



Università degli Studi di Trieste

***XXXII Ciclo del Dottorato di Ricerca in  
Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo***

**Ricerca proteomica nei  
tumori uterini maligni e  
benigni**

*Settore scientifico disciplinare MED/38  
ANNO ACCADEMICO 2018/2019*

***Dottorando:***

***Guglielmo Stabile***

***Coordinatore:***

***Prof. Paolo Gasparini***

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Paolo Gasparini'.

***Supervisore:***

***Prof. Giuseppe Ricci***

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Giuseppe Ricci'.

# INDICE

<b>Indice.....</b>	<b>2</b>
<b>Introduzione.....</b>	<b>3</b>
<b>Patologia miometriale.....</b>	<b>8</b>
<b>Patologia endometriale.....</b>	<b>15</b>
<b>Obiettivi.....</b>	<b>19</b>
<b>Materiali e Metodi.....</b>	<b>19</b>
<b>Gruppo1.....</b>	<b>20</b>
<b>Gruppo 2.....</b>	<b>24</b>
<b>Gruppo 3.....</b>	<b>27</b>
<b>Conclusioni.....</b>	<b>30</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>31</b>

# INTRODUZIONE

Miometrio ed endometrio uterini sono tra i tessuti che presentano le variazioni più marcate della maturazione post-trascrizionale del pre-mRNA. Questo fenomeno contribuisce in maniera determinante a generare la complessità genomica e proteomica tessuto-specifica, le cui variazioni sono influenzate significativamente dai cambiamenti ormonali ciclici della fisiologia femminile. Le conseguenze di ciò si riflettono su una serie di patologie uterine che includono neoplasie benigne e maligne del miometrio e dell'endometrio.

## **PROTEOMICA: Una panoramica**

La **proteomica** è la scienza che consente lo studio approfondito del proteoma, ed è una branca della biologia molecolare. Più in dettaglio, si può parlare di proteoma cellulare, per intendere l'insieme delle proteine espresse da una singola cellula, oppure di proteoma completo, se si fa riferimento all'insieme di tutti i proteomi cellulari di un intero organismo; questo, per analogia, è l'equivalente proteico del genoma. È importante sottolineare come una delle più importanti scoperte dell'era post-genomica è che il vecchio paradigma secondo cui un gene codifica per una sola proteina risulta non essere più valido. Il proteoma infatti è più grande del genoma, specie negli eucarioti, a causa delle modifiche post-traduzionali (glicosilazione, fosforilazione) e in quanto questo presenta due livelli di complessità che mancano nel genoma. Il proteoma infatti non è limitato alla sequenza proteica, ma tiene conto anche delle modificazioni strutturali e dell'interazione tra le proteine stesse. Inoltre, a differenza del genoma che è qualcosa considerata come statica, il proteoma cambia continuamente, in rapporto con lo stadio di sviluppo, la localizzazione tissutale specifica e le condizioni ambientali in cui si trova l'organismo in questione.

La variabilità del contenuto proteico di una cellula, di un tessuto o di un organismo in generale è da associare a diverse possibili cause, quali cambiamenti indotti da patologie, risposte a stimoli esterni oppure a processi compresi nella fisiologia ma

che inducono mutamenti cellulari.

È possibile, in quest'ottica, correlare la presenza o l'assenza o il diverso livello di espressione di una proteina ad un determinato stato fisiologico oppure patologico.

Il ramo della proteomica che studia le variazioni quantitative e qualitative di queste proteine in relazione a condizioni fisio-patologiche è chiamata **proteomica di espressione**, mentre, la **proteomica funzionale** è il ramo che studia la funzione biologica di proteine il cui ruolo è ancora sconosciuto e che tenta di identificare componenti di compartimenti cellulari, complessi multi proteici e vie di trasduzione del segnale. La proteomica di espressione a sua volta si distingue in due principali linee: la **proteomica sistematica** che aiuta a definire mappe di riferimento delle proteine espresse nei tessuti identificando quelle maggiormente espresse nel tessuto specifico; e la **proteomica differenziale** che valuta in base alle variazioni patologiche o fisiologiche di un tessuto la quantità e le differenti proteine.

Le applicazioni possibili di questa disciplina sono molto ampie e spaziano dallo studio dei processi molecolari che si osservano in corso di malattia, quali modificazioni post- traduzionali delle proteine o loro redistribuzione cellulare, allo sviluppo di nuovi biomarker proteici specifici per determinate condizioni.

Le informazioni fornite da una ricerca proteomica sono complementari e spesso più ampie rispetto alle informazioni genetiche ricavate da un ricerca genomica. Basti pensare, infatti, che lo studio del proteoma è lo studio dell'insieme delle proteine prodotte dal genoma, ma che se nel genoma umano abbiamo 30.000 geni, abbiamo un proteoma composto all'incirca da 100.000 proteine. L'associazione di genomica e proteomica infatti rappresenta il futuro della ricerca biomedica e ha un impatto significativo sullo sviluppo di nuovi sistemi diagnostici.

30'000 geni nel genoma umano

100'000 proteine nel proteoma umano



## LA PROTEOMICA NELLA PRATICA CLINICA

Il possibile impiego della proteomica è rivolto alla diagnosi, alla ricerca di nuovi biomarker ed anche allo sviluppo di nuove terapie mediante l'identificazione di possibili target terapeutici.

Tra le applicazioni cliniche della proteomica la ricerca dei biomarker rappresenta sicuramente uno dei principali ambiti. Questi vengono generalmente ricercati nei liquidi biologici, grazie alla loro facile accessibilità e alla non invasività del metodo di raccolta rispetto alla biopsia tissutale. D'altronde, la ricerca ha dimostrato che nei fluidi biologici è possibile ritrovare le componenti proteiche dei tessuti che sono in rapporto con essi. I liquidi biologici che possono essere analizzati tramite studi di proteomica comprendono il plasma, l'urina, il liquido cefalorachidiano, il liquido seminale, il liquido sinoviale, il liquido di lavaggio bronco-alveolare e il liquido amniotico e il fluido cervico-vaginale.

Tecniche di proteomica sono state ad esempio utilizzate nell'indagine, sotto diversi profili, delle seguenti patologie:

- *carcinoma mammario*, ad esempio nella classificazione dei tessuti tumorali per distinguere il profilo di espressione proteica del tessuto

mammario normale, tumorale benigno e maligno [1], confronto di biomarker sierici in pazienti con carcinoma mammario e controlli sani [2], identificazione delle pathway coinvolte nell'azione nuovi di farmaci antineoplastici [3], identificazione di specifiche modificazioni del ciclo cellulare coinvolte nella cancerogenesi [4].

- *carcinoma prostatico* [5],
- *patologie cardiache*, ad esempio per lo studio della cardiomiopatia dilatativa [6]

Tecniche di proteomica, inoltre, sono state già utilizzate in ambito di ginecologia oncologica, ed endometriosi:

- *cancro della cervice uterina*, identificazione di biomarker attraverso l'analisi del fluido cervico-vaginale [7], analisi delle differenze di espressione proteica tra i tessuti di cervice normale, CIN e carcinoma a cellule squamose [8].
- *carcinoma ovarico*, ricerca di biomarker sierici [9], possibili nuovi target terapeutici per forme multidrug-resistance [10], profilo del proteoma-metaboloma nell'ascite da carcinoma ovarico [11].
- *carcinoma dell'endometrio*, ricerca di autoanticorpi indotti dalla neoplasia come possibili biomarker diagnostici [12], biomarker proteici per la valutazione del rischio di cancro dell'endometrio in pazienti con PCOS [13], individuazione di biomarker identificativi di forme di carcinoma ad alto rischio [14].
- *endometriosi ed infertilità*, utilizzo della proteomica per indagare le correlazioni tra stress ossidativo ed infertilità [15], biomarker sierici dell'endometriosi [16]

## **FOSFOPROTEINE**

Una parte della proteomica riguarda sicuramente anche la fosforilazione delle proteine. Sappiamo infatti che più del 50% di tutte le proteine vanno incontro a fosforilazione e che questa è regolata in modo dinamico dalle chinasi e dalle fosfatasi. La fosforilazione modifica la struttura e la funzione delle proteine (attività enzimatica, specificità di substrato etc.), regola la localizzazione proteica e la formazione o la divisione di complessi proteici ed interviene, influenzandoli, in diversi processi cellulari quali quelli di segnale, metabolici oppure nell'apoptosi ed anche nella regolazione genica.

Di certo, quindi, le fosfoproteine fanno parte dei rami di studio più interessanti della proteomica in quanto, come in altri ambiti della medicina, permettono di intravedere possibilità future terapeutiche oltre che diagnostiche all'interno della patologia dell'apparato genitale femminile.

