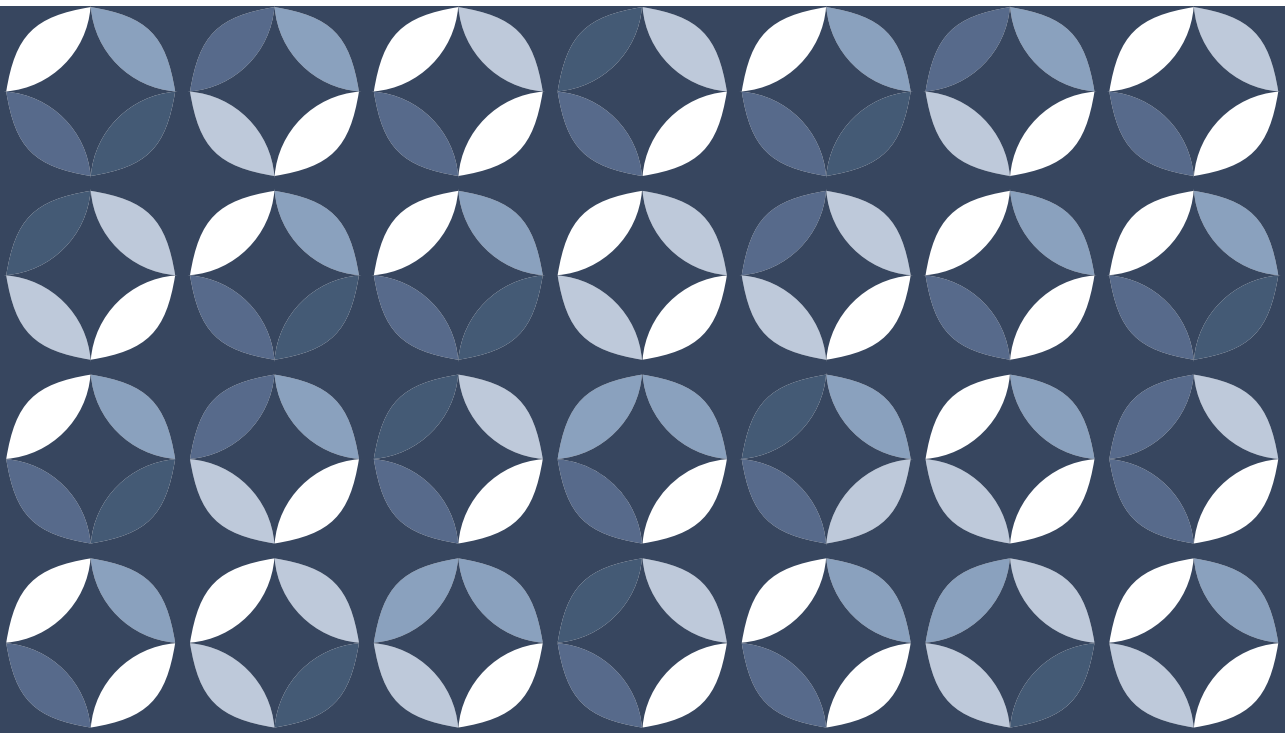


FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO TERAPÉUTICO DEL COMPUESTO BO-110 EN UN MODELO ANIMAL DE LEIOMIOMA

TESIS DOCTORAL

Irene Juárez Pallarés



DIRECTORES

Dr. Raúl Gómez Gallego

Prof. Antonio Pellicer Martínez

PROGRAMA DE DOCTORADO 3139 MEDICINA

ENERO 2023





FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTO TERAPÉUTICO
DEL COMPUESTO BO-110
EN UN MODELO ANIMAL
DE LEIOMIOMA**

TESIS DOCTORAL
Irene Juárez Pallarés

DIRECTORES
Dr. Raúl Gómez Gallego
Prof. Antonio Pellicer Martínez

PROGRAMA DE DOCTORADO 3139 MEDICINA
ENERO 2023

VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Dr. Raúl Gómez Gallego, Doctor por la Universidad de Valencia, profesor asociado en la Universidad de Valencia e Investigador consolidado en INCLIVA.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: “Efecto terapéutico del compuesto BO-110 en un modelo animal de leiomioma” ha sido realizado íntegramente por **Irene Juárez Pallarés** bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 9 de enero de 2023.

Fdo. Dr. Raúl Gómez Gallego

VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Prof. Antonio Pellicer Martínez, Catedrático en Obstetricia y Ginecología, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, fundador del Instituto Valenciano de Infertilidad y presidente de la Fundación IVI.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: “Efecto terapéutico del compuesto BO-110 en un modelo animal de leiomioma” ha sido realizado íntegramente por **Irene Juárez Pallarés** bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 9 de enero de 2023.

Fdo. Dr. Antonio Pellicer Martínez

El presente proyecto de tesis doctoral ha sido realizado gracias a la colaboración del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia y los laboratorios del departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias al esfuerzo, apoyo y cariño de muchas personas a las que quisiera reconocer su contribución en estas líneas.

En primer lugar, me gustaría dar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, pues sin ellos este trabajo habría sido completamente imposible. Gracias al **Prof. Pellicer** por su confianza al ofrecerme la oportunidad de participar en su grupo de investigación y poder así realizar esta tesis. Gracias a la ayuda, cercanía, disponibilidad y motivación del **Dr. Raúl Gómez**, que me ha permitido finalizar esta tesis doctoral y desarrollarme como investigadora.

A la **Dra. Carmen María Pascual** por todo el trabajo realizado y por acogerme como una más, enseñándome las bases del trabajo de laboratorio.

A mis compañeros y amigos de **Ginecología del Hospital La Fe** por su ayuda y paciencia, en especial al Dr. Vicente Payá, mi mentor, que me ha enseñado tantas cosas.

A mis amigas y compañeras de guardia, **Marta y Julia**. Gracias por vuestro apoyo, por el gran equipo que hacemos las tres y por todos los momentos divertidos que vivimos.

A **mis padres, Carmen y Servando**, por ser mis referentes y por animarme siempre a perseguir mis sueños. A **mis hermanas Cristina y Alicia**, y a **mi prima Violeta**, por su cariño y apoyo incondicional.

A **mis amigos**, a todos ellos, por estar siempre ahí, especialmente a mis amigas del colegio (Marta, Amparo, Ana, María, Amaia y Patri) y de la facultad, así como a Miriam y Nuria, dos personas fundamentales en mi vida.

Y sobre todo a mi pareja, **Carlos**, por acompañarme y respaldarme durante toda esta etapa y transmitirme siempre tanto amor.

En Valencia, a enero de 2023

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	22
1.1. CONCEPTO	23
1.2. EPIDEMIOLOGÍA	23
1.3. FACTORES DE RIESGO	25
1.4. COSTES SOCIOECONÓMICOS	31
1.5. FISIOPATOLOGÍA	32
1.5.1. Células madre	33
1.5.2. Factores paracrinos y hormonales	33
1.5.3. Alteraciones genéticas	35
1.5.4. Factores vasculares y angiogénicos	36
1.5.5. Factores fibróticos	37
1.6. CLASIFICACIÓN	39
1.7. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	41
1.8. DIAGNÓSTICO	45
1.8.1. Diagnóstico clínico	46
1.8.2. Exploración física	46
1.8.3. Técnicas de imagen	47
1.8.4. Histeroscopia	51
1.8.5. Histología	52
1.8.6. Biomarcadores	53
1.9. TRATAMIENTO	53
1.9.1. Manejo expectante	54
1.9.2. Tratamiento médico	55
1.9.2.1. Tratamiento no hormonal	55
1.9.2.2. Anticoncepción hormonal combinada	56
1.9.2.3. Progestágenos	57
1.9.2.4. Análogos de la hormona liberadora de Gonadotropinas (aGnRH)	58
1.9.2.5. Moduladores Selectivos de los Receptores de la Progesterona (SPRM)	59
1.9.2.6. Inhibidores de la aromataasa	61
1.9.2.7. Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógenos (SERM)	61
1.9.2.8. Otros fármacos	61
1.9.3. Tratamiento quirúrgico	62
1.9.3.1. Miomectomía	62
1.9.3.2. Histerectomía	64
1.9.3.3. Ablación endometrial	65
1.9.4. Tratamientos alternativos	65
1.9.4.1. Embolización de las arterias uterinas	65
1.9.4.2. Miólisis	67
1.10. VASCULARIZACIÓN Y ANGIOGÉNESIS DEL ÚTERO Y LOS MIOMAS	68
1.10.1. La vascularización uterina	68
1.10.2. La vascularización de los miomas	70
1.10.3. La angiogénesis	71
1.10.3.1. La angiogénesis en los miomas	73
1.10.3.2. Terapias antiangiogénicas y miomas	76
1.11. ÁCIDO POLIINOSINA-POLICITIDÍLICO	79
1.12. MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LOS MIOMAS	83
1.13. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	85
2. HIPÓTESIS	86
3. OBJETIVOS	88
4. MATERIAL Y MÉTODOS	90
4.1. ÁMBITO DEL ESTUDIO	91
4.2. DISEÑO DEL ESTUDIO	91
4.3. OBTENCIÓN DE TEJIDO DE LEIOMIOMA Y MIOMETRIO HUMANO	93
4.4. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE [pICPEI] EN CÉLULAS DE LEIOMIOMA <i>IN VITRO</i>	94
4.4.1. Cultivo primario de células de leiomioma y miometriales normales	94
4.4.2. Tratamiento con [pICPEI] y ensayos de muerte celular	95
4.5. GENERACIÓN DE UN MODELO MURINO HETERÓLOGO DE LEIOMIOMA	96
4.5.1. Adquisición y procesado de los fragmentos de leiomioma humano	96
4.5.2. Preparación de los animales receptores	96
4.5.3. Implantación del tejido en los animales receptores	98
4.5.4. Intervenciones farmacológicas	99
4.5.5. Sacrificio de los animales y recuperación de los implantes	99
4.6. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE [pICPEI] SOBRE LOS IMPLANTES DE LEIOMIOMA MEDIANTE MÉTODOS DE INMUNOTINCIÓN	100
4.6.1. Procedimientos de inmunotinción	100
4.6.2. Detección de la proliferación celular	105
4.6.3. Detección de la vascularización	106
4.6.4. Detección de la apoptosis	107
4.6.5. Adquisición y análisis de datos de las imágenes microscópicas	111
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	112
5. RESULTADOS	114
5.1. ENSAYO DE MUERTE CELULAR <i>IN VITRO</i>	115
5.2. EFECTOS DEL TRATAMIENTO SOBRE EL TAMAÑO Y ASPECTO MACROSCÓPICO DE LAS LESIONES	116
5.3. EFECTOS DEL TRATAMIENTO EVALUADOS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOHISTOQUÍMICA	118
5.3.1. Análisis inmunofluorescente cuantitativo de la vascularización en los implantes de leiomioma	119
5.3.2. Análisis inmunohistoquímico cuantitativo de la proliferación celular en los implantes de leiomioma	121
5.3.3. Análisis inmunofluorescente cuantitativo de la apoptosis en los implantes de leiomioma	122
6. DISCUSIÓN	124
7. CONCLUSIONES	136
8. BIBLIOGRAFÍA	138

LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

(NOD)-SCID: *Non-obese diabetic severe combined immunodeficient*

3D: Tridimensional

ABC: Complejo Avidina-Biotina

ADM: Adrenomedulina

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

aGnRH: Análogos de la GnRH

AINE: Antiinflamatorios no esteroideos

AUP: Acetato de ulipristal

bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico

CA-125: Antígeno de cáncer 125

CD31: *Cluster of differentiation 31*

CLR: *Calcitonin receptor-like receptor*

COL4A5: Colágeno tipo IV $\alpha 5$

COL4A6: Colágeno tipo IV $\alpha 6$

DIU-LNG: Dispositivo intrauterino liberador de levonorgestrel

DIU: Dispositivo intrauterino

dUTP: Desoxiuridina trifosfato

EAU: Embolización de las arterias uterinas

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

FDA: *Food and Drug Administration*

FH: Fumarato hidratasa

FIGO: *International Federation of Gynecology and Obstetrics*

FSH: Hormona foliculoestimulante

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

HB-EGF: Factor de crecimiento ligado a heparina

HIF-1 α : Factor inducible por hipoxia 1 α

HIFU: Ablación con ultrasonido focalizado de alta intensidad

HLA: Antígeno leucocitario humano

HLRCC: Leiomiomatosis hereditaria y cáncer de células renales

HMGA2: *High mobility group AT-hook 2*

HSV1TK: *Herpes simplex virus 1 thymidine kinase gene*

HTA: Hipertensión arterial

IF: Inmunofluorescencia

IFN- β : Interferón-beta

IHQ: Inmunohistoquímica

IMC: Índice de masa corporal

JZ: *Junctional zone*

LDH: Lactato deshidrogenasa

LH: Hormona luteinizante

MDA5: Proteína 5 asociada a la diferenciación de melanoma

MEC: Matriz extracelular

MED12: *Mediator Complex Subunit 12*

MRgFUS: Ultrasonido focalizado guiado por resonancia magnética nuclear

MUSA: *Morphological Uterus Sonographic Assessment*

NIEHS: *National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)*

NK: *Natural killer*

OCT: *Optimal cutting temperature*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAP: Peroxidasa-antiperoxidasa

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PECAM: *Platelet endothelial cell adhesion molecule*

PEI: Polietilenimina

pIC o PolyI:C: Ácido poliinosina-policitidílico

PRAC: *Pharmacovigilance Risk Assessment Committee*

RE: Receptor estrogénico

RMN: Resonancia magnética nuclear

RP: Receptor de progesterona

SCID: *Severe combined immunodeficient*

SERM: Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógenos

SHBG: Hormona transportadora de hormonas sexuales

SMA: Sangrado menstrual abundante

SPRM: Moduladores Selectivos de los Receptores de la Progesterona

TdT: Desoxinucleotidil transferasa terminal

TGF β 3: Factor de crecimiento transformante β 3

TLR3: Receptor tipo toll-3

TMR-dUTP: Tetrametilrodamina-dUTP

TRA: Técnica de reproducción asistida

Tsc2: Complejo de la esclerosis tuberosa 2

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*

UE: Unión Europea

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

vNOTES: *Transvaginal natural orifice transluminal endoscopic surgery*

VPP: Valor predictivo positivo

α -**SMA:** *Alpha Smooth Muscle Actin*

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1.

Factores de riesgo de los miomas.

FIGURA 2.

Tasa de incidencia de miomas en diferentes poblaciones.

FIGURA 3.

Interacción paracrina entre las células de mioma.

FIGURA 4.

Resumen de la patogenia de los miomas uterinos.

FIGURA 5.

Clasificación de los miomas con el sistema FIGO.

FIGURA 6.

Clasificación SETPW de los miomas submucosos.

FIGURA 7.

Manifestaciones clínicas.

FIGURA 8.

Imagen ecográfica de un mioma tipo 2 en escala de grises (A). Imagen de un mioma tipo 0 visualizado con ecografía 3D (B).

FIGURA 9.

Características ecográficas de los miomas.

FIGURA 10.

Imagen ecográfica de un mioma submucoso tipo 2 visualizado mediante histerosonografía.

FIGURA 11.

Miomas visualizados mediante RMN.

FIGURA 12.

Imagen de un mioma tipo 0 visualizado por histeroscopia.

FIGURA 13.

Hallazgos histológicos de los miomas.

FIGURA 14.

Estrategias actuales en el manejo de los miomas uterinos.

FIGURA 15.

Miomectomía laparoscópica.

FIGURA 16.

Embolización de las arterias uterinas.

FIGURA 17.

Vascularización del útero.

FIGURA 18.

Vascularización de los miomas visualizada mediante ecografía *Doppler*.

FIGURA 19.

La angiogénesis en el ciclo ovárico.

FIGURA 20.

Cambios en la expresión de los factores de crecimiento angiogénicos y sus receptores en los miomas en comparación con el resto del miometrio.

FIGURA 21.

Patogénesis de la vascularización de los miomas.

FIGURA 22.

Diferencias morfológicas entre un vaso inmaduro y maduro.

FIGURA 23.

Estructura del ácido poliinosina-policitidílico.

FIGURA 24.

Modelo propuesto de cómo [pICPEI] induce actividad antimelanoma.

FIGURA 25.

Diseño del estudio.

FIGURA 26.

Células teñidas con azul de tripano.

FIGURA 27.

Ratón de la cepa *Crl:CD1-Foxn1tm*.

FIGURA 28.

Métodos Inmunohistoquímicos y de Inmunofluorescencia.

FIGURA 29.

Inmunohistoquímica con marcaje directo (A) o indirecto (B).

FIGURA 30.

Método del Complejo Avidina-Biotina (ABC) (A) y método PAP (B).

FIGURA 31.

Esquema de la reacción de la Inmunofluorescencia.

FIGURA 32.

Expresión de Ki67 en diferentes fases del ciclo celular.

FIGURA 33.

Etapas de la muerte celular por apoptosis.

FIGURA 34.

Fundamento TUNEL.

FIGURA 35.

Evaluación de los efectos proapoptóticos del tratamiento con [pICPEI] sobre la supervivencia de las células de leiomioma y miometrio cultivadas *in vitro*.

FIGURA 36.

Efecto de [pICPEI] sobre las características macroscópicas de los implantes de leiomioma en la pared peritoneal de las ratonas.

FIGURA 37.

Tamaño medio de los implantes de leiomioma (mm²) antes y después del tratamiento.

FIGURA 38.

Efecto del tratamiento de [pICPEI] sobre la neoangiogénesis de los implantes de leiomioma mediante tinción PECAM comparando ambos grupos de tratamiento.

FIGURA 39.

Análisis cuantitativo del área teñida con PECAM en ambos grupos de tratamiento.

FIGURA 40.

Efecto del tratamiento con [pICPEI] sobre la proliferación celular en los implantes de leiomioma comparando ambos grupos de tratamiento.

FIGURA 41.

Análisis cuantitativo de la proliferación celular en ambos grupos de tratamiento.

FIGURA 42.

Efecto del tratamiento con [pICPEI] sobre la apoptosis en los implantes de leiomioma comparando ambos grupos de tratamiento.

FIGURA 43.

Análisis cuantitativo de la apoptosis en ambos grupos de tratamiento.

RESUMEN

Los miomas son los tumores benignos más frecuentes en las mujeres en edad reproductiva y pueden asociar numerosos síntomas como dolor, sangrado y problemas reproductivos. Sin embargo, actualmente no existe una terapia totalmente satisfactoria por lo que es de suma importancia la evaluación de nuevos tratamientos. En la búsqueda de opciones terapéuticas alternativas, hemos seleccionado el ácido poliinosina-policitídílico (pIC) conjugado con polietilenimina (PEI) [pICPEI], cuyo nombre comercial es BO-100. El compuesto pIC es un ARN sintético de doble cadena sin toxicidad asociada, que induce de manera selectiva la autofagia y apoptosis en un gran espectro de células tumorales. Presenta una amplia eficacia en diversas enfermedades neoplásicas, aunque su efecto en células tumorales benignas como los miomas es desconocido. Por lo que el objetivo de este estudio es evaluar el efecto de [pICPEI] sobre el tamaño de los miomas, la proliferación celular, la apoptosis y la angiogénesis.

Para la consecución de nuestro objetivo pusimos a punto un modelo animal de leiomioma para poder testar *in vivo* el funcionamiento del fármaco. Previamente, realizamos un estudio *in vitro* donde evidenciamos un efecto selectivo de [pICPEI] sobre células de mioma sin afectar a las células de miometrio sano. Para el modelo *in vivo*, empleamos ratonas *nude*, inmunodeprimidas, atímicas, de cinco semanas de edad (n=48) a las que se les practicó una ooforectomía y recibieron reemplazo hormonal mediante una cápsula de liberación lenta de 0,05 mg de 17 β -estradiol

y 50 mg de progesterona. Tras esto, se procedió a la implantación de cuatro fragmentos de 3-5mm³ de mioma en el peritoneo de los animales y estos fueron divididos en dos grupos (control y tratamiento) recibiendo vehículo o 0,6 mg/kg de [pICPEI] durante cuatro semanas. Al finalizar el tratamiento, los animales fueron sacrificados, se recuperaron los implantes y se calculó el tamaño de las lesiones. Posteriormente se evaluó la vascularización (con el anticuerpo PECAM, marcador de células endoteliales), la proliferación celular (con el anticuerpo Ki67) y la apoptosis (con el kit Apoptag®) mediante análisis inmunohistoquímico e inmunofluorescente cuantitativo. Las imágenes obtenidas mediante un microscopio óptico y de fluorescencia con una cámara digital acoplada fueron cuantificadas utilizando un *software* de análisis de imagen.

Demostramos un efecto antiangiogénico, proapoptótico y una disminución de la proliferación celular en las ratonas tratadas con el fármaco. Sin embargo, estos efectos no condujeron a una disminución del tamaño del implante, que era el objetivo principal de nuestro trabajo. Posiblemente esto sucedió porque se requiera un mayor tiempo de exposición al fármaco del que empleamos para obtener una reducción significativa de los implantes. Por ello creemos que debido a los efectos ejercidos por [pICPEI] sobre la angiogénesis, proliferación celular y apoptosis, si se administrase durante períodos de tiempo más prolongados podría conducir a una disminución del tamaño de las lesiones.

1 INTRODUCCIÓN

1.1. CONCEPTO

Los miomas uterinos, también conocidos como fibromas o leiomiomas, son tumores benignos monoclonales que se originan a partir de células de músculo liso y están rodeados por una pseudocápsula (Wu *et al.*, 2017). Se caracterizan por presentar un exceso de matriz extracelular (MEC) que incluye fibronectina, colágeno y proteoglicanos (Stewart *et al.*, 1994).

Su etiopatogenia, incidencia, historia natural y factores de riesgo no están completamente establecidos (Pavone *et al.*, 2018).

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

Los miomas son los tumores pélvicos benignos más frecuentes en la mujer (Parker, 2007), y son la causa más común de histerectomía en Estados Unidos (Farquhar & Steiner, 1997). Se estima que los miomas afectan a más del 70% de las mujeres al inicio de la menopausia (Baird *et al.*, 2003) y son clínicamente significativos en el 25% de las mujeres en edad reproductiva, pudiendo causar síntomas graves que requieran tratamiento hasta en el 25% de ellas (Stewart *et al.*, 2017).

Se desconoce la incidencia y la prevalencia real de los miomas debido a que una gran parte de las mujeres permanecen asintomáticas o solo presentan síntomas leves. Además, existe una gran disparidad en los resultados de los estudios publica-

dos, ya que se incluyen poblaciones heterogéneas y se emplean diferentes métodos diagnósticos (Stewart *et al.*, 2017). Algunas de las publicaciones más representativas sobre la prevalencia e incidencia de los miomas se describen a continuación:

- En un estudio donde analizaron 100 piezas de histerectomía, encontraron miomas en el 77% de ellas (Cramer & Patel, 1990).
- El estudio de *Nurses' Health Study II* observó que la incidencia de miomas, diagnosticados por ecografía o en la pieza de histerectomía, era de 9.2/100.000 mujeres y la prevalencia de un 30.6% en mujeres negras y 8.9% en mujeres blancas. También evidenciaron un incremento de la incidencia asociado a la edad (Marshall *et al.*, 1997).
- Un trabajo realizado en diferentes países de Europa, evaluó a 1756 mujeres con síntomas asociados a miomas confirmando su presencia en el 12-24% de ellas. Por otro lado, detectaron miomas en el 80% de las piezas de histerectomía. En el grupo de España, estimaron una prevalencia del 18.8% en mujeres de más de 18 años, sumándose un 19.1% adicional en aquellas pacientes con problemas de sangrados (Downes *et al.*, 2010).
- En 2017 se publica la primera revisión sistemática sobre epidemiología de los miomas, donde incluyen 60 artículos y estudian la prevalencia, la incidencia y los factores de riesgo asociados. El estudio mostró una gran disparidad entre las diferentes publicaciones, tanto en la prevalencia (4,5- 68.6%), como en la incidencia (217-3745 casos per 100.000 mujeres/año) (Stewart *et al.*, 2017).

1.3. FACTORES DE RIESGO

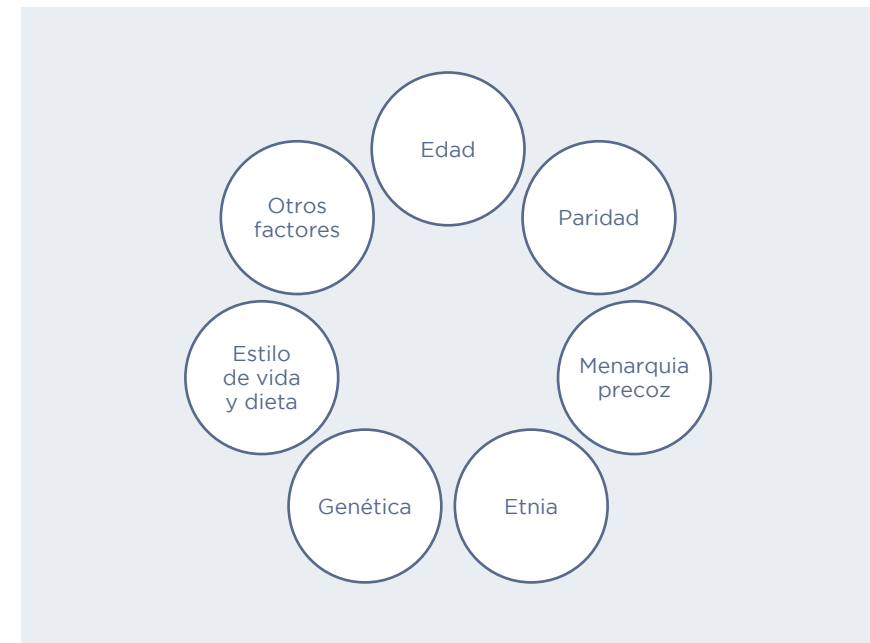


FIGURA 1
Factores de riesgo de los miomas.

Edad

La prevalencia y el número de miomas aumenta con la edad durante la época fértil (DeWaay *et al.*, 2002). El desarrollo de los miomas va ligado a las variaciones en las hormonas reproductivas, estrógeno y progesterona, por lo que no hay casos descritos antes de la menarquia y tras la menopausia, reducen su tamaño en la mayoría de los casos (Marshall *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 2017).

El crecimiento de los miomas se incrementa con la edad, aunque también está modulado por otros factores como la etnia. Las mujeres menores de 35 años presentan tasas de crecimiento similares, independientemente de la etnia. Sin embargo, las mayores de 45 años sí muestran diferencias, presentando las caucásicas una menor tasa de crecimiento y manteniendo las mujeres negras la misma tasa de crecimiento que las jóvenes (Peddada *et al.*, 2008).

Etnia

Es bien conocida la mayor prevalencia de miomas entre las mujeres negras, además, la aparición de estos es más precoz y se manifiestan con síntomas más graves (Wise *et al.*, 2004a).

En un estudio en el cual determinaron la prevalencia de los miomas mediante ecografía en mujeres nulíparas asintomáticas de 18 a 30 años, encontraron miomas en el 7% de las mujeres blancas y en el 26% de las negras (Marsh *et al.*, 2013). Estos datos son acordes a los resultados del *National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)*, donde analizan la incidencia de miomas según la edad de 1364 mujeres blancas y negras de entre 35 y 49 años, incluidas de manera aleatoria. El cribado se realizó también mediante ecografía y se detectaron miomas nuevos en el 59% de las pacientes negras frente al 43% de las pacientes blancas. Además, las pacientes negras eran más jóvenes que las blancas cuando se diagnosticaron (33 vs. 36 años). Por otro lado, observaron que la incidencia acumulada a los 50 años fue mayor del 80% para mujeres negras frente al 70% de las blancas (Baird *et al.*, 2003).

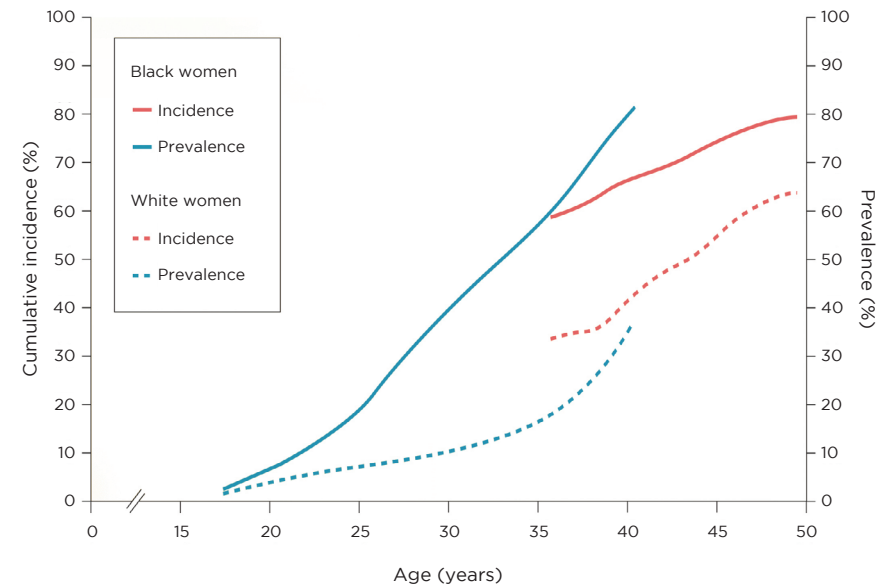


Imagen extraída de (Stewart *et al.*, 2016).

FIGURA 2.

Tasa de incidencia de miomas en diferentes poblaciones.

Las mujeres negras desarrollan los miomas a edades más tempranas y tienen una mayor incidencia acumulada de la enfermedad (línea roja continua) que las mujeres blancas (línea roja discontinua). Además, las mujeres negras (línea azul sólida) tienen una prevalencia más alta que las mujeres blancas (línea azul discontinua).

Menarquia precoz

La menarquia precoz está asociada a un aumento de riesgo de desarrollo de miomas (Marshall *et al.*, 1998). Las mujeres negras tienen la primera menstruación a edades más tempranas que las blancas, pudiendo ser este uno de los motivos por el cual desarrollan miomas más jóvenes y en mayor cantidad (Huyck *et al.*, 2008).

Paridad

La paridad está asociada a una disminución del riesgo de aparición de miomas (Donnez & Dolmans, 2016). Se ha mostrado que grandes multíparas con tres o más partos, tienen hasta cinco veces menos riesgo de desarrollar miomas (Sato *et al.*, 2002), sugiriendo que a mayor número de embarazos mayor es el efecto protector (Stewart *et al.*, 2017). Por el contrario, el retraso en la edad de la primera gestación hasta la tercera década, parece favorecer su aparición (Petraglia *et al.*, 2013).

Los mecanismos por los cuales la gestación ejerce su efecto protector no están completamente establecidos. Se postula que tras el parto se produce un remodelado uterino que conlleva una disminución del tamaño de los miomas, tanto los de pequeño (Baird *et al.*, 2003), como los de gran tamaño (Laughlin, Herring, *et al.*, 2010). También parece estar implicada la isquemia producida durante el parto (Burbank, 2004; Laughlin, Schroeder, *et al.*, 2010) y la disminución de estrógeno y progesterona durante el parto y postparto (Pavone *et al.*, 2018).

Genética e historia familiar

La historia familiar de miomas puede favorecer su aparición (Stewart *et al.*, 2017). En un estudio se observó una frecuencia 2.2 veces superior en las mujeres con parientes de primer grado con dos o más miomas diagnosticados (Vikhlyeva *et al.*, 1995). Este efecto observado parece estar relacionado con la herencia de factores genéticos comunes (Mehine *et al.*, 2013, 2014).

Estilo de vida y dieta

Varios estudios muestran una asociación entre el consumo de alcohol y la aparición de miomas. En el *Black Women's Health Study* se evidenció que la relación era mayor con la cerveza que con otras bebidas alcohólicas (Wise *et al.*, 2004b).

La relación entre el tabaco y los miomas es menos clara, ya que diferentes publicaciones muestran resultados contradictorios; algunos le confieren un efecto protector mientras que otros un aumento del riesgo (Pavone *et al.*, 2018). En una revisión sistemática concluyeron que el tabaco disminuye el riesgo de desarrollar miomas, sobre todo en mujeres con índice de masa corporal (IMC) bajo (Stewart *et al.*, 2017). Este efecto beneficioso parece estar relacionado con la disminución de los niveles de estrógeno por inhibición de la aromatasa (Biegon *et al.*, 2012).

