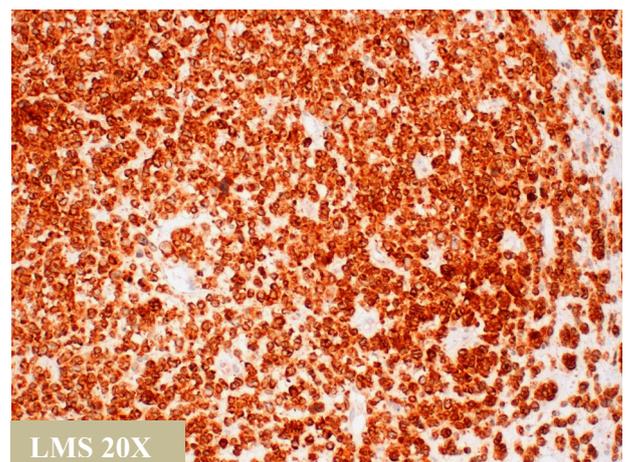
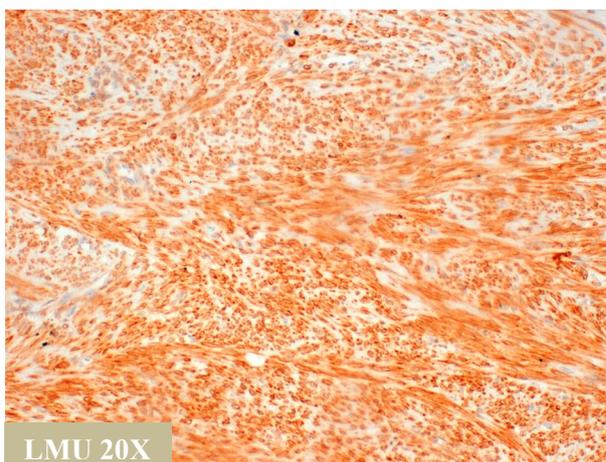


Figura 33: Imágenes de la expresión de Bcl-2 en distintos tumores
 LMU: leiomioma usual, LMS: leiomiosarcoma

También fueron significativos todos los resultados en el estudio 2 a 2, observándose en el estudio entre LMS y LMU ($p < 0,001$), entre LMS y LMC ($p \approx 0,005$), y entre LMS y LME ($p \approx 0,010$), siendo más frecuente la expresión de Bcl-2 en los grupos tumorales benignos frente al grupo de LMS.

Además, en el estudio por estado (positivo/negativo), todos los estudios 2 a 2 entre los grupos fueron significativos ($p < 0,005$), (LMS versus LMU $p \approx 0,003$, LMS versus LMC $p \approx 0,043$ y LMS versus LME $p \approx 0,045$); también de todos los grupos ($p \approx 0,001$).

Bax

La expresión IHQ de esta proteína fue elevada y homogénea, tanto en el miometrio control como en los LM y LMS, por lo que no se observó una correlación estadísticamente significativa entre el rango de expresión de Bax y el diagnóstico anatomopatológico ($p \approx 0,379$) (figura 34 y 35). Además, no se pudo realizar la relación entre los LMS y los LME debido a que todos los casos de ambos grupos presentaron una positividad mayor del 75% de las células. En el resto de 2 a 2 no se obtuvieron resultados significativos ni entre los LMS y los LMU ($p \approx 1$), ni entre los LMS y los LMC ($p \approx 0,484$),

Al presentar todos los casos una positividad en más del 10% de la celularidad, no se realizaron estudios por estado (positivo/negativo).

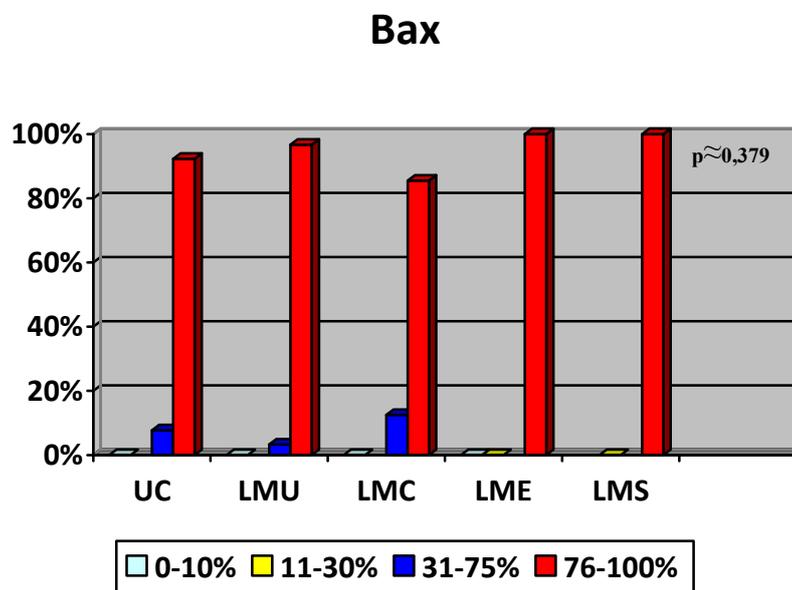


Figura 34: Diagrama de barras de los resultados del rango de Bax por grupos

UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

No se observaron relaciones estadísticamente significativas entre el diagnóstico anatomopatológico y el patrón de expresión o la intensidad, siendo el patrón homogéneo y la intensidad moderada.

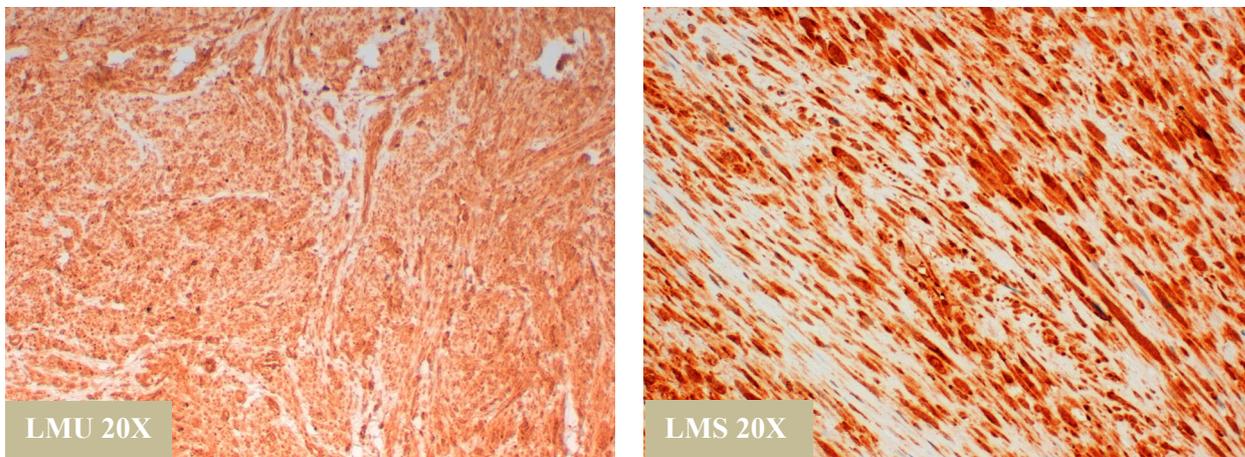


Figura 35: Imágenes de la expresión de Bax en distintos tumores.
LMU: leiomioma usual, LMS: leiomiosarcoma

CICLO CELULAR

p53

La expresión de p53 fue relevante únicamente en el grupo de LMS, (figuras 36 y 37), siendo positivos en el 68% de los casos, con un patrón homogéneo y una tinción de leve a moderada y sin relacionarse con el grado tumoral. Los tumores benignos y el miometrio no neoplásico fueron negativos frente a esta proteína.

En un rango de entre el 0-10% de positividad se observaron todos los miometrios control, así como la totalidad de los LM, y un 43,8% de LMS (incluyendo 1 caso de bajo grado). En un rango de entre el 11-30% se observó un 18,8% de los LMS (incluyendo 2 de los LMS de bajo grado). En un rango de entre el 31-75% se encontraron un 25% de los LMS (incluyendo un LMS de bajo grado). Y en un rango de entre 76-100% de observó el 12,5% de los LMS (2 casos, uno de alto grado y uno de bajo grado). Estos resultados fueron altamente significativos en el estudio estadístico ($p < 0,005$).

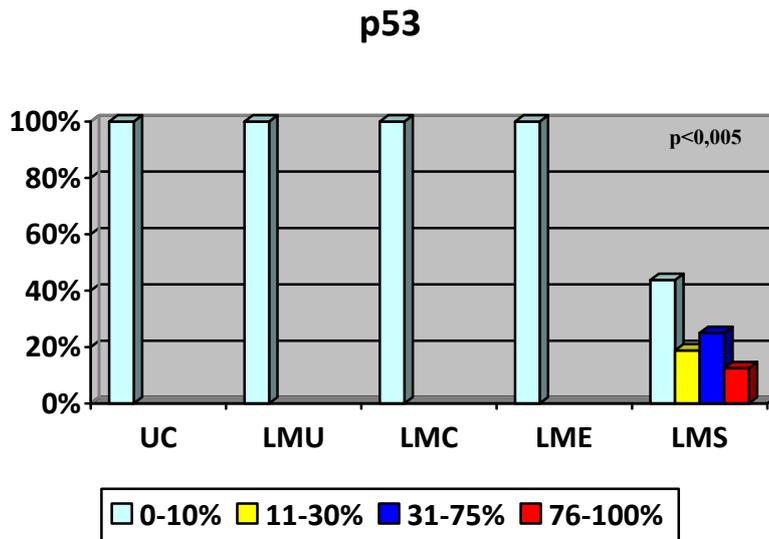


Figura 36: Diagrama de barras de los resultados del rango de p53 por grupos

UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

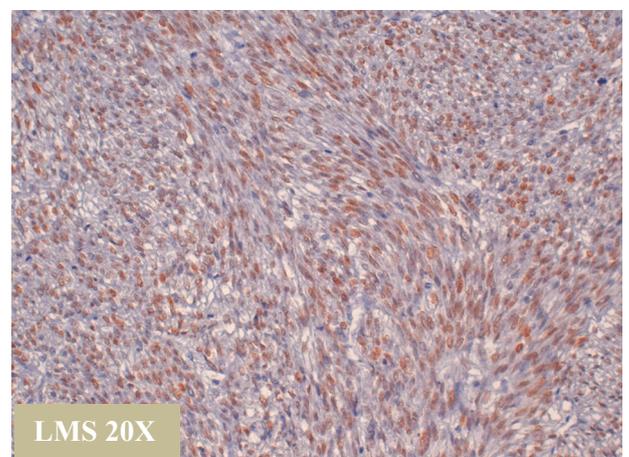
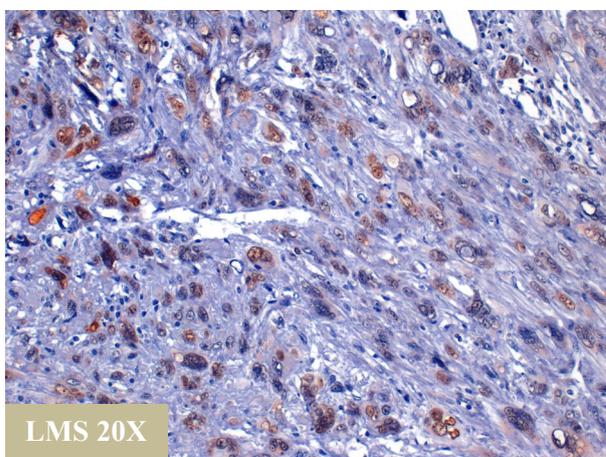
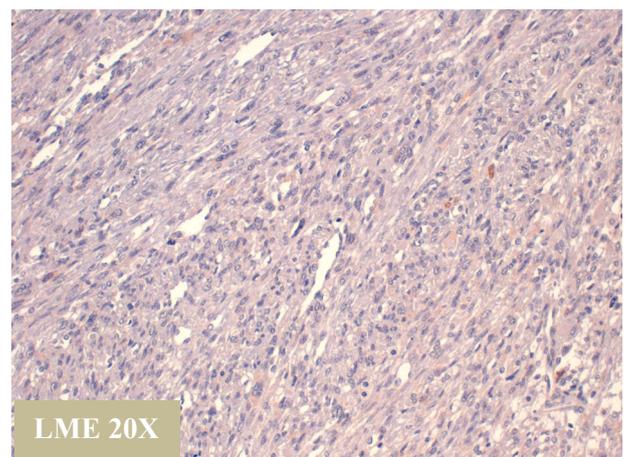
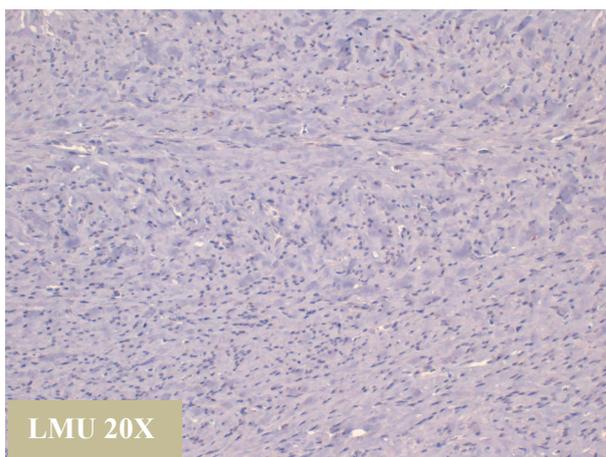


Figura 37: Imágenes de .la expresión de p53 en distintos tumores

LMU: leiomyoma usual, LME: leiomyoma especial, LMS: leiomiosarcoma

También hallamos en los distintos estudios 2 a 2, una relación estadísticamente significativa entre la expresión de p53 y el diagnóstico anatomopatológico, tanto el estudio entre LMS y LMU ($p < 0,001$), entre LMS y LMC ($p \approx 0,006$), y entre LMS y LME ($p \approx 0,010$).

En los estudios por estado también obtuvimos una relación significativa entre la presencia de expresión de p53 por encima del 10% y el diagnóstico anatomopatológico, tanto en los estudios 2 a 2 entre los grupos tumorales ($p < 0,005$), como en el que incluía todos los grupos ($p < 0,001$).

También estudiamos la existencia de una relación entre la expresión de p53 con otros parámetros en el grupo de los LMS, como el tamaño tumoral, la expresión de p16, p21, p27, c-kit, c-erb-B2 y de los receptores hormonales. Se observó una relación estadísticamente significativa ($p \approx 0,025$) entre la expresión de p53 y la expresión de RREE, observándose en general una mayor expresión de RREE en los casos con menor expresión de p53.

Ciclina D1

La mayor parte de los casos de nuestra serie fueron negativos frente a esta proteína, observándose en 2 casos de LMU con una positividad del 30% (nº 15 y 27), en un caso de LMC (nº 12) una positividad del 20%, en 4 casos de LME (nº 8, 11, 12 y 13, todos ellos plexiformes) una positividad del 25%, y en 2 caso de LMS positivos uno en un porcentaje alrededor del 20% (nº 5, de alto grado), y otro con una positividad alrededor del 80% (nº 11, de alto grado). El rango de expresión de esta proteína de ciclo celular fue escaso tanto en el miometrio control como en los distintos grupos tumorales en nuestra serie (figuras 38 y 39), sin observarse correlación estadísticamente significativa entre su rango de expresión y el diagnóstico ($p \approx 0,069$).

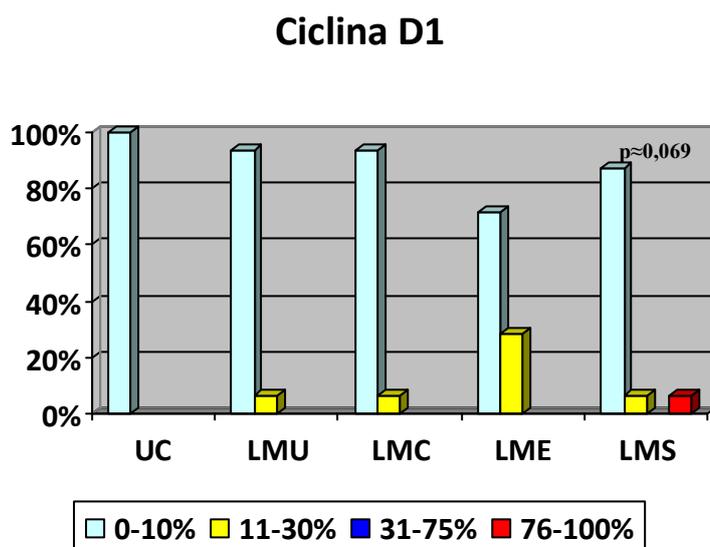


Figura 38: Diagrama de barras de los resultados del rango de ciclina D1 por grupos
UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

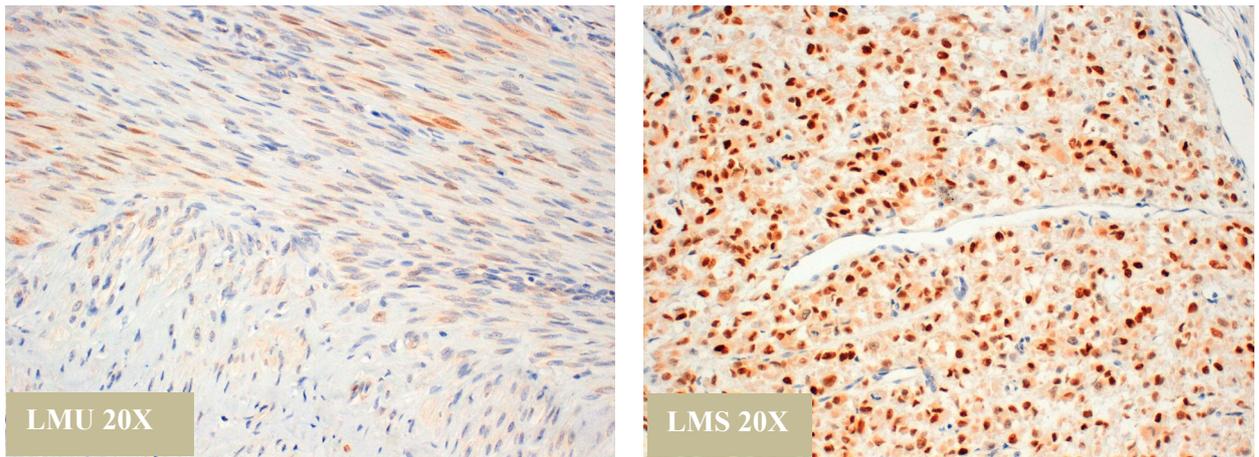


Figura 39: Imágenes de expresión de ciclina D1 en distintos tumores
LMU: leiomioma usual, LMS: leiomiosarcoma

No hallamos en los distintos estudios 2 a 2, una relación estadísticamente significativa entre la expresión de ciclina D1 y el diagnóstico anatomopatológico, ni en el estudio comparando LMS y LMU ($p \approx 0,384$), LMS y LMC ($p \approx 0,386$), y LMS y LME ($p \approx 0,187$), ni por estado ($p > 0,05$).

p16

La proteína p16 presentó una sobreexpresión en todos los grupos, siendo más frecuente y mayor en el grupo de LMS (figura 40).

Se constató una correlación altamente significativa ($p < 0,005$) entre el rango de expresión de la proteína p16 y el diagnóstico anatomopatológico. En un rango de entre el 0-10% se observó el 100% de los miometrios control, el 63,3% de los LMU un 81,3% de LMC, un 57,1% de LME (4 LMA, 1 LM con patrón vascular, 2 LM mitóticamente activos, y un LM plexiforme), y un 18,8% de LMS (3 casos). En un rango de entre el 11-30% se observó un 33,3% de LMU (10 casos), un 12,5% de LMC (2 casos), un 42,9% de LME, y un 18,8% de LMS. En un rango del 31-75% se observó un 3,3% de LMU (1 caso), un 6,3% de LMC (1 caso), y un 18,8% de LMS (3 casos). En un rango de entre el 76-100% se observó un 43,8% de los LMS (7 casos).

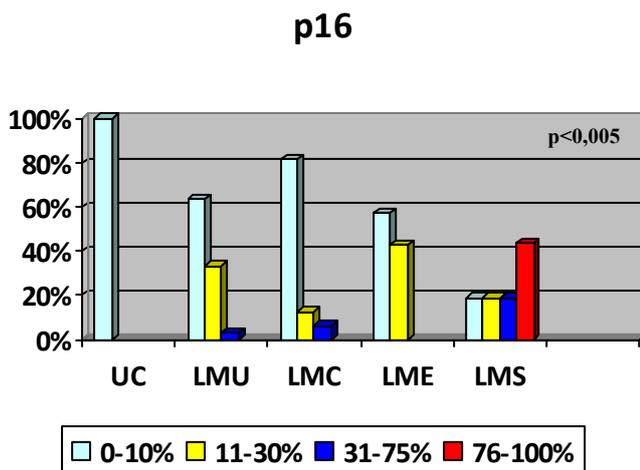


Figura 40: Diagrama de barras de los resultados del rango de p16 por grupos
 UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

Esta relación también se obtuvo entre la intensidad de la expresión y el diagnóstico ($p < 0,005$). Los LM presentaron una intensidad menor, siendo leve a moderada, mientras que los LMS tuvieron predominantemente una positividad intensa (figuras 41 y 42). 13 casos fueron negativos, entre los que había 1 caso de LMU (3,3% de los LMU), 7 LMC (43,8%), 3 LME (21,4%, 2 LMA, y un LM mitóticamente activo), y 2 LMS (12,5%). Con una positividad débil encontramos 22 LMU (73,3%), 4 LMC (25%), 10 LME (71,4%) y 2 LMS (12,5%). Y con una positividad moderada hallamos 7 LMU (23,3%), 5 LMC (31,3%), 1 LME (7,1%, un LM epiteliode), y 12 LMS (75%).

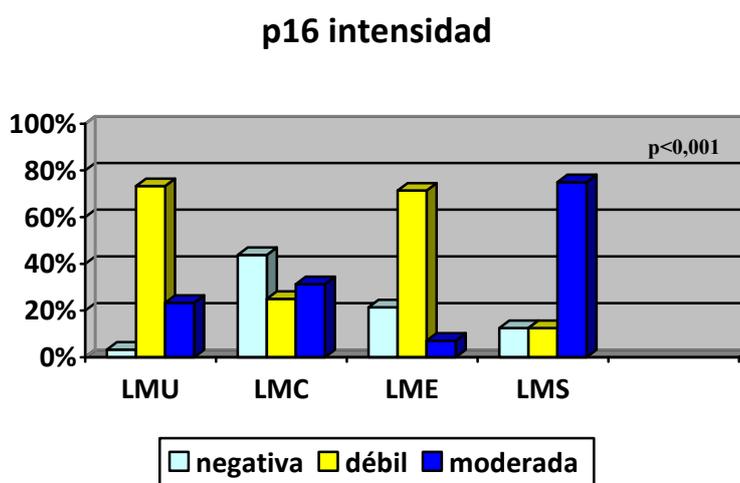


Figura 41: Resultados de la intensidad de expresión de p16 por grupos
 LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

No fue significativo en el patrón de positividad, presentando todos los casos positivos un patrón homogéneo.

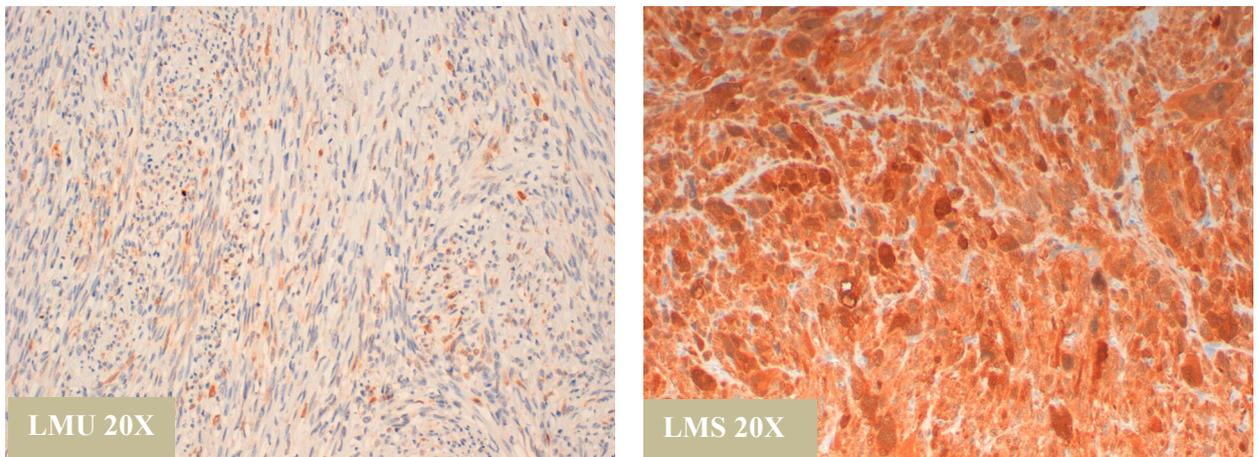


Figura 42: Imágenes de la expresión de p16 en distintos tumores
LMU: leiomioma usual, LMS: leiomiosarcoma

También hallamos en los distintos estudios 2 a 2, una relación estadísticamente significativa, tanto entre el rango expresión de p16 y el diagnóstico anatomopatológico entre LMS y LMU ($p < 0,001$), entre LMS y LMC ($p \approx 0,002$), y entre LMS y LME ($p \approx 0,004$), como en la intensidad de la positividad y el diagnóstico anatomopatológicos, entre LMS y LMU ($p < 0,001$), entre LMS y LMC ($p \approx 0,042$), y entre LMS y LME ($p \approx 0,001$).

Además realizamos los diferentes estudios por estado de la expresión de p16, encontrando, en los estudios 2 a 2, entre LMS y LMU ($p \approx 0,005$), y entre LMS y LMC ($p \approx 0,001$) siendo ambos significativos; el estudio entre LMS y LME se aproximó a la significación ($p \approx 0,057$).

También observamos un resultado altamente significativo en el estudio por estado incluyendo todos los grupos ($p < 0,001$).

P21

La proteína p21 no se sobreexpresó en ninguno de los miometrios control, ni tampoco en ninguno de los casos de LMU. Sí existió una positividad significativa en escasos casos de LMC (3 casos) y de LME (4 casos) y en un porcentaje elevado de LMS. Sin embargo, en 2 casos de LMC y un caso de LME (LMA), se observó una positividad mayor a la observada en los LMS (figura 43).

En nuestro estudio se observó una correlación altamente significativa ($p < 0,001$) entre el rango de expresión de la proteína p21 y el diagnóstico anatomopatológico. En un rango de entre el 0-10% se encontraron todos los casos de miometrio control y de LMU, el 81,3% de LMC, un 64,3% de LME, y un 31,3% de LMS. En un rango del 11-30% se observó un 6,3% de LMC, un

28,6% de LME (LM epitelioides, LMA, LM plexiforme y un LM mitóticamente activo), y un 68,8% de LMS. En un rango del 31-75% se observó un 12,5% de LMC y, un 7,1% de LME (1 LMA).

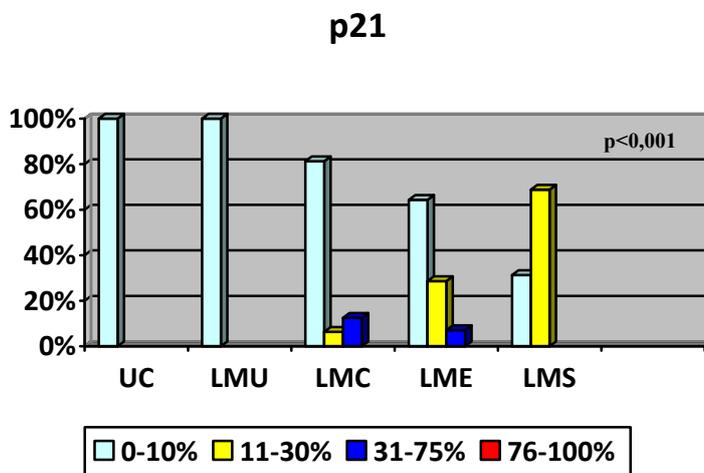


Figura 43: Diagrama de barras de los resultados del rango de p21 por grupos
 UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

También se obtuvo una relación estadísticamente significativa ($p \approx 0,005$) entre la intensidad de la expresión y el diagnóstico anatomopatológico, siendo moderada en los LMS y débil y muy débil en los grupos de LM (figura 44 y 45). Varios casos fueron negativos, incluyendo 29 LMU (96,7%), 11 LMC (68,8%), y 3 LME (21,4%, LM atípico, un LM con patrón vascular y un LM plexiforme). Con una expresión débil encontramos 1 LMU (3,3%), 5 LMC (31,3%), 10 LME (71,4%), y 9 LMS (56,3%). Y con una expresión moderada se observó un LMA (con menos del 10% de las células positivas), y 7 LMS (43,8%).

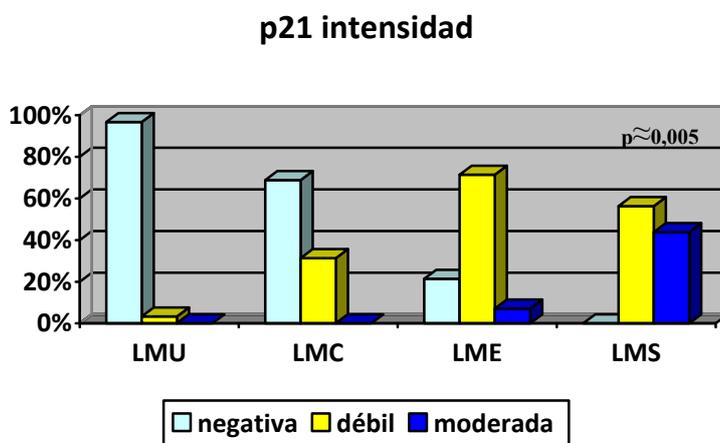


Figura 44: Diagrama de barras de los resultados la intensidad de expresión de p21 por grupos
 LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

No se encontró una correlación significativa estadísticamente en el patrón de expresión ya que todos los casos positivos presentaron un patrón homogéneo.

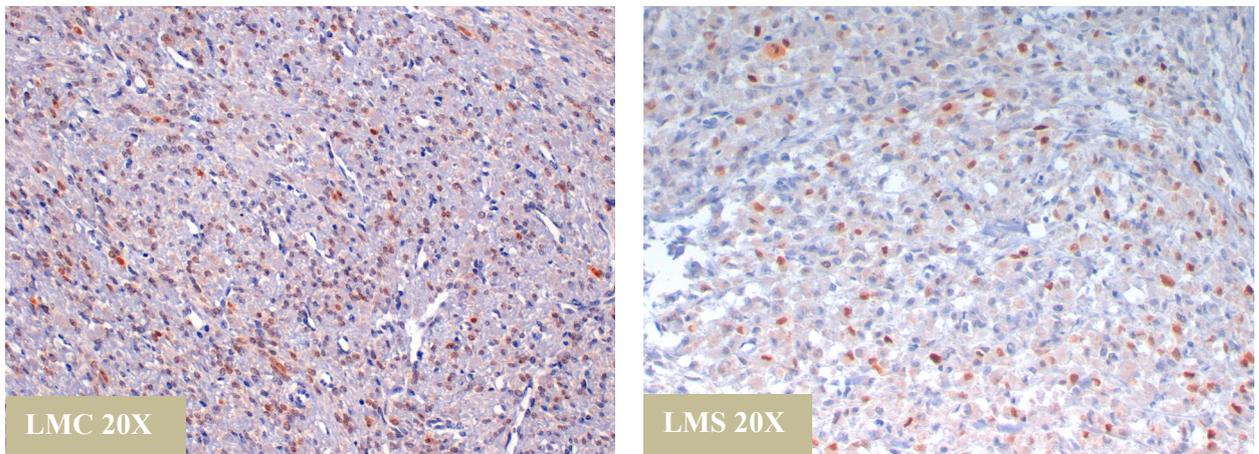


Figura 45: Imágenes de expresión de p21 en distintos tumores
LMC: leiomioma celular, LMS: leiomiosarcomas

En los distintos estudios por rangos de expresión de p21 entre los LMS y los distintos grupos de LM, se obtuvieron resultados estadísticamente significativos entre los LMS y los LMU ($p < 0,001$), y entre los LMS y los LMC ($p \approx 0,001$), sin embargo no obtuvimos relación significativa entre los LMS y los LME ($p \approx 0,071$).

Por otro lado, en estos mismos estudios para valorar la relación entre la intensidad de expresión de esta proteína y el diagnóstico anatomopatológico, obtuvimos resultados significativos en todos los estudios; tanto entre LMS frente a LMU ($p < 0,001$), entre LMS frente a LMC ($p < 0,001$), como entre LMS frente a LME ($p \approx 0,024$), siendo de mayor intensidad en el grupo de los LMS. En el estudio por estado (positivo/negativo), observamos una relación estadísticamente significativa entre la expresión de esta proteína y el diagnóstico anatomopatológico tanto en el estudio entre LMS y LMU ($p < 0,001$), entre LMS y LMC ($p \approx 0,011$) y entre todos los grupos ($p < 0,001$). Sin embargo no obtuvimos un resultado significativo entre LMS y LME ($p \approx 0,070$).

P27

La expresión de p27 fue más extensa en los LMS, y en los LMC, frente a los grupos de LMU y LME. Encontramos una correlación altamente significativa ($p < 0,005$) entre el rango de expresión de p27 y el diagnóstico anatomopatológico (figura 46). En un rango de entre el 0-10% se observó 15,4% de los miometriosis control, el 70% de LMU, un 31,3% de LMC, el 78,6% de LME, y un 25% de LMS. Con un rango entre el 11-30% se observó un 30,8% de controles, un

6,7% de LMU, un 56,3% de LMC, un 21,4% de LME (2 LMA y un LM plexiforme), y un 25% de LMS. Con un rango de entre 31-75% de positividad se observó un 46,2% de los controles, un 20% de LMU, un 6,3% de LMC y un 31,7% de LMS (5 casos, todos ellos de alto grado). Con un rango entre el 76-100% de positividad se encontraron un 7,7% de controles, un 3,3% de LMU, un 6,3% de LMC y un 18% de LMS (3 casos todos ellos de alto grado).

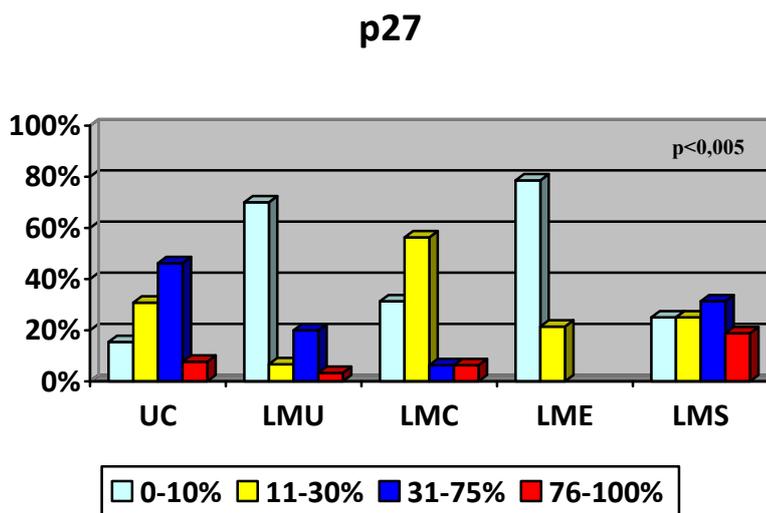


Figura 46: Diagrama de barras de los resultados del rango de expresión de p27 por grupos UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

También obtuvimos una relación estadísticamente significativa entre la intensidad de expresión y el diagnóstico anatomopatológico ($p \approx 0,003$) siendo la expresión débil a moderada en los LMS, y débil en los LM (figura 47 y 48). Encontramos 21 casos negativos, incluyendo 15 LMU (50%), 3 LMC (18,8%) y 3 LME (21,4%). Con una tinción débil había 12 LMU (40%), 12 LMC (75%), 9 LME (64,3%), y 13 LMS (81,3%). Y con una expresión moderada se encontraron 3 LMU (10%), 1 LMC (6,3%), 2 LME (14,3%, 2 LM atípicos) y 3 LMS (18,8%).

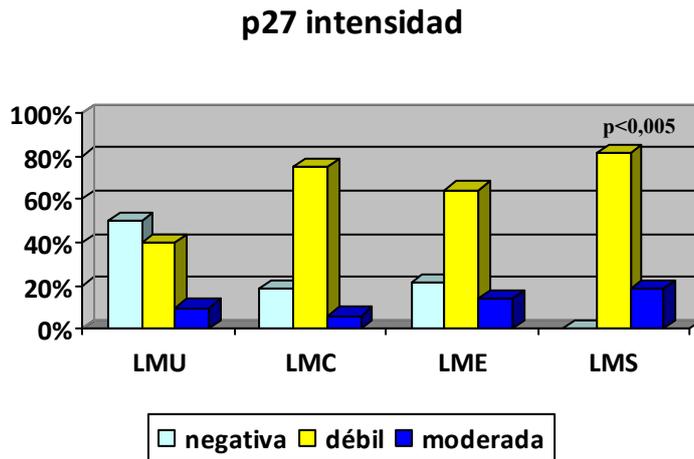


Figura 47: Resultados de la intensidad de expresión de p27 por grupos
LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

El patrón de positividad no resultó estadísticamente significativo ya que todos los casos positivos presentaron un patrón de positividad homogéneo.

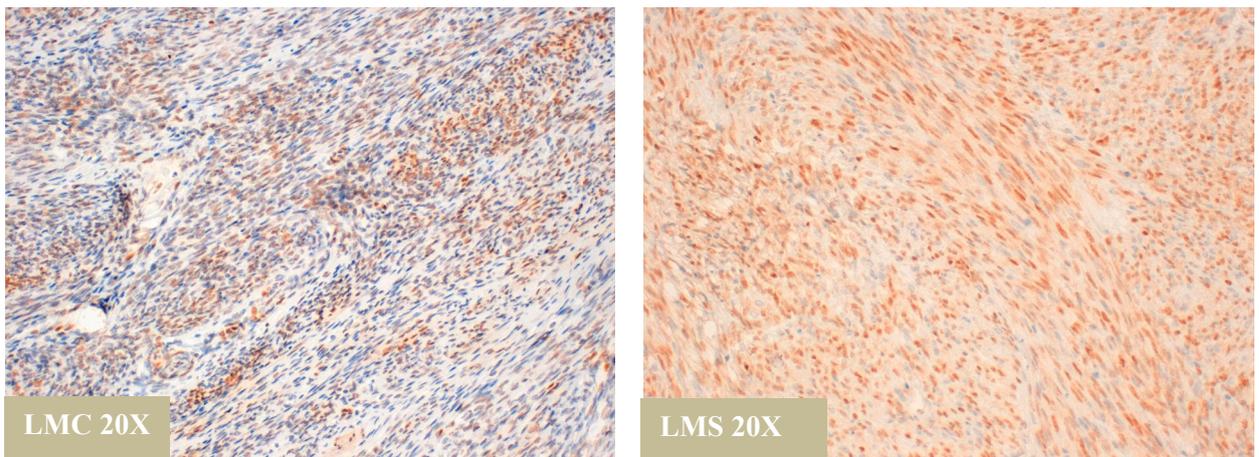


Figura 48: Imágenes de la expresión de p27 en distintos tumores
LMC: leiomioma celular, LMS: leiomiosarcoma

En los distintos estudios de los rangos de expresión entre los LMS y los grupos de LM, se obtuvieron resultados estadísticamente significativos entre los LMS y los LMU ($p \approx 0,019$), y entre los LMS y los LME ($p \approx 0,010$), sin embargo no obtuvimos relación significativa entre los LMS y los LMC ($p \approx 0,127$).

Obtuvimos una relación significativa en el estudio por estado entre LMS frente a LMU ($p \approx 0,005$) y LMS frente a LME ($p \approx 0,009$), y en el estudio conjunto de todos los grupos ($p < 0,001$). Sin embargo, no se obtuvo una relación significativa entre LMS y LMC ($p \approx 1$).

Además, en estos mismos estudios para valorar la relación entre la intensidad de expresión de esta proteína y el diagnóstico anatomopatológico, obtuvimos resultados significativos entre LMS frente a LMU ($p \approx 0,003$), pero no observamos esta relación significativa entre LMS frente a LMC ($p \approx 0,133$), ni entre LMS frente a LME ($p \approx 0,149$), siendo muy similar el grado de intensidad entre estos dos grupos

DIANAS TERAPÉUTICAS

C-kit

En nuestra serie no encontramos positividad frente a esta proteína en ninguno de los casos de LM ni en el miometrio control, presentando los distintos tumores como control interno la presencia de aislados mastocitos, y en algún caso tinción muy débil citoplasmática considerada difusión del anticuerpo (figura 49). Sin embargo, en el grupo de los LMS se encontraron casos con tinción citoplasmática entre moderada e intensa, sin observarse refuerzo de membrana, por lo que tuvimos que ser cautos a la hora de interpretar estos resultados (figura 50).

Se observó una correlación altamente significativa entre el rango de expresión de la proteína c-kit y el diagnóstico anatomopatológico ($p < 0,005$), debido a que únicamente se expresó en el grupo de los LMS. Fueron negativos todos los miometrios control y todos los LM, así como un 37,5% de LMS (6 casos). Con un rango de positividad de entre el 11-30% de las células se encontraron el 37,5% de los LMS. Con un rango de entre el 31-75% se encontraron el 18,8% de los LMS (3 casos), y con un rango entre el 75-100% de las células positivas se observaron un 6,3% de los LMS (LMS epitelioides de alto grado).

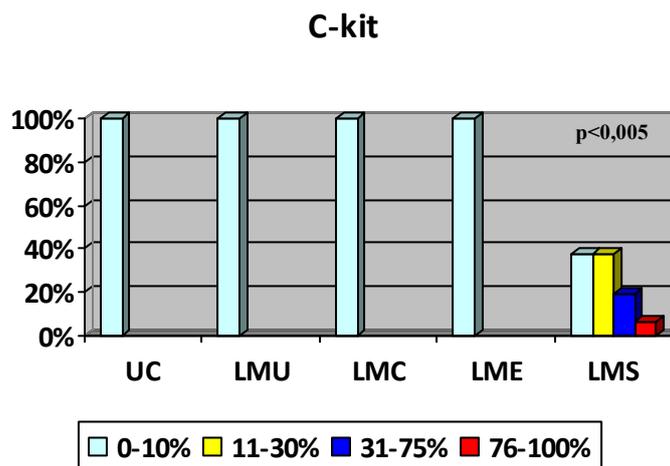


Figura 49: Diagrama de barras de los resultados del rango de expresión c-kit por grupos
UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

El patrón de tinción fue en todos los casos homogéneo y la intensidad entre muy débil y débil en el 81,3% de los casos (13 casos) y moderada en el 12,5% de los casos (2 casos, ambos casos de alto grado).

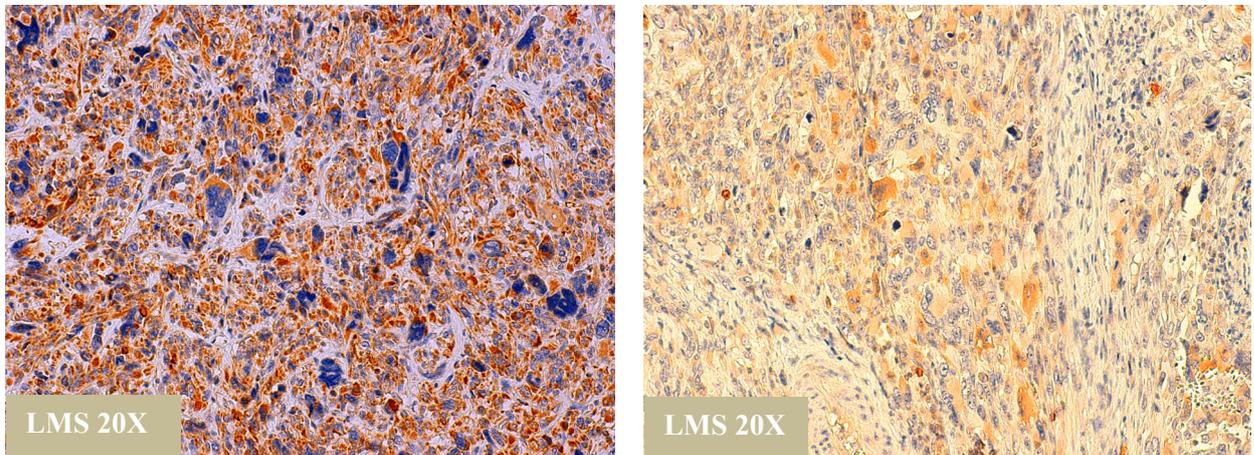


Figura 50: Imágenes de expresión de c-kit en leiomiosarcomas.
LMS: leiomiosarcoma

En los estudios 2 a 2, y por estado también encontramos una relación estadísticamente significativa entre el rango de expresión de c-kit y el diagnóstico anatomopatológico ($p < 0,05$) ya que únicamente fue en el grupo de LMS donde encontramos expresión de esta proteína.

En el grupo de los LMS se observaron 5 casos positivos frente a c-kit, y negativos frente a c-erb-B2 e IGFR-1; 4 casos positivos frente a c-kit y c-erb-B2 y negativos frente a IGFR-1, 1 caso positivo frente a c-kit, c-erb-B2 e IGFR-1, y 1 caso positivo frente a c-erb-B2 e IGFR-1 y negativo frente a c-kit. No encontramos relación estadística entre la expresión de estas dianas terapéuticas en nuestro estudio ($p > 0,05$).

Tampoco se relacionó la expresión de c-kit con el tamaño tumoral ni el recuento mitótico ($p > 0,05$).

PDGFR α

La mayor parte de los LM (excepto un caso) y todos los LMS expresaron de forma amplia PDGFR α por lo que no existió una relación significativa entre el rango de expresión frente a esta proteína ($p \approx 0,126$) y el diagnóstico. Su expresión fue en todos los casos con un patrón homogéneo, siendo de una mayor intensidad en los LMS y LMU observándose una relación altamente significativa entre la intensidad y el diagnóstico ($p < 0,005$). La expresión fue nula en el 7,7% de los miometrios control, en el 6,7% de los LMU; leve en el 92,3% de los miometrios

control, 16,7% de los LMU, 43,8% de los LMC, el 100% de los LME; y moderada en el 76,7% de los casos de LMU, 56,3% de los LMC y en el 100% de los LMS (figura 51 y 52).

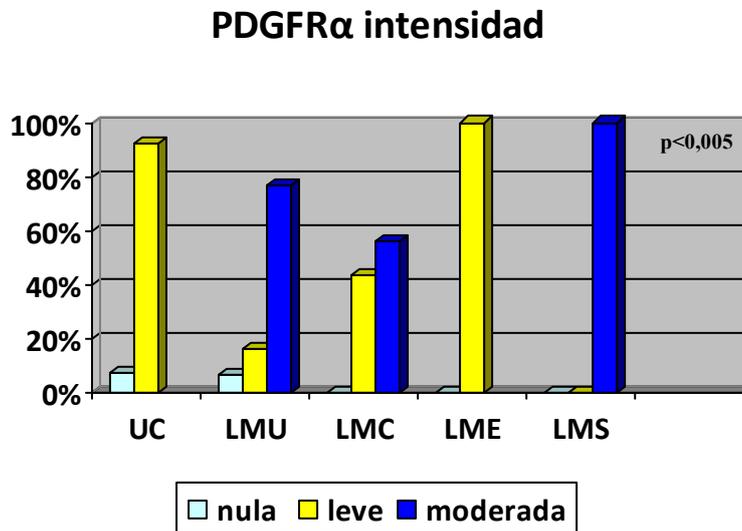


Figura 51: Resultados de la intensidad de expresión de PDGFR α por grupos
 UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

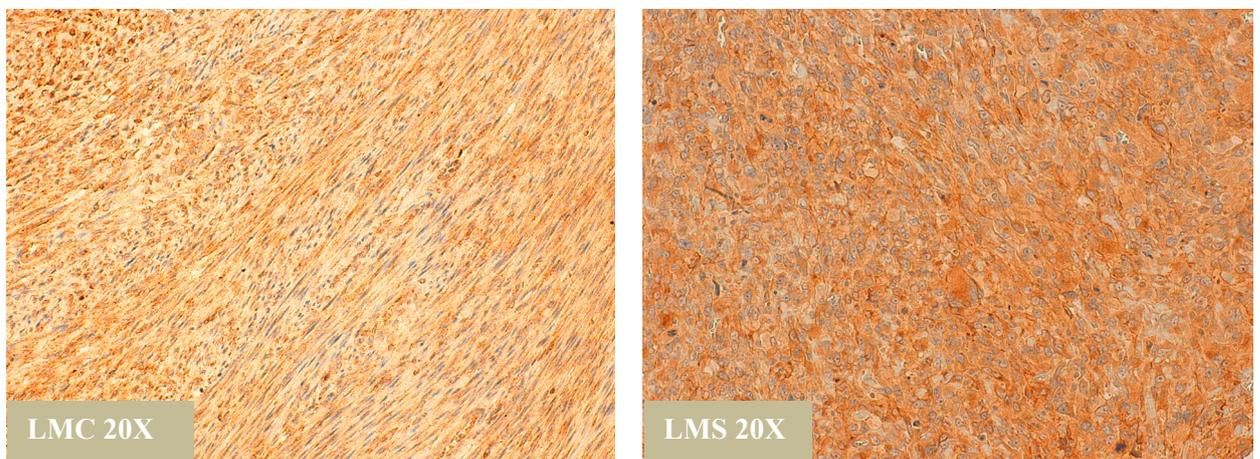


Figura 52: Imágenes de la expresión de PDGFR α en distintos tejidos estudiados
 LMC: leiomioma celular, LMS: leiomiosarcoma

En los estudios 2 a 2, tampoco existió relación estadísticamente significativa entre el rango de expresión de esta proteína y el diagnóstico anatomopatológico. Aunque sí que fueron relevantes las diferencias en la intensidad de expresión entre LMS y LMC ($p \approx 0,007$) y los LMS y los LME ($p < 0,001$), donde los LMS presentan claramente una intensidad mayor, aunque no existió relación entre los LMS y los LMU ($p \approx 0,111$), ambos con una intensidad más elevada.

IGFR1

La expresión de IGFR-1 fue nula en prácticamente todos los casos, tanto en tumores benignos como en los LMS únicamente 2 casos del grupo de LMS positivos ($p \approx 0,315$), uno de ellos con un rango de positividad de entre el 11-30% y el otro de entre el 75-100% de la celularidad. Ambos casos con un patrón homogéneo y una intensidad moderada (figura 53).

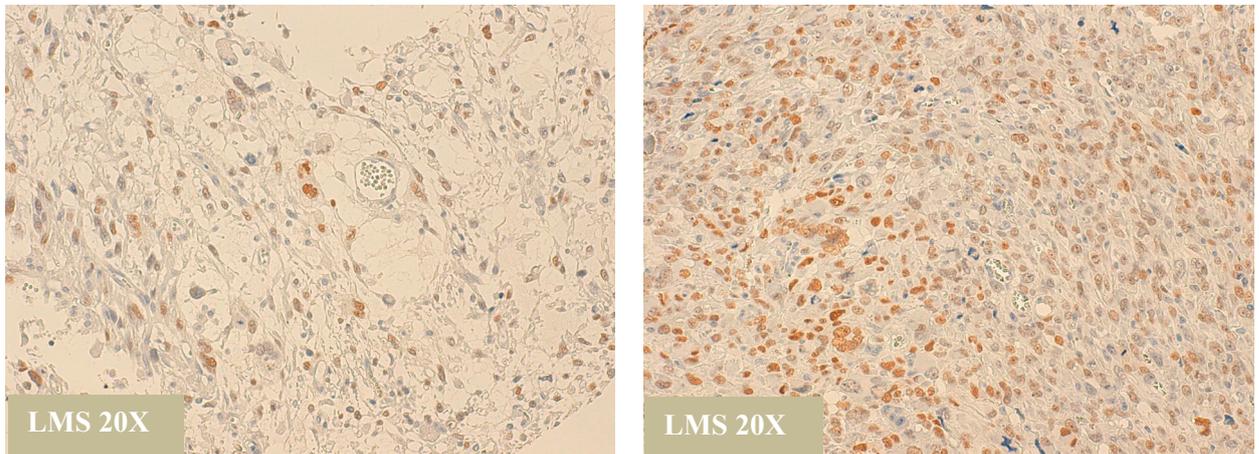


Figura 53: Imágenes de la expresión de IGFR1 en distintos tumores
LMS: leiomiosarcoma

C-erb-B2

En nuestra serie, la expresión de la proteína fue predominantemente citoplasmática, y solo focalmente de membrana. Aunque sabemos que esta proteína es de membrana hemos querido recoger todos los casos que tuvieran expresión aunque fuera muy escasa y citoplasmática. Únicamente se observó expresión en 6 LMS y 2 LMU (aunque estos últimos con una expresión de menos del 10% de la celularidad).

En un rango de entre el 0-10% se observaron todos los casos de miometrio normal (todos negativos), todos los LM que fueron negativos salvo 2 casos de LMU, con muy escasa celularidad positiva (menor del 10%) con intensidad débil, y únicamente citoplasmática y el 62,5% de los LMS (incluyendo los 4 LMS de bajo grado y el 50% de LMS de alto grado). Con un rango de entre 11-30% de la celularidad positiva se encontró un 18,8% de los casos de LMS (3 casos de alto grado), y con un rango de positividad de entre el 31-75% se observó un 18,8% de los LMS (3 casos de alto grado) Estos resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0,005$) (figura 54).

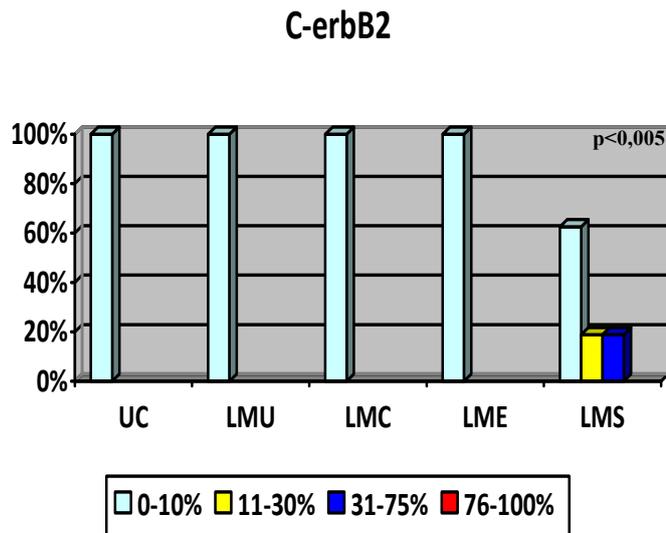


Figura 54: Diagrama de barras de los resultados del rango de c-erb-B2 por grupos
 UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

El patrón en todos los casos fue homogéneo y la intensidad varió en el grupo de los LMS entre muy débil a débil en el 18,8% de los casos (3 casos) y moderada en el 31,3% de los casos (8 casos) (figura 55), siendo débil en los 2 casos de LMU.

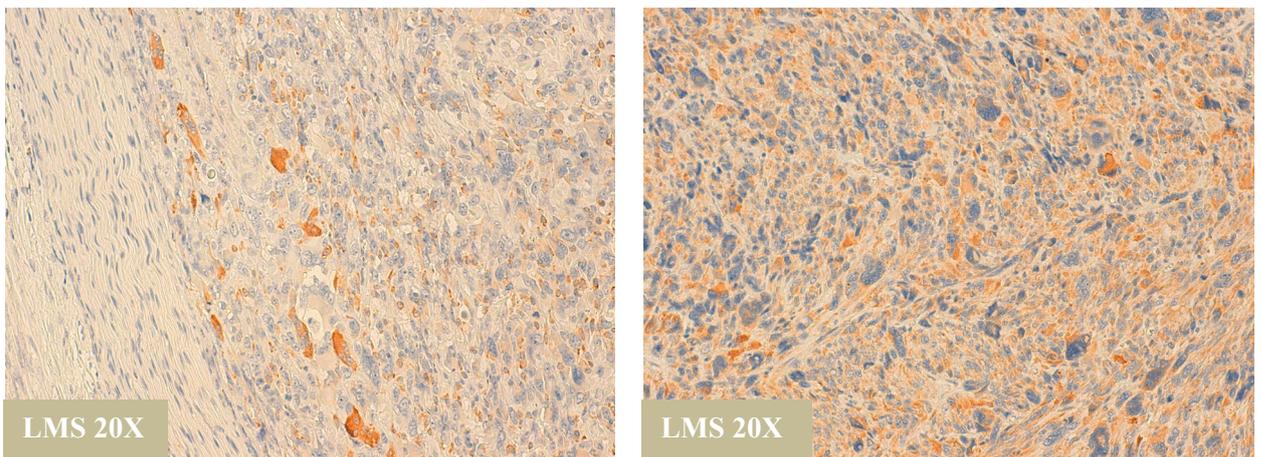


Figura 55: Imágenes de la expresión de c-erb-B2 en leiomiosarcomas
 LMS: leiomiosarcoma

En los estudios entre el grupo de LMS frente a los LM, obtuvimos en todos ellos una relación significativa, tanto entre LMS frente a LMU ($p \approx 0,002$), LMS frente a LMC ($p \approx 0,025$) y LMS frente a LME ($p \approx 0,038$), reforzando el resultado significativo en el estudio de todos los grupos. Por estado (positivo/negativo), encontramos una relación estadísticamente significativa en todos los estudios, tanto 2 a 2 entre LMS y los distintos grupos de LM ($p < 0,005$), como en el de todos los grupos ($p < 0,001$).

TRANSICION EPITELIO MESÉNQUIMA

E-caderina

En nuestra serie no se observó ningún caso de LM, LMS ni miometrio control positivo. La relación estadística no se pudo hacer por este motivo.

Slug

La mayor parte de los casos en todos los grupos presentaron una extensa expresión de esta proteína. No se observó ningún caso totalmente negativo en ninguno de los grupos estudiados. Más del 70% de los tumores benignos y más del 50% de los malignos presentó un rango de expresión por encima del 75% de la celularidad, llegando en la mayor parte de los casos entorno al 100% (figuras 56 y 57).

No hubo diferencias significativas entre el rango de expresión de Slug y el diagnóstico anatomopatológico ($p \approx 0,073$). 25 LMU (83,3% de los casos), 16 LMC (100% de los casos), 10 LME (71% de los casos) estuvieron en el rango más elevado de expresión. Los LMS también tuvieron esta alta expresión hasta en 9 casos (56,3%) así como 10 UC (76,9%).

En el rango de expresión entre el 31-75% se presentaron 4 casos de LMU (13,3%), 1 caso de LME (7,1%), 5 LMS (31,3%) y 2 casos de UC (15,4%). En un rango de entre 11-30% estuvo 1 caso de LMU (3,3%) y 1 caso de LMS (6,3%), y con una positividad inferior al 11% se encontraron 3 casos de LME, todos ellos atípicos (21,4%), 1 caso de LMS (de bajo grado) (6,3%) y 1 caso de UC (7,7%).

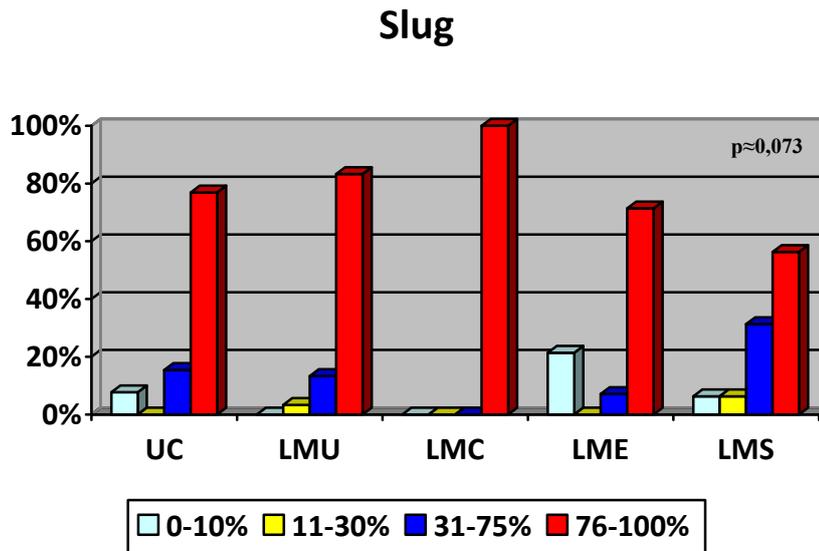


Figura 56: Diagrama de barras del rango de expresión de slug en distintos tumores
 UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

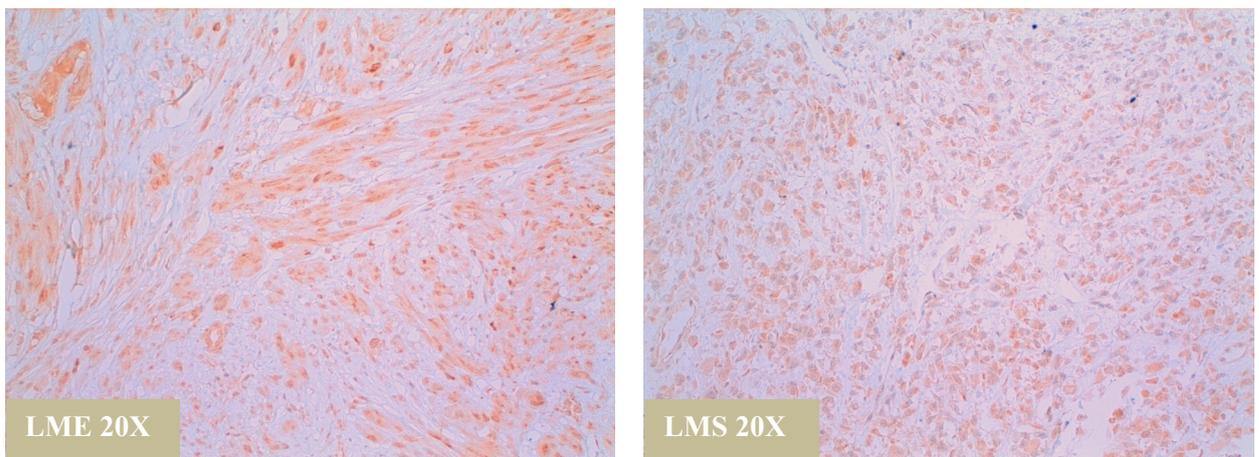


Figura 57: Imágenes de la expresión de slug en distintos tumores
 LME: leiomioma especial, LMS: leiomiosarcoma

No se observó relación estadísticamente significativa en el estudio de los LMS frente a los LMU ($p \approx 0,185$) ni de los LMS frente a los LME ($p \approx 0,203$) debido a la falta de variabilidad entre los grupos. Ninguno de los estudios por estado (positivo/negativo) fue significativo, encontrando como resultados, entre LMS y LMU ($p \approx 0,348$), entre LMS y LMC ($p \approx 1$), entre LMS y LME ($p \approx 0,315$) y entre todos los grupos ($p \approx 0,051$).

Snail

Esta proteína se expresó con más frecuencia en el grupo de los LMS (figura 58 y 59).

Todos los UC (13 casos), LMU (30 casos), el 75% de los LMC (12 casos), 92,9% de LME (13 casos) y 37,5% de LMS (6 casos) presentaron una positividad de expresión por debajo del 11 %. El 31,3% de LMS (5 casos) presentaron una expresión entre el 11-30%. Además, el 25% de los LMC (4 casos), 7,1% de los LME (un LM plexiforme), y 25% de LMS (4 casos), fueron positivos en un rango del 31-75%. Finalmente, 6,3% de LMS (1 caso) presentó una positividad superior al 75% de las células. Estos resultados fueron significativos ($p < 0,005$).

Snail

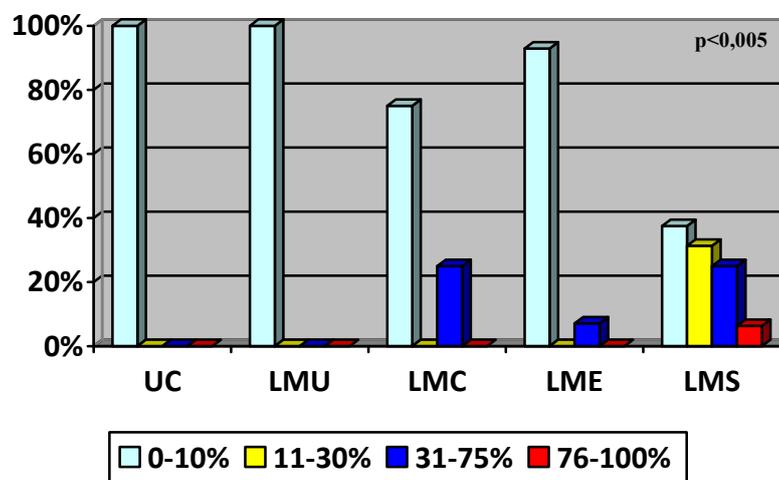


Figura 58: Diagrama de barras del rango de expresión de snail en distintos grupos
UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

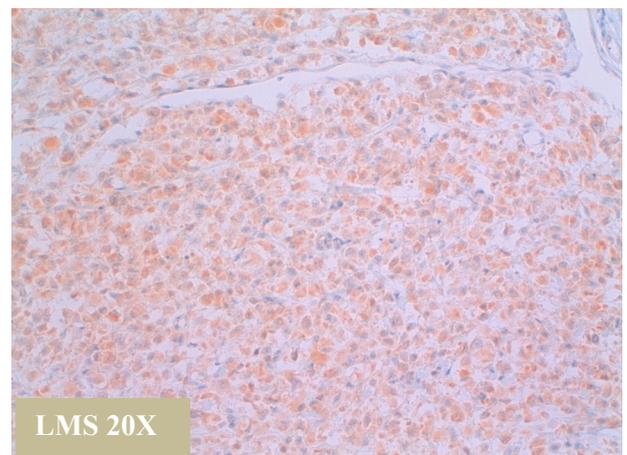
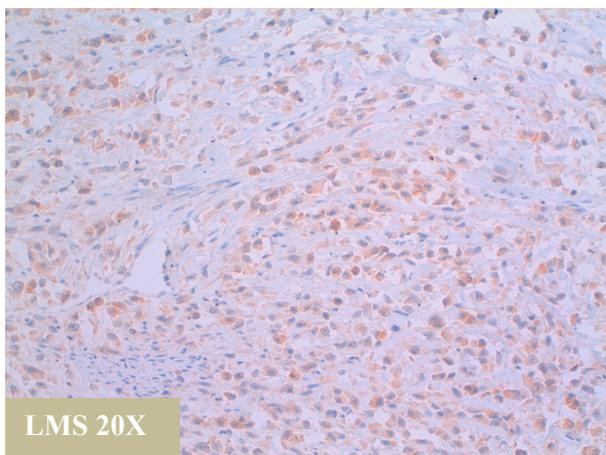


Figura 59: Imágenes de la expresión de snail en leiomiosarcomas
LMS: leiomiosarcoma

En los estudios 2 a 2 presentaron una relación estadísticamente significativa entre la expresión IHQ de Snail y el diagnóstico anatomopatológico, siendo entre LMS frente a LMU ($p < 0,001$), LMS frente a LMC ($p \approx 0,046$), y LMS frente a LME ($p \approx 0,016$), lo que refuerza los resultados obtenidos en el estudio global de todos los grupos. No obstante hay que tener en cuenta que los LMU tuvieron todos una positividad menor del 11 %, y los 2 grupos de LM restantes no presentaron apenas variabilidad en el rango de expresión.