# Patologia Miometriale

## I MIOMI

### Patogenesi ed Epidemiologia

I leiomiomi, definiti più comunemente fibromi, sono la più comune neoplasia uterina, diagnosticata in circa l'80% dei prodotti di isterectomia. La loro prevalenza nelle donne tra i 35 ed i 55 anni di età è stimata intorno al 40%, e si mantiene costante nella popolazione anziana. Essi, inoltre, rappresentano la principale causa di isterectomia al mondo. La mancanza di cure mediche disponibili per il trattamento dei leiomiomi è imputabile principalmente ad una ancora scarsa conoscenza dei meccanismi patogenetici e di crescita tumorale responsabili dello sviluppo dei miomi stessi. Per questa ragione è sempre maggiore l'interesse della ricerca nei confronti dell'individuazione di possibili target terapeutici.

Diversi fattori epidemiologici sono stati associati ai leiomiomi uterini, quali la razza, l'ereditarietà [17], fattori riproduttivi (nulliparità, menarca precoce e menopausa tardiva), steroidi sessuali esogeni (contraccettivi orali [18]), stile di vita e fattori ambientali (PCOS, obesità [19], diabete mellito e ipertensione [20]).

Tuttavia queste informazioni vanno interpretate con cautela. La maggior parte degli studi erano studi trasversali o studi di coorte condotti in popolazioni prevalentemente mono-etniche.

Recenti studi hanno riportato che vengono effettuate più di 600000 isterectomie all'anno solo negli Stati Uniti, e che di queste il 29,4% e il 41,4% rispettivamente in donne tra 18-44 e 45-64 anni sono dovute alla presenza di miomi uterini [21]. Infatti



tra tutte le indicazioni benigne all'isterectomia i leiomiomi uterini rappresentano la principale.

Si rende quindi necessario concentrare gli studi futuri sull'individuazione di nuovi ed alternativi approcci terapeutici rispetto all'isterectomia. Attualmente sta infatti crescendo l'interesse verso la ricerca di trattamenti più conservativi chirurgici ma soprattutto medici, con lo scopo di identificare delle terapie mediche per prevenire o inibire la crescita dei miomi, o se possibile di indurne la regressione [22]. Si può comprendere quanto il problema sia sentito soprattutto nei paesi occidentali, dove l'età della prima gravidanza è al di sopra dei 30 anni e continua ad aumentare progressivamente negli anni, come anche la prevalenza dei miomi nella popolazione dopo i 35 anni (fino al 40%)

Per quanto riguarda la crescita dei leiomiomi, la letteratura ad oggi ha riportato che la crescita e la regressione dei miomi risultano essere molto variabili [23]. Ad ogni modo, la crescita e la riduzione del mioma ha una variabilità compresa fra -89% e +138% all'interno di uno stesso utero e in donne diverse.

Ad oggi i leiomiomi rimangono una patologia poco studiata, e non si conosce ancora l'esatto meccanismo patogenetico responsabile della loro formazione. Si tratta ad ogni modo di una malattia la cui patogenesi è verosimilmente multifattoriale.

## **FATTORI DI RISCHIO**

In passato è già stata stabilita una correlazione tra i livelli di estrogeni e progesterone e la crescita dei miomi. La crescita del leiomioma dell'utero è strettamente correlata agli estrogeni e ai loro recettori ( $ER\alpha$  ed  $ER\beta$ ). Numerosi studi hanno rilevato che i livelli di mRNA ed espressione proteica, così come il contenuto di  $ER\alpha$  ed  $ER\beta$  sono più alti nel leiomioma se confrontato col miometrio normale [24]. In accordo con questa ipotesi, gli estrogeni potrebbero esercitare i

loro effetti di stimolo della crescita attraverso l'intermediazione di citochine, fattori di crescita o fattori apoptotici [25]. Ishikawa et al. suggeriscono che non ci sia un effetto diretto degli estrogeni ma che questi possano stimolare l'espressione del recettore del progesterone (PR) che sarebbe il diretto responsabile nell'induzione della crescita del mioma [26]. Anche altri studi hanno messo in luce come il progesterone attraverso i suoi recettori PR-A e PR-B intervenga in modo diretto nella biologia del miometrio e del leiomioma [27,28] e che nei leiomiomi vi sia una maggiore espressione di PR e di mRNA rispetto al miometrio normale [29,30,31]; in particolare Fujimoto et al. hanno descritto la sovraespressione del PR-B e di mRNA sulla superficie del leiomioma [32].

Inoltre, diverse citochine come Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), eritropoietina, interleuchina-1 (IL-1) e interleuchina 6 (IL6) sembrano avere un ruolo nello sviluppo del leiomioma uterino, [33,34].

Seppur le cause non sono ancora state identificate, è ormai nota una maggior prevalenza dei leiomiomi nelle donne di razza Afro-Americana rispetto a quelle di razza Caucasica ed Ispanica [35]. È altresì nota la correlazione fra i miomi e la familiarità. Parenti di primo grado di donne affette hanno un aumento del rischio di 2.5 volte di sviluppare fibromi [36,37].

Recenti evidenze scientifiche indicano che perlomeno alcuni miomi hanno un'eziologia genetica. Studi recenti hanno descritto la presenza nel 70% dei fibromi di una serie di mutazioni in una Transcriptional regulator complex subunit 12 (MED12) [38]. MED12 è frequentemente mutata nei leiomiomi tipici (66.6%) e nei leiomiosarcomi molto aggressivi. Probabilmente, però, MED12 è qualcosa di correlato esclusivamente ai tumori uterini in quanto in altri leiomiosarcomi non uterini la sua mutazione non risulta presente [39].

Diversi studi riportano un importante aumento dell'incidenza dei fibromi dopo i 30 anni di età [39,40]. Questo potrebbe rappresentare il risultato di cambiamenti ormonali legati all'età o essere dovuto ad un aumento della sintomatologia di

fibromi già esistenti. Diversi studi hanno rivelato che il fumo potrebbe ridurre l'incidenza dei miomi; la nicotina inibisce le aromatasi e riduce la conversione degli androgeni in estrone [41]. Un menarca precoce, prima dei 10 anni, è stato riscontrato essere un fattore di rischio per lo sviluppo dei miomi uterini, mentre un menarca dopo i 16 anni sembra ridurre lo stesso rischio [42]. Alcuni studi sottolineano che vi è una correlazione tra bassa incidenza dei miomi ed elevato numero di gravidanze [43]. Il crescente numero di miomectomie ed isterectomie nei paesi occidentali potrebbe essere correlato alla ridotta natalità di questi paesi ed al procrastinamento crescente della popolazione femminile della prima gravidanza. La gravidanza, infatti, potrebbe indurre un remodeling della matrice extracellulare (MEC) e l'espressione di specifici recettori per peptidi e steroidi. La terapia sostitutiva postmenopausale non sembra essere responsabile di importanti stimoli alla crescita dei fibromi [44], ma questo entra in contrasto con altri lavori che mettono in correlazione la crescita dei miomi con l'uso di contraccettivi orali. Probabilmente le differenze nell'induzione della crescita fibromatosa è legata alle diverse quantità ormonali di estrogeni ed ai diversi progestinici utilizzati nei contraccettivi orali e per la terapia ormonale sostitutiva.

Il leiomioma dell'utero, inoltre, produce una matrice extracellulare (MEC) che risulta anomala in volume, contenuto e struttura [45]. La disorganizzazione della matrice extracellulare è una caratteristica tipica dei fibromi in accrescimento, essendo costituita da diversi tipi di collagene, fibronectina e proteoglicani. La ricerca sulle anomalie della matrice extracellulare (MEC) e la loro correlazione con i fibromi ha portato all'individuazione di un fattore di crescita con attività profibrotica, il Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) [46]. La subunità  $\beta 3$  di TGF-  $\beta$  e i mediatori del suo segnale sono overespressi nei leiomiomi se confrontati con il miometrio normale [47]. Rogers et al. hanno confermato che la matrice extracellulare risulta anomala in contenuto e struttura e che le cellule di leiomioma con tale matrice sono sottoposte ad un maggiore stress meccanico. Questo diverso

carico meccanico è associato ad una alterata organizzazione dell'actina e alterata espressione di Rho-GEF (AKAP13).



Sono state proposte diverse teorie in merito alle cause che danno origine ai miomi. Rein [48] afferma che l'aumento dei livelli di estrogeni potrebbe avere come risultato un aumento del tasso mitotico delle cellule che a sua volta sarebbe causa di induzione di mutazioni somatiche. Un'altra interessante teoria ipotizza che la patogenesi potrebbe essere simile alla risposta generata da un danno tissutale; il danno ischemico sarebbe scatenato dai flussi mestruali che provocherebbero la liberazione di sostanze ad azione vasocostrittiva. Le cellule di muscolo liscio a quel punto risponderebbero al danno producendo matrice extracellulare fibrosa [49]. A seguito del danno vascolare sono sovraespressi nel leiomioma fattori di crescita dei fibroblasti [50].