No se ha confirmado asociación entre el consumo de cafeína y el desarrollo de miomas. Sin embargo, el consumo excesivo de café sí parece conferir un mayor riesgo en mujeres menores de 35 años (Wise *et al.*, 2004b).

Respecto a la alimentación, el consumo de carne roja y de cerdo está asociado a un incremento del riesgo de aparición de miomas, mientras que el consumo de vegetales y fruta, con una disminución del mismo (Chiaffarino *et al.*, 1999; Wise *et al.*, 2011). En un estudio de casos y controles realizado en China, se observó que el consumo de leche de soja se asocia con un riesgo 2.5 superior de desarrollo de miomas y los alimentos con aditivos, edulcorantes y conservas con un riesgo de 3.1 superior (Shen *et al.*, 2013).

Hay evidencia de que bajos niveles de vitamina D están relacionados con la aparición de miomas (Baird *et al.*, 2013). Las mujeres negras tienen una pre-

valencia de déficit de vitamina D diez veces superior a las mujeres caucásicas (Nesby-O'Dell *et al.*, 2002) debido, entre otros motivos, a la mayor concentración de melanina (Zhao *et al.*, 2012), pudiendo ser otra de las razones por la que estas mujeres presentan una mayor prevalencia de miomas. Se ha observado en un modelo murino de xenotrasplante, que dosis altas de vitamina D mantenidas durante largo tiempo, conllevan una reducción del tamaño de los miomas, debido a sus efectos antiproliferativos, antifibróticos y proapoptóticos (Corachán *et al.*, 2020).

La actividad física confiere un efecto protector frente a la aparición de miomas (Wise & Laughlin-Tommaso, 2016). El beneficio está relacionado tanto con la cantidad de ejercicio realizado como con la intensidad del mismo (Baird *et al.*, 2007).

Se ha descrito también la asociación entre el estrés psicológico crónico y los miomas, sobre todo en mujeres negras (Qin *et al.*, 2019).

Anticoncepción hormonal

La relación entre los anticonceptivos orales y los miomas es contradictoria; algunos resultados apuntan a un aumento del riesgo (Marshall *et al.*, 1998) y otros a una disminución del mismo o ningún efecto (Wise & Laughlin-Tommaso, 2016).

Otros fármacos sí han mostrado un efecto beneficioso en la reducción del tamaño. Por ejemplo, el acetato de medroxiprogesterona depot ejerce un efecto protector (Harmon *et al.*, 2022; Lumbiganon *et al.*, 1996) así como los dispositivos intrauterinos (DIU) con progesterona (Gunes *et al.*, 2008).

Otros factores

La hipertensión arterial (HTA) supone un aumento del riesgo de aparición de miomas, y este está asociado a la duración y gravedad de la misma (Faerstein *et al.*, 2001). Se ha descrito que las mujeres con HTA presentan un riesgo cinco veces superior que las mujeres sin ella (Takeda *et al.*, 2008).

El índice de masa corporal (IMC) está asociado a un incremento moderado del riesgo de aparición de miomas (Parker, 2007). Esta relación puede deberse al aumento de estrógeno circulante activo en mujeres obesas debido a la conversión de andrógeno a estrona, así como a la disminución de la hormona transportadora de hormonas sexuales (SHBG) (Wise & Laughlin-Tommaso, 2016). El aumento de la prevalencia también está asociado a la ganancia ponderal, evidenciándose un riesgo adicional del 21% por cada aumento de diez kilogramos (Ross *et al.*, 1986).

1.4. COSTES SOCIOECONÓMICOS

Los miomas uterinos suponen un importante coste económico tanto para los sistemas de salud como para las propias pacientes, por ser motivo de un elevado número de visitas a consultas, precisar de tratamientos médicos e intervenciones quirúrgicas y por el absentismo laboral que ocasionan. Son causa del 40-60% de todas las histerectomías realizadas en Estados Unidos y un 30% de las realizadas a pacientes jóvenes de entre 18-44 años (Merrill, 2008). Además, suponen

un 29% de los ingresos ginecológicos en Estados Unidos entre los 15 y 54 años (Whiteman *et al.*, 2010).

En una revisión sistemática publicada en el 2012 se analizaron los costes anuales debido a los miomas uterinos en Estados Unidos. Los resultados obtenidos mostraron unos costes directos (cirugía, hospitalización, consultas externas y tratamiento médico) de 4.1-9.4 mil millones de dólares. Los costes debidos a absentismo laboral fueron de 1.55-17.2 mil millones de dólares anuales. Las complicaciones obstétricas atribuidas a los miomas fueron de 238 millones a 7.76 mil millones de dólares anuales. Se concluyó que los miomas uterinos suponían un coste total a Estados Unidos 5.9-34.4 mil millones de dólares anuales (Cardozo *et al.*, 2012).

1.5. FISIOPATOLOGÍA

La fisiopatología de los miomas no está completamente establecida. Varios trabajos han mostrado que son tumores monoclonales, es decir, que cada mioma surge de la expansión clonal de una sola célula de músculo liso miometrial transformada por una o varias mutaciones (Bulun, 2013).

Existen otros mecanismos involucrados en la formación de estos tumores como la predisposición genética, las hormonas esteroideas, diversos factores de crecimiento, citocinas, componentes de la MEC y alteraciones en la apoptosis (Stewart, 2001).

1.5.1. Células madre

El miometrio contiene una pequeña población de células madre somáticas (Ono *et al.*, 2012). Una de las hipótesis más aceptadas sobre la patogenia de los miomas es la que sugiere que las células madre del mioma surgen de estas células madre somáticas del miometrio tras sufrir una transformación tumoral debido a la adquisición de una mutación. Esta transformación origina una célula madre con mayor capacidad de autorrenovación y proliferación, dando lugar finalmente a la formación de un mioma (Bulun, 2013). Otros factores propuestos que participan en esta transformación son las alteraciones en la señalización de las hormonas esteroideas gonadales, vías de señalización paracrina, la hipoxia uterina o la metilación aberrante (Bulun, 2013; Ono *et al.*, 2012).

Por otro lado, se ha propuesto que tras la adquisición de mutaciones en la célula madre inicial, los miomas, en su fase preclínica, se diferencian en cuatro componentes celulares clonalmente relacionados: células de músculo liso, células de músculo liso vascular y dos tipos de fibroblastos (fibroblastos y fibroblastos asociados a fibromas). Estas células proliferan bajo el estímulo de factores ambientales y moleculares acelerando su crecimiento y desarrollando finalmente el mioma clínico (Holdsworth-Carson *et al.*, 2014).

1.5.2. Factores paracrinos y hormonales

A pesar de que las hormonas gonadales son necesarias para la transformación de las células madre somáticas a células progenitoras de miomas, estas presentan pocos receptores hormonales en comparación con las células miometriales normales.

Por ello, se ha sugerido que las interacciones paracrinas juegan un papel clave en esta correlación (Figura 3) (Stewart *et al.*, 2016). Algunos de estos mecanismos son la vía de señalización Wnt/ β -catenina que puede estimular la expresión del factor de crecimiento transformante β 3 (TGF β 3), que a su vez induce la expresión de fibronectina con una producción excesiva de MEC y aumento de la proliferación celular (Ciebiera *et al.*, 2017; Ono *et al.*, 2013; Stewart *et al.*, 2016). También se sabe, que las interacciones paracrinas inducen una disminución de la apoptosis (Figura 3) (Bulun, 2013).

Los estrógenos producen un aumento del receptor estrogénico α (RE α) y la función principal de ambos es inducir la expresión del receptor de progesterona (RP) para permitir que las células respondan a esta hormona (Ishikawa *et al.*, 2010; Marsh & Bulun, 2006). Por otro lado, las células miomatosas presentan un aumento de los niveles de aromatasa (la enzima que convierte los andrógenos en estrógenos) en comparación con el miometrio normal y este aumento es mayor en mujeres negras (Ishikawa *et al.*, 2009).

La progesterona y su receptor son necesarios para el crecimiento de los miomas y además los RP están aumentados en los miomas en comparación con el miometrio normal (Ishikawa *et al.*, 2010). El tratamiento de los miomas con fármacos moduladores de los RP produce una reducción significativa del tamaño del tumor, confirmando el papel clave que esta hormona ejerce en la modulación del crecimiento de estos tumores (Donnez *et al.*, 2014).

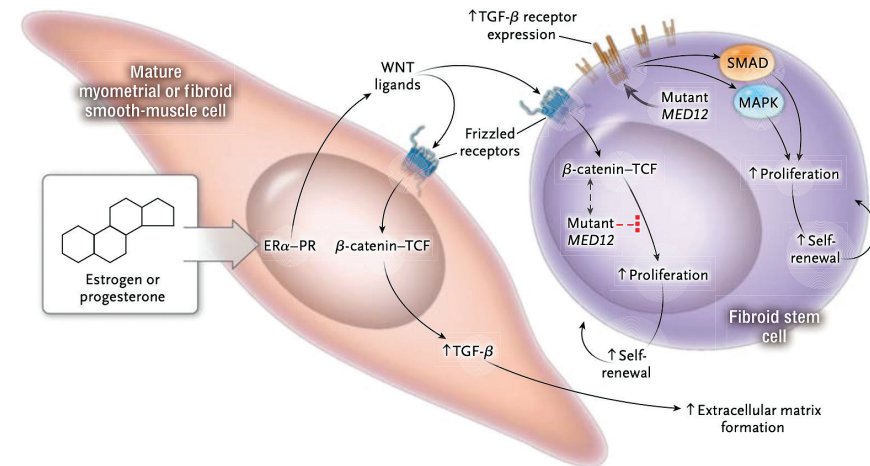


Imagen extraída de (Bulun, 2013).

FIGURA 3.

Interacción paracrina entre las células de mioma.

El estrógeno y la progesterona inducen la secreción de ligandos Wnt en las células maduras del miometrio y del mioma. Wnt estimula la expresión de los genes diana de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en las células madre del mioma que estimula el TGF β 3, dando como resultado una mayor formación de matriz extracelular y un incremento de la proliferación celular.

1.5.3. Alteraciones genéticas

Estudios basados en agrupación jerárquica y secuenciación de alto rendimiento han identificado cuatro subgrupos de miomas molecularmente distintos. Esta subclasificación se realiza según las mutaciones somáticas o alteraciones cromosómicas presentes en genes clave: el gen MED12 (*Mediator Complex Subunit 12*), el grupo HMGA2 (*High mobility group AT-hook 2*), el grupo de la fumarato hidratasa (FH) y un último grupo asociado con la delección del colágeno tipo IV α 5 (COL4A5) y α 6 (COL4A6) (Mehine *et al.*, 2013, 2014).

La mutación MED12 es la más frecuente, seguida de los HMGA2, presentes en el 48-92% y 40-50% de los miomas respectivamente (Mehine *et al.*, 2014). Las mutaciones hereditarias en el gen de la fumarato hidratasa (FH), una enzima que participa en el ciclo de Krebs, presentan una inactivación de la FH con acumulación intracelular de fumarato y causa la leiomiomatosis hereditaria y cáncer de células renales (HLRCC, por sus siglas en inglés). Las deleciones de los genes del colágeno COL4A5 y COL4A6 son una minoría y están asociadas con una enfermedad rara, el síndrome de Alport con leiomiomatosis difusa (Mehine *et al.*, 2014; Stewart *et al.*, 2016).

Además, esta heterogeneidad de las mutaciones se asocia con diferentes fenotipos en la presentación de los miomas. Las mujeres con mutación MED12 desarrollan múltiples tumores, pero de menor tamaño. Mientras que, los miomas con reordenamientos de HMGA2 son más grandes y con una mayor tasa de crecimiento debido a que esta alteración promueve factores angiogénicos que aumentan la angiogénesis y, en consecuencia, aumentan la proliferación celular y la migración de células endoteliales (Ferrero H., 2020). Se cree que las mutaciones genéticas de MED12 y HMGA2 no se superponen en ningún mioma, siendo dos vías genéticas independientes (Ferrero H., 2020).

1.5.4. Factores vasculares y angiogénicos

La angiogénesis y la vascularización son dos factores importantes en el desarrollo de los miomas. Los miomas presentan alteraciones estructurales en los vasos sanguíneos (Sampson, 1912) y esta vascularización anómala provoca un ambiente hipóxico que estimula su crecimiento (Mayer *et al.*, 2008). Además, se han descrito múltiples factores de crecimiento angiogénicos expresados con mayor intensi-

dad en los miomas frente al miometrio sano. Algunos de los factores descritos son: adrenomedulina (ADM), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y TGF β (Tal & Segars, 2014).

Más adelante desarrollaré con mayor extensión los procesos fisiopatológicos de la angiogénesis y la vascularización involucrados en la formación y crecimiento de los miomas, para así poder comprender la investigación que hemos llevado a cabo.

1.5.5. Factores fibróticos

El componente fibrótico es de gran relevancia en el desarrollo de los miomas. Estos tumores presentan diversas anomalías de la MEC como un aumento del colágeno de tipo I y III, que además poseen una estructura y orientación anómalas (Stewart *et al.*, 1994). Por otro lado, los miomas son más rígidos que el resto de miometrio y este aumento de rigidez se acompaña de una alteración de la MEC que conduce a una expresión génica alterada a través de la señalización de estado sólido (Leppert *et al.*, 2004; Rogers *et al.*, 2008).

Los factores de crecimiento fibrótico también se presentan alterados en los miomas. TGF β es un importante regulador del crecimiento celular cuyos niveles se encuentran incrementados en estos tumores. Ejerce su acción mediante la modulación de la remodelación tisular, la inflamación y la prevención de la apoptosis (Lee & Nowak, 2001; Sinclair *et al.*, 2011). El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) puede estimular el crecimiento de miomas por sí mismo o a través de un aumento en la expresión de TGF β (Chegini *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha descrito que la vitamina D3 induce apoptosis en las células del mioma a

través de la vía de la TGF β , por lo que parece que su deficiencia está implicada en el desarrollo de miomas (Halder *et al.*, 2011). En la figura 4 se muestra un resumen de los diferentes mecanismos implicados en la patogenia de los miomas.

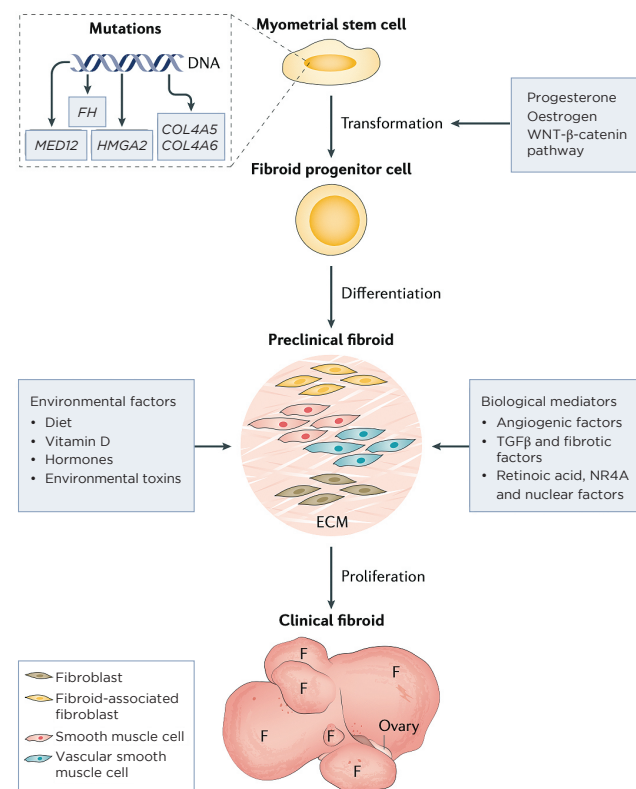


Imagen extraída de (Stewart *et al.*, 2016).

FIGURA 4.

Resumen de la patogenia de los miomas uterinos.

Las células madre del miometrio bajo la influencia de mutaciones, de las hormonas gonadales y de Wnt- β -catenina, se diferencian en un mioma preclínico. Posteriormente, los cuatro tipos de células que forman los miomas y la matriz extracelular, bajo el estímulo de factores ambientales y moleculares, aceleran su crecimiento y finalmente desarrollan el mioma clínico.

1.6. CLASIFICACIÓN

Los miomas se clasifican según el grado de extensión intramural y la distorsión de la cavidad en: subserosos, localizados en la superficie uterina deformando la serosa; intramurales, situados en el espesor del miometrio; transmurales, aquellos que ocupan toda la pared miometrial y deforman tanto la serosa como el endometrio; submucosos, que desplazan el endometrio (Donnez & Dolmans, 2016; Pavone *et al.*, 2018).

Aunque no hay ninguna clasificación universalmente aceptada, la más empleada actualmente es la propuesta por la *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO) en el año 2011. Esta, elabora una clasificación donde se describen 8 tipos de miomas en función de su relación con el endometrio y la serosa (Figura 5) (Munro *et al.*, 2011):

- Miomas submucosos (FIGO tipo 0,1,2): categorizados según la clasificación de Wamsteker teniendo en cuenta la proporción de afectación intramural. El tipo 0 es pediculado intracavitario, el tipo 1 se extiende menos del 50% en miometrio y el tipo 2 igual o más del 50% (Wamsteker *et al.*, 1993).
- Miomas intramurales (FIGO tipo 3, 4): localizados en el espesor miometrial. El tipo 3 contacta con el endometrio pero es 100% intramural y el tipo 4 es intramural.
- Miomas subserosos (FIGO tipo 5,6,7): el tipo 5 presenta más de un 50% de componente intramural, el tipo 6 menos de un 50% y el tipo 7 es subseroso pediculado.

- Otros (FIGO tipo 8): miomas que no están relacionados con el miometrio del todo, como los localizados en el cérvix, los ligamentos o los miomas parasitarios.
- Miomas híbridos (FIGO tipo 2-5): miomas transmurales, submucosos y subserosos, que ocupan menos del 50% de la cavidad endometrial y peritoneal.

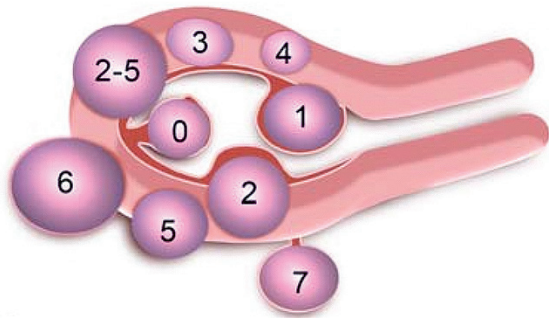


Imagen adaptada de (Munro et al., 2011), extraída de (Donnez & Dolmans, 2016).

FIGURA 5.

Clasificación de los miomas con el sistema FIGO.

En 2005, se desarrolla una nueva clasificación específica para miomas submucosos llamada STEPW acrónimo de *size, topography, extension, penetration, and wall*. En ella se emplean estos cinco parámetros y se les asigna una puntuación a cada uno de ellos que permite clasificar la complejidad de extirpación de los miomas por vía histeroscópica (Figura 6) (Lasmar et al., 2005).

	Tamaño (cm)	Topografía	Extensión de la base	Penetración	Afectación de la pared lateral	Total
0	≤ 2	tercio inferior	≤ 1/3	0%	+1	
1	> 2-5	tercio medio	> 1/3- 2/3	≤ 50%		
2	> 5	tercio superior	≤ 2/3	> 50%		
Score	+	+	+	+		

Score	Grupo	Complejidad y opciones terapéuticas
0-4	I	Baja complejidad. Miomectomía por histeroscopia
5-6	II	Alta complejidad. Miomectomía por histeroscopia Considerar el uso de tratamientos médicos Considerar miomectomía histeroscópica en dos pasos
7-9	III	Considerar alternativas a la técnica histeroscópica

Imagen adaptada de (Lasmar et al., 2005).

FIGURA 6.

Clasificación SETPW de los miomas submucosos.

1.7. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Una gran parte de los miomas son de pequeño tamaño y no producen síntomas, sin embargo, hasta un 30-40% de las mujeres con estos tumores presentan síntomas y requerirán tratamiento (Donnez & Dolmans, 2016). Las manifestaciones clínicas se pueden dividir en sangrado menstrual abundante (SMA), clínica por el efecto masa y disfunción reproductiva (esterilidad, abortos y complicaciones obstétricas) (Figura 7) (Stewart, 2001). Su expresividad clínica está relacionada con el número, tama-

ño y localización de los miomas. Los intramurales y, sobre todo, los submucosos, se suelen manifestar con sangrado, mientras que los miomas subserosos con síntomas por el efecto masa como dolor o presión pélvica (Wise & Laughlin-Tommaso, 2016).



FIGURA 7.
Manifestaciones clínicas.

El patrón de **sangrado** característico es una menstruación abundante y prolongada que puede producir anemia ferropénica. Las mujeres negras presentan sangrados mayores y anemia más grave en comparación con las caucásicas (Stewart *et al.*, 2013). La razón por la cual se produce el SMA no está bien establecida, pero se han propuesto diferentes mecanismos, tales como un aumento de la superficie endo-

metrial, aumento de la vascularización uterina, daño en la contractilidad uterina, ulceración submucosa y compresión del plexo venoso del miometrio asociando ectasia venosa y congestión uterina (Sinai Talaulikar, 2018).

El aumento del tamaño uterino puede causar síntomas debido al **efecto masa** como dolor, presión pélvica, compresión de la vena cava con aumento del riesgo tromboembólico, clínica urinaria y digestiva. Los síntomas urinarios incluyen un aumento de la frecuencia urinaria, incontinencia, dificultad para la micción con retención de orina e incluso obstrucción ureteral en miomas de gran tamaño. Los síntomas gastrointestinales, como estreñimiento y tenesmo, también pueden estar presentes, sobre todo en miomas localizados en la cara posterior (Stewart *et al.*, 2016). De manera atípica, se pueden manifestar como un dolor agudo en casos de degeneración, torsión de un mioma pediculado o en un mioma parido (Stewart, 2001).

El impacto sobre la **fertilidad** dependerá del tamaño, número y localización de los miomas. Se han sugerido diversos mecanismos por los cuales los miomas producen un efecto negativo sobre la fertilidad: distorsión de la cavidad endometrial (Somigliana *et al.*, 2007); cambios funcionales del miometrio y endometrio; cambios moleculares, paracrinos y endocrinos, que afectan al transporte de gametos y a la implantación del blastocisto; afectación de la receptividad endometrial debido a la producción de anticoagulantes en el endometrio, a la producción de TGF β y a la expresión de genes HOX en los miomas (Galliano *et al.*, 2015; Purohit & Vigneswaran, 2016; Zepiridis *et al.*, 2016). Respecto a la localización de los miomas, aunque hay consenso sobre el impacto negativo en la fertilidad de los miomas submucosos, el papel de los intramurales es más controvertido. Se ha sugerido que los miomas

intramurales de más de 4 cm, aunque no distorsionen la cavidad, pueden ejercer una influencia negativa sobre la fertilidad. Sin embargo, los miomas subserosos no parecen jugar ningún papel (Oliveira *et al.*, 2004; Pritts *et al.*, 2009).

La relación entre el aborto espontáneo y la presencia de miomas es cuestionable. Mientras que algunas publicaciones muestran una asociación, sobre todo de los miomas que distorsionan la cavidad (Pritts *et al.*, 2009), otros indican que no hay un aumento del riesgo y que los estudios que sí encuentran esta asociación presentan fallos debido a factores de confusión (Sundermann *et al.*, 2017).

Por otro lado, se ha observado una alteración de los mecanismos inflamatorios y moleculares en los úteros con miomas (Vannuccini *et al.*, 2016), y esto, asociado o no a otros trastornos reproductivos, se relaciona con un incremento de las **complicaciones obstétricas** como parto pretérmino, presentaciones fetales anómalas, mayores tasas de cesárea, desprendimiento de placenta o hemorragia postparto (Coutinho *et al.*, 2022).

Por todo esto, los miomas causan una morbilidad significativa y tienen un impacto negativo en la calidad de vida de las pacientes. Las mujeres que presentan síntomas, suelen mostrar preocupación sobre el efecto que los miomas pueden causar en sus relaciones personales, en el trabajo y sobre su salud en general. Los sangrados abundantes pueden ser motivo de vergüenza social acarreando una pérdida importante de la productividad de la mujer (Borah *et al.*, 2013; Stewart, 2001).

1.8. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de los miomas uterinos puede ser complejo debido a varios factores como el tamaño, la localización y la presencia de múltiples miomas. Además, aunque hay una serie de manifestaciones clínicas que nos pueden hacer sospechar de su presencia, estas pueden estar asociadas a otras patologías, como la disfunción ovulatoria, adenomiosis, endometriosis o pólipos endometriales (Stewart *et al.*, 2016).

Su diagnóstico se basa principalmente en la exploración física y la ecografía. La necesidad de otras pruebas complementarias dependerá de los hallazgos encontrados. Las técnicas de imagen disponibles incluyen la ecografía, la histerosonografía y la resonancia magnética nuclear (RMN). Para la valoración de los miomas submucosos también se emplea la histeroscopia. Es necesaria una evaluación precisa del número, tamaño y localización de los miomas para elegir el tratamiento óptimo en cada paciente (Khan *et al.*, 2014; Parker, 2007).

Aunque el diagnóstico definitivo es anatomopatológico, a él no se llegará en la mayoría de los casos. Sin embargo, será fundamental en aquellos tumores sospechosos en los que no se puede descartar malignidad. Hay que tener en cuenta, que tanto los miomas como los leiomiomas uterinos, se presentan como tumores en el espesor del miometrio y, en ocasiones, hacer el diagnóstico diferencial entre ambos resulta complejo. El leiomioma uterino es una afección muy poco frecuente y está presente en de 1 de cada 1500 mujeres menores de 40 años y 1 de cada 1100 mujeres de entre 40 y 44 años operadas por una sospecha de mioma (Wright *et al.*, 2014). En el año 2017, *The Agency for Healthcare Research and Quality* revisó datos de

160 estudios prospectivos y retrospectivos y encontró una tasa de 0-13 leiomiomas por cada 10.000 cirugías indicadas por sospecha de mioma (Hartmann *et al.*, 2017). Por ello es importante tener en cuenta los factores de riesgo de sarcoma tales como la edad avanzada (la mayoría se diagnostican en la sexta década de la vida), el uso de tamoxifeno, antecedente de irradiación pélvica o algunos síndromes genéticos raros (Stewart, 2015). En caso de sospecha, el diagnóstico preoperatorio puede ser posible mediante RMN. La detección de la isoenzima 3 del lactato deshidrogenasa (LDH), los hallazgos ecográficos y, en algunos casos, una biopsia endometrial, pueden ayudar a su diagnóstico (Parker, 2007).

1.8.1. Diagnóstico clínico

Aunque en muchas ocasiones los miomas son asintomáticos, la manifestación más común es el sangrado menstrual prolongado y abundante. También puede presentarse como dolor, presión pélvica y esterilidad. En casos de sangrado grave, se estudiará si la mujer presenta anemia y ferropenia mediante un hemograma y un perfil férrico (Stewart, 2015).

1.8.2. Exploración física

Los úteros miomatosos pueden palparse por vía abdominal, generalmente agrandados y de contorno irregular. El tamaño se describe según la altura del fondo uterino comparándolo con un útero grávido: 12 semanas a nivel de la sínfisis del pubis, 16 semanas entre la sínfisis del pubis y el ombligo y 20 semanas a nivel umbilical. Mediante el tacto bimanual se describe el tamaño, el contorno y la movilidad uterina. Con el espéculo se puede visualizar un cérvix aumentado de ta-

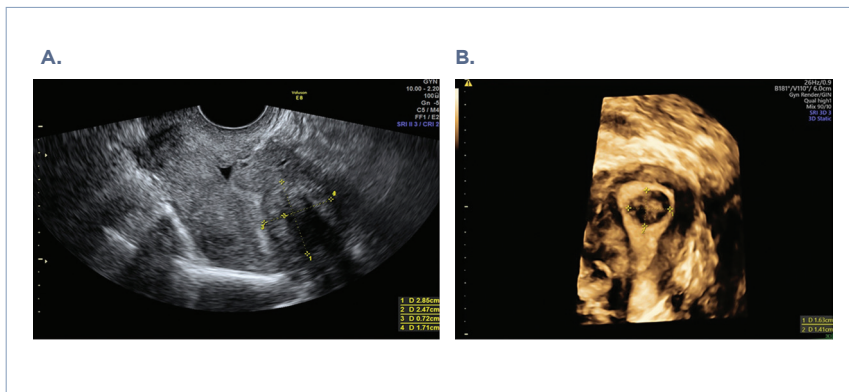
maño debido a la presencia de un mioma cervical o un mioma prolapsado (Parker, 2007; Stewart, 2001).

1.8.3. Técnicas de imagen

La **ecografía** es la técnica de elección para el diagnóstico de miomas, ya que es sencilla, reproducible y económica (Khan *et al.*, 2014; Stewart, 2015). Aunque la ecografía transvaginal presenta una sensibilidad del 95-100% para detectar miomas en úteros con un tamaño menor que 10 semanas de gestación, en úteros grandes o con múltiples miomas, determinar la localización precisa puede resultar más complejo (Dueholm *et al.*, 2002). En aquellos úteros con un tamaño acorde a más de 10 semanas de gestación deberá completarse el estudio con una ecografía abdominal. Además, si existen sospechas de que los miomas puedan estar causando una obstrucción del tracto urinario, debe realizarse una ecografía renal para evaluar una posible hidronefrosis. El uso de la **ecografía tridimensional** (3D) es otra herramienta útil para el estudio de la patología miometrial debido a su capacidad para reconstruir el plano coronal del útero y valorar una posible impronta en el endometrio (Wong *et al.*, 2015).

El aspecto de los miomas por ecografía es variable, aunque generalmente se observan como lesiones sólidas, bien delimitadas, dentro del miometrio o adyacentes a él. Suelen tener la misma ecogenicidad que el miometrio, pero también pueden ser hipoeoicas. Es frecuente la presencia de sombra acústica, que es más marcada cuando están calcificados. La morfología varía, pudiendo ser redondeados o no. Con la aplicación del *Doppler* color se muestra una vascularización circunferencial, aunque en los miomas necrosados o torsionados puede haber ausencia de flujo. El ta-

maño se obtiene midiendo los tres diámetros y para describir la localización usualmente se emplea la clasificación de la FIGO (Munro *et al.*, 2011). La zona de unión endometriometrial, o *Junctional zone (JZ)* en inglés, no se presenta engrosada y puede estar interrumpida por miomas submucosos (Khan *et al.*, 2014; Parker, 2007).



Fuente: Servicio de Ginecología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

FIGURA 8.

Imagen ecográfica de un mioma tipo 2 en escala de grises (A). Imagen de un mioma tipo 0 visualizado con ecografía 3D (B).

En 2015 se publicó la declaración MUSA (*Morphological Uterus Sonographic Assessment*), que es un consenso sobre los términos, definiciones y medidas que se pueden usar para describir e informar de las características ecográficas del miometrio mediante ecografía en escala de grises, *Doppler* color y ecografía 3D. En la figura 9 se describen las características ecográficas de los miomas consideradas importantes que deben quedar reflejadas en el informe (van den Bosch *et al.*, 2015).

La ecografía con infusión de solución salina, conocida como **histerosonografía**, resulta de utilidad para valorar la cavidad uterina en pacientes con sospecha de mio-

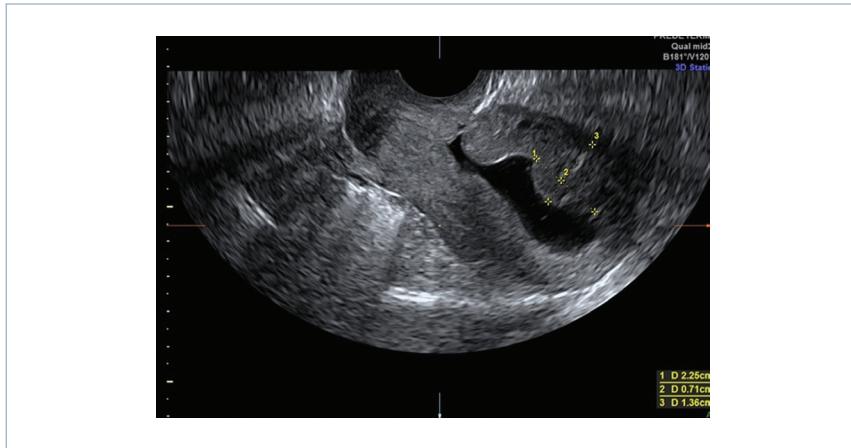
Características	Mioma típico
Contorno seroso del útero	Lobulado
Definición de la lesión	Bien definida
Simetría de las paredes uterinas	Asimétricas en presencia de lesiones bien definidas
Lesión	
Contorno	Bien definido
Forma	Redondeada, ovalada, lobulada
Superficie	Lisa
Borde	Hipo o hiperecogénico
Sombras	Sombras externas e internas (en ocasiones en forma de abanico)
Ecogenicidad	Uniforme: hiper-, iso-, hipocogénico No uniforme: ecogenicidad mixta
Vascularización	Flujo circunferencial
Zona de unión endometriometrial	
Grosor, regularidad	No engrosada: regular o no visible
Interrumpida	Interrumpida o distorsionada en áreas con miomas FIGO tipo 1-3

Imagen adaptada de (van den Bosch *et al.*, 2015).