En los estudios por estado (positivo/negativo) obtuvimos una relación significativa entre la presencia de expresión de Snail por encima del 10% y el diagnóstico anatomopatológico, obteniendo un p valor en el estudio entre LMS y LMU ($p < 0,001$) y entre LMS y LME ($p \approx 0,002$), así como en el estudio incluyendo todos los grupos ($p < 0,001$), sin embargo no obtuvimos un resultado significativo al comparar los LMS y LMC ($p \approx 0,073$).

βcatenina

En los UC, en el miometrio la expresión de la βcatenina resultó negativa en todos los casos, y aunque no se exponga en la gráfica, se observó positividad en el endometrio (presente en las muestras de UC), lo que sirvió de control interno. En los LMU se observó focalmente positividad de los endotelios vasculares. Los LMC, LME y LMS presentaron también tinción focal vascular, no valorada, y una positividad muy débil en el citoplasma, siendo focalmente una tinción en “gota”, siendo en los LMS más frecuente este patrón de positividad.

Se observó una correlación altamente significativa entre el rango de expresión de la proteína βcatenina y el diagnóstico anatomopatológico ($p < 0,005$) aunque a expensas de las diferencias entre LMS, LMC y LME frente a LMU (figura 60 y 61).

En un rango de entre el 0-10% se observaron todos los controles y los LMU, el 56,3% de LMC, 57,1% de LME (4 LMA, 1 LM epitelioides, 1 LM vascular, y 1 LM mitóticamente activo, 1 LM plexiforme), y el 37,5% de los LMS. En un rango de positividad de entre el 11-30% se observaron un 25% de LMC, un 7,1% de LME (un LM plexiforme) y un 25% de LMS. En un rango de entre el 31-75% de las células positivas se encontraron un 12,5% de LMC, un 35,7% de LME, y un 37,5% de LMS. Con un rango de positividad de entre el 75-100% de encontró únicamente el 6,3% de LMC.

βcatenina

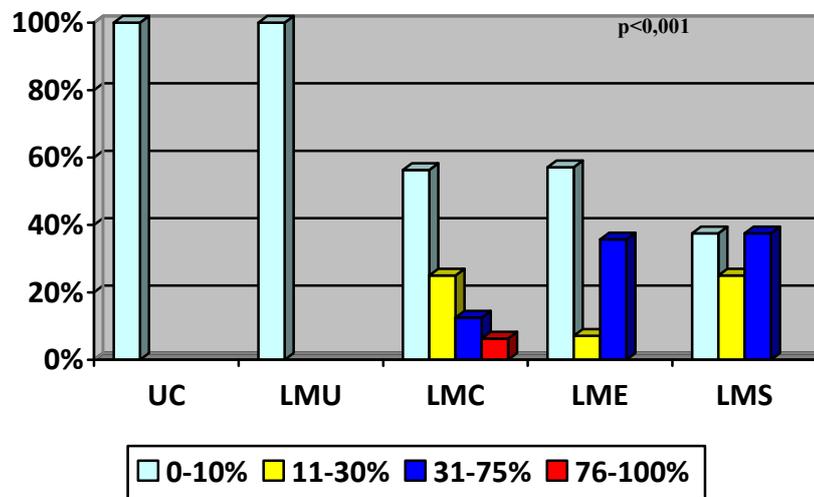


Figura 60: Diagrama de barras del rango de expresión de βcatenina en los diferentes grupos UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

Sólo uno de los estudios 2 a 2 entre el grupo de LMS y los distintos grupos de LM presentó una relación significativa entre la expresión de esta proteína y el diagnóstico anatomopatológico, siendo entre LMS y LMU ($p < 0,001$) aunque al presentar todos los casos de LMU una positividad inferior al 11% no es del todo valorable. Sin embargo, el rango de expresión entre LMC, LME y LMS fue similar, ($p \approx 0,308$) entre LMC y LMS y ($p \approx 0,358$) LME y LMS.

En los estudios por estado también obtuvimos una relación significativa entre la expresión de βcatenina por encima del 10% y el diagnóstico anatomopatológico, al comparar LMS y LMU ($p < 0,001$), y en el estudio incluyendo todos los grupos ($p < 0,001$). Sin embargo, al comparar LMS y LMC ($p \approx 0,288$) así como LMS y LME ($p \approx 0,464$) no encontramos relación entre la expresión de esta proteína y el diagnóstico anatomopatológico.

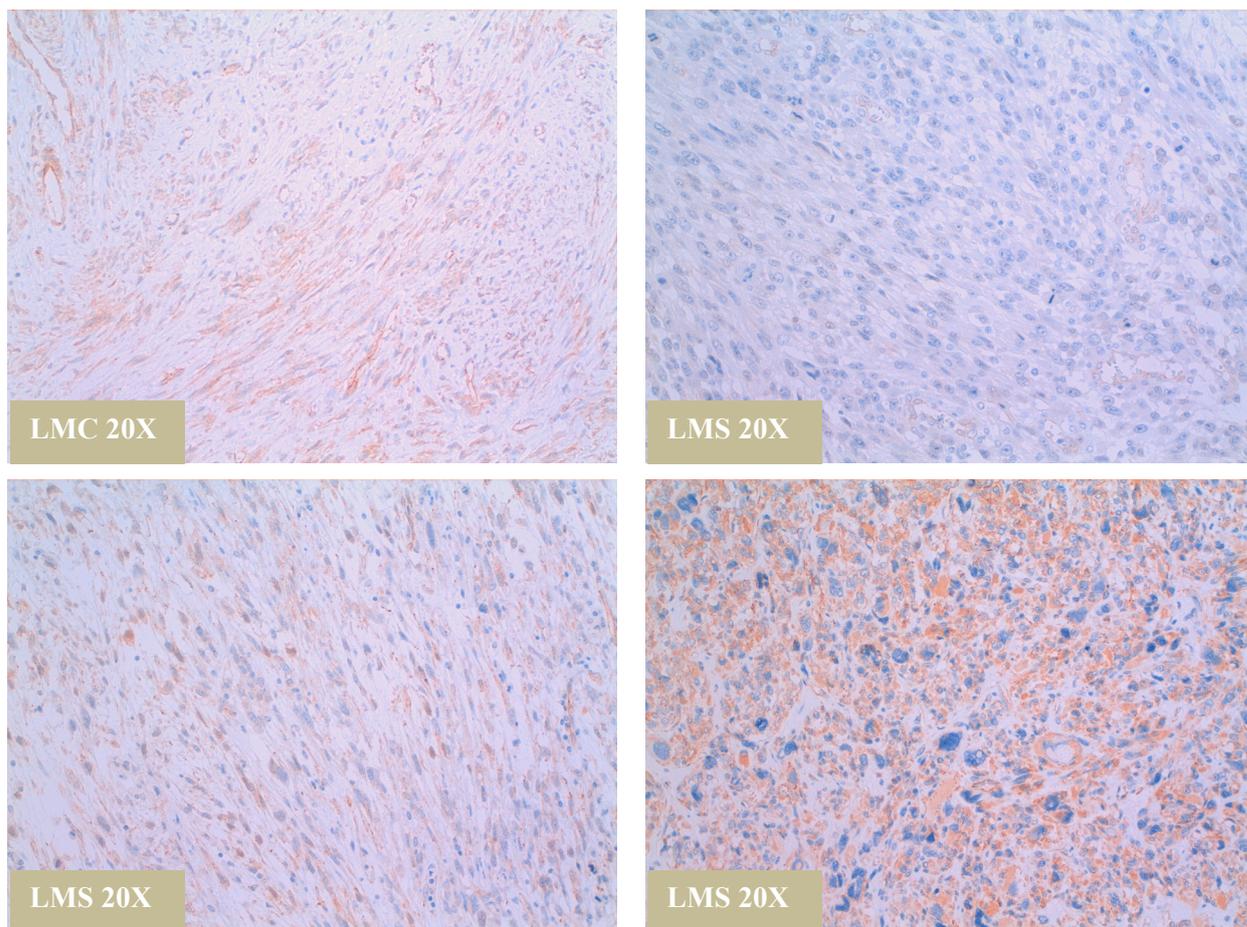


Figura 61: Imágenes de la expresión de β catenina en distintos tumores
LMC: leiomioma celular, LMS: leiomiosarcoma

AKT

En conjunto, tanto el miometrio sano como los diferentes LM expresaron la proteína AKT más extensamente que los LMS obteniendo una correlación altamente significativa entre el rango de expresión de esta proteína y el diagnóstico anatomopatológico ($p < 0,005$) (figuras 62 y 63). En un rango de entre el 0-10% se observaron el 18,8% de los LMS. En un rango de positividad de entre el 11-30% se observaron el 7,7% de los UC (1 caso), un 7,1% de LME (un LMA) y el 18,8% de LMS (3 casos). En un rango de positividad de entre el 31-75% se encontraron el 10% de LMU, 6,3% de LMC, 14,3% de LME (2 LMA), y el 43,8% de LMS. Y un rango de positividad de entre el 75-100% se observaron el 92,3% de los UC, 90% de LMU, 93,8% de LMC, 78,6% de LME y el 18,8% de LMS.

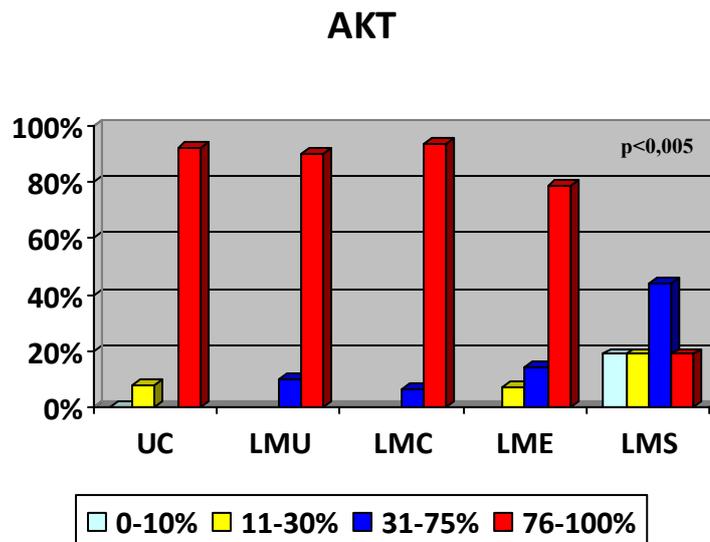


Figura 62: Diagrama de barras del rango de expresión de AKT en los diferentes grupos
UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

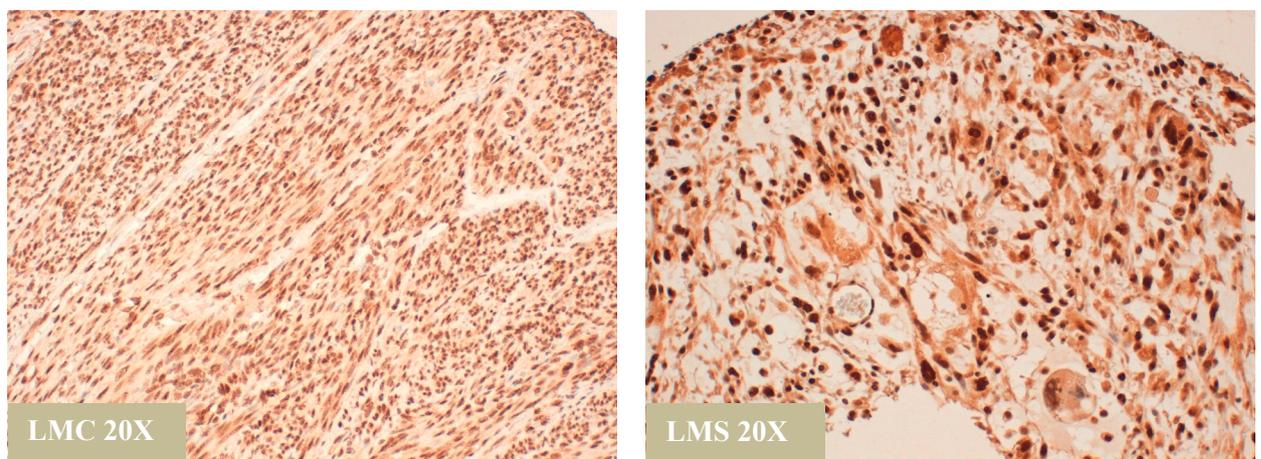


Figura 63: Imágenes de la expresión de AKT en distintos tumores
LMC: leiomioma celular, LMS: leiomiosarcoma

Todos los estudios 2 a 2 fueron significativos, entre los LMS y LMU ($p < 0,001$), entre LMS y LMC ($p < 0,001$) y entre LMS y LME ($p \approx 0,010$), a pesar de ello hay que tener en cuenta la escasa variabilidad en los diferentes grupos de LM.

Por estado (positivo/negativo), únicamente encontramos una relación estadísticamente significativa en los estudios, 2 a 2 entre LMS y los LMU ($p \approx 0,037$), sin tener una relación significativa en los estudios 2 a 2 entre LMS y LMC ($p \approx 0,226$), ni entre LMS y LME ($p \approx 0,228$).

ESTATUS HORMONAL

Receptores de estrógenos

La expresión de RREE fue mayor y más homogénea en los LMU y LMC. En los LME fueron negativos los LMA, y el grupo de los LMS presentó una expresión heterogénea, sin poderse relacionar en nuestra serie con el grado, ni con el estadio. El miometrio control presentó frecuente positividad frente a RREE, al igual que en los LMU y LMC. Hasta en 5 casos se observó una negatividad de los RREE en el grupo de LME, siendo los 4 casos de LMA de la serie y un LM plexiforme, así como en un único caso de LMU también negativo. Asimismo el 43,8% de los LMS fueron negativos frente a RREE (7 casos, 6 de alto grado y 1 de bajo grado). Se halló una correlación altamente significativa entre el rango de expresión de los RREE y el diagnóstico anatomopatológico ($p \leq 0,005$) (figuras 64 y 65). En un rango de entre el 0-10% se encontraron un 15,4% de casos control, un 3,3% de LMU, 42,9% de LME (5 LMA, y 1 LM plexiformes), y 43,8% de LMS. En un rango de expresión de entre el 11-30% de las células observamos un 7,7% de los casos control, el 3,3% de LMU, 21,4% de LME (un LM epiteliode, un LM mitóticamente activo, y un LM plexiforme) y el 12,5% de LMS. En un rango de expresión de entre el 31-75% se presentaron el 15,4% de los casos control, 30% de LMU, 43,8% de LMC, 14,3% de LME (un LM plexiforme y un LM mitóticamente activo) y 31,3% de LMS. En un rango de entre el 76-100% se observaron el 61,5% de los controles, el 63,3% de los LMU, 56,3% de LMC, 21,4% de LME (2 LM plexiformes y un LM vascular), y un 12,5% de LMS (siendo 2 de los 4 casos de LMS de bajo grado).

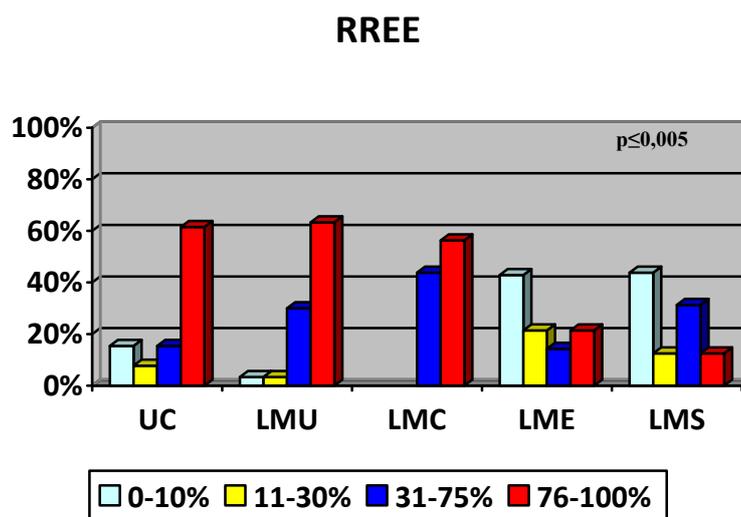


Figura 64: Diagrama de barras del rango de expresión de los receptores de estrógenos en los distintos grupos

UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

También se observó una relación estadísticamente significativa entre la intensidad de expresión de los RREE y el diagnóstico anatomopatológico en el estudio de todos los grupos ($p \approx 0,001$).

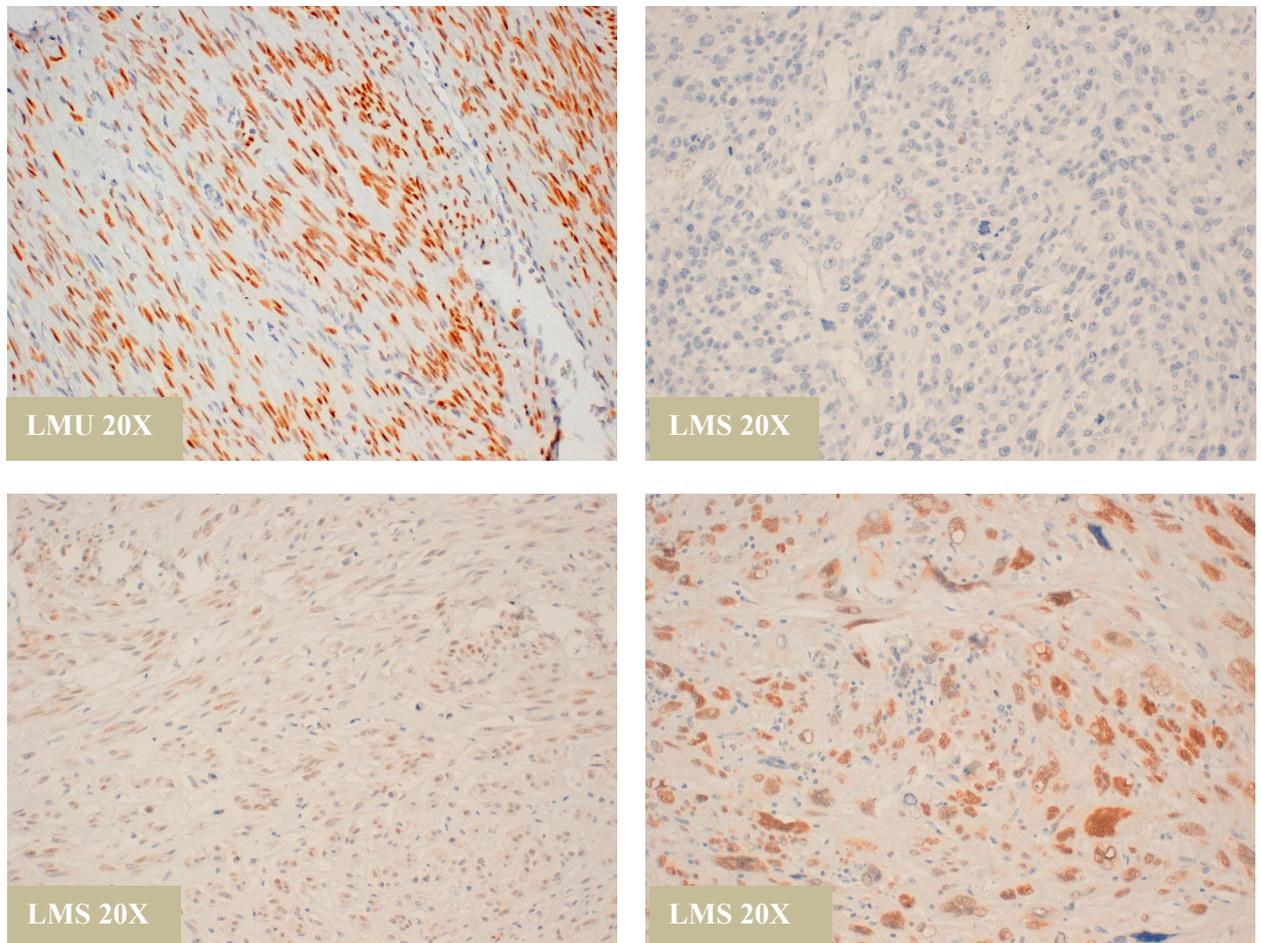


Figura 65: Imágenes de la expresión de los receptores de estrógenos en distintos tumores
LMU: leiomioma usual, LMS: leiomiosarcoma

En los estudios 2 a 2 entre el grupo de LMS y el resto de grupos tumorales, obtuvimos resultados estadísticamente significativos en el de los LMS frente a LMU ($p \approx 0,001$), y LMS frente a LMC ($p \approx 0,003$), sin observarse significación en el de los LMS frente a los LME ($p \approx 0,651$), presentando estos últimos unos patrones semejantes más heterogéneos.

En los estudios por estado también obtuvimos una relación significativa entre la presencia de expresión de RREE por encima del 10% y el diagnóstico anatomopatológico, entre LMS y LMU ($p \approx 0,001$), entre LMS y LMC ($p \approx 0,007$) y en el estudio de todos los grupos ($p < 0,001$), sin observarse relación estadísticamente significativa entre LMS y LME ($p \approx 0,961$).

Además, en los estudios 2 a 2 para valorar la relación estadística entre la intensidad de expresión de los RREE y el diagnóstico anatomopatológico, los resultados fueron semejantes,

observándose una tinción leve a moderada en los LME y LMS, siendo más intensa en los LMU y LMC. Estos resultados fueron estadísticamente significativos con los p valores siguientes, LMS frente a LMU ($p < 0,001$) y de los LMS frente a los LMC ($p \approx 0,020$), LMS y los LME ($p \approx 0,527$).

Receptores de progesterona

La expresión de los RRPP se dio mucho más extensamente en los tumores benignos, siendo además de mayor intensidad a la observada en el grupo de los LMS. El miometrio sano presentó en la mayoría de los casos una positividad extensa frente a los RRPP, así como los LM, sin observarse ningún caso negativo. Por otro lado, el 50% de los LMS fueron negativos o con baja expresión de los RRPP, predominantemente en los LMS de alto grado (figuras 66 y 67).

Se observó una correlación altamente significativa entre el rango de expresión de los RRPP y el diagnóstico anatomopatológico ($p \leq 0,005$). En un rango de entre el 0-10% se observaron el 7,7% de casos control (1 caso), y el 50% de LMS (7 casos de alto grado y un caso de bajo grado). En un rango de expresión de entre el 11-30% de las células obtuvimos el 7,7% de los casos control, el 7,1% de LME (un LMA) y el 6,3% de LMS (1 caso de alto grado). En un rango de expresión de entre el 31-75% se encontraron el 7,7% de los casos control, 20% de LMU, 31,3% de LMC, 14,3% de LME (un LM epitelioides y un LMA) y 18,8% de LMS (3 casos de alto grado). En un rango de entre el 76-100% se presentaron el 76,9% de los controles, el 80% de los LMU, 68,8% de LMC, 78,6% de LME, y un 25% de LMS (3 casos de bajo grado y 1 caso de alto grado).

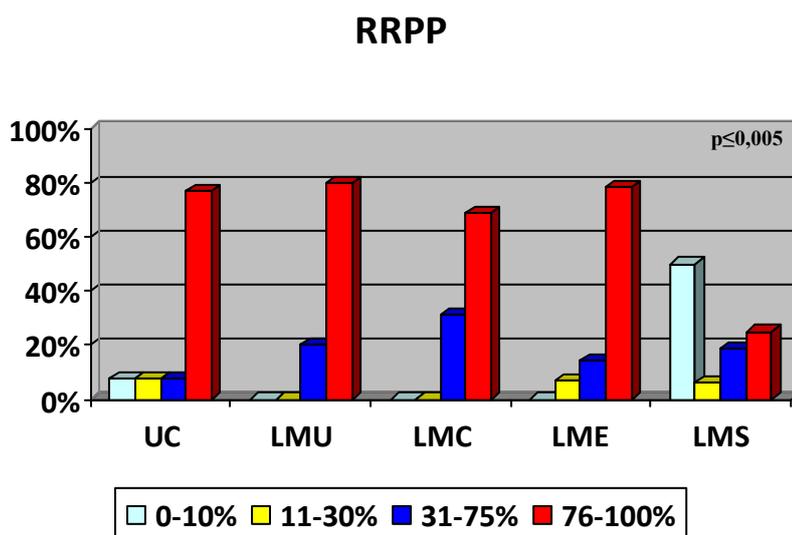


Figura 66: Diagrama de barras del rango de expresión de RRPP en los distintos grupos UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

También se observó una relación estadísticamente significativa entre la intensidad de expresión de los RRPP y el diagnóstico anatomopatológico en el estudio de todos los grupos ($p \approx 0,001$), así como en los estudios entre LMS y LMU ($p \leq 0,001$), entre LMS y LMC ($p \approx 0,005$), y entre LMS y LME ($p \approx 0,033$).

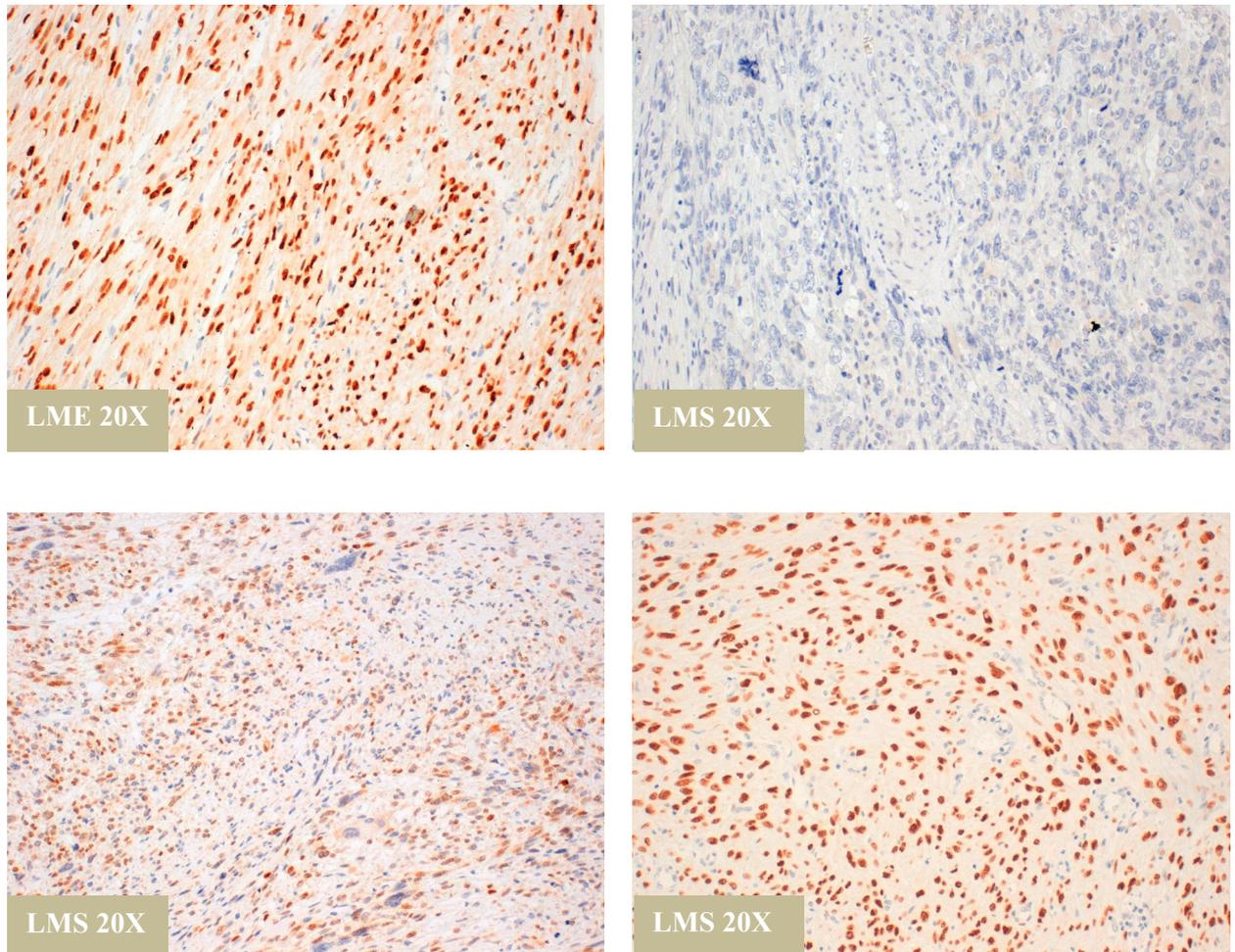


Figura 67: Imágenes de la expresión de RRPP en distintos tumores
LME: leiomioma especial, LMS: leiomiosarcoma

En los estudios 2 a 2 obtuvimos una relación estadísticamente significativa entre rango y diagnóstico con estos resultados: LMS frente a LMU ($p < 0,001$), entre LMS y LMC ($p \approx 0,005$), y entre LMS y LME ($p \approx 0,010$).

En los estudios por estado (positivo/negativo) también obtuvimos una relación significativa tanto en los estudios 2 a 2 entre los grupos tumorales ($p < 0,005$), como en el que incluía todos los grupos ($p < 0,001$).

En nuestra serie la expresión de RRPP suele acompañarse de la positividad frente a RREE en los LMS. De los 16 LMS, 7 casos no expresaron ninguna de las 2 proteínas, 8 casos expresaron

ambas, en rangos similares en la mayor parte de ellos, y únicamente un caso presentó expresión de RRPP y fue negativo frente a RREE. Así pues, de los En el grupo de los LMS observamos una correlación entre la expresión de los RREE y los RRPP ($p \approx 0,004$).

VASULARIZACIÓN:

CD31

El estudio de este marcador endotelial se realizó en primer lugar para comprobar la expresión en las células tumorales, y en segundo lugar para observar la angiogénesis en los diferentes grupos y evaluar las diferencias.

En primer lugar se comprobó que tanto el miometrio control, como los diferentes grupos de LM y los LMS no expresaron esta proteína, salvo en los endotelios vasculares, que sirvieron de control interno. Únicamente un caso de LMS expresó de forma leve una tinción citoplasmática en algunas de sus células, probablemente debido a una difusión del anticuerpo o reacción cruzada (figura 68). Este caso también expresaba una tinción citoplasmática frente a CD34, c-erb-B2 y c-kit a nivel citoplasmático.

En la valoración de la densidad vascular, no observamos una mayor densidad vascular, en ninguno de los grupos, que se relacionase estadísticamente con el diagnóstico anatomopatológico ($p \approx 0,262$). También valoramos la ramificación vascular, sin encontrar diferencias entre los distintos diagnósticos.

No observamos una relación estadísticamente significativa en los estudios 2 a 2 entre los diferentes grupos tumorales, incluyendo, LMS frente a LMU ($p \approx 1$), LMS frente a LMC ($p \approx 0,229$), y LMS frente a LME ($p \approx 0,204$).

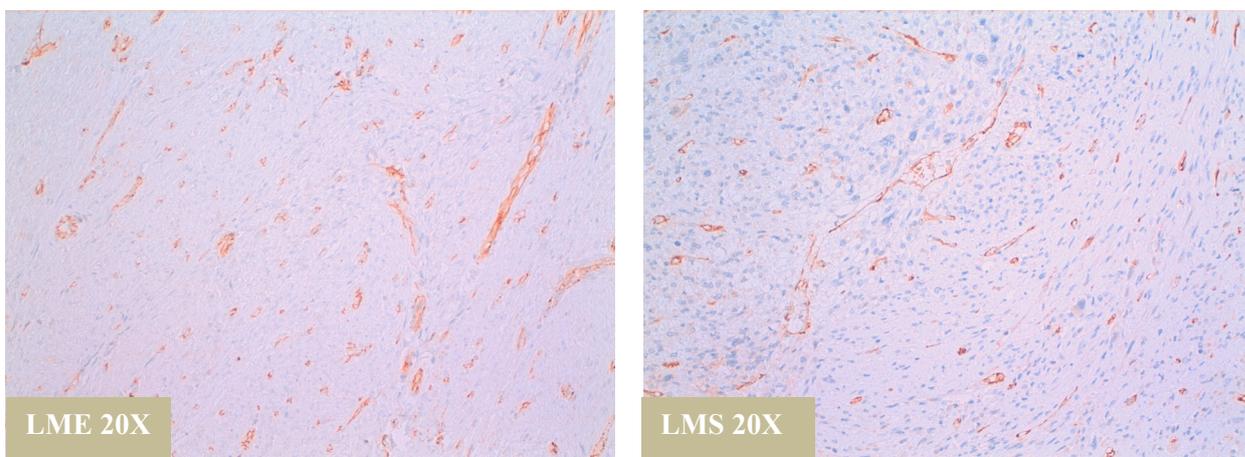


Figura 68: Imágenes de la expresión de CD31 en distintos tumores
LME: leiomioma especial, LMS: leiomiosarcoma

CD34

Realizamos un segundo marcador de angiogénesis, el CD34, encontrándonos resultados similares a los de CD31. En primer lugar las células de UC fueron negativas, así como las células tumorales de todos los LM y LMS, a excepción de un caso de LMS, comentado en el apartado anterior (Figura 67).

En cuanto a las formaciones vasculares, no hubo una relación estadísticamente significativa entre la expresión de esta proteína y el diagnóstico anatomopatológico ($p \approx 0,474$).

Tampoco encontramos ninguna relación estadísticamente significativa en los estudios 2 a 2 entre los diferentes grupos tumorales, incluyendo, LMS frente a LMU ($p \approx 0,400$), LMS frente a LMC ($p \approx 0,710$), y LMS frente a LME ($p \approx 0,358$).

No observamos alteraciones en la morfología vascular, ni aumento significativo de la ramificación en ninguno de los grupos.

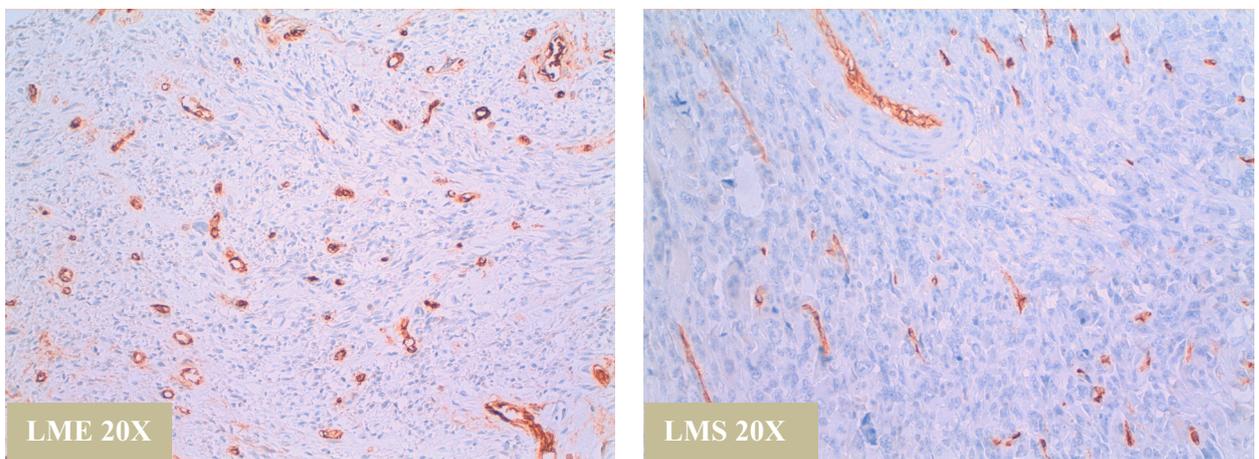


Figura 69: Imágenes de la expresión de CD34 en distintos tumores
LME: leiomioma especial, LMS: leiomiosarcoma

OTROS**CD44**

La proteína CD44 se expresó en mayor medida en los UC, LMU y LME con aproximadamente una expresión en el 60% de los casos, siendo menos frecuente en los LMC y LMS donde se expresó en alrededor del 25% de los casos.

El 46,2% de los UC (6 casos), el 43,3% de los LMU (13 casos), el 75% de los casos de LMC (12 casos), el 42,9% de los LME (6 casos, 3 LM plexiformes, un LMA, un LM con patrón vascular, y un LM mitóticamente activo) y el 75% de los LMS (12 casos, incluyendo 3 LMS de bajo grado y 9 LMS de alto grado) presentaron una positividad nula o por debajo del 11%. En un rango de entre el 11-30% se encontraron el 15,4% de los UC (2 casos), el 10% de los LMU

(3 casos), el 6,3% de los LMC (1 caso), el 21,4% de los LME (3 casos, un LMA, un LM epitelioide, un LM plexiforme) y el 12,5% de los LMS (2 casos, 2 LMS de alto grado). En un rango entre el 31-75% se presentaron el 38,5% de los UC (5 casos), el 40% de los LMU (12 casos), el 6,3% de los LMC (1 caso), 28,6% de los LME (4 casos, 3 LMA y 1 LM plexiforme) y 12,5% de los LMS (2 casos, un LMS de bajo grado y un LMS de alto grado). Por último con más de 75% de las células positivas, se vieron el 6,7% de los LMU (2 casos), 12,5% de LMC (2 casos) y 7,5% de LME (1 caso, LM mitóticamente activo), sin ningún caso de UC ni LMS. Esta variabilidad no mostró una relación estadísticamente significativa entre la expresión de esta proteína y el diagnóstico la serie estudiada ($p \approx 0,258$) (figura 70 y 71).

CD44

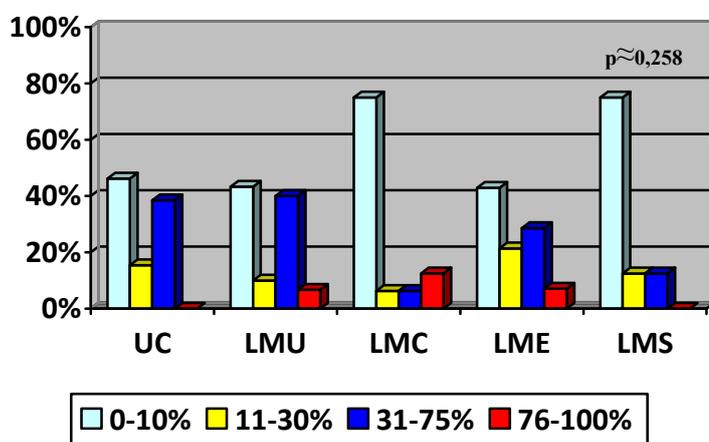


Figura 70: Diagrama de barras del rango de expresión de CD44 en los distintos grupos UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

En los estudios 2 a 2 entre el grupo de LMS frente a los LM no se observó en ninguno de ellos una relación significativa entre el rango de expresión de CD44 y el diagnóstico anatomopatológico. Los resultados obtenidos fueron, el estudio entre los LMS y LMU ($p \approx 0,130$), entre LMS y LMC ($p \approx 0,446$), y entre LMS y LME ($p \approx 0,290$).

Por estado (positivo/negativo), tampoco encontramos una relación estadísticamente significativa en ninguno de los estudios, tanto 2 a 2 entre LMS y los distintos grupos de LM, obteniendo entre LMS y LMU ($p \approx 0,063$), entre LMS y LMC ($p \approx 1$), y entre LMS y LME ($p \approx 0,135$), ni en el estudio de todos los grupos ($p \approx 0,086$).

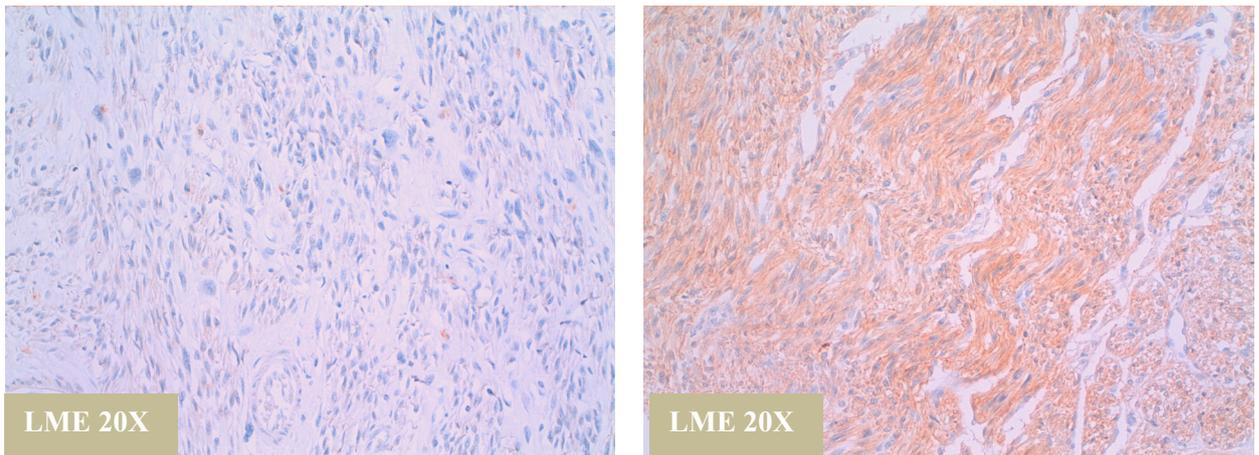


Figura 71: Imágenes de la expresión de CD44
LME: leiomioma especial,

OCT3/4

La proteína OCT fue más extensamente positiva en LMU y LMC (en más del 80% de los casos), y más heterogénea en los LME y LMS (figura 72 y 73).

Se constató una correlación altamente significativa entre el rango de expresión de la proteína OCT3/4 y el diagnóstico anatomopatológico ($p < 0,005$). Con un rango de positividad entre el 0-10% se observan el 46,2% de los controles, el 3,3% de los LMU, el 28,6% de los LME (un LMA, un LM mitóticamente activo, y 2 LM plexiformes) y el 18,8% de LMS. En un rango de expresión de entre el 11-30% se obtuvieron el 3,3% de LMU, 14,3% de LME (un LMA y un LM plexiforme), y 18,8% de LMS. En un rango de positividad de entre el 31-75% se encontraron el 30,8% de los controles, el 26,7% de LMU, el 18,8% de LMC, el 28,6% de LME (2 LM plexiformes, 2 LMA) y el 37,5% de los LMS. En un rango de expresión de entre el 76-100% se encontraron el 23,1% de los controles, el 66,7% de los LMU, el 81,3% de LMC, el 28,6% de LME (un LM epitelioides, un LM vascular, y un LMA), y el 25% de los LMS.

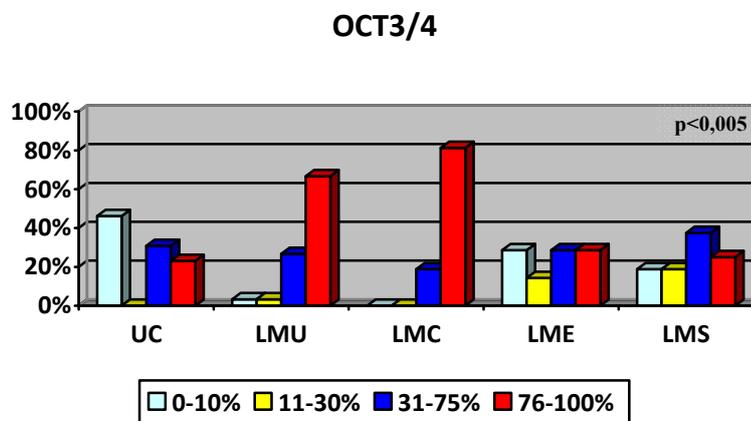


Figura 72: Diagrama de barras del rango de expresión de OCT 3/4 en los distintos grupos
UC: Útero control, LMU: leiomiomas usuales, LMC: leiomiomas celulares, LME: leiomiomas especiales, LMS: leiomiosarcomas

En los estudios 2 a 2 entre los LMS y los LM, observamos la relación entre el rango de expresión de OCT3/4 y el diagnóstico anatomopatológico tanto en el estudio entre LMS y LMU ($p \approx 0,023$) y entre LMS y LMC ($p \approx 0,008$), sin ser significativo en el estudio entre LMS y LME ($p \approx 0,894$).

Por estado (positivo/negativo), no encontramos una relación estadísticamente significativa en ninguno de los estudios, siendo los resultados entre LMS y LMU ($p \approx 0,114$), entre LMS y LMC ($p \approx 0,226$), y entre LMS y LME ($p \approx 0,675$).

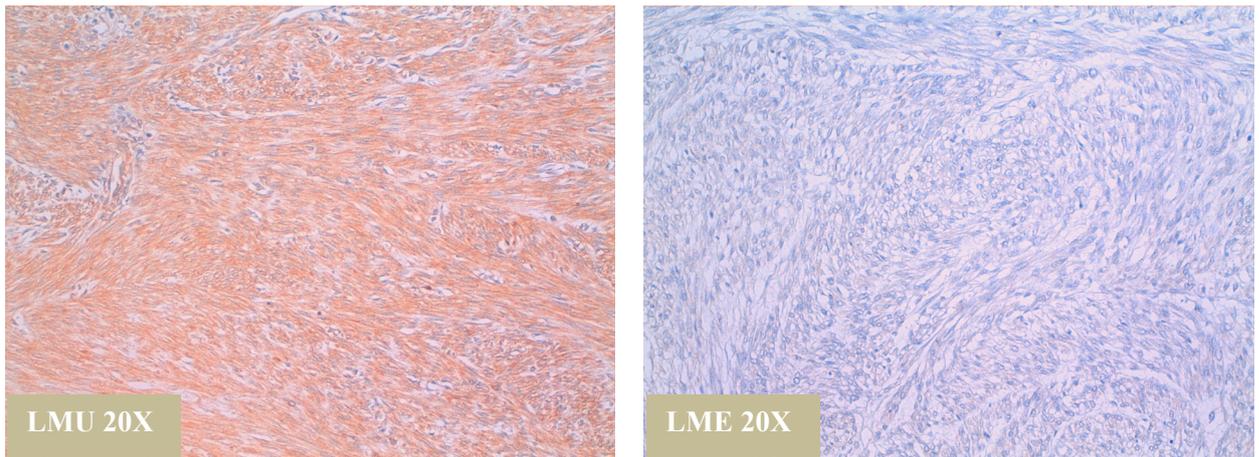


Figura 73: Imágenes de la expresión de OCT3/4
LMU: leiomioma usual, LME: leiomioma especial

Adjuntamos en la tabla 18 las variables anatomopatológicas e inmunohistoquímicas que resultaron significativas en todos los estudios.

Tabla 18: p valores significativos para las variables anatomopatológicas e inmunohistoquímicas

	Todos los grupos	LMS vs LMU	LMS vs LMC	LMS vs LME
Mitosis	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \approx 0,001$
Ki67	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$
Bcl-2	$p \leq 0,001$	$p \approx 0,003$	$p \approx 0,043$	$p \approx 0,045$
P53	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \approx 0,001$	$p \leq 0,001$
P21 intensidad	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \approx 0,024$
c-kit	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \approx 0,002$	$p \approx 0,004$
c-erb-B2	$p \leq 0,001$	$p \approx 0,002$	$p \approx 0,025$	$p \approx 0,038$
RRPP	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \approx 0,003$
RRPP intensidad	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \approx 0,005$	$p \approx 0,033$

LMS: leiomiosarcoma, LMU: leiomiomas usual, LMC: leiomioma celular, LME: leiomioma especial, RRPP: receptores de progesterona

4.3 HALLAZGOS CITOGENÉTICOS

4.3.1 RESULTADOS DEL FISH

En el estudio por FISH observamos un frecuente desdoblamiento de las señales de CEP 3 debido a que su centrómero es muy grande, viéndose 4 señales en algunas células que no se encontraban en G0 y que entraban en división. Excepto por este hecho, la habitual gran dimensión de la región pericentromérica del cromosoma 3 y el color rojo hicieron de esta sonda la más sencilla de evaluar en el conteo.

Las señales CEP 7, en verde con el filtro dual se podían confundir algunas veces con las señales amarillas, debido a la proximidad de sus longitudes de onda. El tamaño de la señal mucho mayor nos ayudó a diferenciar las dos señales cuando existía alguna duda.

Las señales de LSI 9p21, al marcar un gen locus específico, presentaban una señal muy pequeña, que tuvimos en cuenta en la valoración de las pérdidas.

Las señales de CEP 17, en aguamarina fueron visibles de forma correcta con el filtro específico, y fáciles de contabilizar.

En las muestras de útero control, muestras principales para la realización de los puntos de corte para la evaluación de las señales, no se observaron alteraciones numéricas, en las sondas estudiadas, siendo la celularidad claramente disómica, sin poblaciones celulares con más de 3 señales en células aisladas (tablas 19 a 22). En zonas con múltiples fascículos pequeños formado plexos pequeños observamos entre 1 a 4% de estructuras con 3 señales debido al solapamiento (ver tabla 14 de la sección material y métodos página 96).

Tabla 19: Porcentaje de células con 1, 2 o más señales para la sonda CEP3 en el útero control (realización del punto de corte)

CEP3	1 señal	2 señales	>2 señales
1	10%±1	86%±2	4%±1
2	12%±2	86%±3	2%±1
3	16%±2	83%±1	1%±1
4	10%±1	88%±1	2%±2
5	20%±1	78%±2	2%±2
6	12%±2	85%±1	3%±1
7	14%±1	83%±3	3%±2
8	10%±2	86%±3	4%±1
9	13%±1	84%±2	3%±1
10	12%±1	86%±3	2%±2
11	13%±2	83%±1	4%±1
12	12%±1	85%±2	3%±3
13	11%±2	87%±1	2%±1

Tabla 20: Porcentaje de células con 1, 2 o más señales en el útero control para la sonda CEP7 (realización del punto de corte)

CEP 7	1 señal	2 señales	>2 señales
1	13%±2	85%±3	2%±1
2	15%±1	83%±3	2%±2
3	20%±2	78%±1	2%±1
4	12%±1	85%±2	3%±1
5	20%±1	76%±1	4%±2
6	20%±1	77%±3	3%±2
7	15%±2	81%±1	4%±1
8	15%±1	83%±3	2%±2
9	15%±3	82%±2	3%±1
10	23%±2	74%±1	3%±1
11	21%±1	77%±3	2%±2
12	21%±1	76%±2	3%±1
13	18%±1	81%±1	1%±2

Tabla 21: Porcentaje de células con 1, 2 o más señales en el útero control para la sonda LSI 9p21 (realización del punto de corte)

LSI 9p21	1 señal	2 señales	>2 señales
1	17%±1	82%±3	1%±2
2	17%±2	83%±1	0%±1
3	24%±1	74%±1	2%±2
4	19%±1	83%±2	0%±1
5	23%±1	75%±1	2%±2
6	22%±2	75%±1	3%±3
7	16%±2	84%±1	0%±1
8	20%±1	81%±2	0%±2
9	17%±1	81%±1	2%±2
10	26%±2	74%±1	0%±1
11	24%±2	75%±1	1%±3
12	21%±1	79%±1	0%±2
13	18%±1	81%±2	1%±1

Tabla 22: Porcentaje de células con 1, 2 o más señales en el útero control para la sonda CEP17 (realización del punto de corte)

CEP 17	1 señal	2 señales	>2 señales
1	15%±1	81%±2	4%±1
2	19%±1	79%±1	2%±2
3	21%±1	78%±2	1%±3
4	16%±1	83%±1	1%±2
5	21%±1	78%±2	1%±3
6	17%±1	81%±2	2%±1
7	15%±1	85%±1	0%±2
8	18%±2	81%±3	1%±1
9	19%±1	78%±1	3%±2
10	23%±2	75%±1	2%±1
11	20%±2	78%±2	3%±1
12	21%±2	76%±1	3%±1
13	16%±2	82%±3	2%±1

Se estudió el tejido adyacente a distintos tumores de cada grupo, incluyendo 6 LMU (LMU 10, 11, 13, 16, 18 y 30), 3 LMC (LMC 3, 10 y 15); 4 LME (LME 2, 7, 11 y 13) y 6 LMS (LMS 2, 4, 6, 10, 11 y 14).

En estas muestras, encontramos unos resultados interesantes. En los LMS, las alteraciones genéticas halladas en los tumores, no se observaron el tejido próximo, a excepción de un caso, el caso 2, donde se observó una ganancia en las señales de CEP3, siendo disómica para el resto de sondas, al igual que el tumor (tablas 23 a 26).

Tabla 23: Porcentaje de células observadas con 1, 2 o más señales en el tejido adyacente para la sonda CEP 3 (realización del punto de corte)

CEP 3	1 señal	2 señales	>2 señales
1 LMU10	7%	83%	10%
2 LMU11	9%	80%	11%
3 LMU13	6%	85%	9%
4 LMU16	9%	79%	12%
5 LMU18	9%	78%	13%
6 LMU30	6%	82%	12%
7 LMC3	4%	85%	11%
8 LMC10	6%	86%	8%
9 LMC15	5%	82%	13%
10 LME2	4%	85%	11%
11 LME7	6%	84%	10%
12 LME11	5%	86%	9%
13 LME13	7%	87%	6%
14 LMS2	4%	64%	32%
15 LMS4	9%	77%	14%
16 LMS6	7%	71%	22%
17 LMS10	7%	78%	15%
18 LMS11	5%	77%	18%
19 LMS14	7%	79%	14%

LMU: leiomioma usual, LMC: leiomioma celular, LME: leiomioma especial, LMS: leiomiosarcoma

Tabla 24: Porcentaje de células observadas con 1, 2 o más señales en el tejido adyacente para la sonda CEP 7 (realización del punto de corte)

CEP 7	1 señal	2 señales	>2 señales
1 LMU10	4%	85%	11%
2 LMU11	0%	90%	10%
3 LMU13	7%	85%	8%
4 LMU16	3%	86%	11%
5 LMU18	2%	88%	10%
6 LMU30	3%	85%	12%
7 LMC3	11%	86%	3%
8 LMC10	11%	89%	0%
9 LMC15	12%	88%	0%
10 LME2	14%	85%	1%
11 LME7	12%	88%	0%
12 LME11	11%	87%	2%
13 LME13	13%	87%	0%
14 LMS2	9%	82%	9%
15 LMS4	15%	73%	12%
16 LMS6	7%	84%	9%
17 LMS10	5%	81%	14%
18 LMS11	6%	83%	11%
19 LMS14	13%	79%	8%

LMU: leiomioma usual, LMC: leiomioma celular, LME: leiomioma especial, LMS: leiomiosarcoma

Tabla 25: Porcentaje de células observadas con 1, 2 o más señales en el tejido adyacente para la sonda LSI 9p21 (realización del punto de corte)

LSI 9p21	1 señal	2 señales	>2 señales
1 LMU10	14%	86%	0%
2 LMU11	15%	85%	0%
3 LMU13	11%	89%	0%
4 LMU16	13%	84%	0%
5 LMU18	14%	83%	3%
6 LMU30	16%	82%	2%
7 LMC3	13%	87%	0%
8 LMC10	11%	89%	0%
9 LMC15	16%	84%	0%
10 LME2	14%	82%	4%
11 LME7	14%	86%	0%
12 LME11	14%	86%	0%
13 LME13	15%	85%	0%
14 LMS2	21%	79%	0%
15 LMS4	20%	80%	0%
16 LMS6	18%	82%	0%
17 LMS10	20%	80%	0%
18 LMS11	18%	82%	0%
19 LMS14	16%	84%	0%

LMU: leiomioma usual, LMC: leiomioma celular, LME: leiomioma especial, LMS: leiomiosarcoma

Tabla 26: Porcentaje de células observadas con 1, 2 o más señales en el tejido adyacente para la sonda CEP 17 (realización del punto de corte)

CEP 17	1 señal	2 señales	>2 señales
1 LMU10	10%	90%	0%
2 LMU11	12%	82%	0%
3 LMU13	10%	85%	5%
4 LMU16	11%	89%	0%
5 LMU18	14%	84%	2%
6 LMU30	15%	82%	3%
7 LMC3	13%	87%	0%
8 LMC10	11%	89%	0%
9 LMC15	9%	91%	0%
10 LME2	13%	85%	2%
11 LME7	15%	85%	0%
12 LME11	14%	86%	0%
13 LME13	10%	86%	4%
14 LMS2	15%	82%	3%
15 LMS4	14%	78%	8%
16 LMS6	11%	81%	3%
17 LMS10	12%	79%	9%
18 LMS11	12%	82%	6%
19 LMS14	13%	84%	3%

LMU: leiomioma usual, LMC: leiomioma celular, LME: leiomioma especial, LMS: leiomiosarcoma

En el tejido fetal, las células, más poligonales y redondeadas sufrieron en menor medida el efecto del corte, y se visualizaron las disomías fácilmente. Este grupo se observaron en apenas entre un 1-3% de celularidad con más de 2 señales, siendo la celularidad mayoritariamente disómica para todas las sondas (tablas 27 a 30).

Tabla 27: Porcentaje de células observadas con 1, 2 o más señales en el útero fetal para la sonda CEP 3 (realización del punto de corte)

CEP 3	1 señal	2 señales	>2 señales
1	4%±2	94%±3	2%±1
2	2%±1	95%±1	3%±2
3	5%±1	92%±2	3%±1
4	5%±1	94%±3	1%±2
5	5%±2	92%±4	3%±2
6	4%±2	94%±3	2%±1
7	3%±1	94%±2	3%±1
8	2%±2	96%±3	2%±1
9	4%±1	93%±2	3%±1
10	2%±2	96%±1	2%±1
11	3%±2	95%±4	2%±2
12	3%±2	94%±3	3%±1
13	5%±2	92%±4	3%±2
14	3%±1	94%±3	3%±2

Tabla 28: Porcentaje de células observadas con 1, 2 o más señales en el útero fetal para la sonda CEP 7 (realización del punto de corte)

CEP 7	1 señal	2 señales	>2 señales
1	6%±1	92%±3	2%±2
2	7%±1	92%±1	1%±2
3	5%±2	93%±3	2%±1
4	7%±1	91%±3	2%±2
5	5%±2	92%±3	3%±1
6	4%±2	94%±4	2%±2
7	5%±1	93%±3	2%±2
8	6%±2	92%±4	2%±2
9	5%±1	93%±2	2%±1
10	7%±1	92%±2	1%±1
11	5%±2	93%±3	2%±1
12	8%±1	90%±3	3%±2
13	6%±1	92%±3	2%±2
14	5%±2	93%±4	2%±2

Tabla 29 Porcentaje de células observadas con 1, 2 o más señales en el útero fetal para la sonda LSI 9p21 (realización del punto de corte)

LSI 9p21	1 señal	2 señales	>2 señales
1	11%±1	86%±4	3%±3
2	9%±3	88%±1	3%±2
3	11%±2	88%±3	1%±1
4	11%±2	89%±2	0%
5	12%±2	87%±1	1%±1
6	12%±2	88%±2	0%±1
7	14%±2	84%±4	2%±2
8	15%±2	84%±3	1%±1
9	12%±2	87%±1	1%±1
10	10%±1	88%±1	2%±2
11	13%±1	85%±3	2%±2
12	12%±2	87%±1	1%±1
13	8%±2	91%±3	1%±1
14	9%±1	89%±2	2%±1

Tabla 30: Porcentaje de células observadas con 1, 2 o más señales en el útero fetal para la sonda CEP 3 (realización del punto de corte)

CEP 17	1 señal	2 señales	>2 señales
1	7%±1	91%±2	2%±1
2	6%±1	92%±3	2%±2
3	6%±1	91%±2	3%±1
4	7%±1	90%±4	3%±3
5	5%±1	93%±2	2%±1
6	6%±3	92%±2	2%±1
7	7%±2	90%±1	3%±1
8	9%±2	91%±1	0%±1
9	7%±1	91%±2	2%±1
10	6%±1	91%±1	3%±2
11	8%±1	89%±3	3%±2
12	6%±1	93%±2	1%±1
13	8%±2	90%±4	2%±2
14	3%±1	95%±2	2%±1

Además, realizamos un conteo en todos los controles internos con tejidos no uterinos en las muestras. Observando tejido renal, hepático y esplénico, que presentaban distinto grado de entrecruzamiento o solapamiento celular, tamaños celulares variables y tipos celulares diferentes. En estos tejidos, como se detalló en material y métodos se encontraron distinto número de señales, siendo en su mayoría disómicas para todas las sondas y sin observar en ningún caso de núcleos únicos aislados un número de señales superior a 2. Únicamente en entrecruzamientos nucleares (fácilmente distinguibles en los controles) observamos entre 1 a 3% de estructuras con 3 señales.

También se tomaron como referencia en las muestras de todos los tejidos tumorales, celularidad no tumoral, como las células endoteliales de los vasos sanguíneos, mastocitos, o linfocitos. Tampoco se observó un número de señales superior a 3, siendo celularidad disómica para todas las sondas en núcleos perfectamente individualizados

No se observaron alteraciones numéricas de las sondas estudiadas en ninguno de los casos de LM (usuales, celulares y con características especiales), siendo todos estos tumores disómicos para todas las sondas.

Los LMU se visualizaron con facilidad viéndose los núcleos más separados, sin gran efecto de empaquetado. La dificultad en este grupo resultó ser las diferentes direcciones de las células, y el efecto del corte. Los LMC, presentaron un empaquetamiento importante, con muchos núcleos yuxtapuestos, lo que dificultó la cuantificación. Sin embargo, en este grupo, la presencia de nucléolos prominentes fue frecuente y facilitó el estudio citogenético a la hora de evaluar los límites nucleares y la dirección del corte. Los LME, presentaron morfologías celulares dispares, sin dificultar en exceso el conteo, teniendo en cuenta las aisladas figuras de mitosis en los LM mitóticamente activos (figura 74).

Resumimos las medias obtenidas en el conteo de las señales de las 4 sondas estudiadas en los grupos de LMU (tablas 31 a 34), LMC (tablas 35 a 38) y LME (tablas 39 a 42).

Tabla 31: Resultados citogenéticos en el grupo de leiomiomas usuales: media de los porcentajes de células con número de señales visualizadas del CEP 3.

LMU	1 señal	2 señales	>3 señales
1	15%	80%	5%
2	7%	78%	15%
3	13%	71%	16%
4	11%	79%	10%
5	15%	71%	14%
6	12%	74%	14%
7	9%	86%	5%
8	14%	71%	15%
9	12%	78%	10%
10	10%	78%	12%
11	17%	74%	9%
12	7%	83%	10%
13	12%	78%	10%
14	15%	70%	15%
15	8%	75%	17%
16	16%	74%	10%
17	10%	78%	12%
18	16%	72%	12%
19	12%	73%	15%
20	14%	79%	7%
21	15%	72%	13%
22	14%	74%	12%
23	16%	70%	14%
24	7%	79%	14%
25	11%	84%	5%
26	16%	72%	12%
27	14%	71%	15%
28	15%	73%	12%
29	9%	86%	5%
30	10%	76%	14%

Tabla 32: Resultados citogenéticos en el grupo de leiomiomas usuales: media de los porcentajes de células con número de señales visualizadas del CEP 7.

LMU	1 señal	2 señales	>3 señales
1	4%	94%	2%
2	6%	88%	6%
3	2%	94%	4%
4	7%	91%	2%
5	15%	77%	8%
6	8%	82%	10%
7	15%	79%	6%
8	10%	85%	5%
9	5%	93%	2%
10	14%	81%	5%
11	4%	87%	9%
12	5%	88%	7%
13	10%	80%	10%
14	12%	81%	7%
15	7%	81%	12%
16	5%	87%	8%
17	6%	82%	12%
18	13%	82%	5%
19	9%	89%	2%
20	6%	92%	2%
21	8%	81%	11%
22	13%	83%	4%
23	5%	80%	15%
24	5%	83%	12%
25	8%	85%	7%
26	7%	88%	5%
27	18%	71%	11%
28	11%	76%	13%
29	19%	73%	8%
30	3%	82%	15%

Tabla 33: Resultados citogenéticos en el grupo de leiomiomas usuales: media de los porcentajes de células con número de señales visualizadas del LSI 9p21.

LMU	1 señal	2 señales	>3 señales
1	18%	80%	2%
2	12%	82%	6%
3	15%	83%	2%
4	14%	85%	1%
5	14%	84%	2%
6	17%	81%	2%
7	13%	86%	1%
8	13%	87%	0%
9	14%	86%	0%
10	16%	84%	0%
11	16%	88%	2%
12	18%	82%	0%
13	14%	86%	0%
14	12%	88%	0%
15	16%	84%	0%
16	18%	80%	2%
17	15%	85%	0%
18	15%	85%	0%
19	14%	86%	0%
20	15%	85%	0%
21	14%	86%	0%
22	16%	84%	0%
23	19%	79%	2%
24	15%	82%	3%
25	14%	86%	0%
26	19%	81%	0%
27	16%	82%	2%
28	14%	86%	0%
29	17%	83%	0%
30	19%	78%	3%

Tabla 34: Resultados citogenéticos en el grupo de leiomiomas usuales: media de los porcentajes de células con número de señales visualizadas del CEP 17.

LMU	1 señal	2 señales	>3 señales
1	14%	84%	2%
2	2%	83%	15%
3	13%	87%	0%
4	14%	76%	10%
5	18%	80%	2%
6	14%	74%	12%
7	11%	81%	8%
8	9%	85%	6%
9	14%	71%	15%
10	11%	89%	0%
11	14%	84%	2%
12	16%	71%	13%
13	10%	87%	3%
14	7%	93%	0%
15	11%	89%	0%
16	13%	85%	2%
17	12%	86%	2%
18	14%	81%	5%
19	11%	85%	4%
20	9%	81%	10%
21	13%	85%	2%
22	12%	88%	0%
23	17%	78%	5%
24	15%	85%	0%
25	13%	82%	5%
26	17%	71%	12%
27	17%	78%	5%
28	15%	80%	5%
29	19%	79%	2%
30	15%	73%	12%

Tabla 35: Resultados citogenéticos en el grupo de leiomiomas celulares: media de los porcentajes de células con número de señales visualizadas del CEP 3.

LMC	1 señal	2 señales	>2 señales
1	5%	83%	12%
2	4%	82%	14%
3	5%	83%	12%
4	8%	75%	17%
5	5%	80%	15%
6	5%	80%	15%
7	7%	79%	14%
8	5%	82%	13%
9	5%	82%	13%
10	8%	80%	12%
11	6%	81%	13%
12	5%	82%	13%
13	7%	79%	14%
14	6%	81%	15%
15	5%	83%	12%
16	7%	80%	13%

Tabla 36: Resultados citogenéticos en el grupo de leiomiomas celulares: media de los porcentajes de células con número de señales visualizadas del CEP 7.