## **TERAPIA**

Oltre alla terapia chirurgica, praticata in genere per fibromi sintomatici maggiori di 3 cm [51] esistono diverse terapie mediche per i fibromi

- Pillole Estro progestiniche
- Danazolo

- IUD medicate con Levonorgestrel (Mirena)
- GnRha
- **SPRMs (Selective- progesterone – receptor modulators)**

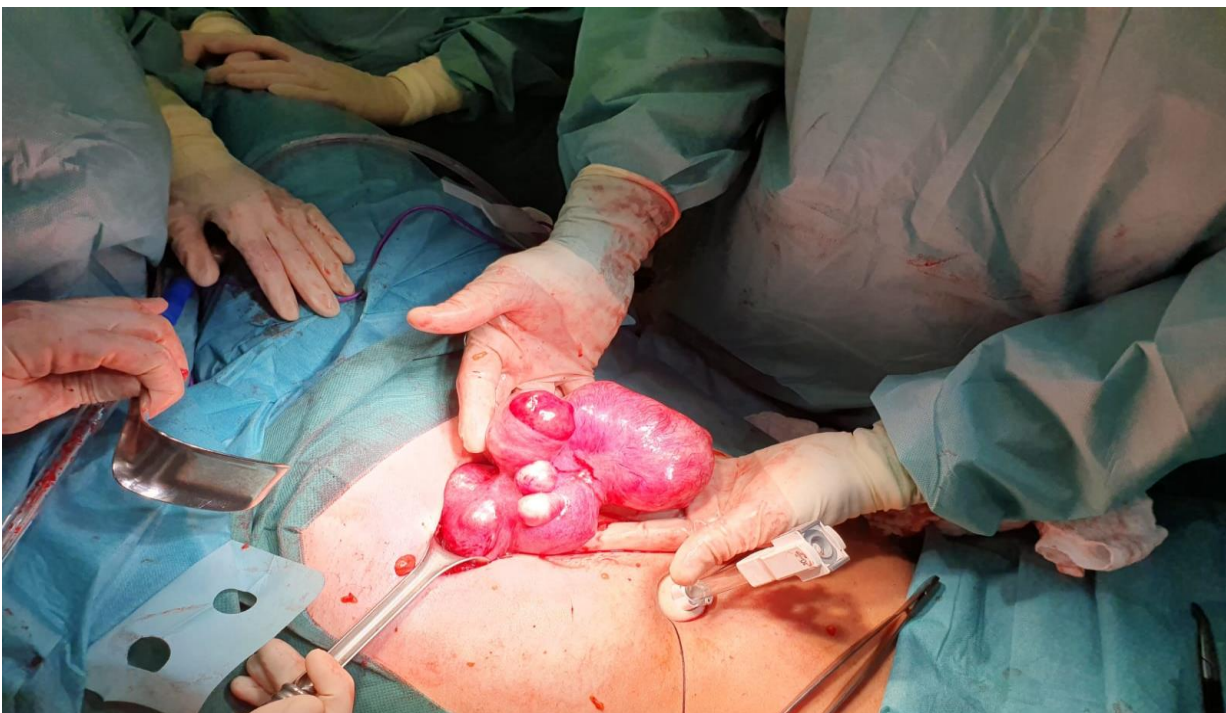
Gli SPRMs rappresentano l'ultima terapia medica entrata nel mercato ed inizialmente su questi sono state riposte molte aspettative sulla possibilità di avere a disposizione una terapia medica che migliorasse i sintomi, interrompesse l'accrescimento dei miomi ed addirittura riducesse di volume le lesioni.

Gli SPRMs sono composti steroidei o non steroidei che legano i recettori del progesterone, modulando (la modulazione è tessuto specifica) la trascrizione recettoriale. I vari SPRMs sono una classe ampia di farmaci che va dall'antagonismo all'agonismo puro e per quanto riguarda la terapia medica dei miomi il farmaco che ha dato i migliori risultati si è rivelato essere l'Ulipristal Acetato (UPA).

L'UPA si comporta da antagonista nei confronti del Progesterone nei tessuti bersaglio avendo un effetto diretto nei confronti dei miomi riducendone le dimensioni, un effetto sull'ipofisi inducendo amenorrea ed infine un effetto diretto sull'endometrio bloccandone il sanguinamento. L'effetto farmacodinamico sull'endometrio induce delle modificazioni tipiche dell'istologia endometriale (PAECs) reversibile dopo la fine del trattamento ed il ritorno delle mestruazioni. I PAECs cioè PRM Associated Endometrial Changes, sono caratterizzati da endometrio inattivo o debolmente proliferativo con ghiandole di aspetto cistico. Nel Novembre 2016 era stato approvato l'uso di UPA per 4 cicli da 3 mesi ciascuno di trattamento a carico del SSN, non solo come terapia pre-chirurgica ma anche come terapia medica specifica per la miomatosi uterina. Nel Novembre 2017 purtroppo, dopo 4 casi di insufficienza epatica grave, che hanno condotto a trapianto epatico e di cui uno è risultato fatale per il paziente, l'UPA è stato ritirato dal commercio da parte dell'EMA. Il farmaco è stato reintrodotta in commercio nell'Agosto del 2018

ma le sue indicazioni sono state riviste. Infatti, l'Ulipristal Acetato rimane indicato solo nelle pazienti non elegibili per chirurgia o in un singolo ciclo di trattamento di 3 mesi nella fase pre-chirurgica. Non può essere somministrato nel caso di disordini epatici da parte dei pazienti e deve essere interrotto il trattamento nel caso di aumento degli enzimi epatici che vanno testati nei pazienti all'inizio del trattamento, al termine e mensilmente durante i primi 2 cicli di terapia. Ogni paziente deve essere messo al corrente dei rischi epatici legati all'uso del farmaco. Naturalmente tutte queste limitazioni hanno ridimensionato le aspettative inizialmente riposte su questo farmaco.

In conclusione, molto c'è ancora da capire sull'eziologia e sullo sviluppo dei miomi ed inoltre sull'effetto che i farmaci possono avere su quest'ultimi. Solo comprendendo a pieno questi processi complessi della patologia sarà forse possibile trovare in futuro una terapia adeguata oltre a quella chirurgica.



# **Patologia Endometriale**

## **CARCINOMA ENDOMETRIALE**

Nel mondo, il tumore dell'endometrio è al 6° posto tra i tumori più frequenti nelle donne. Rappresenta per incidenza circa il 5% del totale dei tumori nelle donne, con circa 288.000 nuovi casi e 74.000 morti per anno stimati nel 2010

In Italia nel 2013 sono stati diagnosticati 8200 casi di carcinoma endometriale ed il rischio per una donna di sviluppare un carcinoma endometriale nel nostro paese è di 1:47.

L'incidenza massima di tale patologia è tra i 55 ed i 65 aa (30% dei casi diagnosticato prima della menopausa) e data la precoce comparsa dei sintomi (sanguinamento genitale) essa viene diagnosticata nell'80-85% dei casi al I stadio.

### **FATTORI DI RISCHIO**

Il fattore di rischio principale è l'esposizione prolungata agli estrogeni in assenza di un effetto differenziante dell'endometrio. In generale possiamo distinguere tra i fattori di rischio endogeni e quelli esogeni:

**ENDOGENI:** Menarca precoce –Menopausa tardiva

Anovularità

Nulliparità

Obesità, Diabete, PA aumentata

Genetici (S. di Lynch)

Tumori estrogeno-secernenti

**ESOGENI:** Dietetici (Dieta Ipercalorica, scarsa attività fisica)

RT (Dose e durata)

## Tamoxifene

### ANATOMIA PATOLOGICA

Il carcinoma dell'endometrio può insorgere in qualsiasi punto della cavità del corpo dell'utero e può essere sia in forma circoscritta che diffusa. L'utero affetto dalla malattia può presentarsi di volume aumentato e consistenza diminuita, può apparire, però, anche del tutto normale [52].

Il carcinoma endometriale si può presentare sotto forma di diversi tipi istologici:

- Adenocarcinoma endometriode 90%
  - *villoghiandolare*
  - *secretivo*
  - *a cellule ciliate*
  - *con differenziazione squamosa*
    - *metaplasia squamosa*
    - *carcinoma adenosquamoso*
- Adenocarcinoma sieroso 5-10%
- Adenocarcinoma a cellule chiare 1-5.5%
- Adenocarcinoma mucinoso raro
- Carcinoma squamoso raro
- Carcinoma misto raro
- Carcinoma indifferenziato raro
- Varianti rare

Per tale motivo si può dividere il Tumore endometriale in 2 tipi:

- I Tipo Carcinoma endometriode (derivante da iperestrogenismo e da Iperplasia atipica) nel 90% dei casi



- Il Tipo Istotipo sieroso-papillifero, a cellule chiare, adeno-squamoso etc., non preceduto da iperplasia atipica, nel 10 % dei casi

## **DIAGNOSI**

Come precedentemente accennato, nell'80-85% dei casi questo tipo di tumore è diagnosticato al I stadio grazie alla presenza di sintomi precoci (perdite ematiche dai genitali) che spesso inducono le pazienti ad eseguire accertamenti. E' il tumore più frequente dell'apparato genitale femminile ma ciò nonostante non esiste un esame di Screening per questa malattia nelle donne asintomatiche.