FIGURA 9.

Características ecográficas de los miomas.

mas submucosos, miomas intramurales que improntan en la cavidad endometrial o en mujeres con deseo gestacional (Seshadri *et al.*, 2015). Presenta una sensibilidad del 99% con un valor predictivo positivo (VPP) del 96% para miomas submucosos, siendo superior a la ecografía transvaginal (Bingol *et al.*, 2011). Aunque la histeroscopia diagnóstica sigue siendo el *gold standard* para valorar la cavidad endometrial, la histerosonografía puede ser una alternativa de gran utilidad en muchos casos. No obstante, la calidad de la imagen obtenida depende de la capacidad de deformar la cavidad endometrial por el suero infundido, por lo que, si la cantidad es muy pequeña por mala tolerancia de la técnica por parte de la paciente, no se conseguirá visualizar completamente (Khan *et al.*, 2014).



Fuente: Servicio de Ginecología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

FIGURA 10.

Imagen ecográfica de un mioma submucoso tipo 2 visualizado mediante histerosonografía.

La **resonancia magnética** es la técnica más eficaz para visualizar el tamaño y la ubicación de todos los miomas uterinos. También es útil para realizar el diagnóstico diferencial entre miomas y otras patologías como adenomiosis, masas ováricas y leiomiomas uterinos (Khan *et al.*, 2014). La RMN es superior a la ecografía transvaginal en la identificación exacta de la localización de estos tumores, sobre todo en aquellos úteros grandes (> 375 ml) y con múltiples miomas (>4) (Dueholm *et al.*, 2002). Además, aporta información adicional sobre la vascularización y la relación de los miomas con la superficie endometrial y serosa (Stewart, 2015). Sin embargo, es una técnica más cara y menos accesible, por lo que su uso se reserva a aquellos casos donde existan dudas diagnósticas, en la planificación de intervenciones complejas o para predecir y evaluar la respuesta de los miomas a la embolización de las arterias uterinas (EAU).



Imagen extraída de (Stewart, 2001).

FIGURA 11.

Miomas visualizados mediante RMN.

1.8.4. Histeroscopia

La histeroscopia diagnóstica se emplea para visualizar la cavidad endometrial y ayuda a diferenciar entre miomas submucosos y otras patologías endometriales como los pólipos. Permite valorar el tamaño y el grado de protrusión de los miomas en la cavidad, así como aplicar la clasificación SETPW para planificar la resección del mioma submucoso (Lasmar *et al.*, 2005).



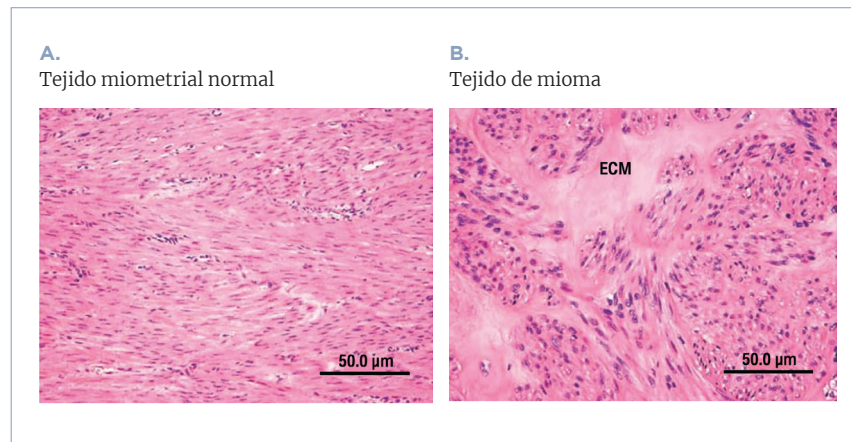
Fuente: Servicio de Ginecología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

FIGURA 12.

Imagen de mioma tipo 0 visualizado por histeroscopia.

1.8.5. Histología

La imagen histológica clásica es un tejido formado por células de músculo liso en forma de huso dispuestas en fascículos desorientados y separados por MEC. Se presentan con bordes bien delimitados y poca actividad mitótica (índice mitótico ≤ 2 por 10 campos de gran aumento). Los núcleos están definidos por irregularidades focales de la membrana nuclear sin atipia y nucleolos pequeños. Para hacer el diagnóstico diferencial con patología maligna se evalúa el grado de atipia nuclear, el número de mitosis y la presencia o ausencia de necrosis coagulativa (Toledo & Oliva, 2008).



Imágenes adaptadas de (Bulun, 2013).

FIGURA 13.

Hallazgos histológicos de los miomas (hematoxilina y eosina).

Tejido miometrial normal (A). En los miomas se observan islas de músculo liso desordenadas separadas por abundante MEC y abundante tejido fibroso. Las células de músculo liso contienen núcleos agrandados (B).

1.8.6. Biomarcadores

Se han investigado varias moléculas como potenciales biomarcadores tales como la prolactina, el antígeno leucocitario humano clase I (HLA-1), HLA-G, VEGF, grelina (la hormona reguladora del apetito), LDH y el antígeno de cáncer 125 (CA-125) (G. Levy *et al.*, 2013; Stewart *et al.*, 2016). Sin embargo, hasta la fecha, ninguno ha resultado útil para el diagnóstico y no aportan información adicional al examen físico y las pruebas de imagen.

1.9. TRATAMIENTO

El tratamiento de los miomas debe ser individualizado, teniendo en cuenta la edad de la paciente, el tamaño, número y ubicación de los miomas, la presentación clínica, el deseo gestacional y si presenta esterilidad. Aunque existen diferentes opciones terapéuticas, hay pocos ensayos aleatorizados que comparen los diferentes tratamientos entre sí y, además, hay pocos datos sobre el efecto en la fertilidad de algunas terapias (Stewart, 2015).

En miomas asintomáticos se recomienda manejo expectante. El tratamiento profiláctico de los miomas no se recomienda, excepto en aquellas mujeres con miomas que deformen la cavidad endometrial y presenten deseo gestacional o miomas que compriman el uréter y causen hidronefrosis (Stewart, 2015). En mujeres sintomáticas el control de la clínica es el objetivo principal y las opciones actuales de tratamiento incluyen intervenciones médicas, quirúrgicas y radiológicas (Stewart *et al.*,

2016). Generalmente el tratamiento inicial es médico, y en caso de fracaso se recurrirá a cirugía u otras terapias. A pesar del avance en las opciones de tratamiento, la histerectomía sigue siendo el tratamiento más comúnmente ofrecido y elegido por las mujeres, siendo la principal indicación de histerectomía (Giuliani *et al.*, 2020). En la Figura 14 se muestran las diferentes opciones de tratamiento.

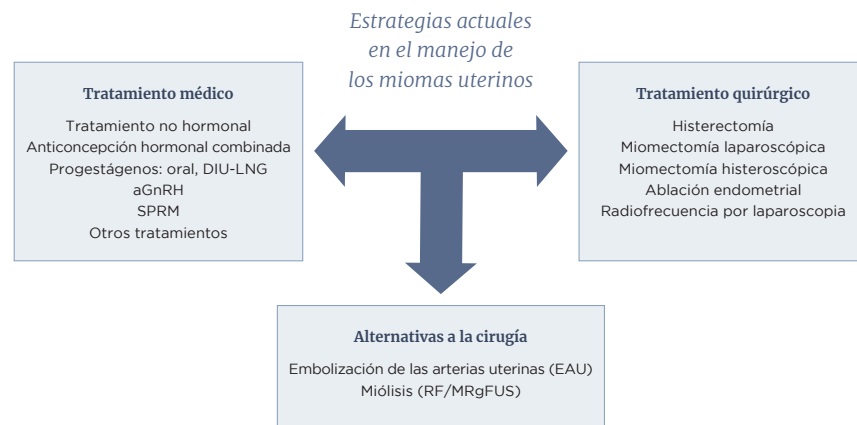


FIGURA 14.

Estrategias actuales en el manejo de los miomas uterinos.

1.9.1. Manejo expectante

La mayoría de guías clínicas recomiendan un manejo expectante en los miomas asintomáticos y de pequeño tamaño, sobre todo en edades próximas a la menopausia. Es necesario hacer un seguimiento de los miomas para detectar cambios en el tamaño o la presencia de síntomas de nueva aparición. Aunque no hay consenso

sobre el intervalo de tiempo que debe pasar entre las evaluaciones, generalmente se recomienda un año (Pérez-López *et al.*, 2014). Se sabe que la vascularización de los miomas se correlaciona con la tasa de crecimiento por año, por lo tanto, los miomas asintomáticos que no presentan vascularización pueden no precisar seguimiento y aquellos vascularizados pueden requerir evaluación cada seis meses (Nieuwenhuis *et al.*, 2018).

1.9.2. Tratamiento médico

Hay una gran variedad de terapias médicas disponibles para el tratamiento de los miomas sintomáticos como los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), los antifibrinolíticos y los tratamientos hormonales. Sin embargo, hay escasos estudios de calidad que respalden la efectividad de la mayoría de estos tratamientos (Stewart *et al.*, 2016).

1.9.2.1. Tratamiento no hormonal

Los **AINE** son el tratamiento de primera línea para el SMA y la dismenorrea producida por miomas debido a su bajo coste, efectos adversos limitados y buena disponibilidad. Están contraindicados en mujeres con hipersensibilidad conocida a estos fármacos, úlceras gástricas y enfermedad renal. Las concentraciones de prostaglandinas E2 y F2 α son más elevadas en el endometrio de mujeres con sangrado menstrual abundante y miomas durante la fase secretora del ciclo en comparación con mujeres con menstruaciones normales (Willman *et al.*, 1976). Por ello, los AINE, que actúan inhibiendo la enzima ciclooxigenasa y disminuyen los niveles de prostaglandinas, son efectivos en el control del dolor

(Giuliani *et al.*, 2020). Se ha observado que los AINE reducen el SMA en comparación con el placebo, aunque son menos eficaces que el ácido tranexámico, danazol o el dispositivo intrauterino liberador de levonorgestrel (DIU-LNG) (Lethaby *et al.*, 2013).

El **ácido tranexámico** es un agente antifibrinolítico oral que se toma durante los días de sangrado abundante de la menstruación. Las mujeres con SMA presentan una mayor actividad del sistema fibrinolítico en el endometrio durante la menstruación, lo que conduce a una degradación acelerada del coágulo de fibrina y a un aumento del sangrado (Chwalisz & Taylor, 2017). El tratamiento con ácido tranexámico reduce el sangrado y mejora la calidad de vida con efectos secundarios mínimos. El tratamiento antifibrinolítico puede ser tan efectivo para el tratamiento de SMA como los progestágenos orales (Bryant-Smith *et al.*, 2018).

1.9.2.2. Anticoncepción hormonal combinada

La anticoncepción hormonal combinada, con estrógeno y progestágeno, es el tratamiento más comúnmente empleado en el tratamiento del SMA asociado a miomas, sobre todo en aquellas mujeres que desean anticoncepción. Hay tres presentaciones -oral, vaginal y transdérmica- y la elección de la vía dependerá de las preferencias de cada paciente. Se puede administrar de forma continua o con descansos. A la hora de pautarlos se deben seguir los criterios de elegibilidad de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization, 2015) y tener en cuenta los posibles efectos adversos (Giuliani *et al.*, 2020). Las mujeres con SMA y miomas que usan anticoncepción hormonal combinada presentan mayor calidad de vida y niveles de hemoglobina más elevados en com-

paración con placebo, sin embargo, son menos eficaces que el DIU-LNG controlando el sangrado (Giuliani *et al.*, 2020; Moroni, Martins, Dias, *et al.*, 2015).

1.9.2.3. Progestágenos

Los tratamientos con progestágenos más comúnmente empleados son los de presentación oral y el DIU-LNG. Los progestágenos suprimen el crecimiento endometrial disminuyendo el sangrado durante la menstruación. Los eventos adversos más frecuentes de la presentación oral son los síntomas gastrointestinales, sangrado irregular, acné y sensibilidad mamaria (Giuliani *et al.*, 2020).

Los DIU-LNG actúan localmente sobre el endometrio, con una absorción sistémica mínima y, por lo tanto, con menos efectos adversos. Tienen una acción antiproliferativa sobre el endometrio, lo que provoca atrofia endometrial y, en consecuencia, reducen la duración y cantidad del sangrado menstrual (Giuliani *et al.*, 2020; Sinai Talaulikar, 2018). Esta disminución del sangrado conlleva un aumento de los niveles de hemoglobina, ferritina y hematocrito (Wrona *et al.*, 2017). En modelos preclínicos se ha observado que el levonorgestrel inhibe la proliferación e induce la apoptosis sobre las células de miomas, sin embargo, no se ha observado una reducción del tamaño del mismo (Socolov *et al.*, 2011). El principal inconveniente que presentan es el riesgo de expulsión del DIU (12-16 %) durante los primeros tres años, sobre todo ante la presencia de miomas que distorsionan la cavidad (Stewart *et al.*, 2016). Aun así, la mayoría de las guías clínicas respaldan el uso de estos dispositivos como tratamiento de primera línea en mujeres con SMA asociado a miomas.

1.9.2.4. Análogos de la hormona liberadora de Gonadotropinas (aGnRH)

Los aGnRH incluyen los agonistas y antagonistas de la GnRH. Su efecto se basa en el bloqueo del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal que conlleva a la supresión de estrógeno y progesterona.

Los agonistas de GnRH, tras una estimulación inicial de la liberación de gonadotropinas (hormona foliculoestimulante [FSH] y hormona luteinizante [LH]), inducen una regulación hipofisaria que disminuye su producción llevando a un estado hipoestrogénico que inhibe el crecimiento de los miomas consiguiendo una reducción de su volumen (Stewart, 2015). Se consigue amenorrea en más del 98% de las mujeres y se relacionan con una disminución del tamaño del 35 al 65 % los primeros tres meses de tratamiento. Por ello, aumentan los niveles de hemoglobina y mejoran los resultados perioperatorios en pacientes que van a ser sometidas a una histerectomía o miomectomía, siendo esta una de sus principales indicaciones (Giuliani *et al.*, 2020; Lethaby *et al.*, 2001). También se pueden emplear en aquellas mujeres sintomáticas en la perimenopausia (Donnez & Dolmans, 2016). No obstante, debido al hipoestrogenismo que producen, presentan eventos adversos como los sofocos o la disminución de la densidad mineral ósea, motivo por el cual su uso está limitado entre tres y seis meses. En situaciones en las que deba prolongarse el tratamiento, se puede asociar terapia hormonal complementaria, también llamada terapia *add-back*, para limitar estos efectos secundarios. Aunque con una evidencia moderada, el tratamiento combinado de agonistas de GnRH y terapia complementaria con tibolona, raloxifeno, estriol e ipriflavona, ayuda a preservar la densidad mineral ósea. Además, con acetato de medroxiprogesterona y tibolona se reducen los síntomas vasomotores (Moroni *et al.*, 2015).

Los antagonistas de GnRH tienen resultados similares a los agonistas, pero con la ventaja del inicio rápido de los efectos clínicos y la posibilidad de presentación oral, no solo inyectable como ocurre con los agonistas. Los efectos secundarios asociados son los mismos, por lo que se suelen formular con una terapia hormonal complementaria para limitar los efectos secundarios (Stewart *et al.*, 2016). La *Food and Drug Administration* (FDA) estadounidense ha aprobado el uso combinado de dos antagonistas, Elagolix y Relugolix, con estradiol y acetato de noretisterona para el tratamiento de SMA asociado a miomas durante un periodo máximo de 24 meses. La terapia combinada con Relugolix una vez al día consigue en una reducción significativa del sangrado menstrual en comparación con el placebo y conserva la densidad mineral ósea (Al-Hendy *et al.*, 2021). Del mismo modo, Elagolix con terapia *add-back* es efectivo reduciendo el SMA en mujeres con miomas (Schlaff *et al.*, 2020). En España aún no está aprobado su uso.

1.9.2.5. Moduladores Selectivos de los Receptores de la Progesterona (SPRM)

Los moduladores de los receptores de progesterona (SPRM) han demostrado ser muy efectivos en el tratamiento de los miomas, tanto para el control de los síntomas como en la reducción de su tamaño. Los SPRM son compuestos sintéticos que ejercen un efecto agonista o antagonista sobre los tejidos diana a través de la unión con el RP. El más empleado es el acetato de ulipristal (AUP) cuyo uso se extendió durante los últimos años para el tratamiento de mujeres con miomas sintomáticos (Donnez *et al.*, 2018). Los SPRM tienen un inicio de acción rápido y son efectivos para reducir el SMA, la anemia, el dolor, el volumen ute-

rino y del mioma (Stewart *et al.*, 2016). Sus indicaciones principales son previas a una intervención quirúrgica para controlar el sangrado, recuperar la anemia y reducir el volumen del tumor, así como para el tratamiento intermitente de los síntomas asociados a miomas.

Sin embargo, actualmente no están disponibles en la mayoría de los países y en otros, su uso es muy limitado debido al potencial riesgo de toxicidad hepática (Mahase, 2020). En el año 2018, debido a varios casos notificados de hepatotoxicidad grave, el Comité Europeo para la Evaluación de Riesgos en Farmacovigilancia (PRAC) evaluó el riesgo de AUP y restringieron las indicaciones de uso del medicamento y determinaron unas medidas para minimizar el riesgo de daño hepático. En 2020, tras un nuevo caso de fallo hepático que requirió trasplante, se revisó de nuevo el fármaco suspendiendo cautelarmente su comercialización en la Unión Europea (UE), incluyendo España a través de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) (AEMPS, 2020). En la última evaluación de la AEMPS del año 2021, se suspende su uso en el tratamiento prequirúrgico de los miomas uterinos por existir otras alternativas, y limita su prescripción para el tratamiento intermitente de los síntomas de moderados a graves en mujeres que no han alcanzado la menopausia, cuando no haya otra alternativa (AEMPS, 2021).

La **mifepristona**, también conocida como RU-486, es empleada principalmente como abortivo y su uso en miomas no está actualmente aprobado en nuestro país. Aunque reduce el SMA y mejora la calidad de vida, no consigue reducir el volumen de estos tumores, y, además, aumenta el riesgo de hiperplasia endometrial (Tristan *et al.*, 2012).

1.9.2.6. Inhibidores de la aromatasasa

Los inhibidores de la aromatasasa (letrozol y anastrozol) pueden ser útiles en el tratamiento de los miomas debido al bloqueo de la conversión de andrógenos a estrógenos. Esto consigue un estado hipoestrogénico que obtiene como resultado un adelgazamiento endometrial y una reducción del sangrado menstrual (Giuliani *et al.*, 2020). Aunque parece mejorar la dismenorrea, la cantidad y la duración de la menstruación, debido a la falta de evidencia, actualmente no se recomienda su uso (Song *et al.*, 2013).

1.9.2.7. Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógenos (SERM)

Los SERM más estudiados en el tratamiento de los miomas son el raloxifeno y el tamoxifeno, aunque en la actualidad ninguno de los dos está aprobado para este fin. El tamoxifeno disminuye significativamente la pérdida de sangre y el dolor, sin embargo, presenta frecuentes efectos secundarios (Sadan *et al.*, 2001). Respecto al raloxifeno, no existe suficiente evidencia para recomendar su uso en mujeres premenopáusicas con miomas (Deng *et al.*, 2012).

1.9.2.8. Otros fármacos

El danazol y la gestrinona, aunque puedan ser efectivos, presentan efectos secundarios y la ausencia de evidencia hace que no se puedan recomendar (Pérez-López *et al.*, 2014).

1.9.3. Tratamiento quirúrgico

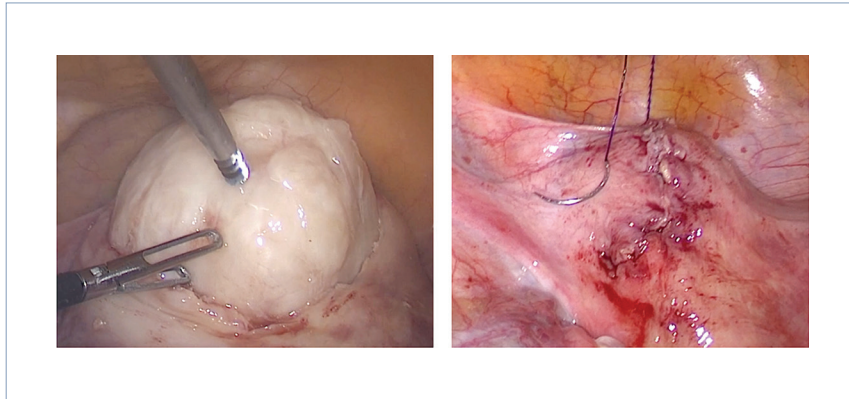
1.9.3.1. Miomectomía

La miomectomía consiste en la extirpación del mioma preservando el útero. Según las características del mioma, la experiencia del cirujano y el equipo disponible, se puede realizar mediante diferentes abordajes: histeroscopia, laparoscopia y laparotomía.

La **miomectomía histeroscópica** es el tratamiento de elección en los miomas submucosos. Las indicaciones más frecuentes son el SMA y los problemas reproductivos. En las mujeres con deseo gestacional y aquellas que van a ser sometidas a una técnica de reproducción asistida (TRA), la extirpación de los miomas submucosos mejora los resultados gestacionales (Pritts *et al.*, 2009). Es un procedimiento quirúrgico mínimamente invasivo, ambulatorio, con rápida recuperación, bajo riesgo de complicaciones y se asocia a una rápida mejoría (Sandberg *et al.*, 2018). Los miomas de mayor tamaño se pueden extirpar con el resectoscopio (con energía monopolar o bipolar), fibra láser o con morceladores intrauterinos (Donnez & Dolmans, 2016; Sandberg *et al.*, 2018). Cuanto mayor es el tamaño del mioma (sobre todo aquellos mayores de 5cm) y su componente intramural (>50% de extensión miometrial), hay menos posibilidades de resección completa (Wamsteker *et al.*, 1993) y puede ser necesaria la exéresis en dos tiempos quirúrgicos. Además, la extirpación de miomas grandes presenta mayor riesgo de complicaciones quirúrgicas como sangrado, extravasación de líquido o perforación uterina (Donnez & Dolmans, 2016).

El uso de fármacos previos a la histeroscopia, como aGnRH o AUP, puede facilitar la intervención, reducir el tiempo quirúrgico, requerir menos volumen de fluido infundido y generar una percepción de dificultad quirúrgica menor en el cirujano (Bizzarri *et al.*, 2015).

Las pacientes con miomas intramurales y subserosos sintomáticos con indicación quirúrgica que tengan deseo gestacional o quieran preservar el útero, se realiza una **miomectomía laparoscópica o laparotómica** siempre que sea factible. La vía de abordaje dependerá del tamaño y el número de miomas, así como de la experiencia del cirujano (Metwally *et al.*, 2012). La miomectomía laparoscópica debe ser el procedimiento estándar, ya que está asociada con menor sangrado y dolor postoperatorio, menos fiebre y estancia hospitalaria más corta en comparación con la vía laparotómica (Bhave Chittawar *et al.*, 2014). Hay que tener en cuenta que mediante la vía laparoscópica es necesario morcelar el mioma para su extracción y este procedimiento debe realizarse de manera estanca, por el riesgo potencial de que se trate de una lesión maligna y pueda diseminarse durante el procedimiento. Por otro lado, la tasa de recurrencias tras la miomectomía es de más del 25%, aunque menos del 15% precisarán cirugías adicionales (Marret *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2016).



Fuente: Servicio de Ginecología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

FIGURA 15.
Miomectomía laparoscópica.

1.9.3.2. Histerectomía

La histerectomía es el único tratamiento quirúrgico definitivo y está indicado en mujeres sin deseo gestacional o que no deseen preservar el útero. Se puede realizar por vía vaginal, laparoscópica, vNOTES (*Transvaginal natural orifice transluminal endoscopic surgery*), robótica y laparotómica. Las histerectomías vaginales, vNOTES y laparoscópicas, cuando son factibles, se recomiendan como primera línea ya que se asocian a una estancia hospitalaria más breve, una recuperación más rápida y una mayor satisfacción de la paciente. Tras la histerectomía, la mayoría de las mujeres presentan una mejoría significativa de los síntomas y de la calidad de vida, con una tasa de complicaciones baja (Giuliani *et al.*, 2020; Marret *et al.*, 2012; Pitter *et al.*, 2014).

1.9.3.3. Ablación endometrial

La ablación endometrial es una alternativa para aquellas mujeres con SMA por miomas y deseo genésico cumplido. Se pueden emplear diferentes dispositivos para destruir el endometrio (balón térmico, microondas, hidrotermablación, radiofrecuencia o crioterapia), la elección depende de la disponibilidad y de las características de la cavidad. Se asocia con una mejoría del sangrado uterino de hasta el 90 % y una tasa de complicaciones baja del 1–2 %. Las tasas de fracaso oscilan entre el 29–40 % y son mayores en miomas de gran tamaño, mujeres mayores de 45 años, multíparas y con adenomiosis concomitante (Giuliani *et al.*, 2020; Munro, 2018).

1.9.4. Tratamientos alternativos

1.9.4.1. Embolización de las arterias uterinas

La embolización de las arterias uterinas es una técnica de radiología intervencionista mínimamente invasiva que está indicada en pacientes con miomas sintomáticos. Es una alternativa para aquellas pacientes que tienen contraindicada la cirugía o desean preservar el útero (Stewart, 2015). Este procedimiento tiene una tasa de satisfacción similar a la histerectomía y la miomectomía y ofrece la ventaja de tener una estancia hospitalaria más corta con un retorno más rápido a las actividades rutinarias. Sin embargo, se asocia con una mayor tasa de complicaciones menores y una probabilidad del 15–32% de requerir una intervención quirúrgica entre los dos y cinco años posteriores al procedimiento inicial (Gupta *et al.*, 2012). La EAU afecta al útero completo, no solo a los miomas, y

aunque parece que induce necrosis isquémica de los miomas y posteriormente se produce una revascularización del resto de miometrio, esta afectación global puede afectar a la función uterina y ovárica de manera permanente (Giuliani *et al.*, 2020). Debido a la controversia sobre la seguridad en los embarazos futuros y el posible deterioro de la reserva ovárica su uso está actualmente no está en las mujeres en edad fértil (Stewart, 2015).

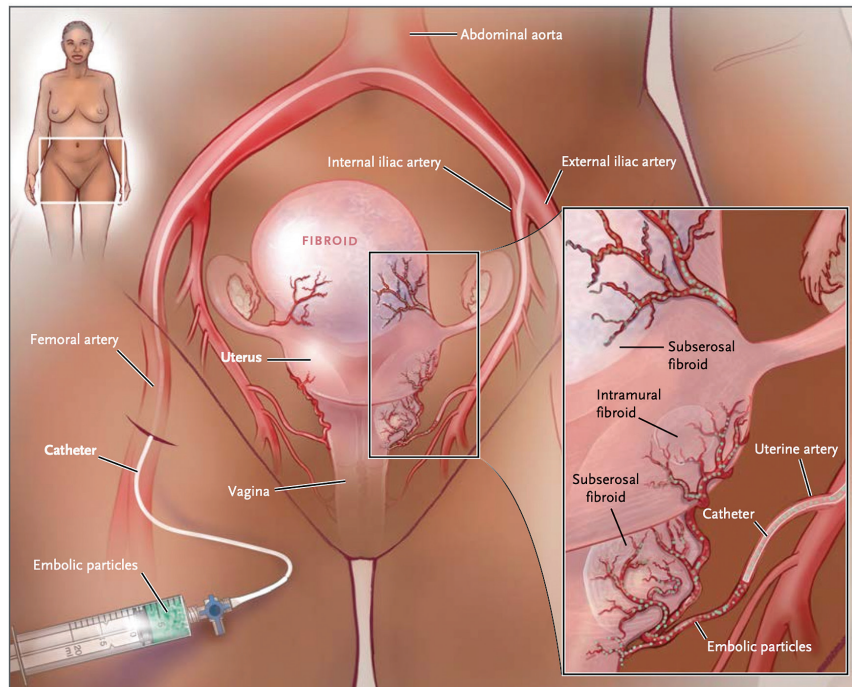


Imagen extraída de (Stewart, 2015).

FIGURA 16.

Embolización de las arterias uterinas.

Se emplea la ablación percutánea del útero miomatoso para inducir necrosis isquémica de los miomas con revascularización posterior del resto de miometrio. Se utiliza un catéter que se introduce en la arteria femoral para administrar partículas embólicas a ambas arterias uterinas.

1.9.4.2. Miólisis

La miólisis engloba diferentes técnicas y se basa en la destrucción de los miomas mediante la aplicación de energía. La ablación con ultrasonido focalizado de alta intensidad (HIFU) es un tratamiento mínimamente invasivo que se realiza bajo la guía de ultrasonidos o RMN y produce coagulación focal y necrosis del mioma sin alteración del miometrio normal circundante (Lee & Yu, 2016).

El ultrasonido focalizado guiado por resonancia magnética nuclear (MRgFUS)

está más extendido que el guiado por ecografía. Es un procedimiento no invasivo que no precisa ingreso ni anestesia, indicado principalmente en miomas intramurales, con el que se obtienen resultados comparables a otros tratamientos (Pérez-López *et al.*, 2014). Presenta algunas contraindicaciones como la presencia de cinco o más miomas, miomas pediculados, miomas grandes de más de diez centímetros, estado posmenopáusico y adenomiosis grave (Giuliani *et al.*, 2020). El MRgFUS es una técnica segura, eficiente y rentable para el tratamiento de los miomas uterinos sintomáticos que mejora la calidad de vida y la fertilidad (Gizzo *et al.*, 2014). Los efectos secundarios son poco comunes e incluyen quemaduras locales en piel y neuropatías pélvicas reversibles (Stewart, 2015). Hasta el 30% de las mujeres pueden necesitar alguna intervención adicional dos años después del tratamiento, (Jacoby *et al.*, 2016). Los datos sobre embarazos exitosos tras MRgFUS son escasos y es necesaria más investigación al respecto (Giuliani *et al.*, 2020).

La **miólisis por radiofrecuencia** es una técnica eficaz, segura y mínimamente invasiva que induce una necrosis coagulativa del mioma consiguiendo una reducción de su tamaño (Luo *et al.*, 2007). Puede ser realizada mediante abordaje lapa-

roscópico o guiado por ecografía (Pérez-López *et al.*, 2014). **La radiofrecuencia por laparoscopia** produce menos pérdida sanguínea y estancias hospitalarias más cortas que la miomectomía laparoscópica (Brucker *et al.*, 2014). Además, reduce significativamente el volumen de los miomas (a los 12 meses disminuye un 66%), mejora la calidad de vida y se consiguen tasas de reintervención favorables (tasa acumulativa anual de 4,2 %, 8,2 % y 11,5 % durante 3 años) (Bradley *et al.*, 2019). Sin embargo, como en los anteriores procedimientos, los datos sobre los resultados en embarazos posteriores a la técnica son escasos (Keltz *et al.*, 2017).

La **criomiólisis y la termocoagulación** laparoscópica se basan en la supresión del flujo sanguíneo debido a temperaturas extremas con la consecuente reducción del tamaño de los miomas. Son considerados procedimientos experimentales, ya que los datos disponibles son insuficientes para recomendar su uso. El **láser Nd:YAG**, también ha demostrado ser eficaz, pero su elevado precio, la fragilidad de las fibras y el riesgo de adherencias postoperatorias han limitado su uso generalizado (Donnez & Dolmans, 2016; Pérez-López *et al.*, 2014).