LMC	1 señal	2 señales	>2 señales
1	12%	84%	4%
2	7%	91%	2%
3	10%	90%	0%
4	10%	90%	0%
5	12%	85%	3%
6	10%	90%	0%
7	14%	84%	2%
8	11%	84%	5%
9	10%	90%	0%
10	12%	86%	2%
11	12%	84%	4%
12	9%	89%	2%
13	11%	89%	0%
14	10%	85%	5%
15	8%	92%	0%
16	13%	84%	3%

Tabla 37: Resultados citogenéticos en el grupo de leiomiomas celulares: media de los porcentajes de células con número de señales visualizadas del LSI 9p21.

LMC	1 señal	2 señales	>2 señales
1	15%	85%	0%
2	12%	87%	0%
3	16%	84%	0%
4	14%	86%	0%
5	13%	87%	0%
6	14%	86%	0%
7	17%	83%	0%
8	15%	85%	0%
9	16%	84%	0%
10	15%	85%	0%
11	12%	88%	0%
12	14%	86%	0%
13	18%	82%	0%
14	14%	86%	0%
15	19%	81%	0%
16	17%	83%	0%

Tabla 38: Resultados citogenéticos en el grupo de leiomiomas celulares: media de los porcentajes de células con número de señales visualizadas del CEP 17.

LMC	1 señal	2 señales	>2 señales
1	10%	90%	0%
2	7%	93%	0%
3	9%	91%	0%
4	12%	83%	5%
5	11%	87%	2%
6	12%	88%	0%
7	10%	90%	0%
8	13%	84%	3%
9	16%	84%	0%
10	14%	86%	0%
11	19%	81%	0%
12	18%	82%	0%
13	16%	84%	0%
14	13%	87%	0%
15	12%	88%	0%
16	15%	85%	0%

Tabla 39: Resultados citogenéticos en el grupo de leiomiomas especiales: media de los porcentajes de células con número de señales visualizadas del CEP 3.

LME	1 señal	2 señales	>2 señales
1	8%	87%	5%
2	11%	85%	4%
3	13%	79%	8%
4	10%	88%	2%
5	11%	83%	6%
6	12%	88%	0%
7	14%	81%	5%
8	15%	83%	2%
9	12%	88%	0%
10	12%	81%	7%
11	10%	90%	0%
12	13%	85%	2%
13	14%	86%	0%
14	12%	88%	0%

Tabla 40: Resultados citogenéticos en el grupo de leiomiomas especiales: media de los porcentajes de células con número de señales visualizadas del CEP 7.

LME	1 señal	2 señales	>2 señales
1	11%	89%	0%
2	8%	87%	5%
3	10%	85%	5%
4	12%	88%	0%
5	9%	86%	5%
6	10%	89%	1%
7	7%	90%	3%
8	12%	88%	0%
9	14%	86%	0%
10	13%	84%	3%
11	15%	85%	0%
12	14%	86%	0%
13	11%	89%	0%
14	13%	87%	0%

Tabla 41: Resultados citogenéticos en el grupo de leiomiomas especiales: media de los porcentajes de células con número de señales visualizadas del LSI 9p21.

LME	1 señal	2 señales	>2 señales
1	17%	83%	0%
2	15%	85%	0%
3	13%	87%	0%
4	15%	85%	0%
5	16%	84%	0%
6	14%	86%	0%
7	14%	86%	0%
8	17%	83%	0%
9	19%	81%	0%
10	16%	84%	0%
11	17%	83%	0%
12	19%	81%	0%
13	16%	84%	0%
14	19%	81%	0%

Tabla 42: Resultados citogenéticos en el grupo de leiomiomas especiales: media de los porcentajes de células con número de señales visualizadas del CEP 17.

LME	1 señal	2 señales	>2 señales
1	14%	86%	0%
2	11%	87%	2%
3	11%	89%	0%
4	10%	90%	0%
5	12%	88%	0%
6	14%	86%	0%
7	11%	89%	0%
8	13%	87%	0%
9	12%	86%	2%
10	15%	83%	2%
11	14%	82%	4%
12	16%	84%	0%
13	13%	87%	0%
14	13%	87%	0%

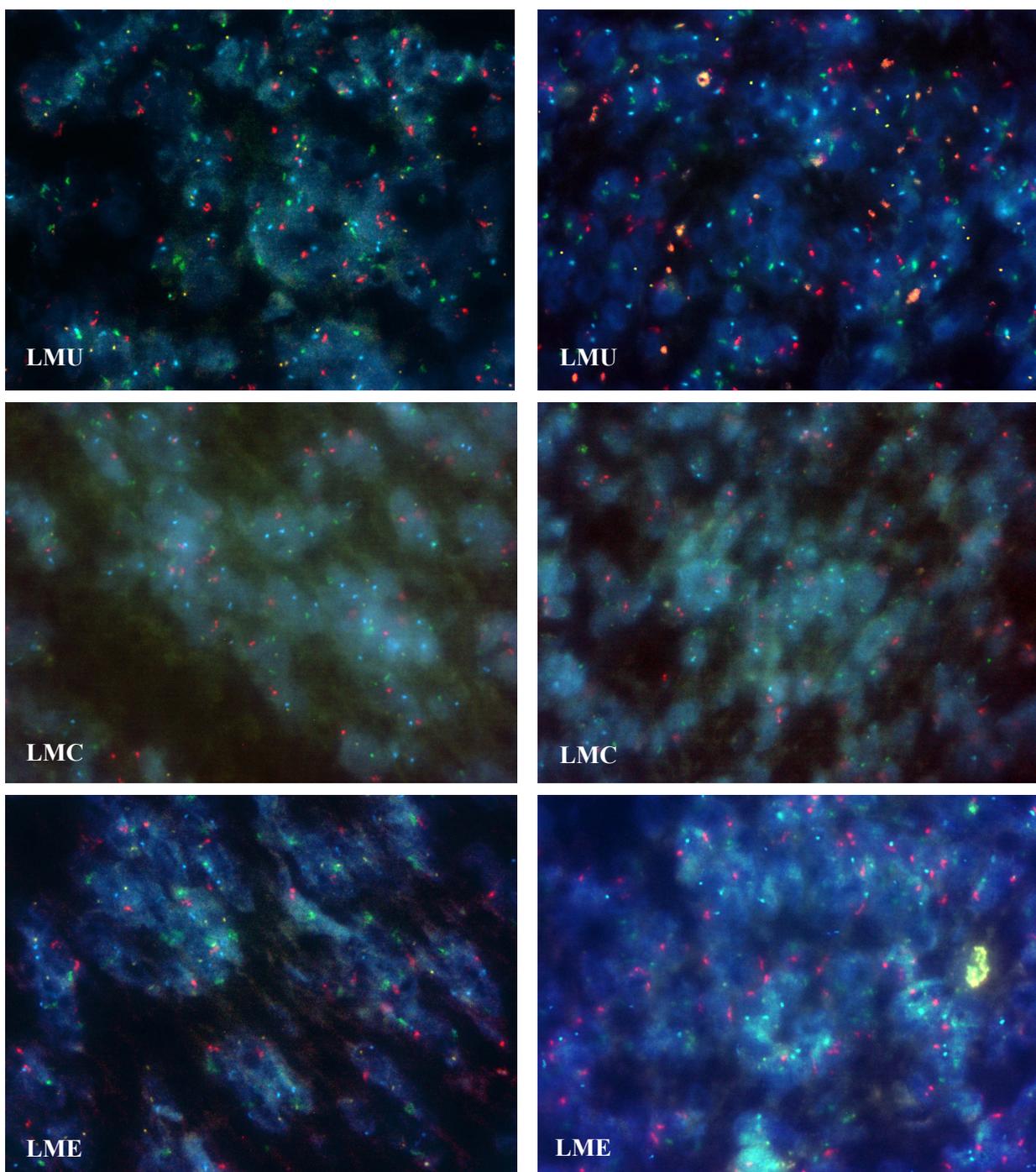


Figura 74: Imágenes de los hallazgos con FISH de leiomiomas
LMU: leiomioma usual, LMC: leiomioma celular, LME: leiomioma especial.

Obtuvimos numerosas alteraciones numéricas del las sondas estudiadas en el grupo de los LMS (tabla 43) utilizando los puntos de corte mencionados en el material y métodos (tabla 14 página 98).

Quince de los 16 casos presentaron cambios numéricos de las señales fluorescentes. (93,8%).

La alteración más frecuente fue una ganancia de las señales del cromosoma 3, observándose en 14 de 16 casos (87,5% de los casos), hubo dos casos disómicos (12,5%) y ningún caso con pérdidas (tabla 44).

En segundo lugar, se observó una ganancia del cromosoma 17 en 10 de los 16 casos (62,5% de los casos). Este cromosoma fue disómico en 6 casos (37,5%), y no se observaron pérdidas en ningún caso (tabla 47).

En tercer lugar se observó una ganancia del cromosoma 7 en 6 de 16 casos (37,5% de los casos), siendo disómico en 10 casos (62,5% de los casos), sin objetivarse pérdidas (tabla 45).

En último lugar se observaron ganancias del locus específico 9p21 en 6 de 16 casos (37,5% de los casos), siendo disómico en 9 casos (56,3% de los casos), y mostrando pérdidas en un único caso (6,3%) (tabla 46).

En 3 de los 16 casos (18,75% de los casos) se observaron ganancias de todas las señales estudiadas, y en 10 casos se observaron 2 o más alteraciones (62,5% de los casos)

Únicamente un caso de LMS (caso N°13) presentó pérdidas en las señales del locus específico 9p21, con un 30% de la celularidad visualizada con una única señal. En las señales de los cromosomas 3, 7 y 17 no se observaron pérdidas en ningún caso, como muestra la figura 75. Mostramos distintas imágenes de los patrones de las alteraciones encontradas en el grupo de los LMS la figura 76.

Tabla 43: Resumen de los resultados citogenéticos en el grupo de leiomiomas: media de los porcentajes de células con ganancias de cada una de las señales estudiadas.

Caso n°	CEP 3	CEP 7	LOCUS 9p21	CEP17
1	22,5 %	15 %	10 %	5 %
2	37,50 %	7,50 %	10 %	5 %
3	45 %	37,50 %	32,50 %	40 %
4	43,30 %	36,70 %	23,30 %	30 %
5	60 %	60 %	5 %	75 %
6	30 %	12,50 %	30 %	20 %
7	62,50 %	57,50 %	50 %	50 %
8	30 %	17,50 %	20 %	17,50 %
9	70 %	45 %	35 %	55 %
10	37,50 %	37,50 %	67,50 %	20 %
11	51,60 %	20 %	6,7 %	30 %
12	47,50 %	20 %	5 %	47,50 %
13	30 %	7,50 %	7,50 %	5 %
14	50 %	7,50 %	7,50 %	52,50 %
15	17,50 %	12,50 %	5 %	40 %
16	35 %	15 %	30 %	30 %

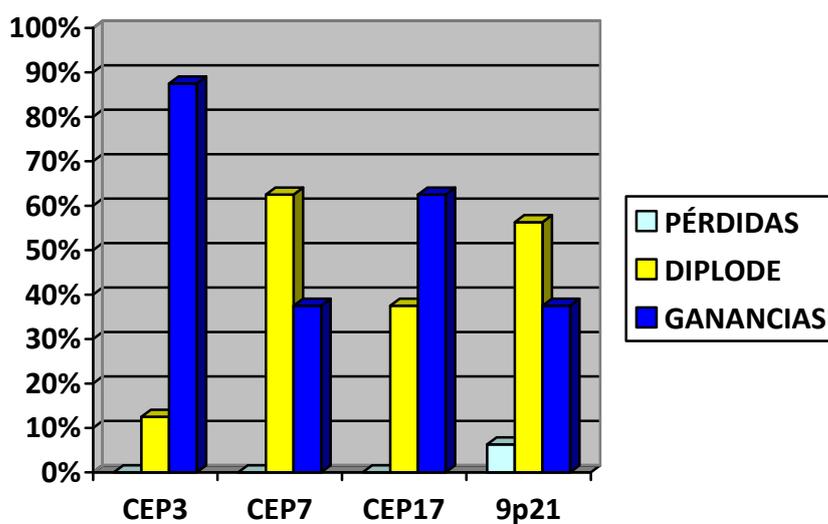


Figura 75: Diagrama de barras de los resultados de FISH por sondas estudiadas

Tabla 44: Resultados citogenéticos en el grupo de leiomiomas: media de los porcentajes de células con número de señales visualizadas del CEP 3.

LMS	1 señal	2 señales	3 señales	>3señales	Resultado
1	2,5 %	78 %	10 %	9,5 %	Disómico
2	2,5 %	50 %	30 %	17,5 %	Ganancia
3	0 %	55 %	7,5 %	37,5 %	Ganancia
4	0 %	56,4 %	17,5 %	23,3 %	Ganancia
5	0 %	40 %	30 %	30 %	Ganancia
6	10 %	52 %	28 %	10 %	Ganancia
7	5 %	35 %	20 %	42,5 %	Ganancia
8	10 %	55 %	25 %	10 %	Ganancia
9	0 %	30 %	12,5 %	57,5 %	Ganancia
10	12,5 %	50 %	30 %	7,5 %	Ganancia
11	10 %	38,3 %	11,7 %	40 %	Ganancia
12	5 %	47,5 %	20 %	27,5 %	Ganancia
13	7,5 %	62,5 %	10 %	20 %	Ganancia
14	10 %	40 %	25 %	25 %	Ganancia
15	15 %	67,5 %	15 %	2,5 %	Disómico
16	5 %	60 %	25 %	10 %	Ganancia

Tabla 45: Resultados citogenéticos en el grupo de leiomiomas: media de los porcentajes de células con número de señales visualizadas del CEP 7.

LMS	1 señal	2 señales	3 señales	>3señales	Resultado
1	7,5 %	77,5 %	10 %	5 %	Disómico
2	5 %	87,5 %	7,5 %	0 %	Disómico
3	0 %	62,5 %	10%	27,5%	Ganancia
4	0 %	63,3 %	10%	26,7 %	Ganancia
5	0 %	40 %	30 %	30 %	Ganancia
6	15 %	72,5 %	12,5 %	0%	Disómico
7	0 %	42,5 %	37,5 %	20%	Ganancia
8	12,5 %	70 %	15 %	2,5%	Disómico
9	0 %	55 %	12,5 %	32,5 %	Ganancia
10	5 %	57,5 %	25 %	12,5 %	Ganancia
11	10 %	70 %	17,5 %	2,5 %	Disómico
12	0 %	80 %	10 %	10 %	Disómico
13	15 %	77,5 %	7,5 %	0 %	Disómico
14	15 %	77,5 %	5 %	2,5 %	Disómico
15	15 %	72,5 %	10 %	2,5 %	Disómico
16	5 %	80 %	10 %	5 %	Disómico

Tabla 46: Resultados citogenéticos en el grupo de leiomiomas: media de los porcentajes de células con número de señales visualizadas de LSI 9p21.

LMS	1 señal	2 señales	3 señales	>3señales	Resultado
1	12,5 %	77,5 %	7,5 %	2,5 %	Disómico
2	15 %	75 %	10 %	0 %	Disómico
3	0 %	67,5 %	5 %	27,5 %	Ganancia
4	13,3 %	63,4 %	10 %	13,3 %	Disómico
5	12,5 %	82,5 %	2,5 %	2,5 %	Disómico
6	7,5 %	62,5 %	25 %	5 %	Ganancia
7	12,5 %	37,5 %	27,5 %	22,5 %	Ganancia
8	10 %	70 %	17,5 %	2,5 %	Disómico
9	7,5 %	57,5 %	12,5 %	22,5 %	Ganancia
10	5 %	27,5 %	27,5 %	40 %	Ganancia
11	10 %	83,3 %	6,7 %	0 %	Disómico
12	10 %	85 %	0 %	5 %	Disómico
13	30 %	62,5 %	5 %	2,5 %	Pérdida
14	15 %	77,5 %	5 %	2,5 %	Disómico
15	15 %	80 %	5 %	0 %	Disómico
16	5 %	65 %	20 %	10 %	Ganancia

Tabla 47: Resultados citogenéticos en el grupo de leiomiomas: media de los porcentajes de células con número de señales visualizadas de CEP 17.

LMS	1 señal	2 señales	3 señales	>3señales	Resultado
1	17,5 %	77,5 %	5 %	0 %	Disómico
2	15 %	80 %	5 %	0 %	Disómico
3	0 %	60 %	5 %	35 %	Ganancia
4	15,3 %	54,7 %	13,3 %	16,7 %	Ganancia
5	0 %	25 %	27,5 %	47,5 %	Ganancia
6	12,5 %	67,5 %	20 %	0 %	Disómico
7	7,5 %	42,5 %	20 %	30 %	Ganancia
8	10 %	72,5 %	15 %	2,5 %	Disómico
9	0 %	45 %	10 %	45 %	Ganancia
10	10 %	70 %	20 %	0 %	Disómico
11	10,7 %	59,3 %	16,7 %	13,3 %	Ganancia
12	0 %	52,5 %	30 %	17,5 %	Ganancia
13	12,5 %	82,5 %	5 %	0 %	Disómico
14	0 %	47,5 %	27,5 %	25 %	Ganancia
15	15 %	45 %	32,5 %	7,5 %	Ganancia
16	10 %	60 %	20 %	10 %	Ganancia

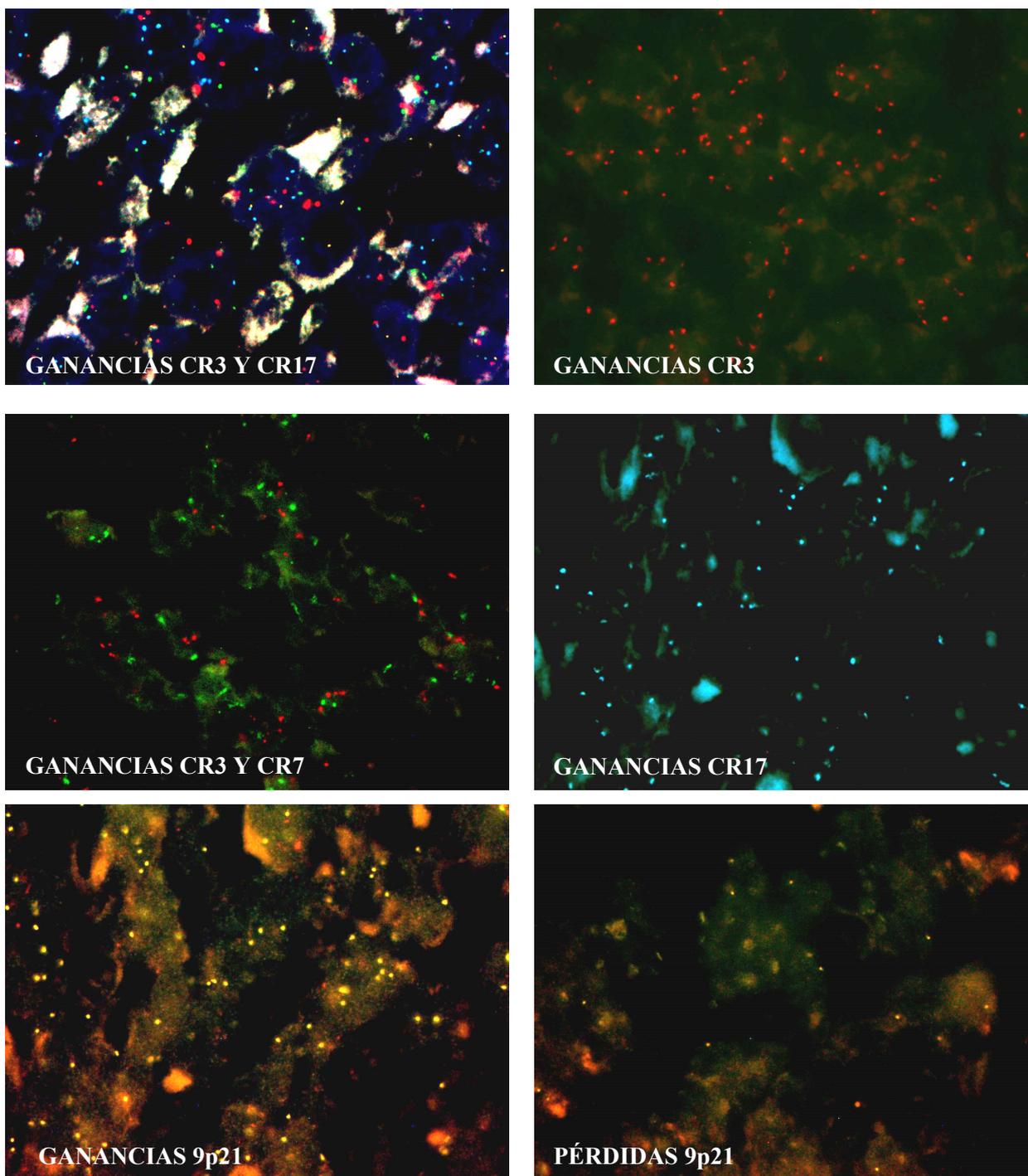


Figura 76: Imágenes de los hallazgos con FISH en leiomyosarcomas

En el análisis estadístico, observamos una correlación estadísticamente significativa entre los hallazgos en cada una de las sondas y el diagnóstico anatomopatológico (tabla 48), tanto en el estudio incluyendo todos los grupos tumorales ($p \leq 0,001$) con la v de Cramer, como en los estudios 2 a 2 entre los distintos grupos (utilizando el test exacto de Fisher para CEP 3, CEP 7 y CEP 17, y la v de Cramer para LSI 9p21).

Tabla 48: Resumen de los p valores

	CEP 3	CEP 7	CEP 17	LSI 9p21
LMS vs LMU	$p \leq 0,001$	$p \approx 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$
LMS vs LMC	$p \leq 0,001$	$p \approx 0,018$	$p \leq 0,001$	$p \approx 0,011$
LMS vs LME	$p \leq 0,001$	$p \approx 0,019$	$p \leq 0,001$	$p \approx 0,018$

LMS: leiomiomas; LMU: leiomiomas usuales; LMC: leiomiomas celulares; LME: leiomiomas especiales.

4.3.2 RESULTADOS DE LOS SNPs

Para los estudios de SNPs fueron seleccionados según los criterios de calidad (reflejados en material y métodos) 10 casos, 6 LMS, y 4 LMA.

Se cuantificó el ADN con la prueba con Picogreen®, obteniéndose en todos los casos una cantidad óptima de ADN para realizar el estudio. También se procedió a confirmar la calidad del ADN mediante la realización de la qPCR. El resultado obtenido fue que todos los casos a excepción de 3, eran óptimos para continuar con el proceso. Los casos, los cuales presentaron una calidad baja fueron 2 LMS (nº10 y nº15) y un LMA (nº7). Se volvió a repetir todo el procedimiento anterior para estos tres casos, para confirmar su escasa calidad, y por tanto que debían ser eliminados del estudio. Con los 7 casos restantes (4 LMS y 3 LMA) se procedió a realizar el estudio, obteniendo como resultados que todos presentaron una cantidad variable de alteraciones. Presentamos a continuación los resúmenes de los 7 casos estudiados, mostrando con más detalle los resultados de los SNPs.

Los tres LMA fueron disómicos en el estudio FISH (cromosomas 3, 7, 17 y locus específico 9p21) y presentaron en los SNP diferentes alteraciones que predominaron en el cromosoma 1 (pérdidas y ganancias) sin presentar relación con ningún dato clínico, IHQ o con los resultados del FISH (tabla 49).

LMA: caso n°1

Este caso pertenecía a una mujer de 25 años, nuligesta, con clínica de sangrado y una lesión de 8cm de diámetro máximo. El estudio IHQ mostró la falta de expresión de p16 y RREE siendo positiva frente a RRPP. El estudio FISH no mostró alteraciones numéricas de las sondas estudiadas (CEP3, CEP 7, CEP 17, LSI 9p21). En el estudio con SNP se encontraron 5 alteraciones segmentarias (s) localizadas todas ellas en el cromosoma 1, 1p-(ter-36.11), +1p (36.11-31.1) (31.1-22.3), +1q (21.1-32.2), siendo estas dos últimas intersticiales, 1q-(32.2-ter), así como una aberración cromosómica focal segmentaria en el cromosoma (FSCA) 3, FSCA +3q29 (anexos 6 a 8)

LMA: caso n°2

En este caso de LMA en una mujer de 45 años, con 3 gestaciones previas, no menopáusica, con clínica de sangrado, se estudió un tumor de 3 cm. La lesión, negativa inmunohistoquímicamente frente a p16 y RREE, sí que presentó positividad frente a RRPP. El estudio FISH no mostró

alteraciones numéricas de las sondas estudiadas. En los resultados de los SNP se pusieron en evidencia 12 deleciones segmentarias incluyéndose 1p-(ter-36.12) (35.3-34.2) (31-11.2) que eran alteraciones intersticiales, y 2q-(11.2-12.2) (14.2-23.3) (24.1-24.3) (32.2-ter), una FSCA 2p-(p12) y una copia neutral con pérdida de heterocigosidad en (CNLOH) 2q (31.1-31.2) (anexos 9 a 11)

LMA: caso n°3

Este caso con diagnóstico de LMA, en una mujer de 52 años, con 5 gestaciones, se manifestó con una clínica de sangrado vaginal anormal en una mujer menopáusica. El tamaño tumoral fue de 5cm, y en el estudio inmunohistoquímico, la lesión fue negativa frente a p16 y RREE y positiva frente a RRPP. El estudio FISH no presentó alteraciones numéricas de los cromosomas 3, 7 y 17 ni del locus específico 9p21.

En el estudio con SNP, se hallaron únicamente 2 deleciones segmentarias del alelo A en el brazo largo del cromosoma 1; 1q-(31.2-ter) y el brazo corto y parte del brazo largo del cromosoma 6; 6pq-(ter-q14.1) (anexos 12 a 14)

Tabla 49: Resumen de los resultados de los leiomiomas atípicos

	LMA 1	LMA 2	LMA 3
Clínica	25años, sangrado	45años, sangrado	51años, sangrado
Tamaño	8 cm	3 cm	5 cm
IHQ	p16-/ RREE-/ RRPP+	p16-/ RREE-/ RRPP+	p16-/ RREE-/ RRPP+
FISH	Disómico	Disómico	Disómico
	a0s5:	a0s12:	a0s2:
	1p- (ter-36.11), +1p (36.11-31.1) (31.1-22.3), +1q (21.1-32.2), 1q- (32.2-ter) FSCA +3q29	1p-(ter-36.12) (35.3-34.2) (31-11.2), 2q-(11.2-12.2) (14.2-23.3) (24.1- 24.3) (32.2-ter), FSCA 2p-(p12) CNLOH 2q(31.1-31.2).	1q-(31.2-ter), 6pq-(ter-q14.1)

LMA: leiomioma atípico; IHQ: inmunohistoquímica; RREE: receptores de estrógenos; RRPP: receptores de progesterona, FISH: hibridación in situ fluorescente, SNP: polimorfismo de nucleótido simple; a: amplificación, s: alteración segmentaria, FSCA: aberración cromosómica focal segmentaria. CNLOH: número de copias neutro con pérdida de heterocigosidad.

Los 4 LMS presentaron alteraciones diversas en el estudio con SNP, mayoritariamente pérdidas segmentarias, viéndose una tendencia a correlacionarse el número de alteraciones segmentarias con el tamaño tumoral (tabla 50). También encontramos correlaciones entre los resultados SNP y el FISH como en el caso nº 11 que presentó tanto una pérdida de 9p21 con los estudios de SNP, una pérdida en el número de señales de 9p21 con FISH, y una ausencia de expresión proteica de p16. Sin embargo, no se observaron relación entre las alteraciones genéticas y la clínica.

LMS-BG: caso nº4

En este LMS de BG de una mujer de 47 años, con 4 gestaciones previas, no menopáusica con sintomatología de prolapso, se estudió una lesión de 0,5 cm, con un perfil inmunohistoquímico que mostraba positividad frente a p16, y receptores hormonales. En nuestro estudio con FISH observamos ganancias numéricas en los cromosomas 3, 7 y 17, si observarse alteraciones en 9p21. Los resultados de los SNP mostraron una única alteración CNLOH 17p(12-11.2), sin observarse alteraciones segmentarias ni amplificaciones (anexos 15 y 16)

LMS-BG: caso nº8

Este caso pertenecía a una mujer de 43 años, con 3 gestaciones previas, no menopáusica, que debutó con clínica de dolor, con una lesión de 1,8 cm. En el estudio inmunohistoquímico, las células tumorales expresaron p16 y receptores hormonales. En el estudio FISH se observaron únicamente ganancias del cromosoma 3, siendo diploide en el resto de sondas. Los resultados de los SNP mostraron 2 alteraciones segmentarias incluyendo 3q-(24-25.2), y 4 CNLOH 1p(33-32.3), 6p(22.2-22.1), 11p(15.4-15.3), 13q(32.2-33.1) (anexos 17 a 22)

LMS-BG: caso nº11

Este caso de una mujer de 81 años, con 4 gestaciones previas, menopáusica desde los 52 años, acudió a nuestro centro con clínica de dolor. La lesión tenía un tamaño máximo de 10 cm, y en el estudio IHQ no expresó p16, siendo positivo frente a receptores hormonales. En el estudio con FISH, se encontraron ganancias en los cromosomas 3 y 17, y pérdida de 9p21. Los resultados de los SNP mostraron dos alteraciones segmentarias, ambas pérdidas, una en el cromosoma 5, 5p-(ter-13.3), y otra en el cromosoma 9, que incluía la región de 9p21, 9p-(ter-13.1) (anexos 23 a 25)

LMS-BG: caso nº13

Este caso correspondiente a una mujer de 79 años, con historia de una gestación previa, y menopáusica desde los 48 años, presentó clínica de dolor con sangrado asociado, y una tumoración de 20 cm. El estudio inmunohistoquímico mostró negatividad de expresión frente a

p16, siendo las células tumorales positivas frente a receptores hormonales (estrógenos y progesterona). En el estudio FISH se observó únicamente una ganancia numérica en el cromosoma 3, siendo diploide en el resto de sondas. Los resultados de los SNP pusieron en evidencia 15 deleciones segmentarias, todas ellas pérdidas, incluyendo 1p-, 2q-(24.1-ter), 3p-(12.3-11.1), 3q-(21.1-26.32), 5q-(14.3(x2)) siendo estas tres últimas intersticiales, 6p-, 8p-(ter-11.21), 10q-(22.3-24.32), 14q- (23.3-24.3), 22q-(11.21-ter) y una amplificación en el brazo corto del cromosoma 3, a(3p21.31) (anexos 26 a 35).

Tabla 50: Resumen de los resultados de los leiomiomas

	LMS 4	LMS 8	LMS 11	LMS 13
Clínica	47años, prolapso	43años, dolor	81años, dolor	79años, dolor y sangrado
Tamaño	0,5 cm	1,8 cm	10 cm	20 cm
IHQ	p16+/ RREE+/ RRPP+	p16+/ RREE+/ RRPP+	p16-/ RREE+/ RRPP+	p16-/ RREE+/ RRPP+
FISH	Ganancia de los cr 3, 7, 17	Ganancia del cr.3	Ganancia de los cr.3 y 17, pérdida de 9p21	Ganancia del cr.3
SNP	a0s0: CNLOH 17p(12- 11.2),	a0s2: 3q-(24-25.2), CNLOH 1p(33-32.3), 6p(22.2-22.1), 11p(15.4-15.3), 13q(32.2-33.1).	a0s2: 5p-(ter-13.3), 9p-(ter-13.1)	a1s15: a(3p21.31). 1p-, 2q-(24.1-ter), 3p-(12.3-11.1), 3q-(21.1-26.32), 5q-(14.3(x2)), 6p-, 8p-(ter-11.21), 10q-(22.3- 24.32), 14q- (23.3-24.3), 22q-(11.21-ter)

LMS: leiomioma; IHQ: inmunohistoquímica; RREE: receptores de estrógenos; RRPP: receptores de progesterona; FISH: hibridación in situ fluorescente, cr: cromosoma; SNP: polimorfismo de nucleótido simple; a: amplificación, s: alteración segmentaria, CNLOH: número de copias neutro con pérdida de heterocigosidad, FSCA: aberración cromosómica focal segmentaria.

4.4 RELACIÓN ENTRE HALLAZGOS CLÍNICOS Y CITOGENÉTICOS

Este estudio lo realizamos únicamente en el grupo de los LMS, ya que fue el único grupo que presentó alteraciones citogenéticas.

No encontramos ninguna relación significativa con la v de Cramer entre el **tamaño tumoral** y las distintas alteraciones citogenéticas detectadas con FISH en el grupo de los LMS. (CEP3 $p \approx 0,319$, CEP7 $p \approx 0,319$, 9p21 $p \approx 0,501$, CEP 17 $p \approx 0,319$).

Tampoco encontramos relación estadística entre el **número de mitosis** mayor o menor de 15 mitosis en 10 CGA y las alteraciones citogenéticas, realizado con el test exacto de Fisher para CEP3, CEP7 y CEP17, y con la v de Cramer para LSI9p21 (CEP3 $p \approx 0,475$, CEP7 $p \approx 1$, 9p21 $p \approx 0,106$, CEP 17 $p \approx 0,633$).

También analizamos la relación entre la aparición de **metástasis** (en cualquier momento de la enfermedad) y los hallazgos citogenéticos, sin resultados significativos, realizado con el test exacto de Fisher para CEP3, CEP7 y CEP17, y con la v de Cramer para LSI9p21 (CEP3 $p \approx 0,487$, CEP7 $p \approx 0,293$, 9p21 $p \approx 0,501$, CEP 17 $p \approx 0,293$).

Para completar nuestro trabajo, realizamos con el grupo de los LMS un estudio estadístico para ver si las alteraciones citogenéticas tenían relación con los **éxitus**. Ninguna de estas relaciones fue estadísticamente significativa.

En los 16 casos de LMS los 2 casos disómicos para el **cromosoma 3** habían fallecido; sin embargo de los 14 casos con ganancias de señales de este cromosoma 6 estaban vivos, y 8 habían fallecido ($p \approx 0,242$).

De los 10 casos disómicos para el **cromosoma 7**, 2 estaban vivos, y 8 murieron. Y en los 6 casos con ganancias de señales de este cromosoma, 4 viven, y 2 han fallecido ($p \approx 0,062$). Ese resultado se aproximaba más a la significación, pero al contar con pocos casos, no es valorable.

Tampoco fueron estadísticamente significativos los resultados con el **cromosoma 17**, mostrando de los 6 casos con señales disómicos, 3 fallecidos y 3 vivos; y de los 10 casos con ganancias, 7 fallecidos y 3 casos vivos ($p \approx 0,424$).

Lo mismo ocurrió con el **locus 9p21**, de los 9 casos con señales disómicos habían 4 vivos y 5 fallecidos; el único caso con pérdidas de esta señal se encontraba fallecido, y de los 6 casos con ganancias, 2 casos estaban vivos y 4 fallecidos ($p \approx 0,660$).

La escasez en el número de casos de LMS y la frecuente presencia de alteraciones citogenéticas en nuestra serie no nos permite realizar un estudio estadístico valorable, aunque sería interesante reevaluar estos parámetros en grupos más amplios.

4.5 RELACIÓN ENTRE HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS Y CITOGENÉTICOS

Nos propusimos encontrar la relación entre las alteraciones citogenéticas en el grupo de los LMS y la expresión IHQ.

RELACIÓN ENTRE CROMOSOMA 3 Y β CATENINA

En el cromosoma 3 encontramos el gen de la *β catenina*. Estudiamos la relación entre la expresión de esta proteína en nuestros LMS y la comparamos con las alteraciones numéricas de las señales del cromosoma 3 encontradas en el FISH (figura 77). La ganancia del cromosoma 3 fue la norma, así como la expresión de esta proteína. De los 16 LMS, todos los casos con una expresión de β catenina por encima del 11% de la celularidad tumoral, 4 con rango de expresión de entre el 11-30% y 6 con un rango de expresión de entre el 31-75%, presentaron ganancias de las señales del cromosoma 3 en el estudio FISH. Por otro lado de los 6 casos restantes, con expresión en menos del 10% de su celularidad de β catenina, encontramos 2 casos (33,3%) diploides y 4 casos (66,7%) con ganancia del cromosoma 3.

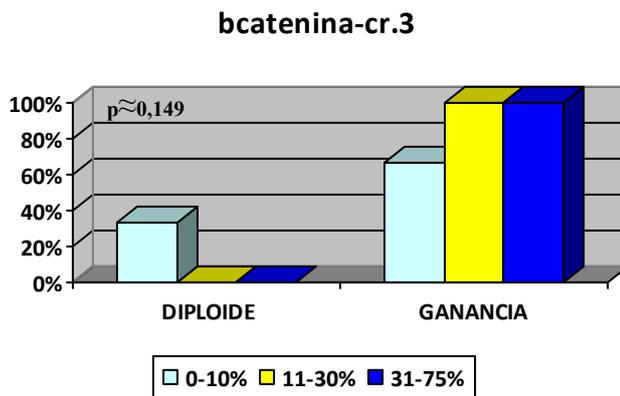


Figura 77: Diagrama de barras con relación de la expresión de β catenina y ploidía del cromosoma 3 en el estudio FISH

-RELACIÓN ENTRE CROMOSOMA 17 Y p53

El gen de *p53* se encuentra en el cromosoma 17. Estudiamos la relación entre el rango de expresión de la proteína y las alteraciones numéricas observadas en el FISH (figura 78). De los 16 casos destaquemos 2 casos que presentaron un rango de expresión de *p53* por encima del 75%, ambos con ganancias de las señales del cromosoma 17 en el FISH. Por otro lado hubo 7 casos con un rango de expresión de *p53* entre 0-10% de los cuales 3 (42,9%) eran disómicos y 4 (57,1%) presentaron ganancia de las señales del cromosoma 17. En un rango de expresión entre el 11-30% encontramos 3 casos, siendo 2 disómicos (66,7%) y el otro (33,3%) presentó

ganancias de las señales del cromosoma 17. 4 casos tuvieron un rango de expresión de p53 entre el 31-75%, uno de ellos (25%) resultó disómico y los otros 3 (75%) presentaron ganancias en el FISH. Ninguno de nuestros casos presentó pérdidas numéricas del cromosoma 17.

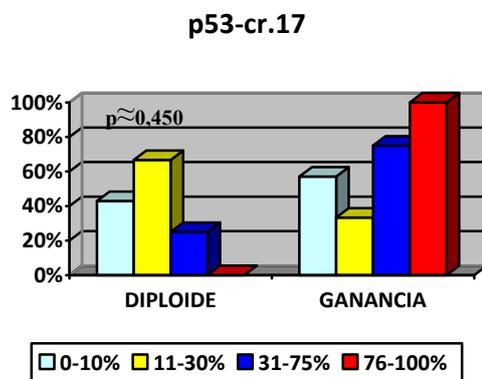


Figura 78: Diagrama de barras con relación de la expresión de p53 y ploidía del cromosoma 17 en el estudio FISH

-RELACIÓN ENTRE CROMOSOMA 17 Y C-ERB-B2

El gen *erb2* se encuentra en el cromosoma 17. Realizamos un estudio estadístico entre los hallazgos citogenéticos del número de señales del cromosoma 17 y la expresión IHQ de c-erb B2 en el grupo de los LMS (figura 79).

De los 16 casos de nuestra serie, destaquemos 3 casos que fueron positivos frente a c-erb-B2 con 31-75% de las células positivas, presentando todos ellos ganancias todos ellos del cromosoma 17. 10 casos presentaron una expresión de c-erb-B2 nula o menor del 11%, siendo 5 casos (50%) disómicos y 5 casos (50%) con ganancias de las señales del cromosoma 17. 3 casos presentaron un rango de expresión de entre el 11-30%, siendo 1 disómico (33,3%) y 2 (66,7%) con ganancias en el FISH. Ningún caso de nuestro estudio presentó pérdidas de las señales del cromosoma 17.

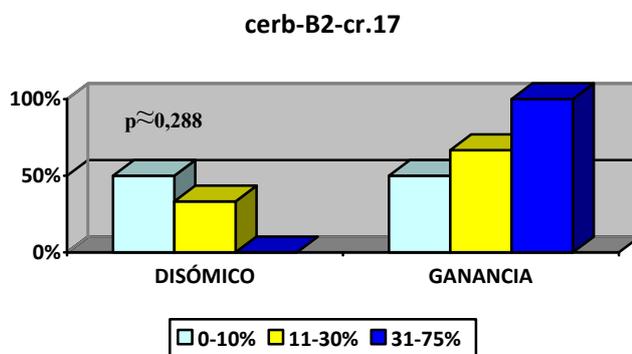


Figura 79: Diagrama de barras con relación de la expresión de c-erb-B2 y ploidía del cromosoma 17 en el estudio FISH

-RELACIÓN ENTRE EL LOCUS ESPECÍFICO 9p21 Y p16

En nuestra serie de 16 casos de LMS observamos una relación estadística entre las alteraciones citogenéticas de *9p21* y su expresión proteica por la p16 (figura 80). De 7 casos con un rango de expresión de p16 superior al 75% de las células (43,8% de los casos), observamos ganancias a nivel citogenético por FISH en 6 casos (85,7%), mientras que un caso resultó disómico (14,3%). En un rango de expresión entre el 11-30% y el 31-75% de las células encontramos 6 casos, 3 en cada rango, resultando todos ellos disómico en el estudio citogenético. Finalmente en el rango de expresión de p16 menor o igual al 10% de la celularidad tumoral, se observó un único caso con pérdidas en el FISH (33,3% de estos casos) que además asociaba pérdida de 9p21 en los estudios de SNP y 2 casos disómicos (66,7% de los casos en este rango). Todos estos resultados presentaron una relación estadísticamente significativa ($p \approx 0,012$).

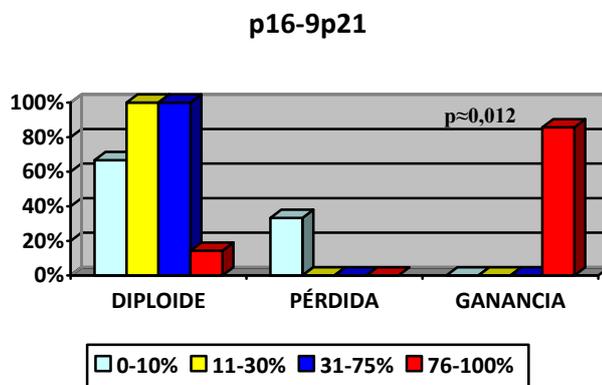


Figura 80: Diagrama de barras con relación de la expresión de p16 y ploidía del LSI 9p21 en el estudio FISH

4.6 ASOCIACIÓN DEL INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD Y LOS PARÁMETROS CLÍNICOS Y ANATOMOPATOLÓGICOS

El tiempo de seguimiento medio en los grupos de LM en su conjunto fue de 71,2 meses., con una mediana de 59,5.meses, desviación estándar de 38,1, con un mínimo de 39 meses y un máximo de 202 meses. En la tabla 51 resumimos los datos descriptivos por grupos.

Tabla 51: Tiempo de seguimiento de los leiomiomas

ILE	Media	Mediana	Desv.Estandar	Mín	Max
LMU	52,7	51,5	10,1536	41	91
LMC	89,938	76	34,9084	42	150
LME	89,571	65	58,0301	39	202

ILE: intervalo libre de enfermedad; LMU: leiomiomas usual; LMC: leiomioma celular; LME: leiomioma especial; Desv. Estándar: desviación estándar; Min: mínimo; Max: máximo

Realizamos un estudio estadístico incluyendo todas nuestras variables en relación al ILE con curvas de Kaplan-Meier. Este estudio se realizó únicamente en el grupo de los LMS, con el gran factor limitante del número de casos a la hora de interpretar los resultados, ya que no tuvimos ningún caso en los grupos de LM con recidiva tumoral. Realizamos el estudio recodificando los resultados en 2 categorías:

- en el estudio citogenético como alterado/ no alterado;
- en el estudio IHQ como negativos (incluyendo aquí las positividades entre el 0-10% de las células) y positivos (positividad en más del 10% de la celularidad)
- también realizamos en el conteo mitótico, dos grupos, tomando como límite 15 mitosis en 10 CGA.

El tiempo máximo de seguimiento los 16 LMS fue de 288 meses, y con un mínimo de 2 meses. En el estudio del ILE se incluyen los datos de los 16 casos, mientras que en los de la SG únicamente de 8 casos, ya que 8 casos seguían vivos al final del seguimiento. En cuanto al ILE, se observó una media de 82,66 meses, y una mediana de 23,5 meses (tabla 52).

Tabla 52: Parámetros descriptivos de los leiomiomas en el intervalo libre de enfermedad

ILE	Media	Mediana	Desv.Estandar	Mín	Max
en meses	82,66	23,5	99,483	0	288

ILE: Intervalo libre de enfermedad; ILE: intervalo libre de enfermedad; Desv. Estándar: desviación estándar; Min: mínimo; Max: máximo

De los 16 casos, 9 recidivaron (tabla 53), 8 de ellos diagnosticados como LMS de alto grado y un caso con diagnóstico de LMS de bajo grado en una mujer de 79 años de 20 cm (LMS nº13).

Los 8 casos de alto grado, uno de ellos ya tenía una extensión peritoneal al diagnóstico, y otro caso fue una recidiva peritoneal 19 meses tras la excisión del primario.

Dos caso más, fueron recidivas peritoneales, al mes y medio y a los 5 meses.

Escasos resultados fueron estadísticamente relevantes debido a la escasez de casos de LMS, y a la homogeneidad en los resultados de muchas de nuestras variables. 3 casos tuvieron metástasis pulmonares, a los 0, 2 y 19 meses de la intervención, este último el de bajo grado. Un caso metastatizó a los 5 meses en pulmón e hígado, y por último, un caso tuvo una metástasis subcutánea a los 28 meses, siendo este último, el único caso que sigue vivo. La localización de recidiva y/o metástasis a distancia más frecuente fueron la abdominal y la pulmonar (figura 81).

Tabla 53: Resumen de los leiomiomas recidivados

LMS	ILE (meses)	SG	Edad	Tamaño (cm)	Mitosis	Localización
1	0	7	66	5	16-20	pulmón
3	5	5	80	20	16-20	abdomen
7	2	12	73	6,5	>20	pulmón
9	28	-	39	6	6-10	subcutánea
11	5	12	81	10	11-15	pulmón +hígado
12	19	79	48	6	≤5	abdomen
13	19	22	79	20	>20	pulmón
15	1,5	2	60	15	16-20	abdomen
16	0	27	44	16	>20	abdomen

LMS: leiomioma; ILE: intervalo libre de enfermedad; SG: supervivencia global

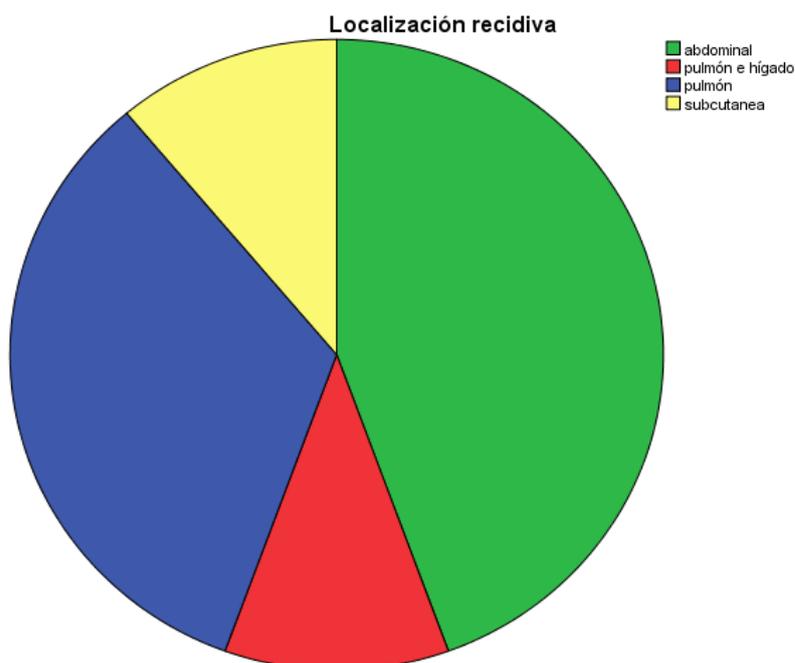


Figura 81: Resumen de las localizaciones de las recidivas tumorales

-EDAD AL DIAGNÓSTICO E ILE

En nuestra serie se observó un menor ILE en las pacientes de más de 65 años, los dos otros rangos presentaron un mayor ILE, poco valorable debido a la diferencia en el número de pacientes en cada grupo. Estos resultados no fueron significativos estadísticamente ($p \approx 0,37$) (figura 82)

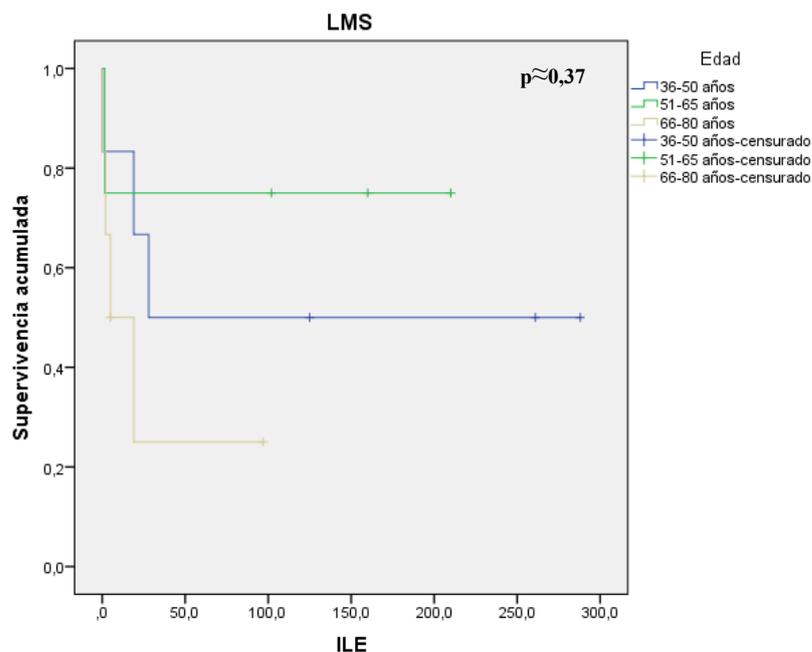


Figura 82: Intervalo libre de enfermedad por rangos de edad en leiomiosarcomas
LMS: leiomiosarcoma; ILE: intervalo libre de enfermedad

-TAMAÑO TUMORAL MÁXIMO E ILE

Las lesiones que recidivaron tuvieron un tamaño máximo de entre 5 y 20 cm., con una mediana de 10 cm, y una media de 11,6 cm. La lesión de menor tamaño recidivó en primer lugar, antes del mes de la intervención a nivel pulmonar. No se observó una relación estadística entre el tamaño máximo y el ILE en los LMS ($p \approx 0,369$).

-MITOSIS E ILE

El número de mitosis en 10 CGA, no fue un factor relacionado con el ILE ($p \approx 0,333$). De los 9 casos que recidivaron, 6 casos presentaron más de 15 mitosis en 10 CGA. De los 3 casos con menos de 15 mitosis en 10 CGA, uno presentó menos de 5 mitosis en 10 CGA (nº12) con un ILE de 19 meses; otro caso presentó entre 6 y 10 mitosis (nº9) con un ILE de 28 meses; y el tercero presentó entre 11 y 15 mitosis (nº11) con un ILE de 5 meses.

-MITOSIS + MEDIDA E ILE

Observamos en nuestra serie que lesiones que presentaban hasta 15 mitosis en 10 CGA y de menos de 10cm, tenían tendencia a un mayor ILE que las que no cumplían estas dos condiciones, sin ser estadísticamente significativo ($p \approx 0,158$) (figura 83).

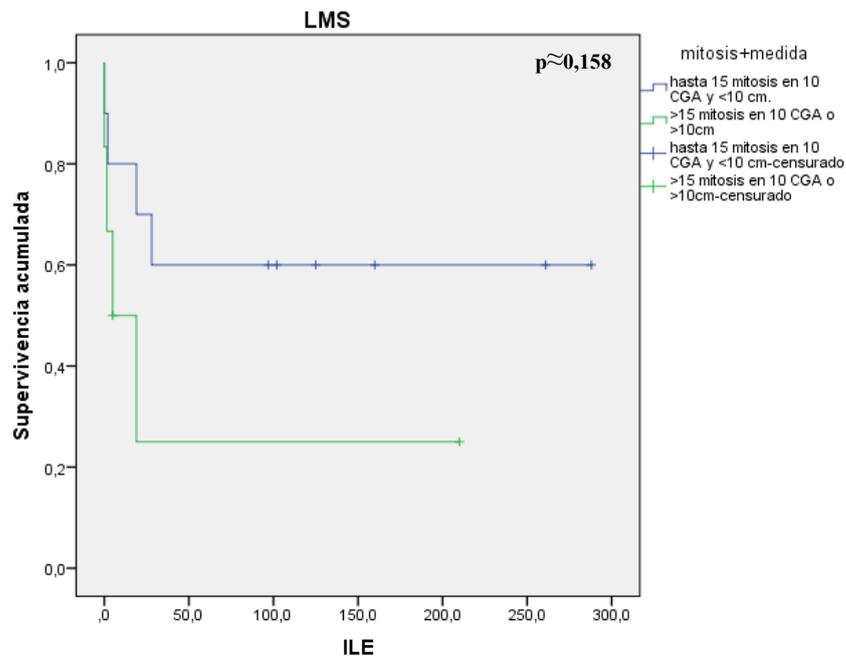


Figura 83: Intervalo libre de enfermedad en leiomiomas en relación con el tamaño tumoral junto al conteo de mitosis

LMS: leiomioma; ILE: intervalo libre de enfermedad

4.7 ASOCIACIÓN DEL INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD Y LOS HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS Y CITOGENÉTICOS

En nuestra serie, el factor limitante fue el número de casos con recidiva tumoral (9) y con posterior fallecimiento (8) para la obtención de resultados concluyentes. A pesar de esto, encontramos interesante valorar la relación de nuestros datos con el ILE y SG para valorar tendencias y compararlas con series publicadas.

Resumimos en estas tablas (tabla 54 y 55) los resultados obtenidos en el estudio entre los marcadores IHQ y el ILE:

Tabla 54: Resumen de leiomiomas con recidiva tumoral y los resultados inmunohistoquímicos más relevantes

LMS	ILE (meses)	SG (meses)	p53	p16	c-kit	RRPP
1	0	7	0	2	0	0
3	5	5	2	3	2	0
7	2	12	0	3	2	1
9	28		0	3	1	2
11	28	12	0	0	3	2
12	19	79	2	2	0	0
13	19	22	0	0	0	3
15	1,5	2	0	0	0	0
16	0	27	3	3	0	0

LMS: leiomioma; ILE: intervalo libre de enfermedad; SG: supervivencia global

Tabla 55: Resultados del estudio inmunohistoquímico en relación con el intervalo libre de enfermedad

ILE	Categoría LMS	Rango LMS
Ki67	p≈0,433	p≈0,574
p53	p≈0,017	p≈0,083
Bcl-2	p≈0,711	p≈0,963
Bax	-	-
Ciclina	p≈0,967	p≈0,376
p16	p≈0,054	p≈0,104
p21	p≈0,217	p≈0,217
p27	p≈0,212	p≈0,248
c-kit	p≈0,024	p≈0,053
PDGFR α	-	-
IGFR-1	p≈0,811	p≈0,575
c-erb-B2	p≈0,363	p≈0,645
E-caderina	-	-
Slug	p≈0,376	p≈0,822
Snail	p≈0,755	p≈0,548
β catenina	p≈0,225	p≈0,389
AKT	p≈0,651	p≈0,574
RREE	p≈0,837	p≈0,459
RRPP	p≈0,662	p≈0,345
CD44	p≈0,292	p≈0,413
OCT	p≈0,633	p≈0,278
CD31	-	p≈0,960
CD34	-	p≈0,401

LMS: leiomiocarcinoma; ILE: intervalo libre de enfermedad; RREE: receptores de estrógenos; RRPP: receptores de progesterona

P53

Esta proteína se expresó en únicamente 3 de los 9 casos que recidivaron, frente a los 6 casos positivos de los 7 casos que no recidivaron. En nuestra serie parecía significativo el mejor pronóstico de los casos positivos frente a p53, sin embargo la escasez de muestra hace difícil la interpretación de este resultado (figura 84)

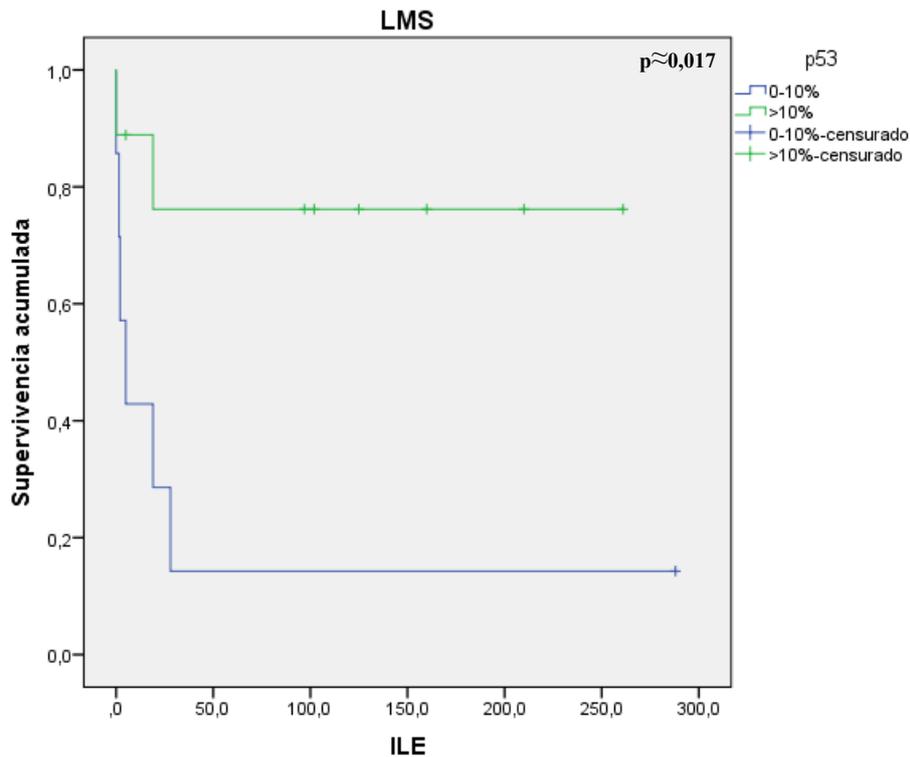


Figura 84: Intervalo libre de enfermedad en leiomiomas en relación a la expresión de p53
LMS: leiomioma; ILE: intervalo libre de enfermedad

C-kit

La expresión IHQ de c-kit se observó únicamente a nivel citoplasmático, y tan solo el grupo de los LMS. En este grupo se observó que la expresión de esta proteína se relacionaba con un mayor ILE (figura 85). 4 de los 9 casos que recidivaron fueron positivos frente a esta proteína, sin embargo de los 7 casos que no recidivaron, 6 expresaron a nivel citoplasmático c-kit, estos hallazgos resultaron estadísticamente significativos en el estudio por categorías ($p \approx 0,024$), y próximo a la significación en el estudio por rangos ($p \approx 0,053$).

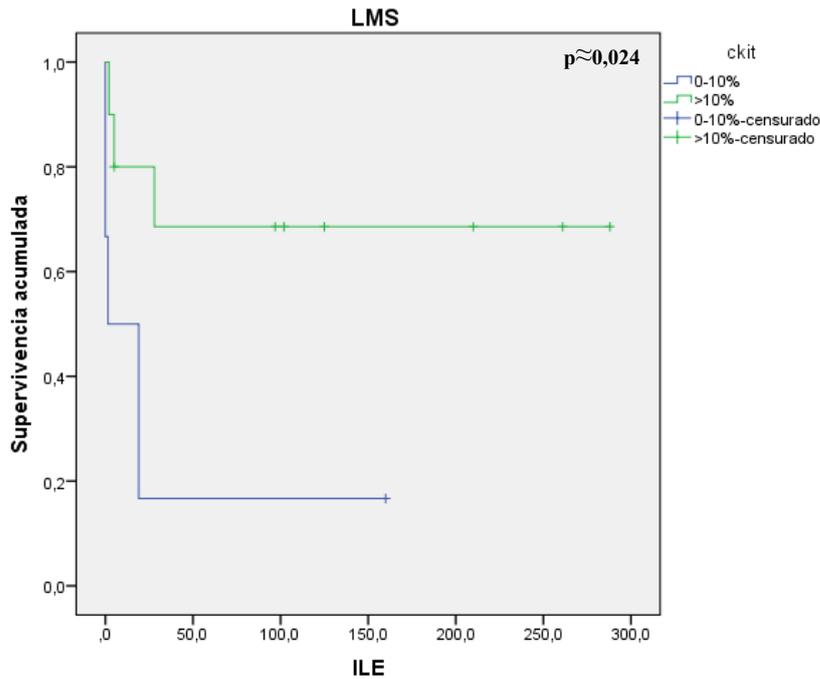


Figura 85: Intervalo libre de enfermedad de los leiomiosarcomas en relación a la expresión de c-kit

LMS: leiomiosarcoma; ILE: intervalo libre de enfermedad

Valoramos la relación entre las alteraciones encontradas con el FISH y el ILE.

De los 9 casos recidivados, 3 casos tuvieron ganancias de las señales de las 4 sondas estudiadas (casos nº 3, 7 y 9). Un caso no presentó alteraciones en nuestro estudio FISH (nº1). 2 casos con ganancias de CEP 3 y CEP 17 (nº11 y 12). 1 caso con ganancias de CEP3 y pérdida de LSI 9p21 (nº13). 1 caso con ganancia de CEP17 (nº15). Y por último un caso con ganancias en CEP3, LSI 9p21 y CEP17 (tabla 56).

Únicamente existió un menor ILE en los casos con ganancias de CEP3. La relación entre la alteración de CEP 3 y el ILE fue estadísticamente significativa ($p \approx 0,001$) aunque no valorable, ya que únicamente 2 casos fueron disómicos frente a 14 casos con ganancias de esta señal (figura 86).

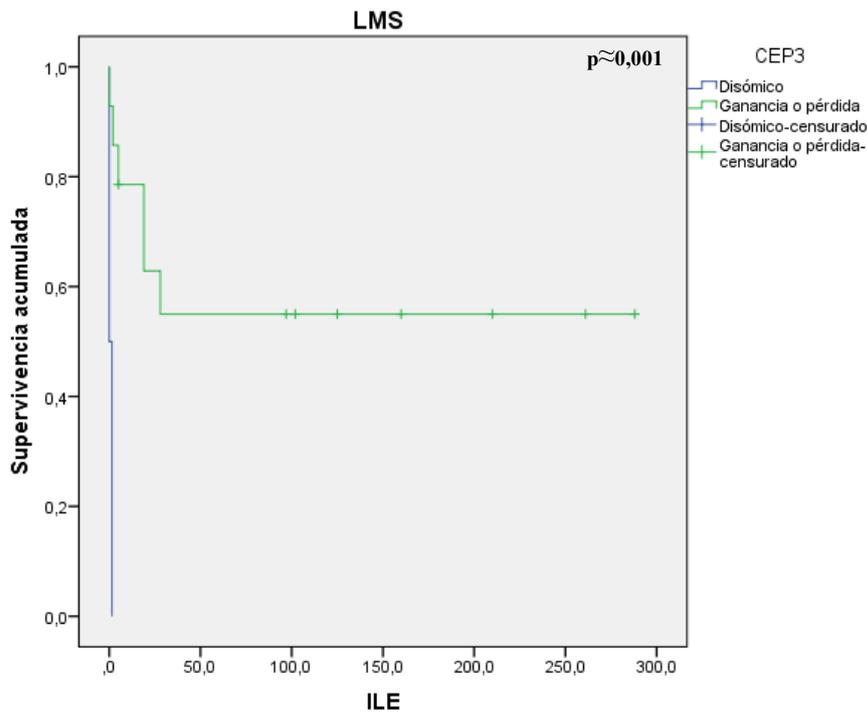


Figura 86: Intervalo libre de enfermedad de los leiomiomas en relación a la ploidía del cromosoma 3

LMS: leiomioma; ILE: intervalo libre de enfermedad

El resto de hallazgos por FISH no presentaron una relación con el ILE (tabla 56).

Tabla 56: Resultados obtenidos en el estudio entre los hallazgos citogenéticos y el intervalo libre de enfermedad

LMS	ILE	CEP 3	CEP 7	LSI 9p21	CEP 17
1	0	Disómico	Disómico	Disómico	Disómico
3	5	Ganancia	Ganancia	Ganancia	Ganancia
7	2	Ganancia	Ganancia	Ganancia	Ganancia
9		Ganancia	Ganancia	Ganancia	Ganancia
11	28	Ganancia	Disómico	Disómico	Ganancia
12	19	Ganancia	Disómico	Disómico	Ganancia
13	19	Ganancia	Disómico	Pérdida	Disómico
15	1,5	Disómico	Disómico	Disómico	Ganancia
16	0	Ganancia	Disómico	Ganancia	Ganancia
ILE		p≈0,001	p≈0,319	p≈0,637	p≈0,299

LMS: leiomioma; ILE: intervalo libre de enfermedad

4.8 RELACIÓN ENTRE LOS HALLAZGOS CLÍNICOS, ANATOMOPATOLÓGICOS Y LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

Ninguna de las pacientes con LM había fallecido al final de nuestro estudio, a excepción de una paciente de 25 años, con el diagnóstico de LMA, que falleció por otras causas (accidente), a los 39 meses del diagnóstico. El tiempo de seguimiento medio de estos grupos fue de 71, 233 meses., con una mediana de 59,5.meses, desviación estándar de 38,1, con un mínimo de 39 meses y un máximo de 202 meses.

En cuanto al grupo de los LMS, la SG tuvo una mediana de 12 meses en los 8 casos que fallecieron, con una desviación estándar de 25,001 (tabla 57).

Tabla 57: Parámetros descriptivos de los leiomiomas en la supervivencia global

SG	Media	Mediana	Desv.Estandar	Mín	Max
en meses	20,75	12	25,001	2	79

SG: supervivencia global; Desv.estandar: desviación estándar, Mín: mínimo, Max: máximo

El estudio se realizó de dos maneras al igual que en el ILE, dividiendo los casos en 2 categorías (positivos/negativos) y respetando los rangos de positividad en el grupo de los LMS.