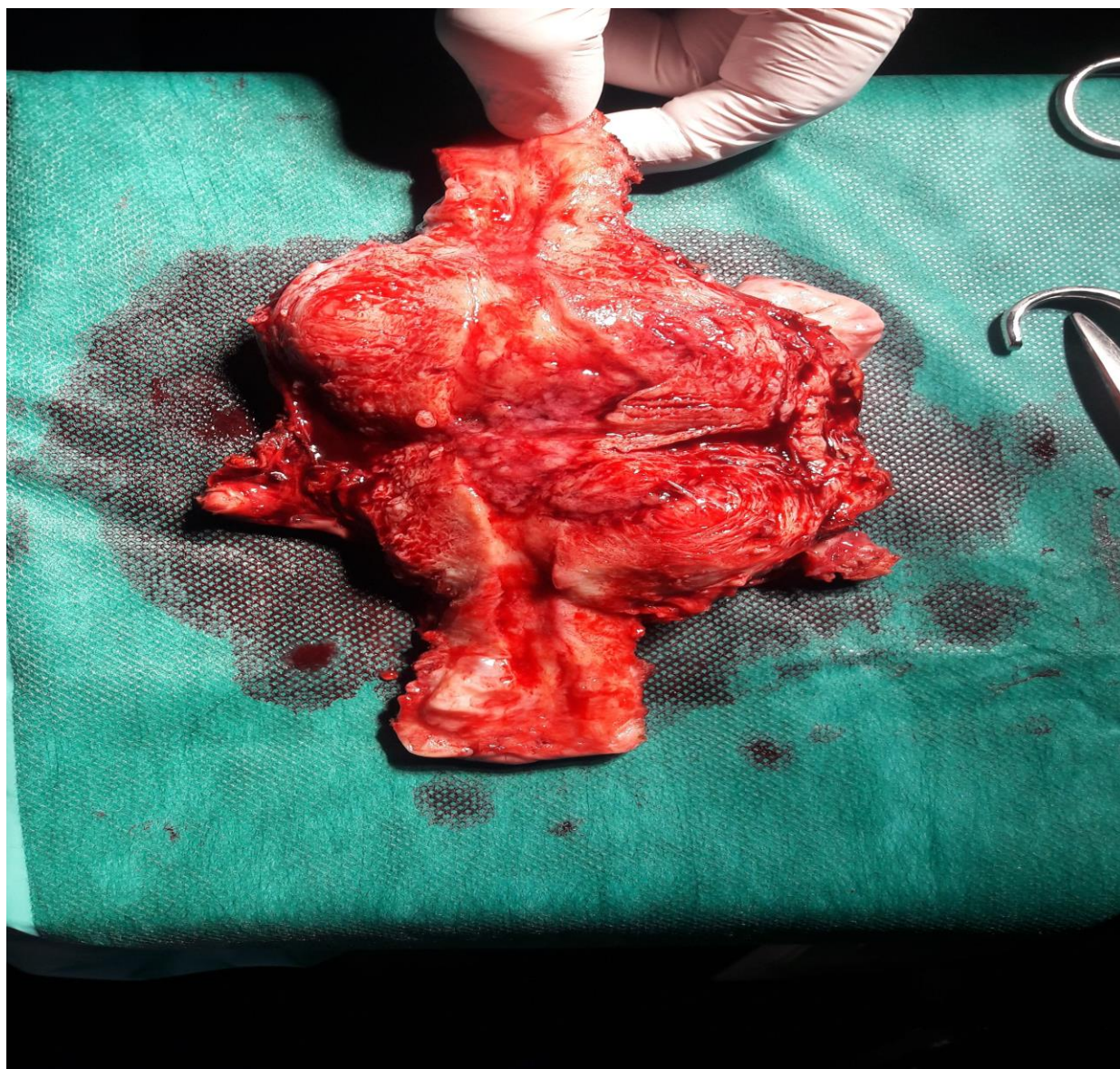
Per quanto riguarda gli esami strumentali utili a sospettare e quindi diagnosticare la patologia quelli generalmente usati sono:

- Ecografia: Consente la misurazione dello spessore endometriale permettendo di analizzare la struttura del tessuto endocavitario e la eventuale presenza di infiltrazione miometriale di malattia. Purtroppo, però, la sola ecografia non è diagnostica
- Risonanza Magnetica: Utile nella valutazione preoperatoria (Infiltrazione miometriale, invasione cervicale, interessamento linfonodale) anch'essa non è diagnostica
- TAC: Utilizzata prevalentemente per l'individuazione di metastasi a distanza

Il Gold standard, dunque, per la diagnosi del carcinoma endometriale è la biopsia endometriale, generalmente eseguita mediante Isteroscopia. In assenza di questa la revisione di cavità uterina o la biopsia mediante cannula di Novak possono sostituire questa procedura.

Si deve ricordare, inoltre, che la stadiazione della malattia avviene solo tramite chirurgia e che al momento non esistono marcatori per il carcinoma endometriale.

Le proteine svolgono un ruolo chiave nello sviluppo di diverse patologie tra cui i tumori. Inoltre, i liquidi biologici sono ricchi di proteine e la differente concentrazione di queste al loro interno può indicare o meno la presenza di malattia, rendendole un marker plausibile per lo sviluppo di nuovi test diagnostici non invasivi.



# **OBIETTIVI**

Gli obiettivi che ci siamo posti all'inizio di questo progetto di studio erano i seguenti:

- Identificazione di diversa quantità di Fosfoproteine nelle cellule di mioma rispetto a quelle del miometrio normale
- Identificazione di espressione proteica diversa nelle cellule di miomi trattati con Ulipristal Acetato rispetto a i miomi non trattati
- Comprendere il coinvolgimento delle diverse proteine nella crescita del tumore
- Identificazione e validazione di biomarker solubili nell'aspirato uterino di donne affette da Carcinoma endometriale

# **MATERIALI E METODI**

Il nostro studio è stato condotto su gruppi diversi di pazienti, divisi per patologia e per proteine ricercate. Più precisamente i gruppi studiati erano:

- 1) Espressione delle fosfoproteine dei miomi in gruppo di pazienti affette da miomatosi uterina, Vs fosfoproteine espresse dal miometrio normale di quelle stesse pazienti
- 2) Espressione proteica nei miomi uterini di 2 gruppi di donne di cui uno trattato con UPA per almeno 3 mesi Vs gruppo di donne non trattate
- 3) Espressione proteica nell'endometrio di 2 gruppi di donne di cui uno affetto da carcinoma endometriale e l'altro con endometrio sano.

Le analisi statistiche sono state effettuate mediante il test non-parametrico di Wilcoxon sign-rank.

Prima della raccolta dei campioni tutte le donne avevano firmato un consenso informato per la partecipazione allo studio e per l'autorizzazione alla conservazione ed all'analisi dei campioni. Tutti i campioni una volta prelevati venivano conservati e congelati ad una temperatura di -80°C. Nella conduzione della nostra analisi abbiamo creato un database con tutti i dati dei pazienti. I nostri criteri di esclusione per le pazienti sono stati: Altri tumori sincroni alla patologia miometriale ed endometriale,

infezioni virali croniche (HCV, HBV, HIV), mutazioni genetiche note (come la S. di Lynch).

## **GRUPPI DI STUDIO**

### **Gruppo 1**

La nostra ricerca è stata eseguita su 7 pazienti sottoposte ad isterectomia per fibromatosi uterina sintomatica. La biopsia è stata eseguita dopo l'estrazione del pezzo operatorio e per ogni paziente operata abbiamo eseguito una biopsia sul leiomioma ed un'altra sul miometrio normale ad almeno 2 cm di distanza dalla capsula dei leiomiomi. Per rendere omogeneo il nostro campione sono state reclutate solo donne con leiomiomi sottomucosi od intramurali tra i 4 ed i 6 cm di diametro.

### **ANALISI**

Per l'individuazione delle fosfoproteine abbiamo condotto la nostra analisi proteomica in 2 step.