1.10. VASCULARIZACIÓN Y ANGIOGÉNESIS DEL ÚTERO Y LOS MIOMAS

1.10.1. La vascularización uterina

La vascularización del útero depende de una red anastomótica que se origina en las arterias uterinas, ováricas y vaginales (Ramsey, 1994). La arteria uterina es una

rama de la arteria ilíaca interna y es el suministro vascular principal del útero. En su trayecto presenta tres segmentos: uno descendente, paralelo a la pared pélvica; un segmento transversal, que cruza al uréter a nivel del cérvix, y un segmento ascendente, que discurre por la cara lateral uterina (Pelage *et al.*, 2005). La arteria uterina da ramas cervicovaginales, al penetrar en el interior del miometrio, forma las arterias arcuatas circunferenciales, que a su vez se ramifican, dando lugar a las arterias radiales. Estas últimas atraviesan el miometrio y alcanzan el endometrio, donde forman arteriolas basales y espirales. La arteria uterina continúa ascendiendo paralela al útero y a nivel del mesosálpinx se anastomosa con la circulación ovárica (Figura 17) (Ramsey, 1994).

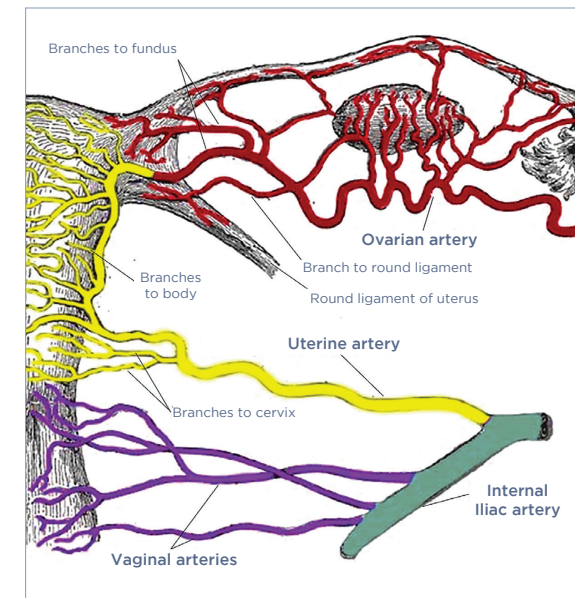


Imagen extraída de (Ciarmela *et al.*, 2022).

FIGURA 17. Vascularización del útero.

1.10.2. La vascularización de los miomas

La arteria uterina es el vaso principal que perfunde los miomas, y en su presencia, esta se encuentra agrandada y distorsionada. Las arterias ováricas proporcionan un aporte sanguíneo adicional hasta en un 5-10 % de los miomas (Pelage *et al.*, 2005).

La vascularización de los miomas ha sido estudiada por diferentes técnicas como la ecografía *Doppler*, inmunohistoquímica y microscopía electrónica (Ciarmela *et al.*, 2022). Mediante estas técnicas se pone de manifiesto que los miomas presentan un rico plexo vascular perifibroide, formado por arterias que suelen tener un tamaño mayor que las del resto del miometrio, que irriga la periferia del tumor (Pelage *et al.*, 2005). Sin embargo, el interior del tumor está menos vascularizado y está irrigado por pequeñas arterias centrípetas que se originan en ese plexo perifibroide (Poncelet *et al.*, 2002; Sampson, 1912). Mediante técnicas de microscopía electrónica se evidencia que los miomas de tamaño pequeño (1-3 mm) son prácticamente avasculares y están rodeados por pequeños vasos que invaden la lesión desde la periferia; aquellos de mayor tamaño (>1cm) contienen una red caótica de vasos sanguíneos, en su mayoría capilares, arteriolas y vénulas, con una densidad vascular similar o inferior al miometrio y a su alrededor presentan una capa vascular de gran densidad (Walocha *et al.*, 2003). Se han encontrado los mismos hallazgos mediante ecografía *Doppler* mostrando este aumento del flujo sanguíneo de la región que rodea el mioma en comparación con el interior del mismo (Figura 18) (Tsiligiannis *et al.*, 2013).

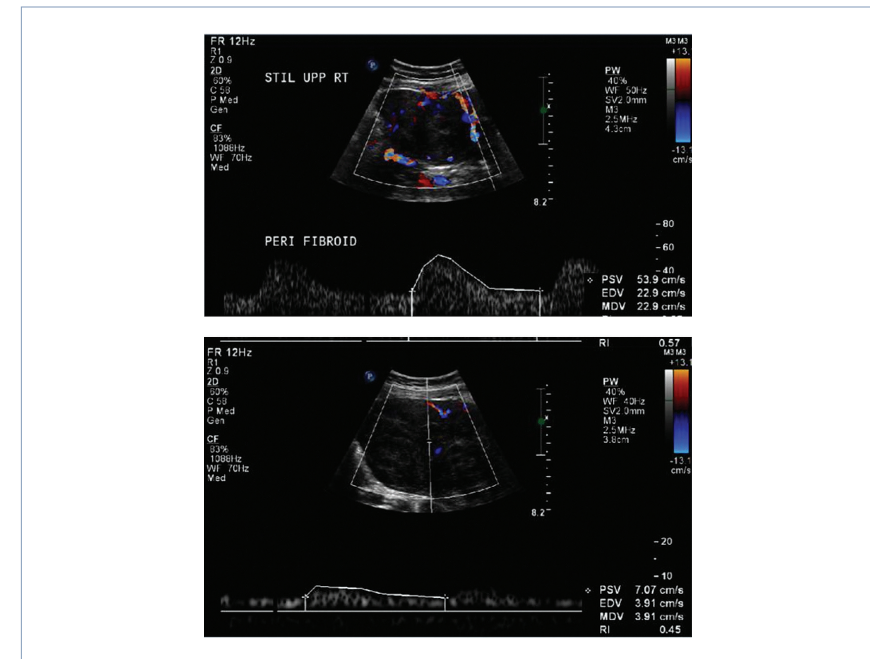


Imagen extraída de (Tsiligiannis *et al.*, 2013).

FIGURA 18.

Vascularización de los miomas visualizada mediante ecografía *Doppler*.

En la imagen de arriba se observa flujo moderado alrededor del mioma y en la de abajo flujo escaso en el interior del mismo.

1.10.3. La angiogénesis

La angiogénesis se define como la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de otros ya existentes y es considerada un proceso esencial para el crecimiento y desarrollo de los tejidos (Tal & Segars, 2014). Podemos distinguir dos tipos de angiogénesis, una fisiológica y otra patológica. La primera se asocia a procesos de regeneración tisular y a cambios en el aparato reproductor. En las mujeres, se produce

angiogénesis de manera cíclica para conseguir un aporte sanguíneo correcto en el endometrio, folículo y cuerpo lúteo, así como para facilitar el posterior mantenimiento del embarazo participando en la formación de la placenta (Figura 19). A nivel uterino, las hormonas esteroideas gonadales, estrógeno y progesterona, son las principales reguladoras de la angiogénesis (Fraser & Duncan, 2008). La angiogénesis patológica tiene lugar, entre otros procesos, durante el crecimiento tumoral o la inflamación crónica (Griffioen & Molema, 2000).

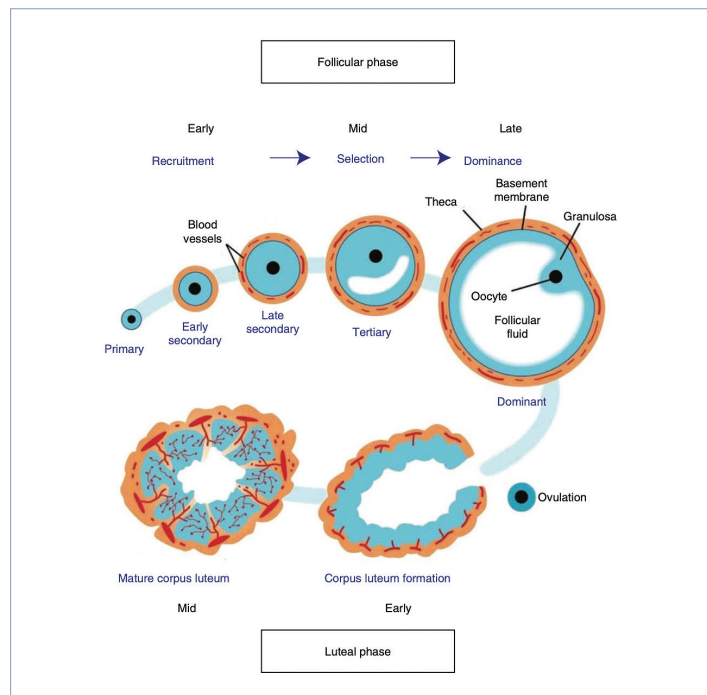


Imagen extraída de (Fraser & Duncan, 2008).

FIGURA 19.

La angiogénesis en el ciclo ovárico.

En la ovulación, la membrana basal se rompe y, en asociación con una intensa angiogénesis, los vasos sanguíneos invaden el cuerpo lúteo.

1.10.3.1. La angiogénesis en los miomas

Se ha demostrado que el estrógeno y la progesterona regulan al alza la expresión de múltiples factores angiogénicos en el tejido miometrial y los miomas. El crecimiento de estos depende de estas hormonas, debido a la inducción local de factores angiogénicos que favorecen la vascularización del tumor (Tal & Segars, 2014).

Existe evidencia de que la angiogénesis desregulada, con un aumento de los factores proangiogénicos, juega un papel fundamental en la fisiopatología de los miomas, pudiendo contribuir al desarrollo inicial del tumor (Ciarmela *et al.*, 2011). En los miomas hay múltiples factores de crecimiento con actividad angiogénica que muestran una expresión alterada y son probablemente los responsables de las anomalías vasculares observadas en esta enfermedad. Algunos de los factores que se expresan de manera diferente al resto del útero son el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento ligado a heparina (HB-EGF), ADM, VEGF, bFGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y TGF β (Figura 20) (Tal & Segars, 2014).

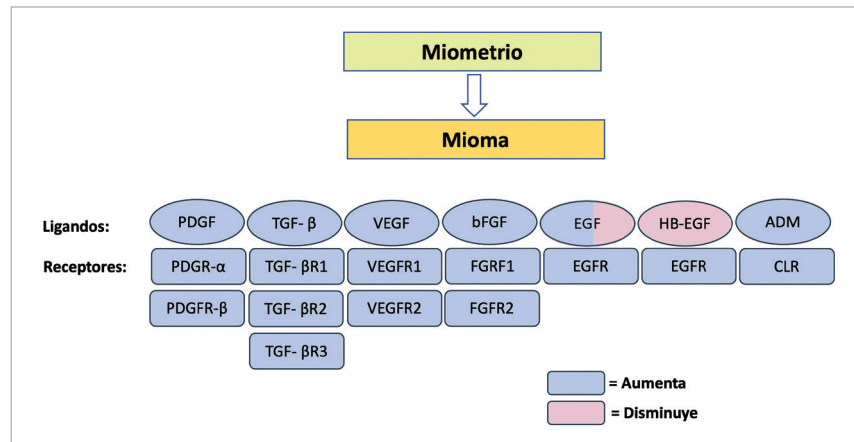


Imagen adaptada de (Tal & Segars, 2014).

FIGURA 20.

Cambios en la expresión de los factores de crecimiento angiogénicos y sus receptores en los miomas en comparación con el resto del miometrio.

Los círculos son los factores de crecimiento angiogénico, mientras que los rectángulos representan sus receptores. En azul los que se encuentran incrementados y en rosa aquellos con una menor expresión.

Se sabe que el factor inducible por hipoxia 1α (HIF-1α) permite que los tejidos se adapten a la hipoxia aumentando la angiogénesis (Ciarmela *et al.*, 2022). Los miomas presentan un ambiente hipóxico, pero no expresan HIF-1α, por lo que el núcleo del tumor es relativamente hipovascular. Sin embargo, en el miometrio de alrededor hay una sobreexpresión de HIF-1α y genera una cápsula vascularizada que rodea al mioma. Desde dicha cápsula vascular llega el aporte sanguíneo al tumor en crecimiento y a la vez, favorece la vascularización desde la periferia del tumor hacia el miometrio circundante, explicando los sangrados abundantes de estas pacientes y la tendencia hemorrágica durante la miomec-tomía (Figura 21) (Mayer *et al.*, 2008; Tal & Segars, 2014).

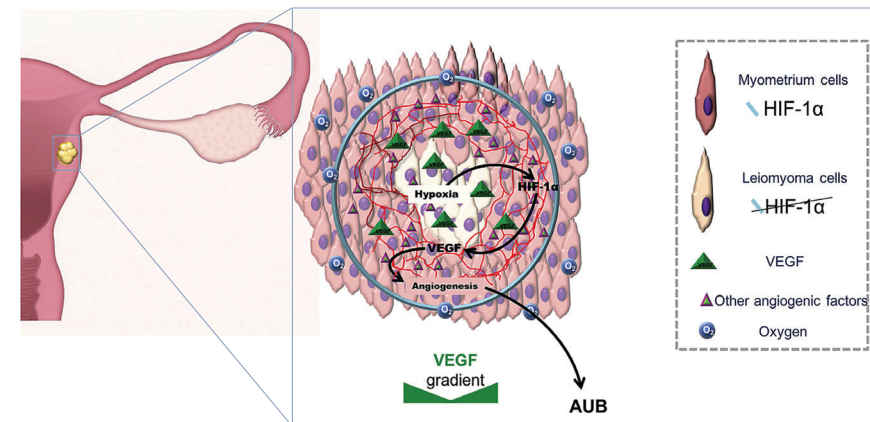


Imagen extraída de (Ciarmela *et al.*, 2022).

FIGURA 21.

Patogénesis de la vascularización de los miomas.

Estos tumores muestran un núcleo avascular dentro de una cápsula vascularizada (líneas rojas). Aunque los miomas son hipóxicos, no expresan HIF-1α. Sin embargo, HIF-1α (líneas azul claro) se encuentra incrementado en las células del miometriales (rosa oscuro). Por otro lado, se expresan diversos factores angiogénicos (pequeños triángulos morados y verde claro) y VEGF (triángulos verdes oscuro) en las células del miometrio y del mioma, estableciéndose un gradiente de concentración de VEGF dentro del mioma. Este gradiente aumenta desde la parte interna hacia la zona periférica del mioma. Todo esto puede explicar la cápsula vascularizada que crece alrededor de los miomas y los fenómenos de sangrado uterino anormal que presentan estas mujeres. Las flechas negras muestran todo el proceso desde la hipoxia hasta el sangrado uterino anormal.

Por otro lado, la presencia de diversas alteraciones genéticas en los miomas puede influir en la respuesta inadecuada a los estímulos angiogénicos (G. Levy *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la HMGA2 juega un papel clave en la regulación de la angiogénesis (Griffin *et al.*, 2019; Sakata *et al.*, 2019) y en aquellos miomas con esta mutación existe un aumento de los factores angiogénicos y, en consecuencia, aumento de la proliferación celular y migración de células endo-

teliales, dando lugar a una mayor tasa de crecimiento. Por ello, los miomas con sobreexpresión de HMGA2 tienden a presentar más vascularización y ser más voluminosos (Ferrero H., 2020; Li *et al.*, 2020).

1.10.3.2. Terapias antiangiogénicas y miomas

La respuesta hipóxica y angiogénica aberrante que presentan los miomas, puede hacerlos vulnerables a la interrupción de su suministro vascular, una característica que podría aprovecharse con fines terapéuticos (Tal & Segars, 2014). Además, el tratamiento antiangiogénico actúa principalmente sobre los vasos sanguíneos inmaduros y proliferativos y no en los vasos maduros rodeados de pericitos.

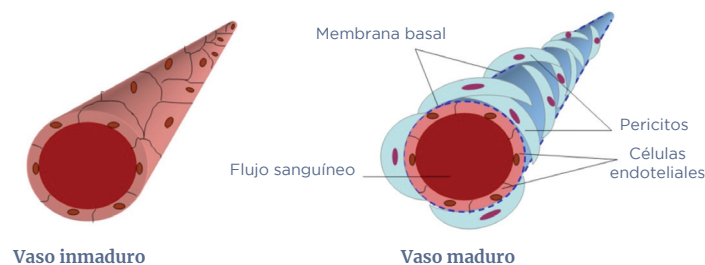


FIGURA 22.

Diferencias morfológicas entre un vaso inmaduro y maduro.

Los aGnRH disminuyen la expresión de factores relacionados con la angiogénesis, posiblemente mediado por la regulación a la baja de los estrógenos y la progesterona. Gracias a esto disminuye el suministro de sangre tanto a los miomas como al tejido miometrial circundante con la consecuente reducción del tamaño de los tumores (Ciarmela *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2010).

Un estudio con el SPRM asoprisnil mostró una reducción moderada en el flujo sanguíneo de la arteria uterina gracias a un efecto antiangiogénico (Wilkens *et al.*, 2008). Se demostró que estos efectos están asociados con la regulación a la baja de los factores angiogénicos VEGF, ADM, TGF β y EGF y sus receptores en las células de mioma sin afectar a las células miometriales normales (Ohara *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2006). Estos datos sugieren que los SPRM pueden inducir la reducción del mioma a través de un mecanismo antiangiogénico.

El efecto de la EUA también se basa en una isquemia uterina transitoria que afecta tanto al miometrio como a los miomas, y aunque se observa una reperusión del resto del tejido miometrial, en los miomas isquémicos se produce un infarto irreversible (Scheurig-Muenkler *et al.*, 2010).

En el campo de la ginecología, la mayoría de los estudios experimentales y ensayos clínicos con compuestos antiangiogénicos se han centrado en las neoplasias malignas y la endometriosis (Tal & Segars, 2014). En los últimos años también se han investigado algunas terapias antiangiogénicas para el tratamiento de miomas. Por ejemplo, basado en estudios previos donde se observó que la expresión de ADM era mayor en el tejido de los miomas en comparación con el miometrio y que esto estaba correlacionado con su índice de proliferación endotelial y densidad vascular (Hague *et al.*, 2000), Nikitendo *et al.* investigaron si el receptor de ADM, *Calcitonin receptor-like receptor* (CLR), podría ser efectivo como diana antiangiogénica. Los investigadores demostraron en un primer lugar que la ADM inducía la proliferación y migración de las células endoteliales del miometrio *in vitro*. Posteriormente, en un modelo *in vivo*, evidenciaron que CLR se localizaba exclusivamente en el endotelio de los miomas y del miometrio adyacente. Sin embargo, los niveles de CLR eran inferiores en los tumores

respecto al miometrio de alrededor, coincidiendo este hallazgo con una menor densidad vascular en los miomas (Nikitenko *et al.*, 2006). Por otro lado, la curcumina presenta propiedades antineoplásicas y antiangiogénicas, demostrando tener un efecto antiproliferativo en las células de mioma a través de la regulación de la apoptosis (Malik *et al.*, 2020).

A diferencia de la enfermedad metastásica, en la que es necesaria la administración sistémica de fármacos, los miomas son lesiones tumorales bien delimitadas. Por ello, uno de los desafíos de la terapia angiogénica es apuntar selectivamente a la vascularización del mioma sin afectar al miometrio u ovarios circundantes. Una manera de conseguir un efecto selectivo sobre la vascularización de los miomas sin dañar a otros tejidos no diana es empleando terapia génica. En un modelo animal de mioma se empleó terapia génica con un vector adenoviral portador del gen de la timidina cinasa del virus herpes simple 1 (*herpes simplex virus 1 thymidine kinase gene* [HSV1TK]) seguido de tratamiento con ganciclovir, y se obtuvo una disminución del volumen de los miomas, con un aumento de la apoptosis y no se encontraron eventos adversos asociados (Hassan *et al.*, 2009).

No obstante, en la actualidad el papel de las terapias antiangiogénicas en los miomas uterinos es limitado. Por tanto, se debe profundizar en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la angiogénesis miometrial normal y patológica, para poder diseñar terapias antiangiogénicas que actúen de manera selectiva sin asociar toxicidad.

Atendiendo a esta estrategia, buscamos un compuesto con potencial terapéutico en los miomas. Entre las diferentes opciones, investigamos el ácido poli-

nosina-policitidílico (pIC) y su efecto sobre estos tumores. Dadas las implicaciones que tiene en el desarrollo de esta tesis, a continuación, expondremos las principales características de este compuesto.

1.11. ÁCIDO POLIINOSINA-POLICITIDÍLICO

El ácido poliinosina-policitidílico (pIC o PolyI:C) es un ARN sintético de doble cadena que fue sintetizado hace más de cinco décadas. Originalmente se describió como un elemento que ejercía efectos antitumorales tras estimular al sistema inmune a través de la vía del interferón (Field *et al.*, 1967; H. B. Levy *et al.*, 1969). Sin embargo, posteriormente se observó que en modelos murinos inmunodeprimidos también seguía siendo efectivo (Bergé *et al.*, 2010), por lo que se postuló que el mecanismo de acción era distinto o presentaba otro adicional.

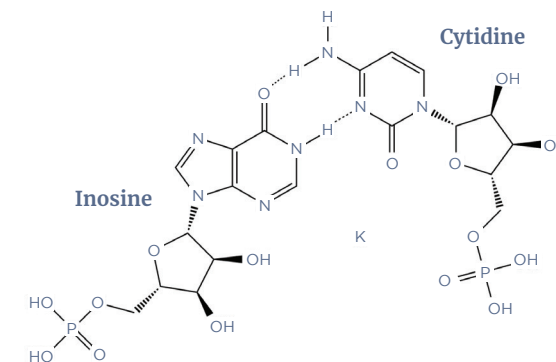


FIGURA 23. Estructura del ácido poliinosina-policitidílico.

Se ha descrito que pIC puede producir efectos terapéuticos a través de la estimulación de la vía del receptor tipo toll-3 (TLR3) / interferón (Bergé *et al.*, 2010). A través de la vía de TLR3, este compuesto induce un aumento de secreción de interferón-beta (IFN- β) y estimula la inmunidad antitumoral mediante la activación de las células *natural killer* (NK) (Huang *et al.*, 2013). Otro mecanismo por el cual consigue efecto antitumoral es desencadenando la apoptosis y frenando el crecimiento del tumor a través de la inactivación de la vía PI3K/Akt (Harashima *et al.*, 2012). Por otro lado, pIC ejerce una acción antiangiogénica estimulando el receptor de membrana celular TLR3 (Bergé *et al.*, 2010; Blumberg, 1974; Kleinman *et al.*, 2008) e induciendo cambios en la permeabilidad de las células endoteliales (Fischer *et al.*, 2009).

Los cambios en la angiogénesis pueden generar problemas de toxicidad (Blumberg, 1974). Sin embargo, el perfil de seguridad de pIC en diversos estudios se ha mostrado favorable, con una baja tasa de efectos adversos (Field *et al.*, 1967; Lampson *et al.*, 1972). En un ensayo en 24 pacientes con cáncer e infecciones virales concomitantes los efectos adversos más frecuentes fueron fiebre en 21 pacientes, elevación leve de las enzimas hepáticas en 8 pacientes y anomalías en parámetros de la coagulación en 9 pacientes, que aparecieron relacionadas con la dosis empleada. Todas estas anomalías fueron reversibles y ninguna se consideró grave o potencialmente mortal (Freeman *et al.*, 1977).

A pesar de que algunas publicaciones en modelos animales describieron una potente actividad antitumoral asociada a un bajo perfil tóxico (H.B. Levy *et al.*, 1969), otros ensayos clínicos posteriores con pIC mostraron poca estabilidad y no encontraron efecto antitumoral (Robinson *et al.*, 1976). Debido a esto, durante años no

se avanzó en el estudio de este compuesto. Posteriormente, se retomó el interés en esta molécula y diferentes estudios encontraron efectos beneficiosos de pIC a través de la activación de la inmunidad antitumoral, como por ejemplo en un modelo murino de cáncer de cérvix (Cui & Qiu, 2006) o en cáncer de pulmón metastásico (Forte *et al.*, 2012).

Por otro lado, como algunos datos sobre el pIC no fueron positivos, se realizaron estudios posteriores con complejos de pIC asociado a otros compuestos como poli-L-lisina, carboximetilcelulosa, liposomas o polietilenimina (PEI) observando que de esta manera se incrementaba su actividad antitumoral (Fujimura *et al.*, 2006; Levine *et al.*, 1979; Pollack *et al.*, 2014).

En el trabajo de Tormo *et al.* en un modelo murino de melanoma, reportaron que la combinación de pIC con PEI [pICPEI], mejoraba significativamente la capacidad de pIC para ejercer su acción y además resultaba fundamental para mantener un programa transcripcional persistente con actividad antitumoral. Se demostró que el complejo [pICPEI] promueve la hiperactivación selectiva de la autofagia en células malignas, y activa las caspasas proapoptóticas induciendo la apoptosis. La convergencia de la autofagia sostenida y la activación de caspasas actúan de forma sinérgica en la destrucción tumoral (Figura 24) (Alonso-Curbelo & Soengas, 2010; Tormo *et al.*, 2009).

Debido a la capacidad antiangiogénica y la inducción de la apoptosis que este compuesto ejerce sobre los tumores, así como la baja toxicidad asociada, [pICPEI] podría ser un tratamiento potencial en patología benigna. De hecho, un estudio evaluó el efecto de este compuesto en un modelo murino heterólogo de endometriosis, mostrando efectos proapoptóticos y antiangiogénicos en los implantes endometriósicos (García-Pascual *et al.*, 2015).

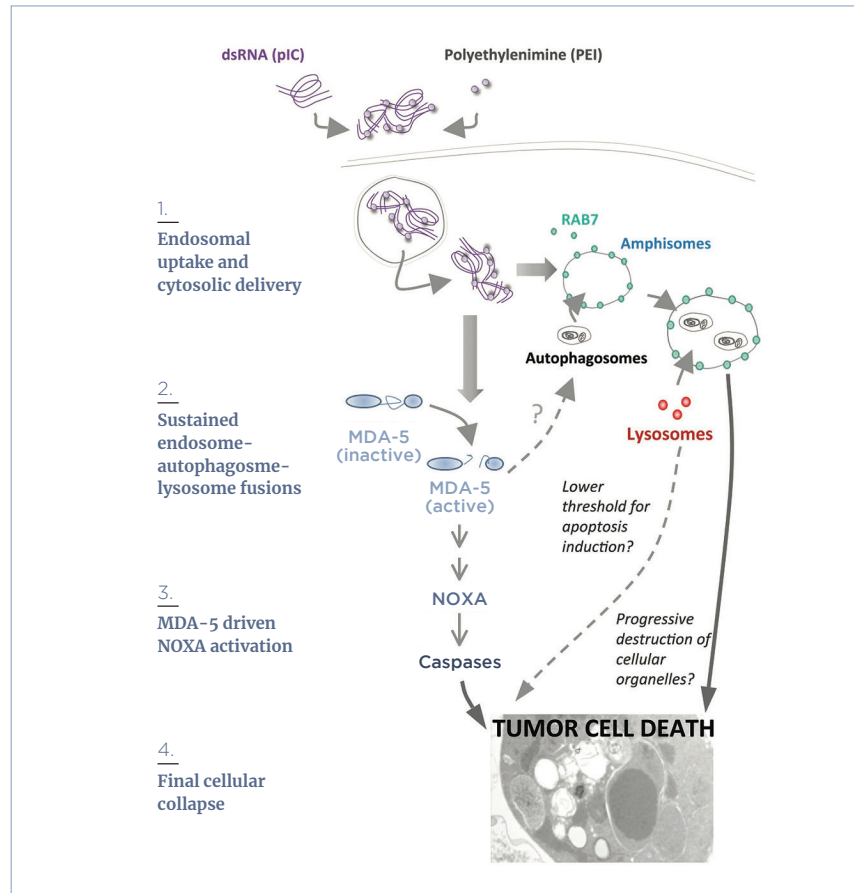


Imagen extraída de (Alonso-Curbelo & Soengas, 2010).

FIGURA 24.

Modelo propuesto de cómo [pICPEI] induce actividad antimelanoma.

El [pICPEI] es absorbido de manera eficiente por el compartimento endosomal de las células tumorales para su posterior liberación en el citosol (1). Este compuesto altera la dinámica endosomal e induce de manera sostenida ciclos de fusión endosoma-autofagosoma-lisosoma (2). Además, pIC a nivel del citosol activa la enzima helicasa MDA5 (proteína 5 asociada a la diferenciación de melanoma), favoreciendo la activación del factor proapoptótico NOXA y consecuentemente de las caspasas apoptóticas (3). La convergencia de la autofagia sostenida y la activación de caspasas se sinergizan en una autodestrucción tumoral eficiente (4).

Por todo esto, hipotetizamos que [pICPEI], que inició su comercialización temprana con el nombre de BO-110, podría ser un compuesto con potencial terapéutico en los miomas. Para realizar este trabajo de investigación, revisamos diferentes modelos animales con el fin de seleccionar el más idóneo.

1.12. MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LOS MIOMAS

Para el estudio de posibles nuevos tratamientos es fundamental disponer de un modelo animal adecuado. Aunque se han diseñado diversos modelos, la mayoría de ellos no representa debidamente la enfermedad humana (Malik *et al.*, 2020). Los roedores parecen ser los más apropiados para llevar a cabo nuestra investigación y para seleccionar el más idóneo, revisamos los diferentes modelos murinos en miomas.

Uno de los primeros modelos *in vivo* de mioma fue la cepa de ratas Eker que desarrolla tumores espontáneos en el útero (Everitt *et al.*, 1995; Howe *et al.*, 1995). Las ratas Eker presentan mutaciones en el complejo de la esclerosis tuberosa 2 (Tsc2) que las predispone a la formación de tumores espontáneos en diferentes órganos como el riñón, el útero, el bazo y los pulmones (Howe *et al.*, 1995). El 65% de estos animales desarrolla miomas uterinos entre los 12 y los 16 meses de edad y, aunque con menos frecuencia, también leiomiomas (Howe *et al.*, 1995). No obstante, este modelo animal tiene sus limitaciones como la dependencia exclusiva de estrógeno para el crecimiento de los miomas (sin jugar un papel la progesterona), la predisposición a leiomiomas, las diferencias entre especies y su alto coste (Hassan *et al.*, 2008).

Por ello, se han diseñado diferentes modelos alternativos, aunque con limitaciones similares, como los ratones transgénicos Tsc2-null en los que se forman miomas a las 24 semanas (Prizant *et al.*, 2013) o un modelo murino que expresa una mutación en el gen MED12 que también conduce a la formación de estos tumores. Sin embargo, los tumores no son de origen humano y, además, no en todos los miomas están implicadas mutaciones en dicho gen (Mittal *et al.*, 2015).

En los últimos años se han optimizado los modelos murinos usando xenoinjerto de tejido humano en ratones inmunodeficientes. En la mayoría de los estudios se injerta tejido de mioma de origen humano o se inyectan células de mioma por vía subcutánea, bajo el riñón o a nivel intrauterino (Drosch *et al.*, 2013; Hassan *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2018; Wang & Shozu, 2014). Algunos trabajos apuntan que el tejido de mioma injertado requiere transfección con vectores adenovirales portadores de ciclooxigenasa-2 y VEGF-A para promover su supervivencia (Hassan *et al.*, 2008), por el contrario, otras publicaciones concluyen que las células de mioma primario pueden crecer en ausencia de la transfección viral auxiliar (Drosch *et al.*, 2013). Los modelos murinos inmunodeprimidos, al no presentar respuesta inmune, no pueden rechazar tejidos heterólogos trasplantados. Ejemplo de ellos son los ratones atímicos (Nude-NU), que carecen de células T maduras; los ratones con inmunodeficiencia combinada severa (*severe combined immunodeficient* [SCID] en inglés), que presentan una deficiencia congénita en la función de los linfocitos T y B; los ratones (NOD)-SCID (*non-obese diabetic severe combined immunodeficient*) que además son deficientes en células NK, y NOD/SCID/γCnull(NOG) que combina la incompetencia funcional de las células T, B y NK con la alteración en la capacidad de producción de citocinas. Hay que tener en cuenta que, aunque sea una gran ventaja el empleo de tejido de mioma humano, no siempre es factible la obtención de muestras en fresco obtenidas de biopsias o cirugías.

Por todo ello, tras revisar los diferentes modelos animales, decidimos que el modelo más adecuado para nuestra investigación era un modelo murino inmunodeprimido que nos permitiera emplear xenoinjerto de mioma humano.