-EDAD AL DIAGNÓSTICO

En el grupo de los LMS las pacientes de mayor edad tuvieron un pronóstico peor. Ninguna de las pacientes sin recidivas murieron durante nuestro estudio, de las 9 pacientes con recidiva tumoral, únicamente la más joven, permanece viva. Observamos que las pacientes de más de 65 años de edad presentaron una menor SG (únicamente una paciente permanece con vida). Sin embargo los dos grupos de mujeres más jóvenes presentan una SG semejante. En el estudio Kaplan-Meier, existió una relación que se aproximó a la significación ($p \approx 0,058$) (figura 87) entre la edad al diagnóstico y la SG.

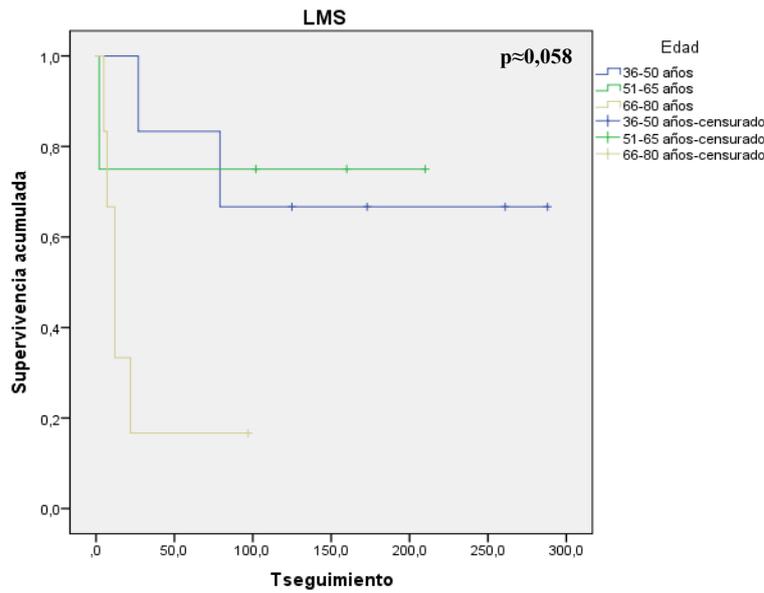


Figura 87: Supervivencia global de los leiomyosarcomas en relación a la edad al diagnóstico
LMS: leiomyosarcomas; T seguimiento: tiempo de seguimiento

-MEDIDA TUMORAL

De los 8 casos fallecidos, un caso medía 5 cm, 2 casos presentaban un tamaño tumoral entre 6 y 9, y 5 casos medían más de 10 cm. Los LMS de mayor tamaño presentaron una menor SG, sobre todo los de 10 cm o más, sin llegar a ser estadísticamente significativo ($p \approx 0,072$) en nuestra serie. Sí que pudimos observar que sí que existen diferencias en la SG en el grupo de tumores de 10 cm o mayores, frente a los 2 grupos de menor tamaño, sin embargo, en las lesiones de entre 6 y 9 cm y menores de 6 cm, la SG era semejante (figura 88).

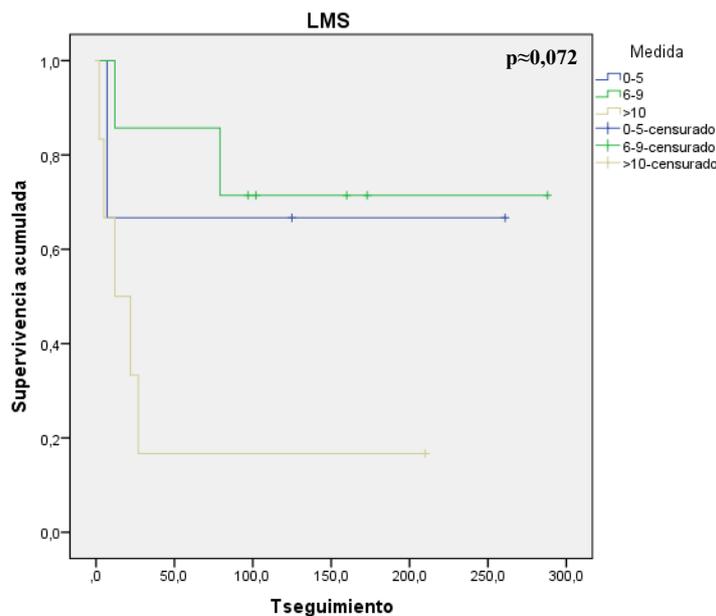


Figura 88: Supervivencia global de los leiomyosarcomas en relación al tamaño tumoral
LMS: leiomyosarcomas; T seguimiento: tiempo de seguimiento

-MITOSIS

El número de mitosis elevado es una de las tres principales características histopatológicas de los LMS, siendo poco frecuentes en su variante benigna. Este elevado contaje mitótico implica un mayor crecimiento y un peor pronóstico (figura 89). En nuestra serie, de los 8 casos fallecidos, 4 casos presentaron un contaje por debajo o igual a 15 mitosis en 10 CGA, y 4 casos superaron este rango. El resultado no fue significativo ($p \approx 0,097$) debido al escaso número de casos en nuestra serie, aunque sí que se observa una tendencia a una menor SG en los tumores con un contaje superior a 15 mitosis en 10 CGA en nuestra gráfica.

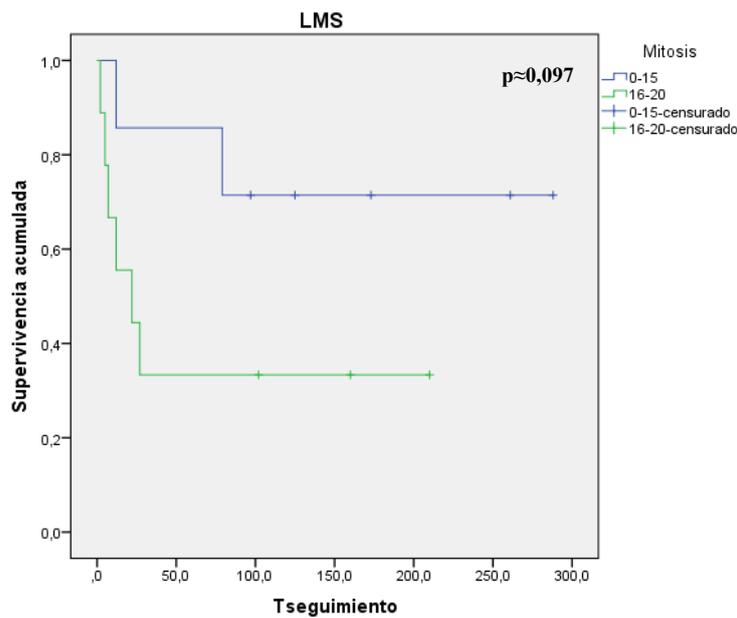


Figura 89: Supervivencia global de los leiomiomas en relación al número de mitosis en 10CGA

LMS: leiomiomas; T seguimiento: tiempo de seguimiento

El estudio de la SG con Kaplan-Meier al unir la medida tumoral ($> 10\text{cm}$) y el número de mitosis (> 15 mitosis en 10 CGA) en el grupo de los LMS fue estadísticamente significativo ($p \approx 0,022$) observándose una menor SG en los LMS que tenían ambas características, más de 15 mitosis en 10 CGA y de más de 10 cm de dimensión máxima (figura 90).

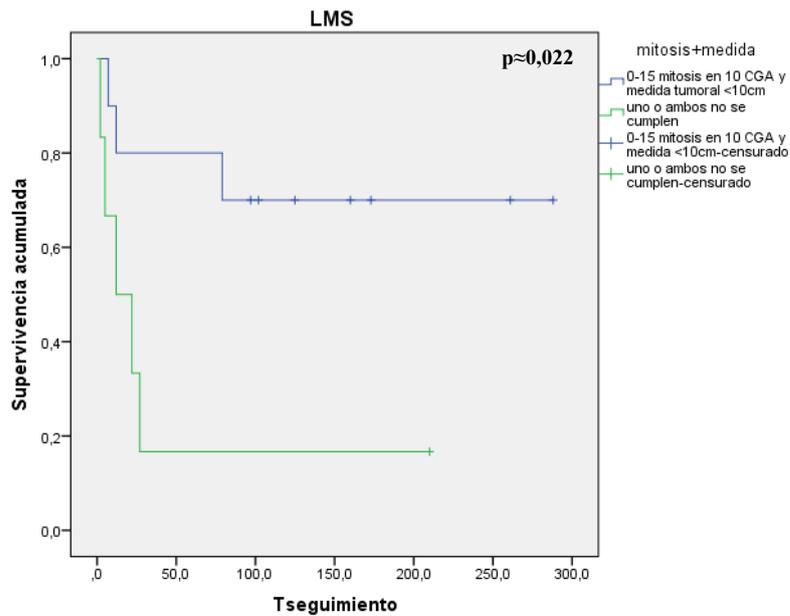


Figura 90: Supervivencia global de los leiomiomas en relación al número de mitosis en 10CGA junto con el tamaño tumoral
LMS: leiomiomas; T seguimiento: tiempo de seguimiento

4.9 RELACIÓN ENTRE LOS HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS Y LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

P53

La expresión de la proteína de ciclo celular p53 es frecuente en tumores malignos, en nuestra serie, la positividad frente a p53 se observó únicamente en el grupo de los LMS, sin expresarse en ninguno de nuestros casos de LM ni en los controles. En cuanto a la SG, fue similar en los tumores con expresión de p53 (9 casos) o negativos frente a esta proteína (7 casos) ($p \approx 0,081$) De los 8 casos fallecidos por la enfermedad, 3 expresaron p53, frente a 5 casos negativos. Sería interesante realizar estudios más amplios para verificar el valor de la expresión de esta proteína en la SG.

p16

La proteína p16 se expresó con mayor frecuencia en los tumores malignos. La expresión de esta proteína en el grupo de los LMS fue la norma (únicamente 3 casos fueron negativos) lo que no permitió valorar la relación de su expresión con la SG.

La intensidad de expresión de la proteína p16 no presentó una relación significativa con la SG y no fue valorable por la escasez de la muestra.

RRPP

La expresión de RRPP fue más frecuente en los LM, que tienen un pronóstico excelente. En el grupo de los LMS, se observó en la gráfica una tendencia a una mayor SG en los casos con una positividad frente a RRPP en más del 10% de la celularidad tumoral (8 de 16 casos), aunque sin una relación significativa ($p \approx 0,3$) (figura 91).

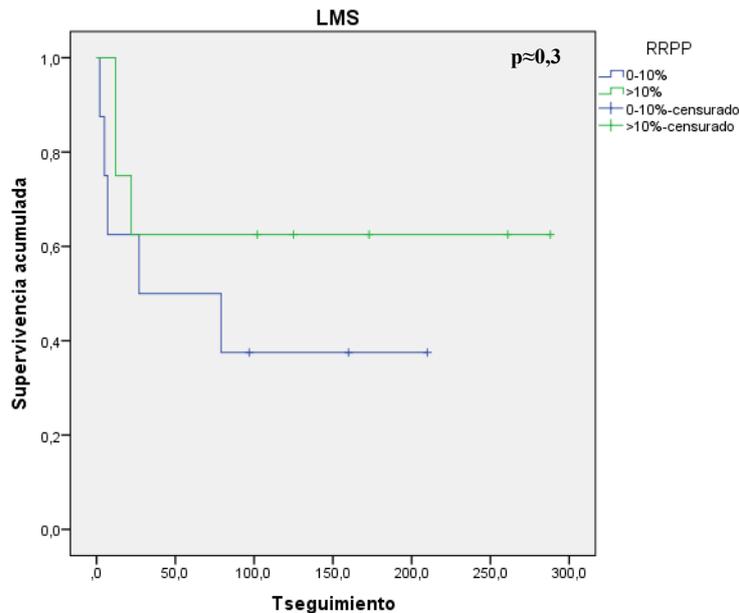


Figura 91: Supervivencia global de los leiomiomas en relación a la expresión de los receptores de progesterona
LMS: leiomiomas; T seguimiento: tiempo de seguimiento; RRPP: receptores de progesterona

Hemos realizado el estudio de la SG tanto por categorías, como por rangos en el grupo de los LMS de forma aislada, obteniendo los datos abajo incluidos. Comentamos los resultados obtenidos (tablas 58).

Tabla 58: Resumen de los resultados de la supervivencia global

SG	Categoría LMS	Rango LMS
Ki67	p≈0,512	p≈0,669
Ki67+p53	p≈0,238	-
Bcl-2	p≈0,498	p≈0,914
Bax	-	-
p53	p≈0,081	p≈0,250
p16	p≈0,011	p≈0,043
Ciclina	p≈0,991	p≈0,250
p21	P≈0,897	p≈0,897
p27	p≈0,269	p≈0,680
c-kit	p≈0,053	p≈0,35
c-erb-B2	p≈0,936	p≈0,556
PDGFR α	-	-
IGFR-1	p≈0,762	p≈0,648
E-caderina	-	-
Slug	p≈0,392	p≈0,656
Snail	p≈0,244	p≈0,56
β catenina	p≈0,021	p≈0,068
AKT	p≈0,611	p≈0,845
RREE	p≈0,467	p≈0,633
RRPP	p≈0,300	p≈0,395
CD44	p≈0,297	p≈0,435
OCT	p≈0,466	p<0,001

SG: supervivencia global; LMS: leiomiomas; RREE: receptores de estrógenos, RRPP: receptores de progesterona

4.10 CORRELACIÓN ENTRE LOS HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS Y CITOGENÉTICOS Y LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

p16 Y LSI 9p21

En este estudio vimos la relación entre la positividad frente a p16 junto a las alteraciones citogenéticas halladas en LSI 9p21 con la SG. El estudio se realizó entre 2 grupos de casos, uno, en el que se observaba la alteración de la señal por FISH de LSI 9p21 y además una positividad de la proteína p16 en el estudio IHQ por encima del 10%, y otro grupo, que no presentaba las 2

premisas antes mencionadas, en el grupo de los LMS. Aunque en la gráfica (figura 92) parece haber un discreto aumento de la SG en los casos diploides y negativos frente a p16, en comparación con los que presentaban alteraciones de la ploidía o eran positivos frente a p16 (o ambas cosas), no se observó una relación significativa ($p \approx 0,687$).

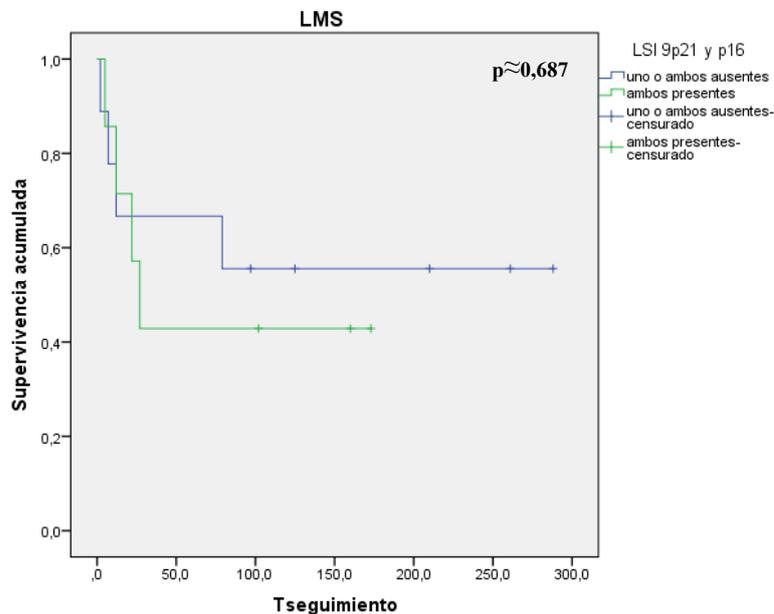


Figura 92: Supervivencia global de los leiomiomas en relación a la expresión de p16 y de la ploidía de LSI 9p21

LMS: leiomiomas; T seguimiento: tiempo de seguimiento

p53 Y CEP 17

La expresión de p53 junto a la ganancia de señales en el FISH de la sonda CEP 17 (cromosoma en el que se sitúa) no se relacionó en el grupo de los LMS con una menor SG ($p \approx 0,827$). Realizamos un estudio separando los casos en 2 grupos, en un primer grupo pusimos los casos positivos frente a p53 (con por lo menos el 11% de las células positivas) y que además presentara alteraciones citogenéticas en el estudio FISH para CEP 17. En el segundo grupo incluimos el resto de casos, tanto si eran negativos frente a p53 en el estudio IHQ, como si no presentaban alteraciones de CEP 17, o ambas. La SG fue similar en ambos grupos.

4.11 CORRELACIÓN ENTRE LOS HALLAZGOS CITOGENÉTICOS Y LA SUPERVIVENCIA GLOBAL.

Únicamente encontramos alteraciones citogenéticas en el grupo de los LMS, sin encontrar ninguna alteración numérica de los cromosomas 3, 7 y 17 ni del locus específico 9p21 en ninguno de los LM.

Entre los LMS de peor pronóstico, la alteración más frecuente fue la ganancia de señal de CEP3, seguida de CEP17, LSI9p21 y CEP7, al igual que en el resto del grupo de LMS. Un caso no presentó alteraciones en el FISH (caso n°1), presentando una SG de 7 meses. Un caso presentó ganancia de señal en todas las sondas, con una SG de 5 meses (LMS n°3) (tabla 59). Ninguno de los hallazgos por FISH presentó una relación clara con la SG.

Tabla 59: Resumen de LMS fallecidos y los resultados FISH

LMS	SG (meses)	CEP3	CEP7	LSI9p21	CEP17
1	7	Disómico	Disómico	Disómico	Disómico
3	5	Ganancia	Ganancia	Ganancia	Ganancia
7	12	Ganancia	Ganancia	Ganancia	Ganancia
11	12	Ganancia	Disómico	Disómico	Ganancia
12	79	Ganancia	Disómico	Disómico	Ganancia
13	22	Ganancia	Disómico	Pérdida	Disómico
15	2	Disómico	Disómico	Disómico	Ganancia
16	27	Ganancia	Disómico	Ganancia	Ganancia
SG		p<0,001	p≈0,415	p≈0,999	p≈0,355

LMS: leiomiocarcinoma; SG: supervivencia global

CEP 3

Todos los LMS a excepción de 2 casos (n° 1 y 7) presentaron ganancias en la señal de esta región, no se observó ningún caso con pérdidas de la señal. Los dos casos disómicos presentaron muy mal pronóstico con una SG de 7 y 12 meses respectivamente. Esta homogeneidad en los casos en cuanto a alteraciones en CEP 3 no permitió la valoración estadística con la SG a pesar de obtenerse un resultado muy significativo (p<0,001).

CEP 7

En el grupo de los LMS, 6 casos presentaron una ganancia de CEP 7, y 10 casos fueron disómicos, sin observarse en ningún caso pérdidas de esta señal. En cuanto a la SG, no se observó una relación estadísticamente significativa entre las ganancias de cromosoma 7 observadas por FISH y la SG (p≈0,415), presentando un pronóstico similar tanto los casos con ganancias de la señal de CEP 7 como los casos disómicos.

LSI 9p21

De los 16 LMS, 6 presentaron ganancias de la señal del locus específico 9p21, 9 resultaron disómicos, y un caso presentó pérdidas de la señal. Todos estos datos no se relacionaron con la SG (p≈0,999).

CEP 17

De los 16 LMS, 10 casos presentaron ganancias en la visualización de esta sonda, siendo 6 casos disómico. Estos hallazgos no mostraron relación significativa ($p \approx 0,355$) con la SG en nuestra serie, aunque en la gráfica se muestra una tendencia a un mejor pronóstico en el grupo de los tumores disómicos (figura 93).

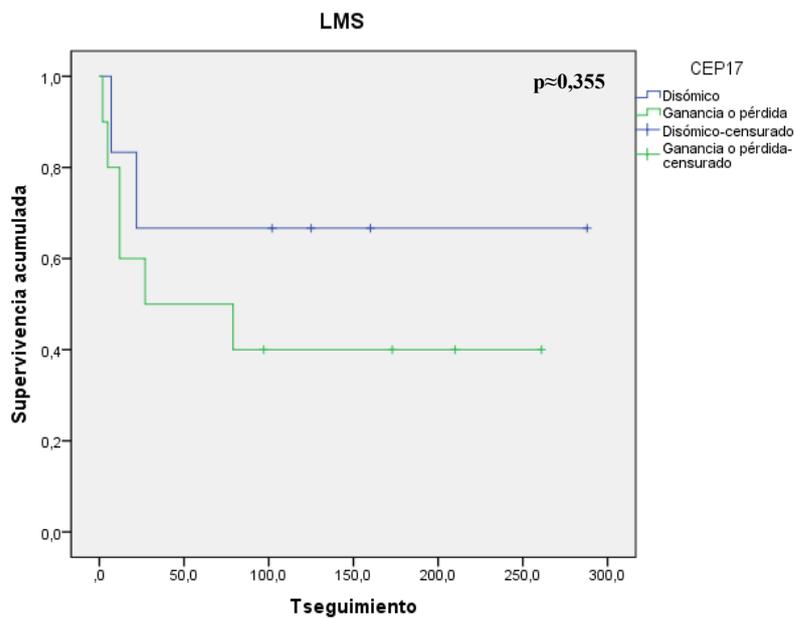


Figura 93: Supervivencia global de leiomiosarcomas en relación a la plodía del cromosoma 17
LMS: leiomiosarcomas; T seguimiento: tiempo de seguimiento

4.12 ÁRBOL DE TOMA DE DECISIÓN EN LA AYUDA AL DIAGNÓSTICO

El modelo de clasificación se diseñó entrenando al algoritmo J48 para distinguir entre muestras LS (LMS) y NonLS (LM).

Con el objetivo de balancear el modelo se realizaron 3 clasificaciones a partir de 37 muestras, entre las que se incluyeron 16 LMS y 21 LM, tomando para este grupo 7 LMU, 7 LMC y 7 LME en muestras aleatorias para cada modelo y con una representación equitativa entre los tres subgrupos que representa la clase.

De las variables clínicas seleccionadas: la medida del tumor (medida), la edad al diagnóstico (intervalos), y la presencia de la menopausia (presenciamenop); variables histopatológicas como el número de mitosis (Nmitos); y variables inmunohistoquímicas, como el rango de positividad frente a ki67 (KI67R), Bcl-2 (BCL2R), p53 (P53R), p16 (P16R), p21 (P21R), p27, c-kit (CKITR), snail (SNAILR), β catenina (BCATR), AKT (AKTR), RREE (RRESTRR) y RRPP (PROGR), así como la intensidad de p21 (P21I) y p27 (P27I).

Los tres modelos utilizaron las mismas dos variables: el número de mitosis (Nmitos) realizando dos grupos, uno de 0-15 mitosis en 10 CGA y otro con 16 o más mitosis en 10 CGA y el porcentaje de celularidad positiva frente a c-kit para clasificar, obteniéndose unos resultados similares (una precisión alrededor del 80%). Resumimos los resultados obtenidos en la tabla 60.

Estas dos variables clasifican bastante bien nuestros casos debido probablemente a que el número de mitosis por encima de 15 se da exclusivamente en el grupo de los LMS y la positividad frente a c-kit únicamente se observó en algunos casos de LMS, siendo todos los LM negativos frente a esta proteína.

Modelo 1:

En el primer modelo realizado observamos como con dos únicas variables, las mitosis (más o menos de 15 en 10 CGA), y el rango de células positivas frente a c-kit conseguimos clasificar correctamente 11 de los 16 LMS (los otros 5 LMS se clasificaron como LM, falsos negativos) todos los LM (Anexo 36).

Primero el programa utilizó la variable número de mitosis, consiguiendo clasificar correctamente 9 LMS. Con la segunda variable, c-kit, consiguió reclasificar correctamente 6 de los 7 LMS con menos de 15 mitosis en 10 CGA (figura 94). Finalmente falló en 5 LMS que los clasificó como LM (5 falsos negativos), esto es debido al cálculo del error que realiza con la cross-validación, repitiendo la clasificación n veces y calculando una media.

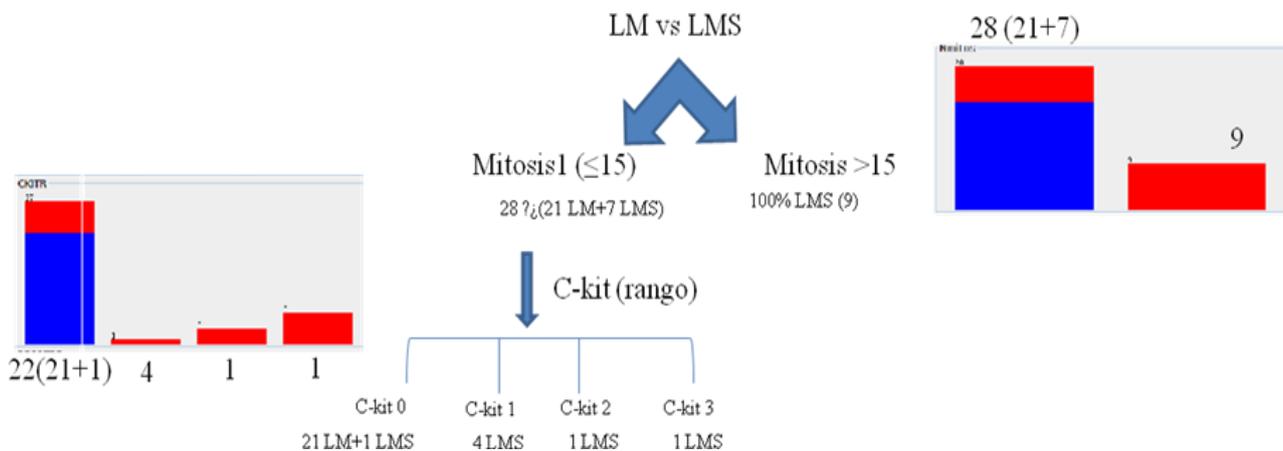


Figura 94: Árbol de toma de decisión de ayuda al diagnóstico, modelo n°1
LM: leiomiomas; LMS: leiomiosarcomas.

Modelo 2:

En este segundo modelo, observamos que con las mismas dos variables, el número de mitosis y el rango de positividad de c-kit, conseguíamos clasificar correctamente 11 de los 16 LMS y 19 de los 21 LM (Anexo 37).

Modelo 3:

En el tercer modelo, se utilizaron las mismas dos variables que en los dos anteriores, clasificándose correctamente 13 de los 16 LMS y 20 de los 21 LM (Anexo 38).

Tabla 60: Resumen de los resultados obtenidos en el estudio computacional

	Curva ROC	Correctos	Incorrectos	Sensibilidad LMS	Especificidad LMS	Sensibilidad LM	Especificidad LM
Modelo 1	0,844	32 (86,48%)	5 (13,51%)	68,8%	100%	100%	68,8%
Modelo 2	0,853	30 (81,08%)	7 (18,92%)	68,8%	90,5%	90,5%	68,7%
Modelo 3	0,917	33 (89,19%)	4 (10,81%)	81,2%	95,2%	95,2%	81,2%

LMS: leiomiosarcomas; LM: leiomiomas

Realizamos nuevamente el mismo análisis eliminando la variable c-kit para observar qué nuevas variables se utilizaban para clasificar correctamente nuestras muestras (tabla 61). De nuevo en los 3 modelos (cada uno de ellos con unas muestras aleatorias de LM) la variable inicial, que

mejor dividía en un principio las muestras entre LMS y LM fueron el número de mitosis (usan como punto de corte 15 mitosis en 10 CGA). Sin embargo, así como en el primer estudio, los 3 modelos usaron c-kit, siendo este marcador el más estable, en estos tres nuevos modelos se utilizaron distintas variables, el primero de ellos utilizó la expresión de p53, y los otros dos, la expresión de ki67. Los 3 modelos presentaron una precisión por encima de 82%. Al igual que en los modelos anteriores, el programa utilizó la variable número de mitosis y consiguió clasificar correctamente 9 LMS.

Modelo 4:

En el primer modelo realizado observamos como con el rango de células positivas frente a p53 conseguimos clasificar correctamente 12 de los 16 LMS (los otros 4 LMS se clasificaron como LM, falsos negativos) y 19 de los 21 LM, los otros 2 se clasificaron como LMS (falsos positivos) (Anexo 39), obteniendo en conjunto una precisión del 83,8%.

Modelo 5:

En este segundo modelo, el programa utilizó el rango de positividad de ki67 (Anexo 40). Este modelo conseguía clasificar 12 de los LMS y todos los LM correctamente, obteniendo en conjunto una precisión del 89,2%.

Modelo 6:

En el tercer modelo, se utilizaron también el rango de positividad de ki67, clasificándose correctamente 12 de los 16 LMS y todos los LM (Anexo 41). En este modelo la precisión global fue del 89,2% al igual que en modelo anterior.

Tabla 61: Resumen de los resultados obtenidos en el estudio computacional.

	Curva ROC	Correctos	Incorrectos	Sensibilidad LMS	Especificidad LMS	Sensibilidad LM	Especificidad LM
Modelo 4	0,824	31 (83,78%)	6 (16,21%)	75%	90,5%	90,5%	75%
Modelo 5	0,857	33 (89,19%)	4 (10,81%)	75%	100%	100%	75%
Modelo 6	0,857	33 (89,19%)	4 (10,81%)	75%	100%	100%	75%

LMS: leiomiomas; LM: leiomiomas

5. DISCUSIÓN

“El objeto de toda discusión no debe ser el triunfo, sino el progreso”. Joseph Joubert

5.1 HALLAZGOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Los LM son los tumores mesenquimales uterinos más frecuentes. Estos tumores benignos han sido ampliamente estudiados debido a su prevalencia, y a su clínica, ya que son motivo de consulta muy común, y de tratamiento médico o quirúrgico frecuente, pudiendo comprometer la fertilidad. Se ha comprobado su hormonodependencia, por lo que se han utilizado terapias hormonales para paliar la clínica, y evitar en algunos casos la cirugía.

Su variante maligna, los LMS uterinos, son neoplasias poco frecuentes, muy agresivas, que no contemplan demasiadas opciones en su tratamiento, basado esencialmente en la cirugía, y en algunos casos la QT y la RT aunque no se han demostrado tan eficaces como en otras neoplasias. Incluso en tumores localizados en el útero sin extensión extrauterina, la recurrencia y las metástasis son frecuentes, existiendo casos aislados de recidivas y metástasis a distancia con una supervivencia larga. Se diferencian de los LM en el estudio histopatológico sin grandes dificultades en la mayor parte de los casos, debido a características como la atipia citológica, el número de mitosis y la presencia de necrosis tumoral, aunque en algunos casos hay que hacer el diagnóstico diferencial con algunos subtipos de LM, como el atípico o el mitóticamente activo, así como con otras neoplasias uterinas como los SEE. En nuestro estudio la revisión inicial de todos los casos no modificó el diagnóstico, en cambio sí que se cambió el estadio en 2 de los tumores malignos según la clasificación de la FIGO actual [67].

El objetivo de nuestro estudio ha sido comparar las características histopatológicas de los tumores de musculo liso uterinos tanto benignos (LM) como malignos (LMS), así como su expresión inmunofenotípica, y sus alteraciones a nivel citogenético, realizando por un lado un análisis de las alteraciones numéricas en los cromosomas 3, 7 y 17 y en el locus específico 9p21, y un amplio pangenómico mediante SNP. Todo ello en primer lugar en vistas a facilitar el diagnóstico diferencial en casos complejos, valorar características con implicación pronóstica, y considerar posibles dianas terapéuticas en base a la biología de estos tumores.

Con este objetivo, hemos realizado un estudio de una serie de casos de LM uterinos y LMS uterinos recogidos en el HCUV.

En total, se registraron un total de 89 casos incluyendo 13 casos de miometriosis control, de úteros sin patología estructural uterina, 16 casos diagnosticados como LMS uterinos reevaluados con criterios actuales, y un total de 60 LM uterinos divididos en LMU (30) LMC (16) y LME (14). Además, para el estudio citogenético con FISH también utilizamos tejido sano adyacente a diversos tumores estudiados, y tejido uterino fetal.

En nuestra serie, como en trabajos publicados anteriormente, hemos observado una **edad media al diagnóstico** mayor en el grupo de los LMS frente a los grupos de LM. Nuestras pacientes con diagnóstico de LMS presentaron en más de la mitad de los casos una edad superior a 50 años, siendo la mayor parte mayores de 40 años de edad, con una mediana de edad de 56,5 años. Por el contrario, en nuestros tumores benignos la edad de presentación fue más temprana, menor de 50 años en global como era de esperar al ser tumores hormonodependientes, con una mediana de edad de 48, 42,5 y 44 años en los grupos de LMU, LMC y LME respectivamente. Sin embargo, existió una gran superposición de edades entre los LMU y los LMS lo que hizo que las diferencias entre estos dos grupos no fueran significativas; sí que tuvieron estos dos grupos edades más avanzadas a las de los LMC y los LME. En la literatura, los estudios fijan la edad de diagnóstico de los LMS predominantemente en la menopausia, con una media de edad de 60 años como las series estudiadas de Major en 1993 y Leisbsohn en 1990 [295, 296], observándose un incremento progresivo de la incidencia de LMS a partir de la cuarta década hasta la séptima década. Por ello es importante evaluar de forma cautelosa aquellas tumoraciones uterinas de nueva aparición a partir de los 40 años, tanto en un útero sin otros hallazgos, como en uno miomatoso.

El diagnóstico de los LM es, en las series publicadas, predominantemente en mujeres fértiles con disminución de la incidencia tras la menopausia. Como reflejo de su hormonodependencia, observamos que muy frecuentemente pueden aparecer, o aumentar de tamaño en situaciones como el embarazo, ya que son predominantemente los progestágenos los que ejercen una mayor influencia en su crecimiento. Además los moduladores de los RRPP, como el Ullipristal, son eficaces para que disminuyan su tamaño y desaparezca su clínica, por lo que se utilizan en la preparación de la cirugía. Cramer y Patel, publicaron en 1990 un estudio de la frecuencia de estos tumores en Estados Unidos donde observaron una prevalencia de hasta el 77% en mujeres en edad reproductiva [5], disminuyendo su incidencia en la postmenopausia, donde además hallaron LM menores en tamaño y número. En la menopausia, los niveles hormonales disminuyen drásticamente, teniendo además escasas variaciones, por, lo que el crecimiento de las lesiones existentes se frena, involucionando en muchos casos.

En los estudios del ILE y de la SG en el grupo de los LMS, en el primero no se observó una relación entre el ILE y la edad al diagnóstico ($p \approx 0,37$), y en el segundo se observó una relación próxima a la significación entre la SG y la edad al diagnóstico, observando un aumento de la mortalidad sobretudo en el grupo de las pacientes con el diagnóstico realizado a partir de los 66 años. En nuestra serie, de 16 casos, recidivaron 9 LMS, y fallecieron 8 de las 9 pacientes, 2 de ellos, presentaban al diagnóstico extensión extrauterina. En 2012, Zivanovic y cols, en una serie de 185 casos de LMS, no encontraron una relación estadísticamente significativa entre la edad de la paciente y la supervivencia a los 5 años. Los estudios de Abeler y cols en 2009, con una serie larga de LMS incluyendo 235 LMS convencionales, 18 LMS mixoides y 6 LMS

epitelioides, no encontraron que la edad de las pacientes fuera un factor pronóstico ni en los estudios univariados, ni en los multivariados, en tumores limitados a útero.

La edad de incidencia de estas patologías hace inevitable que la **menopausia** se haya instaurado de forma estadísticamente significativa en el grupo de los LMS ($p \approx 0,004$), debido a que las pacientes de este grupo presentan una edad considerablemente superior. La presentación de estos tumores tras la menopausia, hace surgir la sospecha clínica de LMS, ya que en esta fase de la vida reproductiva dentro de los tumores uterinos de músculo liso, son más frecuentemente malignos. Este dato ayuda en la toma de decisiones terapéuticas. Es necesario, que ante todo tumor uterino de aspecto miomatoso aparecido en la menopausia, o el aumento significativo de tamaño de una lesión preexistente se realice una escisión de la misma para descartar un LMS. Además dentro de los LMS, Larson y cols en 1990 asociaron la presencia de la menopausia con un peor pronóstico de estos tumores en un estudio realizado en 143 pacientes [297].

En las series publicadas, la **paridad** no es un dato reseñable, debido entre otras cosas a que la edad al diagnóstico es un sesgo en sí mismo, y que en los LM, únicamente estudiamos aquellos intervenidos quirúrgicamente debido a la clínica, pero no se consideran aquellos que siendo asintomáticos (más del 50%) y en pacientes sin los deseos genésicos cumplidos, no se intervienen. En nuestro estudio este parámetro fue muy significativo ($p \approx 0,006$). Los LM en la edad fértil pueden comprometer la fertilidad, en especial los submucosos, por lo que se suelen extirpar con cirugía histeroscópica, en especial en las pacientes nuligestas o con abortos de repetición.

La **incidencia** de los LM según las series es de hasta el 70% de las mujeres en edad fértil, basada en piezas de histerectomía [5], por lo que podría ser incluso mayor. Remitiéndonos a la clínica, la prevalencia es bastante menor, de aproximadamente el 30%. Los LMS son tumores excepcionales, representando menos del 2% de los tumores malignos uterinos, siendo el tumor de origen mesenquimal más frecuente ya que el carcinosarcoma o TMM, ya se ha clasificado como de origen epitelial [298]. El LMS tiene una incidencia de 0,64 por 100.000 mujeres [299], incluyendo los del cuerpo uterino y los del cérvix, no considerando estos últimos en este trabajo. En Estados Unidos, tuvieron una incidencia de 0,36 por 100.000 mujeres desde 1979 a 2001 [300]. Además, aproximadamente el 0,5% de los LMS uterinos se diagnostican en úteros polimiomatosos intervenidos por los LM [299]. La prevalencia de sarcomas en los que la sospecha clínica es de LM es de aproximadamente 0,14%, (entre el 0,45% y el 0,014%). El riesgo de encontrar un sarcoma cuando se sospecha un LM es muy raro por debajo de los 40 años [301]. Esta situación plantea un problema serio en los métodos terapéuticos quirúrgicos, pues la cirugía laparoscópica necesita fragmentar las tumoraciones para extraerlas y con este

procedimiento si es un LMS puede diseminarse y empeorar el pronóstico. La FDA en 2014 desaconsejó esta práctica. A partir de ahí, algunos estudios han intentado definir las condiciones óptimas para el uso de esta técnica. Brölmann y cols en 2015, realizaron una revisión bibliográfica, concluyendo que lesiones sin necrosis ni gran vascularización central, menores de 40 años y sin otras características como la presencia de menopausia, lesiones únicas, tamaño por encima de 8 cm en la lesión más grande, aumento de la LDH o sangrado uterino anormal; podían ser candidatas a la cirugía laparoscópica, al tener un mínimo riesgo de LMS [301]

LM y LMS, presentan una **sintomatología** similar, lo que dificulta el diagnóstico clínico [302]. Además, algunos LMS coexisten con múltiples LM lo que dificulta la realización de la biopsia al no saber cuales biopsiar [299]. En nuestra serie, eliminado el grupo control, que presentó en todos los casos una clínica de prolapso, sí que obtuvimos una relación estadística entre la clínica inicial y el diagnóstico ($p \approx 0,037$), sin embargo al realizar el estudio 2 a 2, observamos que esta relación únicamente se cumplía al comparar LMS y LMU ($p \approx 0,021$), seguramente debido a que muchos de los LMU fueron asintomáticos (7) o con clínica de prolapso (8), o de infertilidad (3). En todos los grupos, tanto de LM como de LMS, la sintomatología más frecuente fue el sangrado con o sin dolor. En los LMS observamos en segundo lugar el dolor siendo estas lesiones usualmente de mayor tamaño y debido a su vez al carácter infiltrativo y estadios avanzados al diagnóstico, con afectación peritoneal en varios casos. La infertilidad fue un síntoma observado únicamente en los grupos de LM, ya que cuando dan clínica suele ser al aparecer o crecer, usualmente en mujeres jóvenes.

Revisamos en todas las historias clínicas la analítica al diagnóstico, o en su defecto la analítica preoperatoria. La mayor parte de los casos, tanto de los LM como de los LMS presentaron una analítica sin alteraciones significativas, fuera de sus patologías diagnosticadas (DM, DL...), tras esto, la alteración más frecuente fue la Hb por debajo de 12, que en muchos de los casos se correspondía con clínica de sangrado, aunque no en todos. La gran mayoría de las pacientes con clínica de sangrado, no presentaron alteraciones en la analítica. En resumen, la analítica no presentó marcadores específicos en vistas a realizar un diagnóstico de la patología uterina. Encontramos un aumento de la LDH sérica en 1 paciente que presentaba un LMS (nº13); y un aumento de CEA en un caso de LMC (nº6), sin observar relación entre estos marcadores y la patología uterina. En 2015, Brölmann y cols, resumieron los hallazgos en distintos trabajos de marcadores séricos en pacientes con LM y LMS [301] para ayudar en la toma de decisiones preoperatorias. Por un lado, Goto y cols en 2002, en una serie de 227 pacientes, observaron un aumento de la LDH en los pacientes con LMS, en comparación con los que presentaban LM degenerados [303]. Juang y cols en 2006, observaron un aumento significativo de CA125 en los LMS frente a los LM, siendo mayor en los LMS de alto grado, tanto en mujeres menopáusicas

como premenopáusicas. Sin embargo, aunque ayudaba a diferenciar entre LMS de alto y bajo grado, los LMS de bajo grado presentaron niveles similares a los de los LM. Utilizaron distintos puntos de corte en los grupos de pacientes premenopáusicas y post menopáusicas siendo: 162 U/mL y 75 U/mL respectivamente [304].

En cuanto al **tamaño tumoral**, en series amplias, sí que se observa que el tamaño de los LMS es significativamente superior al de los LM, presentando las neoplasias de alto grado un crecimiento muy rápido. En nuestra serie se confirmó también este dato siendo la media del tamaño tumoral de entre 4,77 cm en LMU, a 6,52 cm en LME frente a 9,38 cm en LMS. Los LMS presentaron un tamaño superior a 5 cm en el 90% de los casos, siendo el tamaño mayor de 10 cm un dato clínico muy significativo de criterio sospechoso de malignidad, ya que en los grupos de LM menos del 10% alcanzan este tamaño. En nuestra serie, las diferencias fueron relevantes entre los LMS y los LMU y LMC, siendo los LME de tamaño semejante al de los LMS. Además, no observamos una relación estadística entre el tamaño tumoral y el ILE ($p \approx 0,369$), ni entre el tamaño tumoral y la SG ($p \approx 0,072$) aunque sí que se observaba en la gráfica una diferencia notable en el pronóstico de los tumores a partir de 10 cm, con un empeoramiento notable de la SG. En nuestro análisis del ILE, tampoco observamos una relación estadística entre el pronóstico y el número de mitosis junto al tamaño tumoral con puntos de corte de 15 mitosis en 10 CGA y 10 cm. En 2011, D'Angelo y cols en una serie de 84 LMS, encontraron que siguiendo 4 marcadores, como el tamaño tumoral, el índice mitótico, la expresión de ki67 y de Bcl-2, se formaban 2 grupos con pronóstico distinto. Por un lado el grupo con tamaño inferior a 10 cm, índice mitótico inferior a 20 mitosis en 10CGA, ki67 negativo y Bcl-2 negativo o positivo, tenía un mejor pronóstico. Por otro lado tumores de igual o más de 10 cm, con índice mitótico de igual o más de 20 mitosis en 10 CGA, positivos frente a ki67 y negativos frente a Bcl-2 tenía un peor pronóstico ($p \approx 0,007$). Tanto el tamaño tumoral como el índice mitótico fueron factores significativos en estudios univariados y multivariados [85]. Dicho esto y de acuerdo con nuestros resultados, un tamaño tumoral superior a 10 cm es sugestivo de una lesión maligna, y dentro del grupo de los tumores malignos es un factor de peor pronóstico ($p \approx 0,021$), por lo que puede resultar un dato a tener en cuenta en el examen clínico a la hora de valorar una actitud terapéutica.

La diseminación más frecuente de los LMS es la hematógena, localizándose sus recurrencias habituales en la cavidad abdominal y en los pulmones. De los 16 casos, 9 recidivaron (56,25% de los casos). 4 fueron recidivas locales en abdomen, 4 casos tuvieron metástasis pulmonares, uno de ellos acompañado de metástasis hepáticas, y un caso presentó una metástasis subcutánea (el único caso que sigue vivo). En la bibliografía se describen hasta un 70% de recurrencias en estadios I y II, de localización preferentemente abdominal y pulmonar [299, 305-307]. En

nuestra serie la incidencia de recidivas fue inferior a la encontrada generalmente en la bibliografía, aunque en las mismas localizaciones. 3 de las recidivas de nuestros casos se reintervinieron: 2 abdominales (1 en el momento del diagnóstico) y una subcutánea. Las recidivas locales se intervienen en algunos casos, y Levenback y cols publicaron un estudio donde constataban que la reintervención de las metástasis aisladas pulmonares conseguían supervivencias del 45% a los 5 años, y 35% a los 10 años [308]. Estas reintervenciones están siempre sujetas al estado general del paciente. En 2013 Lusby y cols presentaron un estudio de 349 casos en los que se incluían 157 con extensión intraabdominal y 192 con metástasis a distancia. Encontraron que las lesiones con extensión peritoneal de entrada presentaban un mejor pronóstico que las recidivas intraperitoneales posteriores. Además, en su serie, un número de mitosis por encima de 10 en 10 CGA era un factor de peor pronóstico en los tumores intraabdominales. En las neoplasias metastásicas los factores de mal pronóstico fueron la presencia de múltiples tumores, tanto en un solo órgano como repartidas en varios órganos, y las metástasis pulmonares independientemente del número, siendo en estas últimas el pronóstico mejor tras cirugía con intención curativa [309].

El **recuento mitótico** es muy importante en los tumores uterinos de músculo liso, siendo un criterio mayor para el diagnóstico de los LMS. En nuestra serie, al igual que en los estudios publicados, el número de mitosis en 10 CGA, no sólo fue mayor de forma significativa en el grupo de los LMS, sino que además, lo fue también a nivel pronóstico. Observamos una correlación estadística muy clara en la comparativa entre grupos ($p < 0,001$), donde no se observaron tumores benignos con más de 10 mitosis en 10 CGA, frente al 75% de los LMS. En los estudios del ILE y de la SG, realizado únicamente en el grupo de los LMS no observamos relación con el recuento de mitosis. Sin embargo en la SG sí que se apreció en la gráfica una tendencia a un mejor pronóstico en los tumores por debajo de las 15 mitosis en 10 CGA, un hallazgo similar al de D'Angelo y cols de 2011

Previamente, con un recuento de 10 o más mitosis en 10 CGA ya se emitía el diagnóstico de LMS [62, 297, 310]; en la actualidad, este dato es importante para el diagnóstico de los LMS aunque no es por sí solo determinante. Otros trabajos como el de Bell y cols con 213 casos de tumores musculares uterinos no encontraron una relación entre un recuento mitótico entre 5 y 19 mitosis, sin otros criterios de malignidad, y la supervivencia. Por otro lado Larson y cols en 1990, publicaron que un contaje mitótico de 10 o más mitosis, la menopausia y el estadio, se relacionaban con la supervivencia [36, 297]. D'Angelo y cols en 2011 encontraron que tanto los análisis univariantes como multivariantes un recuento por encima de 20 mitosis en 10 CGA otorgaba a los LMS un peor pronóstico [85]. Además en este estudio al combinar 4 variables diferenciaban 2 grupos en los LMS, por un lado los LMS menores de 10 cm, con menos de 20 mitosis en 10 CGA, ki-67 negativos, p53 negativos y con expresión de Bcl-2 tenían mejor pronóstico.

El índice mitótico en los LM suele estar por debajo de 5 mitosis en 10 CGA y en la gran mayoría de casos no se observa actividad mitótica, exceptuando los LM mitóticamente activos que por definición presentan 5 o más mitosis en 10 CGA. Por el contrario, en el grupo de los LMS, en los convencionales de células fusiformes, suelen observarse más de 10 mitosis en 10 CGA [311]. Sí que es cierto que en los tumores sobre todo de bajo grado, el recuento mitótico puede ser muy inferior. Además en el grupo de los LMS, otros subtipos histológicos como el mixoide o el epitelioides suelen tener un recuento mitótico inferior o igual a 3 mitosis en 10CGA [48, 302].

Por lo tanto este dato no sólo es fundamental e insustituible para el diagnóstico de los tumores uterinos de músculo liso, sino que además es por sí mismo un indicador de agresividad y pronóstico en los LMS uterinos.

5.2 HALLAZGOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Para el diagnóstico de rutina, no se suelen necesitar marcadores IHQ en el caso de los LM y LMS uterinos. La morfología, la valoración de características como el crecimiento expansivo, o infiltrativo, el elevado índice de mitosis y la observación de la presencia de necrosis y la atipia citológica, suelen ser suficientes para confirmar el diagnóstico anatomopatológico.

No obstante, para el diagnóstico diferencial con otras patologías y con la zona gris de estos tumores, llamados “tumores de músculo liso con incierto potencial de malignidad”, solemos utilizar una batería de técnicas IHQ. Aquí, en 8 de los 16 casos de LMS se tuvieron que realizar estudios concretos utilizando marcadores musculares en el momento del diagnóstico, que fueron reevaluados para nuestro estudio, y CD10, EMA, y CAM 5.2 en 3 casos, para el diagnóstico diferencial con otros tipos de tumores mesenquimales uterinos (SEE).

Para establecer patrones fenotípicos más detallados estudiamos una batería amplia utilizando la técnica IHQ, con marcadores de proliferación, apoptosis, ciclo celular, marcadores de transición epitelio-mesénquima, dianas terapéuticas y angiogénesis.

Así como el número de mitosis en 10 CGA es un criterio fundamental en la valoración de los tumores de músculo liso uterinos, la expresión de la proteína **ki-67**, reflejo del índice de proliferación, no es un dato indispensable para el diagnóstico. En nuestra serie, se observó una expresión muy superior en el grupo de los LMS frente al resto de los grupos tumorales ($p < 0,005$). El 75% de los LMS presentaron un índice de proliferación superior al 10%, y algo más del 50% un índice por encima del 30%. Prácticamente todos los grupos de LM

(exceptuando un caso de LMC que rondaba el 11%, teniendo el resto de LMC una positividad del 1%), incluyendo los casos de LM mitóticamente activos, presentaron un índice de proliferación inferior al 10%. Además, en el grupo de los LMS, no se observó relación con el ILE y la SG ($p \approx 0,433$ y $p \approx 0,512$), por lo que no parece, de forma aislada que sea un factor de peor pronóstico. Varios estudios han evaluado también este marcador no sólo en su papel diagnóstico, sino también en su papel pronóstico. En 2007, O'Neill y cols, en una serie de 10 LMU, 27 LME (incluyendo entre otras variantes LMA, LM epitelioides, o LMC), 4 tumores de musculo liso de incierto potencial de malignidad y 22 LMS, estudiaron la expresión y la intensidad del ki-67, p16 y p53. Observaron una mayor expresión de estas tres proteínas en el grupo de LMS frente a los LM, así como la intensidad de esta última mayor en los LMS. Estos resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$). La media de expresión de ki-67 fue del 7% para los LMU, 7% para los LME y 7,5% para los tumores musculares de incierto potencial de malignidad, frente a una media de 49,5% en el grupo de los LMS [312]. Todo esto hace pensar que un índice de proliferación por encima del 30% es sugestivo de LMS, aunque algunos LMS muestran un bajo índice de proliferación, lo que le resta sensibilidad a este marcador entre malignidad y benignidad tumoral [312]. Encontraron además que los LMC presentaban un muy bajo índice de proliferación con ki-67, al igual que en nuestra serie, lo que indicaría que la densidad celular en estas lesiones no se debería al incremento de la proliferación. Otros estudios también han encontrado claras diferencias en la expresión de ki-67 entre tumores benignos y malignos de musculo liso uterinos [72, 313, 314] hallando diferencias destacables entre el índice de proliferación de LM y tumores de musculo liso de potencial de malignidad incierto frente a los LMS [315]. Así pues, el índice de proliferación puede ser útil en una batería de técnicas IHQ a la hora de realizar un diagnóstico diferencial entre LM y LMS, y de ayuda para valorar los LMS de bajo y alto grado, sin embargo, no hemos encontrado que sea un factor pronóstico dentro de los LMS .

La proteína **Bcl-2** tiene como función evitar la apoptosis; hemos encontrado una relación significativa entre la expresión de Bcl-2 y el diagnóstico anatomopatológico, siendo la expresión de esta proteína más frecuente en los 3 grupos de LM frente al grupo de LMS. Más del 90% de los LM, tuvieron un rango de expresión de Bcl-2 superior al 30% frente al 43% de los LMS. Sin observarse ningún caso en el grupo de los LM una expresión por debajo del 11%, frente al 31% de los casos en el grupo de los LMS que fueron negativos.

No se encontró una relación significativa entre la expresión de Bcl-2 y el ILE ($p \approx 0,711$) ni con la SG ($p \approx 0,362$), ni tampoco entre su intensidad de expresión y el diagnóstico anatomopatológico ($p \approx 0,207$).

Varios estudios han analizado el papel pronóstico de este marcador de apoptosis [80, 316] siendo su positividad en LMS un marcador de mejor pronóstico. En la serie de Bodner y cols en

2004, con 26 LM, 22 tumores musculares de incierto potencial de malignidad, y 21 LMS uterinos, observaron una diferencia significativa en el nivel de expresión de esta proteína y su intensidad ($p < 0,05$) entre LMS y LM, y entre LM y tumores musculares de incierto potencial de malignidad; pero no entre LMS y tumores musculares de incierto potencial de malignidad. La expresión de Bcl-2 fue, como en nuestra serie, más frecuente y más intensa en los LM frente a los LMS. Encontrándose además en este estudio un mejor pronóstico en los LMS positivos frente a Bcl-2, aunque aún se necesitan estudios más amplios para corroborar este hallazgo y poner en la batería de rutina este marcador.

Otros estudios han analizado este marcador junto a otras proteínas. Leiser y cols, en 2006, analizaron en 36 LMS y 19 LM un panel IHQ constituido por marcadores de apoptosis como Bcl-2, y Bax, junto a marcadores reguladores del ciclo celular como la p21, p27 y p53. En su estudio no se observó una relación estadísticamente significativa ($p \approx 0,249$) entre la expresión de Bcl-2 y el diagnóstico anatomopatológico. Estos resultados contrastan con los de nuestro estudio, y en los de Bodner y cols. Leiser explica los hallazgos de Bodner por la falta de homogeneidad en cuanto a estadio, ya que Bodner y cols incluyeron en su serie un 24% de los pacientes en estadio III/IV y 29% de pacientes en estadio III/IV. Nuestro estudio también fue heterogéneo ya que incluimos 16 casos, de los cuales 11 se encontraban en un estadio I (68,75%), 1 caso en estadio II (6,25%) y 4 en estadio IV (25%). Leiser y cols sí que observaron una relación significativa entre la expresión de este marcador y un mayor tiempo de recurrencia ($p \approx 0,02$). Por otro lado la expresión de este marcador, sugiere el correcto funcionamiento de esta vía de la apoptosis lo que ha demostrado un mejor pronóstico en otros tipos de tumores, como sarcomas de partes blandas, carcinoma de cérvix, colon, mama [317-320].

Esta proteína antiapoptótica, es útil en el diagnóstico de otros tumores. Un buen ejemplo es el linfoma folicular asociado a $t(14; 18)(q32; q31)$, que lleva a una sobreexpresión proteica por la yuxtaposición del gen *BCL2* al locus de la inmunoglobulina de cadena pesada, sin esto ser un factor pronóstico. Los centros germinales no neoplásicos son negativos frente a esta proteína, lo que la convierte en clave para el diagnóstico diferencial entre folículos reactivos y neoplásicos. Sin embargo, la expresión de Bcl-2 no permite distinguir entre el linfoma folicular y otros linfomas B, tanto indolentes como agresivos, o con linfomas T, ya que todos ellos pueden expresar esta proteína. En otros tumores, como es el caso del neuroblastoma, la expresión de la proteína Bcl-2 se asocia a una histología desfavorable, así como a una amplificación del gen *n-Myc*, lo que se asocia a un peor pronóstico [321]. Además, la desregulación de miembros de la familia *Bcl-2* se puede encontrar en numerosos tumores, asociadas a resistencias terapéuticas en especial linfomas y leucemias [322, 323].

Dentro del panel IHQ para estudiar la apoptosis, también analizamos la expresión de la proteína **Bax**. Se expresó de manera homogénea prácticamente en todos nuestros casos, sin ser

significativas las diferencias de su expresión entre los grupos de estudio ($p \approx 0,379$). Por otro lado, no se pudo correlacionar la expresión de esta proteína con el ILE ni con la SG debido a esta homogeneidad de la expresión en prácticamente todos los casos ($p \approx 0,21$ y $p \approx 0,79$ respectivamente). Se observó una expresión en más del 80% de la celularidad en todos los grupos de estudio, incluido el grupo control, con una intensidad moderada. En la serie de Leiser y cols en 2006, encontraron una relación significativa entre la expresión de esta proteína y el diagnóstico ($p < 0,001$): el 33% de los LMS fueron positivos (12 de 36 casos) frente al 89% de los LM (17 de 19 casos) [80]. Estos resultados contrastan con los nuestros, sin poder descartarse que ello sea debido a la ausencia de homogeneidad en cuanto al estadio de los LMS, ya que en el estudio de Leiser y cols este marcador también se relacionó con el estadio ($p \approx 0,06$); es probable que este sesgo explique nuestros resultados. Así pues sería conveniente realizar estudios en series más amplias, con LMS en diferentes estadios, de manera homogénea para evaluar la relación entre la expresión de esta proteína y el diagnóstico IHQ.

Otro marcador IHQ que empleamos fue **p53**. Esta proteína del ciclo celular presentó, en nuestro estudio, una relación significativa entre su rango de expresión y el diagnóstico anatomopatológico ($p < 0,005$), observándose una expresión muy superior en el grupo de los LMS, siendo los LM generalmente negativos. Su expresión fue inferior al 10% de la celularidad, prácticamente del 1% en todos los casos de los diferentes grupos de LM. Sin embargo, en los LMS el 57,2% de los casos presentaron una positividad por encima del 10% de la celularidad, y, de estos casos positivos, el 37% fueron superiores al 30% de la celularidad. Estudios recientes como el de Hewedi y cols en 2012 detectaron que la expresión de p53 (así como la de los RRPP) era significativa entre el grupo de LMS frente a los grupos de tumores no sarcomatosos ($p < 0,001$). La combinación de expresión de RRPP altos, junto a una expresión de p53 baja representaba un perfil benigno en su serie [324]. En esta serie, la expresión de p53 era superior en el grupo de los LMS, observándose 2 casos positivos frente a esta proteína de los 15 tumores benignos, frente a 15 casos positivos de un total de 15 de LMS con una expresión en todos ellos moderada a severa. Otros estudios han demostrado también esta diferencia de expresión de p53 entre los LMS y los LM. De Vos y cols fueron los primeros que sugirieron que la mutación de la *p53* era más frecuente en LMS [325], y Jeffers y cols vieron que la positividad IHQ de esta proteína no siempre se correspondía con la mutación [79]. Incluso se planteó como un criterio accesorio para el diagnóstico diferencial entre los tumores benignos y malignos de músculo liso [326]. Otros estudios, también encontraron diferencias significativas en la expresión de p53 entre los LMS y los LM de acuerdo con nuestro estudio [69, 77, 78, 327], y en algunas series se ha visto sobreexpresada hasta en el 50% de los LMS [314, 328]. A pesar de todo, Mills y cols en 2013, vieron que la positividad de p53 en los LMS no es constante, y al igual que otros marcadores de ciclo celular, como p16, p21 y p27 no debe tomarse como un

único marcador para discriminar entre LM y LMS [329], siendo más adecuado y útil la combinación de distintos de estos marcadores [330]. La limitación casuística de nuestra serie no permite interpretar la relación de la expresión de esta proteína con el ILE ni con la SG. Leiser y cols, en 2006 encontraron que de forma aislada la expresión de p53 no era un factor pronóstico en sí mismo, siendo el estadio tumoral el único factor pronóstico independiente que encontraron. Sería recomendable valorar con series amplias ya que se ha demostrado en algunos estudios que también tiene un valor pronóstico, siendo la sobreexpresión sugestiva de mayor agresividad, como en la serie de Anderson y cols en 2006. Este estudio de 25 LMS y 19 LM mostró un peor pronóstico en los LMS positivos a p53 en comparación con los LMS negativos, sin llegar a ser estadísticamente significativo ($p \approx 0,07$); el estadio fue la variable que presentó una mayor relación con la SG ($p \approx 0,05$) [331]. La p53 podría ser de gran ayuda a la hora de realizar el diagnóstico, cuando nos encontramos ante el diagnóstico diferencial entre LMS y LM, e incluso para prever el pronóstico.

La **Ciclina D1** participa como inhibidora en el ciclo celular. Conocida su expresión en otros tumores, sobre todo hematológicos, apenas se ha estudiado en tumores uterinos. Nuestros casos presentaron escasa positividad en todos los grupos, a excepción de un único caso de LMS con una positividad en más del 75% de las células tumorales (LMS de alto grado, primario, estadio I de la FIGO, que recurrió a los 4 meses en pulmón e hígado, con positividad en más del 75% de las células frente a Bcl-2), sin encontrarse una relación estadísticamente significativa en nuestra serie ($p \approx 0,069$). En 1999, Rao y cols en una serie de 16 LMS extrauterinos, 14 LMS uterinos, 5 LM uterinos y 5 LM extrauterinos, observaron la expresión de Ciclina D1, Bcl-2, CD44, RREE y Glut 1. Frente a la Ciclina D1 encontraron una positividad difusa de todos los LM (tanto uterinos como extrauterinos), y la positividad de la Ciclina D1, fue independiente del grado tumoral e inversamente proporcional a la positividad de Bcl-2 [332]. Aunque estos resultados contrastan con los obtenidos en nuestra serie, sería interesante realizar un estudio más amplio, ya que tan solo incluyeron 5 LM uterinos.

El estudio de la **p16** en nuestra serie mostró una mayor expresión y más intensa en el grupo de los LMS, presentando una positividad por encima del 30% del tumor en más del 50% de los casos, siendo el 43,8% de los casos de LMS positivos en más del 75% de la celularidad. En cambio, todos los grupos de LM presentaron una positividad frente a esta proteína igual o menor del 10% de la celularidad en más de la mitad de los casos. Estos resultados fueron estadísticamente representativos ($p < 0,005$); encontrándose también una relación altamente significativa entre la intensidad y el diagnóstico anatomopatológico, siendo moderada a intensamente positiva en los LMS y más débil en LM. En nuestra serie, al presentar los casos recidivados y/o fallecidos únicamente 3 casos negativos de los 8 casos, no se pudo valorar la

relación de la positividad de esta proteína con el ILE y la SG. En 2005, Bodner-Adler y cols [82] en una serie de 26 LM, 24 tumores de músculo liso de incierto potencial de malignidad y 21 LMS encontraron que la proteína p16 se expresaba más frecuentemente y con mayor intensidad en los LMS ($p < 0,05$), siendo la diferencia estadísticamente significativa tanto entre el grupo de LMS y de tumores musculares de incierto potencial de malignidad y entre los LMS y los LM, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los LM y los tumores musculares con incierto potencial de malignidad que expresaron p16 de forma similar. Tampoco apreciaron una relación estadística entre la expresión de p16 y el estadio clínico, la edad, la afectación del espacio vascular, el ILE o la SG ($p > 0,05$).

Esta proteína, producto de un oncogen, se ha detectado en otros tipos de tumores, observándose una delección del gen que la codifica en numerosas neoplasias [333, 334], aunque hay que tener en cuenta que varios de los tumores epiteliales con estos hallazgos tienen una relación directa con la presencia de infección por HPV, lo que los hace difícilmente comparables.

La presencia mayor de esta proteína en los LMS está descrita con mucha frecuencia, aunque la razón de esta sobreexpresión no está clara. Una posible explicación podría ser su alteración genética con formación de proteína biológicamente no activa, necesitándose un estudio exhaustivo de esta actividad en series de mayor tamaño.

Otros estudios como el de Atkins y cols en 2008 también encontraron una mayor expresión de p16 en los LMS en comparación con LM o tumores musculares con incierto potencial de malignidad ($p < 0,05$) [81]. En su serie habían 15 LMS; 8 tumores musculares con incierto potencial de malignidad, 22 LM y 10 miometrios control. En este estudio se observó una clara diferencia entre la expresión de p16 entre LMS y LM ($p < 0,0001$), al igual que sucede en nuestro análisis.

Otros estudios, como el de Hakverdi y cols en 2011, también encontraron esta mayor expresión en el grupo de los LMS de forma estadísticamente significativa ($p \approx 0,0001$), proponiendo este marcador para el diagnóstico diferencial entre LMS y su variante benigna [335]. Otras series han encontrado resultados similares de la expresión de la proteína p16 junto a otros marcadores de ciclo celular como la de O'Neill y cols en 2006, donde también obtuvieron una relación estadísticamente significativa entre el diagnóstico anatomopatológico de LMS y la intensidad de expresión de p16 [312], así como las de Ünver y cols en el 2011 [336], Chen y cols en 2008 [77], o Gannon y cols en 2008 [337]. Esta proteína del ciclo celular puede ser útil en los estudios de diagnóstico diferencial entre LMS y LM, tanto por su rango de expresión como por la intensidad de ésta.

Analizamos la expresión de **p21**, otra proteína del ciclo celular, en nuestros casos, resultando más frecuentemente positiva en los LMS y LME. El 69% de los LMS fueron positivos (en más del 11% de las células); en contraposición con los grupos de LM, que presentaron una expresión

menos frecuente, en menos de la mitad de los casos en todos los grupos. Obtuvimos una relación significativa entre el diagnóstico y la expresión de p21 entre LMS frente a LMU y LMC, aunque no fue significativa entre LMS y LME ($p \approx 0,071$). También vimos una correlación significativa con la intensidad de expresión, siendo moderada en los LMS y débil o muy débil en todos los grupos de LM (incluido el grupo de LME). En otras series como en la de Ünver y cols en 2011 también encontraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la expresión de p21 entre LMS y LM, y tumores de músculo liso de incierto potencial de malignidad, así como en su intensidad de expresión [336], sugiriendo que tanto la p21 como la p16 pueden ser de gran valor con los criterios morfológicos a la hora del diagnóstico diferencial entre LMS y tumores de músculo liso de incierto potencial de malignidad. En 2006, Leiser y cols también encontraron una correlación significativa ($p < 0,001$) entre la expresión de p21 y el diagnóstico de LMS versus LM, con una serie de 36 LMS y 19 LM [80], siendo todos los LM negativos frente a esta proteína.