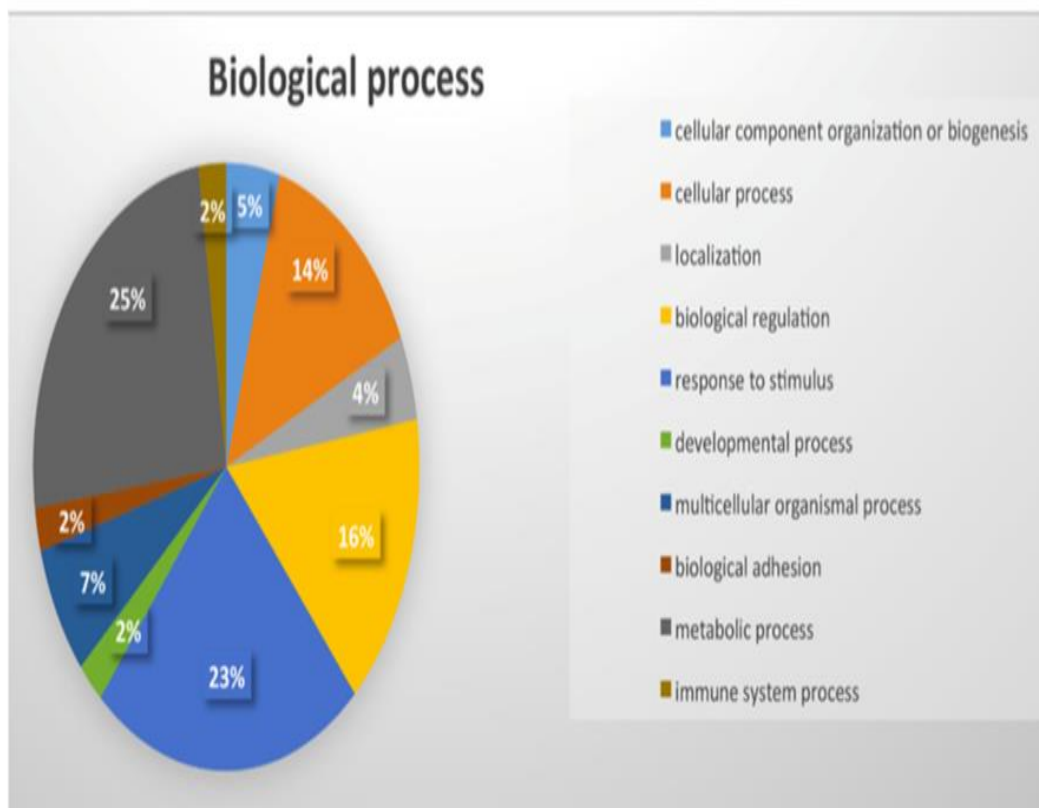
I STEP: Abbiamo usato un gel per elettroforesi bidimensionale. Successivamente la colorazione per fosfoproteine Pro Q Diamond. Abbiamo elaborato con un software (Proteomweaver) le fosfoproteine identificate con il gel bidimensionale. Infine abbiamo identificato le fosfoproteine con la Spettrometria di massa.

II STEP: Arricchimento delle fosfoproteine con la cromatografia con tecnica IMAC. Abbiamo eseguito nuovamente l'elettroforesi su gel bidimensionale ed individuato di nuovo le fosfoproteine con il software. Infine abbiamo eseguito nuovamente la spettrometria di massa per l'identificazione delle fosfoproteine. Al termine della procedura abbiamo validato i nostri dati tramite Western blotting.

Dopo la colorazione con la tecnica Pro Q Diamond abbiamo identificato la presenza in quantità diversa di 7 fosfoproteine tra il leiomioma ed il miometrio normale. Nello specifico abbiamo trovato 2 fosfoproteine APO E e RPLP2 più espresse nelle cellule di leiomioma (>1.5 fold), mentre altre 5 erano meno rappresentate cioè CAVN1, HNRNPC, PTRF, APOD, MYLK (<0.6-fold).

Dopo l'utilizzo della tecnica IMAC, invece, abbiamo riscontrato la presenza di 25 fosfoproteine di cui 24 Upregolate mentre 1 downregolata (abbiamo considerato esclusivamente le fosfoproteine con una concentrazione statisticamente significativa ( $P < 0.05$ )). La cosa che abbiamo notato è che le 7 proteine identificate con la tecnica di colorazione Pro Q Diamond non entravano a far parte delle 25 identificate con la tecnica IMAC. Probabilmente la differenza nell'individuazione delle fosfoproteine è dovuta alla differenza delle due tecniche utilizzate per isolarle.

Successivamente alla loro identificazione abbiamo usato la classificazione Panther dividendo le fosfoproteine a seconda dei processi biologici in cui erano coinvolte

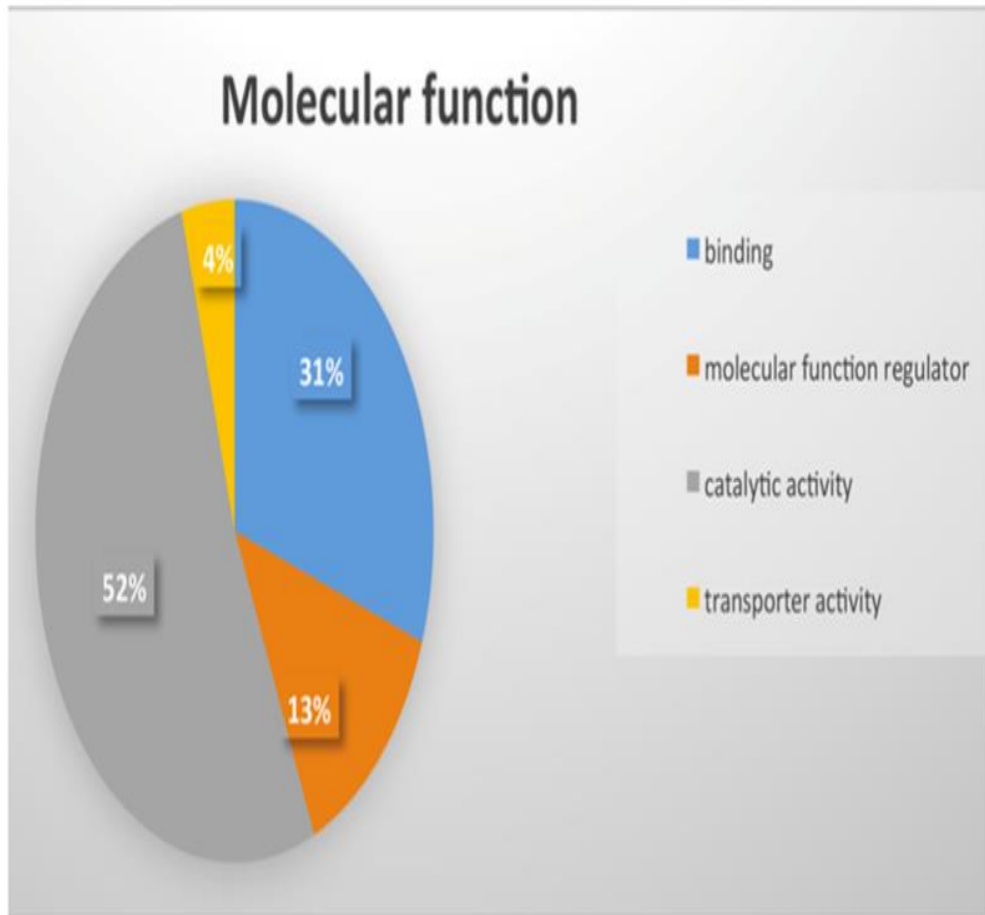


**Figure S1.** PANTHER classification of identified proteins in the leiomyoma according to their biological process.

[53]

In seguito abbiamo diviso le fosfoproteine, sempre utilizzando la classificazione Panther, secondo la loro funzione molecolare