1.13. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Los miomas uterinos son los tumores benignos más frecuentes en las mujeres en edad reproductiva, pudiendo interferir en la fertilidad y asociando síntomas que afectan a su calidad de vida. Actualmente no existe un tratamiento totalmente satisfactorio para esta enfermedad por lo que es de gran importancia la investigación de nuevas terapias. Basándonos en el papel clave de la angiogénesis en el desarrollo y crecimiento de los miomas, el empleo de fármacos con actividad antiangiogénica puede ser una alternativa terapéutica potencial. En esta tesis investigamos si la acción selectiva y eficaz de [pICPEI] frente a tumores malignos podría ser de utilidad en el tratamiento de los miomas. Este compuesto tiene un buen perfil de seguridad con escasa toxicidad, presenta actividad antiangiogénica e induce de manera selectiva la autofagia y apoptosis en un gran espectro de células tumorales. No obstante, su efecto en células tumorales benignas es desconocido. Por ello, en la presente tesis hemos desarrollado un modelo murino heterólogo con tejido de mioma humano para el estudio *in vivo* del compuesto [pICPEI].

2 HIPÓTESIS

El compuesto [pICPEI] puede ser eficaz en el tratamiento de los miomas debido a sus propiedades antiangiogénicas, proapoptóticas y antiproliferativas. Este efecto lo realiza de manera selectiva sobre los tumores, y como consecuencia de él, se podría obtener una reducción del tamaño de los miomas.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo principal de este estudio es evaluar el efecto de [pICPEI] sobre el tamaño de los miomas uterinos con el fin de determinar su potencial papel terapéutico.

3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Determinar *in vitro* la potencial actividad proapoptótica del [pICPEI] sobre las células de mioma de manera selectiva.
- Determinar *in vivo* en un modelo murino heterólogo de mioma humano el efecto sobre la angiogénesis, la proliferación celular y la apoptosis.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. ÁMBITO DEL ESTUDIO

El reclutamiento de pacientes y la obtención de muestras fue realizada en el servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. El estudio posterior de las muestras obtenidas se llevó a cabo en los laboratorios del departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia.

4.2. DISEÑO DEL ESTUDIO

Como paso previo a la experimentación funcional *in vivo*, se llevó a cabo estudio piloto inicial *in vitro* en el que se determinó la potencial actividad proapoptótica del [pICPEI] sobre las células de mioma.

Posteriormente, para la consecución de nuestro objetivo, realizamos la puesta a punto de un modelo animal heterólogo de mioma, para poder testar *in vivo* el funcionamiento del fármaco. Teniendo en cuenta que las ratonas no pueden desarrollar esta enfermedad, decidimos utilizar un modelo de xenotrasplante. Para evitar el rechazo del xenoinjerto de mioma humano se emplearon ratonas inmunodeprimidas, concretamente 48 ratonas *nude*, atímicas, de 5 semanas de edad (Charles River Laboratories, International, Inc., Wilmington, MA) que se subdividieron en 3 sets experimentales (n=16 por set). Debido a la dependencia hormonal de la enfermedad, las ratonas fue-

ron previamente ooforectomizadas evitando así la interferencia de las hormonas endógenas del animal y eliminando las variaciones interindividuales. Tras la ooforectomía se les implantó por vía subcutánea, bajo la piel del cuello, cápsulas de liberación lenta de 60 días que contenían 0,05 mg de 17 β -estradiol y 50 mg de progesterona. Una semana después se procedió a la implantación de 4 fragmentos de 3-5 mm³ de leiomiomas humano obtenido de mujeres sometidas a miomectomía laparoscópica. Estos fragmentos se implantaron en la cavidad peritoneal de cada animal con el uso del pegamento tisular n-butil cianoacrilato (3M Animal Care, St. Paul, MN).

Después de dejar que los implantes se establecieran y revascularizaran durante una semana, se procedió a la administración del tratamiento. Para ello se aleatorizó en dos grupos a los animales, un grupo control (n=8) que recibió vehículo salino por vía intravenosa y otro grupo tratamiento (n=8), a los que se les administró 0.6 mg/kg de [pICPEI] dos veces por semana durante 4 semanas.

Al finalizar el tratamiento los animales fueron sacrificados, se recuperaron los implantes y se determinó inmediatamente su tamaño. Tras ello, los implantes fueron procesados para la posterior realización de métodos inmunohistoquímicos y de inmunofluorescencia donde se evaluó la vascularización con el anticuerpo PECAM, marcador de células endoteliales, la proliferación celular utilizando el anticuerpo Ki67 y la apoptosis con el kit Apoptag®. Las imágenes obtenidas mediante un microscopio óptico y de fluorescencia (Nikon®) con una cámara digital acoplada, fueron cuantificadas utilizando un *software* de análisis de imagen Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Warrendale, PA). La existencia de diferencias significativas entre los dos grupos fue evaluada mediante test paramétricos y no paramétricos, considerando estadísticamente significativa una $p < 0,05$.

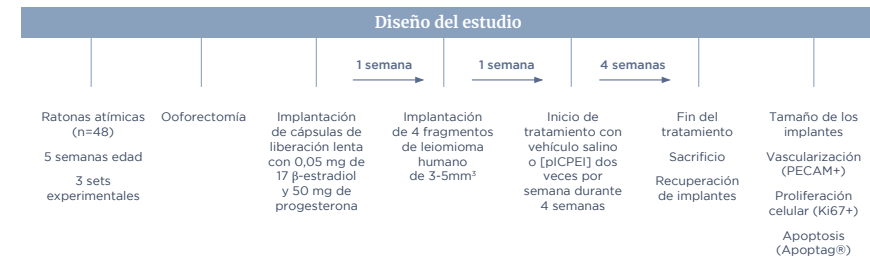


FIGURA 25.
Diseño del estudio.

4.3. OBTENCIÓN DE TEJIDO DE LEIOMIOMA Y MIOMETRIO HUMANO

Se obtuvo tejido de leiomioma y de miometrio normal de pacientes caucásicas (n=6) que fueron sometidas a miomectomía laparoscópica por miomas uterinos sintomáticos en el Hospital Universitario y Politécnico la Fe de Valencia. Los criterios de inclusión fueron mujeres que aceptaron participar en el estudio, previa obtención del consentimiento informado, con un rango de edad de 30 a 50 años, sin trastornos ginecológicos o neoplasias malignas y que no hubieran recibido ningún tratamiento hormonal durante al menos los 3 meses previos a la cirugía.

Tras disponer de los tejidos frescos, se colocaron inmediatamente a 4°C en un medio de mantenimiento (medio M199 [Gibco, Carlsbad, CA]) que contiene un 10% de suero bovino fetal (FBS, PAA, Piscataway, NJ), penicilina y estreptomina al 1% (Gibco) y 10 mmol/L de ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) y se transportaron al laboratorio para su procesamiento. Las muestras se diseccionaron para separar el leiomioma del resto de tejido miometrial.

La mitad de las muestras de leiomioma (n=3), así como el correspondiente tejido endometrial normal, se utilizaron para establecer un cultivo primario para estudios *in vitro*. Las muestras de leiomioma restantes (n=3) se procesaron para establecer un modelo de leiomioma murino para estudios *in vivo*.

4.4. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE [pICPEI] EN CÉLULAS DE LEIOMIOMA *IN VITRO*

Antes de realizar los estudios *in vivo*, se evaluaron los efectos *in vitro* sobre células de leiomioma para testar si [pICPEI] presentaba un efecto selectivo sobre células de leiomioma, sin ejercer su acción en las células miometriales normales.

4.4.1. Cultivo primario de células de leiomioma y miometriales normales

El leiomioma y los fragmentos de miometrio sano se trituraron en trozos de 1 a 2 mm³ y se digirieron enzimáticamente a 37°C con 2 mg/ml de colagenasa tipo II (Worthington, Lakewood, NJ) y 1 mg/ml de ADNasa tipo I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 1 hora con agitación constante. La mezcla se filtró a través de filtros de polietileno de 50 µm (Partec; Celltrics, Münster, Germany) para eliminar los grumos celulares y los tejidos no digeridos. El proceso de digestión enzimática y filtrado se repitió dos veces hasta obtener una suspensión unicelular. A continuación, las células se sembraron en placas de cultivo celular de seis pocillos a una densidad de 1 x 10⁵ células/pocillo con medio Eagle modificado de Dulbecco/mez-

cla de nutrientes F-12, DMEM/F-12 (Gibco) que contenía suero bovino fetal al 10% (PAA Laboratories) y solución antibiótica-antimicótica al 1% (Gibco).

4.4.2. Tratamiento con [pICPEI] y ensayos de muerte celular

Después de una incubación durante la noche en condiciones estándar (37°C y 5% de CO₂), las células se lavaron y posteriormente se cultivaron con vehículo (agua Milli-Q; EMD Millipore) o 1 µg/mL [pICPEI] durante 12, 24 o 48 horas. Para la preparación y la dosis de [pICPEI] nos basamos en la dosis ensayada que había mostrado efectos proapoptóticos claros sobre células de melanoma en cultivos *in vitro* (Tormo *et al.*, 2009).

El porcentaje de muerte celular se cuantificó con un ensayo de viabilidad celular (integridad de la membrana) mediante exclusión del colorante azul de tripano. Para los tiempos de observación posterior nos basamos en estudios previos (Cordell-Stewart & Taylor, 1973). El fundamento de esta técnica consiste en que las células viables, con membrana citoplasmática íntegra, excluyen el colorante y no se tiñen; en cambio el colorante sí que penetra en las células no viables con alteraciones de la membrana celular provocando que éstas se observen con una coloración azul (Figura 26).

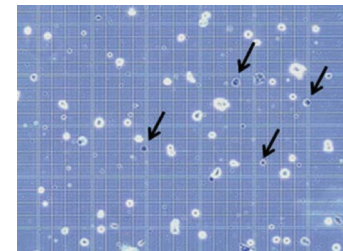


FIGURA 26.

Células teñidas con azul de tripano.

Las células que no captan el colorante son viables; las células no viables, con pérdida de la integridad de la membrana celular, se tiñen de azul (flecha negra).

Imagen extraída de (Hong *et al.*, 2011).

4.5. GENERACIÓN DE UN MODELO MURINO HETERÓLOGO DE LEIOMIOMA

4.5.1. Adquisición y procesado de los fragmentos de leiomioma humano

Tras la obtención de la pieza en fresco de leiomioma, esta se separó del tejido mio-metrial sano en el medio M199, se cortó en piezas de aproximadamente 3-5 mm³ y se fotografió junto a una regla de referencia. Posteriormente el tamaño de los implantes se calculó determinando la longitud de dos diámetros perpendiculares (D1, D2) con un calibrador y el área de la sección transversal de cada lesión según un método descrito previamente para formas ovoides ($D1 \times D2 \times \pi/4$) (Efstathiou *et al.*, 2005). Los fragmentos obtenidos se transportaron en medio M199 al laboratorio para facilitar su posterior implantación en las ratonas.

4.5.2. Preparación de los animales receptores

La cepa que se empleó como receptora de los implantes de leiomioma humanos fue la Crl:CD1-Foxn1^{nu} (Figura 27) desarrollado a partir de la transferencia del gen *nude* de Crl:NU-Foxn1^{nu} a un ratón CD-1[®] a través de una serie de cruces que comenzó en 1979 en los laboratorios Charles River. Este ratón es inmunodeficiente al carecer de timo y no producir células T.

En este estudio se utilizaron un total de 48 ratones *nude* hembra sin timo de 5 semanas de edad (Charles River Laboratories, International, Inc., Wilmington, MA). La ejecución experimental se subdividió en 3 sets experimentales (n=16 por set).

Cada set estaba formado por dos grupos de 8 animales correspondientes a los grupos experimental y control. Las ratonas se alojaron en condiciones libres de patógenos específicos, a 26°C, en un ambiente de horas controladas de luz con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y se alimentaron *ad libitum*. Todo el manejo se realizó en campanas de flujo laminar filtrado.



Imagen extraída de la web oficial de Charles River Laboratories.

FIGURA 27.
Ratón de la cepa Crl:CD1-Foxn1^{nu}.

Para evitar fluctuaciones en los niveles hormonales los animales fueron ooforectomizados. Esta cirugía se realizó tras la administración de analgesia (buprenorfina, 0,1 mg/kg) y con el uso de anestesia inhalatoria (5% isoflurano para inducción y 2% para mantenimiento), reduciendo así al mínimo el sufrimiento animal.

Para permitir la supervivencia del injerto de tejido y evitar variaciones interindividuales y las dependientes del ciclo, tras la ooforectomía, los niveles hormonales se homogeneizaron colocando cápsulas de liberación lenta de 60 días (Innovative Research of America) que contenían 0,05 mg de 17β-estradiol y 50 mg de progesterona por vía subcutánea, bajo la piel del cuello de los animales.

El estudio fue aprobado por el Comité de ética de Bienestar Animal de la Universidad de Valencia, de acuerdo con la normativa vigente y respetando los procedimientos de manejo y sacrificio recomendados por las legislaciones española y europea (Real Decreto 1201/2005, B.O.E. 252, 10 de octubre de 2005 104 y el Convenio Europeo 1-2-3, 18 de marzo de 1986).

4.5.3. Implantación del tejido en los animales receptores

Una semana después de la cirugía sobre la ratona, 4 fragmentos de leiomioma humano se fijaron en el peritoneo de cada animal usando el adhesivo n-butil cianoacrilato (3M Animal Care, St. Paul, MN).

Para la implantación del injerto, los animales fueron de nuevo anestesiados con isoflurano y posteriormente se les realizó una pequeña incisión en el abdomen para tener acceso al peritoneo de la pared abdominal e implantar el tejido. Tras ello, se suturó la pared abdominal. El procedimiento transcurrió sin complicaciones en todos los animales.

Los fragmentos de leiomioma usados para injertar a los animales en cada grupo (n=16) se obtuvieron de una misma paciente para evitar la variación interindividual en cada uno de los tres sets experimentales.

4.5.4. Intervenciones farmacológicas

Una semana tras la implantación de los leiomiomas, los animales de cada grupo se trataron con inyecciones en la vena lateral de la cola de 100 µL de vehículo de agua Milli-Q (n=8) o una dosis de 0,6 mg/kg de [pICPEI] (n = 8), dos veces por semana durante 4 semanas. La dosis de [pICPEI] ensayada había sido reportada previamente como óptima para ejercer efectos antitumorales en el tratamiento de melanoma sin efectos tóxicos significativos (Tormo *et al.*, 2009).

El comportamiento y peso de las ratonas fue monitorizado durante todo el proceso sin que se apreciaran alteraciones en estos parámetros en ninguno de los dos grupos de animales.

4.5.5. Sacrificio de los animales y recuperación de los implantes

Tras finalizar el tratamiento, los animales fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂ y se extirpó la cavidad peritoneal a fin de tener acceso a las lesiones para determinar el efecto de [pICPEI].

Al examen macroscópico se encontró que las vísceras eran morfológicamente normales en todas las ratonas. Los implantes de leiomioma fueron recuperados y fotografiados, y su tamaño (área) fue estimado nuevamente como se ha descrito anteriormente con el método para formas ovoides.

4.6. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE [PICPEI] SOBRE LOS IMPLANTES DE LEIOMIOMA MEDIANTE MÉTODOS DE INMUNOTINCIÓN

Tras la obtención de las muestras y la medición del tamaño, la mitad de los implantes se fijaron en formaldehído tamponado (neutro) al 4 % durante la noche a 4 °C para la caracterización histológica y la detección inmunohistoquímica de la proliferación celular. El resto de los implantes se embebieron en un compuesto de temperatura de corte óptimo, en inglés *optimal cutting temperature compound (OCT compound)* para posteriormente determinar la vascularización y la apoptosis mediante técnicas de inmunofluorescencia.

Antes de proseguir con el desarrollo de la metodología empleada en nuestra investigación vamos a describir sucintamente las generalidades de las técnicas de análisis de inmunotinción que hemos aplicado para poder tener una mejor comprensión de esta.

4.6.1. Procedimientos de inmunotinción

En bioquímica, la inmunotinción o inmunodetección es cualquier método basado en anticuerpos para detectar una proteína específica en una muestra celular o tisular. El término inmunotinción se usó originalmente para referirse a la tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido, como lo describió por primera vez Albert Coons en 1941 (Coons *et al.*, 1941). En la actualidad la inmunotinción engloba diferentes técnicas empleadas en histología, biología celular y molecular que utilizan diversos métodos de tinción basados en anticuerpos; dos de los más empleados son la inmunohistoquímica (IHQ) y la inmunofluorescencia (IF).

La inmunohistoquímica es un procedimiento que tiene como objetivo localizar y hacer visible un antígeno específico, generalmente proteínas, en secciones de tejido o células mediante el empleo de anticuerpos. La localización de una proteína proporciona información sobre su función. Aunque el antígeno se una a la molécula que queremos detectar, no será visible con el microscopio si no se conjugan con marcadores que aporten visibilidad. Este tipo de marcadores suelen ser de dos tipos: enzimas, que forman un precipitado de color o moléculas fluorescentes. Las enzimas más empleadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina. El uso de marcadores fluorescentes se denomina inmunofluorescencia (Figura 28) (Katikireddy & O'Sullivan, 2011).



FIGURA 28. Métodos inmunohistoquímicos (A) y de inmunofluorescencia (B).

Los anticuerpos son predominantemente de tipo inmunoglobulina G o M, y pueden ser poli- o monoclonales. Los primeros son una mezcla de inmunoglobulinas que derivan de diferentes linfocitos B. Esta mezcla de anticuerpos reconoce diferentes epítopos en el mismo antígeno y son más fáciles de obtener que los anticuerpos

monoclonales. Los segundos son inmunoglobulinas idénticas que derivan de un único clon de linfocitos B y reaccionan con un epítipo específico de un antígeno.

Por otro lado, para detectar la unión del anticuerpo a su antígeno se puede utilizar un método directo o indirecto. En el método directo, el anticuerpo primario se marca con una enzima o, en el caso de la fluorescencia, con un fluorocromo (Figura 29.A). En el método indirecto, el anticuerpo primario no está marcado y su unión se detecta mediante un anticuerpo secundario que tiene una enzima o un fluorocromo marcado (Figura 29.B). Con el método indirecto, se amplifica la señal al emplear diversos anticuerpos secundarios que pueden unirse al anticuerpo primario y hoy en día es el método más empleado (Katikireddy & O'Sullivan, 2011).

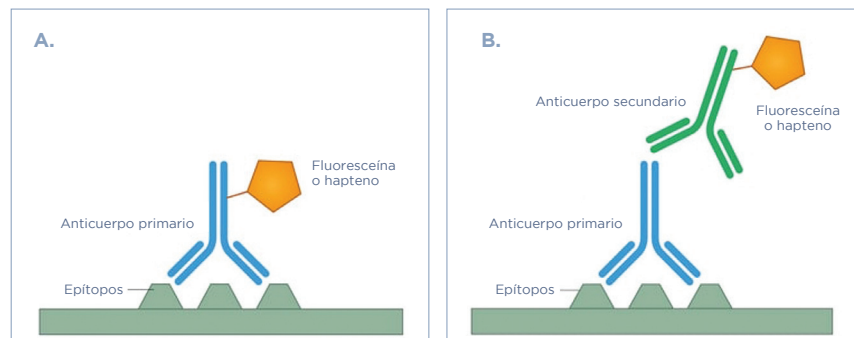


FIGURA 29.

Inmunohistoquímica con marcaje directo (A) o indirecto (B).

El método indirecto puede modificarse con la finalidad de amplificar aún más la señal obtenida. Una de las modalidades más empleadas es del complejo Avidina-Biotina (ABC). En él, la biotina, una vitamina hidrosoluble, se une a una serie de complejos de avidina/estreptavidina que a su vez se han unido a una enzima o

un fluorocromo (Figura 30.A). Otro ejemplo de método indirecto en varios pasos, es la técnica de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP). El método PAP utiliza un anticuerpo secundario para formar un puente entre el anticuerpo primario y el complejo PAP. El complejo PAP consta de una combinación de anticuerpos contra la peroxidasa de rábano picante y varias moléculas de peroxidasa de rábano picante. De este modo, el anticuerpo primario puede diluirse en gran medida, lo que reduce la tinción de fondo (Figura 30.B).

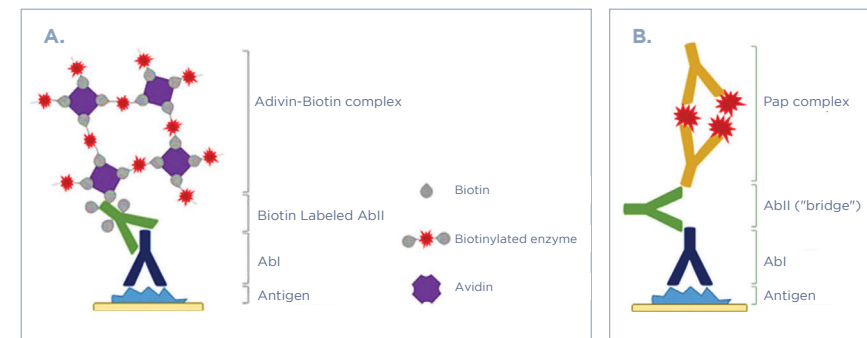


FIGURA 30.

Método del Complejo Avidina-Biotina (ABC) (A) y método PAP (B).

Este tipo de procedimientos se realizan sobre secciones de tejido previamente fijadas. Inmediatamente después se incuban en una solución de bloqueo que satura los posibles sitios de unión inespecífica, gracias a una alta concentración de proteína como la seroalbúmina bovina. Tras cada paso de unión de anticuerpos o del complejo avidina-biotina-peroxidasa se realizan lavados de los cortes con una solución de tampón fosfato, donde también están disueltos los anticuerpos. La reacción de la peroxidasa convierte la diaminobencidina y el peróxido de hidrógeno, en un producto insoluble y coloreado que permite ser visualizado con el microscopio óptico.

La **inmunofluorescencia** se basa en las propiedades de los fluorocromos, que son moléculas que emiten luz visible tras iluminarlas con una determinada longitud de onda. Actualmente suelen emplearse métodos de detección indirecta. Existe una amplia gama de fluoróforos disponibles, que proporcionan mayor brillo y fotoestabilidad. La fluorescencia requiere un microscopio específico (microscopía de fluorescencia) con un conjunto de filtros adecuados para las sondas fluorescentes empleadas. Aunque es el método de elección cuando se localiza una o más proteínas con una célula, tiene la desventaja de que la intensidad de la señal fluorescente va decreciendo con el paso del tiempo (Figura 31) (Katikireddy & O'Sullivan, 2011).

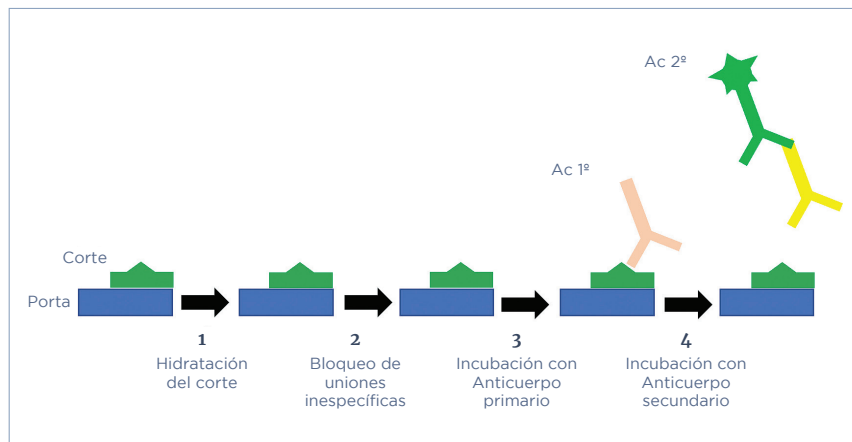


FIGURA 31.

Esquema de la reacción de la Inmunofluorescencia.

Así pues, existen numerosos métodos inmunohistoquímicos e inmunofluorescentes que pueden usarse para localizar y caracterizar diversos antígenos. La selección del método apropiado debe basarse en parámetros tales como el tipo de muestra o tejido a investigar y el grado de sensibilidad requerido.

4.6.2. Detección de la proliferación celular

Los implantes se fijaron en formaldehído tamponado (neutro) al 4% durante la noche a 4°C antes de incluirlos de forma rutinaria en cera de parafina y cortarse en secciones de 5 µm. Posteriormente, para evaluar la proliferación celular, se realizó tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal de origen murino dirigido frente al antígeno nuclear Ki67 (MIB-1, 1:50; DakoCytomation, Denmark).

Ki67 es una proteína nuclear necesaria para la proliferación celular. Se expresa durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis). Nunca se expresa en las células en reposo (G0) (Figura 32). Por ello, su expresión se correlaciona con la fracción celular en fase de proliferación (Yuan *et al.*, 2015).

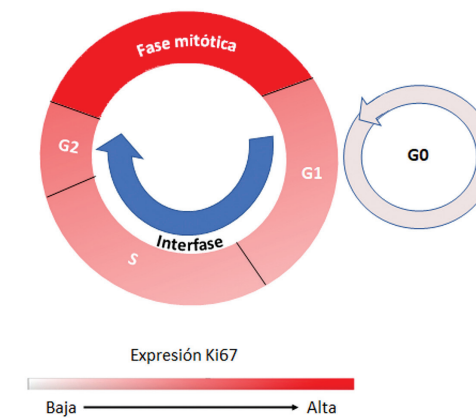


Imagen adaptada de (Yuan *et al.*, 2015).

FIGURA 32.

Expresión de Ki67 en diferentes fases del ciclo celular.

Las células expresan Ki67 durante las fases G1, S, G2 y mitosis, pero no durante G0. Los niveles de Ki67 son bajos en las fases G1 y S y aumentan al nivel máximo en la fase mitótica; la intensidad del color rojo representa los niveles de expresión de Ki67, cuanto más intensos, más elevados.

4.6.3. Detección de la vascularización

Los fragmentos de leiomioma congelados se cortaron en secciones de 8 μm a intervalos de 50 μm y se montaron en portaobjetos de vidrio Superfrost Gold (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA).

A continuación, los cortes seleccionados se fijaron en acetona a -20°C y se realizó inmunofluorescencia frente a PECAM (CD31).

La molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas, en inglés *Platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM), también conocida como *cluster of differentiation 31* (CD31), es una glicoproteína transmembrana relacionada con la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se expresa en las células endoteliales, plaquetas, macrófagos y otras células del linaje mieloide. PECAM es un mediador de la adhesión de leucocitos y plaquetas a las células endoteliales e interviene también en la migración de los leucocitos hacia el espacio intersticial. En inmunohistoquímica PECAM se usa principalmente para demostrar la presencia de células endoteliales en secciones de tejido, ayudando a evaluar el grado de angiogénesis del tumor (Tanaka, 2016).

En nuestro estudio empleamos el anticuerpo frente a PECAM al cual se le acopló un sistema de revelado fluorescente de color rojo. El protocolo específico de marcaje se detalla a continuación:

- Se fijaron las secciones en acetona a -20°C y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente.
- Tras lavar 3 veces con PBS, se procedió a realizar el bloqueo de la biotina endógena con Avidin/Biotin Blocking kit (Vector Biolabs) durante 15 mi-

nutos a temperatura ambiente, primero con Avidina y posteriormente con Biotina.

- A continuación, se procedió al bloqueo endógeno con una solución de bloqueo (cuya composición era 2% suero de conejo y 5% BSA en PBS) y se incubó una hora a temperatura ambiente.
- Posteriormente se retiró el tampón de bloqueo y se incubaron las muestras con un anticuerpo primario *antimouse* biotinilado PECAM (BD553370) a una concentración de 1:50, este anticuerpo primario se incubó a 4°C durante toda la noche.
- A partir de este momento se trabajó en oscuridad.
- Se procedió a la detección del anticuerpo secundario incubando el tejido con el fluorocromo Streptavidin Alexa Fluor488 (Molecular probes, USA) diluido a una concentración 1:1500 durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Por último, los cortes fueron lavados en PBS y contrateñidos con medio de montaje con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) que es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN (ProLong® Gold Antifade Reagent. Invitrogen, P36931) proporcionando un marcaje nuclear bajo la lámpara de luz ultravioleta del microscopio.

4.6.4. Detección de la apoptosis

La apoptosis (del griego antiguo *ἀπόπτωση*, *apóptōsis*, caída, desprendimiento), también conocida como muerte celular programada, es fundamental para controlar el número de células de los organismos multicelulares. Es un proceso altamente

regulado, a diferencia de la necrosis, que es una forma de muerte celular traumática en respuesta a un daño celular agudo. La apoptosis es considerada como una muerte celular fisiológica que ejerce un papel protector frente a posibles enfermedades. De hecho, su desregulación puede resultar perjudicial y conducir a situaciones patológicas como el cáncer (Majtnerová & Roušar, 2018).

Morfológicamente, entre los cambios celulares característicos de la apoptosis se encuentran la disminución del volumen celular y pérdida de las características de adhesión, la degradación de proteínas y fragmentación del ADN, condensación de la cromatina, aparición de ampollas en la superficie celular, fragmentación del núcleo y la formación de los cuerpos apoptóticos que pueden ser fagocitados (Figura 33) (Liu *et al.*, 1997; Saraste & Pulkki, 2000).

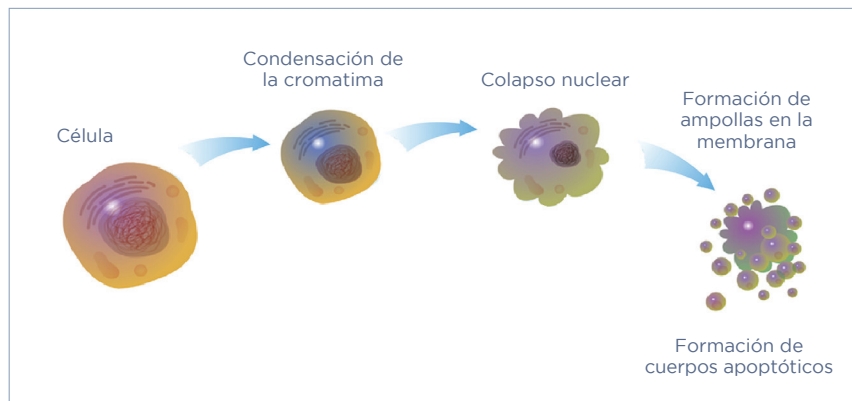


FIGURA 33.
Etapas de la muerte celular por apoptosis.

La apoptosis está mediada por enzimas proteolíticas llamadas caspasas, que desencadenan la muerte celular al escindir proteínas específicas en el citoplasma y el núcleo. Las caspasas existen en todas las células como precursores inactivos, o

procaspasas, que generalmente se activan por escisión por otras caspasas, produciendo una cascada de caspasas proteolíticas. El proceso de activación se inicia por señales de muerte extracelular o intracelular, que hacen que las moléculas adaptadoras intracelulares se agreguen y activen las procaspasas. La activación de las caspasas está regulada por miembros de las familias de proteínas Bcl-2 e IAP (Alberts *et al.*, 2002).

A pesar de que se han diseñado una gran variedad de técnicas para medición de la actividad apoptótica en cultivos celulares (medición de alteraciones citomorfológicas, fragmentación de ADN, detección de caspasas, alteraciones de membrana o ensayos mitocondriales), no se ha establecido un único método que sea lo suficientemente específico a la hora de la determinación de los niveles de apoptosis *in vitro*.

En nuestra investigación empleamos el método TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*) que es la base de la tecnología ApopTag® y que determina los fragmentos de ADN cortados por la acción de endonucleasas.

El ensayo aprovecha la rotura de la doble cadena de ADN de las células apoptóticas. Esta rotura puede detectarse marcando los terminales 3'-OH libres con nucleótidos modificados en una reacción enzimática. La enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT), cataliza la incorporación de desoxiuridina trifosfato (dUTP), en el extremo 3'-OH de la cadena afectada. El marcaje habitual de dUTP puede hacerse con biotina, digoxigenina (DIG) o fluoresceína. Estos dUTP modificados, pueden detectarse utilizando métodos indirectos como el uso de anticuerpos dirigidos frente a BrUTP o de forma directa, mediante la incorporación de biotina o nucleótidos marcados fluorescentemente. Los kits ApopTag® detectan roturas de cadena simple y de cadena doble asociadas a la apoptosis. Además, esta técnica puede de-

tectar apoptosis en etapas tempranas en sistemas donde la condensación de cromatina ha comenzado y las roturas de hebras son menores, incluso antes de que el núcleo sufra cambios morfológicos importantes (Majtnerová & Roušar, 2018).