Dobashi y cols en 2001, vieron que la negatividad frente a esta proteína en los sarcomas extrauterinos, conllevaba un aumento del riesgo de recurrencia [338], aunque en los LMS uterinos no se ha encontrado que la expresión de esta proteína tenga valor pronóstico en sí misma. Con anterioridad ya se había descrito una mayor expresión de p21 en los LMS en comparación con los LM, como el trabajo de Palazzo y cols en 1997, donde encontraron en una serie de 10 LMS y 10 LM, una expresión de p21 en todos los LMS frente al 50% de los LM [339]. En cuanto al pronóstico no encontramos relación estadística entre la expresión de esta proteína con el ILE ni con la SG, al igual que Leiser y cols. Por lo que parece ser un marcador de utilidad para el diagnóstico diferencial entre los LMS y LM, aunque no es un predictor pronóstico en los LMS [80].

La expresión de **p27** mostró un rango de positividad mayor en el grupo de los LMS frente a los LM; curiosamente, el grupo de los miometrios control, también presentó un rango más elevado de expresión. Se observó una relación estadísticamente significativa entre la expresión de esta proteína y el diagnóstico anatomopatológico entre LMS frente a LMU y LME, sin ser significativo entre LMS y LMC ($p \approx 1$) que tuvieron un rango de expresión similar al de los LMS. Esta proteína del ciclo celular es activada por la p53, y ya se ha visto su diferente implicación clinicopatológica en otros tumores al igual que la p21 [118, 340, 341]. Catzavelos y cols en 1997, demostraron la disminución de la expresión de p27 con técnicas IHQ en tumores primarios de mama, lo que se asociaba además con la progresión tumoral, tanto en el tumor in situ como en el infiltrante. En 1997, Catzavelos y cols, sugirieron que bajos niveles de expresión de p27 también predicen un peor pronóstico en los carcinomas de células pequeñas de pulmón, siendo probablemente, un factor pronóstico independiente [118]. También Bales y cols, estudiaron la expresión de p21, p27, ciclina D1 y ciclina E en melanoma, relacionando los altos

niveles de p21 y p27 con progresión de la enfermedad y resistencia a QT y RT [341]. Esta resistencia tumoral con sobreexpresión de p27 también la estudiaron Eymin y cols en neoplasias hematológicas [342, 343], lo que hace importante el estudio de estas proteínas en estos tipos tumorales para valorar si los casos con sobreexpresión responden en menor medida al tratamiento adyuvante.

En la serie de Leiser y cols no se observó una relación significativa entre la expresión de esta proteína y el diagnóstico anatomopatológico ($p \approx 0,164$) [80], con el 61% de los LMS positivos, frente al 42% de los LM. En nuestra serie, no encontramos una relación estadística entre la expresión de p27 y el ILE o la SG sin observarse tampoco la expresión de p27 como un factor pronóstico independiente en la serie de Leiser y cols.

Son necesarios estudios más extensos para determinar la importancia de p27 en estos tumores y su implicación pronóstica.

Estudiamos dentro del apartado de posibles dianas terapéuticas, la expresión IHQ de **c-kit**, fundamental en el diagnóstico y tratamiento de otro tipo de sarcoma, como el GIST, y utilizado junto a los marcadores musculares y el CD34 para el diagnóstico diferencial de este grupo tumoral con el de los LMS. No hemos encontrado ningún caso de miometrios control y de LM con un porcentaje por encima de 10% de las células positivas. Sin embargo, en el grupo de los LMS 6 casos fueron negativos (37,5%), y 10 casos positivos (62,5%), en un rango variable de celularidad. Estos resultados fueron significativos ($p < 0,001$), siendo más frecuente la positividad de c-kit en los LMS que en los LM. La positividad frente a esta proteína fue únicamente citoplasmática, sin observarse claramente un refuerzo de membrana, por lo que hay que ser cautos, ya que pueden existir reacciones cruzadas con otras proteínas y falsear el resultado; sin embargo, en los estudios realizados por otros autores como Comunoglu y cols, Raspollini y cols o Rushing y cols, es este patrón de positividad el que encuentran y valoran como positivo. No estudiamos la presencia de mutaciones frente a c-kit, diana terapéutica en los tumores GIST, por lo que se podría ampliar el estudio en este sentido, aún siendo nuestra serie escasa.

En las escasas series publicadas de la expresión de esta proteína en LM y LMS uterinos se encuentra un estudio de 2007, de Comunoglu y cols, con 20 LM, 22 LMA y 22 LMS. Encontraron varios casos positivos, predominantemente LMS, con tinción únicamente citoplasmática frente a c-kit en 4 LM, 5 LMA y 15 LMS, siendo este resultado estadísticamente significativo ($p < 0,05$) [344]. En este trabajo también se encontró relevante ($p < 0,05$) la expresión de COX-2 en los LM (7 LM y 5 LMA fueron positivos) frente al grupo de LMS (donde no encontraron ningún caso positivo). En 2004, Raspollini y cols, descubrieron en una serie de 32 LMS uterinos positividad frente a c-kit en un 50% de los casos sugiriendo la posibilidad de tratamiento anti-tirosinquinasa (Imatinib) como posible diana terapéutica, aunque no

encontraron mutación de *c-kit* en ningún caso. En este estudio consideraron positivos los casos con expresión de la proteína en el citoplasma y/o en la membrana celular, siendo predominantemente citoplasmática en sus casos [345]. No obstante las series de estudios posteriores no detectaron en los LMS fosforilación de *KIT*, dato determinante para la efectividad de Imatinib, que actúa bloqueando esta fosforilación [346]. Rushing y cols en 2003 también encontraron la expresión de esta proteína (predominantemente citoplasmática, aunque no especificaron si existía algún caso con expresión de membrana) en distintos sarcomas uterinos, demostrando en un único caso de LMS (de 7 LMS estudiados) una delección de los exones 11 y 17 de *c-kit*. Los tumores que suelen responder a Imatinib presentan frecuentemente mutaciones en el exón 11 de *c-kit*, sin embargo, los que tienen mutaciones en el exón 17 no suelen responder a este fármaco [347].

Analizamos la expresión de la proteína **PDGFR α** , que estuvo presente en todos nuestros casos salvo un caso de LMU y otro caso de UC. No se observó una relación significativa entre el rango de positividad de esta proteína y el diagnóstico anatomopatológico ($p \approx 0,126$). La expresión de PDGFR α fue en más del 80% de los casos positiva en un rango superior al 75% de las células, exceptuando el grupo de LMU que presenta en este rango el 70% de los casos. Sin embargo sí que se observó una mayor intensidad en los LMS ($p < 0,001$), con una intensidad moderada en todos los casos. También moderada fue la intensidad en el 75% de los LMU y el 56,3% de los LMC, mientras que los controles y los LME presentaron una intensidad débil. Por otro lado tampoco encontramos una relación estadística entre la expresión de esta proteína y el ILE y la SG.

Liang y cols en 2006, observaron que la expresión de PDGF, se detectaba tanto en los LM como en el miometrio, siendo mayor la expresión en los LM que en el tejido normal. Además encontraron que la expresión de PDGFR α y PDGFR β también era mayor en los LM ($p < 0,01$) frente al miometrio no tumoral, sin observar cambios significativos entre las fases del ciclo menstrual [348]; por todo ello concluyeron que PDGF parece tener una función en la patogénesis de los LM, además de en la expresión de moléculas extracelulares. Por el contrario, Hwu y cols en 2008, no encontraron diferencias significativas entre el grado de expresión de PDGFR α en LM y el miometrio adyacente no tumoral, aunque sí que observaron estas diferencias con PDGF-C, siendo mayor su expresión en los LM, realizando estos estudios por PCR real-time [349]. Este último estudio se aproxima a nuestros resultados, aunque dichos autores no analizaron LMS uterinos, lo que haría interesante, ante los resultados contradictorios entre las diferentes publicaciones, una valoración más extensa de este marcador en estos tumores mesenquimales. En 2006, Anderson y cols sí que compararon la expresión de PDGFR entre LMS y LM, observando en una serie de 25 LMS de alto grado y 19 LM, 15 LMS positivos (60%) frente a de los 6 LM (32%), sin ser este resultado significativo ($p \approx 0,08$), [331]. La

ausencia de estudios más extensos hace necesario una profundización en esta proteína, que en algunos casos se acerca al punto de corte de la significación estadística.

El estudio de dianas terapéuticas en los tumores uterinos de músculo liso, pasó por revisar la expresión de **IGFR-1** en nuestra serie. Sólo dos de nuestros LMS fueron positivos con una tinción nuclear, sin observarse expresión en ninguno de los tumores benignos ($p \approx 0,315$). En estudios recientes se ha visto un valor a esta diana terapéutica en algunos tumores ginecológicos, como el carcinoma seroso [350]. Sarfstein y cols vieron en la metformina un valor terapéutico, también Attias-Geva y cols en 2011 estudiaron en estos mismos tumores serosos la expresión de p53 e IGFR-1, encontrando una alta expresión tanto en tumores primarios como metastásicos. También observaron que p53 regula la expresión genética de *IGFR-1*, lo que tiene gran relevancia [351]. En los tumores de músculo liso uterinos, también se ha llegado a la conclusión de la importancia de la vía de IGF-1 en el desarrollo de los LM y su crecimiento [177, 352-354].

En 2008, Yu y cols, estudiaron la expresión de receptores tirosinquinasa, y de IGF-1 en LM uterinos. En el estudio IHQ, se observó que la expresión del péptido IGF-1 fue mayor en los LM frente al tejido miometrial, presentando este último una tinción mínima perivascular. Los LM expresaron IGF-1 tanto en el citoplasma de sus células musculares como en los fibroblastos de la matriz extracelular de forma moderada a intensa. Tanto los LM como las muestras de miometrio expresaron IGFR-1 β , aunque fue mayor en los LM [355]. Van de Ven y cols en 1997, realizaron entre otras técnicas IHQ con IGFR-1 e IGFR-2, encontrándose el tipo 1 expresado en el citoplasma tanto de LM, LMS y miometrio, siendo mayor su expresión en los LM frente a los otros grupos. El tipo 2 fue positivo en todos los grupos, en el citoplasma, perinuclear, siendo similar en miometrio y LM y de menor intensidad en LMS [356].

Otra posible diana terapéutica estudiada fue la expresión de la proteína **c-erb-B2**, una proteína transmembrana perteneciente a la familia EGFR con actividad tirosínquinasa. En nuestra serie, se observaron 6 LMS (37, 5% de los casos), con un rango de positividad superior al 10% de las células, predominantemente citoplasmático con refuerzo de membrana ocasional, siendo negativos todos los LM a excepción de 2 casos de LMU escasamente positivos (únicamente citoplasmático), y de forma tan débil que se consideró posible difusión del anticuerpo. Estos resultados fueron significativos ($p < 0,001$).

En la literatura encontramos muy pocos estudios sobre c-erb-B2 en los LMS y LM uterinos. En 2004, Amant y cols, realizaron un análisis de su expresión considerando únicamente la tinción de membrana. En su serie incluyeron entre otros sarcomas uterinos, 10 LMS (7 primarios y 3 recurrencias) siendo todos ellos negativos frente a c-erb-B2, al igual que los SEE, en cambio, los adenosarcomas sí que expresaron la proteína en algunos TMM, y algunos sarcomas

indiferenciados, que presentaron en algunos casos amplificación de *erb-B2* por FISH [357]. Aunque nuestro resultado parece significativo, no se observó en prácticamente ningún caso una tinción de membrana completa y limpia, aunque se vio refuerzo focal de membrana en 4 de los 6 casos, con una positividad citoplasmática en todos ellos, habiendo que descartar reacciones cruzadas con acúmulos de proteínas citoplasmáticas en estos casos. Teniendo como referencia los amplios estudios realizados en el carcinoma mamario, donde la positividad radica inmunohistoquímicamente, en la tinción completa de membrana, nuestra positividad se debería probablemente a una reacción cruzada con otras proteínas. Por ello, sería más prudente realizar series más amplias y realizar estudios genéticos para determinar la presencia de amplificaciones del oncogen *HER2/neu* en los tumores con tinción de membrana.

Por otro lado no observamos ninguna relación estadística entre la expresión de esta proteína y el ILE y la SG, sin poder contrastar este resultado con la bibliografía.

La **e-caderina** es un marcador de transición epitelio-mesénquima, que, aunque se expresa de manera poco frecuente en los tumores mesenquimales, puede aportar en algunos casos datos interesantes. No hemos encontrado en la literatura estudios de la expresión de esta proteína en grandes series de tumores de músculo liso uterinos. En nuestro estudio todos los casos fueron negativos frente a esta proteína. Sin embargo sí que se han visto casos de **LMS de partes blandas** con expresión de e-caderina. Tian y cols, en 2013, en una serie de 45 casos observaron que la expresión de e-caderina (15,6% de los casos) y la pérdida de expresión de vimentina se correlacionaban con un pronóstico favorable, estando la expresión de e-caderina asociada significativamente a estadios clínicos tempranos [358]. Otros estudios como el de Gogou y cols, en 2009, no encontraron positividad alguna en una serie de 19 LMS primarios (no metastásicos) [359].

Entre los mediadores de la transición epitelio-mesénquima analizamos la expresión de **Slug**, que reprime la transcripción de e-caderina. Todos los casos estudiados presentaron positividad frente a esta proteína ($p \approx 0,073$). Más del 70% de los tumores benignos y más del 50% de los LMS obtuvieron una expresión extensa con más del 75% de las células positivas, presentando menos del 11% de las células positivas en un caso de LMS (LMS de bajo grado) y 3 casos de LME (3 LMA). En 2010, Yang y cols en un estudio de 31 LMS (**no uterinos**) y 38 GIST observaron la correlación inversa entre la expresión de e-caderina y la expresión de Slug en los LMS ($p < 0,001$), tanto en la expresión IHQ como en el análisis de mRNA, por lo que sugerían que Slug pudiera ser importante en el mecanismo de diferenciación epitelial en los LMS y por lo tanto una importante diana terapéutica, llevando la inhibición de Slug a una mejor respuesta frente a la QT [360]. Nosotros no pudimos realizar la relación entre la expresión de e-caderina y slug debido a que la e-caderina no se expresó en ningún caso de nuestra serie. En nuestro

estudio, las escasas diferencias entre los tumores benignos, los malignos y el miometrio control, arrojan pocas esperanzas frente a esta proteína, aunque valdría la pena realizar estudios moleculares para buscar diferencias. No hemos encontrado estudios comparativos dentro de los tumores uterinos, por lo que con ayuda de la biología molecular podría ser de gran interés el estudiar si en nuestros tumores también es susceptible de ser una buena diana terapéutica y un buen marcador de respuesta al tratamiento QT en los LMS.

Junto con Slug, realizamos la determinación inmunohistoquímica de **Snail**. Snail se expresó más frecuentemente en los UC, los LMU, seguidos de los LME, los LMC y en último lugar en los LMS. Las diferencias de expresión entre los grupos se observaron en la valoración del rango de expresión ($p < 0,005$), sin embargo en el estudio por estado se observó una relación significativa entre LMS frente a LME y LMU, aunque no entre LMS y LMC ($p \approx 0,073$) ya que estos dos últimos grupos presentaron una proporción de casos negativos similar. La menor expresión de esta proteína en los tumores benignos frente a los malignos fue llamativa. Únicamente 4 casos de LMC (25%) y un caso de LME (7,1%) mostraron una positividad por encima del 11% de las células tumorales, frente al 62% de los LMS. Sin embargo, en el grupo de los LMS no se relacionó la expresión de esta proteína con el ILE ni con la SG. No hemos encontrado en la bibliografía estudios de esta proteína en tumores de musculo liso uterinos, siendo interesante evaluar la importancia de este marcador en series más amplias, ya que puede aportar información a la hora de realizar el diagnóstico histopatológico de los LMS uterinos.

Para seguir con el estudio de la transición epitelio-mesénquima, revisamos la expresión de la proteína de adhesión **β catenina**. La valoración fue complicada, debido en primer lugar a la debilidad de la expresión, por lo que nos apoyamos también en la tinción “en gota” que presentaba en algunos casos. En nuestra serie encontramos con mayor frecuencia positividad en el grupo de LMS, seguidos de los LME y LMC, siendo todos los LMU y UC negativos, o con una intensidad de tinción muy débil considerada negativa. Por este motivo, no se observaron diferencias significativas en la expresión de β catenina entre los LMS y los LME, ni con los LMC. Por otro lado, en nuestra serie no se relacionó la expresión de esta proteína con el pronóstico, teniendo un ILE y una SG similar los casos positivos y negativos frente a β catenina en el grupo de los LMS.

En 2013, Lusby y cols, en una serie de 349 LMS, de los cuales 157 casos tenían recurrencia intraabdominal y 192 casos tenían metástasis a distancia, estudiaron entre otras la expresión de β catenina que se relacionó con un menor ILE, relacionándose la sobreexpresión como factor de riesgo de recurrencia intraabdominal [309]. Otros estudios, en 2009 como el de Gogou y cols, y el de Kildal y cols también vieron la sobreexpresión de esta proteína como un factor de riesgo en los LMS [359, 361].

La determinación de esta proteína en los tumores de músculo liso uterinos no es muy frecuente en la bibliografía consultada, Pérot y cols de 2012, se propusieron observar entre otras cosas, la localización de expresión (nuclear/citoplasmática) de esta proteína en relación con las mutaciones de *MED12* en 9 LMU (con mutación de *MED12* en 6), 5 LMA (*MED12* no mutado), 8 tumores de músculo liso de incierto potencial de malignidad (1 caso mutado), y 10 LMS (2 casos mutados). Encontraron que el 66,6% de los LMU, 80% de los LMA, el 87,7% de los tumores de incierto potencial de malignidad, y el 70% de los LMS mostraron una positividad de membrana frente a β catenina. En cambio, una tinción citoplasmática, asociada o no a una tinción de membrana, se apreció en el 22% de los LMU, 20% de LMA, 37,5% de los tumores musculares de incierto potencial de malignidad y en el 40% de LMS. Así obtuvieron que el 71,4% (5/7) tumores con mutación de *MED12* presentaron expresión de membrana, uno de ellos también citoplasmática, y los 2 casos restantes fueron negativos. Por otro lado, los casos no mutados, fueron 2 de ellos negativos, y el resto presentaron tinción de membrana y citoplasmática (16,7%), citoplasmática en el 25% y de membrana en el 41,6% [27]. Sería interesante realizar estudios más amplios, y analizar en los casos positivos la mutación del gen para valorar posibles dianas terapéuticas.

La proteína **AKT** relacionada con el ciclo celular, mostró en nuestros casos una positividad mayor en los tumores benignos y el miometrio control que en los LMS. Los resultados en cuanto al rango de expresión de esta proteína fueron significativos ($p < 0,001$). Más del 80% de los LM presentaron una positividad extensa, con más del 75% de las células positivas con una intensidad moderada a intensa, mientras en el grupo de los LMS, el 40% de los casos presentaron una positividad por debajo del 30% de las células. La activación de la vía mTOR se conoce en los tumores de músculo liso uterinos, Dhingra y cols en 2010, realizaron un estudio en 47 tumores uterinos de músculo liso (incluyendo 11 LMS, 17 tumores de músculo liso de potencial maligno incierto y 19 LM) y 9 miometrios control. Realizaron técnicas IHQ incluyendo p-AKT, p-mTOR, p-p70S6K y fosfolipasa D1 (PLD1). Todos los tumores fueron positivos con una mayor intensidad de expresión de las 4 proteínas estudiadas en los LMS, seguido de los tumores de malignidad incierta, y de los LM, siendo los miometrios control débilmente positivos frente a p-AKT, p-mTOR y PLD1, y el 22% con positividad moderada frente a p-p70S6K [362]. En nuestro estudio, la intensidad de la tinción con AKT no resultó significativa, siendo los casos positivos de forma homogénea y predominantemente moderada. Y sin embargo, sí que encontramos, 3 casos en el grupo de los LMS con menos del 10% de celularidad positiva frente a esta proteína. Sería interesante realizar más estudios para valorar la vía PI3K-AKT-mTOR en nuestra serie, ya que múltiples estudios, como el de Hernando y cols en 2007, han encontrado su relación con la proliferación del músculo liso uterino, aunque no parece ser suficiente su activación para el desarrollo de LMS [363].

Realizamos el estatus hormonal en todos los casos con la determinación de RREE y RRPP siendo más frecuente la expresión de estos últimos. A excepción de los 5 LMA de nuestra serie, y un único caso de LMU, todos los LM presentaron una positividad significativa de los RREE. En el grupo de los LMS, 6 casos resultaron negativos (37,5%) y otro presentó una positividad escasa de menos del 10% de las células tumorales. Estos hallazgos fueron significativos ($p < 0,001$), siendo los LM más frecuentemente positivos frente a estos receptores hormonales. En la literatura hay numerosas series que valoran la expresión de RREE. Gokaslan y cols, en 2005, estudiaron la expresión de estos receptores en una serie de 17 LMS uterinos, 2 tumores musculares con incierto potencial de malignidad, 9 LMA y 15 LMU. El resultado de la expresión de RREE no fue claramente significativo ($p \approx 0,07$), aunque sí próximo a su punto de corte, observando que a mayor grado de diferenciación del tumor, mayor era la expresión de este receptor. En cambio sí que encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \approx 0,005$) en la expresión de RRPP, que fue mayor en los tumores benignos (tanto LM como LMA) en comparación con los LMS [364]. En 2004 Leitao y cols, en una serie de 25 LMS y 19 LM, también observaron una mayor expresión de RREE en los LM en comparación con los LMS ($p \approx 0,03$), y también esta misma relación con la expresión de RRPP ($p \approx 0,001$), sin ver, en cambio, diferencias significativas entre estos dos grupos tumorales en cuanto a la expresión de receptores de andrógenos ($p \approx 0,75$) [71]. Estos resultados se asemejan a los nuestros, siendo interesante la evaluación de los RREE en los tumores de músculo liso uterinos, aunque los RRPP son sin duda los que tienen un papel más determinante. Pocas series han estudiado la importancia de estos marcadores con el pronóstico; entre ellos Bodner y cols en 2003, aunque no encontraron relación significativa ($p > 0,05$) entre la positividad de estos receptores (estrógenos y progesterona) y el pronóstico [70].

La positividad de los RRPP fue mayor y más intensa que la de los RREE en todos los grupos, y menos frecuente en los LMS. El estudio de los **RRPP** mostró en nuestros casos una positividad extensa de todos los LM (sólo hubo un caso de LME con menos del 25% de las células positivas, un LMA), con mayor o menor intensidad, y en el grupo de los LMS, 7 casos (43,8%) totalmente negativos frente a este receptor, y un caso (6,3%) con un rango de positividad por debajo del 10% de las células tumorales. Estos resultados fueron muy significativos ($p < 0,001$). En otras series, el valor diagnóstico de esta proteína para diferenciar entre LM y LMS estuvo por delante del de los RREE, y así Bodner y cols, propusieron este marcador para diferenciar entre LMS y tumores de músculo liso dudosos [70], ya que no sólo era significativa la mayor expresión de RRPP en los LM en comparación con los LMS, sino también existía una mayor expresión en los tumores de músculo liso con incierto potencial de malignidad frente a los LMS ($p < 0,05$). Esta misma relación la corroboraron Hewedi y cols en 2012, que vieron en este

marcador junto a p53, una buena combinación para diferenciar los tumores malignos de los benignos, siendo el perfil IHQ de RRPP positivos moderada o intensa, junto a la expresión de p53 nula o baja, específico 100% de un diagnóstico no-sarcomatoso [365]. Otros estudios han encontrado baja expresión de RRPP en los LMS [70, 78, 366], siendo de media el 45-50% de los casos negativos, resultado acorde con nuestro análisis.

El tratamiento con moduladores de los receptores de la progesterona se utiliza en los LM uterinos. En nuestro trabajo y en el resto de series se observa una menor expresión de receptores hormonales en los LMS, pero a pesar de esto, un 50% expresaron RREE y un 50% expresaron RRPP en nuestra serie. Sería interesante evaluar en casos concretos la utilización de estos tratamientos en los LMS, por ejemplo en cirugías incompletas de tumores positivos, como adyuvancia, o en tumores de bajo grado con biopsia diagnóstica positiva en pacientes poco aptos para cirugía (por el estado general, edad, negativa de la paciente...) al igual que en otras patologías uterinas [367, 368]. En 2014, Thanopoulou y cols en una serie de 16 LMS uterinos, vieron que los LMS con expresión de RREE y/o RRPP, sobretodo moderada a severa, y/o los de bajo grado y con un volumen pequeño, son los mejores candidatos al tratamiento en primera línea de inhibidores de la aromatasa (Letrozol). Constataron en sus casos una mayor supervivencia global en este grupo. Además encontraron una tolerancia al tratamiento buena. Con estos hallazgos concluyeron que el tratamiento con inhibidores de la aromatasa podría ser un buen tratamiento sistémico en casos seleccionados [369]. También en 2014, George y cols en un estudio de 26 pacientes con LMS uterinos metastásicos y/o irresecables, utilizaron Letrozol como tratamiento adyuvante, observando en el 50% una estabilización de la enfermedad en 14 de las pacientes. En este estudio también observaron una buena tolerancia del tratamiento.

La escasa toxicidad de estos tratamientos junto al beneficio en cuanto a la SG en este tipo de tumores con tan escasas posibilidades terapéuticas justificaría la posibilidad de considerar los tratamientos hormonales en pacientes seleccionados [370].

El **CD31** y el **CD34**, marcadores ambos de células endoteliales, fueron analizados en nuestra serie no sólo para observar su expresión en las células tumorales, sino también para valorar la densidad y morfología de la vascularización dentro de estos grupos tumorales. La densidad de la microvascularización es considerada un marcador de la angiogénesis, de gran importancia para el desarrollo de las lesiones neoplásicas. En nuestro trabajo, ambos marcadores fueron negativos en las células musculares tanto en los casos de miometrio control, como en todos los grupos tumorales (LMU, LMC, LME y LMS). Asimismo, no observamos diferencias entre los distintos grupos tumorales en cuanto a la densidad de la microvascularización ($p \approx 0,3$ y $p \approx 0,4$ respectivamente). Tampoco encontramos claras diferencias entre los LMS y el tejido control ($p \approx 0,07$). Poncelet y cols, en 2004, publicaron una serie de 32 miometrios normales, 32 LM uterinos y 12 LMS, donde determinaron el valor pronóstico de anticuerpos contra el factor von

Willebrand (FvW), el CD31, CD34 y el VEGF. Estos autores encontraron diferencias significativas con el FvW y el CD34 ($p < 0,05$) siendo menor la densidad de la microvascularización en los LMS y LM frente al miometrio sano. No se observaron diferencias significativas en la expresión de CD34 y anti-VEGF entre los grupos tumorales. En el grupo de los LMS, una baja densidad de la microvascularización, puesta en evidencia con anti-FvW se relacionó con recurrencias ($p \approx 0,04$) y menor SG ($p \approx 0,03$) [371]. Estudios recientes como en el de Avdalyan y cols en 2012, han utilizado la expresión de la proteína CD31 para valorar la densidad de microvascularización en los LMS y su valor pronóstico. Esta serie contaba con 66 pacientes con diagnóstico de LMS. En sus resultados, la densidad de la microvascularización, puesta en evidencia con CD31 fue menor en el tejido adyacente al tumor, sin observarse diferencias significativas ($p \approx 0,9$) entre los dos tejidos. Tampoco vieron relación entre la densidad de la microvascularización y el grado, estadio ni tamaño tumoral de los LMS. Aunque sí que encontraron relación entre la densidad de la microvascularización del tejido peritumoral y el pronóstico [372]. En 2015, Bobinski y cols en una serie de 50 LMS tampoco encontraron una relación entre la densidad de microvasos y el estadio de la FIGO, ni entre la densidad de la vascularización y el pronóstico, y con estos hallazgos concluyeron que fenómenos de “mimetismo vascular”, formación de estructuras pseudo-vasculares sin celularidad endotelial pero con capacidad de transportar sangre, y de transición epitelio-mesénquima pueden tener lugar en los LMS, y podrían relacionarse con nuevas dianas terapéuticas y factores pronósticos [373]. Estos fenómenos de mimetismo vascular se han visto en otros sarcomas como en el rabdomiosarcoma relacionándose con un peor pronóstico [374].

En cuanto a los tratamientos antiangiogénicos como la talidomida o el sunitinib, de momento no ha demostrado actividad antiangiogénicos en los LMS [375, 376].

La proteína **CD44** parece estar asociada con la migración celular y por este motivo nos pareció interesante determinar su expresión en los tumores analizados en la presente serie, en vista a estudiar su potencial en el diagnóstico y el pronóstico. En nuestro trabajo la expresión de CD44 fue similar en todos los grupos ($p \approx 0,258$). Mientras que el 46% de los UC y entre el 43% y el 75% de los LM presentaron una expresión nula o mínima de este marcador, hasta el 75% de los LMS fueron también negativos. Con respecto a los casos positivos, fueron más frecuentes en el grupo control con un 55% de los casos y en el grupo de LMU y LME con hasta un 56% de los casos con una positividad de más del 30% de la celularidad tumoral.

Ya en 1999, Rao y cols en un trabajo sobre LMS uterinos y extrauterinos, compararon la expresión de CD44s, Glut1, Bcl-2 y ciclina D1 en 16 LMS extrauterinos, 14 LMS uterinos y 5 LM uterinos y 5 LM extrauterinos viendo que mientras que todos los LM eran positivos difusamente frente a CD44s, Bcl-2 y ciclina D1, y negativos frente a Glut 1, el 50% de los LMS uterinos y el 25% de los extrauterinos eran positivos frente a Glut 1, y en cambio más del 80%

de los LMS extrauterinos y el 50% de los LMS uterinos fueron negativos frente a CD44s; resultados semejantes a los encontrados en nuestra serie. Además de esto, Glut 1 se relacionó con la agresividad tumoral [332]. La escasez de casos de LM uterinos en este estudio lo hace difícilmente comparable con nuestra serie, sin embargo, los resultados en el grupo de LMS uterinos, en un grupo similar al nuestro, se asemejan a nuestros hallazgos.

En 2001, Poncet y cols, estudiaron la expresión de CD44 y sus isoformas V3 y V6 en tumores de músculo liso uterinos para analizar su importancia en el diagnóstico anatomopatológico. Utilizaron las técnicas IHQ y de inmunoblotting en tejido control (miometrio), LM y LMS. Por un lado, por inmunoblotting, encontraron que tanto en el UC como en los LM se observaban 3 bandas, CD44s, CD44v3 y CD44v6, sin embargo, en los LMS no se encontraba la banda CD44v3. En el estudio inmunohistoquímico se observó una menor expresión de CD44s en LM y LMS comparado con los UC ($p < 0,0001$), coincidiendo además con un descenso en los LMS con recurrencia ($p \approx 0,03$), por lo que en estos tumores podría tener valor pronóstico. La ausencia de expresión en los 3 grupos de CD44v6, y la ausencia de expresión de CD44v3 en LMS pero no en LM y UC, permitió concluir en el estudio referido que la ausencia de CD44v3 podría tener valor para el diagnóstico de los LMS uterinos [377]. Más recientemente, en 2015, Kaygusuz y cols en una serie de 35 LMA y 22 LMS pusieron en evidencia con técnicas IHQ la positividad de todos los casos frente a CD44, siendo también todos negativos frente a E-caderina, concluyendo que estos dos marcadores no fueron de utilidad en su trabajo para el diagnóstico diferencial entre estas dos entidades [130].

La proteína OCT3/4, es un marcador de pluripotencialidad, Mas y cols en 2012, observaron “in vitro” la expresión de OCT4 así como de NANOG, DNMT3B y GDF3 de células indiferenciadas consideradas “side population” de leiomiomas, viendo su gran capacidad de replicación in vitro en condiciones de hipoxia, y describiendo su capacidad funcional en un modelo animal, convirtiéndose en tejido fibroso “in vivo” [378]. En nuestro estudio, LMU y LMC presentan más frecuentemente una alta expresión inmunohistoquímica de esta proteína, mientras que en los LMS y LME esta expresión es más heterogénea. Observamos una relación estadística en su expresión y el diagnóstico anatomopatológico entre los LMS frente a LMU y LMC, siendo similar la expresión entre los grupos de LMS y LME. La pérdida de esta expresión no hemos podido asociarla a ninguno de los tipos de LME analizados. En 2005, Tai y cols vieron que aunque OCT4 es un marcador de células madre embrionarias, se expresa en las células madre de algunos tejidos adultos, como el renal, pancreático, gástrico, hepático, adiposo y en las de el epitelio mamario, disminuyendo su expresión con la diferenciación de estas células. Además observaron la expresión de OCT4 en las líneas celulares de tumores de páncreas e hígado [379]. La investigación sobre células madre somáticas en los leiomiomas es una vía importante a la hora de desarrollar nuevas dianas terapéuticas [380].

5.3 HALLAZGOS CITOGENÉTICOS

A pesar de la gran frecuencia de los LM, poco se sabe acerca de la etiología de sus alteraciones genéticas. Es ya conocido el hecho de que los LM tienen un menor número de alteraciones citogenéticas que los LMS, que suelen tener cariotipos complejos. Decidimos utilizar el FISH para ver con una técnica sencilla si encontrábamos diferencias notables en estos dos grupos de tumores. La simultánea detección, en una única hibridación, del estado numérico de múltiples cromosomas así como del locus específico del gen p16, nos acerca a conocer cambios citogenéticos concretos de manera rápida. En nuestro estudio, únicamente estudiamos alteraciones numéricas de los cromosomas 3, 7 y 17 (con visualización del centrómero de estos cromosomas) y del locus específico 9p21, por lo que alteraciones que no afecten a estas regiones concretas no se pueden visualizar. No hemos encontrado en la bibliografía ningún trabajo efectuado con la sonda urovysion en tumores uterinos de músculo liso.

Se ha descrito en la bibliografía la existencia de distintas alteraciones citogenéticas en los LM, usualmente traslocaciones, deleciones y alguna trisomía.

No hemos encontrado ninguna alteración numérica de las regiones estudiadas por FISH en los LM. Esto nos indica que aunque sí están descritas alteraciones en los cromosomas estudiados como deleciones del 7q y con menor frecuencia del 3q, el número de cromosomas es más frecuentemente disómico. En distintos estudios se han encontrado deleciones del 7q en aproximadamente el 17% de los LM con cariotipo anormal [13, 381] reordenamientos del cromosoma 3 y traslocaciones que incluyen el cromosoma 17, siendo estas dos últimas poco frecuentes [382].

Por otro lado, realizamos con SNP un estudio pangenómico de 3 LME y 4 LMS, observando la presencia de diversas alteraciones. Sin embargo con esta técnica, no se visualizaron alteraciones numéricas de ninguno de los casos, ya que el programa informático que organiza los resultados obtenidos, tiende a homogeneizar los hallazgos, por lo que estas alteraciones se ven más claramente con el FISH.

En nuestro trabajo, en los 3 LME estudiados se encontraron sobretodo alteraciones segmentarias, de predominio en el cromosoma 1. Encontramos como alteraciones del cromosoma 1 en su brazo corto; 1p-(ter-36.11) y +1p(36.11-31)(31.1-22.3) en el primer caso, 1p-(ter-36.12)(35.3-34.2)(31-11.2) en el segundo caso. En 1p se alojan genes como *TP73* (1p36.2) que codifica una proteína de la familia de p53 involucrado en el control del ciclo celular y la apoptosis; además en 1p36.12 encontramos el gen *ALPL* (gen de la fosfatasa alcalina, de la que no se conoce a ciencia cierta su función), y en 1p22.3 se encuentra *LMO4*, un factor de transcripción. En 1p33-1p34 encontramos la familia de genes de *SRO*, que comprende unos 59 genes relacionados con la reparación (*MUTYH*), regulación de la proliferación (*PRDX1*), desarrollo embrionario (*FOXD2*, *FOXE3* y *PTCH2*). La ganancia afectando a genes

como *JUN* (1p32.1) se observó en LMS y en el componente de LM presente en la misma lesión [211]. La pérdida de 1p, o partes de 1p, es la segunda alteración citogenética en meningiomas y se asocia a meningiomas grado II y III. Los meningiomas tienen ciertas características similares a los LM, ambos son tumores frecuentes, los LM son lo más frecuentes a nivel uterino, y los meningiomas son los tumores cerebrales primarios más frecuentes en el adulto. En el caso de los LM es indiscutible su relación con factores hormonales. En los meningiomas diferentes estudios como el de Custer y cols en 2002, y Lee y cols en 2006, también sugirieron esta relación [383, 384]. Yen y cols en 2014, han publicado una serie de 281.244 mujeres, donde han observado que el riesgo de desarrollar un meningioma, era superior en las mujeres con LM (45%) que en las que no presentaban esta patología, en el grupo de mujeres entre los 36 y los 65 años [385]. También tienen una morfología con ciertos parecidos, expresión IHQ habitualmente de RRPP, siendo los meningiomas negativos frente a RRPP, y semejanzas citogenéticas (1p-), por lo que sería interesante un estudio más en profundidad que podría ayudar a aclarar las causas concretas de su desarrollo.

En +1q(21.1-32.2), se encuentra 1q23.3 que fue una de las regiones con mayor nivel de ganancias en el estudio de Raish y cols en 2009 [220]. Encontramos en los LMA alteraciones en el cromosoma 2 en uno de los casos 2q-(11.2-12.2)(14.2-23.3)(24.1-24.3)(32.2-ter), en 2q encontramos genes como la *Desmina* en 2q35, *ERBB4* en 2q33.3-q34, la *histona deacetilasa 4* en 2q37.3 un gen involucrado con la transcripción, y ciclo y desarrollo celular. En el tercer caso de LMA encontramos una pérdida en el cromosoma 6, 6pq-(ter-q14.1), donde se incluye el gen de los RREE, en 6q25.1, que estudiamos, siendo este caso además negativo frente a RREE. Los otros dos casos, también negativos frente a RREE no presentaron alteración de esa región.

Salvo en el caso nº1 con una FSCA +3q29, no se encontraron otras alteraciones en los cromosomas 3, 7, 17, ni alteraciones en 9p21 en ninguno de los LMA, acorde con los resultados obtenidos en el FISH. Todos los LMA fueron positivos frente a RRPP y negativos frente a RREE. El gen de los RRPP está en 11q22., y ninguno de los casos de LMA presentó alteraciones en el cromosoma 11.

En 2009, Bowden y cols, realizaron un estudio pangénómico con SNP en 16 LM y en miometrio normal. El 56% de los tumores (9) presentaron alteraciones genéticas, 4 de los cuales presentaron alteraciones de más de 5 Mb, y 5 presentaron alteraciones de menos de 5 Mb. Entre los resultados se centraron en aquellas alteraciones genéticas que no estuvieran presentes en el miometrio control, consideradas específicas de los LM. De estas 17 alteraciones encontradas exclusivamente en los LM se encontraban la delección de 1p, 1q42.13, 2q37.3, 3q25.1-q26.1, 7q21.12, 7q21.2-q31.31, 7q32.3, 7q21.3-q31.1, 11q13.1, 12q13.13, delección del cromosoma 13, 14q23.3-qter, 15q11.2-q23, 17p-q21.31, 20q11.21, y 22q12.2-q12.3, corroborando estos hallazgos con PCR cuantitativa a excepción de las delecciones de 7q21.12, 12q13.13 y 20q11.21 [386]. Dos de nuestros LM presentaron una pérdida de 1q incluyendo 1q42.13, localización que

codifica el gen RHO (de la familia RAS) una GTPasa de la familia Rho asociada a numerosos tumores [387]. Además las alteraciones de los niveles hormonales pueden alterar la expresión de este gen en el miometrio no tumoral facilitando el crecimiento de LM, ya que se ha visto que este gen es sensible al estradiol [388].

En 2011, Meadows y cols, observaron en una serie de 37 LM pertenecientes a 11 pacientes, con SNP, 15 tumores presentaban amplificación en el número de copias en más de 68 localizaciones diferentes, encontrando 3p26.3 en 4 de los tumores. Además, 4 tumores presentaron pérdida de heterocigosidad, asociada con los tumores de mayor tamaño, 2 de ellos en 7q, otro en 1p, 1q, y 16p; y el cuarto una CNLOH en 3q [389].

Por el contrario, los LMS presentaron numerosos cambios numéricos de las regiones estudiadas por FISH, siendo prácticamente todas ellas ganancias, salvo en un caso con pérdida de 9p21 (caso nº11). Nuestros resultados de los SNP no mostraron alteraciones numéricas en ninguno de los 4 casos sin embargo, sí que obtuvimos otras alteraciones, sobretodo segmentarias en el cromosoma 3 (en 2 de los casos), en el cromosoma 17 (en uno de los casos), y del brazo corto del cromosoma 9 (en uno de los casos), lugar donde se aloja la región 9p21, estando en este caso deleciónado también en el estudio por FISH. Las ganancias o pérdidas en regiones concretas de los brazos corto y largo de los cromosomas 3, 7 y 17, no son visualizadas con las sondas utilizadas aunque sí se objetivan las alteraciones numéricas de dichos cromosomas.

La pérdida del gen p16 localizado en la región 9p21 puede ser evaluada con la sonda empleada pero no si existe una polisomía del cromosoma 9. En cualquier caso, la complejidad del cambio numérico cromosómico de los LMS uterinos se pone en evidencia en nuestro trabajo, con frecuentes ganancias y pérdidas cromosómicas en muchos casos. Todo ello en contraposición a los LM, donde no hemos observado cambio de número cromosómico de las señales de las sondas utilizadas en ninguno de los casos de los diferentes subgrupos.

En los SNP encontramos variadas alteraciones segmentarias; en el cromosoma 1, con pérdida completa del brazo corto, 1p; en el cromosoma 2 en 2q-(24.1-ter); en el cromosoma 3, en 3q-(24-25.2), 3p-(12.3-11.1), 3q-(21.1-26.329, en el cromosoma 5 en 5p-(ter-13.3) y 5q-(ter-13.3), en el cromosoma 6 en 6p-, en el cromosoma 8 en 8p-(ter-11.21), en el cromosoma 9 en 9p(ter-13.1), en el cromosoma 10 en 10q-(22.3-24.32), en el cromosoma 14 en 14q-(23.3-24.3), y en el cromosoma 22 en 22q-(11.21-ter).

En las series publicadas, los LMS tienen numerosas alteraciones genéticas y cariotipos usualmente muy complejos. Se han realizado numerosos estudios citogenéticos con distintas técnicas para detectar las alteraciones de estos tumores. Los LMS uterinos son diferentes tanto clínicamente como genéticamente al resto de LMS de partes blandas.

En 2001, Hu y cols analizaron 21 LMS uterinos por hibridación genómica comparada, observando alteraciones en el número de copias de DNA en todos los casos. Las pérdidas más frecuentes fueron las de 13q (16/21 = 76%), 10q (13/21 = 62%), 16q (8/21 = 38%), 12p (7/21 =

33%), and 2p (9/21 = 43%). Las ganancias más frecuentes fueron las de **17p** (8/21 = 38%), Xp (7/21 = 33%), y 1q (7/21 = 33%). Ganancias con gran cantidad de copias se vieron en Xp, 1q, y **17p**. [218]. Observaron que pérdidas de 10q, 2p y 12p y ganancias de 1q y 17p se encontraban con mayor frecuencia en los LMS de alto grado y con recurrencias, asociando la inactivación de genes supresores y la activación de oncogenes en estas regiones a un comportamiento más agresivo. En cambio, también constataron que tumores con pérdida únicamente de 13q, sin otros hallazgos, tuvieron mayor SG.

Cho y cols en 2005, mostraron mediante arrays de CGH y FISH alteraciones específicas en estos tumores. Regiones cromosómicas ganadas fueron 7q36.3, 7q33-q35, 12q13-q15, y 12q23.3, mientras que regiones con pérdidas homocigotas fueron 1q21.1, 2p22.2, 6p11.2, **9p21.1**, 9p22.1, 14q32.33 y 14q32.33 [207]. Más recientemente en 2011, Raish y cols, también realizaron estudios citogenéticos mediante arrays de GH y PCR en 15 casos de LMS uterinos, encontrando en todos ellos ganancias y pérdidas específicas. Entre otras, encontraron ganancias de 7p14.2, 7q34, 7q35, 7q36.3, 17p11.2, 17p13.3, 17q21.33, 17q25.3, además de hallar regiones de pérdidas concretas en 7q21.2, 9p21.2, y 17p13.1 [220].

5.4 ÁRBOL DE TOMA DE DECISIÓN DE AYUDA AL DIAGNÓSTICO

Hay que tener en cuenta las limitaciones y la variabilidad del set de entrenamiento.

Los resultados obtenidos sirven para nuestra serie, pero a la hora de extrapolar los resultados habría que realizar series amplias. En nuestro trabajo, la variable que mejor discrimina entre LM y LMS es el número de mitosis, con un punto de corte en 15 mitosis en 10 CGA. En segundo lugar, la variable que reclasifica correctamente un número mayor de muestras mal clasificadas fueron, c-kit, ki67 y p53, siendo la primera la que lo hacía de forma constante, fueran cuales fueran los casos seleccionados aleatoriamente en los grupos de LMS. De los 7 casos de LMS con un recuento mitótico inferior a 16 mitosis en 10 CGA, 5 de ellos presentaron positividad citoplasmática frente a c-kit al menos en el 11 % de su celularidad, esto explica que estas dos variables juntas, lograron clasificar 12 de los 16 LMS correctamente.

Las otras dos variables, como p53 y ki67 también complementan al número de mitosis para ayudar al diagnóstico, aunque en nuestra serie de forma menos estable. De todos modos, la precisión puede ser en algunos modelos incluso superior a la obtenida con c-kit.

Tenemos que tener en cuenta que otras variables, como p16, aunque por si solas pueden aportar una mayor información a la hora del diagnóstico que c-kit, al utilizarla con otras de nuestras variables pueden no mejorar la clasificación de una lesión.

Parece que p53, y p16 se suelen corresponder bastante con ki67, como hemos visto anteriormente, por lo que no suelen complementarse para la toma de decisiones.

Estos algoritmos de decisión han sido utilizados en medicina en múltiples estudios, por ejemplo para clasificar enfermedades en distintos estadios, como en 2014, Mestizo Gutiérrez y cols, en la enfermedad de Alzheimer, observando que es el mini-Mental State Examination (MMSE) la variable más informativa para esta clasificación [390].

También puede servir para la toma de decisiones en cuanto a tratamiento, según diferentes parámetros; en 2014 Putora y cols, realizaron en conjunto con otros centros, el árbol de decisión para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata basándose en 3 parámetros, el estadio quirúrgico, el nivel de Gleason, y los niveles de PSA [391], utilizando el árbol de decisión para sentar unas bases objetivas para el consenso.

6. CONCLUSIONES

“La tesis no se acaba.....se entrega” L.T

El análisis clínico, histopatológico, inmunohistoquímico, citogenético y pronóstico de 16 casos de LMS uterinos y 60 LM uterinos incluíbles dentro del contexto de los llamados “tumores mesenquimales de músculo liso” nos ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. La edad media de las pacientes con LM uterinos es inferior a la que presentan los LMS. Mientras que los LM aparecen en la edad fértil, los LMS aparecen predominantemente a partir de los 45 años.
2. LM y LMS presentan una clínica de debut semejante, lo que dificulta el diagnóstico clínico. El sangrado es la forma de presentación más frecuente en ambos grupos, aunque su significado es mayor tras la menopausia. La presencia de dolor es más frecuente en el grupo de los LMS, ya que suelen ser tumores de mayor tamaño.
3. El tamaño tumoral de más de 10 cm es un criterio importante de sospecho de malignidad a tener en cuenta en la clínica. Los LMS suelen ser de gran tamaño.
4. Desde un punto de vista morfológico, un recuento de más de 10 mitosis en 10 CGA es un criterio sospechoso de malignidad. Los LM mitóticamente activos no suelen rebasar las 8 mitosis en 10 CGA. Por otro lado, cuando elevamos el conteo a 15 mitosis en 10 CGA, es un excelente criterio para la toma de decisión en el diagnóstico, siendo en nuestro estudio el mejor de todos.
5. El índice de proliferación puesto en evidencia con la expresión de ki67, es superior en el grupo de los LMS frente a los LM, no obstante, aunque es un excelente marcador nuclear de células en ciclo, no sustituye ni supera el recuento mitótico.
6. Las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas Bax y Bcl-2 están relacionadas con el estadio tumoral, aunque su heterogeneidad y el tamaño muestral del presente estudio, no permiten confirmar esta relación.
7. Diferentes proteínas del ciclo celular (p53, p16 y p21) están sobreexpresadas en los LMS con mayor frecuencia que en los LM. Especialmente la p53, es un buen marcador para el diagnóstico diferencial con los LM. También la intensidad de p16 puede servir de ayuda, siendo más intensa y homogénea en los LMS.
8. Expresión de dianas terapéuticas como c-kit, c-erb-B2, PDGFR α o IGFR-1 necesitan ser estudiadas en series mayores para conocer su posible importancia terapéutica en los LMS. La

expresión de c-kit se ha encontrado en nuestra serie únicamente en los LMS, siendo una tinción citoplasmática que sería interesante interpretar con series más amplias.

9. La expresión de receptores hormonales en los LMS es menos frecuente que en los LM, observando que son los LMS de alto grado los que con mayor frecuencia son negativos. Sería interesante considerar la terapia hormonal como un posible tratamiento adyuvante en los casos positivos como los moduladores de los receptores de la progesterona en los LM.

10. Genéticamente, los LM no parecen presentar alteraciones numéricas de los cromosomas 3, 7, 17 ni del locus específico 9p21. Por el contrario, los LMS, tumores que presentan frecuentemente cariotipos complejos, muestran con frecuencia ganancias del cromosoma 3 y menos frecuentemente de los cromosomas 7 y 17 y del locus 9p21. Las pérdidas cromosómicas y/o deleciones de estos cromosomas, son menos frecuentes en estos tumores.

11. La somía cromosómica de estos tumores se ha podido determinar de forma más precisa mediante la técnica FISH que con SNP de Illumina.

Los tumores de músculo liso uterinos tienen variadas y numerosas alteraciones genéticas; si observamos las tendencias con estudios pangenómicos podemos seleccionar cuáles de ellas tienen interés en el desarrollo de estudios posteriores.

12. Los árboles de decisión pueden servir de base para el consenso en la toma de decisiones, y un punto de partida para considerar nuevas alternativas para llegar al diagnóstico, con una precisión por encima del 80%. El contaje por encima de 15 mitosis en 10 CGA en primero lugar, junto a la expresión de c-kit, p53 y ki67 ha sido de utilidad en la toma de decisión del diagnóstico, La variable c-kit es más estable en nuestra serie, aunque es la más difícilmente interpretable en estos tumores. Estas variables son complementarias con la primera, por lo que le aportan un añadido de información para diferenciar entre LM y LMS

7. ANEXOS

“Las imágenes eran lo que de niños nos hacía felices, hacen funcionar otras partes del cerebro, ya cansado de tanta letra”. L.A.

ANEXO 1

LMU	K1S7	BCL	BAV	PS3	CD11	P16	P11	P17	CKIT	PGFR α	IGFR	CERB2	SLUG	SNAIL	PCAT	ANT	RRE	RFP	CD44	OCT3
1	0	2	3	0	0	1	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	2	3	0	3
2	0	3	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0	2	2	3	2	0
3	0	2	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	2	3	0	3
4	0	2	3	0	0	1	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	2	3	0	2
5	0	3	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	2	3
6	0	2	3	0	0	1	0	1	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	0	2
7	0	2	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	2	2	2	0	3
8	0	3	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	3	3	3
9	0	2	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0	3	3	2	2	3
10	0	3	3	0	0	0	0	1	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	2	3
11	0	3	3	0	0	0	0	3	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	2	3
12	0	3	3	0	0	1	0	2	0	3	0	0	2	0	0	3	3	2	0	2
13	0	3	3	0	0	1	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	0	3
14	0	2	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	2	3
15	0	2	3	0	1	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	0	3
16	0	1	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0	2	3	1	1	2
17	0	2	3	0	0	1	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	3	3
18	0	3	3	0	0	0	0	2	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	0	3
19	0	3	3	0	0	1	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	0	3
20	0	2	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	2	3
21	0	2	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	2	3
22	0	3	3	0	0	1	0	2	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	2	3
23	0	2	3	0	0	1	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	0	3
24	0	3	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	2	3
25	0	2	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	0	3
26	0	3	3	0	0	0	0	2	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	1	3
27	0	3	3	0	1	1	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	1	3
28	0	3	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	1	3
29	0	3	3	0	0	0	0	2	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	0	3
30	0	2	3	0	0	2	0	2	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	0	3

Figura 95: Resultados inmunohistoquímicos más relevantes en leiomiomas usuales (LMU).

ANEXO 2

LMC	KI67	BCL2	BAX	P53	CICL D1	P16	P1	P17	CKIT	PDGFR α	IGFB	CEREB	SLUG	SNAIL	PCAT	AKT	RRE	RFP	CD44	OCT3
1	0	3	2	0	0	0	0	1	0	3	0	0	3	0	0	3	3	3	0	2
2	0	3	3	0	0	0	0	1	0	3	0	0	3	0	0	3	3	3	0	3
3	0	2	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	3	0	3
4	0	3	3	0	0	0	0	1	0	2	0	0	3	0	0	3	2	3	0	3
5	0	3	3	0	0	1	0	1	0	3	0	0	3	0	0	3	3	2	0	3
6	0	2	2	0	0	0	0	1	0	2	0	0	3	0	0	3	2	2	0	2
7	0	3	3	0	0	0	2	1	0	3	0	0	3	2	2	3	3	3	3	3
8	0	3	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	3	0	3
9	0	3	3	0	0	0	0	1	0	3	0	0	3	0	0	3	3	3	0	3
10	0	2	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	2	3	0	3
11	0	2	3	0	0	1	1	3	0	3	0	0	3	2	2	3	3	2	0	2
12	0	3	3	0	2	2	2	1	0	3	0	0	3	2	3	3	2	3	3	3
13	0	2	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	1	3	2	3	2	3
14	0	3	3	0	0	0	0	1	0	3	0	0	3	2	1	2	2	2	0	3
15	0	2	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	1	3	2	2	1	3
16	1	3	3	0	0	0	0	2	0	3	0	0	3	0	1	3	3	3	0	3

Figura 96: Resultados inmunohistoquímicos más relevantes en leiomiomas celulares (LMC).

ANEXO 3

LME	K67	BCL2	BAV	P53	CICL1	P16	P11	P17	CKIT	PDGFRα	IGFR	CERB	SLUG	SNAIL	PCAT	AKT	RRE	RPP	CD44	OCT3
1	0	3	3	0	0	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	3	0	3	2	2
2	0	2	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	3	0	2	2	2
3	0	2	3	0	0	0	2	1	0	3	0	0	2	0	0	2	0	3	2	3
4	0	2	3	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
5	0	3	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	5	0	2	3	1	3	0	3
6	0	3	3	0	0	0	1	0	0	3	0	0	3	0	0	3	2	3	3	0
7	0	3	3	0	0	1	0	0	0	3	0	0	3	0	0	2	0	3	0	0
8	0	3	3	0	1	1	0	1	0	3	0	0	3	0	2	3	3	3	0	0
9	0	3	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	3	3	0	3
10	0	2	3	0	0	1	1	0	0	3	0	0	3	0	0	3	1	2	1	3
11	0	3	3	0	1	1	0	0	0	3	0	0	3	0	2	3	3	3	0	2
12	0	3	3	0	1	1	1	0	0	3	0	0	3	0	1	3	2	3	2	2
13	0	3	3	0	1	1	0	0	0	3	0	0	3	2	2	3	1	3	1	0
14	0	3	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0	3	0	1

Figura 97: Resultados inmunohistoquímicos más relevantes en leiomiomas especiales (LME).

ANEXO 4

LMS	KI67	BCI2	BAX	P53	CICLI	P16	P21	P27	CKIT	PDGFRA	IGFR	CERB2	SLUG	SNAIL	BCAT	AKT	RREB	RPPP	CD44	OCT3
1	2	1	3	0	0	2	1	2	0	3	0	3	1	1	0	3	0	0	0	1
2	0	1	3	0	0	1	0	0	1	3	0	1	2	2	1	2	2	3	0	0
3	2	0	3	2	0	3	0	2	2	3	0	2	3	0	0	2	0	0	0	1
4	0	3	3	1	0	2	1	1	2	3	0	0	3	1	0	1	3	3	0	2
5	2	1	3	2	1	1	1	1	1	3	0	1	2	2	1	2	0	0	2	2
6	2	2	3	1	0	3	0	2	1	3	0	0	3	2	2	1	1	2	0	3
7	1	3	3	0	0	3	1	2	2	3	0	2	3	2	2	0	1	1	1	2
8	1	3	3	1	0	1	1	0	1	3	0	0	3	0	1	3	3	0	0	2
9	2	3	3	0	0	3	1	3	1	3	0	0	1	1	2	2	2	2	0	0
10	3	0	3	3	0	3	1	2	1	3	3	2	3	1	2	0	0	0	1	2
11	1	3	3	0	3	0	1	3	3	3	0	0	3	3	1	1	2	2	0	3
12	1	0	3	2	0	2	1	1	0	3	1	1	2	1	0	2	0	0	0	2
13	0	2	3	0	0	0	1	0	0	3	0	0	2	0	0	0	2	3	0	3
14	2	0	3	2	0	3	0	0	0	3	0	0	0	0	2	2	0	0	2	3
15	2	0	3	0	0	0	0	1	0	3	0	0	2	0	0	2	0	0	0	1
16	2	1	3	3	0	3	1	3	0	3	0	0	3	0	2	3	2	0	0	0

Figura 98: Resultados inmunohistoquímicos más relevantes en leiomiomas (LMS).

ANEXO 5

UC	K67	BCL2	BAX	ES3	CDC1D1	P16	P11	P17	CKIT	PDGFR α	IGFBP	CERB2	SLUG	SNAIL	BCAT	AKT	RESTR	RFP	CD44R	OCT3
1	0	3	3	0	0	0	0	2	0	3	0	0	3	0	0	3	3	3	1	2
2	0	2	3	0	0	0	0	2	0	3	0	0	3	0	0	3	0	3	2	0
3	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
4	0	3	3	0	0	0	0	2	0	3	0	0	3	0	0	3	3	3	0	0
5	0	3	3	0	0	0	0	2	0	3	0	0	3	0	0	3	3	3	2	0
6	0	3	3	0	0	0	0	2	0	3	0	0	3	0	0	3	3	3	2	0
7	0	3	3	0	0	0	0	2	0	2	0	0	2	0	0	3	3	2	1	2
8	0	3	3	0	0	0	0	1	0	3	0	0	3	0	0	3	3	3	2	3
9	0	0	3	0	0	0	0	1	0	3	0	0	2	0	0	3	3	3	0	2
10	0	3	3	0	0	0	0	1	0	3	0	0	3	0	0	3	3	3	0	2
11	0	3	3	0	0	0	0	3	0	3	0	0	3	0	0	3	2	1	0	0
12	0	3	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0	3	0	3	2	3
13	0	3	3	0	0	0	0	1	0	3	0	0	3	0	0	3	2	3	0	3

Figura 99: Resultados inmunohistoquímicos más relevantes en útero control (UC).

ANEXO 6

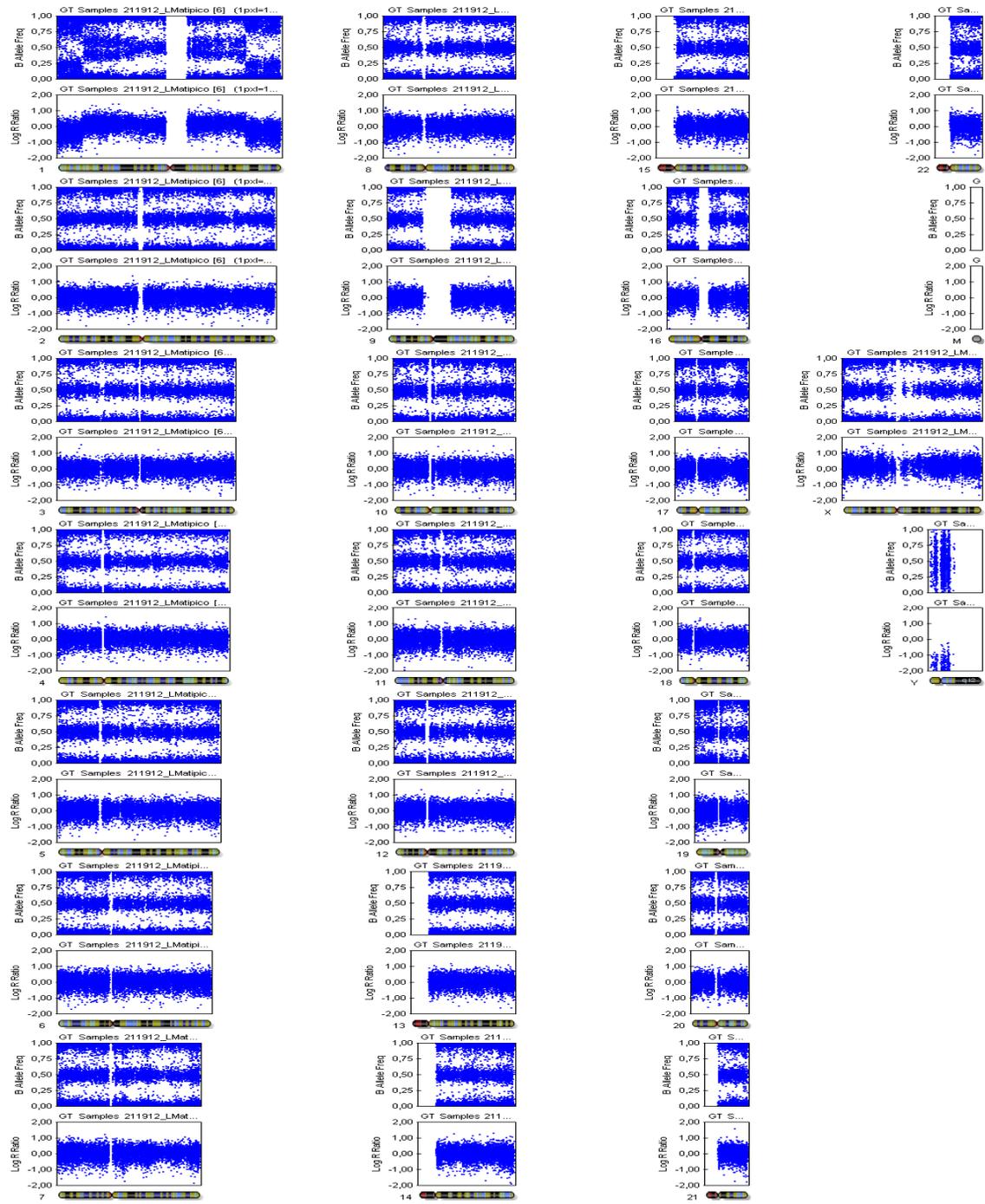


Figura 100: Conjunto de resultados de SNP del leiomioma atípico (LMA) n°1 (a0s5).

ANEXO 7

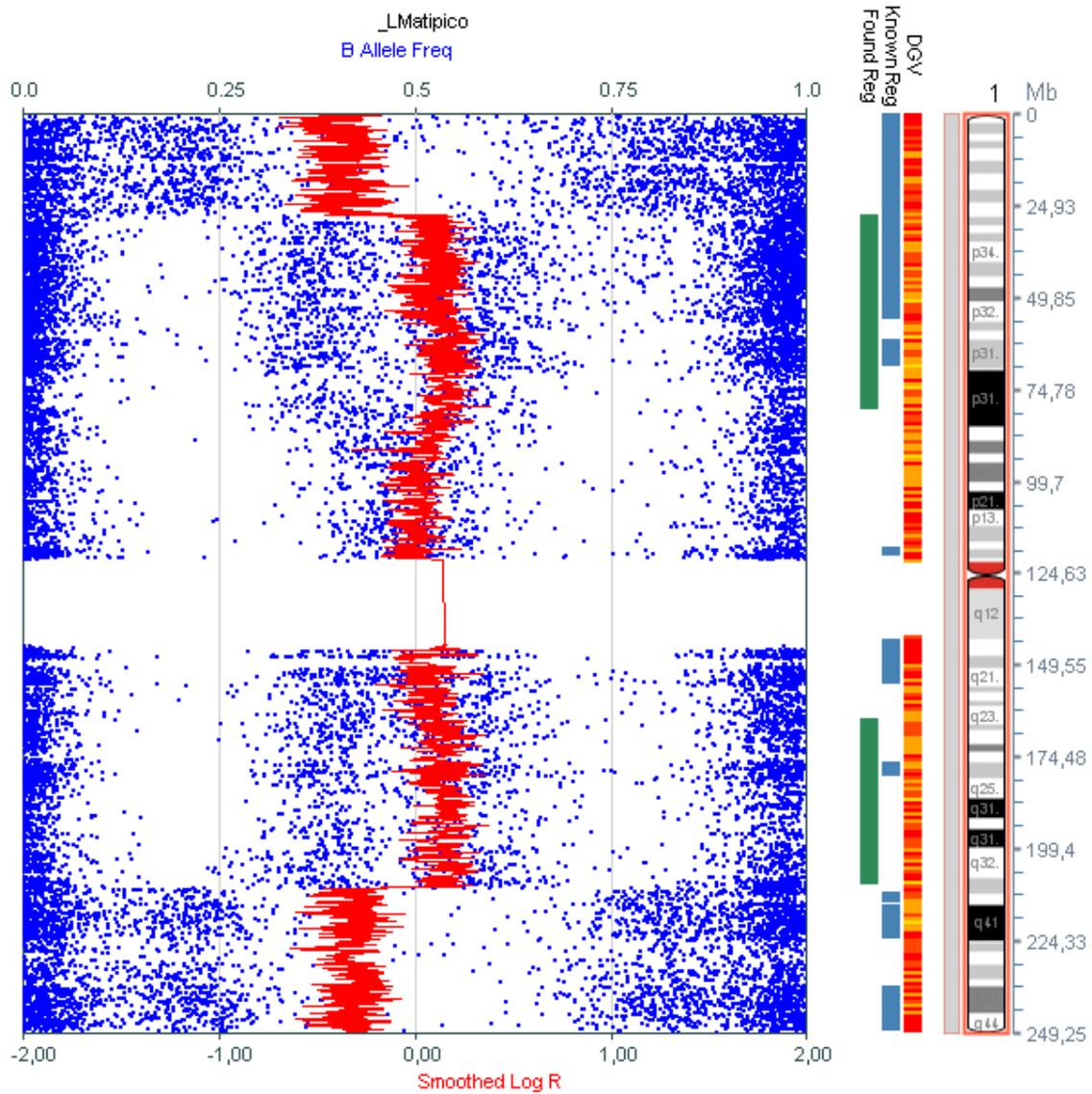


Figura 101: Resultados de los SNP en el cromosoma 1 en el leiomioma atípico (LMatípico) n°1
 Pérdida de 1p(ter-36.11), ganancia de 1p(36.11-31.1)(31.1-22.3), ganancia de 1q(21.1-32.2),
 pérdida de 1q(32.2-ter).