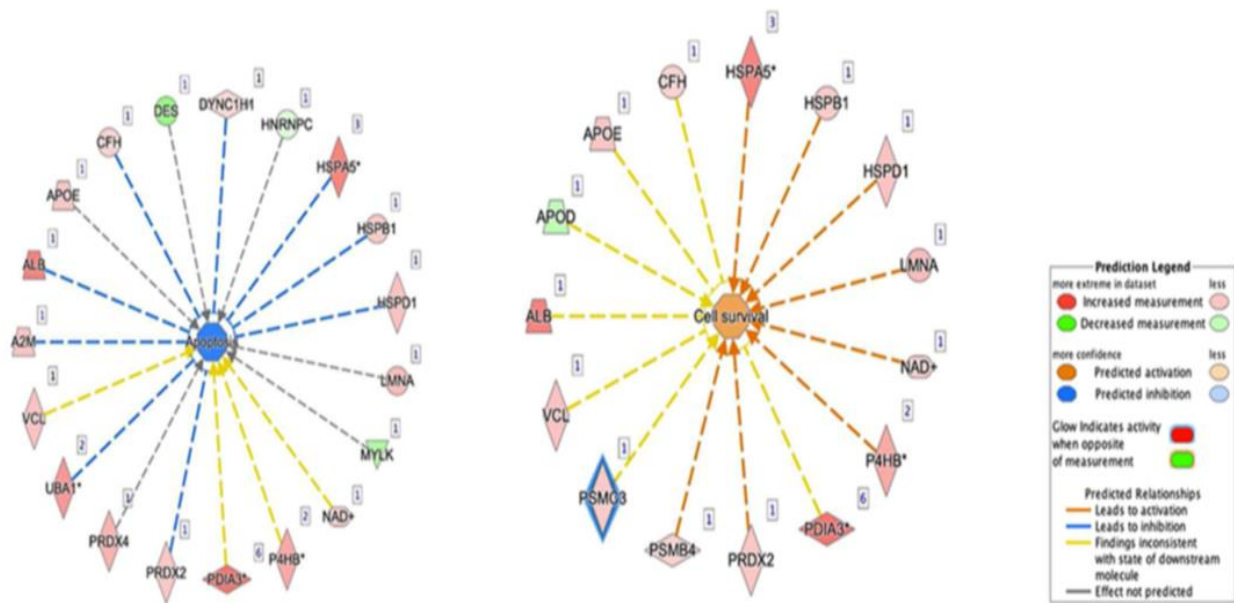


**Figure S2.** PANTHER classification of identified proteins in the leiomyoma according to their molecular function

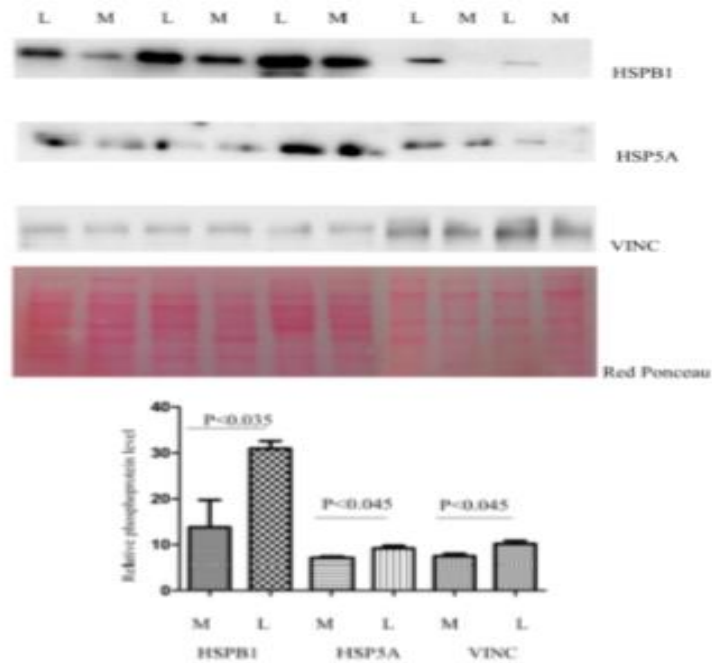
[53]

Analizzando, dunque, la loro funzione molecolare ed i processi biologici in cui queste fosfoproteine erano coinvolte, ci siamo resi conti che queste prendevano parte a 2 networks principali: Apoptosi e sopravvivenza cellulare.

Abbiamo inoltre verificato mediante Immunoblot l'alterazione di 3 proteine: HSPB1, HSPA5 e VINC. Abbiamo scelto queste 3 proteine in quanto le prime 2 sono associate all'inibizione dell'apoptosi ed alla proliferazione cellulare, abbiamo scelto VINC, invece, poiché il suo anticorpo era disponibile in commercio



**Figure S6.** Network build up from one of the most significant bio-functions: 1. Apoptosis, 2. Cell survivor.



**Figure 3.** Western blot analysis was utilized to confirm the alteration of phosphorylation of proteins HSPB1, VINC and HSPA5 in paired myometrium (M) and leiomyoma (L). The intensity of immunostained bands was normalized against the total protein intensities measured from the same blot stained with Red Ponceau. Number 1-5 indicate the patients. The bar graph shows the relative expression (band density) of HSPB1, VINC and HSPA5 in the myometrium and the leiomyoma. Results are shown as a histogram ( $P < 0.05$ ) and each bar represents mean  $\pm$  standard deviation.

[53]

Utilizzando, quindi, una combinazione di arricchimento con IMAC, elettroforesi con gel bidimensionale, la colorazione Pro Q Diamond e la spettrometria di massa abbiamo identificato 32 fosfoproteine differentemente fosforilate nel leiomioma rispetto al miometrio normale.

## **DISCUSSIONE**

Il nostro studio mette in luce il coinvolgimento del fosfoproteoma e più in generale della fosforilazione proteica nella crescita dei leiomiomi. In futuro saranno necessari ulteriori studi per comprendere in che modo la fosforilazione proteica agisce sui leiomiomi.

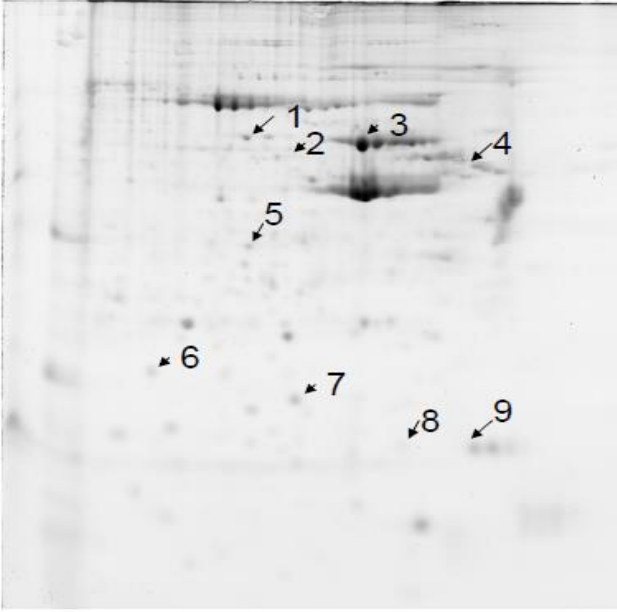
### **Gruppo 2**

Abbiamo successivamente studiato l'effetto che l'UPA può avere sui leiomiomi e sulla loro espressione proteica. Abbiamo arruolato nel nostro studio 6 pazienti sottoposte ad isterectomia per leiomiomi sintomatici. Tre di queste pazienti erano state sottoposte in fase pre-operatoria a terapia con UPA per almeno 3 mesi. Altre 3 invece non erano state sottoposte a nessuna terapia. Anche in questo caso per ogni paziente operata abbiamo eseguito una biopsia sul leiomioma asportato dopo l'asportazione del pezzo operatorio.

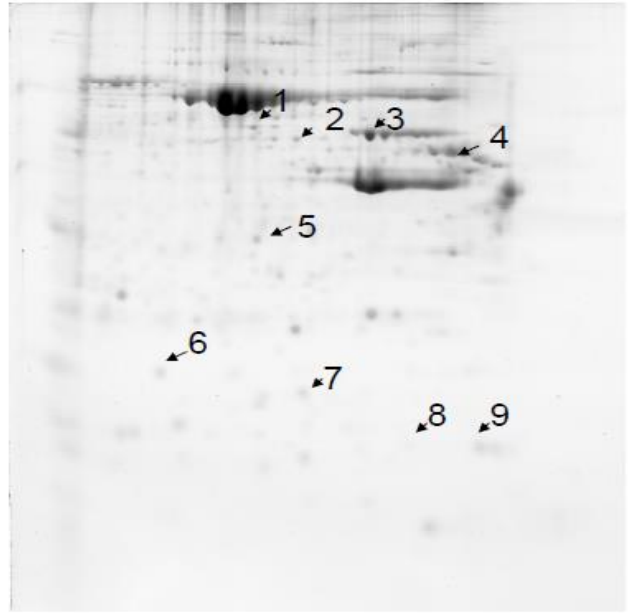
## **ANALISI**

L'analisi dei campioni è stata condotta utilizzando tecniche di proteomica combinando l'elettroforesi su gel bidimensionale con la spettrometria di massa. Durante la nostra analisi abbiamo identificato proteine disregolate (Vedi immagine e tabella sotto).





**Fibroids not treated**



**Treated with UPA**

<b>number of spots</b>	<b>Name of the protein</b>	<b>Gene</b>	<b>Function</b>	<b>Fold change</b>	<b>P-value</b>
<b>1</b>	<b>Protein disulfide isomerase A3</b>	<b>PDIA3</b>	<b>Metabolic process</b>	<b>0.6</b>	<b>0.019</b>
<b>2</b>	<b>Tubulin <math>\beta</math> chain</b>	<b>TUBB</b>	<b>Cellular movement</b>	<b>2.5</b>	<b>0.011</b>
<b>3</b>	<b>Actin beta</b>	<b>ACTB</b>	<b>Cellular movement</b>	<b>0.5</b>	<b>0.03</b>
<b>4</b>	<b><math>\alpha</math>-1-antitrypsin</b>	<b>SERPINA1</b>	<b>Metabolic process</b>	<b>1.5</b>	<b>0.014</b>
<b>5</b>	<b>L-lactate dehydrogenase B chain</b>	<b>LDHB</b>	<b>Metabolic process</b>	<b>1.5</b>	<b>0.014</b>
<b>6</b>	<b>Fatty acid binding protein, epidermal</b>	<b>FABP5</b>	<b>Metabolic process</b>	<b>2</b>	<b>0.011</b>
<b>7</b>	<b>Cellular retinoic acid-binding protein 2</b>	<b>CRABP2</b>	<b>Metabolic process</b>	<b>0.5</b>	<b>0.02</b>
<b>8</b>	<b>Desmin</b>	<b>DES</b>	<b>Cellular movement</b>	<b>0.2</b>	<b>0.04</b>
<b>9</b>	<b>Myosin regulatory light polypeptide 9</b>	<b>MYL9</b>	<b>Cellular movement</b>	<b>0.5</b>	<b>0.017</b>

**Proteins expressed by myomas not treated and Myomas treated with UPA identified by MALDI-TOF / TOF**

Dalla nostra analisi infatti alcune proteine (Serpina1, LDHB, FABP5) coinvolte nei processi metabolici cellulari sono risultate sovraespresse nelle cellule di mioma trattate con UPA. Oltre a queste, però, abbiamo notato anche una ridotta espressione, nelle cellule di mioma trattate con UPA, di una serie di proteine coinvolte nei processi di movimento cellulare come ACTB, DES, MYL9.