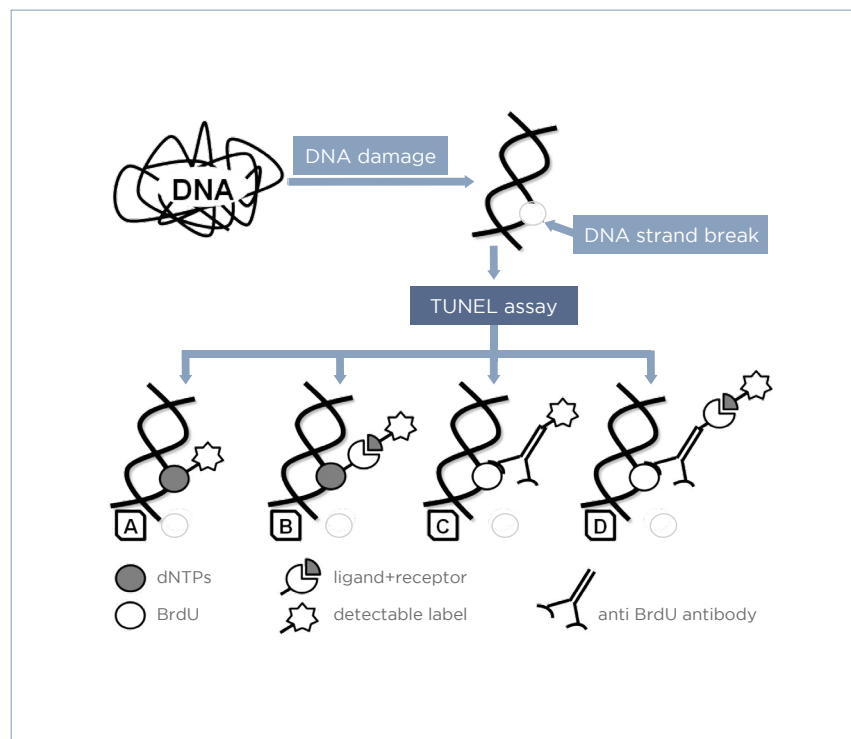


Imagen extraída de (Majtnerová & Roušar, 2018).

FIGURA 34.
Fundamento TUNEL.

En nuestro trabajo, los fragmentos de leiomioma congelados se cortaron en secciones de 8 μm a intervalos de 50 μm y se montaron en portaobjetos Superfrost

Gold Glass (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). La apoptosis celular se detectó empleando ApopTag® ISOL Dual Fluorescence Apoptosis Detection Kit (DNase Types I & II; Millipore, Billerica, MA). Los cortes se incubaron con el kit de TUNEL durante 60 min a 37°C en oscuridad y en cámara húmeda. Este kit es una mezcla de dos soluciones: una solución de marcaje, que contiene Tetrametilrodamina-dUTP (TMR-dUTP) y una solución enzimática, que contiene la enzima TdT. Durante el proceso de incubación, TdT añade moléculas de TMR-dUTP a los extremos 3'-OH libres generados como consecuencia de la fragmentación del ADN. Finalizado el proceso de incubación, se realizaron dos lavados con PBS, y se montaron las muestras con el medio de montaje ProLong Gold Antifade reagent con DAPI (Life Technologies), tras lo cual se dejaron 18 horas a temperatura ambiente. La detección del marcaje se realizó mediante un microscopio de fluorescencia.

4.6.5. Adquisición y análisis de datos de las imágenes microscópicas

Las dos secciones transversales principales obtenidas en cada implante se consideraron representativas de la muestra. Se seleccionaron cuatro campos aleatorios de alta potencia y fueron fotografiados por sección transversal utilizando un sistema de análisis de imágenes conectado a un microscopio Nikon Eclipse E400® (Nikon, Japan). Por lo tanto, se utilizaron un total de 32 imágenes por animal (4 implantes x 2 secciones transversales x 4 campos de alta potencia) para determinar cada uno de los tres parámetros de interés.

Mediante el programa Image-Pro Plus® (Media Cybernetics, Warrendale, PA) se evaluaron los diferentes parámetros:

- Análisis cuantitativo de la proliferación celular, basándose en el porcentaje de células en proliferación por campo con expresión de Ki67.
- La densidad de vasos se expresó como el porcentaje del área de leiomioma ocupada por PECAM.
- Respecto a la apoptosis, debido a la tinción difusa de las células apoptóticas, el *software* generalmente no logra segmentar las células positivas individualmente. Por esta razón, el índice apoptótico se estimó cuantificando el porcentaje de regiones teñidas (expresión de Tdt-OH), como hemos descrito anteriormente.

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el programa IBM® SPSS® Statistics (SPSS, Inc., Chicago, IL). Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media.

Se usó la prueba t de Student para evaluar los efectos de [pICPEI] en el tamaño de la muestra, así como para comparar el porcentaje de muerte celular entre grupos en cada momento en nuestros experimentos *in vitro*. Se usó una prueba U de Mann-Whitney, que es una prueba no paramétrica, para comparar las diferencias en vascularización, proliferación y apoptosis entre los diferentes grupos de estudio en los experimentos *in vivo*. Se consideró estadísticamente significativa una $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1. ENSAYO DE MUERTE CELULAR *IN VITRO*

Tanto las células del miometrio como las de leiomioma, cuando se trataron con el vehículo, mostraron tasas similares de muerte celular de aproximadamente 0,5-1 %, con aumentos no apreciables a lo largo del tiempo.

Sin embargo, en las células de miometrio y de leiomioma tratadas con [pICPEI] sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). En las células de leiomioma se observó un aumento de la muerte celular ya a las 12 horas tras la exposición celular al compuesto, que fue aumentando con el transcurso del tiempo. Por el contrario, las células miometriales tratadas con [pICPEI] no mostraron cambios en el estudio de viabilidad celular mediante exclusión con azul de tripano manteniendo una estabilidad a lo largo del tiempo (Figura 35).

Dado que la cantidad de muerte celular en las células miometriales fisiológicas fue similar tanto si se trataron con [pICPEI] como con vehículo, es probable que este compuesto ejerza un efecto citotóxico selectivo sobre las células de leiomioma.

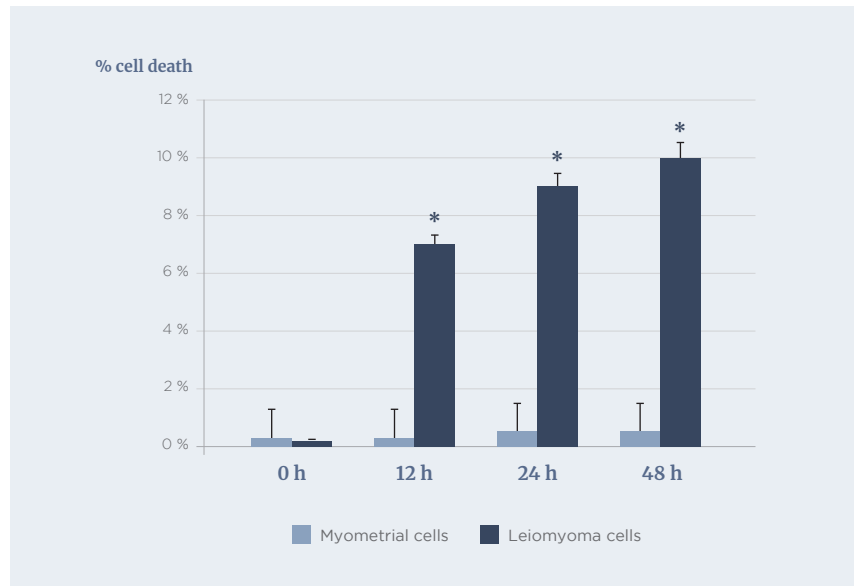


FIGURA 35.

Evaluación de los efectos proapoptóticos del tratamiento con [pICPEI] sobre la supervivencia de las células de leiomioma y miometrio cultivadas *in vitro*.

El gráfico representa la muerte celular, estimada por exclusión de tripano, en células de leiomioma o miometriales cultivadas en presencia de [pICPEI] (1 mg/ml) durante 12, 24 o 48 horas.

5.2. EFECTOS DEL TRATAMIENTO SOBRE EL TAMAÑO Y ASPECTO MACROSCÓPICO DE LAS LESIONES

Los cuatro fragmentos de leiomioma humano trasplantados en la pared peritoneal de cada animal se recuperaron después del tratamiento con [pICPEI]. El aspecto macroscópico de los implantes recuperados en el grupo control era de color rojizo,

muy probablemente debido al aumento de la neovascularización superficial postimplantación. Por el contrario, los implantes de los animales del grupo tratamiento tenían un aspecto blanquecino o rosa pálido, sugiriendo una reducción de la neovascularización importante debido al efecto inhibitor de [pICPEI] (Figura 36). El tamaño promedio del implante (mm^2) fue similar al comienzo y al final del experimento y no se modificó en ninguno de los dos grupos durante el período de tratamiento como se observa en el gráfico (Figura 37), por lo que [pICPEI] no redujo el tamaño de los implantes durante las 4 semanas que duró el tratamiento.

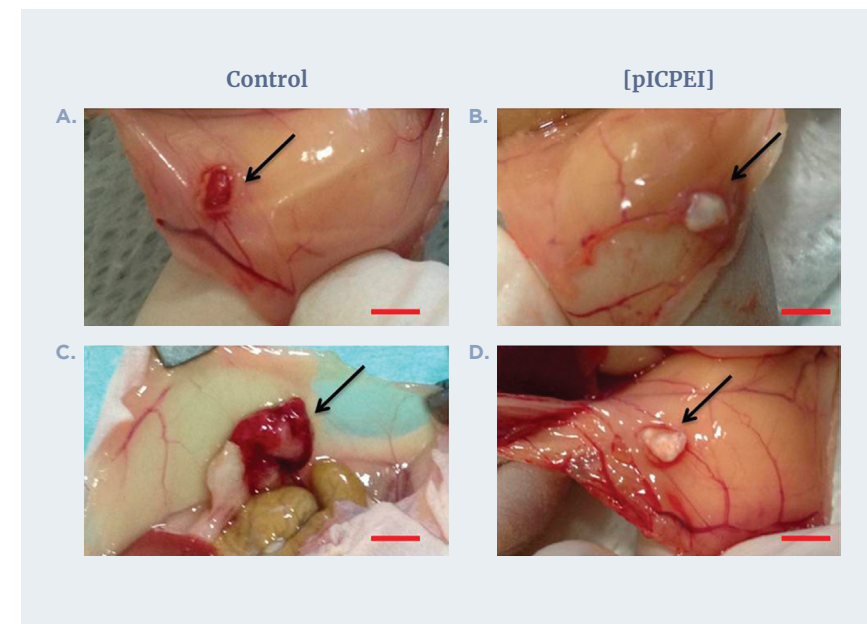


FIGURA 36.

Efecto de [pICPEI] sobre las características macroscópicas de los implantes de leiomioma en la pared peritoneal de las ratonas.

Los implantes de los leiomiomas en los animales tratados con vehículo muestran un aspecto rojizo (A, C). Por el contrario, aquellos tratados con 0,6 mg/kg [pICPEI], presentan un color blanco pálido al final del tratamiento (B, D).

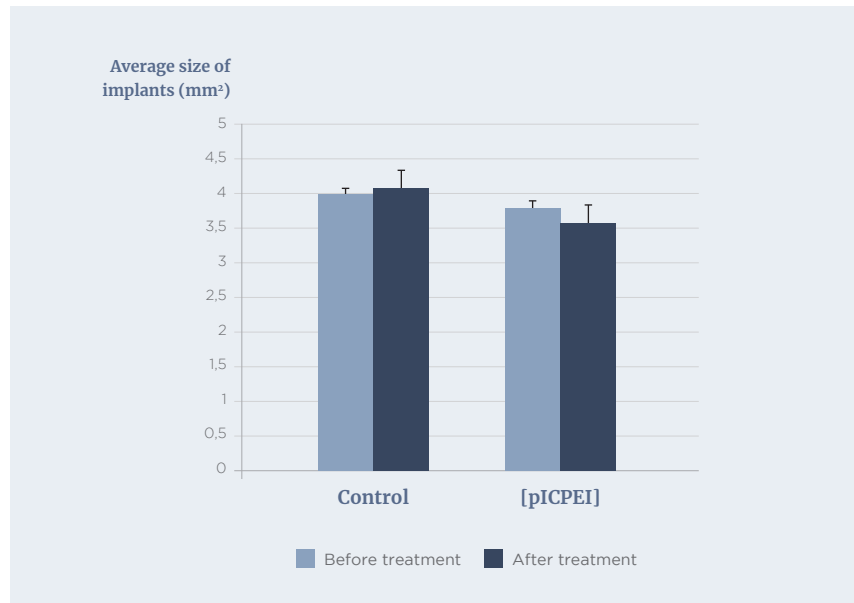


FIGURA 37.

Tamaño medio de los implantes de leiomioma (mm²) antes y después del tratamiento. No se detectó una reducción del tamaño estadísticamente significativa en ningún grupo tras el tratamiento.

5.3. EFECTOS DEL TRATAMIENTO EVALUADOS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOHISTOQUÍMICA

Por último, evaluamos la acción de [pICPEI] sobre tres mecanismos que podrían estar implicados en la disminución del tamaño de las lesiones de miomas: la proliferación celular, la apoptosis y la vascularización de las lesiones.

5.3.1. Análisis inmunofluorescente cuantitativo de la vascularización en los implantes de leiomioma

Analizamos la vascularización de las lesiones mediante inmunofluorescencia con el marcador endotelial PECAM (CD31), y evaluamos los cambios de la densidad vascular comparándolo con el grupo control.

En las imágenes recuperadas parecía que la mayor parte del tejido recuperado estaba poco vascularizado, sobre todo en la parte interna del injerto. Sin embargo, algunas áreas en la periferia mostraban una mayor densidad de vasos sanguíneos. Además, se observó que la vascularización en los animales tratados era menor que en los controles (Figura 38).

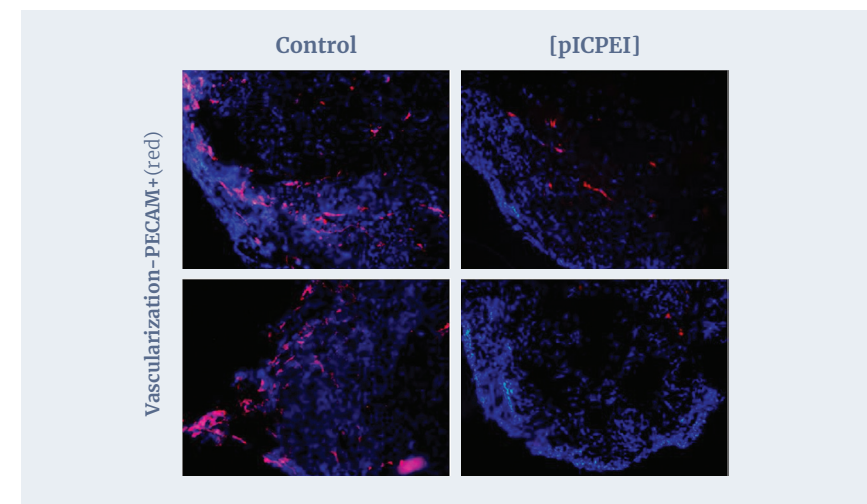


FIGURA 38.

Efecto del tratamiento de [pICPEI] sobre la neoangiogénesis de los implantes de leiomioma mediante tinción con el marcador endotelial PECAM comparando ambos grupos de tratamiento.

Con la tinción PECAM los vasos adquieren un color rojo.

El análisis cuantitativo confirmó nuestra sospecha y detectamos una densidad vascular 3,5 veces mayor en el grupo control ($7,22\% \pm 0,75\%$) en comparación con los animales tratados con [pICPEI] ($2,1\% \pm 0,8\%$, $p < 0,05$) (Figura 39). Estos resultados sugieren que el tratamiento con [pICPEI] reduce la angiogénesis.

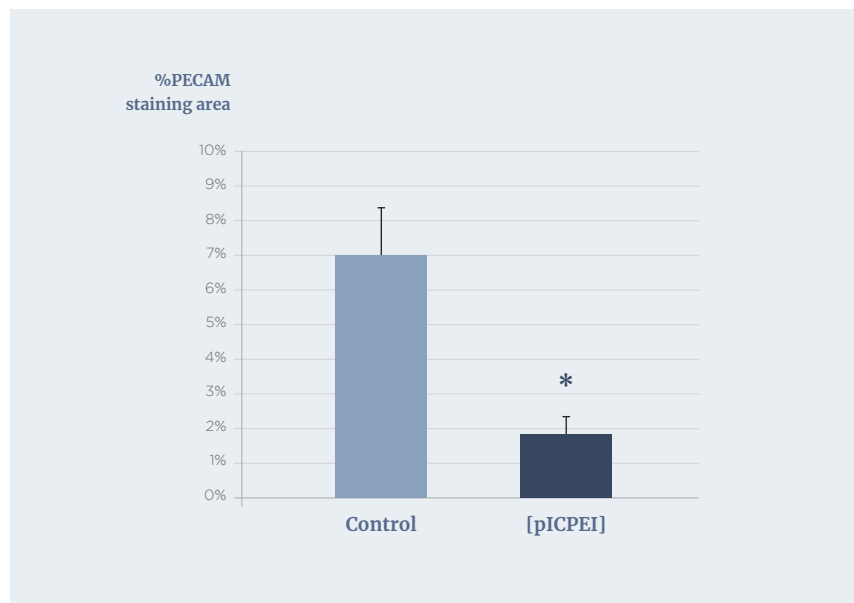


FIGURA 39.

Análisis cuantitativo del área teñida con PECAM en ambos grupos de tratamiento.

Se puede observar la drástica disminución de la densidad vascular del leiomioma en los animales tratados con [pICPEI] frente a los animales del grupo control ($p < 0,05$).

5.3.2. Análisis inmunohistoquímico cuantitativo de la proliferación celular en los implantes de leiomioma

Los injertos de tejido de leiomioma fueron moderadamente proliferativos en el grupo control (5–15 células positivas para Ki67 por campo) (Figura 40). El porcentaje de células teñidas con Ki67 en los implantes de leiomioma en animales tratados con [pICPEI] ($1,6\% \pm 0,85\%$) fue menor en comparación con los animales de control ($4\% \pm 0,7\%$, $p < 0,05$) (Figura 41).

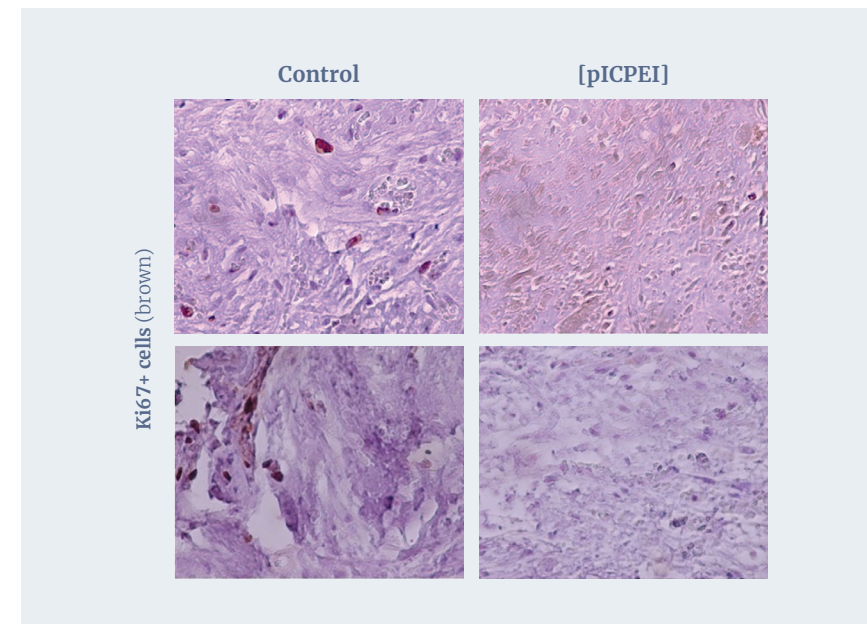


FIGURA 40.

Efecto del tratamiento con [pICPEI] sobre la proliferación celular en los implantes de leiomioma comparando ambos grupos de tratamiento.

Las imágenes corresponden a tinciones que representan las células en proliferación que se tiñen con el marcador de proliferación Ki67, adquiriendo un color marrón.

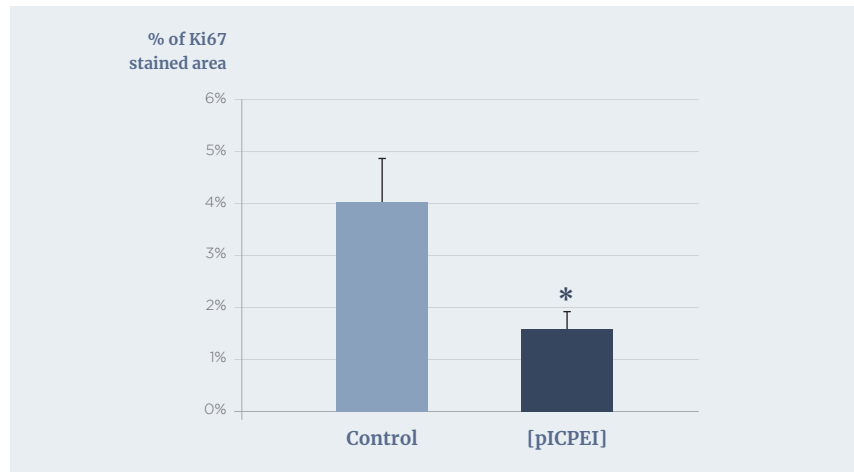


FIGURA 41.

Análisis cuantitativo de la proliferación celular en ambos grupos de tratamiento.

Se evidencia la disminución del porcentaje de células teñidas con Ki67 en los implantes de los animales tratados con [pICPEI] frente a los animales del grupo control ($p < 0,05$).

5.3.3. Análisis inmunofluorescente cuantitativo de la apoptosis en los implantes de leiomioma

El análisis de la apoptosis en las lesiones se realizó mediante la técnica TUNEL. Se detectaron pocas células en apoptosis en las lesiones de las ratonas del grupo control, en cambio, sí se observaron en las células de las ratonas del grupo tratamiento, existiendo diferencias entre los grupos estadísticamente significativas (Figura 42). El porcentaje de tejido teñido que presentaba apoptosis fue significativamente mayor en los implantes de leiomiomas en los animales tratados con [pICPEI] ($1\% \pm 0,9\%$) en comparación con los controles ($0,3\% \pm 0,87\%$, $p < 0,05$). Estos resultados sugieren que el tratamiento con [pICPEI] induce la apoptosis (Figura 43).

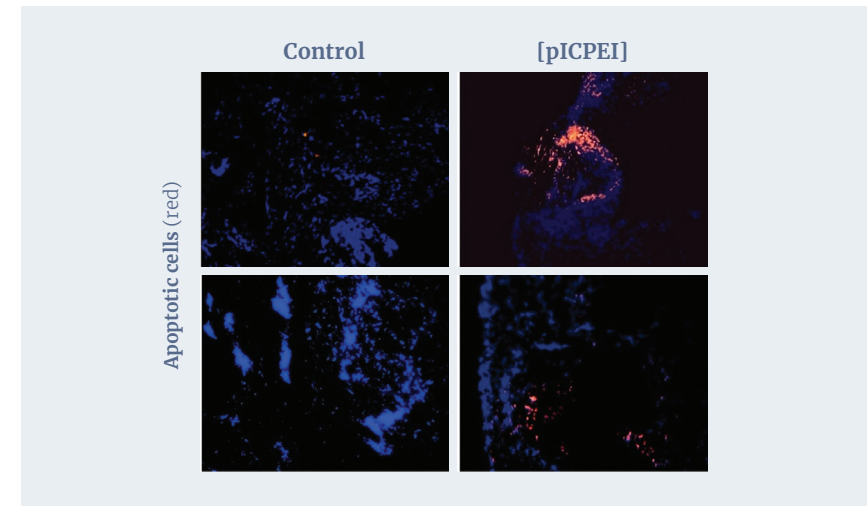


FIGURA 42.

Efecto del tratamiento con [pICPEI] sobre la apoptosis en los implantes de leiomioma comparando ambos grupos de tratamiento.

Las imágenes son tinciones representativas de células de leiomioma del grupo control, que no están teñidas y las células con actividad apoptótica del grupo tratamiento, teñidas de color rojo.

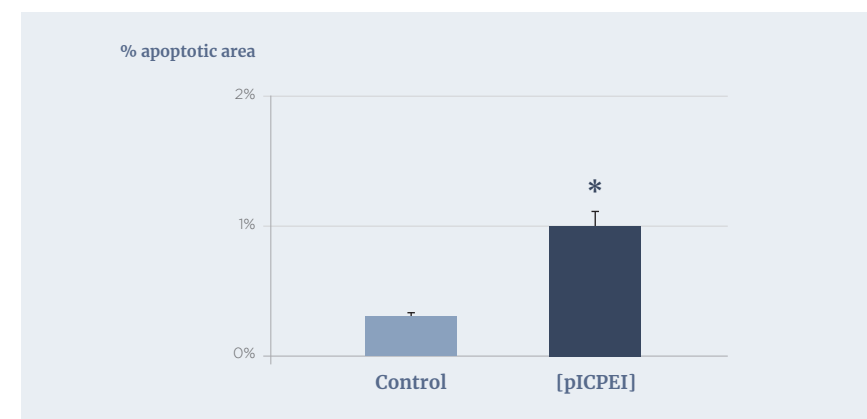


FIGURA 43.

Análisis cuantitativo de la apoptosis en ambos grupos de tratamiento, ($p < 0,05$).

6 DISCUSIÓN

Los miomas son los tumores benignos uterinos más frecuentes y afectan alrededor del 70 % de las mujeres al inicio de la menopausia (Parker, 2007). Debido a la sintomatología que asocian pueden afectar la calidad de vida de las pacientes (Stewart *et al.*, 2017), además de generar un elevado coste económico para los sistemas sanitarios (Cardozo *et al.*, 2012). A pesar de su elevada prevalencia y de las diferentes opciones terapéuticas disponibles, no existe un tratamiento óptimo que consiga reducir su tamaño, que sea mínimamente invasivo o que no presente efectos adversos asociados.

Por todo ello, existe un interés científico en esta patología, tanto para dilucidar los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo y crecimiento de estos tumores como en el diseño de nuevas terapias potenciales con un mejor perfil de eficacia y seguridad.

Aunque el tratamiento médico más empleado en la actualidad es el hormonal, su uso está limitado por sus contraindicaciones, efectos secundarios y por no poder utilizarlo en pacientes con deseo gestacional. Otras terapias hormonales, como los aGnRH, presentan efectos adversos graves al inducir una menopausia artificial debido a su acción antiestrogénica, por lo que la duración del tratamiento debe limitarse a unos pocos meses (Giuliani *et al.*, 2020). Los SPRM son eficaces reduciendo el tamaño de los miomas y controlando los síntomas, sin embargo, actualmente su empleo está muy restringido debido al riesgo de hepatotoxicidad grave (AEMPS, 2021).

Ante el fracaso del tratamiento médico se recurre al tratamiento quirúrgico o a otras terapias alternativas. La histerectomía es el único tratamiento definitivo, sin embargo, no es adecuada para aquellas pacientes que desean preservar su fertilidad y, además, puede asociar complicaciones quirúrgicas (Farquhar *et al.*, 2006).

Los efectos de otras terapias suelen ser de corta duración y asocian una morbilidad significativa con tasas de recurrencia frecuentes (Tal & Segars, 2014).

Aunque la fisiopatología de los miomas no es completamente conocida, existe evidencia de que la desregulación de la angiogénesis, con un aumento de los factores proangiogénicos, puede ser la responsable de las anomalías vasculares, jugando un papel fundamental en el desarrollo y crecimiento de estos tumores (Ciarmela *et al.*, 2011). Esta asociación queda patente con la reducción del tamaño de los miomas tras la EAU, así como por la disminución de la densidad vascular tras el tratamiento con los aGnRH y algunos SPRM como el asoprisnil, que disminuyen la expresión de factores angiogénicos (Wilkens *et al.*, 2008).

Por ello, ante la necesidad de tratamientos alternativos que proporcionen una inhibición duradera del crecimiento de los miomas sin asociar efectos secundarios, el uso de terapias antiangiogénicas selectivas dirigidas frente a la vascularización inmadura y alterada de los miomas puede ser una opción terapéutica potencial.

La terapia antiangiogénica se ha propuesto como una estrategia prometedora para varias enfermedades dependientes de la angiogénesis. El acceso de los fármacos a las células endoteliales es sencillo debido a varios motivos: los fármacos no tienen que penetrar en los tejidos para llegar a las células diana; las células endoteliales son genéticamente muy estables, evitando la resistencia a los medicamentos; la angiogénesis fisiológica ocurre en un número limitado de procesos como la cicatrización de heridas, en el aparato reproductor de manera cíclica y al inicio de la gestación (Tal & Segars, 2014). Por otro lado, hay que tener en cuenta que la sensibilidad al tratamiento antiangiogénico es mucho más acusada en los vasos sanguíneos inmaduros y proliferativos que en los vasos maduros rodeados de pericitos.

El empleo de terapias antiangiogénicas se ha visto históricamente obstaculizado por la toxicidad de estos fármacos, como es el caso de los fármacos empleados en pacientes oncológicos, que ejercen una acción poco selectiva sobre la vascularización, afectando tanto a la vascularización patológica como a la fisiológica. Este hecho se pone de manifiesto con la aparición frecuente de úlceras y en la interferencia con procesos de cicatrización en pacientes tratados con fármacos como bevacizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido frente a VEGF (Kamba & McDonald, 2007). Esta toxicidad puede llegar a ser limitante para los pacientes oncológicos y no es asumible en el caso de una patología benigna y tan prevalente como los miomas.

Sin embargo, la vascularización en condiciones patológicas es fenotípicamente diferente a la producida en condiciones fisiológicas (Seaman *et al.*, 2007), por lo que un efecto selectivo sobre ella puede ser posible. En este sentido, cabría esperar que la vascularización altamente inmadura y proliferativa (Aitken *et al.*, 2006) de los miomas frente a la vascularización más quiescente y madura del tejido sano adyacente, permitiera que las terapias antiangiogénicas fuesen más selectivas.

A pesar de la potencial aplicabilidad de la terapia antiangiogénica en el tratamiento de los miomas, existen muy pocos trabajos que hayan explorado esta posibilidad. El principal desafío del tratamiento antiangiogénico en los miomas es conseguir una acción selectiva sobre la vascularización del tumor sin afectar a los ovarios o al miometrio circundantes. Por ello, el propósito en este trabajo fue encontrar una alternativa farmacológica no hormonal que mostrara eficacia en el tratamiento de esta enfermedad por su capacidad de inhibición de la angiogénesis de manera efectiva y segura. Para superar las restricciones de las terapias antiangiogénicas

actuales empleamos [pICPEI], un compuesto que ha mostrado tener efectos antiangiogénicos y proapoptóticos selectivos sobre las células tumorales malignas con escasa toxicidad asociada (Tormo *et al.*, 2009).

El compuesto [pICPEI] está formado por un ARN sintético de doble cadena (el ácido poliinosina-policitidílico) diseñado hace décadas, coadministrado con un polímero obtenido a partir de monómeros de etilenimina. El pIC ejerce sus efectos terapéuticos a través de la estimulación de la vía del receptor TLR3/IFN- β (Bergé *et al.*, 2010) y de la inmunidad antitumoral tras la activación de las células NK (Huang *et al.*, 2013).

Diversos trabajos han evidenciado que los agonistas de TLR3 presentan efectos proapoptóticos en diferentes tipos de tumores, incluidos los de mama, melanoma, cabeza y cuello, próstata, carcinoma renal, colon, y pulmón (Estornes *et al.*, 2013). Los agonistas de TLR3 promueven la inhibición del crecimiento tumoral en varios modelos murinos y humanos de células cancerígenas disminuyendo la proliferación celular e induciendo la muerte celular por apoptosis. En cáncer de mama, la activación de TLR3 provocó la activación de quimiocinas y linfocitos citotóxicos y la inducción de la secreción de IFN, dando como resultado una mejora de la respuesta inmune antitumoral actuando sobre el crecimiento del tumor (Conforti *et al.*, 2010; Salaun *et al.*, 2011). También se observó en el tejido del carcinoma hepatocelular, que la expresión de TLR3 ejerció un efecto sinérgico sobre la apoptosis e inhibición de la proliferación celular además de un efecto sobre la angiogénesis (Yuan *et al.*, 2015).