ANEXO 8

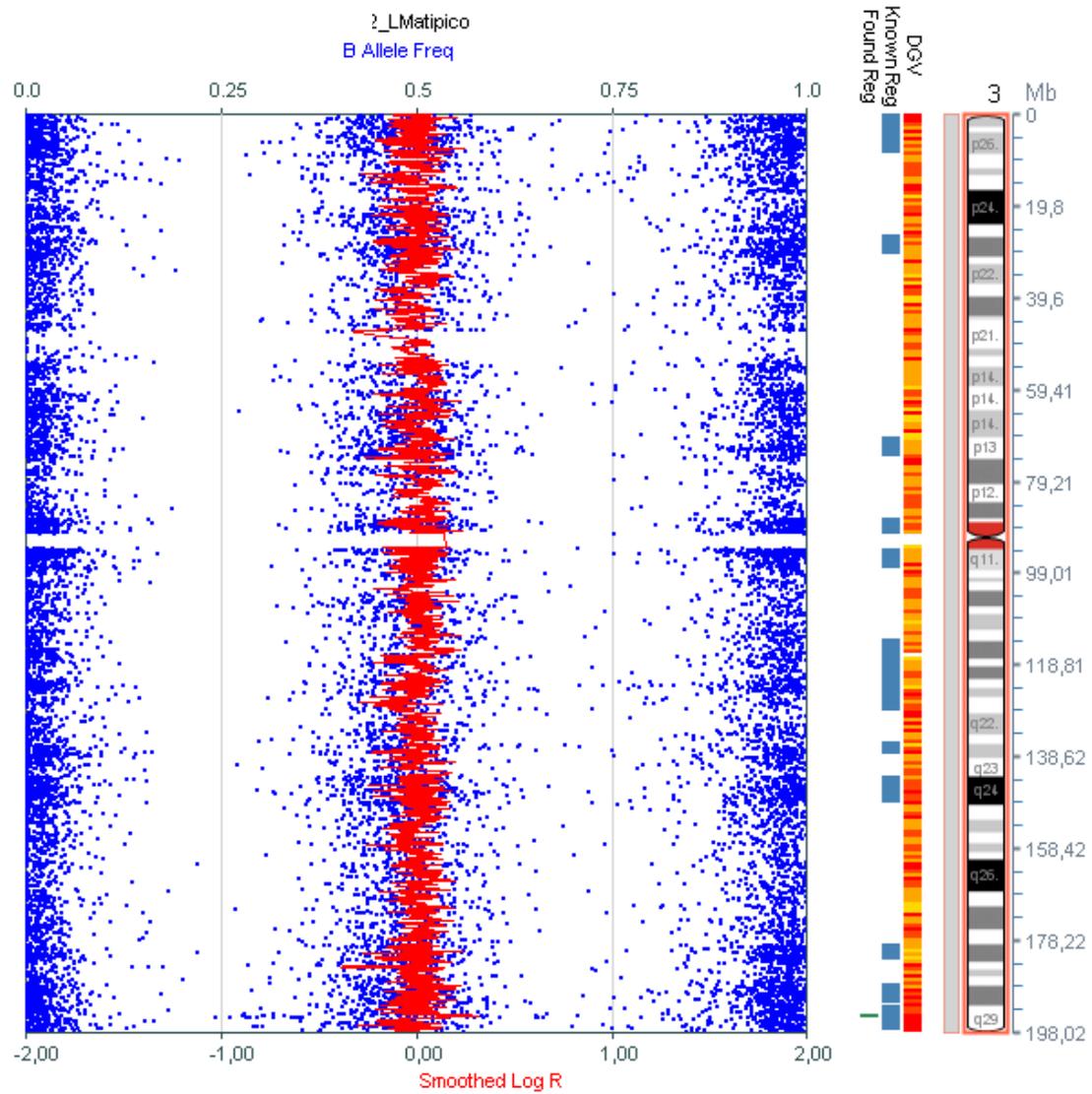


Figura 102: Resultados de los SNP en el cromosoma 3 en el leiomioma atípico (LMatípico) n°1. Aberración cromosómica focal segmentaria (FSCA) +3q29.

ANEXO 9

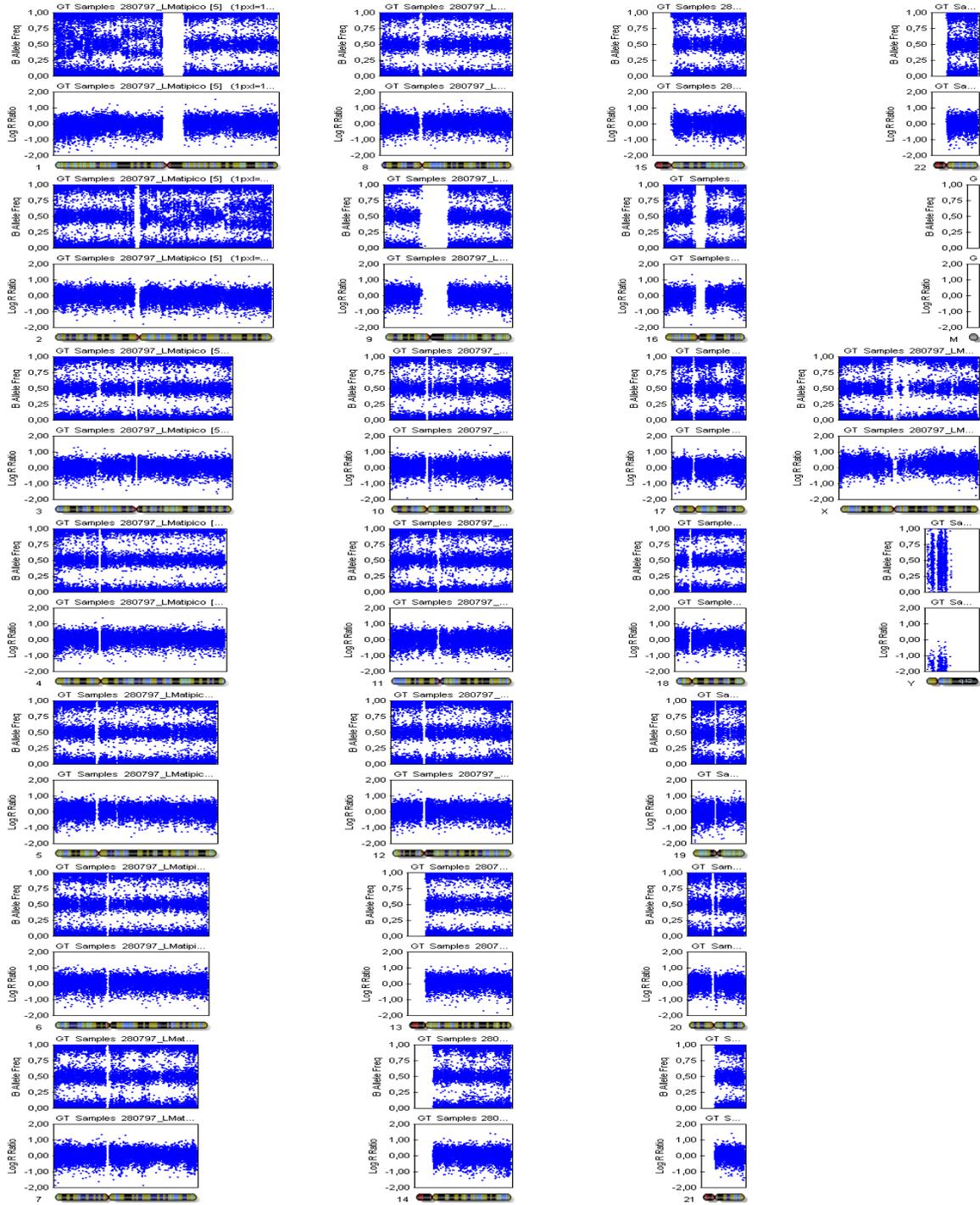


Figura 103: Conjunto de resultados de SNP del leiomioma atípico (LMA) n°2 (a0s12).

ANEXO 10

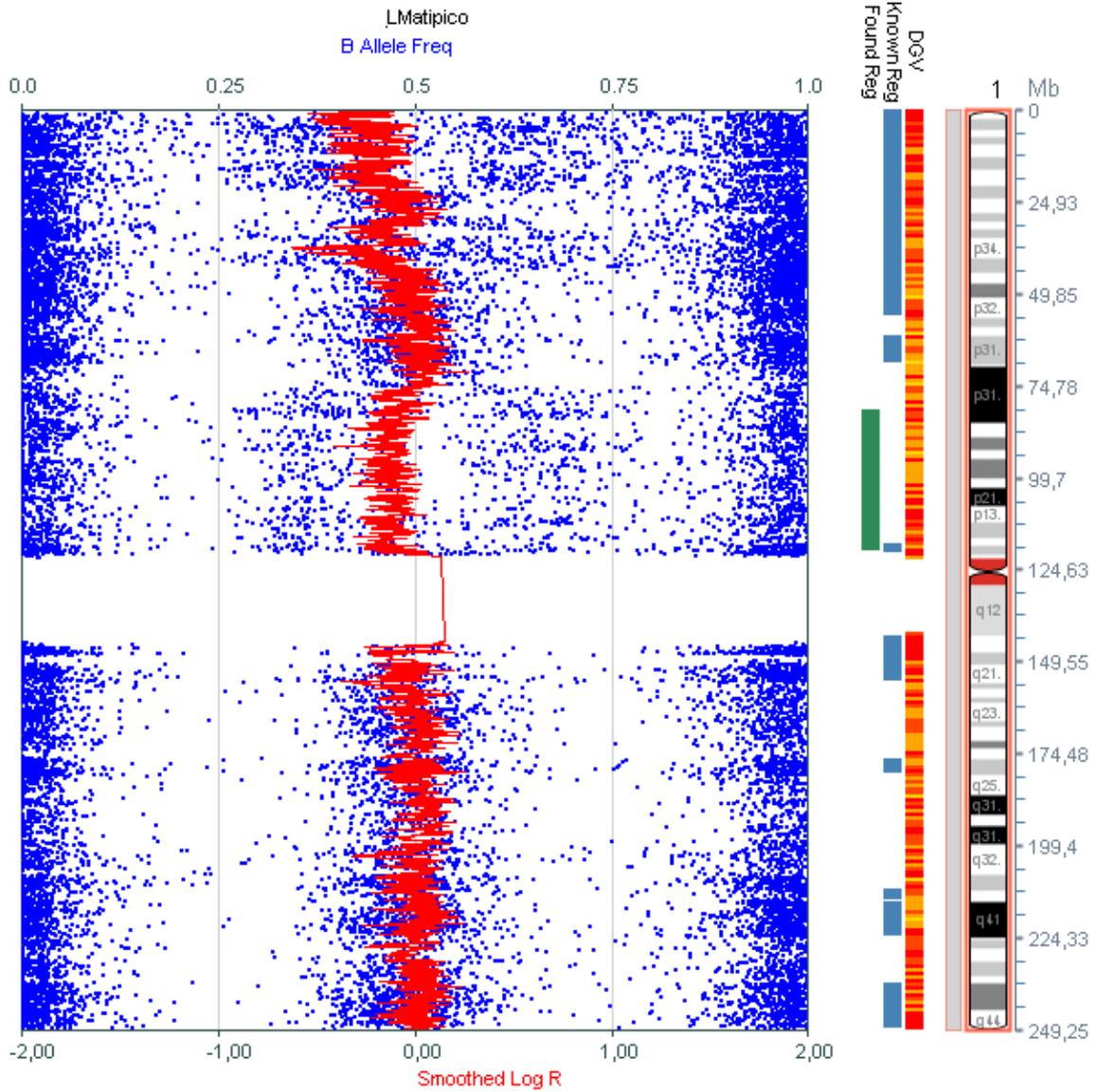


Figura 104: Resultados de SNP en el cromosoma 1 en el leiomioma atípico (LMatípico) n°2
 Pérdida de 1p(ter-36.12)(35.3-34.2)(31-11.2).

ANEXO 11

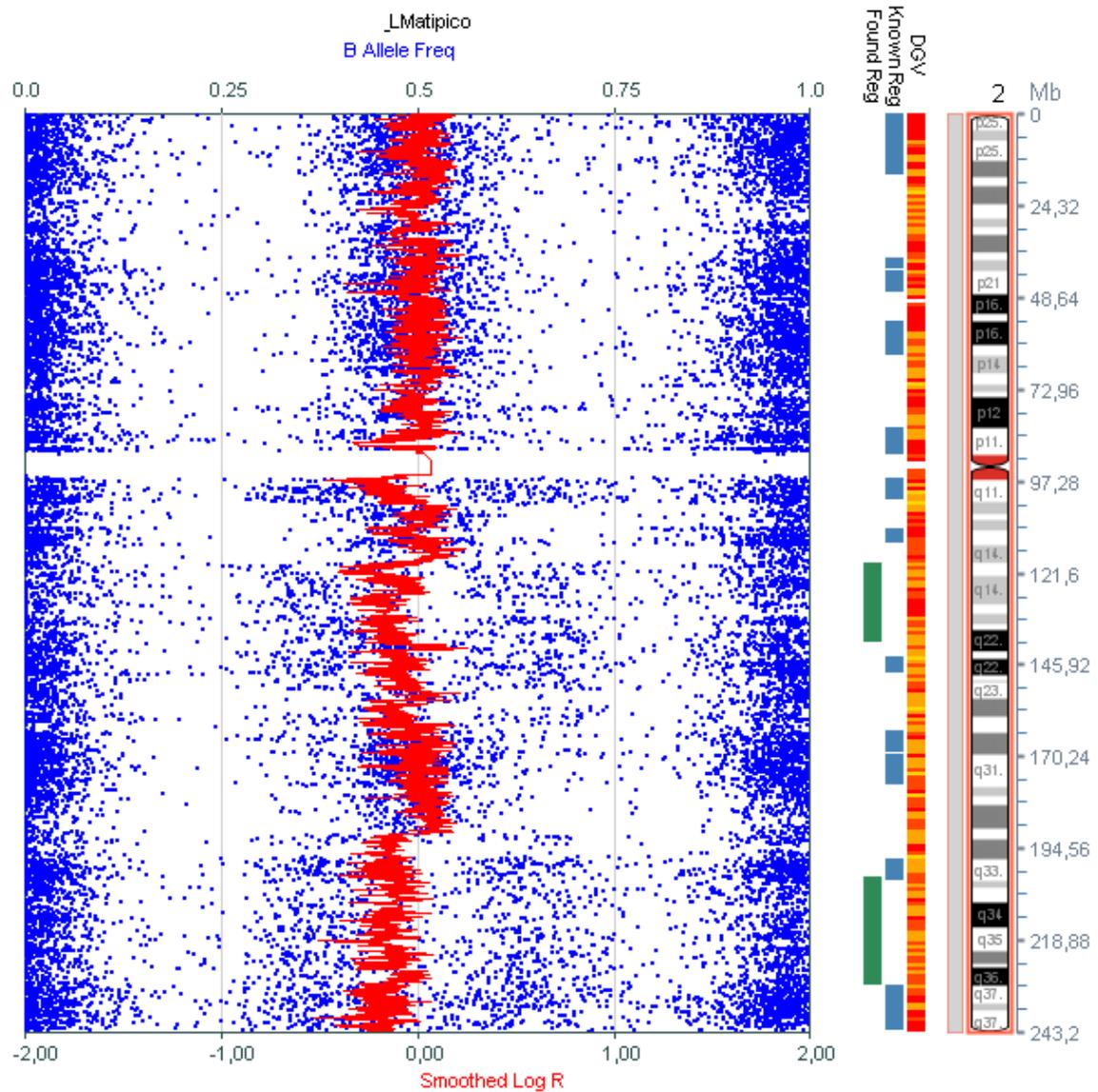


Figura 105: Resultados de SNP en el cromosoma 2 en el leiomioma atípico (LMatípico) n°2. Pérdida de 2q(11.2-12.2)(14.2-23.3)(24.1-24.3)(32.2-ter). Aberración cromosómica focal segmentaria (FSCA) 2p-(p12), número de copia neutro con pérdida de heterocigosidad (CNLOH) 2q(31.1-31.2).

ANEXO 12

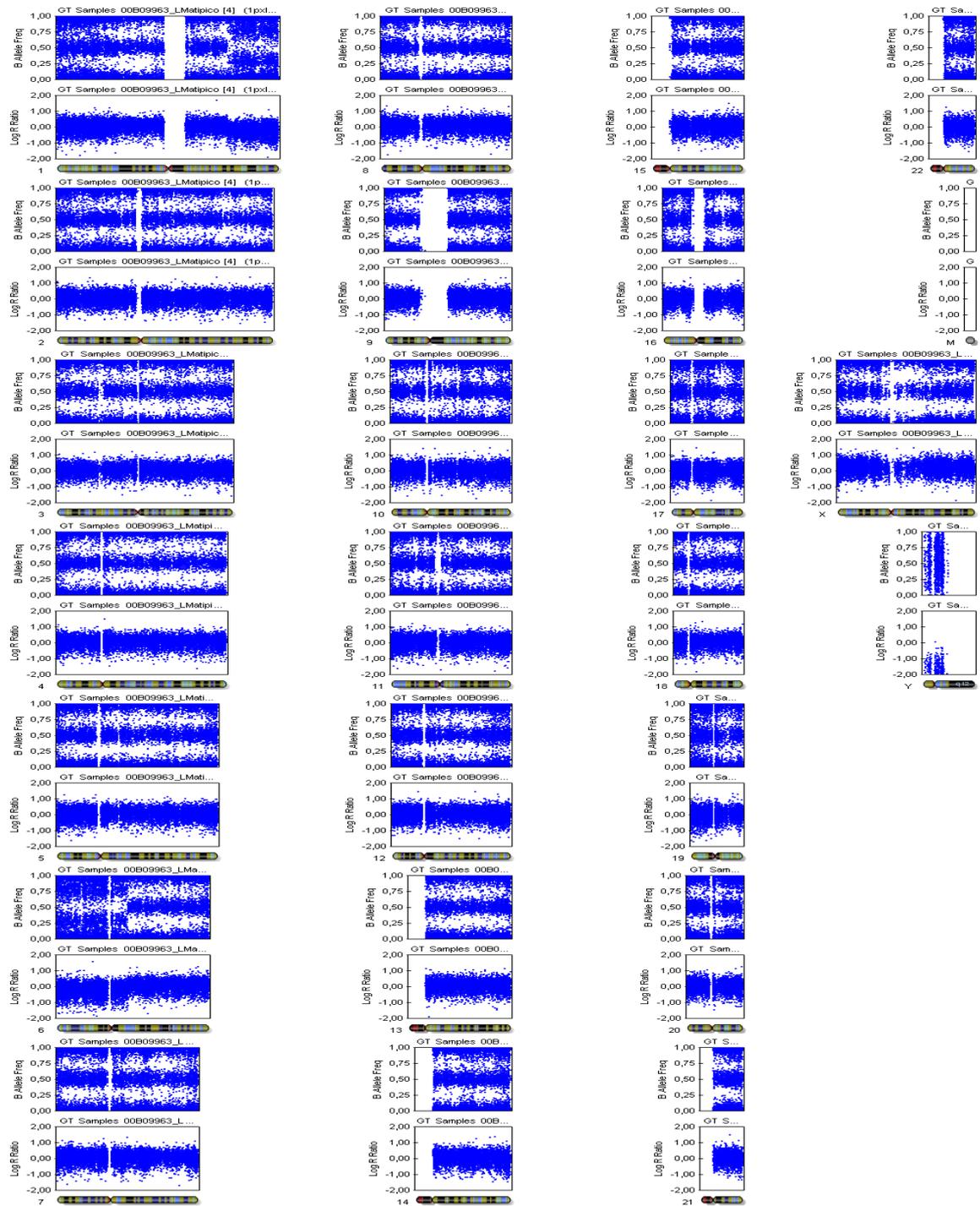


Figura 106: Conjunto de resultados de SNP del leiomioma atípico (LMA) n°3 (a0s2).

ANEXO 13

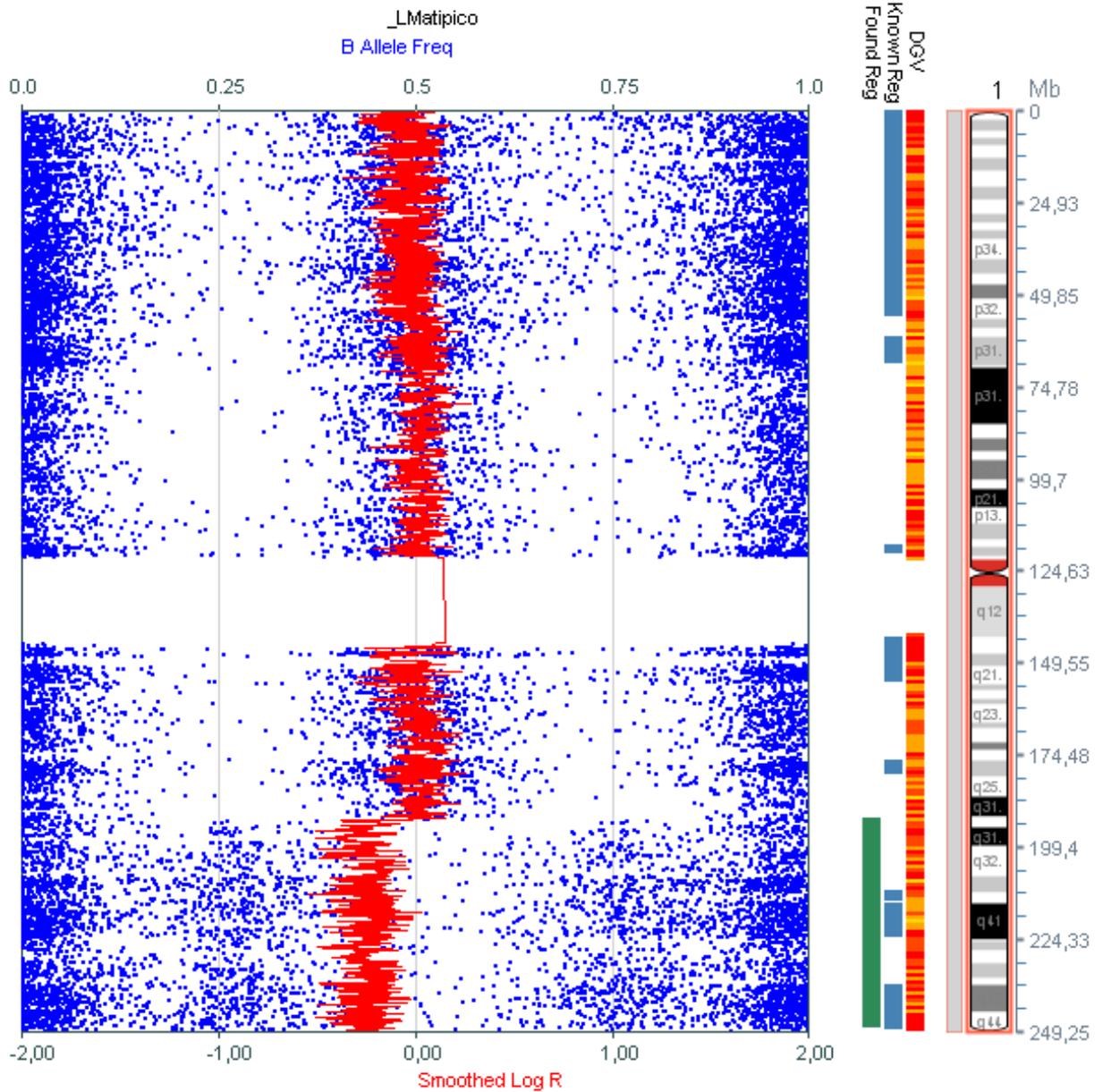


Figura 107: Resultados de SNP en el cromosoma 1 en el leiomioma atípico (LMatípico) nº3. Pérdida de 1q(31.2-ter).

ANEXO 14

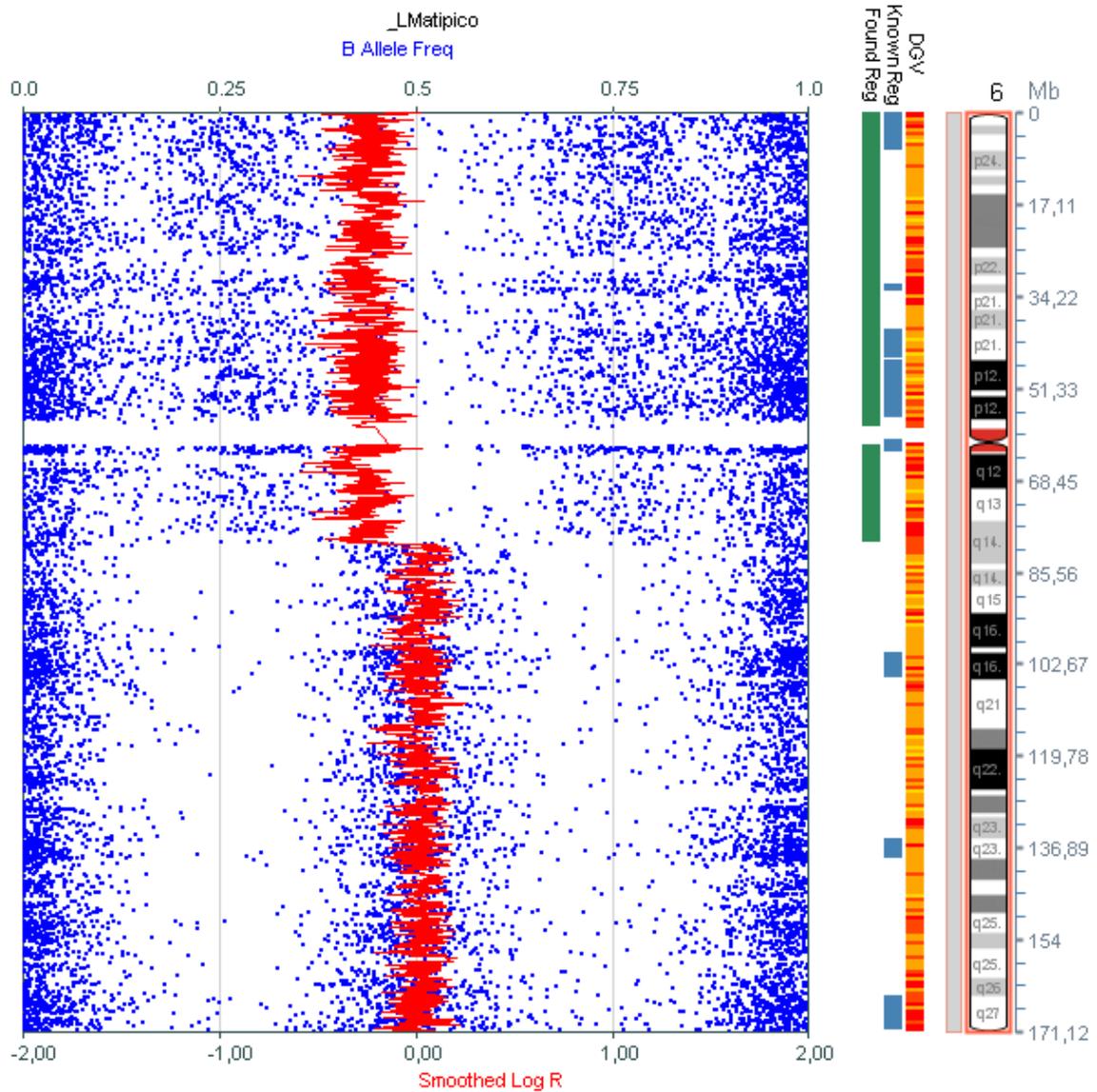


Figura 108: Resultados de SNP en el cromosoma 6 en el leiomioma atípico (LMatípico) n°3 Pérdida de 6pq(ter-q14.1).

ANEXO 15

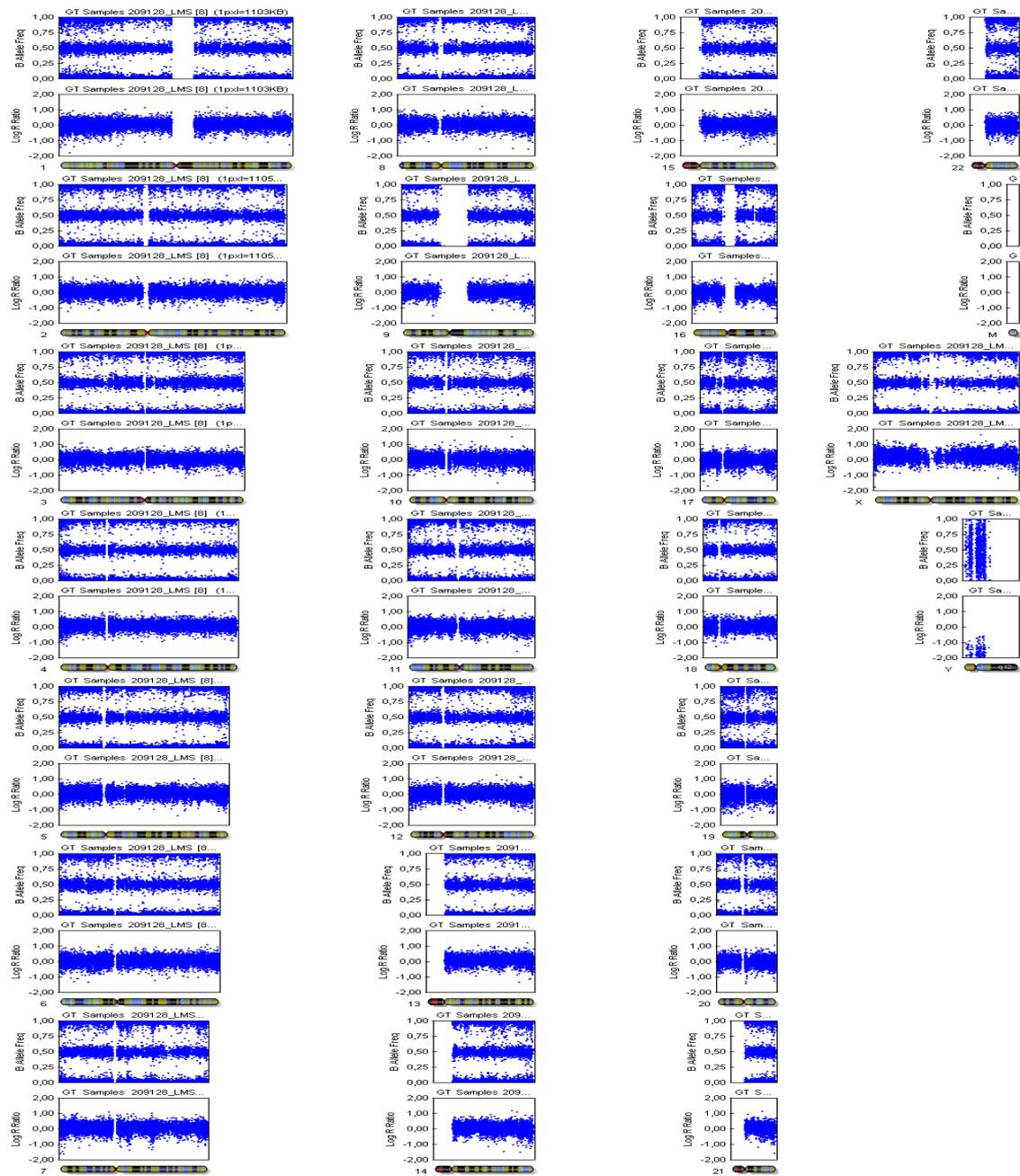


Figura 109: Conjunto de resultados de SNP del leiomioma (LMS) nº4 (a0s0).

ANEXO 16

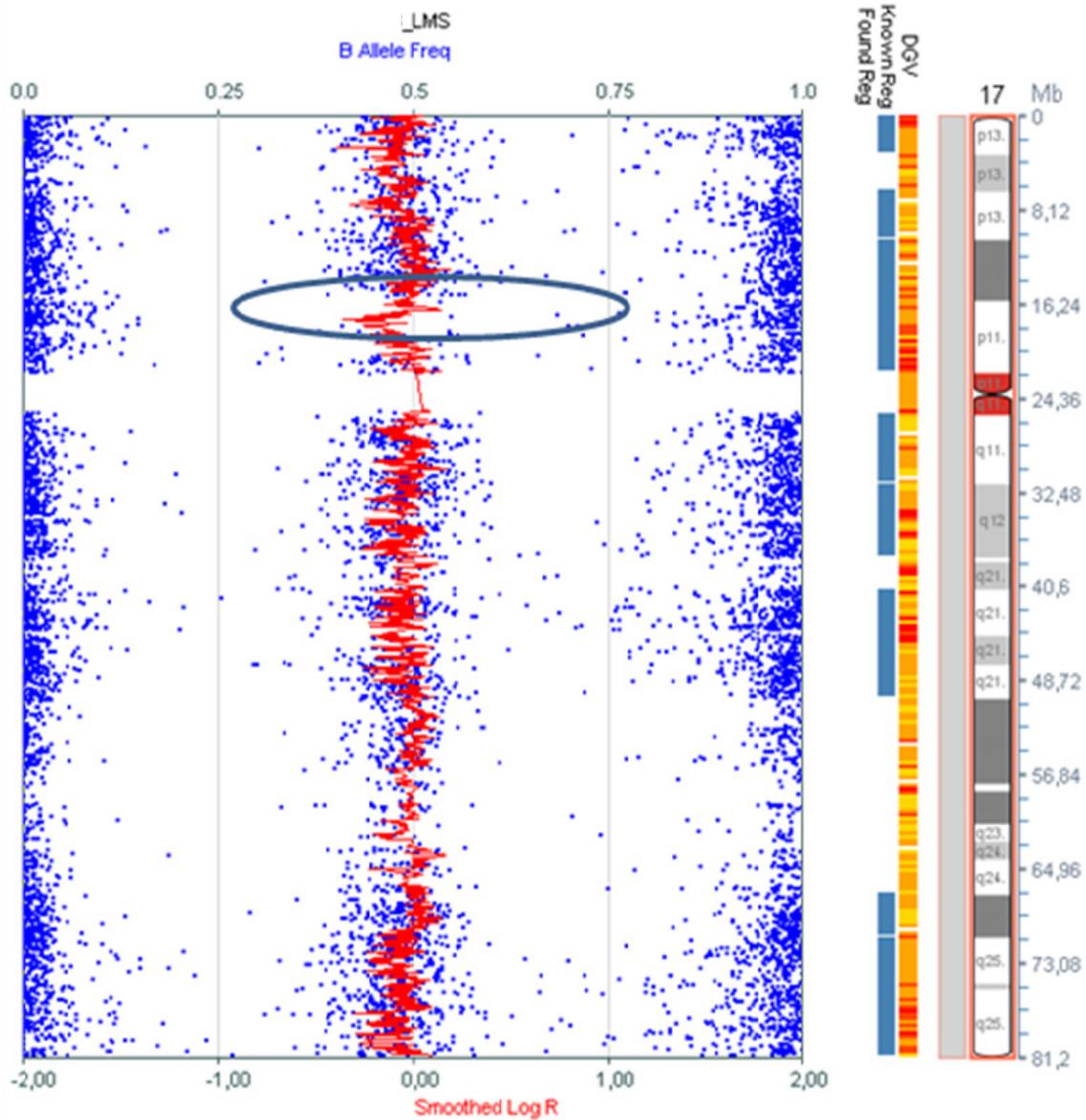


Figura 110: Resultados de SNP en el cromosoma 17 en el leiomiosarcoma (LMS) n°4 número de copia neutro con pérdida de heterocigosidad (CNLOH) 17p(12-11.2).

ANEXO 17

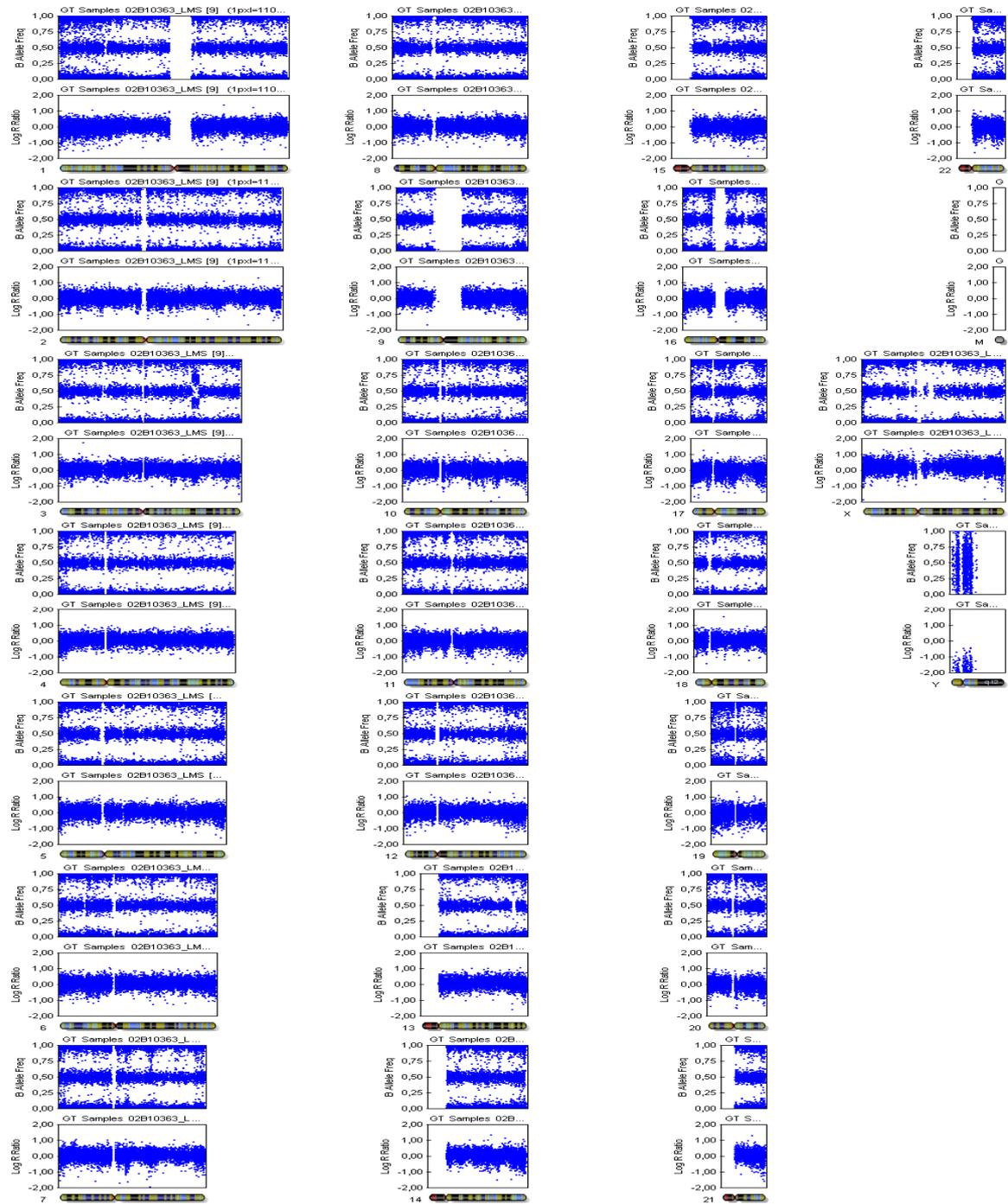


Figura 111: Conjunto de resultados de SNP del leiomiosarcoma (LMS) n°8 (a0s2).

ANEXO 18

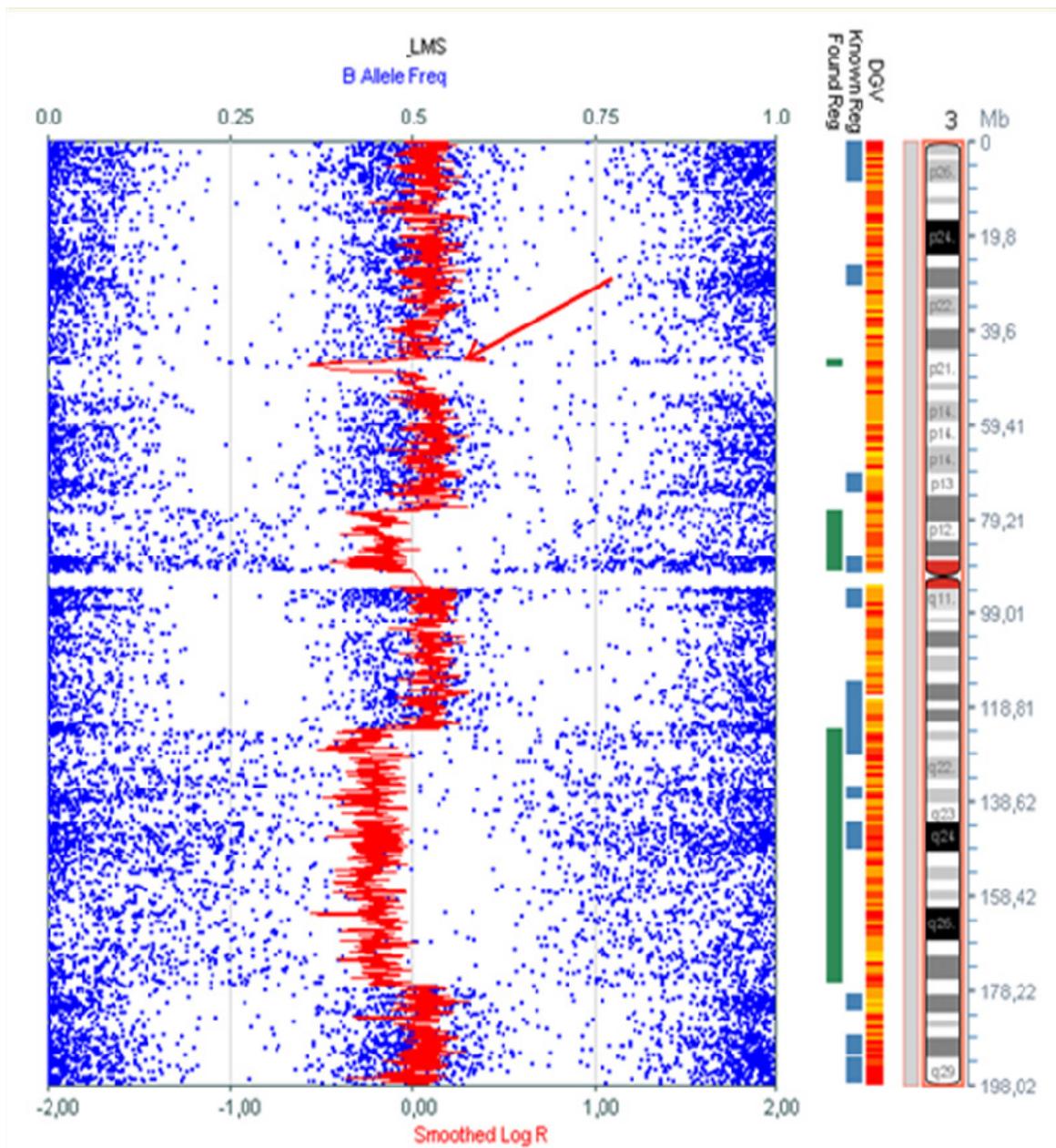


Figura 112: Resultados de SNP en el cromosoma 3 en el leiomiosarcoma (LMS) n°8. Pérdida de 3q(24-25.2).

ANEXO 19

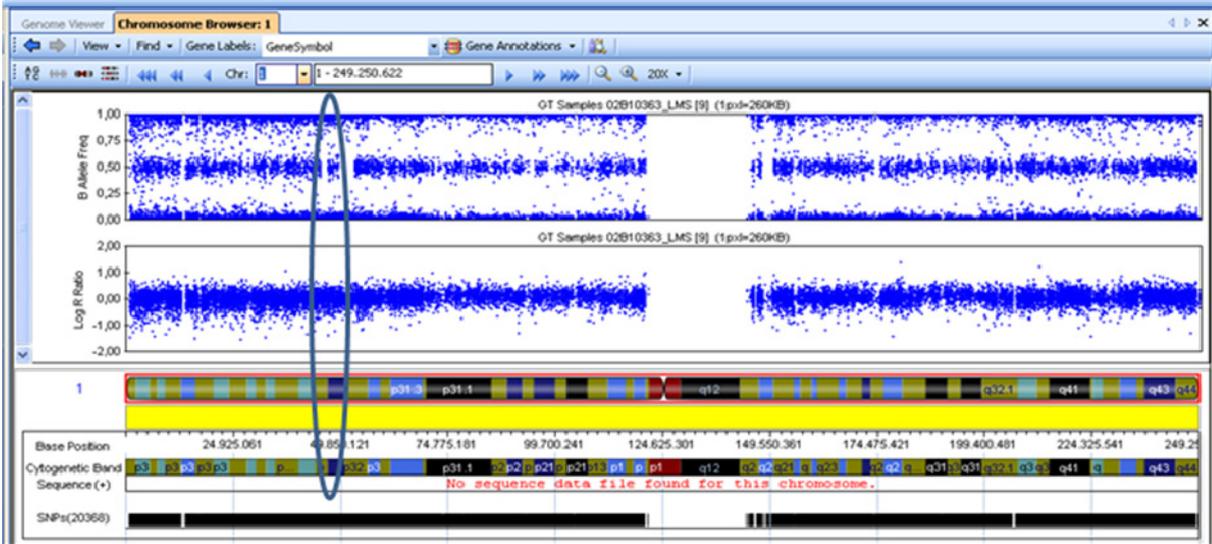


Figura 113: Resultados de SNP en el cromosoma 1 en el leiomioma (LMS) n°8. Número de copia neutro con pérdida de heterocigosidad (CNLOH) 1p(33-32.3).

ANEXO 20

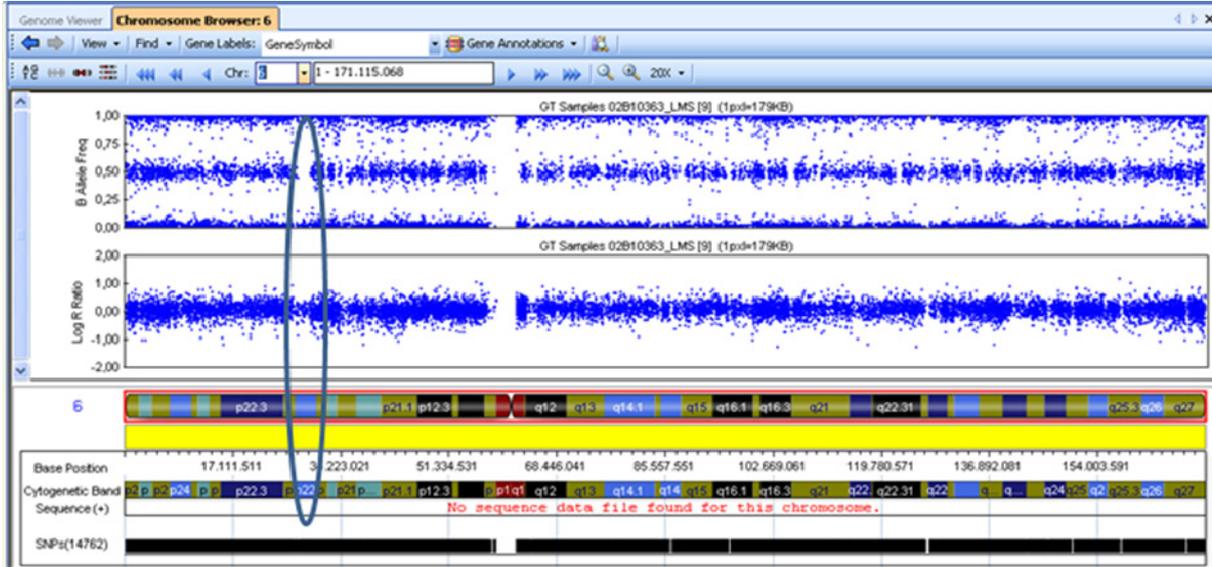


Figura 114: Resultados de SNP en el cromosoma 6 en el leiomioma (LMS) n°8. Número de copia neutro con pérdida de heterocigosidad (CNLOH) 6p(22.2-22.1).

ANEXO 21

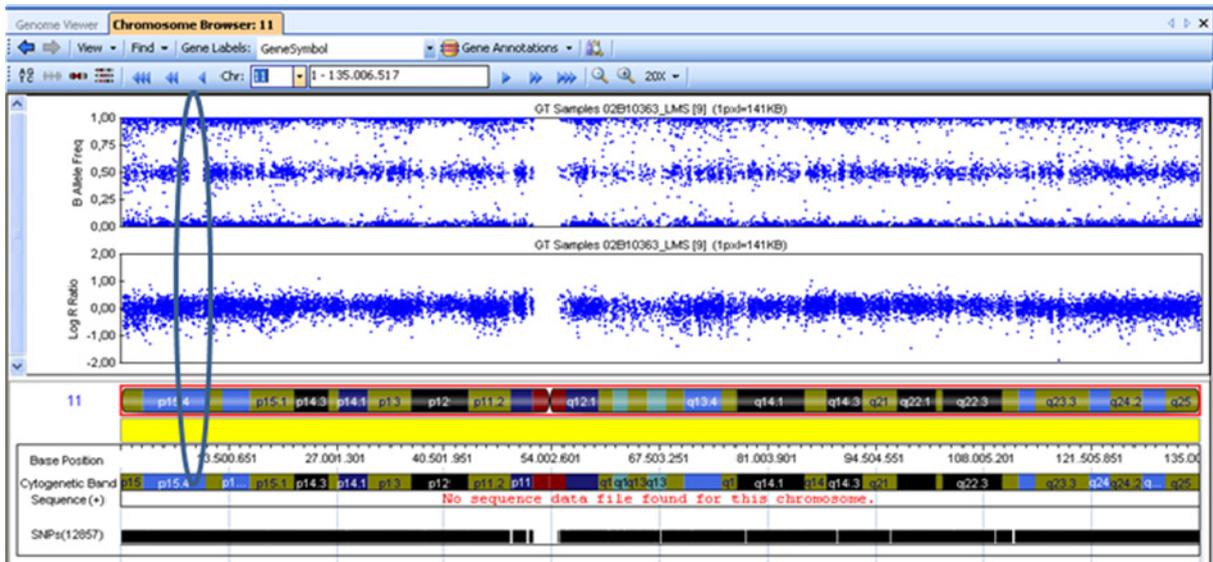


Figura 115: Resultados de SNP en el cromosoma 11 en el leiomioma (LMS) n°8. Número de copia neutro con pérdida de heterocigosidad (CNLOH) 11p(15.4-15.3).

ANEXO 22

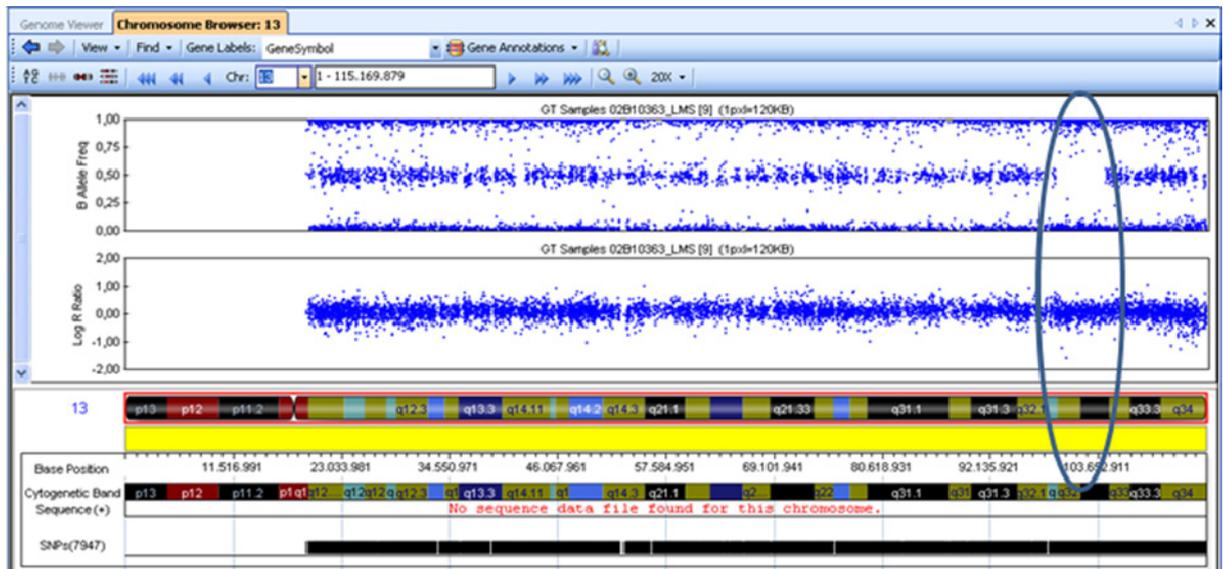


Figura 116: Resultados de SNP en el cromosoma 13 en el leiomioma (LMS) n°8. Número de copia neutro con pérdida de heterocigosidad (CNLOH) 13q(32.2-33.1).

ANEXO 23

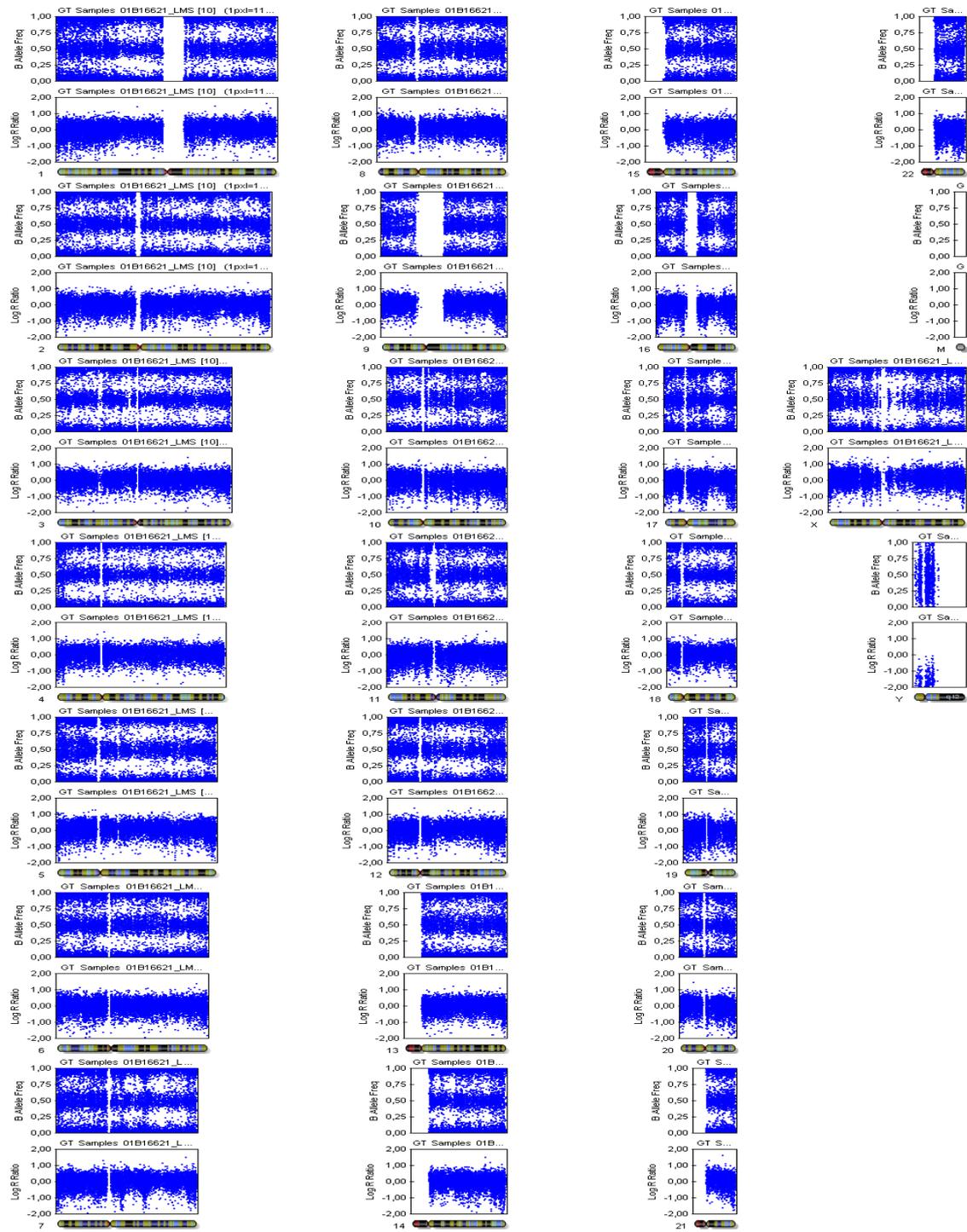


Figura 117: Conjunto de resultados de SNP del leiomiosarcoma (LMS) n°11 (a0s2).

ANEXO 24

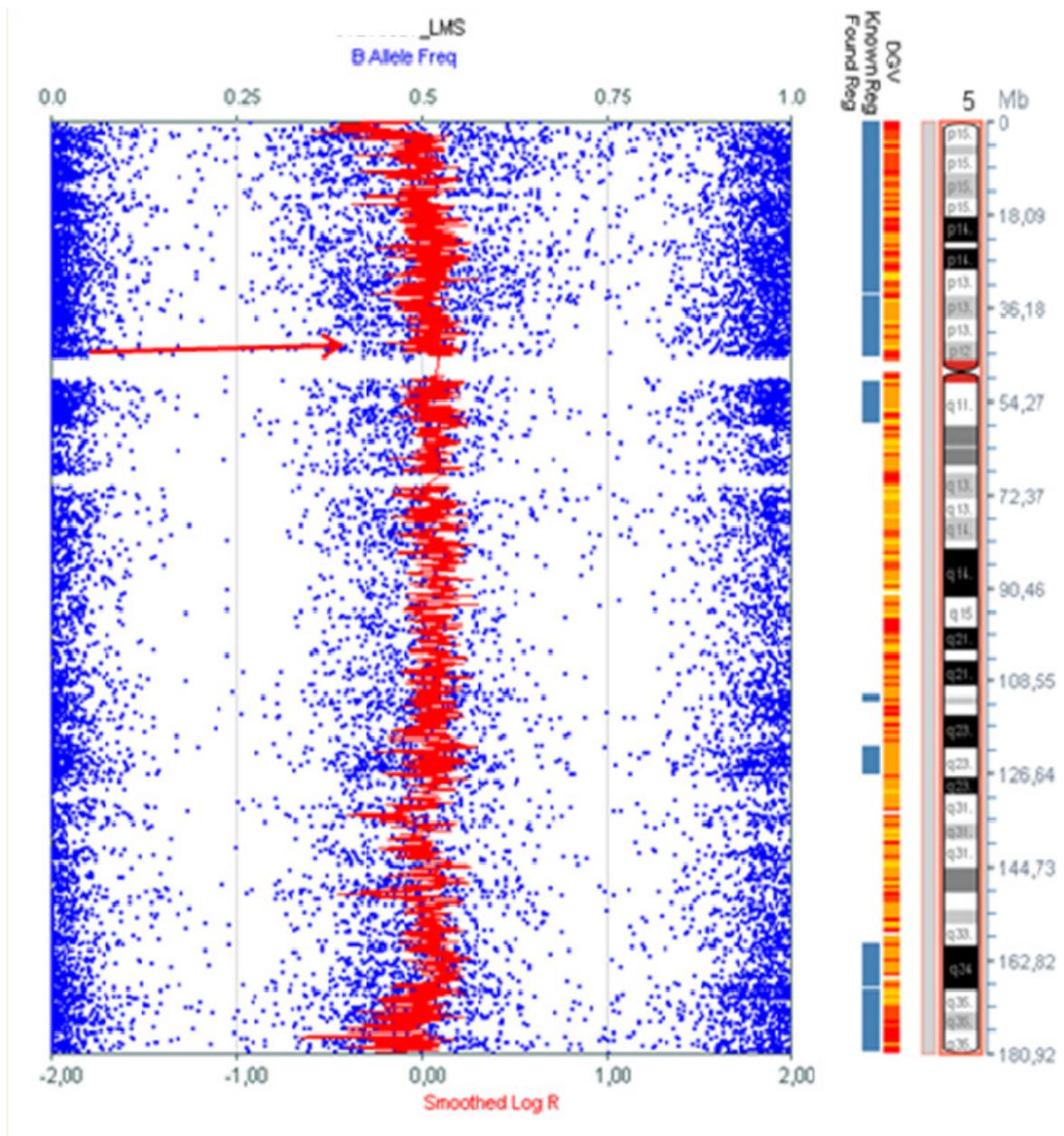


Figura 118: Resultados de SNP en el cromosoma 5 en el leiomiosarcoma (LMS) n°11. Pérdida de 5p(ter-13.3).

ANEXO 25

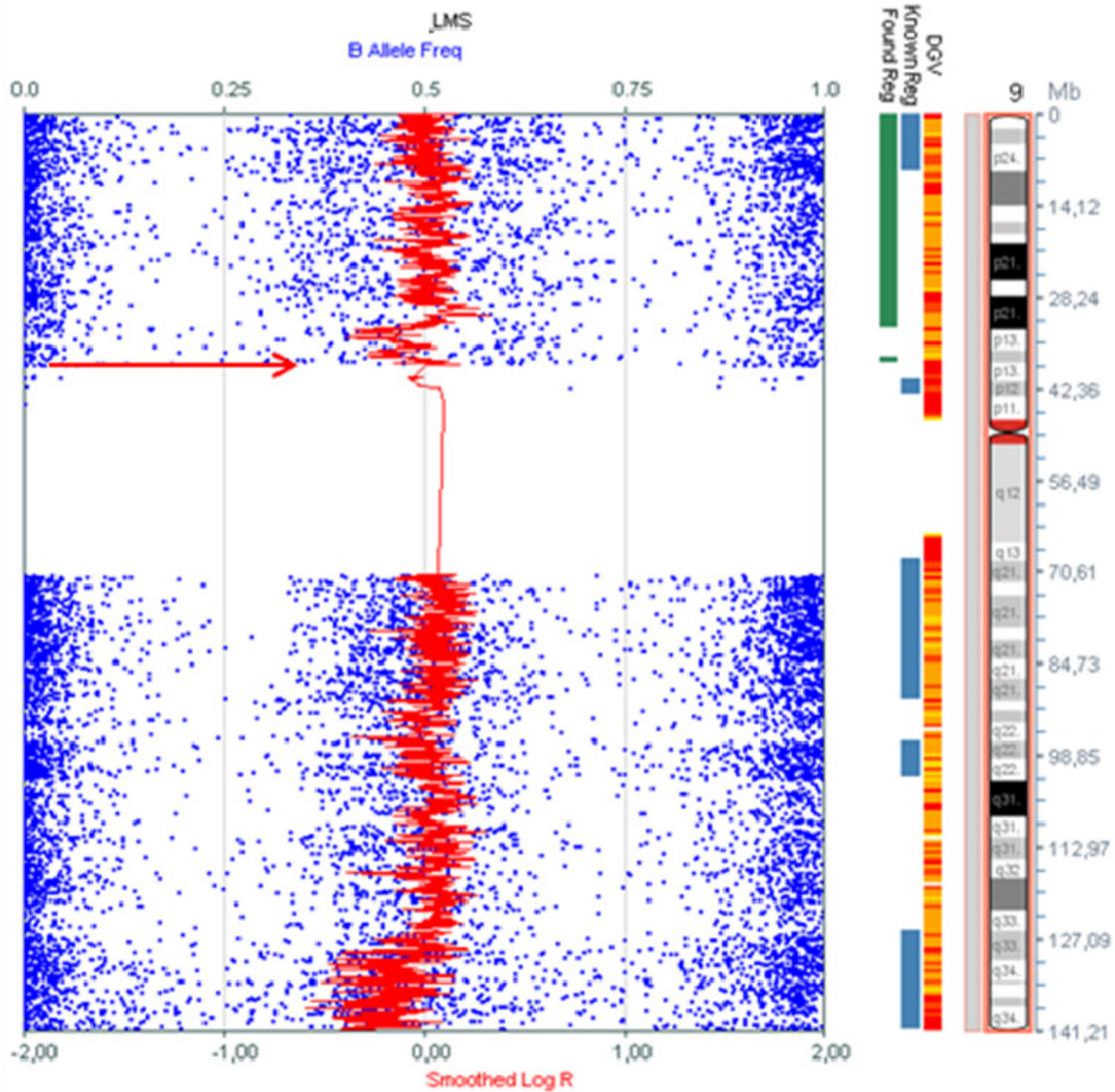


Figura 119: Resultados de SNP en el cromosoma 9 en el leiomiosarcoma (LMS) n°11. Pérdida de 9p(ter-13.1).