## **DISCUSSIONE**

Il nostro studio dà una possibile interpretazione dell'effetto dell'Ulipristal acetato sui leiomiomi. Probabilmente un effetto combinato a livello ormonale (Amenorrea per azione sull'ipofisi e il blocco dell'azione degli ormoni sessuali) ed un effetto diretto sulle proteine anormali del citoscheletro cellulare induce una riduzione della crescita tumorale.

Sicuramente, in futuro, saranno necessari ulteriori studi, su campioni maggiori, al fine di comprendere con precisione gli effetti di questo farmaco sulla crescita dei miomi.

## **Gruppo 3**

Abbiamo infine condotto la nostra ricerca proteomica sull'aspirato uterino di 16 pazienti di cui 10 affette da carcinoma endometriale e 6 donne sane usate come gruppo di controllo. I campioni sono stati collezionati nel nostro ambulatorio di isteroscopia od in sala operatoria prima dell'intervento di isterectomia. I campioni del gruppo di controllo sono stati prelevati durante la fase proliferativa del ciclo. Le pazienti affette, invece, erano tutte donne in menopausa.

## **ANALISI**

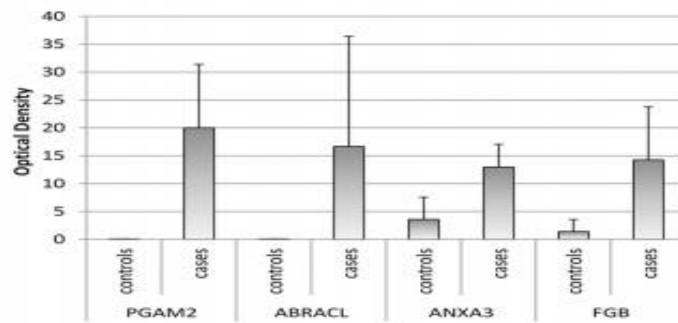
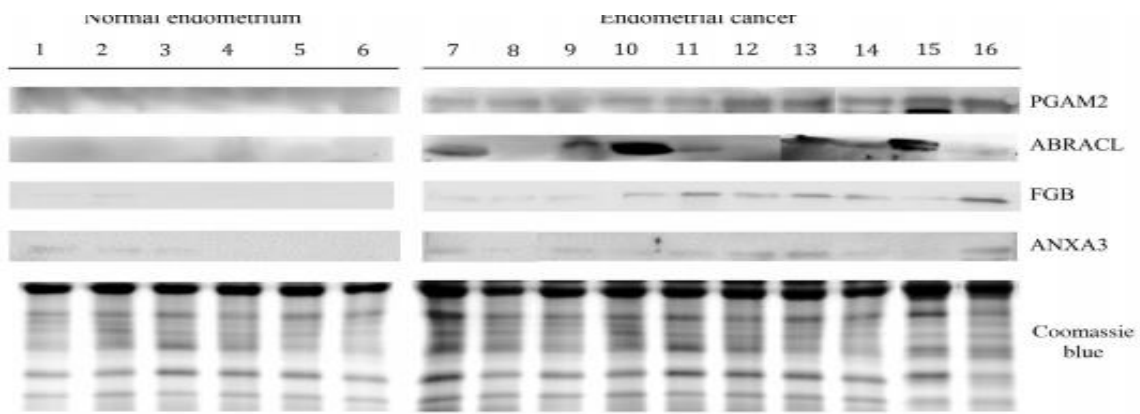
L'analisi in laboratorio è stata condotta mediante gel per elettroforesi bidimensionale. L'immagine del gel bidimensionale è stata analizzata mediante software Proteomweaver.

Le differenze tra i 2 campioni sono state considerate significative quando la ratio della percentuale media del relativo volume era maggiore o uguale a 2 per le proteine upregolate e minore o uguale a 0.5 per le downregolate. Per l'identificazione delle

proteine abbiamo usato la spettrometria di massa ed infine abbiamo validato i dati mediante Western blotting.

L'analisi ha rilevato 25 spot proteici di quantità diversa nell'aspirato uterino delle donne affette da carcinoma endometriale. All'interno del gruppo di queste 25 proteine, 4 proteine ABRACL, PGAM2, FGB, ANXA3 erano presenti esclusivamente nell'aspirato delle donne affette da tumore. Sulla base di questo dato abbiamo deciso di validare tali proteine con Western blot ed alla fine della validazione solo ABRACL e PGAM2 erano in grado di discriminare in modo significativo le pazienti affette da carcinoma dai controlli. Il Western blot, infatti, ha riscontrato la presenza di PGAM2 in tutte le pazienti con carcinoma endometriale, comportandosi, dunque, come marker per tutti i tipi di carcinoma endometriale di grading diverso (G1-G3) e per il carcinoma sieroso papillifero. Per quanto riguarda ABRACL il Western blotting ha verificato la sua presenza in 8 su 10 delle pazienti affette da tumore le quali erano portatrici di carcinoma endometriale endometriale G1, G2, G3 e sieroso papillifero. La sua presenza, invece, non è stata rilevata in un caso di carcinoma endometriale G2-G3 ed in un altro G2.

ABRACL è una proteina composta da 82 aminoacidi che aumenta la dinamica dell'actina e la motilità cellulare. PGAM2 invece è un enzima glicolitico che catalizza la conversione reversibile del 3-fosfoglicerato in 2-fosfoglicerato che è altamente espresso nel tessuto muscolare. Quest'enzima aumenta l'omeostasi di NADPH in risposta ad uno stress ossidativo che impatta sulla proliferazione cellulare e sulla crescita tumorale. Entrambe le proteine sono coinvolte nella motilità e nella replicazione cellulare e ulteriori studi sono necessari per verificare la relazione tra l'espressione di queste e la metastatizzazione tumorale. Inoltre PGAM2 essendo un enzima glicolitico può essere utile per il monitoraggio della glicolisi come processo metabolico fondamentale nello sviluppo del tumore.



## Western blot

## DISCUSSIONE

La nostra ricerca ha dimostrato, come già avevano ipotizzato altri lavori precedenti, che l'aspirato uterino è un fluido biologico utile per l'identificazione di biomarker tumorali al pari di altri fluidi come quello plasmatico. Inoltre l'individuazione di Biomarker per il carcinoma dell'endometrio potrebbe portare ad una diagnosi più veloce ed inoltre ad una riduzione dei costi sanitari.

Soprattutto le proteine ABRACL e PGAM2 sembrano avere un grande potenziale e lasciano pensare di poter arrivare ad una fase di sperimentazione clinica una volta superata la fase di validazione.

## **CONCLUSIONI**

L'uso combinato di diverse tecniche di proteomica ci ha permesso di comprendere meglio i meccanismi alla base dello sviluppo delle patologie benigne e maligne dell'utero. Lo studio della proteomica del carcinoma endometriale ci ha permesso, inoltre, di intravedere una strada per lo sviluppo di markers per questo tumore che ad oggi non esistono. L'approfondimento dello studio della proteomica di queste patologie potrebbe permettere in futuro non solo di capirne meglio l'evoluzione ed eseguire una diagnosi più rapida, bensì aprire nuovi scenari ed opportunità per terapie future.

## BIBLIOGRAFIA

1. Dwek M V, Alaiya AA. Proteome analysis enables separate clustering of normal breast, benign breast and breast cancer tissues. *Br. J. Cancer.* 2003;89(2):305–7
2. Li J, Orlandi R, White CN, et al. Independent validation of candidate breast cancer serum biomarkers identified by mass spectrometry. *Clin. Chem.* 2005;51(12):2229–35
3. Kanugula AK, Dhople VM, Völker U, Ummanni R, Kotamraju S. Fluvastatin Mediated Breast Cancer Cell Death: A Proteomic Approach to Identify Differentially Regulated Proteins in MDA-MB-231 Cells. *PLoS One.* 2014;9(9):e108890.
4. Tenga MJ, Lazar IM. Proteomic study reveals a functional network of cancer markers in the G1-Stage of the breast cancer cell cycle. *BMC Cancer.* 2014;14(1):710
5. Wiese H, Gelis L, Wiese S, et al. Quantitative phosphoproteomics reveals the protein tyrosine kinase Pyk2 as a central effector of olfactory receptor signaling in prostate cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014.
6. Hammer E, Darm K, Völker U. Characterization of the human myocardial proteome in dilated cardiomyopathy by label-free quantitative shotgun proteomics of heart biopsies. *Methods Mol. Biol.* 2013;1005:67–76.
7. Van Raemdonck GAA, Tjalma WAA, Coen EP, Depuydt CE, Van Ostade XWM. Identification of protein biomarkers for cervical cancer using human cervicovaginal fluid. *PLoS One.* 2014;9(9):e106488.
8. Zhao Q, Wu Y, He Y, et al. [Analysis of differentially expressed proteins in normal cervix, cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous carcinoma tissues]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2013;35(12):914–20.