El ácido poliinosina-policitidílico consigue su efecto antitumoral desencadenando la apoptosis (Harashima *et al.*, 2012) y ejerciendo una acción antiangiogénica (Kleinman *et al.*, 2008). Se ha postulado que la supresión de la angiogénesis por la estimulación del receptor TLR3 podría justificar los efectos terapéuticos de pIC

en los tumores de animales inmunodeprimidos (Bergé *et al.*, 2010; Kleinman *et al.*, 2008). Por otro lado, diversos trabajos han mostrado que pIC presenta un bajo grado de toxicidad (Field *et al.*, 1967; Lampson *et al.*, 1972; Freeman *et al.*, 1977).

Publicaciones posteriores asociaron pIC con complejos obteniendo un incremento de su actividad terapéutica. Gracias al estudio de Tormo *et al.* en un modelo murino de melanoma, se reveló que mediante la unión de pIC con un vehículo como la polietilenimina [pICPEI], se inducía la apoptosis de manera selectiva en células malignas promoviendo la hiperactivación de la autofagia (Tormo *et al.*, 2009). Recientemente, también se ha evidenciado que [pICPEI] es capaz de promover actividad apoptótica y disminuir la neovascularización en la endometriosis (García-Pascual *et al.*, 2015).

En este trabajo, evaluamos si tales actividades también podrían ejercerse sobre los miomas. Por lo tanto, la hipótesis fue que [pICPEI] podría tener propiedades antiangiogénicas y ejercer al mismo tiempo efectos proapoptóticos y antiproliferativos sobre estos tumores, produciendo finalmente una reducción en el tamaño de los mismos.

Previamente a la realización del estudio en el modelo animal, testamos si [pICPEI] presentaba un efecto proapoptótico selectivo sobre las células de mioma *in vitro*. Debido a que la tumorigenicidad de las células de mioma primario desaparece tras un cultivo *in vitro* prolongado (Tsuiji *et al.*, 2010) realizamos nuestros experimentos con cultivos de células primarias obtenidas directamente de biopsias de mioma. Al final del análisis, aproximadamente entre el 10-12 % de las células de mioma tratadas con [pICPEI] no eran viables. Sin embargo, las células miometriales normales no se vieron afectadas a pesar del tratamiento, con tan solo un 1 % de muerte celular. Por lo tanto, demostramos que [pICPEI] ejerce selectivamente efectos proapoptóticos en células de miomas sin afectar al miometrio sano.

Para probar el efecto de [pICPEI] *in vivo*, investigamos qué modelo animal era el idóneo para nuestro estudio. Primero recurrimos a modelos de roedores homólogos como las ratas Eker, que desarrollan miomas uterinos de manera espontánea, así como otros tumores como leiomiomas y carcinoma renal (Everitt *et al.*, 1995). No obstante, debido a las limitaciones de este modelo animal se descartó su uso. En estudios previos se demostró que [pICPEI] presenta actividad antitumoral eficaz en modelos de xenotrasplante con ratones inmunocomprometidos (Tormo *et al.*, 2009). Por ello, decidimos desarrollar un modelo murino heterólogo de mioma, con la ventaja de estudiar tejido de mioma de origen humano y no de roedor, como en el caso de las ratas Eker. Los modelos murinos heterólogos de mioma pueden desarrollarse empleando células aisladas (Drosch *et al.*, 2013) o fragmentos de tejido de mioma humano (Hassan *et al.*, 2008). Hassan *et al.* diseñaron un modelo animal en el que, para garantizar la supervivencia del injerto, se empleaban vectores adenovirales portadores de ciclooxigenasa-2 y VEGF-A (Hassan *et al.*, 2009; Hassan *et al.*, 2008). Sin embargo, posteriormente se evidenció que las células de mioma podían crecer en ausencia de dichos vectores (Drosch *et al.*, 2013). Todos estos hallazgos, nos llevaron a diseñar un modelo murino, injertando fragmentos de tejido de mioma humano en ratonas inmunocomprometidas, evitando la transfección con vectores adenovirales, para establecer un entorno más fisiológico que imitara mejor las condiciones en las que crecen los miomas humanos.

Las lesiones recuperadas de los animales tras cuatro semanas de tratamiento fueron similares, tanto morfológicamente (tamaño y apariencia) como histológicamente (proliferación celular y apoptosis) a las recuperadas en estudios previos (Hassan *et al.*, 2008).

En nuestro modelo animal de mioma *in vivo* tratado con una dosis de 0,6 mg/kg de [pICPEI] también se evidenciaron los efectos proapoptóticos del compuesto observados previamente *in vitro*. Por otro lado, al igual que lo descrito en publicaciones previas en las que pIC redujo la vascularización en modelos inmunocomprometidos de tumores malignos (Bergé *et al.*, 2010), el complejo [pICPEI] presentó un efecto antiangiogénico sobre la vascularización de los miomas.

Los vasos sanguíneos inmaduros son mucho más susceptibles a los efectos antiangiogénicos que los vasos maduros (Benjamin *et al.*, 1999). En un estudio de nuestro grupo sobre un modelo heterólogo de endometriosis hemos mostrado que [pICPEI] es capaz de inhibir parcialmente el crecimiento de vasos recién formados (inmaduros), pero no los del tipo maduro rodeados de *Alpha Smooth Muscle Actin* (α -SMA), que son menos susceptibles a los efectos antiangiogénicos (García-Pascual *et al.*, 2015). Este hecho proviene de la observación de que el pIC es capaz de interferir con la angiogénesis por brote de los neovasos, como se muestra en los ensayos de formación de anillos y tubos aórticos *in vitro* (Guo *et al.*, 2012). Estos hallazgos son concordantes con nuestra investigación en la que demostramos que [pICPEI] era capaz de disminuir significativamente la densidad de la vascularización de los miomas, que está formada en gran medida por vasos inmaduros libres de α -SMA (Aitken *et al.*, 2006).

Además de la disminución en la vascularización en el grupo tratamiento frente al grupo control (2,1% \pm 0,8% vs. 7,22% \pm 0,75%, $p < 0,05$) se obtuvo una reducción en el porcentaje de células en proliferación. Para realizar el análisis se midió la expresión del marcador Ki67 y se observó que, en concordancia con nuestra hipótesis, se produjo una menor proliferación en las ratonas del grupo tratado frente al grupo

control ($1,6 \% \pm 0,85 \%$ vs. $4 \% \pm 0,7$, $p < 0,05$), hecho que coincide cuando detectamos la apoptosis en los implantes de los dos grupos aplicando la técnica TUNEL, donde se evidenció un aumento estadísticamente significativo de la muerte celular en el grupo tratado con [pICPEI] comparado con el grupo control ($1 \% \pm 0,9 \%$ vs. $0,3 \% \pm 0,87 \%$, $p < 0,05$).

Quedaría por confirmar en otros estudios si la apoptosis inducida por [pICPEI] en enfermedades benignas como endometriosis y miomas es regulada por los mismos mecanismos moleculares descritos en tejidos malignos (Bergé *et al.*, 2010; Kleinman *et al.*, 2008; Tormo *et al.*, 2009).

Todo ello muestra que las propiedades antitumorales de [pICPEI] (gracias a la disminución de la vascularización y la proliferación celular y aumento de la apoptosis), no se limitan a enfermedades malignas, sino que también pueden extenderse a condiciones tumorales benignas como los miomas. Además, en nuestro trabajo no se observaron efectos secundarios en los animales tratados a lo largo de todo el experimento, como se había descrito anteriormente (Tormo *et al.*, 2009).

A pesar de la eficacia de [pICPEI] para inhibir la angiogénesis y aumentar la apoptosis, estos efectos no condujeron a una reducción significativa del tamaño de los implantes, que era el objetivo principal de nuestro trabajo. Esta ausencia de efecto puede explicarse por varios motivos. Por un lado, las ratonas *nude* no están completamente inmunodeprimidas, aún conservan células NK, que con el tiempo favorecen el rechazo del tejido trasplantado. Basándonos en publicaciones anteriores, estimamos que nuestros implantes serían rechazados en aproximadamente seis semanas (Kawahara *et al.*, 2010). Por este motivo, la corta duración del estudio es una limitación relevante para poder observar una disminución significativa del

tamaño de los miomas, ya que posiblemente sea necesario un período de tiempo experimental más prolongado para que la apoptosis y la inhibición de la angiogénesis inducidas por [pICPEI] conduzcan al colapso progresivo, muerte y reducción posterior del tejido patológico.

Otros trabajos presentan limitaciones similares; así, en un modelo murino heterólogo de mioma, la exposición a corto plazo a la vitamina D (21 días) no mostró reducción del tamaño del tumor frente a una exposición más prolongada (60 días) que sí que se obtuvo una reducción significativa (Corachán *et al.*, 2020).

En otros compuestos con un perfil angiogénico similar, como el agonista de la dopamina quinagolida, cuando se estudió en un modelo animal murino heterólogo de endometriosis durante un corto periodo de tiempo (tres semanas), solo se detectaron discretos efectos en el tamaño de la lesión (Delgado-Rosas *et al.*, 2011). Sin embargo, en un estudio en humanos de cuatro meses de duración, la quinagolida fue capaz de inducir una disminución importante de las lesiones endometriósicas (Gómez *et al.*, 2011).

También cabe destacar que tratamientos con efecto antiangiogénico empleados en la actualidad, como los aGnRH, SPRM o el tratamiento mediante EAU, requieren de un tiempo mayor a cuatro semanas hasta obtener una disminución del tamaño de los miomas. Por ejemplo, el AUP consigue una reducción del tamaño de hasta el 38% tras tres meses de tratamiento que va incrementando conforme aumentan los ciclos de tratamiento (Donnez & Dolmans, 2016). Elagolix, un antagonista de la GnRH, reduce el volumen un 40-50% tras 6 meses de tratamiento (Schlaff *et al.*, 2020) y la EAU hasta un 42% a los 3 meses (Giuliani *et al.*, 2020). Todo ello apoya la hipótesis de que son necesarios períodos de tiempo prolongados para conseguir un efecto en la disminución del tamaño de los miomas.

Otra explicación posible a la falta de disminución del tamaño en nuestro trabajo es el tipo de tejido trasplantado y las características del modelo animal que empleamos. Los miomas están compuestos principalmente por matriz extracelular (Stewart *et al.*, 1994) en cuya degradación el sistema inmunitario juega un papel relevante (Albini & Sporn, 2007). Debido a que las ratonas *nude* presentan una función defectuosa del sistema inmunitario, es posible que no pudieran inducir la regresión de la matriz extracelular favoreciendo que no se produjeran diferencias en el tamaño global de los implantes. De hecho, la actividad antitumoral de [pICPEI] se atribuyó originalmente a su capacidad para estimular el sistema inmune de una manera dependiente del interferón (Field *et al.*, 1967; H. B. Levy *et al.*, 1969).

Nuestros datos sobre el comportamiento [pICPEI] sugieren que los fármacos antiangiogénicos podrían ser una herramienta alternativa prometedora para el tratamiento de los miomas, siempre que los efectos secundarios ejercidos por dichos compuestos puedan mantenerse en un rango tolerable durante períodos prolongados de tiempo. Las limitaciones de nuestro modelo animal, realizando el estudio a corto plazo, han podido ocasionar que no se obtuvieran cambios en el tamaño de las lesiones. Es posible que estos cambios hubieran sido evidentes en un estudio con un período de tiempo mayor. Además, para poder emplear [pICPEI] como terapia frente a los miomas sería precisa una evaluación previa de la eficacia y toxicidad en modelos de ratones inmunocompetentes durante períodos de tiempo más prolongados que los que empleamos. También sería necesario realizar estudios de fase I sobre la toxicidad específica de [pICPEI]. Cabe destacar, datos de un ensayo clínico en fase II en pacientes pediátricos con tumores cerebrales en los que se administró pIC conjuntamente con un poliacetileno similar al PEI, administrando una dosis efectiva de 10-50 mg/kg dos o tres veces por sema-

na por períodos ininterrumpidos de hasta 24 meses, donde no observaron efectos tóxicos significativos (Hartman *et al.*, 2014).

En conclusión, el mayor conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo y crecimiento de los miomas abre una vía en la investigación de nuevos compuestos selectivos que puedan ofrecer una alternativa terapéutica, segura y eficaz para esta enfermedad. No obstante, hace falta continuar investigando en este campo evaluando la eficacia de fármacos activos en monoterapia o en combinación capaces de frenar los procesos anómalos de angiogénesis. En relación con nuestros hallazgos, cabría esperar resultados prometedores en un estudio a largo plazo más potente con un mayor tiempo de exposición a [pICPEI], para posteriormente poder plantear ensayos clínicos en humanos.

7 CONCLUSIONES

- El compuesto [pICPEI] no parece ejercer una disminución en el tamaño de los miomas, en un modelo animal heterólogo tratado durante 4 semanas.
- A tenor de los resultados *in vitro* e *in vivo*, este compuesto parece ejercer efectos proapoptóticos selectivos sobre los miomas sin afectar al miometrio sano.
- En ensayos *in vivo* el compuesto [pICPEI] consigue la disminución de la vascularización y la proliferación celular.
- Los efectos antiangiogénicos, antiproliferativos y proapoptóticos de [pICPEI] sugieren un papel potencial terapéutico si se prolonga el tiempo de exposición del fármaco.

BIBLIOGRAFÍA

—
AEMPS. (2020). Esmya (acetato de ulipristal): suspensión de comercialización como medida cautelar mientras se reevalúa su relación beneficio-riesgo. www.notificaram.es.

—
AEMPS. (2021). Esmya (acetato de ulipristal 5 mg): levantamiento de la suspensión de comercialización, con restricciones en sus indicaciones debido al riesgo de daño hepático grave. www.notificaram.es.

—
Aitken, E., Khaund, A., Hamid, S. A., Millan, D., & Campbell, S. (2006). The normal human myometrium has a vascular spatial gradient absent in small fibroids. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 21(10), 2669–2678.

—
Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. 4th edn. *Annals of Botany*, 91(3), 401.

—
Albini, A., & Sporn, M. B. (2007). The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nature Reviews. Cancer*, 7(2), 139–147.

—
Al-Hendy, A., Lukes, A. S., Poindexter, A. N., Venturella, R., Villarroel, C., Critchley, H., Li, Y., McKain, L., Arjona Ferreira, J. C., Langenberg, A., Wagman, R. B., & Stewart, E. A. (2021). Treatment of Uterine Fibroid Symptoms with Relugolix Combination Therapy. *The New England Journal of Medicine*, 384(7), 630–642.

—
Alonso-Curbelo, D., & Soengas, M. S. (2010). Self-killing of melanoma cells by cytosolic delivery of dsRNA: wiring innate immunity for a coordinated mobilization of endosomes, autophagosomes and the apoptotic machinery in tumor cells. *Autophagy*, 6(1), 148–150.

—
Baird, D. D., Dunson, D. B., Hill, M. C., Cousins, D., & Schectman, J. M. (2003). High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: Ultrasound evidence. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 188(1), 100–107.

—
Baird, D. D., Dunson, D. B., Hill, M. C., Cousins, D., & Schectman, J. M. (2007). Association of physical activity with development of uterine leiomyoma. *American Journal of Epidemiology*, 165(2), 157–163.

—
Baird, D. D., Hill, M. C., Schectman, J. M., & Hollis, B. W. (2013). Vitamin D and Risk of Uterine Fibroids. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 24(3), 447–453.

—
Benjamin, L. E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D., & Keshet, E. (1999). Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(2), 159–165.

—
Bergé, M., Bonnin, P., Sulpice, E., Vilar, J., Allanic, D., Silvestre, J. S., Lévy, B. I., Tucker, G. C., Tobelem, G., & Merkulova-Rainon, T. (2010). Small interfering RNAs induce target-independent inhibition of tumor growth and vasculature remodeling in a mouse model of hepatocellular carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 177(6), 3192–3201.

—
Bhave Chittawar, P., Franik, S., Pouwer, A. W., & Farquhar, C. (2014). Minimally invasive surgical techniques versus open myomectomy for uterine fibroids. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 10, CD004638.

—
Biegon, A., Alia-Klein, N., & Fowler, J. S. (2012). Potential contribution of aromatase inhibition to the effects of nicotine and related compounds on the brain. *Frontiers in Pharmacology*, 3 NOV.

—
Bingol, B., Gunenc, Z., Gedikbasi, A., Guner, H., Tasdemir, S., & Tiras, B. (2011). Comparison of diagnostic accuracy of saline infusion sonohysterography, transvaginal sonography and hysteroscopy. *Journal of Obstetrics and Gynecology: The Journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, 31(1), 54–58.

—
Bizzarri, N., Ghirardi, V., Remorgida, V., Venturini, P. L., & Ferrero, S. (2015). Three-month treatment with triptorelin, letrozole and ulipristal acetate before hysteroscopic resection of uterine myomas: prospective comparative pilot study. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 192, 22–26.

—
Blumberg, N. (1974). Tumor angiogenesis factor. Speculations on an approach to cancer chemotherapy. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 47(2), 71–81.

—
Borah, B. J., Nicholson, W. K., Bradley, L., & Stewart, E. A. (2013). The impact of uterine leiomyomas: a national survey of affected women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 209(4), 319.e1–319.e20.

—
Bradley, L. D., Pasic, R. P., & Miller, L. E. (2019). Clinical Performance of Radiofrequency Ablation for Treatment of Uterine Fibroids: Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques. Part A*, 29(12), 1507–1517.

—
Brucker, S. Y., Hahn, M., Kraemer, D., Taran, F. A., Isaacson, K. B., & Krämer, B. (2014). Laparoscopic radiofrequency volumetric thermal ablation of fibroids versus laparoscopic myomectomy. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 125(3), 261–265.

—
Bryant-Smith, A. C., Lethaby, A., Farquhar, C., & Hickey, M. (2018). Antifibrinolytics for heavy menstrual bleeding. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4(4), CD000249.

—
Bulun, S. E. (2013). Uterine fibroids. *The New England Journal of Medicine*, 369(14), 1344–1355.

—
Burbank, F. (2004). Childbirth and myoma treatment by uterine artery occlusion: do they share a common biology? *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists*, 11(2), 138–152.

—
Cardozo, E. R., Clark, A. D., Banks, N. K., Henne, M. B., Stegmann, B. J., & Segars, J. H. (2012). The estimated annual cost of uterine leiomyomata in the United States. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 206(3), 211.e1–211.e2119.

—
Chegini, N., Tang, X. M., & Ma, C. (1999). Regulation of transforming growth factor- β 1 expression by granulocyte macrophage-colony-stimulating factor in leiomyoma and myometrial smooth muscle cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(11), 4138–4143.

—
Chiaffarino, F., Parazzini, F., la Vecchia, C., Chatenoud, L., di Cintio, E., & Marsico, S. (1999). Diet and uterine myomas. *Obstetrics and Gynecology*, 94(3), 395–398.

—
Chwalisz, K., & Taylor, H. (2017). Current and Emerging Medical Treatments for Uterine Fibroids. *Seminars in Reproductive Medicine*, 35(6), 510–522.

—
Ciarmela, P., Delli Carpini, G., Greco, S., Zannotti, A., Montik, N., Giannella, L., & et al. (2022). Uterine fibroid vascularization: from morphological evidence to clinical implications. *Reproductive Biomedicine Online*, 44(2), 281–294.

—
Ciarmela, P., Islam, M. S., Reis, F. M., Gray, P. C., Bloise, E., Petraglia, F., Vale, W., & Castellucci, M. (2011). Growth factors and myometrium: biological effects in uterine fibroid and possible clinical implications. *Human Reproduction Update*, 17(6), 772–790.

—
Ciebiera, M., Włodarczyk, M., Wrzosek, M., Męczekalski, B., Nowicka, G., Łukaszuk, K., Ciebiera, M., Stabuszewska-Jóźwiak, A., & Jakiel, G. (2017). Role of Transforming Growth Factor β in Uterine Fibroid Biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2435.

—
Conforti, R., Ma, Y., Morel, Y., Paturel, C., Terme, M., Viaud, S., Ryffel, B., & et al. (2010). Opposing Effects of Toll-like Receptor (TLR3) Signaling in Tumors Can Be Therapeutically Uncoupled to Optimize the Anticancer Efficacy of TLR3 Ligands. *Cancer Research*, 70(2), 490–500.

—
Coons, A. H., Creech, H. J., & Jones, R. N. (1941). Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Experimental Biology and Medicine*, 47(2), 200–202.

—
Corachán, A., Ferrero, H., Escrig, J., Monleon, J., Faus, A., Cerveló, I., & Pellicer, A. (2020). Long-term vitamin D treatment decreases human uterine leiomyoma size in a xenograft animal model. *Fertility and Sterility*, 113(1), 205–216.e4.

—
Cordell-Stewart, B., & Taylor, M. W. (1973). Effect of viral double-stranded RNA on mammalian cells in culture: cytotoxicity under conditions preventing viral replication and protein synthesis. *Journal of Virology*, 12(2), 360–366.

—
Coutinho, L. M., Assis, W. A., Spagnuolo-Souza, A., & Reis, F. M. (2022). Uterine Fibroids and Pregnancy: How Do They Affect Each Other? *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 29(8), 2145–2151.

—
Cramer, S. F., & Patel, A. (1990). The frequency of uterine leiomyomas. *American Journal of Clinical Pathology*, 94(4), 435–438.

—
Cui, Z., & Qiu, F. (2006). Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) as a potent peptide vaccine adjuvant: therapeutic activity against human cervical cancer in a rodent model. *Cancer Immunology, Immunotherapy*: CII, 55(10), 1267–1279.

—
Delgado-Rosas, F., Gómez, R., Ferrero, H., Gaytan, F., Garcia-Velasco, J., Simón, C., & Pellicer, A. (2011). The effects of ergot and non-ergot-derived dopamine agonists in an experimental mouse model of endometriosis. *Reproduction (Cambridge, England)*, 142(5), 745–755.

—
Deng, L., Wu, T., Chen, X. Y., Xie, L., & Yang, J. (2012). Selective estrogen receptor modulators (SERMs) for uterine leiomyomas. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 10, CD005287.

—
DeWaay, D. J., Syrop, C. H., Nygaard, I. E., Davis, W. A., & van Voorhis, B. J. (2002). Natural history of uterine polyps and leiomyomata. *Obstetrics and Gynecology*, 100(1), 3–7.

—
Donnez, J., Courtoy, G. E., Donnez, O., & Dolmans, M. M. (2018). Ulipristal acetate for the management of large uterine fibroids associated with heavy bleeding: a review. *Reproductive Biomedicine Online*, 37(2), 216–223.

—
Donnez, J., & Dolmans, M. M. (2016). Uterine fibroid management: From the present to the future. *Human Reproduction Update*, 22(6), 665–686.

—
Donnez, J., Vázquez, F., Tomaszewski, J., Nouri, K., Bouchard, P., Fauser, B. C., Barlow, D. H., Palacios, S., Donnez, O., Bestel, E., Osterloh, I., Loumaye, E., & PEARL III and PEARL III Extension Study Group. (2014). Long-term treatment of uterine fibroids with ulipristal acetate. *Fertility and Sterility*, 101(6), 1565–1573.e1–18.

—
Downes, E., Sikirica, V., Gilabert-Estelles, J., Bolge, S. C., Dodd, S. L., Maroulis, C., & Subramanian, D. (2010). The burden of uterine fibroids in five European countries. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 152(1), 96–102.

—
Drosch, M., Bullerdiek, J., Zollner, T. M., Prinz, F., Koch, M., & Schmidt, N. (2013). A novel mouse model that closely mimics human uterine leiomyomas. *Fertility and Sterility*, 99(3), 927–935.e6.

—
Dueholm, M., Lundorf, E., Hansen, E. S., Ledertoug, S., & Olesen, F. (2002). Accuracy of magnetic resonance imaging and transvaginal ultrasonography in the diagnosis, mapping, and measurement of uterine myomas. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 186(3), 409–415.

—
Efstathiou, J. A., Sampson, D. A., Levine, Z., Rohan, R. M., Zurakowski, D., Folkman, J., D'Amato, R. J., & Rupnick, M. A. (2005). Nonsteroidal antiinflammatory drugs differentially suppress endometriosis in a murine model. *Fertility and Sterility*, 83(1), 171–181.

—
Estornes, Y., Micheau, O., Renno, T., & Lebecque, S. (2013). Dual role of TLR3 in inflammation and cancer cell apoptosis. In S. Yahwardiah (Ed.), *Oncogene and Cancer – From Bench to Clinic*. (IntechOpen, pp. 247–270).

—
Everitt, J. I., Wolf, D. C., Howe, S. R., Goldsworthy, T. L., & Walker, C. (1995). Rodent model of reproductive tract leiomyomata. Clinical and pathological features. *The American Journal of Pathology*, 146(6), 1556–1567.

—
Faerstein, E., Szklo, M., & Rosenshein, N. B. (2001). Risk factors for uterine leiomyoma: a practice-based case-control study. II. Atherogenic risk factors and potential sources of uterine irritation. *American Journal of Epidemiology*, 153(1), 11–19.

—
Farquhar, C. M., Harvey, S. A., Yu, Y., Sadler, L., & Stewart, A. W. (2006). A prospective study of 3 years of outcomes after hysterectomy with and without oophorectomy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 194(3), 711–717.

—
Farquhar, C. M., & Steiner, C. A. (1997). Hysterectomy rates in the United States 1990–1997. *Obstetrics and Gynecology*, 99(2), 229–234.

—
Ferrero, H. (2020). HMGA2 involvement in uterine leiomyomas development through angiogenesis activation. *Fertility and Sterility*, 114(5), 974–975.

—
Field, A. K., Tytell, A. A., Lampson, G. P., & Hilleman, M. R. (1967). Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58(3), 1004–1010.

—
Fischer, S., Nishio, M., Peters, S. C., Tschernatsch, M., Walberer, M., Weidemann, S., & et al. (2009). Signaling mechanism of extracellular RNA in endothelial cells. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(7), 2100–2109.

—
Forte, G., Rega, A., Morello, S., Luciano, A., Arra, C., Pinto, A., & Sorrentino, R. (2012). Polyinosinic-poly-cytidylic acid limits tumor outgrowth in a mouse model of metastatic lung cancer. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 188(11), 5357–5364.

—
Fraser, H. M., & Duncan, W. C. (2008). SRB Reproduction, Fertility and Development Award Lecture 2008. Regulation and manipulation of angiogenesis in the ovary and endometrium. *Reproduction, Fertility, and Development*, 21(3), 377–392.

—
Freeman, A. I., Al-Bussam, N., O'Malley, J. A., Stutzman, L., Bjornsson, S., & Carter, W. A. (1977). Pharmacologic effects of polyinosinic-polycytidylic acid in man. *Journal of Medical Virology*, 1(2), 79–93.

—
Fujimura, T., Nakagawa, S., Ohtani, T., Ito, Y., & Aiba, S. (2006). Inhibitory effect of the polyinosinic-poly-cytidylic acid/cationic liposome on the progression of murine B16F10 melanoma. *European Journal of Immunology*, 36(12), 3371–3380.

—
Galliano, D., Bellver, J., Díaz-García, C., Simón, C., & Pellicer, A. (2015). ART and uterine pathology: how relevant is the maternal side for implantation? *Human Reproduction Update*, 21(1), 13–38.

—
García-Pascual, C. M., Martínez, J., Calvo, P., Ferrero, H., Villanueva, A., Pozuelo-Rubio, M., Soengas, M., Tormo, D., Simón, C., Pellicer, A., & Gómez, R. (2015). Evaluation of the potential therapeutic effects of a double-stranded RNA mimic complexed with polycations in an experimental mouse model of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 104(5), 1310–1318.

—
Giuliani, E., As-Sanie, S., & Marsh, E. E. (2020). Epidemiology and management of uterine fibroids. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 149(1), 3–9.

—
Gizzo, S., Saccardi, C., Patrelli, T. S., Ancona, E., Noventa, M., Fagherazzi, S., Mozzanega, B., D'Antona, D., & Nardelli, G. B. (2014). Magnetic resonance-guided focused ultrasound myomectomy: safety, efficacy, subsequent fertility and quality-of-life improvements, a systematic review. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 21(4), 465–476.

—
Gómez, R., Abad, A., Delgado, F., Tamarit, S., Simón, C., & Pellicer, A. (2011). Effects of hyperprolactinemia treatment with the dopamine agonist quinagolide on endometriotic lesions in patients with endometriosis-associated hyperprolactinemia. *Fertility and Sterility*, 95(3), 882–8. e1.

—
Griffin, B. B., Ban, Y., Lu, X., & Wei, J. J. (2019). Hydropic leiomyoma: a distinct variant of leiomyoma closely related to HMGA2 overexpression. *Human Pathology*, 84, 164–172.

—
Griffioen, A. W., & Molema, G. (2000). Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacological Reviews*, 52(2), 237–268.

—
Gunes, M., Ozdegirmenci, O., Kayikcioglu, F., Haberal, A., & Kaplan, M. (2008). The effect of levonorgestrel intrauterine system on uterine myomas: a 1-year follow-up study. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, 15(6), 735–738.

—
Guo, Z., Chen, L., Zhu, Y., Zhang, Y., He, S., Qin, J., Tang, X., Zhou, J., & Wei, Y. (2012). Double-stranded RNA-induced TLR3 activation inhibits angiogenesis and triggers apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Reports*, 27(2), 396–402.

—
Gupta, J. K., Sinha, A., Lumsden, M. A., & Hickey, M. (2012). Uterine artery embolization for symptomatic uterine fibroids. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 5, CD005073.

—
Hague, S., Zhang, L., Oehler, M. K., Manek, S., MacKenzie, I. Z., Bicknell, R., & Rees, M. C. (2000). Expression of the hypoxically regulated angiogenic factor adrenomedullin correlates with uterine leiomyoma vascular density. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 6(7), 2808–2814.

—
Halder, S. K., Goodwin, J. S., & Al-Hendy, A. (2011). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reduces TGF- β 3-induced fibrosis-related gene expression in human uterine leiomyoma cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(4), E754–E762.

—
Harashima, N., Inao, T., Imamura, R., Okano, S., Suda, T., & Harada, M. (2012). Roles of the PI3K/Akt pathway and autophagy in TLR3 signaling-induced apoptosis and growth arrest of human prostate cancer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 61(5), 667–676.

—
Harmon, Q. E., Patchel, S. A., Zhao, S., Umbach, D. M., Cooper, T. E., & Baird, D. D. (2022). Depot Methylprogesterone Acetate Use and the Development and Progression of Uterine Leiomyoma. *Obstetrics and Gynecology*, 139(5), 797–807.

—
Hartman, L. L., Crawford, J. R., Makale, M. T., Milburn, M., Joshi, S., Salazar, A. M., Hasenauer, B., Vandenberg, S. R., MacDonald, T. J., & Durden, D. L. (2014). Pediatric phase II trials of poly-ICLC in the management of newly diagnosed and recurrent brain tumors. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 36(6), 451–457.

—
Hartmann, K. E., Fannesbeck, C., Surawicz, T., Surawicz, T., Krishnaswami, S., Andrews, J. C., Wilson, J. E., Velez-Edwards, D., Kugley, K., & Sathe, N. A. (2017). *Management of Uterine Fibroids* (Vol. 195). Agency for Healthcare Research and Quality.

—
Hassan, M., Eyzaguirre, E., Arafa, H. M., Hamada, F. M., Salama, S. A., & Al-Hendy, A. (2008). Memy I: a novel murine model for uterine leiomyoma using adenovirus-enhanced human fibroid explants in severe combined immune deficiency mice. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 199(2), 156.e1–156.e1568.

—
Hassan, M., Zhang, D., Salama, S., Hamada, F., Arafa, H., Fouad, H., Walker, C., & Al-Hendy, A. (2009). Towards fibroid gene therapy: adenovirus-mediated delivery of herpes simplex virus 1 thymidine kinase gene/ganciclovir shrinks uterine leiomyoma in the Eker rat model. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 68(1), 19–32.

—
Holdsworth-Carson, S. J., Zaitseva, M., Vollenhoven, B. J., & Rogers, P. A. (2014). Clonality of smooth muscle and fibroblast cell populations isolated from human fibroid and myometrial tissues. *Molecular Human Reproduction*, 20(3), 250–259.