ANEXO 26

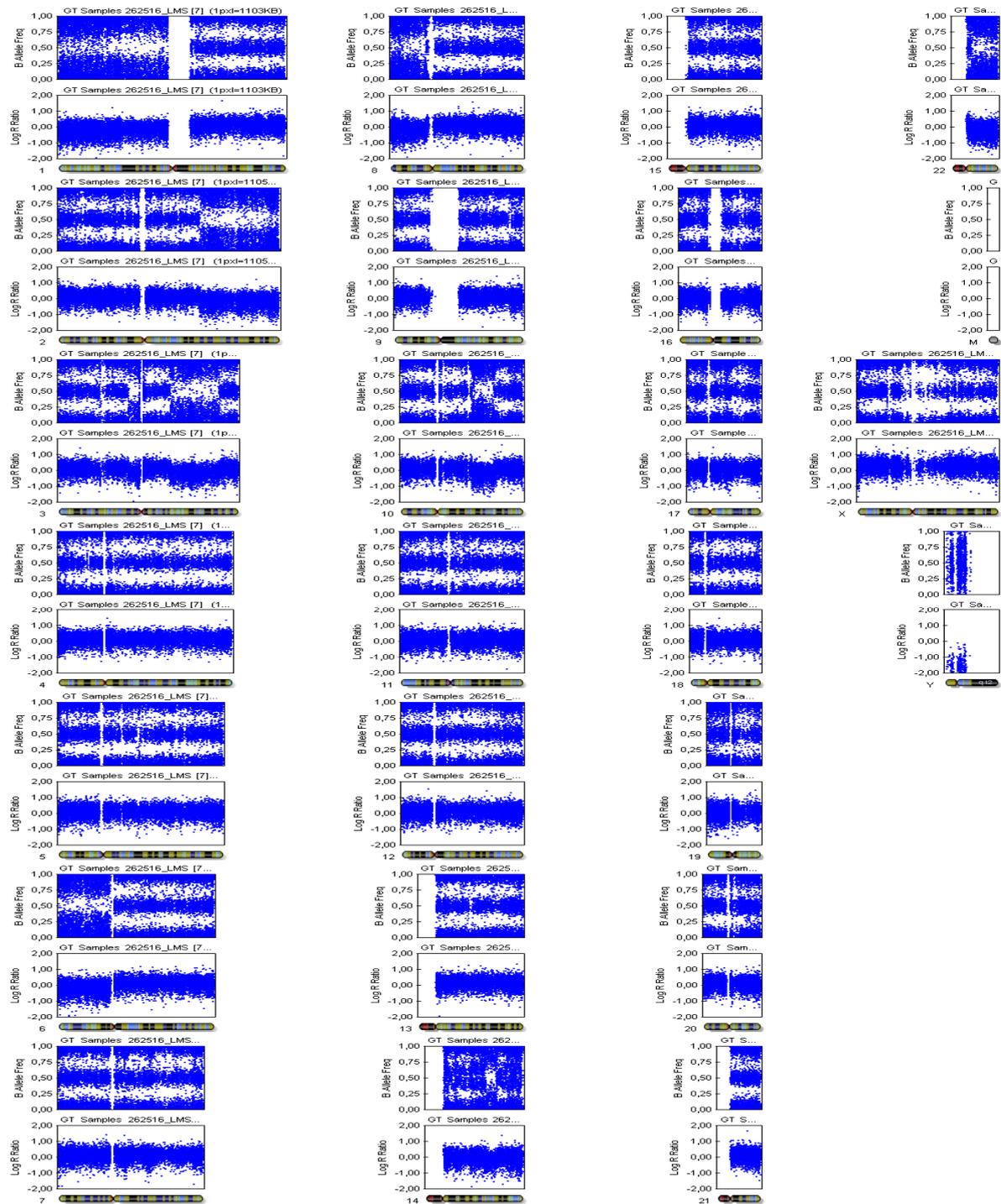


Figura 120: Conjunto de resultados de SNP del leiomioma (LMS) nº13 (a1s15).

ANEXO 27

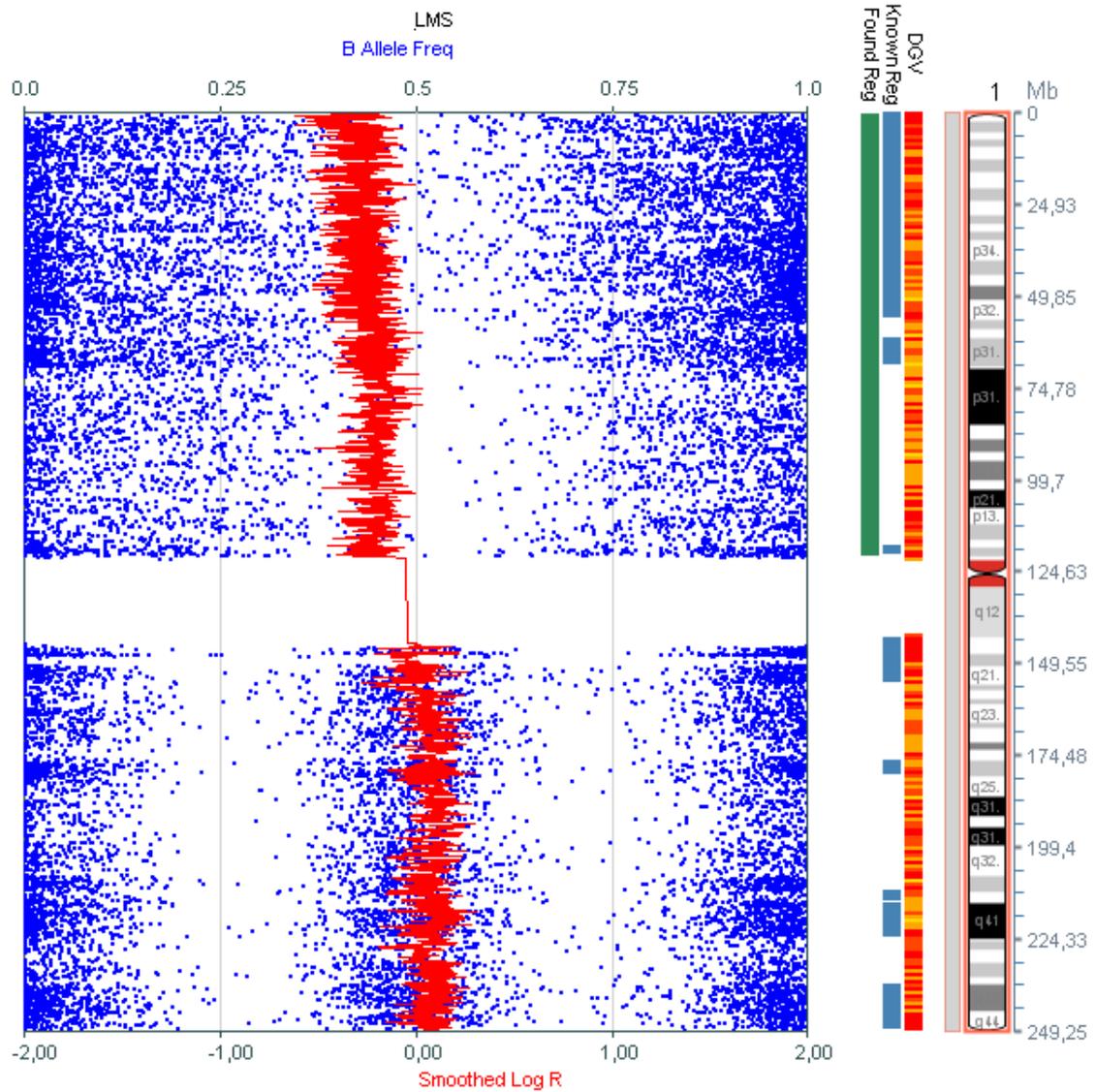


Figura 121: Resultados de SNP en el cromosoma 1 en el leiomiosarcoma (LMS) n°13. Pérdida de 1p.

ANEXO 28

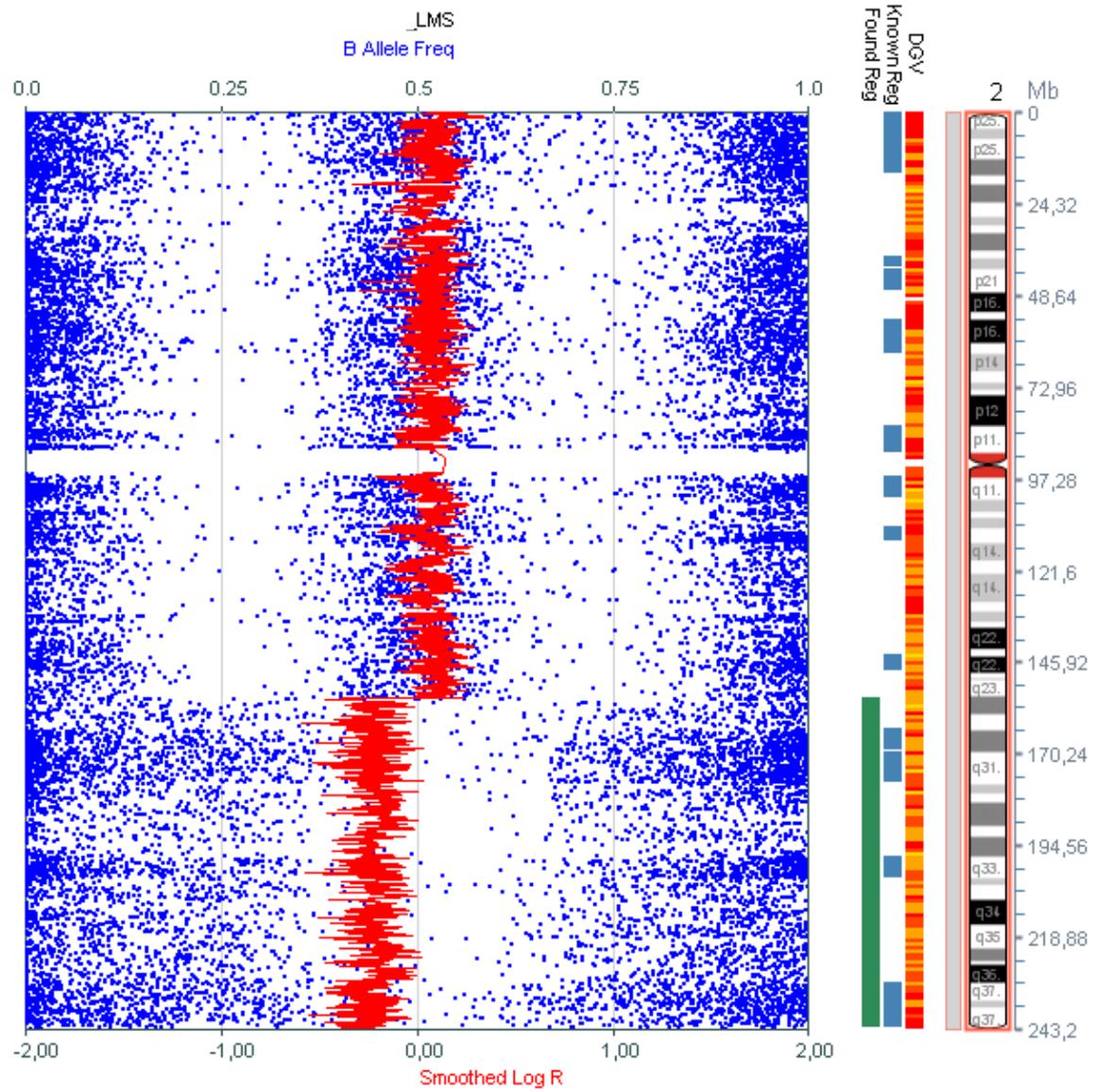


Figura 122: Resultados de SNP en el cromosoma 2 en el leiomiosarcoma (LMS) n°13. Pérdida de 2q(24.1-ter).

ANEXO 29

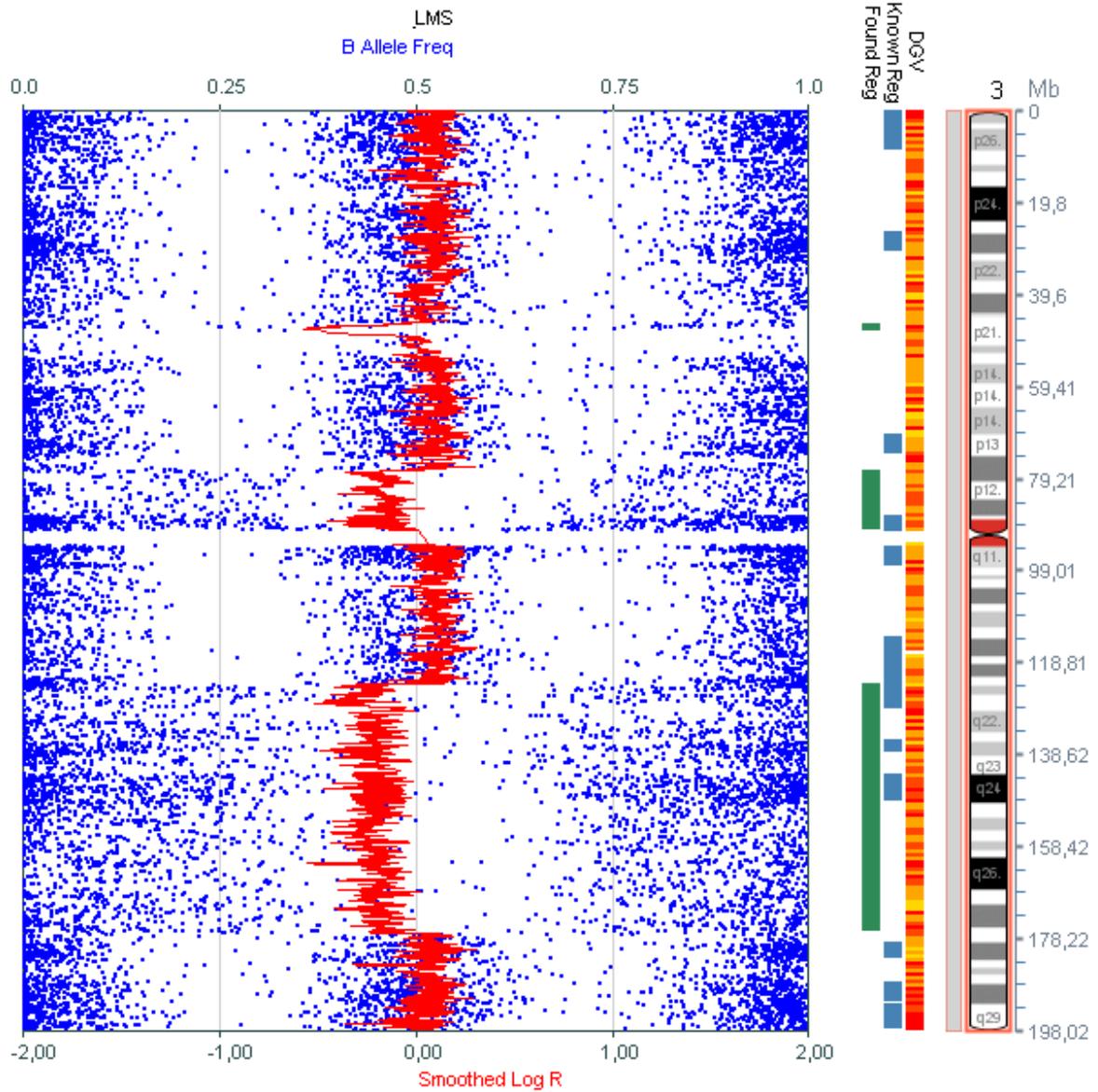


Figura 123: Resultados de SNP en el cromosoma 3 en el leiomiosarcoma (LMS) n°13. Pérdidas de 3p(12.3-11.1), y 3q(21.1-26.32).

ANEXO 30

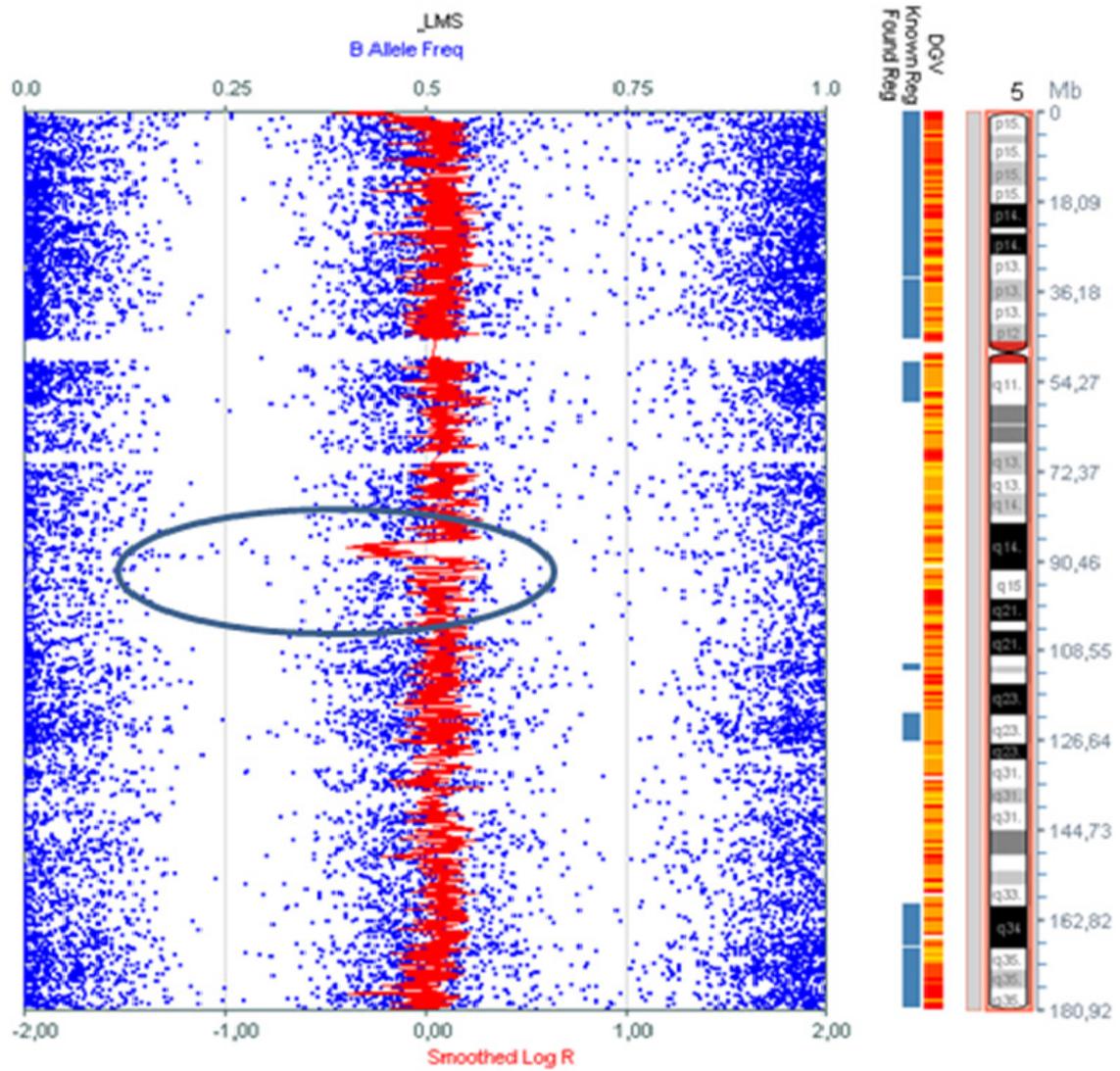


Figura 124: Resultados de SNP en el cromosoma 5 en el leiomiosarcoma (LMS) n°13. Pérdida de 5q-(14.3(x2)).

ANEXO 31

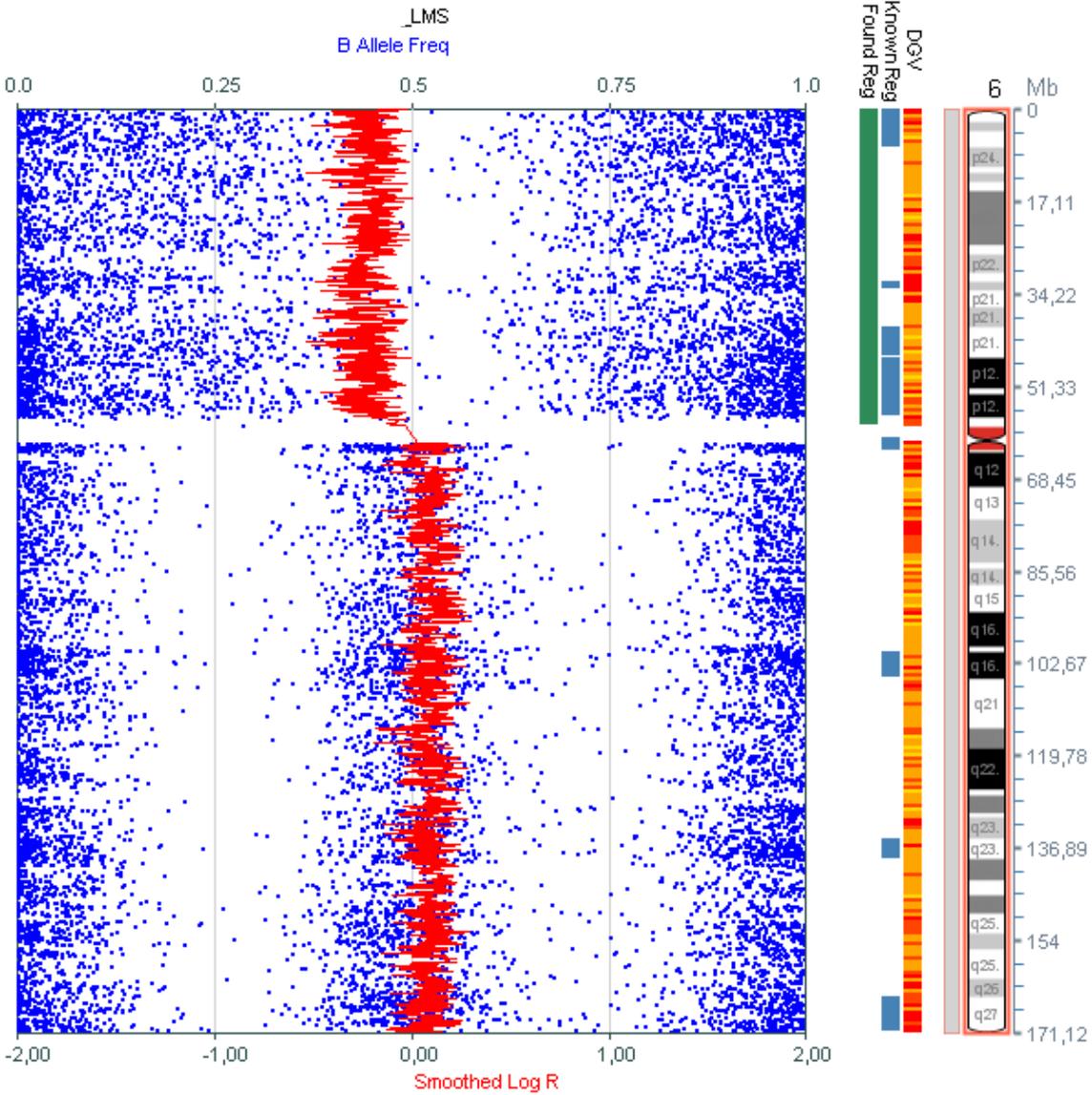


Figura 125: Resultados de SNP en el cromosoma 6 en el leiomiosarcoma (LMS) n°13. Pérdida de 6p.

ANEXO 32

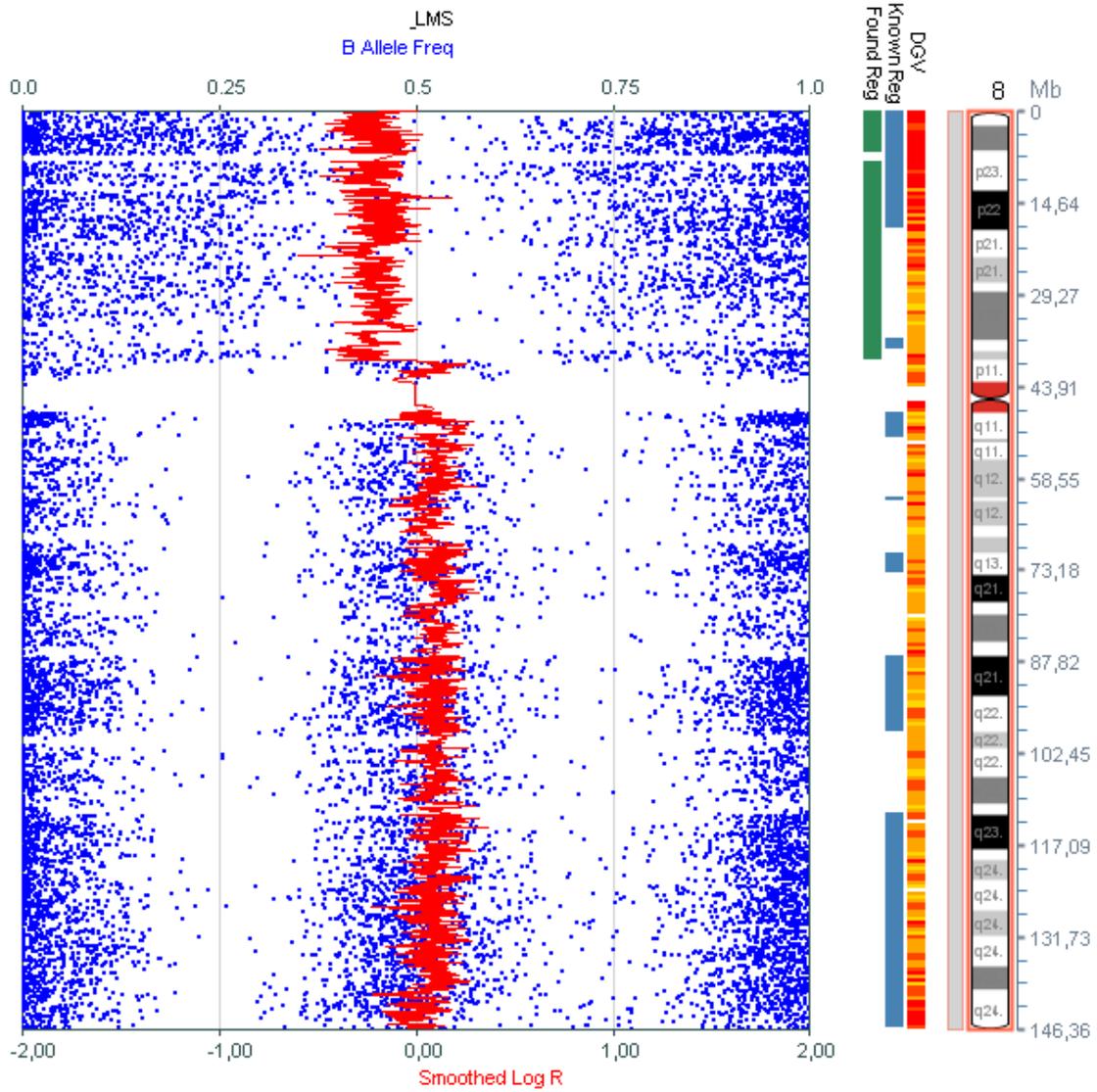


Figura 126: Resultados de SNP en el cromosoma 8 en el leiomiosarcoma (LMS) n°13
Pérdida de 8p(ter-11.21)

ANEXO 33

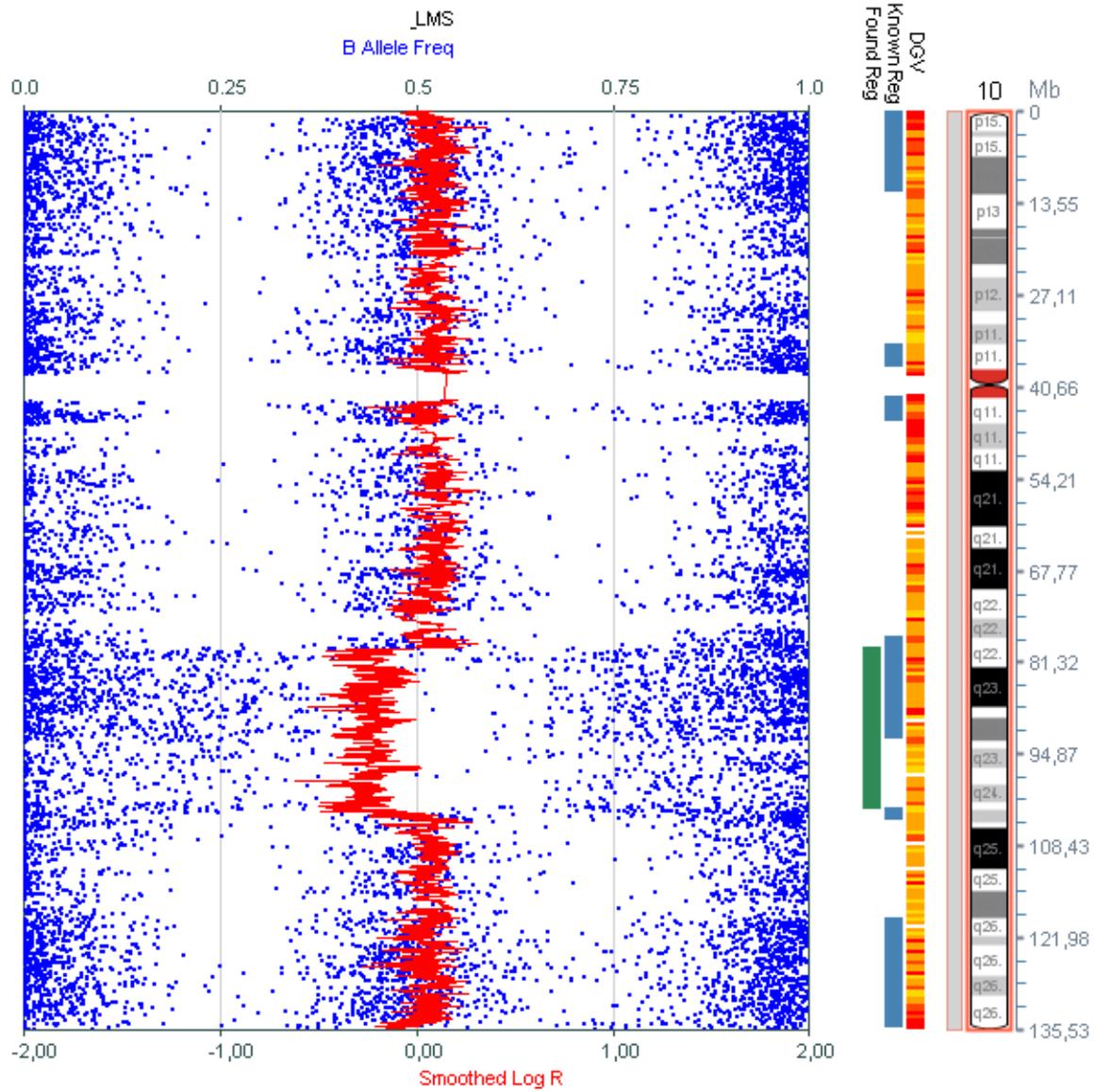


Figura 127: Resultados de SNP en el cromosoma 10 en el leiomiosarcoma (LMS) n°13. Pérdida de 10q(22.3-24.32).

ANEXO 34

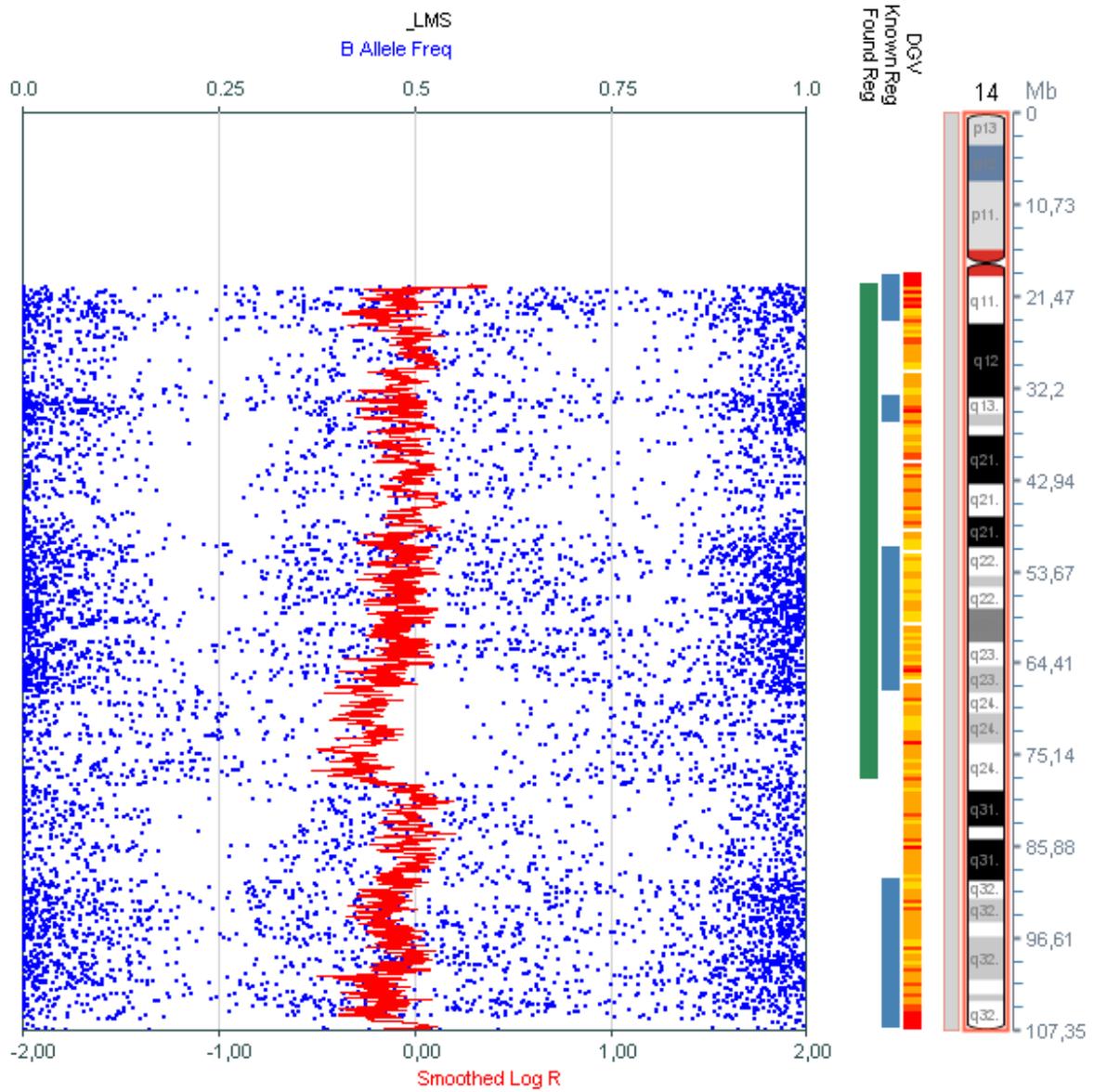


Figura 128: Resultados de SNP en el cromosoma 14 en el leiomiosarcoma (LMS) n°13. Pérdida de 14q(23.3-24.3).

ANEXO 35

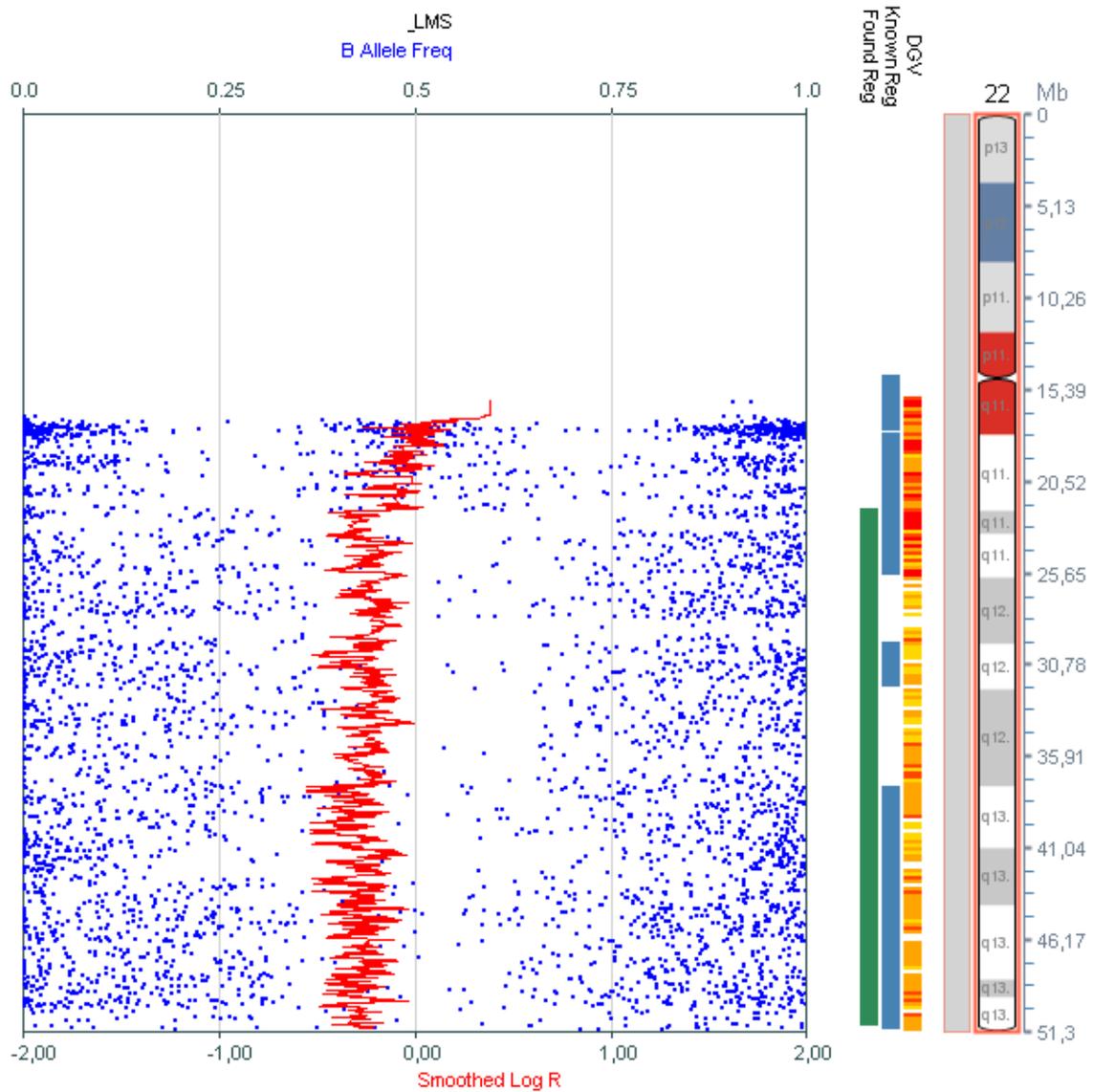


Figura 129: Resultados de SNP en el cromosoma 22 en el leiomiosarcoma (LMS) n°13. Pérdida de 22q(11.21-ter).

ANEXO 36

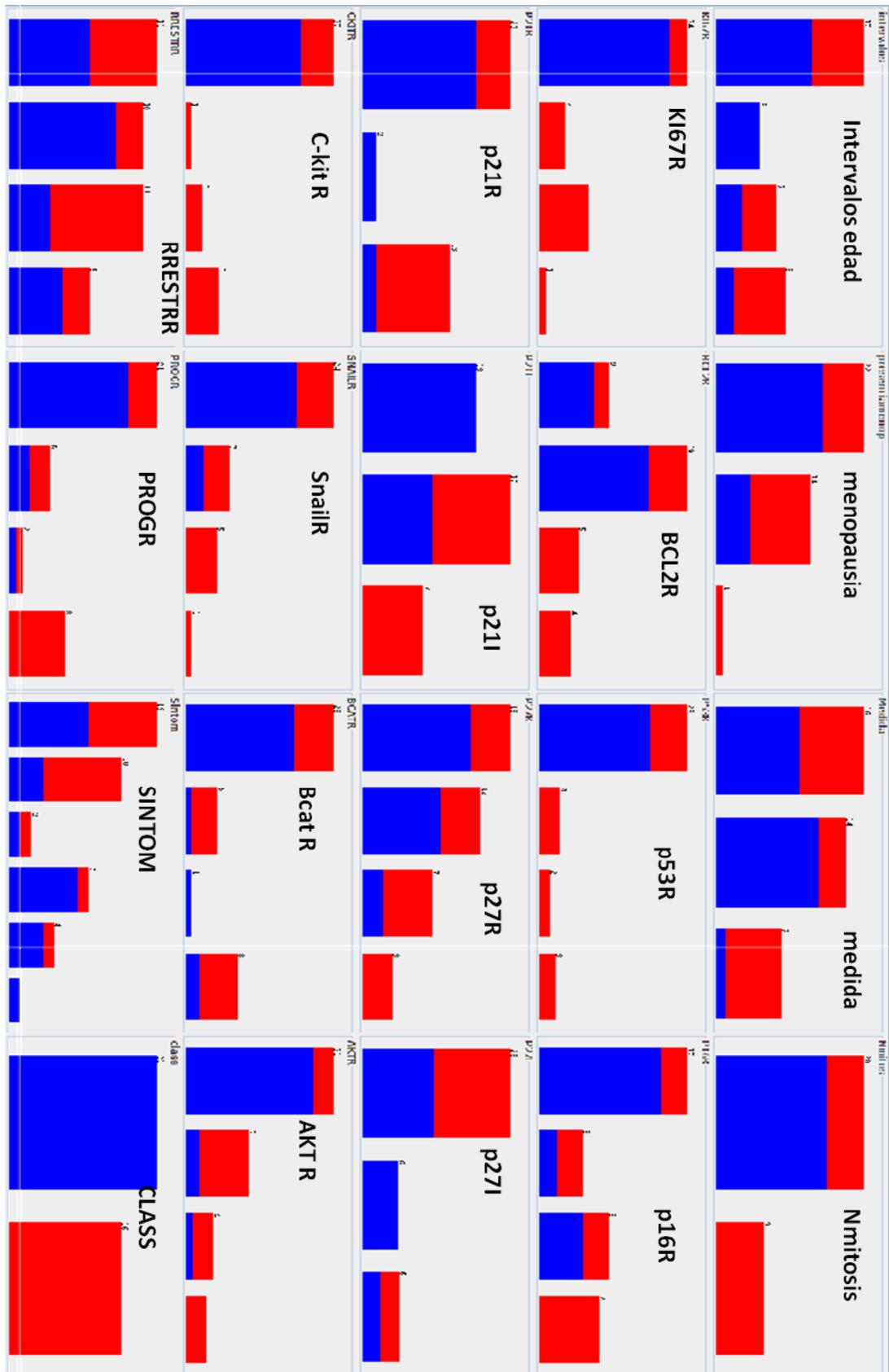


Figura 130: Distribución de casos por variable en el modelo n°1. Azul: leiomiomas, Rojo: leiomyosarcomas.

ANEXO 37

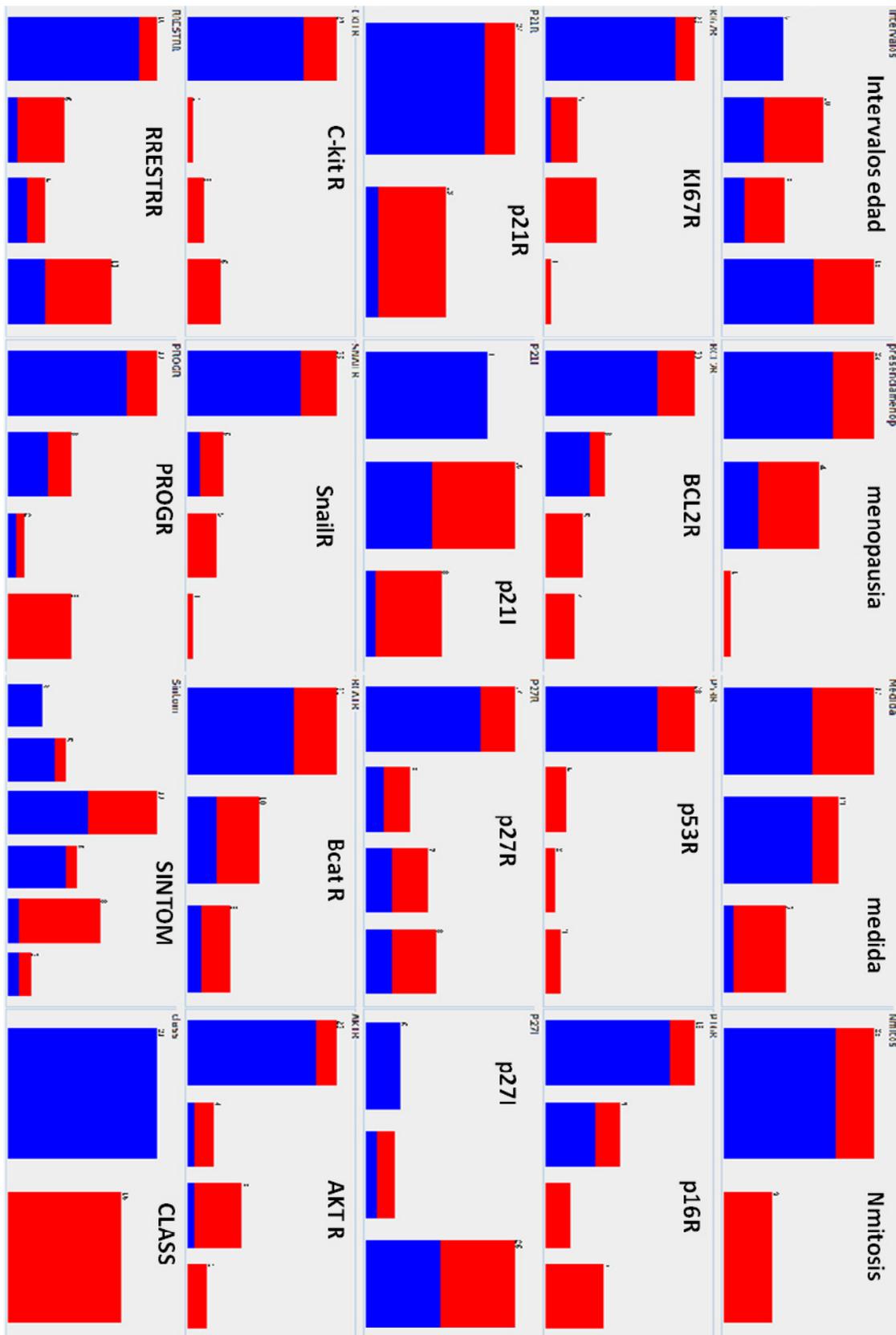


Figura 131: Distribución de casos por variable en el modelo n°2. Azul: leiomiomas, Rojo: leiomiosarcomas.

ANEXO 38

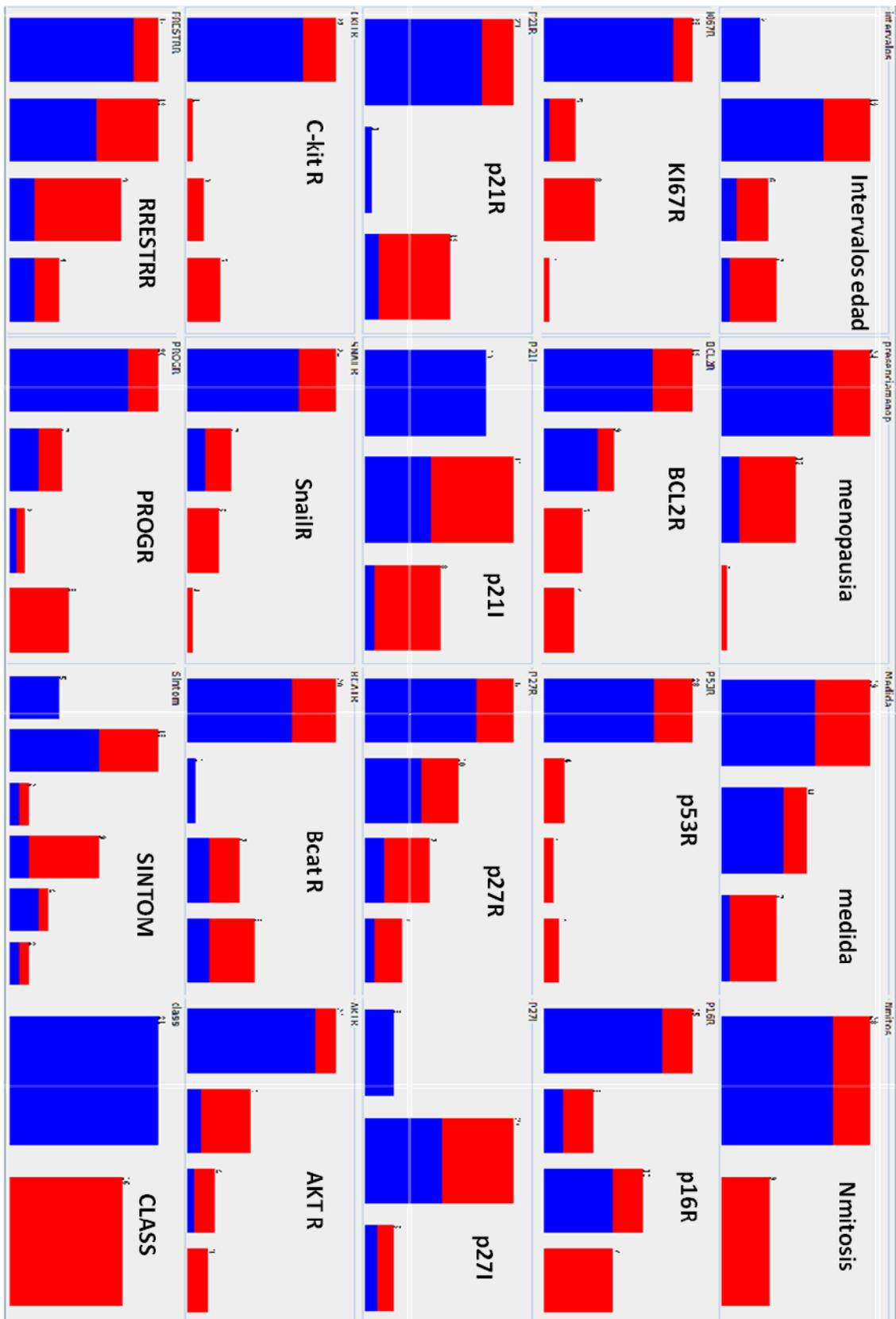


Figura 132: Distribución de casos por variable en el modelo n°3. Azul: leiomiomas, Rojo: leiomyosarcomas.

ANEXO 39

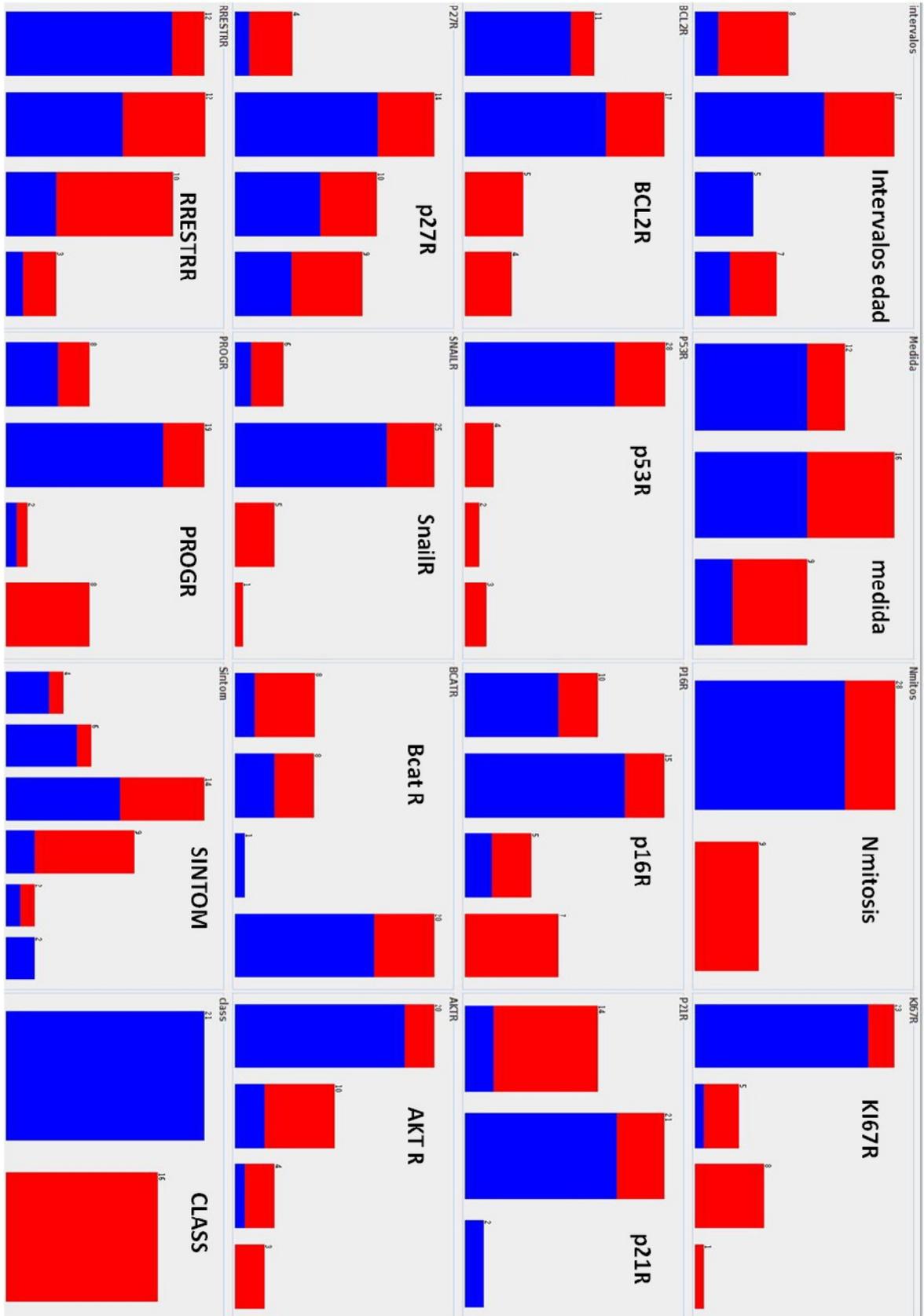


Figura 133: Distribución de casos por variable en el modelo n°4. Azul: leiomiosas, Rojo: leiomiosarcomas.

ANEXO 40

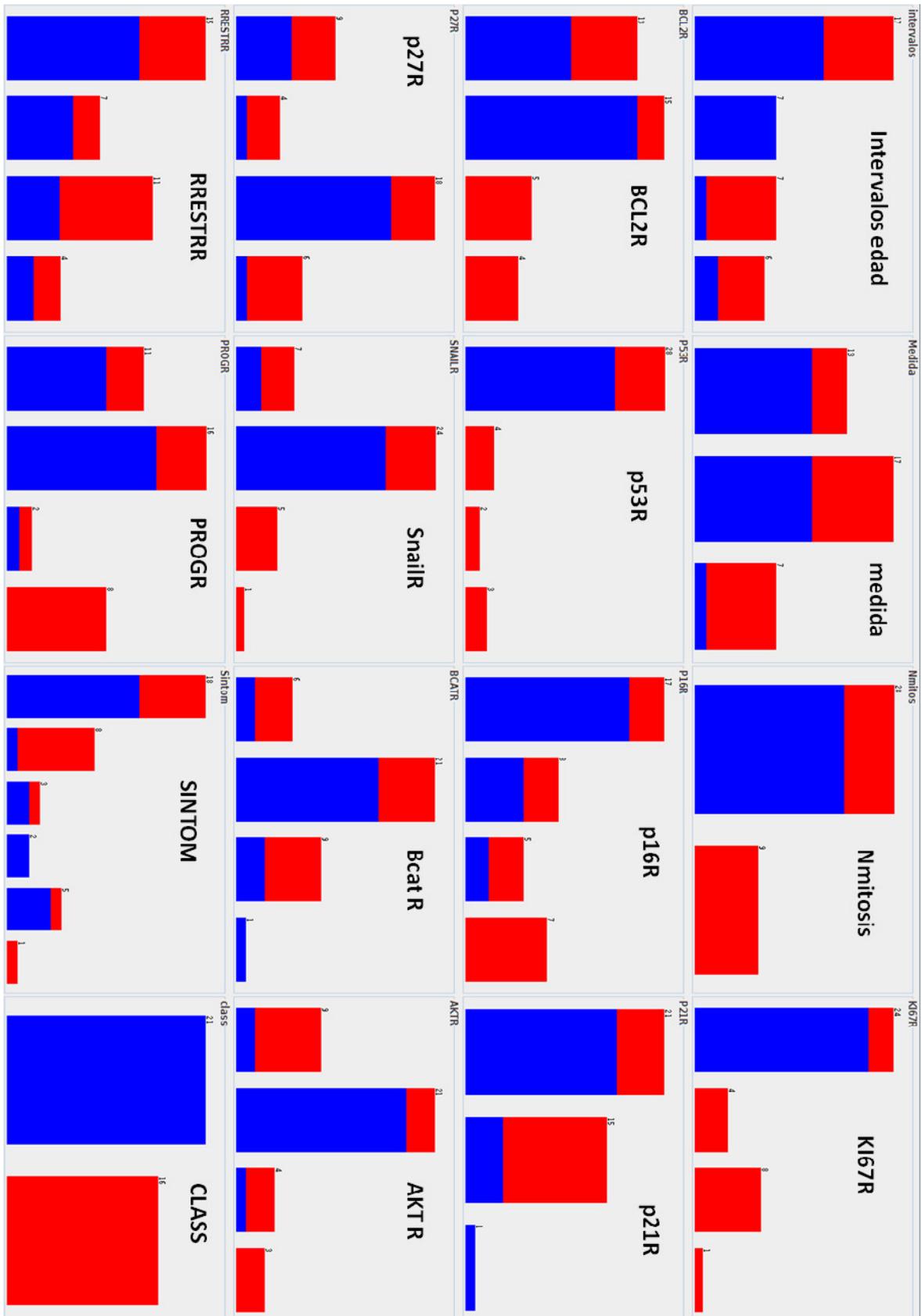


Figura 134: Distribución de casos por variable en el modelo n°5. Azul: leiomiomas, Rojo: leiomyosarcomas.

ANEXO 41

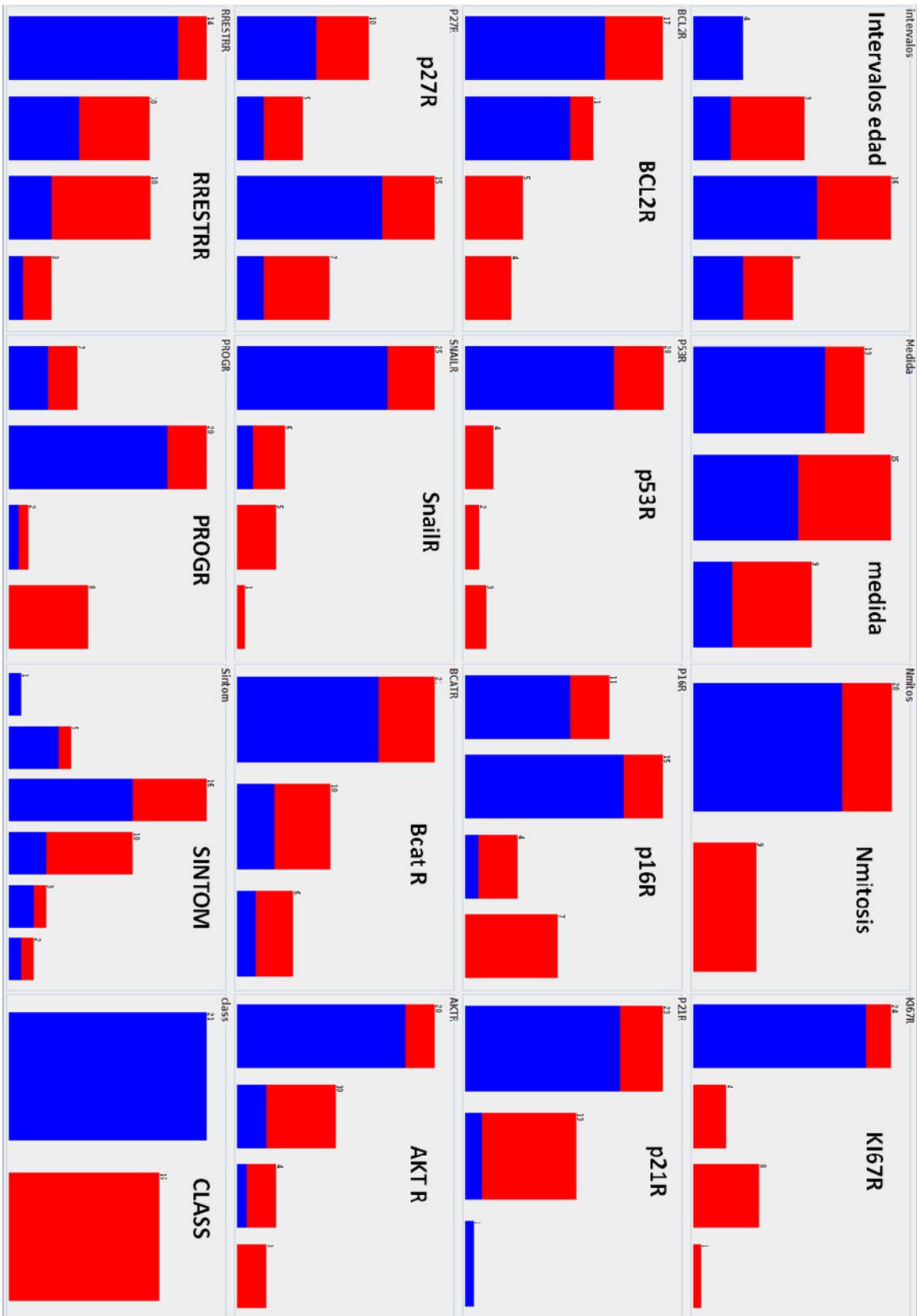


Figura 135: Distribución de casos por variable en el modelo n°6. Azul: leiomiomas, Rojo: leiomiosarcomas.

8. BIBLIOGRAFIA

“Gracias por tanto esfuerzo, por todo el trabajo que hace que otros podamos avanzar. Sois mis maestros.” N.S.

1. Sadler, T.W., *Langman, Fundamentos de embriología médica con orientación Clínica*. 10ª ed. 2007, Buenos Aires: Médica Panamericana. 386 p.
2. Blaustein, A. and R.J. Kurman, *Blaustein's Pathology of the female genital tract*. 6th ed. 2011, New York [etc.]: Springer.
3. Couse, J.F., et al., *Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta*. *Science*, 1999. 286(5448): p. 2328-31.
4. Okolo, S., *Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2008. 22(4): p. 571-88.
5. Cramer, S.F. and A. Patel, *The frequency of uterine leiomyomas*. *Am J Clin Pathol*, 1990. 94(4): p. 435-8.
6. Shikora, S.A., et al., *Relationship between obesity and uterine leiomyomata*. *Nutrition*, 1991. 7(4): p. 251-5.
7. Marshall, L.M., et al., *Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race*. *Obstet Gynecol*, 1997. 90(6): p. 967-73.
8. Knott, V.B., *II. Sarcoma of the Uterus*. *Ann Surg*, 1901. 33(2): p. 137-46.
9. Wheelock, M.C. and S. Warren, *Leiomyosarcoma of the Uterus*. *Ann Surg*, 1942. 116(6): p. 882-90.
10. Gardner, L.U., *A Case of Metastatic Leiomyosarcoma Primary in the Uterus*. *J Med Res*, 1917. 36(1): p. 19-30 3.
11. Luker, S.G., *Sarcoma with Fibromyomata of Uterus*. *Proc R Soc Med*, 1927. 20(6): p. 867.
12. Toledo, G. and E. Oliva, *Smooth muscle tumors of the uterus: a practical approach*. *Arch Pathol Lab Med*, 2008. 132(4): p. 595-605.
13. Sandberg, A.A., *Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: leiomyoma*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2005. 158(1): p. 1-26.
14. Abeler, V.M., et al., *Uterine sarcomas in Norway. A histopathological and prognostic survey of a total population from 1970 to 2000 including 419 patients*. *Histopathology*, 2009. 54(3): p. 355-64.
15. Coronado, G.D., L.M. Marshall, and S.M. Schwartz, *Complications in pregnancy, labor, and delivery with uterine leiomyomas: a population-based study*. *Obstet Gynecol*, 2000. 95(5): p. 764-9.
16. Sunkara, S.K., et al., *The effect of intramural fibroids without uterine cavity involvement on the outcome of IVF treatment: a systematic review and meta-analysis*. *Hum Reprod*, 2009. 25(2): p. 418-29.
17. Falcone, T. and M.D. Walters, *Hysterectomy for benign disease*. *Obstet Gynecol*, 2008. 111(3): p. 753-67.
18. Sosna, O., et al., *Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in patients with uterine fibroid*. *Folia Biol (Praha)*, 2010. 56(5): p. 206-10.
19. Schwartz, S.M., *Epidemiology of uterine leiomyomata*. *Clin Obstet Gynecol*, 2001. 44(2): p. 316-26.
20. Flake, G.P., J. Andersen, and D. Dixon, *Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review*. *Environ Health Perspect*, 2003. 111(8): p. 1037-54.
21. Stewart, E.A. and C.C. Morton, *The genetics of uterine leiomyomata: what clinicians need to know*. *Obstet Gynecol*, 2006. 107(4): p. 917-21.
22. Evans, P. and S. Brunzell, *Uterine fibroid tumors: diagnosis and treatment*. *Am Fam Physician*, 2007. 75(10): p. 1503-8.
23. Laughlin, S.K., J.C. Schroeder, and D.D. Baird, *New directions in the epidemiology of uterine fibroids*. *Semin Reprod Med*, 2010. 28(3): p. 204-17.

24. Wise, L.A., et al., *Risk of uterine leiomyomata in relation to tobacco, alcohol and caffeine consumption in the Black Women's Health Study*. Hum Reprod, 2004. 19(8): p. 1746-54.
25. Sabry, M. and A. Al-Hendy, *Medical treatment of uterine leiomyoma*. Reprod Sci, 2012. 19(4): p. 339-53.
26. Shah, S.H., et al., *Uterine sarcomas: then and now*. AJR Am J Roentgenol, 2012. 199(1): p. 213-23.
27. Perot, G., et al., *MED12 alterations in both human benign and malignant uterine soft tissue tumors*. PLoS One, 2012. 7(6): p. e40015.
28. Giuntoli, R.L., 2nd, et al., *Retrospective review of 208 patients with leiomyosarcoma of the uterus: prognostic indicators, surgical management, and adjuvant therapy*. Gynecol Oncol, 2003. 89(3): p. 460-9.
29. Khan, A.T., M. Shehmar, and J.K. Gupta, *Uterine fibroids: current perspectives*. Int J Womens Health, 2014. 6: p. 95-114.
30. Amant, F., et al., *PTEN mutations in uterine sarcomas*. Gynecol Oncol, 2002. 85(1): p. 165-9.
31. Ip, P.P. and A.N. Cheung, *Pathology of uterine leiomyosarcomas and smooth muscle tumours of uncertain malignant potential*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2011. 25(6): p. 691-704.
32. Rha, S.E., et al., *CT and MRI of uterine sarcomas and their mimickers*. AJR Am J Roentgenol, 2003. 181(5): p. 1369-74.
33. Backlin, B.M., L. Eriksson, and M. Olovsson, *Histology of uterine leiomyoma and occurrence in relation to reproductive activity in the Baltic gray seal (Halichoerus grypus)*. Vet Pathol, 2003. 40(2): p. 175-80.
34. Parker, W.H., *Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas*. Fertil Steril, 2007. 87(4): p. 725-36.
35. Sankaran, S. and I.T. Manyonda, *Medical management of fibroids*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2008. 22(4): p. 655-76.
36. Bell, S.W., R.L. Kempson, and M.R. Hendrickson, *Problematic uterine smooth muscle neoplasms. A clinicopathologic study of 213 cases*. Am J Surg Pathol, 1994. 18(6): p. 535-58.
37. Chiang, S. and E. Oliva, *Recent developments in uterine mesenchymal neoplasms*. Histopathology, 2012. 62(1): p. 124-37.
38. Kempson, R.L. and M.R. Hendrickson, *Smooth muscle, endometrial stromal, and mixed Mullerian tumors of the uterus*. Mod Pathol, 2000. 13(3): p. 328-42.
39. Perrone, T. and L.P. Dehner, *Prognostically favorable "mitotically active" smooth-muscle tumors of the uterus. A clinicopathologic study of ten cases*. Am J Surg Pathol, 1988. 12(1): p. 1-8.
40. O'Connor, D.M. and H.J. Norris, *Mitotically active leiomyomas of the uterus*. Hum Pathol, 1990. 21(2): p. 223-7.
41. Prayson, R.A. and W.R. Hart, *Mitotically active leiomyomas of the uterus*. Am J Clin Pathol, 1992. 97(1): p. 14-20.
42. Miettinen, M. and J.F. Fetsch, *Evaluation of biological potential of smooth muscle tumours*. Histopathology, 2006. 48(1): p. 97-105.
43. Norris, H.J., G.D. Hilliard, and N.S. Irey, *Hemorrhagic cellular leiomyomas ("apoplectic leiomyoma") of the uterus associated with pregnancy and oral contraceptives*. Int J Gynecol Pathol, 1988. 7(3): p. 212-24.
44. Myles, J.L. and W.R. Hart, *Apoplectic leiomyomas of the uterus. A clinicopathologic study of five distinctive hemorrhagic leiomyomas associated with oral contraceptive usage*. Am J Surg Pathol, 1985. 9(11): p. 798-805.