9. Timms JF, Arslan-Low E, Kabir M, et al. Discovery of serum biomarkers of ovarian cancer using complementary proteomic profiling strategies. *Proteomics. Clin. Appl.* 2014.
10. Chen X, Wei S, Ma Y, et al. Quantitative proteomics analysis identifies mitochondria as therapeutic targets of multidrug-resistance in ovarian cancer. *Theranostics.* 2014;4(12):1164–75.
11. Shender VO, Pavlyukov MS, Ziganshin RH, et al. Proteome-metabolome profiling of ovarian cancer ascites reveals novel components involved in intercellular communication. *Mol. Cell. Proteomics.* 2014.
12. Yoneyama K, Shibata R, Igarashi A, et al. Proteomic identification of dihydrolipoamide dehydrogenase as a target of autoantibodies in patients with endometrial cancer. *Anticancer Res.* 2014;34(9):5021–7.
13. Galazis N, Pang Y-L, Galazi M, Haoula Z, Layfield R, Atiomo W. Proteomic biomarkers of endometrial cancer risk in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and biomarker database integration. *Gynecol. Endocrinol.* 2013;29(7):638–44.
14. Teng Y, Ai Z, Wang Y, Wang J, Luo L. Proteomic identification of PKM2 and HSPA5 as potential biomarkers for predicting high-risk endometrial carcinoma. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2013;39(1):317–25.
15. Gupta S, Ghulmiyyah J, Sharma R, Halabi J, Agarwal A. Power of proteomics in linking oxidative stress and female infertility. *Biomed Res. Int.* 2014;2014:916212..



16. Hwang J-H, Lee K-S, Joo J-K, et al. Identification of biomarkers for endometriosis in plasma from patients with endometriosis using a proteomics approach. *Mol. Med. Rep.* 2014;10(2):725–30.
17. Gross KL, Morton CC. Genetics and the development of fibroids. *Clin. Obstet. Gynecol.* 2001;44(2):335–49.
18. Chiaffarino F, Parazzini F, La Vecchia C, Marsico S, Surace M, Ricci E. Use of oral contraceptives and uterine fibroids: results from a case-control study. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1999;106(8):857–60.
19. Shikora SA, Niloff JM, Bistran BR, Forse RA, Blackburn GL. Relationship between obesity and uterine leiomyomata. *Nutrition.* 7(4):251–5.
20. Summers WE, Watson RL, Wooldridge WH, Langford HG. Hypertension, obesity, and fibromyomata uteri, as a syndrome. *Arch. Intern. Med.* 1971;128(5):750–4.
21. Merrill RM. Hysterectomy surveillance in the United States, 1997 through 2005. *Med. Sci. Monit.* 2008;14(1):CR24–31.
22. Laughlin SK, Stewart EA. Individualizing the Approach to a Heterogeneous Condition. 2011;117(2):396–403.
23. Peddada SD, Laughlin SK, Miner K, et al. Growth of uterine leiomyomata among premenopausal black and white women. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105(50):19887–92
24. Benassayag C, Leroy MJ, Rigourd V, et al. Estrogen receptors (ERalpha/ERbeta) in normal and pathological growth of the human myometrium: pregnancy and leiomyoma.

Am. J. Physiol. 1999;276(6 Pt 1):E1112–8.

25. Grings AO, Lora V, Ferreira GD, Brum IS, Corleta H von E, Capp E. Protein expression of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and aromatase in myometrium and uterine leiomyoma. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2012;73(2):113–7.

26. Ishikawa H, Ishi K, Serna VA, Kakazu R, Bulun SE, Kurita T. Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. *Endocrinology.* 2010;151(6):2433–42.

27. Maruo T, Ohara N, Yoshida S, et al. Translational research with progesterone receptor modulator motivated by the use of levonorgestrel-releasing intrauterine system. *Contraception.* 2010;82(5):435–41.

28. Kim JJ, Sefton EC. The role of progesterone signaling in the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012;358(2):223–31.

29. Brandon DD, Bethea CL, Strawn EY, et al. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein are overexpressed in human uterine leiomyomas. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1993;169(1):78–85.

30. Viville B, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Wetzka B, Smith SK. Distribution of the A and B forms of the progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in uterine leiomyomata and adjacent myometrium. *Hum. Reprod.* 1997;12(4):815–22.

31. Ying Z, Weiyuan Z. Dual actions of progesterone on uterine leiomyoma correlate with the ratio of progesterone receptor A:B. *Gynecol. Endocrinol.* 2009;25(8):520–3.

32. Fujimoto J, Hirose R, Ichigo S, Sakaguchi H, Li Y, Tamaya T. Expression of

progesterone receptor form A and B mRNAs in uterine leiomyoma. *Tumour Biol.* 1998;19(2):126–31.

33. Hatthachote P, Gillespie JJ. Complex interactions between sex steroids and cytokines in the human pregnant myometrium: evidence for an autocrine signaling system at term. *Endocrinology.* 1999;140(6):2533–40.

34. Litovkin K V, Domenyuk VP, Bubnov V V, Zaporozhan VN. Interleukin-6 - 174G/C polymorphism in breast cancer and uterine leiomyoma patients: a population-based case control study. *Exp. Oncol.* 2007;29(4):295–8.

35. Kjerulff KH, Langenberg P, Seidman JD, Stolley PD, Guzinski GM. Uterine leiomyomas. Racial differences in severity, symptoms and age at diagnosis. *J. Reprod. Med.* 1996;41(7):483–90.

36. Schwartz SM, Marshall LM, Baird DD. Epidemiologic contributions to understanding the etiology of uterine leiomyomata. *Environ. Health Perspect.* 2000;108 Suppl :821–7.

37. Vikhlyaeva EM, Khodzhaeva ZS, Fantschenko ND. Familial predisposition to uterine leiomyomas. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 1995;51(2):127–31

38. Je EM, Kim MR, Min KO, Yoo NJ, Lee SH. Mutational analysis of MED12 exon 2 in uterine leiomyoma and other common tumors. *Int. J. Cancer.* 2012;131(6):E1044–7

39. Flake GP, Andersen J, Dixon D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ. Health Perspect.* 2003;111(8):1037–54.

40. Parker WH. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertil.*

Steril. 2007;87(4):725–36.

41. Barbieri RL, McShane PM, Ryan KJ. Constituents of cigarette smoke inhibit human granulosa cell aromatase. *Fertil. Steril.* 1986;46(2):232–6.

42. Tiltman AJ. The effect of progestins on the mitotic activity of uterine fibromyomas. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 1985;4(2):89–96

43. Baird DD, Dunson DB. Why is parity protective for uterine fibroids? *Epidemiology.* 2003;14(2):247–50

44. Palomba S, Sena T, Morelli M, Noia R, Zullo F, Mastrantonio P. Effect of different doses of progestin on uterine leiomyomas in postmenopausal women. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2002;102(2):199–201

45. Rogers R, Norian J, Malik M, et al. Mechanical homeostasis is altered in uterine leiomyoma. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008;198(4):474.e1–11.

46. Leppert PC, Catherino WH, Segars JH. A new hypothesis about the origin of uterine fibroids based on gene expression profiling with microarrays. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2006;195(2):415–20.

47. Norian JM, Malik M, Parker CY, et al. Transforming growth factor beta3 regulates the versican variants in the extracellular matrix-rich uterine leiomyomas. *Reprod. Sci.* 2009;16(12):1153–64.

48. Rein MS. Advances in uterine leiomyoma research: the progesterone hypothesis. *Environ. Health Perspect.* 2000;108 Suppl :791–3.

49. Dixon D, Flake GP, Moore AB, et al. Cell proliferation and apoptosis in human uterine leiomyomas and myometria. *Virchows Arch.* 2002;441(1):53–62.
50. Lindner V, Reidy MA. Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991;88(9):3739–43.
51. Linee guida NICE 2007 (National Institute for health and Clinical Excellence)
52. Pescetto G., De Cecco L., Pecorari D., Ragni N, *Ginecologia ed Ostetricia*
53. Blendi Ura, Lorenzo Monasta, Giorgio Arrigoni, Ilaria Battisti, Danilo Licastro, Giovanni Di Lorenzo, Federico Romano, Michelangelo Aloisio, Isabel Peterlunger, Guglielmo Stabile, Federica Scrimin, Giuseppe Ricci. Phosphoproteins Involved in the Inhibition of Apoptosis and in Cell Survival in the Leiomyoma  
*J Clin Med.* 2019 May; 8(5): 691.