—
Hong, C., Lee, J., Zheng, H., Hong, S. S., & Lee, C. (2011). Porous silicon nanoparticles for cancer phototherapy. *Nanoscale Research Letters*, 6(1), 321.

—
Howe, S. R., Gottardis, M. M., Everitt, J. I., Goldsworthy, T. L., Wolf, D. C., & Walker, C. (1995). Rodent model of reproductive tract leiomyomata. Establishment and characterization of tumor-derived cell lines. *The American Journal of Pathology*, 146(6), 1568–1579.

—
Huang, Y. K., Zheng, Z., Cheng, C. X., Wang, L. Y., Li, Y. R., & Qiu, F. (2013). The antitumor effect of the toll-like receptor 3 ligand polyinosinic-cytidylic acid as an adjuvant. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 62(2), 237–244.

—
Huyck, K. L., Panhuysen, C. I. M., Cuenco, K. T., Zhang, J., Goldhammer, H., Jones, E. S., Somasundaram, P., Lynch, A. M., Harlow, B. L., Lee, H., Stewart, E. A., & Morton, C. C. (2008). The impact of race as a risk factor for symptom severity and age at diagnosis of uterine leiomyomata among affected sisters. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 198(2), 168.e1–168.e9.

—
Ishikawa, H., Ishi, K., Serna, V. A., Kakazu, R., Bulun, S. E., & Kurita, T. (2010). Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. *Endocrinology*, 151(6), 2433–2442.

—
Ishikawa, H., Reierstad, S., Demura, M., Rademaker, A. W., Kasai, T., Inoue, M., Usui, H., Shozu, M., & Bulun, S. E. (2009). High aromatase expression in uterine leiomyoma tissues of African-American women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(5), 1752–1756.

—
Jacoby, V. L., Kohi, M. P., Poder, L., Jacoby, A., Lager, J., Schembri, M., Rieke, V., Grady, D., Vittinghoff, E., & Coakley, F. v. (2016). PROMISE trial: a pilot, randomized, placebo-controlled trial of magnetic resonance guided focused ultrasound for uterine fibroids. *Fertility and Sterility*, 105(3), 773–780.

—
Kamba, T., & McDonald, D. M. (2007). Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *British Journal of Cancer*, 96(12), 1788–1795.

—
Katikireddy, K. R., & O’Sullivan, F. (2011). Immunohistochemical and immunofluorescence procedures for protein analysis. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 784, 155–167.

—
Kawahara, T., Douglas, D. N., Lewis, J., Lund, G., Addison, W., Tyrrell, D. L., Churchill, T. A., & Kneteman, N. M. (2010). Critical role of natural killer cells in the rejection of human hepatocytes after xenotransplantation into immunodeficient mice. *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*, 23(9), 934–943.

—
Keltz, J., Levie, M., & Chudnoff, S. (2017). Pregnancy Outcomes After Direct Uterine Myoma Thermal Ablation: Review of the Literature. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, 24(4), 538–545.

—
Khan, A. T., Shehmar, M., & Gupta, J. K. (2014). Uterine fibroids: current perspectives. *International Journal of Women’s Health*, 6, 95–114.

—
khan, K. N., Kitajima, M., Hiraki, K., Fujishita, A., Sekine, I., Ishimaru, T., & Masuzaki, H. (2010). Changes in tissue inflammation, angiogenesis and apoptosis in endometriosis, adenomyosis and uterine myoma after GnRH agonist therapy. *Human Reproduction Update*, 25(3), 642–653.

—
Kleinman, M. E., Yamada, K., Takeda, A., Chandrasekaran, V., Nozaki, M., Baffi, J. Z., & et al. (2008). Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature*, 452(7187), 591–597.

—
Lampson, G. P., Nemes, M. M., Field, A. K., Tytell, A. A., & Hilleman, M. R. (1972). The Effect of Altering the Size of Poly C on the Toxicity and Antigenicity of Poly I: C. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 14(3), 1068–1072.

Lasmar, R. B., Barrozo, P. R., Dias, R., & Oliveira, M. A. (2005). Submucous myomas: a new presurgical classification to evaluate the viability of hysteroscopic surgical treatment—preliminary report. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, 12(4), 308–311.

Laughlin, S. K., Herring, A. H., Savitz, D. A., Olshan, A. F., Fielding, J. R., Hartmann, K. E., Baird, D. D., & Laughlin, S. K. (2010). Pregnancy-Related Fibroid Reduction. *Fertil Steril*, 94(6), 2421–2423.

Laughlin, S. K., Schroeder, J. C., & Day Baird, D. (2010). New Directions in the Epidemiology of Uterine Fibroids. *Seminars in Reproductive Medicine*, 28(3), 204–217.

Lee, B. B., & Yu, S. P. (2016). Radiofrequency Ablation of Uterine Fibroids: a Review. *Current Obstetrics and Gynecology Reports*, 5(4), 318–324.

Lee, B. S., & Nowak, R. A. (2001). Human leiomyoma smooth muscle cells show increased expression of transforming growth factor- β 3 (TGF β 3) and altered responses to the antiproliferative effects of TGF β . *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(2), 913–920.

Leppert, P. C., Baginski, T., Prupas, C., Catherino, W. H., Pletcher, S., & Segars, J. H. (2004). Comparative ultrastructure of collagen fibrils in uterine leiomyomas and normal myometrium. *Fertility and Sterility*, 82 Suppl 3(0 3), 1182–1187.

Lethaby, A., Duckitt, K., & Farquhar, C. (2013). Non-steroidal anti-inflammatory drugs for heavy menstrual bleeding. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1.

Lethaby, A., Vollenhoven, B., & Sowter, M. (2001). Pre-operative GnRH analogue therapy before hysterectomy or myomectomy for uterine fibroids. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2, CD000547.

Levine, A. S., Sivulich, M., Wiernik, P. H., & Levy, H. B. (1979). Initial clinical trials in cancer patients of polyribonucleosinic-polyribocytidylic acid stabilized with poly-L-lysine, in carboxymethylcellulose [poly(I-CLC)], a highly effective interferon inducer. *Cancer Research*, 39(5), 1645–1650.

Levy, G., Hill, M. J., Beall, S., Zarek, S. M., Segars, J. H., & Catherino, W. H. (2012). Leiomyoma: genetics, assisted reproduction, pregnancy and therapeutic advances. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(8), 703–712.

Levy, G., Hill, M. J., Plowden, T. C., Catherino, W. H., & Armstrong, A. Y. (2013). Biomarkers in uterine leiomyoma. *Fertility and Sterility*, 99(4), 1146–1152.

Levy, H. B., Law, L. W., & Rabson, A. S. (1969). Inhibition of tumor growth by polyinosinic-polycytidylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 62(2), 357–361.

Li, Y., Qiang, W., Griffin, B. B., Gao, T., Chakravarti, D., Bulun, S., Kim, J. J., & Wei, J. J. (2020). HMGA2-mediated tumorigenesis through angiogenesis in leiomyoma. *Fertility and Sterility*, 114(5), 1085–1096.

Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 89(2), 175–184.

Lumbiganon, P., Ruggao, S., Phandhu-fung, S., Laopaiboon, M., Vudhikamraksa, N., & Werawatakul, Y. (1996). Protective effect of depot-medroxyprogesterone acetate on surgically treated uterine leiomyomas: a multicentre case-control study. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 103(9), 909–914.

Luo, X., Shen, Y., Song, W. X., Chen, P. W., Xie, X. M., & Wang, X. Y. (2007). Pathologic evaluation of uterine leiomyoma treated with radiofrequency ablation. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 99(1), 9–13.

Mahase, E. (2020). Uterine fibroid drug is recalled after case of liver failure requiring transplant prompts EU review. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 368, m1112.

Majtnerová, P., & Roušar, T. (2018). An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular Biology Reports*, 45(5), 1469–1478.

Malik, M., Britten, J., & Catherino, W. H. (2020). Development and Validation of Hormonal Impact of a Mouse Xenograft Model for Human Uterine Leiomyoma. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 27(6), 1304–1317.

Marret, H., Fritel, X., Ouldamer, L., Bendifallah, S., Brun, J. L., de Jesus, I., Derrien, J., Giraudet, G., Kahn, V., Koskas, M., Legendre, G., Lucot, J. P., Niro, J., Panel, P., Pelage, J. P., Fernandez, H., & CNGOF (French College of Gynecology and Obstetrics). (2012). Therapeutic management of uterine fibroid tumors: updated French guidelines. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 165(2), 156–164.

Marsh, E. E., & Bulun, S. E. (2006). Steroid hormones and leiomyomas. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 33(1), 59–67.

Marsh, E. E., Ekpo, G. E., Cardozo, E. R., Brocks, M., Dune, T., & Cohen, L. S. (2013). Racial differences in fibroid prevalence and ultrasound findings in asymptomatic young women (ages 18–30 years old): A pilot study HHS Public Access. *Fertil Steril*, 99(7), 1951–1957.

Marshall, L. M., Spiegelman, D., Barbieri, R. L., Goldman, M. B., Manson, J. E., Colditz, G. A., Willett, W. C., & Hunter, D. J. (1997). Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. *Obstetrics and Gynecology*, 90(6), 967–973.

Marshall, L. M., Spiegelman, D., Goldman, M. B., Manson, J. A. E., Colditz, G. A., Barbieri, R. L., Stampfer, M. J., & Hunter, D. J. (1998). A prospective study of reproductive factors and oral contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyomata. *Fertility and Sterility*, 70(3), 432–439.

Mayer, A., Höckel, M., Wree, A., Leo, C., Horn, L. C., & Vaupel, P. (2008). Lack of hypoxic response in uterine leiomyomas despite severe tissue hypoxia. *Cancer Research*, 68(12), 4719–4726.

Mehine, M., Kaasinen, E., Mäkinen, N., Katainen, R., Kämpjärvi, K., Pitkänen, E., Heinonen, H. R., Bützow, R., Kilpivaara, O., Kuosmanen, A., Ristolainen, H., Gentile, M., Sjöberg, J., Vahteristo, P., & Aaltonen, L. A. (2013). Characterization of uterine leiomyomas by whole-genome sequencing. *The New England Journal of Medicine*, 369(1), 45–53.

Mehine, M., Mäkinen, N., Heinonen, H. R., Aaltonen, L. A., & Vahteristo, P. (2014). Genomics of uterine leiomyomas: insights from high-throughput sequencing. *Fertility and Sterility*, 102(3), 621–629.

—
Merrill, R. M. (2008). Hysterectomy surveillance in the United States, 1997 through 2005. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 14(1), CR24–CR31.

—
Metwally, M., Cheong, Y. C., & Horne, A. W. (2012). Surgical treatment of fibroids for subfertility. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11, CD003857.

—
Mittal, P., Shin, Y. H., Yatsenko, S. A., Castro, C. A., Surti, U., & Rajkovic, A. (2015). Med12 gain-of-function mutation causes leiomyomas and genomic instability. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(8), 3280–3284.

—
Moroni, R. M., Martins, W. P., Dias, S. v., Vieira, C. S., Ferriani, R. A., Nastri, C. O., & Brito, L. G. (2015). Combined oral contraceptive for treatment of women with uterine fibroids and abnormal uterine bleeding: a systematic review. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 79(3), 145–152.

—
Moroni, R. M., Martins, W. P., Ferriani, R. A., Vieira, C. S., Nastri, C. O., Candido Dos Reis, F. J., & Brito, L. G. (2015). Add-back therapy with GnRH analogues for uterine fibroids. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2015(3), CD010854.

—
Munro, M. G. (2018). Endometrial ablation. *Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 46, 120–139.

—
Munro, M. G., Critchley, H. O., Fraser, I. S., & FIGO Menstrual Disorders Working Group. (2011). The FIGO classification of causes of abnormal uterine bleeding in the reproductive years. *Fertility and Sterility*, 95(7), 2204–2208.e22083.

—
Nesby-O'Dell, S., Scanlon, K. S., Cogswell, M. E., Gillespie, C., Hollis, B. W., Looker, A. C., Allen, C., Dougherty, C., Gunter, E. W., & Bowman, B. A. (2002). Hypovitaminosis D prevalence and determinants among African American and white women of reproductive age: third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(1), 187–192.

—
Nieuwenhuis, L. L., Keizer, A. L., Stoelinga, B., Twisk, J., Hehenkamp, W., Brölmann, H., & Huirne, J. (2018). Fibroid vascularisation assessed with three-dimensional power Doppler ultrasound is a predictor for uterine fibroid growth: a prospective cohort study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics*, 125(5), 577–584.

—
Nikitenko, L. L., Cross, T., Campo, L., Turley, H., Leek, R., Manek, S., Bicknell, R., & Rees, M. C. (2006). Expression of terminally glycosylated calcitonin receptor-like receptor in uterine leiomyoma: endothelial phenotype and association with microvascular density. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(19), 5648–5658.

—
Ohara, N., Morikawa, A., Chen, W., Wang, J., DeManno, D. A., Chwalisz, K., & Maruo, T. (2007). Comparative effects of SPRM asoprisnil (J867) on proliferation, apoptosis, and the expression of growth factors in cultured uterine leiomyoma cells and normal myometrial cells. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 14(8 Suppl), 20–27.

—
Oliveira, F. G., Abdelmassih, V. G., Diamond, M. P., Dozortsev, D., Melo, N. R., & Abdelmassih, R. (2004). Impact of subserosal and intramural uterine fibroids that do not distort the endometrial cavity on the outcome of in vitro fertilization–intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 81(3), 582–587.

—
Ono, M., Qiang, W., Serna, V. A., Yin, P., Coon, J. S., Navarro, A., Monsivais, D., Kakinuma, T., Dyson, M., Druschitz, S., Unno, K., Kurita, T., & Bulun, S. E. (2012). Role of stem cells in human uterine leiomyoma growth. *PLoS One*, 7(5), e36935.

—
Ono, M., Yin, P., Navarro, A., Moravek, M. B., Coon, J. S., Druschitz, S. A., Serna, V. A., Qiang, W., Brooks, D. C., Malpani, S. S., Ma, J., Ercan, C. M., Mittal, N., Monsivais, D., Dyson, M. T., Yemelyanov, A., Maruyama, T., Chakravarti, D., Kim, J. J., ... Bulun, S. E. (2013). Paracrine activation of WNT/β-catenin pathway in uterine leiomyoma stem cells promotes tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(42), 17053–17058.

—
Parker, W. H. (2007). Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertility and Sterility*, 87(4), 725–736.

—
Pavone, D., Clemenza, S., Sorbi, F., Fambrini, M., & Petraglia, F. (2018). Epidemiology and Risk Factors of Uterine Fibroids. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 46, 3–11.

—
Peddada, S. D., Laughlin, S. K., Miner, K., Guyon, J., Haneke, K., Vahdat, H. L., Semelka, R. C., Kowalik, A., Armao, D., Davis, B., & Baird, D. D. (2008). Growth of uterine leiomyomata among premenopausal black and white women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50), 19887–19892.

—
Pelage, J. P., Cazejust, J., Pluot, E., le Dref, O., Laurent, A., Spies, J. B., Chagnon, S., & Lacombe, P. (2005). Uterine fibroid vascularization and clinical relevance to uterine fibroid embolization. *Radiographics: A Review Publication of the Radiological Society of North America*, 25(1), S99–S117.

—
Pérez-López, F. R., Ornat, L., Ceausu, I., Depypere, H., Erel, C. T., Lambrinoudaki, I., Schenck-Gustafsson, K., Simoncini, T., Tremollieres, F., Rees, M., & EMAS. (2014). EMAS position statement: management of uterine fibroids. *Maturitas*, 79(1), 106–116.

—
Petraglia, F., Serour, G. I., & Chapron, C. (2013). The changing prevalence of infertility. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 123(Suppl 2), S4–S8.

—
Pitter, M. C., Simmonds, C., Seshadri-Kreaden, U., & Hubert, H. B. (2014). The impact of different surgical modalities for hysterectomy on satisfaction and patient reported outcomes. *Interactive Journal of Medical Research*, 3(3), e11.

—
Pollack, I. F., Jakacki, R. I., Butterfield, L. H., Hamilton, R. L., Panigrahy, A., Potter, D. M., Connelly, A. K., Dibridge, S. A., Whiteside, T. L., & Okada, H. (2014). Antigen-specific immune responses and clinical outcome after vaccination with glioma-associated antigen peptides and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in children with newly diagnosed malignant brainstem and nonbrainstem gliomas. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(19), 2050–2058.

—
Poncelet, C., Madelenat, P., Feldmann, G., Walker, F., & Darai, E. (2002). Expression of von Willebrand's factor, CD34, CD31, and vascular endothelial growth factor in uterine leiomyomas. *Fertility and Sterility*, 78(3), 581–586.

—
Pritts, E. A., Parker, W. H., & Olive, D. L. (2009). Fibroids and infertility: an updated systematic review of the evidence. *Fertility and Sterility*, 91(4), 1215–1223.

—
Prizant, H., Sen, A., Light, A., Cho, S. N., DeMayo, F. J., Lydon, J. P., & Hammes, S. R. (2013). Uterine-specific loss of Tsc2 leads to myometrial tumors in both the uterus and lungs. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 27(9), 1403–1414.

—
Purohit, P., & Vigneswaran, K. (2016). *Fibroids and Infertility*. *Current Obstetrics and Gynecology Reports*, 5, 81–88.

—
Qin, H., Lin, Z., Vázquez, E., & Xu, L. (2019). The association between chronic psychological stress and uterine fibroids risk: A meta-analysis of observational studies. *Stress and Health: Journal of the International Society for the Investigation of Stress*, 35(5), 585–594.

—
Ramsey, E. M. (1994). *Anatomy of the Human Uterus*. *The Uterus*, 18–40.

—
Robinson, R. A., DeVita, V. T., Levy, H. B., Baron, S., Hubbard, S. P., & Levine, A. S. (1976). A phase I-II trial of multiple-dose polyribonucleic acid in patients with leukemia or solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 57(3), 599–602.

—
Rogers, R., Norian, J., Malik, M., Christman, G., Abu-Asab, M., Chen, F., Korecki, C., Iatridis, J., Catherino, W. H., Tuan, R. S., Dhillon, N., Leppert, P., & Segars, J. H. (2008). Mechanical homeostasis is altered in uterine leiomyoma. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 198(4), 474.e1–474.11.

—
Ross, R. K., Pike, M. C., Vessey, M. P., Bull, D., Yeates, D., & Casagrande, J. T. (1986). Risk factors for uterine fibroids: reduced risk associated with oral contraceptives. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 293(6543), 359–362.

—
Sadan, O., Ginath, S., Sofer, D., Rotmensch, S., Debby, A., Glezerman, M., & Zakut, H. (2001). The role of tamoxifen in the treatment of symptomatic uterine leiomyomata -- a pilot study. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 96(2), 183–186.

—
Sakata, J., Hirose, A., Yoshida, R., Kawahara, K., Matsuoka, Y., Yamamoto, T., Nakamoto, M., & et al. (2019). *HMGA2 Contributes to Distant Metastasis and Poor Prognosis by Promoting Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2473.

—
Salaun, B., Zitvogel, L., Asselin-Paturel, C., Morel, Y., Chemin, K., Dubois, C., Massacrier, C., & et al. (2011). TLR3 as a biomarker for the therapeutic efficacy of double-stranded RNA in breast cancer. *Cancer Research*, 71(5), 1607–1614.

—
Sampson, J. A. (1912). The blood supply of uterine myomata. *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, 14, 215–230.

—
Sandberg, E. M., Tummers, F., Cohen, S. L., van den Haak, L., Dekkers, O. M., & Jansen, F. W. (2018). Reintervention risk and quality of life outcomes after uterine-sparing interventions for fibroids: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 109(4), 698–707.e1.

—
Saraste, A., & Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45(3), 528–537.

—
Sato, F., Mori, M., Nishi, M., Kudo, R., & Miyake, H. (2002). Familial aggregation of uterine myomas in Japanese women. *Journal of Epidemiology*, 12(3), 249–253.

—
Scheurig-Muenkler, C., Wagner, M., Franiel, T., Hamm, B., & Kroencke, T. J. (2010). Effect of uterine artery embolization on uterine and leiomyoma perfusion: evidence of transient myometrial ischemia on magnetic resonance imaging. *Journal of Vascular and Interventional Radiology: JVIR*, 21(9), 1347–1353.

—
Schlaff, W. D., Ackerman, R. T., Al-Hendy, A., Archer, D. F., Barnhart, K. T., Bradley, L. D., Carr, B. R., & et al. (2020). Elagolix for Heavy Menstrual Bleeding in Women with Uterine Fibroids. *The New England Journal of Medicine*, 382(4), 328–340.

—
Seaman, S., Stevens, J., Yang, M. Y., Logsdon, D., Graff-Cherry, C., & St Croix, B. (2007). Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell*, 11(6), 539–554.

—
Seshadri, S., El-Toukhy, T., Douiri, A., Jayaprakasan, K., & Khalaf, Y. (2015). Diagnostic accuracy of saline infusion sonography in the evaluation of uterine cavity abnormalities prior to assisted reproductive techniques: a systematic review and meta-analyses. *Human Reproduction Update*, 21(2), 262–274.

—
Shen, Y., Xu, Q., Xu, J., Ren, M. L., & Cai, Y. L. (2013). Environmental exposure and risk of uterine leiomyoma: an epidemiologic survey. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17(23), 3249–3256.

—
Sinai Talaulikar, V. (2018). Medical therapy for fibroids: An overview. *Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 46, 48–56.

—
Sinclair, D. C., Mastroyannis, A., & Taylor, H. S. (2011). Leiomyoma simultaneously impair endometrial BMP-2-mediated decidualization and anticoagulant expression through secretion of TGF-β3. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(2), 412–421.

—
Socolov, D., Blidaru, I., Tamba, B., Miron, N., Boiculescu, L., & Socolov, R. (2011). Levonorgestrel releasing-intrauterine system for the treatment of menorrhagia and/or frequent irregular uterine bleeding associated with uterine leiomyoma. *He European Journal of Contraception & Reproductive Health Care: The Official Journal of the European Society of Contraception*, 16(6), 480–487.

—
Somigliana, E., Vercellini, P., Dagupati, R., Pasin, R., de Giorgi, O., & Crosignani, P. G. (2007). Fibroids and female reproduction: a critical analysis of the evidence. *Human Reproduction Update*, 13(5), 465–476.

—
Song, H., Lu, D., Navaratnam, K., & Shi, G. (2013). Aromatase inhibitors for uterine fibroids. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 10, CD009505.

—
Stewart, E. A. (2001). Uterine fibroids. *Lancet*, 357(9252), 293–298.

—
Stewart, E. A. (2015). Clinical practice. Uterine fibroids. *The New England Journal of Medicine*, 372(17), 1646–1655.

—
Stewart, E. A., Cookson, C. L., Gandolfo, R. A., & Schulze-Rath, R. (2017). Epidemiology of uterine fibroids: a systematic review. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 124(10), 1501–1512.

—
Stewart, E. A., Friedman, A. J., & Nowak, R. A. (1994). Relative overexpression of collagen type I and collagen type III messenger ribonucleic acids by uterine leiomyomas during the proliferative phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 79(3), 900–906.

—
Stewart, E. A., Laughlin-Tommaso, S. K., Catherino, W. H., Lalitkumar, S., Gupta, D., & Vollenhoven, B. (2016). Uterine fibroids. *Nature Reviews. Disease Primers*, 2, 16043.

—
Stewart, E. A., Nicholson, W. K., Bradley, L., & Borah, B. J. (2013). The Burden of Uterine Fibroids for African-American Women: Results of a National Survey. *Journal of Women's Health* (2002), 22(10), 807–816.

—
Sundermann, A. C., Velez Edwards, D. R., Bray, M. J., Jones, S. H., Latham, S. M., & Hartmann, K. E. (2017). *Leiomyomas in Pregnancy and Spontaneous Abortion: A Systematic Review and Meta-analysis*. *Obstetrics and Gynecology*, 130(5), 1065–1072.

—
Suzuki, Y., Li, M., Saito, T., Terai, Y., Tabata, Y., Ohmichi, M., & Asahi, M. (2018). Establishment of a novel mouse xenograft model of human uterine leiomyoma. *Scientific Reports*, 8(1), 8872.

—
Takeda, T., Sakata, M., Isobe, A., Miyake, A., Nishimoto, F., Ota, Y., Kamiura, S., & Kimura, T. (2008). Relationship between metabolic syndrome and uterine leiomyomas: a case-control study. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 66(1), 14–17.

—
Tal, R., & Segars, J. H. (2014). The role of angiogenic factors in fibroid pathogenesis: potential implications for future therapy. *Human Reproduction Update*, 20(2), 194–216.

—
Tanaka, T. (2016). Leukocyte Adhesion Molecules. *Encyclopedia of Immunobiology*, 3, 505–511.

—
Toledo, G., & Oliva, E. (2008). Smooth muscle tumors of the uterus: a practical approach. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 132(4), 595–605.

—
Tormo, D., Checińska, A., Alonso-Curbelo, D., Pérez-Guijarro, E., Cañón, E., Riveiro-Falkenbach, E., & et al. (2009). Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Cell*, 16(2), 103–114.

—
Tristan, M., Orozco, L. J., Steed, A., Ramírez-Morera, A., & Stone, P. (2012). Mifepristone for uterine fibroids. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2012(8), CD007687.

—
Tsiliogiannis, S. E., Zaitseva, M., Coombs, P. R., Shekleton, P., Olshansky, M., Hickey, M., Vollenhoven, B., & Rogers, P. A. (2013). Fibroid-associated heavy menstrual bleeding: correlation between clinical features, Doppler ultrasound assessment of vasculature, and tissue gene expression profiles. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 20(4), 361–370.

—
Tsuiji, K., Takeda, T., Li, B., Kondo, A., Ito, M., & Yaegashi, N. (2010). Establishment of a novel xenograft model for human uterine leiomyoma in immunodeficient mice. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 222(1), 55–61.

—
van den Bosch, T., Dueholm, M., Leone, F. P., Valentin, L., Rasmussen, C. K., Votino, A., van Schoubroeck, D., Landolfo, C., Installé, A. J., Guerriero, S., Exacoustos, C., Gordts, S., Benacerraf, B., D’Hooghe, T., de Moor, B., Brölmann, H., Goldstein, S., Epstein, E., Bourne, T., & Timmerman, D. (2015). Terms, definitions and measurements to describe sonographic features of myometrium and uterine masses: a consensus opinion from the Morphological Uterus Sonographic Assessment (MUSA) group. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 46(3)(Van den Bosch, T.), 284–298.

—
Vannuccini, S., Clifton, V. L., Fraser, I. S., Taylor, H. S., Critchley, H., Giudice, L. C., & Petraglia, F. (2016). Infertility and reproductive disorders: impact of hormonal and inflammatory mechanisms on pregnancy outcome. *Human Reproduction Update*, 22(1), 104–115.

—
Vikhlyaeva, E. M., Khodzhaeva, Z. S., & Fantschenko, N. D. (1995). Familial predisposition to uterine leiomyomas. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 51(2), 127–131.

—
Walocha, J. A., Litwin, J. A., & Miodoński, A. J. (2003). Vascular system of intramural leiomyomata revealed by corrosion casting and scanning electron microscopy. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 18(5), 1088–1093.

—
Wamsteker, K., Emanuel, M. H., & Kruif, J. H. (1993). Transcervical hysteroscopic resection of submucous fibroids for abnormal uterine bleeding: results regarding the degree of intramural extension. *Obstetrics and Gynecology*, 82(5), 736–740.

—
Wang, G., & Shozu, M. (2014). Nonobese diabetic/severe combined immunodeficient murine xenograft model for human uterine leiomyoma. *Fertility and Sterility*, 101(5), 1485–1492.e3.

—
Whiteman, M. K., Kuklina, E., Jamieson, D. J., Hillis, S. D., & Marchbanks, P. A. (2010). Inpatient hospitalization for gynecologic disorders in the United States. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 202(6), 541.e1–541.e5416.

—
Wilkens, J., Chwalisz, K., Han, C., Walker, J., Cameron, I. T., Ingamells, S., Lawrence, A. C., & et al. (2008). Effects of the selective progesterone receptor modulator asoprisnil on uterine artery blood flow, ovarian activity, and clinical symptoms in patients with uterine leiomyomata scheduled for hysterectomy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(12), 4664–4671.

—
Willman, E. A., Collins, W. P., & Clayton, S. G. (1976). Studies in the involvement of prostaglandins in uterine symptomatology and pathology. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 83(5), 337–341.

—
Wise, L. A., & Laughlin-Tommaso, S. K. (2016). Epidemiology of Uterine Fibroids: From Menarche to Menopause. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 59(1), 2–24.

—
Wise, L. A., Palmer, J. R., Harlow, B. L., Spiegelman, D., Stewart, E. A., Adams-Campbell, L. L., & Rosenberg, L. (2004a). Reproductive Factors, Hormonal Contraception, and Risk of Uterine Leiomyomata in African-American Women: A Prospective Study. *American Journal of Epidemiology Hopkins Bloomberg School of Public Health All Rights Reserved*, 159(2), 113–123.

—
Wise, L. A., Palmer, J. R., Harlow, B. L., Spiegelman, D., Stewart, E. A., Adams-Campbell, L. L., & Rosenberg, L. (2004b). Risk of uterine leiomyomata in relation to tobacco, alcohol and caffeine consumption in the Black Women’s Health Study. *Human Reproduction*, 19(8), 1746–1754.

—
Wise, L. A., Radin, R. G., Palmer, J. R., Kumanyika, S. K., Boggs, D. A., & Rosenberg, L. (2011). Intake of fruit, vegetables, and carotenoids in relation to risk of uterine leiomyomata 1–4. *Am J Clin Nutr*, 94, 1620–1651.

—
Wong, L., White, N., Ramkrishna, J., Araujo Júnior, E., Meagher, S., & Costa, F. (2015). Three-dimensional imaging of the uterus: The value of the coronal plane. *World Journal of Radiology*, 7(12), 484–493.

—
World Health Organization (Ed.). (2015). *Medical Eligibility criteria for contraceptive use (Fifth)*.

—
Wright, J. D., Tergas, A. I., Burke, W. M., Cui, R. R., Ananth, C. v., Chen, L., & Hershman, D. L. (2014). Uterine pathology in women undergoing minimally invasive hysterectomy using morcellation. *JAMA*, 312(12), 1253–1255.

—
Wrona, W., Stępniań, A., & Czuczwar, P. (2017). The role of levonorgestrel intrauterine systems in the treatment of symptomatic fibroids. *Przegląd Menopauzalny = Menopause Review*, 16(4), 129–132.

Wu, X., Serna, V. A., Thomas, J., Qiang, W., Blumenfeld, M. L., & Kurita, T. (2017). Subtype-Specific Tumor-Associated Fibroblasts Contribute to the Pathogenesis of Uterine Leiomyoma. *Cancer Res*, 77(24), 6891–6901.

Xu, Q., Ohara, N., Chen, W., Liu, J., Sasaki, H., Morikawa, A., Sitruk-Ware, R., Johansson, E. D., & Maruo, T. (2006). Progesterone receptor modulator CDB-2914 down-regulates vascular endothelial growth factor, adrenomedullin and their receptors and modulates progesterone receptor content in cultured human uterine leiomyoma cells. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 21(9), 2408–2416.

Yuan, J. P., Wang, L. W., Qu, A. P., Chen, J. M., Xiang, Q. M., Chen, C., Sun, S. R., Pang, D. W., Liu, J., & Li, Y. (2015). Quantum dots-based quantitative and in situ multiple imaging on ki67 and cytokeratin to improve ki67 assessment in breast cancer. *PLoS One*, 10(4), e0122734.

Yuan, M. M., Xu, Y. Y., Chen, L., Li, X. Y., Qin, J., & Shen, Y. (2015). TLR3 expression correlates with apoptosis, proliferation and angiogenesis in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis. *BMC Cancer*, 15(245).

Zepiridis, L. I., Grimbizis, G. F., & Tarlatzis, B. C. (2016). Infertility and uterine fibroids. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 34, 66–73.

Zhao, G., Ford, E. S., Tsai, J., Li, C., Croft, J. B., & Petry, C. J. (2012). Factors Associated with Vitamin D Deficiency and Inadequacy among Women of Childbearing Age in the United States. *Obstetrics and Gynecology*, 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/691486>.