45. Hock, Y.L., P. Goswami, and T.P. Rollason, *Mitotically active haemorrhagic cellular (apoplectic) leiomyoma*. Eur J Gynaecol Oncol, 2000. 21(1): p. 28-9.
46. Oliva, E., et al., *Cellular benign mesenchymal tumors of the uterus. A comparative morphologic and immunohistochemical analysis of 33 highly cellular leiomyomas and six endometrial stromal nodules, two frequently confused tumors*. Am J Surg Pathol, 1995. 19(7): p. 757-68.
47. Downes, K.A. and W.R. Hart, *Bizarre leiomyomas of the uterus: a comprehensive pathologic study of 24 cases with long-term follow-up*. Am J Surg Pathol, 1997. 21(11): p. 1261-70.
48. Kurman, R.J. and H.J. Norris, *Mesenchymal tumors of the uterus. VI. Epithelioid smooth muscle tumors including leiomyoblastoma and clear-cell leiomyoma: a clinical and pathologic analysis of 26 cases*. Cancer, 1976. 37(4): p. 1853-65.
49. Schmid, C., A. Beham, and P. Kratochvil, *Haematopoiesis in a degenerating uterine leiomyoma*. Arch Gynecol Obstet, 1990. 248(2): p. 81-6.
50. Adany, R., et al., *Increased density of histiocytes in uterine leiomyomas*. Int J Gynecol Pathol, 1990. 9(2): p. 137-44.
51. Crow, J., et al., *Morphological changes in uterine leiomyomas treated by GnRH agonist goserelin*. Int J Gynecol Pathol, 1995. 14(3): p. 235-42.
52. Ferry, J.A., N.L. Harris, and R.E. Scully, *Uterine leiomyomas with lymphoid infiltration simulating lymphoma. A report of seven cases*. Int J Gynecol Pathol, 1989. 8(3): p. 263-70.
53. Clement, P.B., *Intravenous leiomyomatosis of the uterus*. Pathol Annu, 1988. 23 Pt 2: p. 153-83.
54. Suginami, H., et al., *Intravenous leiomyomatosis with cardiac extension: successful surgical management and histopathologic study*. Obstet Gynecol, 1990. 76(3 Pt 2): p. 527-9.
55. Cohen, D.T., et al., *Uterine smooth-muscle tumors with unusual growth patterns: imaging with pathologic correlation*. AJR Am J Roentgenol, 2007. 188(1): p. 246-55.
56. Lee, H.J., J. Choi, and K.R. Kim, *Pulmonary benign metastasizing leiomyoma associated with intravenous leiomyomatosis of the uterus: clinical behavior and genomic changes supporting a transportation theory*. Int J Gynecol Pathol, 2008. 27(3): p. 340-5.
57. Cho, K.R., J.D. Woodruff, and J.I. Epstein, *Leiomyoma of the uterus with multiple extrauterine smooth muscle tumors: a case report suggesting multifocal origin*. Hum Pathol, 1989. 20(1): p. 80-3.
58. Tietze, L., et al., *Benign metastasizing leiomyoma: a cytogenetically balanced but clonal disease*. Hum Pathol, 2000. 31(1): p. 126-8.
59. Moinfar, F., M. Azodi, and F.A. Tavassoli, *Uterine sarcomas*. Pathology, 2007. 39(1): p. 55-71.
60. Karpathiou, G., E. Sivridis, and A. Giatromanolaki, *Myxoid leiomyosarcoma of the uterus: a diagnostic challenge*. Eur J Gynaecol Oncol, 2010. 31(4): p. 446-8.
61. Prayson, R.A., J.R. Goldblum, and W.R. Hart, *Epithelioid smooth-muscle tumors of the uterus: a clinicopathologic study of 18 patients*. Am J Surg Pathol, 1997. 21(4): p. 383-91.
62. Jones, M.W. and H.J. Norris, *Clinicopathologic study of 28 uterine leiomyosarcomas with metastasis*. Int J Gynecol Pathol, 1995. 14(3): p. 243-9.
63. Lee, F.Y., M.C. Wen, and J. Wang, *Epithelioid leiomyosarcoma of the uterus containing sex cord-like elements*. Int J Gynecol Pathol, 2009. 29(1): p. 67-8.

64. Dizon, D.S. and M.J. Birrer, *Advances in the diagnosis and treatment of uterine sarcomas*. Discov Med, 2014. 17(96): p. 339-45.
65. Giuntoli, R.L., 2nd, et al., *Comparison of current staging systems and a novel staging system for uterine leiomyosarcoma*. Int J Gynecol Cancer, 2013. 23(5): p. 869-76.
66. Iasonos, A., et al., *External validation of a prognostic nomogram for overall survival in women with uterine leiomyosarcoma*. Cancer, 2013. 119(10): p. 1816-22.
67. Lim, D., et al., *Old versus new FIGO staging systems in predicting overall survival in patients with uterine leiomyosarcoma: a study of 86 cases*. Gynecol Oncol, 2012. 128(2): p. 322-6.
68. D'Angelo, E. and J. Prat, *Diagnostic use of immunohistochemistry in uterine mesenchymal tumors*. Semin Diagn Pathol, 2014. 31(3): p. 216-22.
69. Mittal, K. and R.I. Demopoulos, *MIB-1 (Ki-67), p53, estrogen receptor, and progesterone receptor expression in uterine smooth muscle tumors*. Hum Pathol, 2001. 32(9): p. 984-7.
70. Bodner, K., et al., *Estrogen and progesterone receptor expression in patients with uterine smooth muscle tumors*. Fertil Steril, 2004. 81(4): p. 1062-6.
71. Leitao, M.M., et al., *Tissue microarray immunohistochemical expression of estrogen, progesterone, and androgen receptors in uterine leiomyomata and leiomyosarcoma*. Cancer, 2004. 101(6): p. 1455-62.
72. Zhai, Y.L., et al., *Expression of steroid receptors, Ki-67, and p53 in uterine leiomyosarcomas*. Int J Gynecol Pathol, 1999. 18(1): p. 20-8.
73. Soper, J.T., et al., *Cytoplasmic estrogen and progesterone receptor content of uterine sarcomas*. Am J Obstet Gynecol, 1984. 150(4): p. 342-8.
74. Sutton, G.P., et al., *Estrogen and progesterone receptors in uterine sarcomas*. Obstet Gynecol, 1986. 68(5): p. 709-14.
75. Wade, K., et al., *Uterine sarcoma: steroid receptors and response to hormonal therapy*. Gynecol Oncol, 1990. 39(3): p. 364-7.
76. Lee, C.H., et al., *A panel of antibodies to determine site of origin and malignancy in smooth muscle tumors*. Mod Pathol, 2009. 22(12): p. 1519-31.
77. Chen, L. and B. Yang, *Immunohistochemical analysis of p16, p53, and Ki-67 expression in uterine smooth muscle tumors*. Int J Gynecol Pathol, 2008. 27(3): p. 326-32.
78. Akhan, S.E., et al., *The expression of Ki-67, p53, estrogen and progesterone receptors affecting survival in uterine leiomyosarcomas. A clinicopathologic study*. Gynecol Oncol, 2005. 99(1): p. 36-42.
79. Jeffers, M.D., et al., *p53 immunoreactivity and mutation of the p53 gene in smooth muscle tumours of the uterine corpus*. J Pathol, 1995. 177(1): p. 65-70.
80. Leiser, A.L., et al., *Apoptotic and cell cycle regulatory markers in uterine leiomyosarcoma*. Gynecol Oncol, 2006. 101(1): p. 86-91.
81. Atkins, K.A., et al., *The Use of p16 in enhancing the histologic classification of uterine smooth muscle tumors*. Am J Surg Pathol, 2008. 32(1): p. 98-102.
82. Bodner-Adler, B., et al., *Expression of p16 protein in patients with uterine smooth muscle tumors: an immunohistochemical analysis*. Gynecol Oncol, 2005. 96(1): p. 62-6.
83. Sung, C.O., et al., *Atypical leiomyomas of the uterus with long-term follow-up after myomectomy with immunohistochemical analysis for p16INK4A, p53, Ki-67, estrogen receptors, and progesterone receptors*. Int J Gynecol Pathol, 2009. 28(6): p. 529-34.

84. Kefeli, M., et al., *Fascin expression in uterine smooth muscle tumors*. Int J Gynecol Pathol, 2009. 28(4): p. 328-33.
85. D'Angelo, E., et al., *Uterine leiomyosarcomas: tumor size, mitotic index, and biomarkers Ki67, and Bcl-2 identify two groups with different prognosis*. Gynecol Oncol, 2011. 121(2): p. 328-33.
86. Giordano, G., *Value of immunohistochemistry in uterine pathology: common and rare diagnostic dilemmas*. Pathol Res Pract, 2009. 205(10): p. 663-76.
87. Adams, S.F., et al., *PDGFR-alpha as a potential therapeutic target in uterine sarcomas*. Gynecol Oncol, 2007. 104(3): p. 524-8.
88. Loddenkemper, C., et al., *Use of oxytocin receptor expression in distinguishing between uterine smooth muscle tumors and endometrial stromal sarcoma*. Am J Surg Pathol, 2003. 27(11): p. 1458-62.
89. Jeffers, M.D., J.A. Richmond, and E.M. Macaulay, *Overexpression of the c-myc proto-oncogene occurs frequently in uterine sarcomas*. Mod Pathol, 1995. 8(7): p. 701-4.
90. Lee, S.J., et al., *Increased expression of calpain 6 in uterine sarcomas and carcinosarcomas: an immunohistochemical analysis*. Int J Gynecol Cancer, 2007. 17(1): p. 248-53.
91. Gerdes, J., et al., *Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67*. Am J Pathol, 1991. 138(4): p. 867-73.
92. Gerdes, J., et al., *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67*. J Immunol, 1984. 133(4): p. 1710-5.
93. Carrillo, R., et al., *Prognostic significance of DNA ploidy and proliferative index (MIB-1 index) in gastrointestinal stromal tumors*. Hum Pathol, 1997. 28(2): p. 160-5.
94. Rudolph, P., et al., *Immunophenotype, proliferation, DNA ploidy, and biological behavior of gastrointestinal stromal tumors: a multivariate clinicopathologic study*. Hum Pathol, 1998. 29(8): p. 791-800.
95. Key, G., M.H. Kubbutat, and J. Gerdes, *Assessment of cell proliferation by means of an enzyme-linked immunosorbent assay based on the detection of the Ki-67 protein*. J Immunol Methods, 1994. 177(1-2): p. 113-7.
96. Wong, N.A., et al., *Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumours: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach*. Histopathology, 2003. 43(2): p. 118-26.
97. Plaza, J.A., et al., *Metastases to soft tissue: a review of 118 cases over a 30-year period*. Cancer, 2008. 112(1): p. 193-203.
98. Cunningham, R.E., et al., *Apoptosis, Bcl-2 expression, and p53 expression in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2001. 9(1): p. 19-23.
99. Trisciuoglio, D., et al., *Involvement of BH4 domain of Bcl-2 in the regulation of HIF-1-mediated VEGF expression in hypoxic tumor cells*. Cell Death Differ, 2011. 18(6): p. 1024-35.
100. Marzo, I., et al., *Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis*. Science, 1998. 281(5385): p. 2027-31.
101. Narita, M., et al., *Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(25): p. 14681-6.

102. Nieder, C., et al., *The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in Hodgkin's or non-Hodgkin's lymphoma*. Ann Hematol, 2001. 80(1): p. 2-8.
103. Vojtesek, B., et al., *An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53*. J Immunol Methods, 1992. 151(1-2): p. 237-44.
104. Cooper, K. and Z. Haffajee, *Bcl-2 and p53 protein expression in follicular lymphoma*. J Pathol, 1997. 182(3): p. 307-10.
105. Al-Bozom, I.A., *p53 expression in gastrointestinal stromal tumors*. Pathol Int, 2001. 51(7): p. 519-23.
106. Feakins, R.M., *The expression of p53 and Bcl-2 in gastrointestinal stromal tumours is associated with anatomical site, and p53 expression is associated with grade and clinical outcome*. Histopathology, 2005. 46(3): p. 270-9.
107. de Boer, C.J., et al., *Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma*. Blood, 1995. 86(7): p. 2715-23.
108. Donnellan, R. and R. Chetty, *Cyclin D1 and human neoplasia*. Mol Pathol, 1998. 51(1): p. 1-7.
109. Falini, B., et al., *Immunohistochemical surrogates for genetic alterations of CCDN1, PML, ALK, and NPM1 genes in lymphomas and acute myeloid leukemia*. Best Pract Res Clin Haematol, 2010. 23(3): p. 417-31.
110. Nobori, T., et al., *Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers*. Nature, 1994. 368(6473): p. 753-6.
111. Liu, X.P., et al., *Combined examination of p27(Kip1), p21(Waf1/Cip1) and p53 expression allows precise estimation of prognosis in patients with gastric carcinoma*. Histopathology, 2001. 39(6): p. 603-10.
112. Li, X., et al., *Reduced p21(WAF1/CIP1) expression is an early event in gallbladder carcinogenesis and is of prognostic significance for patients with carcinomas of the gallbladder*. Hum Pathol, 2001. 32(8): p. 771-7.
113. Toyoshima, H. and T. Hunter, *p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21*. Cell, 1994. 78(1): p. 67-74.
114. Polyak, K., et al., *Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals*. Cell, 1994. 78(1): p. 59-66.
115. St Croix, B., et al., *Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents*. Nat Med, 1996. 2(11): p. 1204-10.
116. Fredersdorf, S., et al., *High level expression of p27(kip1) and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27(kip1) and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(12): p. 6380-5.
117. Tan, P., et al., *The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas*. Cancer Res, 1997. 57(7): p. 1259-63.
118. Catzavelos, C., et al., *Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer*. Nat Med, 1997. 3(2): p. 227-30.
119. Yasui, W., et al., *Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinomas*. Jpn J Cancer Res, 1997. 88(7): p. 625-9.
120. Esposito, V., et al., *Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer*. Cancer Res, 1997. 57(16): p. 3381-5.

121. Jin, L., et al., *Transforming growth factor-beta, transforming growth factor-beta receptor II, and p27Kip1 expression in nontumorous and neoplastic human pituitaries*. Am J Pathol, 1997. 151(2): p. 509-19.
122. Lloyd, R.V., et al., *p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers*. Am J Pathol, 1999. 154(2): p. 313-23.
123. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. 100(1): p. 57-70.
124. Forscher, C., M. Mita, and R. Figlin, *Targeted therapy for sarcomas*. Biologics, 2014. 8: p. 91-105.
125. Kahn, C.R., *The molecular mechanism of insulin action*. Annu Rev Med, 1985. 36: p. 429-51.
126. Froesch, E.R., et al., *Actions of insulin-like growth factors*. Annu Rev Physiol, 1985. 47: p. 443-67.
127. Warshamana-Greene, G.S., et al., *The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, sensitizes small cell lung cancer cell lines to the effects of chemotherapy*. Clin Cancer Res, 2005. 11(4): p. 1563-71.
128. Jones, H.E., et al., *Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells*. Endocr Relat Cancer, 2004. 11(4): p. 793-814.
129. Zafrakas, M., et al., *ERBB2 (HER2) protein expression in uterine sarcomas*. Eur J Gynaecol Oncol, 2009. 30(3): p. 292-4.
130. Kaygusuz, E.I., *Immunohistochemical expression of CD44 standard and E-cadherin in atypical leiomyoma and leiomyosarcoma of the uterus*. J Obstet Gynaecol, 2015. 35(3): p. 279-82.
131. Uchikado, Y., et al., *Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2005. 11(3): p. 1174-80.
132. Zhang, K., et al., *Slug enhances invasion ability of pancreatic cancer cells through upregulation of matrix metalloproteinase-9 and actin cytoskeleton remodeling*. Lab Invest, 2011. 91(3): p. 426-38.
133. Nieto, M.A., *The snail superfamily of zinc-finger transcription factors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. 3(3): p. 155-66.
134. Larue, L. and A. Bellacosa, *Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways*. Oncogene, 2005. 24(50): p. 7443-54.
135. Barth, A.I., I.S. Nathke, and W.J. Nelson, *Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways*. Curr Opin Cell Biol, 1997. 9(5): p. 683-90.
136. Behrens, J., et al., *Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1*. Nature, 1996. 382(6592): p. 638-42.
137. Yook, J.I., et al., *Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail*. J Biol Chem, 2005. 280(12): p. 11740-8.
138. Grille, S.J., et al., *The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines*. Cancer Res, 2003. 63(9): p. 2172-8.
139. Dabbs, D.J., *Diagnostic immunohistochemistry*. 2nd ed ed. 2006, [New York?]: Churchill Livingstone. xv, 828 p.

140. Misrahi, M., et al., *Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987. 143(2): p. 740-8.
141. Law, M.L., et al., *The progesterone receptor gene maps to human chromosome band 11q13, the site of the mammary oncogene int-2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(9): p. 2877-81.
142. Avdalyan, A., et al., *Prognostic Value of Microvessel Density in Tumor and Peritumoral Area as Evaluated by CD31 Protein Expression and Argyrophilic Nucleolar Organizer Region Count in Endothelial Cells in Uterine Leiomyosarcoma*. *Sarcoma*, 2012. 2012: p. 594512.
143. Aruffo, A., et al., *CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate*. *Cell*, 1990. 61(7): p. 1303-13.
144. Horny, H.P., D.M. Menke, and E. Kaiserling, *Neoplastic human tissue mast cells express the adhesion molecule CD44/HCAM*. *Virchows Arch*, 1996. 429(2-3): p. 91-4.
145. Stamenkovic, I., et al., *A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family*. *Cell*, 1989. 56(6): p. 1057-62.
146. Flanagan, B.F., et al., *Chemical composition and tissue distribution of the human CDw44 glycoprotein*. *Immunology*, 1989. 67(2): p. 167-75.
147. Wielenga, V.J., et al., *Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression*. *Cancer Res*, 1993. 53(20): p. 4754-6.
148. Mulder, J.W., et al., *Expression of mutant p53 protein and CD44 variant proteins in colorectal tumorigenesis*. *Gut*, 1995. 36(1): p. 76-80.
149. Okumura-Nakanishi, S., et al., *Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells*. *J Biol Chem*, 2005. 280(7): p. 5307-17.
150. Zhu, X.Q., et al., *[The differential diagnosis between uterine leiomyosarcoma and the special subtypes of leiomyoma]*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2003. 83(16): p. 1419-21.
151. Colgan, T.J., S. Pendergast, and M. LeBlanc, *The histopathology of uterine leiomyomas following treatment with gonadotropin-releasing hormone analogues*. *Hum Pathol*, 1993. 24(10): p. 1073-7.
152. Resta, L., et al., *[Morphometric and histological evaluation of uterine leiomyomas treated with GnRH agonists or progestational agents]*. *Pathologica*, 2004. 96(2): p. 35-41.
153. Sreenan, J.J., et al., *Histopathologic findings in 107 uterine leiomyomas treated with leuprolide acetate compared with 126 controls*. *Am J Surg Pathol*, 1996. 20(4): p. 427-32.
154. Layfield, L.J., et al., *Uterine smooth muscle tumors: utility of classification by proliferation, ploidy, and prognostic markers versus traditional histopathology*. *Arch Pathol Lab Med*, 2000. 124(2): p. 221-7.
155. Wilkinson, N. and T.P. Rollason, *Recent advances in the pathology of smooth muscle tumours of the uterus*. *Histopathology*, 2001. 39(4): p. 331-41.
156. Devaney, K. and F.A. Tavassoli, *Immunohistochemistry as a diagnostic aid in the interpretation of unusual mesenchymal tumors of the uterus*. *Mod Pathol*, 1991. 4(2): p. 225-31.
157. Hyde, K.E., et al., *The clear-cell variant of uterine epithelioid leiomyoma. An immunohistologic and ultrastructural study*. *Arch Pathol Lab Med*, 1989. 113(5): p. 551-3.

158. Hales, H.A., et al., *Leiomyomatosis peritonealis disseminata treated with a gonadotropin-releasing hormone agonist. A case report.* Am J Obstet Gynecol, 1992. 167(2): p. 515-6.
159. Bekkers, R.L., et al., *Leiomyomatosis peritonealis disseminata: does malignant transformation occur? A literature review.* Gynecol Oncol, 1999. 75(1): p. 158-63.
160. Zhu, X.Q., et al., *Immunohistochemical markers in differential diagnosis of endometrial stromal sarcoma and cellular leiomyoma.* Gynecol Oncol, 2004. 92(1): p. 71-9.
161. Hwang, H., et al., *Immunohistochemical panel to differentiate endometrial stromal sarcoma, uterine leiomyosarcoma and leiomyoma: something old and something new.* J Clin Pathol, 2015.
162. Tawfik, O., et al., *Transgelin, a Novel Marker of Smooth Muscle Differentiation, Effectively Distinguishes Endometrial Stromal Tumors from Uterine Smooth Muscle Tumors.* Int J Gynecol Obstet Reprod Med Res, 2015. 1(1): p. 26-31.
163. Davidson, B., et al., *Gene expression signatures differentiate uterine endometrial stromal sarcoma from leiomyosarcoma.* Gynecol Oncol, 2012. 128(2): p. 349-55.
164. Ahuja, A., et al., *Primary mixed mullerian tumor of the vagina--a case report with review of the literature.* Pathol Res Pract, 2011. 207(4): p. 253-5.
165. D'Angelo, E. and J. Prat, *Pathology of mixed Mullerian tumours.* Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 25(6): p. 705-18.
166. Townsend, D.E., et al., *Unicellular histogenesis of uterine leiomyomas as determined by electrophoresis by glucose-6-phosphate dehydrogenase.* Am J Obstet Gynecol, 1970. 107(8): p. 1168-73.
167. Mashal, R.D., et al., *Analysis of androgen receptor DNA reveals the independent clonal origins of uterine leiomyomata and the secondary nature of cytogenetic aberrations in the development of leiomyomata.* Genes Chromosomes Cancer, 1994. 11(1): p. 1-6.
168. Hashimoto, K., et al., *Clonal determination of uterine leiomyomas by analyzing differential inactivation of the X-chromosome-linked phosphoglycerokinase gene.* Gynecol Obstet Invest, 1995. 40(3): p. 204-8.
169. Linder, D. and S.M. Gartler, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase mosaicism: utilization as a cell marker in the study of leiomyomas.* Science, 1965. 150(692): p. 67-9.
170. Ciavattini, A., et al., *Uterine Fibroids: Pathogenesis and Interactions with Endometrium and Endomyometrial Junction.* Obstet Gynecol Int. 2013: p. 173184.
171. Nilbert, M., et al., *Ring formation and structural rearrangements of chromosome 1 as secondary changes in uterine leiomyomas with t(12;14)(q14-15;q23-24).* Cancer Genet Cytogenet, 1988. 36(2): p. 183-90.
172. Rein, M.S., et al., *Cytogenetic abnormalities in uterine leiomyomata.* Obstet Gynecol, 1991. 77(6): p. 923-6.
173. Ligon, A.H. and C.C. Morton, *Leiomyomata: heritability and cytogenetic studies.* Hum Reprod Update, 2001. 7(1): p. 8-14.
174. Morton, C.C., *Warner-Lambert/Parke-Davis Award lecture. Many tumors and many genes: genetics of uterine leiomyomata.* Am J Pathol, 1998. 153(4): p. 1015-20.
175. Nilbert, M., et al., *Chromosome rearrangements in two uterine sarcomas.* Cancer Genet Cytogenet, 1990. 44(1): p. 27-35.

176. Morton, C.C., *Genetic approaches to the study of uterine leiomyomata*. Environ Health Perspect, 2000. 108 Suppl 5: p. 775-8.
177. Walker, C.L. and E.A. Stewart, *Uterine fibroids: the elephant in the room*. Science, 2005. 308(5728): p. 1589-92.
178. Fejzo, M.S., et al., *Identification of a YAC spanning the translocation breakpoints in uterine leiomyomata, pulmonary chondroid hamartoma, and lipoma: physical mapping of the 12q14-q15 breakpoint region in uterine leiomyomata*. Genomics, 1995. 26(2): p. 265-71.
179. Meloni, A.M., et al., *Uterine leiomyomas: cytogenetic and histologic profile*. Obstet Gynecol, 1992. 80(2): p. 209-17.
180. Klotzbucher, M., A. Wasserfall, and U. Fuhrmann, *Misexpression of wild-type and truncated isoforms of the high-mobility group I proteins HMGI-C and HMGI(Y) in uterine leiomyomas*. Am J Pathol, 1999. 155(5): p. 1535-42.
181. Reeves, R., *Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function*. Gene, 2001. 277(1-2): p. 63-81.
182. Grosschedl, R., K. Giese, and J. Pagel, *HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures*. Trends Genet, 1994. 10(3): p. 94-100.
183. Ingraham, S.E., et al., *hREC2, a RAD51-like gene, is disrupted by t(12;14) (q15;q24.1) in a uterine leiomyoma*. Cancer Genet Cytogenet, 1999. 115(1): p. 56-61.
184. Thacker, J., *The RAD51 gene family, genetic instability and cancer*. Cancer Lett, 2005. 219(2): p. 125-35.
185. Ozisik, Y.Y., et al., *Involvement of 10q22 in leiomyoma*. Cancer Genet Cytogenet, 1993. 69(2): p. 132-5.
186. Quade, B.J., et al., *Fusion transcripts involving HMGA2 are not a common molecular mechanism in uterine leiomyomata with rearrangements in 12q15*. Cancer Res, 2003. 63(6): p. 1351-8.
187. Sargent, M.S., et al., *Translocations in 7q22 define a critical region in uterine leiomyomata*. Cancer Genet Cytogenet, 1994. 77(1): p. 65-8.
188. van Rijk, A., et al., *Characterization of a recurrent t(1;2)(p36;p24) in human uterine leiomyoma*. Cancer Genet Cytogenet, 2009. 193(1): p. 54-62.
189. Hodge, J.C. and C.C. Morton, *Genetic heterogeneity among uterine leiomyomata: insights into malignant progression*. Hum Mol Genet, 2007. 16 Spec No 1: p. R7-13.
190. Sornberger, K.S., et al., *Expression of HMGIY in three uterine leiomyomata with complex rearrangements of chromosome 6*. Cancer Genet Cytogenet, 1999. 114(1): p. 9-16.
191. Williams, A.J., et al., *HMGI(Y) expression in human uterine leiomyomata. Involvement of another high-mobility group architectural factor in a benign neoplasm*. Am J Pathol, 1997. 150(3): p. 911-8.
192. Moore, S.D., et al., *Uterine leiomyomata with t(10;17) disrupt the histone acetyltransferase MORF*. Cancer Res, 2004. 64(16): p. 5570-7.
193. Mehine, M., et al., *Characterization of uterine leiomyomas by whole-genome sequencing*. N Engl J Med, 2013. 369(1): p. 43-53.
194. Hsieh, Y.Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-308 promoter and p53 codon 72 gene polymorphisms in women with leiomyomas*. Fertil Steril, 2004. 82 Suppl 3: p. 1177-81.
195. Hsieh, Y.Y., et al., *Interleukin (IL)-12 receptor beta1 codon 378 G homozygote and allele, but not IL-1 (beta-511 promoter, 3953 exon 5, receptor antagonist),*

- IL-2 114, IL-4-590 intron 3, IL-8 3'-UTR 2767, and IL-18 105, are associated with higher susceptibility to leiomyoma.* Fertil Steril, 2007. 87(4): p. 886-95.
196. Litovkin, K.V., et al., *Interleukin-6 -174G/C polymorphism in breast cancer and uterine leiomyoma patients: a population-based case control study.* Exp Oncol, 2007. 29(4): p. 295-8.
197. Pietrowski, D., et al., *Uterine leiomyoma is associated with a polymorphism in the interleukin 1-beta gene.* Am J Reprod Immunol, 2009. 62(2): p. 112-7.
198. Csatlos, E., et al., *The role of the alcohol dehydrogenase-1 (ADH1) gene in the pathomechanism of uterine leiomyoma.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2013. 170(2): p. 492-6.
199. Zeng, W.R., et al., *Loss of heterozygosity and reduced expression of the CUTL1 gene in uterine leiomyomas.* Oncogene, 1997. 14(19): p. 2355-65.
200. Ishiai, M., et al., *Isolation of human and fission yeast homologues of the budding yeast origin recognition complex subunit ORC5: human homologue (ORC5L) maps to 7q22.* Genomics, 1997. 46(2): p. 294-8.
201. Matsubara, A., et al., *Prevalence of MED12 mutations in uterine and extrauterine smooth muscle tumours.* Histopathology, 2013. 62(4): p. 657-61.
202. Makinen, N., et al., *MED12 exon 2 mutations are common in uterine leiomyomas from South African patients.* Oncotarget, 2011. 2(12): p. 966-9.
203. Je, E.M., et al., *Mutational analysis of MED12 exon 2 in uterine leiomyoma and other common tumors.* Int J Cancer, 2012. 131(6): p. E1044-7.
204. Markowski, D.N., et al., *MED12 mutations in uterine fibroids--their relationship to cytogenetic subgroups.* Int J Cancer, 2012. 131(7): p. 1528-36.
205. McGuire, M.M., et al., *Whole exome sequencing in a random sample of North American women with leiomyomas identifies MED12 mutations in majority of uterine leiomyomas.* PLoS One, 2012. 7(3): p. e33251.
206. Bertsch, E., et al., *MED12 and HMGA2 mutations: two independent genetic events in uterine leiomyoma and leiomyosarcoma.* Mod Pathol, 2014. 27(8): p. 1144-53.
207. Cho, Y.L., et al., *Array comparative genomic hybridization analysis of uterine leiomyosarcoma.* Gynecol Oncol, 2005. 99(3): p. 545-51.
208. Laxman, R., et al., *Cytogenetic profile of uterine sarcomas.* Cancer, 1993. 71(4): p. 1283-8.
209. Lehtonen, H.J., et al., *Increased risk of cancer in patients with fumarate hydratase germline mutation.* J Med Genet, 2006. 43(6): p. 523-6.
210. Ylisaukko-oja, S.K., et al., *Analysis of fumarate hydratase mutations in a population-based series of early onset uterine leiomyosarcoma patients.* Int J Cancer, 2006. 119(2): p. 283-7.
211. Mittal, K.R., et al., *Molecular and immunohistochemical evidence for the origin of uterine leiomyosarcomas from associated leiomyoma and symplastic leiomyoma-like areas.* Mod Pathol, 2009. 22(10): p. 1303-11.
212. Shan, W., et al., *A small-molecule inhibitor targeting the mitotic spindle checkpoint impairs the growth of uterine leiomyosarcoma.* Clin Cancer Res, 2012. 18(12): p. 3352-65.
213. Raspollini, M.R., et al., *Uterine leiomyosarcomas express KIT protein but lack mutation(s) in exon 9 of c-KIT.* Gynecol Oncol, 2005. 98(2): p. 334-5.
214. Hay, N., *The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer.* Cancer Cell, 2005. 8(3): p. 179-83.

215. Gloudemans, T., et al., *Expression and CpG methylation of the insulin-like growth factor II gene in human smooth muscle tumors*. *Cancer Res*, 1992. 52(23): p. 6516-21.
216. Brewer Savannah, K.J., et al., *Dual targeting of mTOR and aurora-A kinase for the treatment of uterine Leiomyosarcoma*. *Clin Cancer Res*, 2012. 18(17): p. 4633-45.
217. Kampjarvi, K., et al., *Somatic MED12 mutations in uterine leiomyosarcoma and colorectal cancer*. *Br J Cancer*, 2012. 107(10): p. 1761-5.
218. Hu, J., et al., *Genomic alterations in uterine leiomyosarcomas: potential markers for clinical diagnosis and prognosis*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2001. 31(2): p. 117-24.
219. Shikeeva, A.A., et al., *[The loss of heterozygosity and microsatellite instability analysis in differential diagnostics of leiomyosarcoma and proliferative leiomyoma of the uterus]*. *Arkh Patol*, 2011. 73(4): p. 47-50.
220. Raish, M., et al., *Analysis of molecular cytogenetic alterations in uterine leiomyosarcoma by array-based comparative genomic hybridization*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012. 138(7): p. 1173-86.
221. Schwartz S., V.L.S., WA, *Familial aggregation of uterine leiomyomata*. Unpublished data presented at the Annual Meeting of the Society for Epidemiological Research, 2000.
222. Kurbanova, M., A.G. Koroleva, and A.S. Sergeev, *[Genetic analysis of the predisposition to uterine myoma. Prevalence and morbidity]*. *Genetika*, 1989. 25(6): p. 1122-4.
223. Kurbanova, M., A.G. Koroleva, and A.S. Sergeev, *[Genetic-epidemiologic analysis of uterine myoma: assessment of repeated risk]*. *Genetika*, 1989. 25(10): p. 1896-8.
224. Vikhlyeva, E.M., Z.S. Khodzhaeva, and N.D. Fantschenko, *Familial predisposition to uterine leiomyomas*. *Int J Gynaecol Obstet*, 1995. 51(2): p. 127-31.
225. Huyck, K.L., et al., *The impact of race as a risk factor for symptom severity and age at diagnosis of uterine leiomyomata among affected sisters*. *Am J Obstet Gynecol*, 2008. 198(2): p. 168 e1-9.
226. Kjerulff, K.H., et al., *Uterine leiomyomas. Racial differences in severity, symptoms and age at diagnosis*. *J Reprod Med*, 1996. 41(7): p. 483-90.
227. Pedetour, F., A.H. Ligon, and C.C. Morton, *[Genetics of uterine leiomyomata]*. *Bull Cancer*, 1999. 86(11): p. 920-8.
228. Treloar, S.A., et al., *Pathways to hysterectomy: insights from longitudinal twin research*. *Am J Obstet Gynecol*, 1992. 167(1): p. 82-8.
229. Luoto, R., et al., *Heritability and risk factors of uterine fibroids--the Finnish Twin Cohort study*. *Maturitas*, 2000. 37(1): p. 15-26.
230. Pavlovich, C.P. and L.S. Schmidt, *Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma*. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(5): p. 381-93.
231. Ciavattini, A., et al., *Uterine Fibroids: Pathogenesis and Interactions with Endometrium and Endomyometrial Junction*. *Obstet Gynecol Int*, 2013. 2013: p. 173184.
232. Tomlinson, I.P., et al., *Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer*. *Nat Genet*, 2002. 30(4): p. 406-10.

233. Cook, J.D. and C.L. Walker, *The Eker rat: establishing a genetic paradigm linking renal cell carcinoma and uterine leiomyoma*. *Curr Mol Med*, 2004. 4(8): p. 813-24.
234. Buttram, V.C., Jr. and R.C. Reiter, *Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology, and management*. *Fertil Steril*, 1981. 36(4): p. 433-45.
235. Christacos, N.C., et al., *Uterine leiomyomata with deletions of 1p represent a distinct cytogenetic subgroup associated with unusual histologic features*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2006. 45(3): p. 304-12.
236. Quade, B.J., et al., *Molecular pathogenesis of uterine smooth muscle tumors from transcriptional profiling*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004. 40(2): p. 97-108.
237. Dal Cin, P., et al., *t(10;17) as the sole chromosome change in a uterine leiomyosarcoma*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1988. 32(2): p. 263-6.
238. Fletcher, J.A., et al., *Chromosome aberrations in uterine smooth muscle tumors: potential diagnostic relevance of cytogenetic instability*. *Cancer Res*, 1990. 50(13): p. 4092-7.
239. Spies, J.B., et al., *Complications after uterine artery embolization for leiomyomas*. *Obstet Gynecol*, 2002. 100(5 Pt 1): p. 873-80.
240. Candiani, G.B., et al., *Risk of recurrence after myomectomy*. *Br J Obstet Gynaecol*, 1991. 98(4): p. 385-9.
241. Acien, P. and F. Quereda, *Abdominal myomectomy: results of a simple operative technique*. *Fertil Steril*, 1996. 65(1): p. 41-51.
242. Fedele, L., et al., *Recurrence of fibroids after myomectomy: a transvaginal ultrasonographic study*. *Hum Reprod*, 1995. 10(7): p. 1795-6.
243. Walker, W.J. and J.P. Pelage, *Uterine artery embolisation for symptomatic fibroids: clinical results in 400 women with imaging follow up*. *BJOG*, 2002. 109(11): p. 1262-72.
244. Zivanovic, O., et al., *A nomogram to predict postresection 5-year overall survival for patients with uterine leiomyosarcoma*. *Cancer*, 2011. 118(3): p. 660-9.
245. Mayerhofer, K., et al., *Leiomyosarcoma of the uterus: a clinicopathologic multicenter study of 71 cases*. *Gynecol Oncol*, 1999. 74(2): p. 196-201.
246. Pautier, P., et al., *Analysis of clinicopathologic prognostic factors for 157 uterine sarcomas and evaluation of a grading score validated for soft tissue sarcoma*. *Cancer*, 2000. 88(6): p. 1425-31.
247. Stewart, E.A., *Clinical practice. Uterine fibroids*. *N Engl J Med*, 2015. 372(17): p. 1646-55.
248. Zhang, Y., et al., *Acupuncture for uterine fibroids*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010(1): p. CD007221.
249. Marret, H., et al., *Therapeutic management of uterine fibroid tumors: updated French guidelines*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2012. 165(2): p. 156-64.
250. Perez-Lopez, F.R., et al., *EMAS position statement: management of uterine fibroids*. *Maturitas*, 2014. 79(1): p. 106-16.
251. Adm, F.d., *FDA discourages use of laparoscopic power morcellatio to removal of uterus uterine fibroids*. 2014. 17:4
252. Sutton, G., *Uterine sarcomas 2013*. *Gynecol Oncol*. 130(1): p. 3-5.
253. Palomba, S., et al., *Tibolone reverses the cognitive effects caused by leuprolide acetate administration, improving mood and quality of life in patients with symptomatic uterine leiomyomas*. *Fertil Steril*, 2008. 90(1): p. 165-73.

254. De Leo, V., et al., *A benefit-risk assessment of medical treatment for uterine leiomyomas*. Drug Saf, 2002. 25(11): p. 759-79.
255. Andersson, J.K. and G. Rybo, *Levonorgestrel-releasing intrauterine device in the treatment of menorrhagia*. Br J Obstet Gynaecol, 1990. 97(8): p. 690-4.
256. Tang, G.W. and S.S. Lo, *Levonorgestrel intrauterine device in the treatment of menorrhagia in Chinese women: efficacy versus acceptability*. Contraception, 1995. 51(4): p. 231-5.
257. Maruo, T., et al., *Effects of levonorgestrel-releasing IUS and progesterone receptor modulator PRM CDB-2914 on uterine leiomyomas*. Contraception, 2007. 75(6 Suppl): p. S99-103.
258. Sharan, C., et al., *Vitamin D inhibits proliferation of human uterine leiomyoma cells via catechol-O-methyltransferase*. Fertil Steril. 95(1): p. 247-53.
259. Tang, Y., et al., *Epigallocatechin-3 gallate induces growth inhibition and apoptosis in human breast cancer cells through survivin suppression*. Int J Oncol, 2007. 31(4): p. 705-11.
260. Gupta, S., et al., *Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate in androgen-sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 2000. 164(1): p. 82-90.
261. Zhang, D., et al., *Green tea extract inhibits proliferation of uterine leiomyoma cells in vitro and in nude mice*. Am J Obstet Gynecol, 2010. 202(3): p. 289 e1-9.
262. Zhang, D., et al., *Antiproliferative and proapoptotic effects of epigallocatechin gallate on human leiomyoma cells*. Fertil Steril. 94(5): p. 1887-93.
263. Cook, J.D. and C.L. Walker, *Treatment strategies for uterine leiomyoma: the role of hormonal modulation*. Semin Reprod Med, 2004. 22(2): p. 105-11.
264. Mizuno, M., et al., *Clinical benefit of endocrine therapy for benign metastasizing leiomyoma*. Int J Clin Oncol. 16(5): p. 587-91.
265. Amanti, L., et al., *Uterine leiomyoma and its association with menstrual pattern and history of depo-medroxyprogesterone acetate injections*. Int J Gen Med. 4: p. 535-8.
266. Hensley, M.L., et al., *Adjuvant gemcitabine plus docetaxel for completely resected stages I-IV high grade uterine leiomyosarcoma: Results of a prospective study*. Gynecol Oncol, 2009. 112(3): p. 563-7.
267. Hensley, M.L., et al., *Adjuvant therapy for high-grade, uterus-limited leiomyosarcoma: results of a phase 2 trial (SARC 005)*. Cancer, 2013. 119(8): p. 1555-61.
268. Muss, H.B., et al., *Treatment of recurrent or advanced uterine sarcoma. A randomized trial of doxorubicin versus doxorubicin and cyclophosphamide (a phase III trial of the Gynecologic Oncology Group)*. Cancer, 1985. 55(8): p. 1648-53.
269. Omura, G.A., et al., *A randomized study of adriamycin with and without dimethyl triazenoimidazole carboxamide in advanced uterine sarcomas*. Cancer, 1983. 52(4): p. 626-32.
270. Sutton, G., J.A. Blessing, and J.H. Malfetano, *Ifosfamide and doxorubicin in the treatment of advanced leiomyosarcomas of the uterus: a Gynecologic Oncology Group study*. Gynecol Oncol, 1996. 62(2): p. 226-9.
271. Thigpen, J.T., et al., *Phase II trial of cisplatin as first-line chemotherapy in patients with advanced or recurrent uterine sarcomas: a Gynecologic Oncology Group study*. J Clin Oncol, 1991. 9(11): p. 1962-6.

272. van Nagell, J.R., Jr., et al., *Adjuvant vincristine, dactinomycin, and cyclophosphamide therapy in stage I uterine sarcomas. A pilot study.* Cancer, 1986. 57(8): p. 1451-4.
273. Papadimitriou, C.A., et al., *Anthracycline-based adjuvant chemotherapy in early-stage uterine sarcomas: long-term results of a single institution experience.* Eur J Gynaecol Oncol, 2007. 28(2): p. 109-16.
274. Odunsi, K., et al., *Efficacy of adjuvant CYVADIC chemotherapy in early-stage uterine sarcomas: results of long-term follow-up.* Int J Gynecol Cancer, 2004. 14(4): p. 659-64.
275. Pautier, P., et al., *Cisplatin-based chemotherapy regimen (DECAV) for uterine sarcomas.* Int J Gynecol Cancer, 2002. 12(6): p. 749-54.
276. Hensley, M.L., et al., *Randomized phase III trial of gemcitabine plus docetaxel plus bevacizumab or placebo as first-line treatment for metastatic uterine leiomyosarcoma: an NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study.* J Clin Oncol, 2015. 33(10): p. 1180-5.
277. Shah, S.H., et al., *Uterine sarcomas: then and now.* AJR Am J Roentgenol. 199(1): p. 213-23.
278. Wong, T.F., et al., *Curcumin disrupts uterine leiomyosarcoma cells through AKT-mTOR pathway inhibition.* Gynecol Oncol. 122(1): p. 141-8.
279. Ip, P.P. and A.N. Cheung, *Pathology of uterine leiomyosarcomas and smooth muscle tumours of uncertain malignant potential.* Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 25(6): p. 691-704.
280. Sorbe, B. and B. Johansson, *Prophylactic pelvic irradiation as part of primary therapy in uterine sarcomas.* Int J Oncol, 2008. 32(5): p. 1111-7.
281. Yalman, D., et al., *Results of postoperative radiotherapy in the treatment of uterine sarcomas: a retrospective analysis of 46 patients.* Eur J Gynaecol Oncol, 2008. 29(1): p. 46-51.
282. Sampath, S., et al., *The role of adjuvant radiation in uterine sarcomas.* Int J Radiat Oncol Biol Phys. 76(3): p. 728-34.
283. Reed, N.S., et al., *Phase III randomised study to evaluate the role of adjuvant pelvic radiotherapy in the treatment of uterine sarcomas stages I and II: an European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gynaecological Cancer Group Study (protocol 55874).* Eur J Cancer, 2008. 44(6): p. 808-18.
284. O'Ceirbhail, R., et al., *Treatment of advanced uterine leiomyosarcoma with aromatase inhibitors.* Gynecol Oncol, 2009. 116(3): p. 424-9.
285. Kononen, J., et al., *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens.* Nat Med, 1998. 4(7): p. 844-7.
286. Shergill, I.S. and M. Arya, *Tissue microarrays.* Expert Rev Mol Diagn, 2004. 4(4): p. 421-3.
287. Dhir, R., *Tissue microarrays: an overview.* Methods Mol Biol, 2008. 441: p. 91-103.
288. Watanabe, A., R. Cornelison, and G. Hostetter, *Tissue microarrays: applications in genomic research.* Expert Rev Mol Diagn, 2005. 5(2): p. 171-81.
289. Brown, L.A. and D. Huntsman, *Fluorescent in situ hybridization on tissue microarrays: challenges and solutions.* J Mol Histol, 2007. 38(2): p. 151-7.
290. Tibiletti, M.G., et al., *BCL2, BCL6, MYC, MALT 1, and BCL10 rearrangements in nodal diffuse large B-cell lymphomas: a multicenter evaluation of a new set of fluorescent in situ hybridization probes and correlation with clinical outcome.* Hum Pathol, 2009. 40(5): p. 645-52.

291. Frank, E., et al., *Data mining in bioinformatics using Weka*. Bioinformatics, 2004. 20(15): p. 2479-81.
292. Hall M, F.E., Holmes G, Pfahringer B, Reutemann P, Witten IH *The WEKA Data Mining Software: An Update*. SIGKDD Explorations, 2009. 11(1): p. 8.
293. Kaur, G., and Chhabra, A., *Improved J48 Classification Algorithm for the Prediction of Diabetes*. International Journal of Computer Applications, 2014. 98(22): p. 4.
294. Bansal, N., et al., *The utility of preoperative endometrial sampling for the detection of uterine sarcomas*. Gynecol Oncol, 2008. 110(1): p. 43-8.
295. Major, F.J., et al., *Prognostic factors in early-stage uterine sarcoma. A Gynecologic Oncology Group study*. Cancer, 1993. 71(4 Suppl): p. 1702-9.
296. Leibsohn, S., et al., *Leiomyosarcoma in a series of hysterectomies performed for presumed uterine leiomyomas*. Am J Obstet Gynecol, 1990. 162(4): p. 968-74; discussion 974-6.
297. Larson, B., et al., *Prognostic factors in uterine leiomyosarcoma. A clinical and histopathological study of 143 cases. The Radiumhemmet series 1936-1981*. Acta Oncol, 1990. 29(2): p. 185-91.
298. Harlow, B.L., N.S. Weiss, and S. Lofton, *The epidemiology of sarcomas of the uterus*. J Natl Cancer Inst, 1986. 76(3): p. 399-402.
299. Kaur, K., et al., *Uterine leiomyosarcoma: A case report*. J Midlife Health, 2014. 5(4): p. 202-4.
300. Gockley, A.A., J.A. Rauh-Hain, and M.G. del Carmen, *Uterine leiomyosarcoma: a review article*. Int J Gynecol Cancer, 2014. 24(9): p. 1538-42.
301. Brolmann, H., et al., *Options on fibroid morcellation: a literature review*. Gynecol Surg, 2015. 12(1): p. 3-15.
302. D'Angelo, E. and J. Prat, *Uterine sarcomas: a review*. Gynecol Oncol, 2009. 116(1): p. 131-9.
303. Goto, A., et al., *Usefulness of Gd-DTPA contrast-enhanced dynamic MRI and serum determination of LDH and its isozymes in the differential diagnosis of leiomyosarcoma from degenerated leiomyoma of the uterus*. Int J Gynecol Cancer, 2002. 12(4): p. 354-61.
304. Juang, C.M., et al., *Potential role of preoperative serum CA125 for the differential diagnosis between uterine leiomyoma and uterine leiomyosarcoma*. Eur J Gynaecol Oncol, 2006. 27(4): p. 370-4.
305. Denschlag, D., et al., *Prognostic factors and outcome in women with uterine sarcoma*. Eur J Surg Oncol, 2007. 33(1): p. 91-5.
306. Salazar, O.M. and M.E. Dunne, *The role of radiation therapy in the management of uterine sarcomas*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1980. 6(7): p. 899-902.
307. Gadducci, A., et al., *The prognostic relevance of histological type in uterine sarcomas: a Cooperation Task Force (CTF) multivariate analysis of 249 cases*. Eur J Gynaecol Oncol, 2002. 23(4): p. 295-9.
308. Levenback, C., et al., *Resection of pulmonary metastases from uterine sarcomas*. Gynecol Oncol, 1992. 45(2): p. 202-5.
309. Lusby, K., et al., *Uterine leiomyosarcoma management, outcome, and associated molecular biomarkers: a single institution's experience*. Ann Surg Oncol, 2013. 20(7): p. 2364-72.
310. Barter, J.F., et al., *Leiomyosarcoma of the uterus: clinicopathologic study of 21 cases*. Gynecol Oncol, 1985. 21(2): p. 220-7.

311. Evans, H.L., et al., *Smooth muscle neoplasms of the uterus other than ordinary leiomyoma. A study of 46 cases, with emphasis on diagnostic criteria and prognostic factors.* Cancer, 1988. 62(10): p. 2239-47.
312. O'Neill, C.J., et al., *Uterine leiomyosarcomas are characterized by high p16, p53 and MIB1 expression in comparison with usual leiomyomas, leiomyoma variants and smooth muscle tumours of uncertain malignant potential.* Histopathology, 2007. 50(7): p. 851-8.
313. Sprogøe-Jakobsen, S. and B. Holund, *Immunohistochemistry (Ki-67 and p53) as a tool in determining malignancy in smooth muscle neoplasms (exemplified by a myxoid leiomyosarcoma of the uterus).* APMIS, 1996. 104(10): p. 705-8.
314. Amada, S., H. Nakano, and M. Tsuneyoshi, *Leiomyosarcoma versus bizarre and cellular leiomyomas of the uterus: a comparative study based on the MIB-1 and proliferating cell nuclear antigen indices, p53 expression, DNA flow cytometry, and muscle specific actins.* Int J Gynecol Pathol, 1995. 14(2): p. 134-42.
315. Mayerhofer, K., et al., *Ki-67 expression in patients with uterine leiomyomas, uterine smooth muscle tumors of uncertain malignant potential (STUMP) and uterine leiomyosarcomas (LMS).* Acta Obstet Gynecol Scand, 2004. 83(11): p. 1085-8.
316. Bodner, K., et al., *Bcl-2 receptor expression in patients with uterine smooth muscle tumors: an immunohistochemical analysis comparing leiomyoma, uterine smooth muscle tumor of uncertain malignant potential, and leiomyosarcoma.* J Soc Gynecol Investig, 2004. 11(3): p. 187-91.
317. Kokawa, K., et al., *Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in hyperplasia and adenocarcinoma of the uterine endometrium.* Hum Reprod, 2001. 16(10): p. 2211-8.
318. Linjawi, A., et al., *Prognostic significance of p53, Bcl-2, and Bax expression in early breast cancer.* J Am Coll Surg, 2004. 198(1): p. 83-90.
319. Saleh, H.A., et al., *Correlation of Bcl-2 oncoprotein immunohistochemical expression with proliferation index and histopathologic parameters in colorectal neoplasia.* Pathol Oncol Res, 1999. 5(4): p. 273-9.
320. Schiller, A.B., et al., *Image cytometric Bcl-2:Bax and Bcl-2:bcl-x ratios in invasive breast carcinoma: correlation with prognosis.* Cytometry, 2002. 50(4): p. 203-9.
321. Castle, V.P., et al., *Expression of the apoptosis-suppressing protein Bcl-2, in neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification.* Am J Pathol, 1993. 143(6): p. 1543-50.
322. Frenzel, A., et al., *Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer.* Apoptosis, 2009. 14(4): p. 584-96.
323. Yip, K.W. and J.C. Reed, *Bcl-2 family proteins and cancer.* Oncogene, 2008. 27(50): p. 6398-406.
324. Hewedi, I.H., N.A. Radwan, and L.S. Shash, *Diagnostic value of progesterone receptor and p53 expression in uterine smooth muscle tumors.* Diagn Pathol, 2012. 7: p. 1.
325. de Vos, S., et al., *p53 alterations in uterine leiomyosarcomas versus leiomyomas.* Gynecol Oncol, 1994. 54(2): p. 205-8.
326. Wang, M., Y. Xu, and T. Zhang, *[Smooth muscle neoplasms of the uterus--a 51 cases study].* Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 1996. 25(5): p. 263-5.
327. Petrovic, D., et al., *Expression of Ki-67, P53 and progesterone receptors in uterine smooth muscle tumors. Diagnostic value.* Coll Antropol, 2010. 34(1): p. 93-7.

328. Hall, K.L., et al., *Analysis of Ki-ras, p53, and MDM2 genes in uterine leiomyomas and leiomyosarcomas*. *Gynecol Oncol*, 1997. 65(2): p. 330-5.
329. Mills, A.M., et al., *Cell cycle regulatory markers in uterine atypical leiomyoma and leiomyosarcoma: immunohistochemical study of 68 cases with clinical follow-up*. *Am J Surg Pathol*, 2013. 37(5): p. 634-42.
330. Allen, M.M., et al., *An immunohistochemical analysis of stathmin 1 expression in uterine smooth muscle tumors: differential expression in leiomyosarcomas and leiomyomas*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. 8(3): p. 2795-801.
331. Anderson, S.E., et al., *p53, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in uterine leiomyosarcoma and leiomyomas*. *Int J Gynecol Cancer*, 2006. 16(2): p. 849-53.
332. Rao, U.N., S.D. Finkelstein, and M.W. Jones, *Comparative immunohistochemical and molecular analysis of uterine and extrauterine leiomyosarcomas*. *Mod Pathol*, 1999. 12(11): p. 1001-9.
333. Mori, T., et al., *Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK4I (multiple tumor suppressor/cyclin-dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma*. *Cancer Res*, 1994. 54(13): p. 3396-7.
334. Caldas, C., et al., *Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma*. *Nat Genet*, 1994. 8(1): p. 27-32.
335. Hakverdi, S., et al., *Immunohistochemical analysis of p16 expression in uterine smooth muscle tumors*. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2011. 32(5): p. 513-5.
336. Unver, N.U., et al., *Differential expression of P16 and P21 in benign and malignant uterine smooth muscle tumors*. *Arch Gynecol Obstet*, 2010. 284(2): p. 483-90.
337. Gannon, B.R., M. Manduch, and T.J. Childs, *Differential Immunoreactivity of p16 in leiomyosarcomas and leiomyoma variants*. *Int J Gynecol Pathol*, 2008. 27(1): p. 68-73.
338. Dobashi, Y., et al., *CDK-inhibitors-associated kinase activity: a possible determinant of malignant potential in smooth muscle tumors of the external soft tissue*. *Int J Cancer*, 2001. 94(3): p. 353-62.
339. Palazzo, J.P., et al., *Immunohistochemical localization of p21(WAF1/CIP1) in normal, hyperplastic, and neoplastic uterine tissues*. *Hum Pathol*, 1997. 28(1): p. 60-6.
340. Catzavelos, C., et al., *Reduced expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in non-small cell lung carcinoma: a prognostic factor independent of Ras*. *Cancer Res*, 1999. 59(3): p. 684-8.
341. Bales, E.S., et al., *High levels of expression of p27KIP1 and cyclin E in invasive primary malignant melanomas*. *J Invest Dermatol*, 1999. 113(6): p. 1039-46.
342. Eymin, B., et al., *p27Kip1 induces drug resistance by preventing apoptosis upstream of cytochrome c release and procaspase-3 activation in leukemic cells*. *Oncogene*, 1999. 18(7): p. 1411-8.
343. Wouters, B.G., et al., *Loss of p21Waf1/Cip1 sensitizes tumors to radiation by an apoptosis-independent mechanism*. *Cancer Res*, 1997. 57(21): p. 4703-6.
344. Comunoglu, N.U., et al., *Expression of cyclooxygenase-2, c-kit, progesterone and estrogen receptors in uterine smooth muscle tumors: differential diagnosis*. *APMIS*, 2007. 115(6): p. 726-35.
345. Raspollini, M.R., et al., *c-Kit expression in patients with uterine leiomyosarcomas: a potential alternative therapeutic treatment*. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(10): p. 3500-3.

346. Serrano, C., et al., *Imatinib is not a potential alternative treatment for uterine leiomyosarcoma*. Clin Cancer Res, 2005. 11(13): p. 4977-9; author reply 4979-80.
347. Rushing, R.S., et al., *Uterine sarcomas express KIT protein but lack mutation(s) in exon 11 or 17 of c-KIT*. Gynecol Oncol, 2003. 91(1): p. 9-14.
348. Liang, M., et al., *Expression and functional analysis of platelet-derived growth factor in uterine leiomyomata*. Cancer Biol Ther, 2006. 5(1): p. 28-33.
349. Hwu, Y.M., et al., *Increased expression of platelet-derived growth factor C messenger ribonucleic acid in uterine leiomyomata*. Fertil Steril, 2008. 89(2): p. 468-71.
350. Sarfstein, R., et al., *Metformin downregulates the insulin/IGF-I signaling pathway and inhibits different uterine serous carcinoma (USC) cells proliferation and migration in p53-dependent or -independent manners*. PLoS One, 2013. 8(4): p. e61537.
351. Attias-Geva, Z., et al., *p53 Regulates insulin-like growth factor-I receptor gene expression in uterine serous carcinoma and predicts responsiveness to an insulin-like growth factor-I receptor-directed targeted therapy*. Eur J Cancer, 2011. 48(10): p. 1570-80.
352. Dixon, D., H. He, and J.K. Haseman, *Immunohistochemical localization of growth factors and their receptors in uterine leiomyomas and matched myometrium*. Environ Health Perspect, 2000. 108 Suppl 5: p. 795-802.
353. Burroughs, K.D., et al., *Dysregulation of IGF-I signaling in uterine leiomyoma*. J Endocrinol, 2002. 172(1): p. 83-93.
354. Giudice, L.C., et al., *Insulin-like growth factor (IGF), IGF binding protein (IGFBP), and IGF receptor gene expression and IGFBP synthesis in human uterine leiomyomata*. Hum Reprod, 1993. 8(11): p. 1796-806.
355. Yu, L., et al., *Differential expression of receptor tyrosine kinases (RTKs) and IGF-I pathway activation in human uterine leiomyomas*. Mol Med, 2008. 14(5-6): p. 264-75.
356. Van der Ven, L.T., et al., *Expression of insulin-like growth factors (IGFs), their receptors and IGF binding protein-3 in normal, benign and malignant smooth muscle tissues*. Br J Cancer, 1997. 75(11): p. 1631-40.
357. Amant, F., et al., *ERBB-2 gene overexpression and amplification in uterine sarcomas*. Gynecol Oncol, 2004. 95(3): p. 583-7.
358. Tian, W., et al., *Prognostic role of E-cadherin and Vimentin expression in various subtypes of soft tissue leiomyosarcomas*. Med Oncol, 2013. 30(1): p. 401.
359. Gogou, P.N., et al., *Expression of E-cadherin, beta-catenin and topoisomerase IIalpha in leiomyosarcomas*. Clin Transl Oncol, 2009. 11(8): p. 548-51.
360. Yang, J., et al., *Integrated proteomics and genomics analysis reveals a novel mesenchymal to epithelial reverting transition in leiomyosarcoma through regulation of slug*. Mol Cell Proteomics, 2010. 9(11): p. 2405-13.
361. Kildal, W., et al., *Beta-catenin expression in uterine sarcomas and its relation to clinicopathological parameters*. Eur J Cancer, 2009. 45(13): p. 2412-7.
362. Dhingra, S., et al., *Constitutive activation with overexpression of the mTORC2-phospholipase D1 pathway in uterine leiomyosarcoma and STUMP: morphoproteomic analysis with therapeutic implications*. Int J Clin Exp Pathol, 2010. 4(2): p. 134-46.
363. Hernando, E., et al., *The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas*. Nat Med, 2007. 13(6): p. 748-53.

364. Gokaslan, H., et al., *Differential diagnosis of smooth muscle tumors utilizing p53, pTEN and Ki-67 expression with estrogen and progesterone receptors*. Gynecol Obstet Invest, 2005. 59(1): p. 36-40.
365. Hewedi, I.H., N.A. Radwan, and L.S. Shash, *Diagnostic value of progesterone receptor and p53 expression in uterine smooth muscle tumors*. Diagn Pathol. 7: p. 1.
366. Watanabe, K. and T. Suzuki, *Uterine leiomyoma versus leiomyosarcoma: a new attempt at differential diagnosis based on their cellular characteristics*. Histopathology, 2006. 48(5): p. 563-8.
367. Palomba, S., et al., *Effectiveness of combined GnRH analogue plus raloxifene administration in the treatment of uterine leiomyomas: a prospective, randomized, single-blind, placebo-controlled clinical trial*. Hum Reprod, 2002. 17(12): p. 3213-9.
368. Whitney, C.W., et al., *Phase II study of medroxyprogesterone acetate plus tamoxifen in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study*. Gynecol Oncol, 2004. 92(1): p. 4-9.
369. Thanopoulou, E., et al., *Treatment of hormone positive uterine leiomyosarcoma with aromatase inhibitors*. Clin Sarcoma Res, 2014. 4: p. 5.
370. George, S., et al., *Phase 2 trial of aromatase inhibition with letrozole in patients with uterine leiomyosarcomas expressing estrogen and/or progesterone receptors*. Cancer, 2014. 120(5): p. 738-43.
371. Poncelet, C., et al., *Prognostic value of von Willebrand factor, CD34, CD31, and vascular endothelial growth factor expression in women with uterine leiomyosarcomas*. J Surg Oncol, 2004. 86(2): p. 84-90.
372. Avdalyan, A., et al., *Prognostic Value of Microvessel Density in Tumor and Peritumoral Area as Evaluated by CD31 Protein Expression and Argyrophilic Nucleolar Organizer Region Count in Endothelial Cells in Uterine Leiomyosarcoma*. Sarcoma. 2012: p. 594512.
373. Bobinski, M., et al., *Microvessels Density in Uterine Leiomyosarcoma*. Biomed Res Int, 2015. 2015: p. 475305.
374. Sun, B., et al., *Vasculogenic mimicry is associated with poor survival in patients with mesothelial sarcomas and alveolar rhabdomyosarcomas*. Int J Oncol, 2004. 25(6): p. 1609-14.
375. McMeekin, D.S., et al., *A phase II trial of thalidomide in patients with refractory leiomyosarcoma of the uterus and correlation with biomarkers of angiogenesis: a gynecologic oncology group study*. Gynecol Oncol, 2007. 106(3): p. 596-603.
376. Hensley, M.L., et al., *Sunitinib malate in the treatment of recurrent or persistent uterine leiomyosarcoma: a Gynecologic Oncology Group phase II study*. Gynecol Oncol, 2009. 115(3): p. 460-5.
377. Poncelet, C., et al., *Expression of CD44 standard and isoforms V3 and V6 in uterine smooth muscle tumors: a possible diagnostic tool for the diagnosis of leiomyosarcoma*. Hum Pathol, 2001. 32(11): p. 1190-6.
378. Mas, A., et al., *Identification and characterization of the human leiomyoma side population as putative tumor-initiating cells*. Fertil Steril, 2012. 98(3): p. 741-751 e6.
379. Tai, M.H., et al., *Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2005. 26(2): p. 495-502.

380. Mas, A., et al., *Current understanding of somatic stem cells in leiomyoma formation*. Fertil Steril, 2014. 102(3): p. 613-20.
381. Levy, B., T. Mukherjee, and K. Hirschhorn, *Molecular cytogenetic analysis of uterine leiomyoma and leiomyosarcoma by comparative genomic hybridization*. Cancer Genet Cytogenet, 2000. 121(1): p. 1-8.
382. Ligon, A.H. and C.C. Morton, *Genetics of uterine leiomyomata*. Genes Chromosomes Cancer, 2000. 28(3): p. 235-45.
383. Custer, B.S., T.D. Koepsell, and B.A. Mueller, *The association between breast carcinoma and meningioma in women*. Cancer, 2002. 94(6): p. 1626-35.
384. Lee, E., et al., *Association of meningioma with reproductive factors*. Int J Cancer, 2006. 119(5): p. 1152-7.
385. Yen, Y.S., et al., *Higher risk for meningioma in women with uterine myoma: a nationwide population-based retrospective cohort study*. J Neurosurg, 2014. 120(3): p. 655-61.
386. Bowden, W., et al., *Detection of novel copy number variants in uterine leiomyomas using high-resolution SNP arrays*. Mol Hum Reprod, 2009. 15(9): p. 563-8.
387. Tao, W., et al., *Wrch-1, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1*. Genes Dev, 2001. 15(14): p. 1796-807.
388. Kirikoshi, H. and M. Katoh, *Expression of WRCH1 in human cancer and down-regulation of WRCH1 by beta-estradiol in MCF-7 cells*. Int J Oncol, 2002. 20(4): p. 777-83.
389. Meadows, K.L., et al., *Genome-wide analysis of loss of heterozygosity and copy number amplification in uterine leiomyomas using the 100K single nucleotide polymorphism array*. Exp Mol Pathol, 2011. 91(1): p. 434-9.
390. Mestizo Gutierrez, S.L., et al., *Decision trees for the analysis of genes involved in Alzheimer's disease pathology*. J Theor Biol, 2014. 357: p. 21-5.
391. Putora, P.M., et al., *Objective consensus from decision trees*. Radiat Oncol, 2014. 9: p. 270.