



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA**

**PAPEL DE IL-8 Y MCP-1 EN EL DESARROLLO DE
LEIOMIOMAS UTERINOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

KARINA LÓPEZ REYES

DIRECTOR DE TESIS:

**M. en C. ARTURO ERNESTO
FLORES PLIEGO**

ASESOR INTERNO:

**Dra. PATRICIA ROSAS
SAUCEDO**

CIUDAD DE MÉXICO

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El trabajo de investigación de esta tesis se realizó en el laboratorio del Departamento de Inmunobioquímica del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” como parte de mis estudios de licenciatura en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Bajo el cielo cuando algo se concibe como bello aparece lo feo.

Cuando todos reconocen algo como bueno surge también lo malo.

Por lo tanto ser y no ser se engendran uno al otro.

Tener y no tener se originan juntos.

Difícil y fácil se producen mutuamente,

Largo y corto se contrastan uno al otro,

Alto y bajo se apoyan uno al otro.

Palabra y sentido se armonizan uno al otro,

Adelante y atrás se siguen uno al otro.

Esta es la ley de la naturaleza.

Tao Te Ching

Dedicatorias

Mi familia

Son mi hogar, son mis personas favoritas, son con quien he reído y llorado. Son los que hacen que todo valga la pena.

A mi madre **Zoyla Reyes de la Cruz**, gracias por darme la vida, siempre formaras parte de mis ideales y me sentiré orgullosa de mis raíces, me enseñaste que la vida es maravillosa y que a pesar de cualquier problema se debe seguir adelante, y con una enorme sonrisa, que placer ha sido encontrarnos y ser madre e hija, espero que en algún tiempo nuestros destinos coincidan nuevamente. Te amare siempre.

A mi padre **Horacio López Peralta**, gracias por el apoyo incondicional en todas mis locuras y por la paciencia, al fin de cuentas sabes que lo que me impulsa cada día es que me parezca a ti, siempre valientes, fuertes y perseverantes. Siempre estare para ti, te amo.

A mis hermanas, **Soila Nexticapan Reyes y Flora Nexticapan Reyes**, sin duda han sido parte de mi formación como la mujer actual que soy, gracias por enseñarme a conocer y disfrutar de la vida de pueblo, gracias por los sobrinos tan maravillosos que me dieron y por recalcar a cada momento la importancia de la familia y sobre todo por acompañarme en esta vida. Las amo demasiado.

Agradecimientos

Ahora un poema para **Arturo Ernesto Flores Pliego**: Artur querido, Artur adorado, gracias, por tantas enseñanzas a tu lado. Gracias por ser un director, padre académico y un gran amigo, por la confianza que has depositado en mí, y por enseñarme siempre con tanto esmero y paciencia. Esta aventura de la tesis ha sido genial con tu dirección. Los mejores deseos para ti siempre.

A **Sandra Berenice Parra Hernandez y Aurora Espejel**, a dos mujeres que son un gran ejemplo para mí, gracias por todo su apoyo y confianza, espero y seguir trabajando a lado de ustedes.

Gracias especiales al equipo de trabajo del departamento de Inmunobioquímica del INPer, liderado por la Dra. Guadalupe Estrada, y a todos los integrantes, Arturo, Aurora, Sandra, Sonia, Mario, Maribel, Toñita, Diana, Damaris, Aaron, Daniel, David, Eduardo y a la señora Flor, gracias por todo su apoyo, comentarios y enseñanzas.

A **R. David Blanquel Palmeño**, gracias por estar dispuesto cada día a aprender y disfrutar de nosotros, por inspirarme a ser mejor persona y buscar siempre mas de la vida, por el apoyo incondicional y la compañía tan maravillosa que eres. Siempre estaré para vos . Mucho gusto el haberte conocido. Te quiero muchisimo.

A **Marisol, Mariell, Sarai y Amarantha**, fueron la compañía perfecta durante la carrera, esas risas, pláticas, empeño y enseñanzas siempre las recordare y valorare, gracias por tan increíble amistad. Las quiero.

A **Sarah, Brenda, Anahí, Monse, Issac y Fabricio**, fueron la pandilla perfecta, con ustedes aprendí demasiado, desde como conocer nueva gente, como no tener miedo de emprender una aventura, a conocer los mejores lugares de la ciudad y a tener los sueños mas locos. Gracias por tanta risa y compañía. La universidad no habría sido lo mismo sin ustedes. Los quiero.

A **Liliana Hernandez y Chantal Mendivil**, gracias por estar conmigo en las buenas y las malas, por sus consejos, risas y apoyo incondicional mas que amigas son unas hermanas para mi, las quiero.

Contenido

Índice de ilustraciones.....	10
1. Resumen	11
2. Introducción.....	12
2.1 Leiomiomas uterinos (LU).....	12
2.2 Etiología.....	12
2.3 Clasificación anatómica	15
2.4 Síntomas.....	18
2.5 Factores de Riesgo.....	19
2.6 Prevalencia	21
2.7 Histología.....	22
2.8 Citocinas	24
2.8.1 Interleucina 8 (IL-8)	24
2.9 Quimiocinas	25
2.9.1 Proteína quimioadyacente de monocitos (MCP-1).....	26
3. Antecedentes	29
3.1 MCP-1 en Leiomiomas uterinos.....	29
3.2 IL-8 en Leiomiomas uterinos.....	30
4. Planteamiento del problema.....	31
5. Hipótesis	32
6. Objetivos	32
6.1 Objetivo general.....	32
6.2 Objetivos específicos	32

7. Diseño Experimental	33
7.1 Tipo de investigación	33
7.2 Tipos de diseños.....	33
7.3 Características del estudio.....	33
7.4 Procedimiento	33
7.5 Universo o población	33
7.6 Tamaño de la muestra	33
7.7 Características de la población.....	34
7.7.1 Consideraciones éticas	34
7.7.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	34
7.8 Lugar donde se realizó el trabajo.....	35
7.9 Material biológico	35
8. Métodos	36
8.1 Obtención y disposición de muestras.....	37
8.2 Procedimiento histológico	37
8.3 Tinción con hematoxilina y eosina	39
8.4 Tricrómico de Masson	40
8.5 Extractos proteicos.....	41
8.6 Cuantificación de proteínas (Bradford).....	42
8.7 Identificación y cuantificación de la concentración de citocinas en extractos proteicos de LU y miometrio adyacente	42
9. Resultados	44
9.1 Histoquímica	44

9.2 Tricómico de Masson.....	45
9.3 Concentración de MCP-1 e IL-8 en Leiomiomas y Miometrio adyacente. ...	46
10. Discusión	48
11. Conclusiones	53
12. Perspectivas	54
13. Bibliografía	55
14. Abreviaturas	62

Índice de ilustraciones

Figura 1. Modelo hipotético de la relación entre la inflamación y los leiomiomas..	14
Figura 2. Representación esquemática de la localización de los LU.....	17
Figura 3. Características anatómicas e histológicas de los LU..	23
Figura 4. Factores que estimulan la transcripción de MCP-1 y algunas patologías asociadas con su sobreexpresión	27
Figura 5. Esquema que muestra el método empleado para cubrir los objetivos planteados en este trabajo experimental.....	36
Figura 6. Diagrama general del procedimiento histológico.....	38
Figura 7. Diagrama de los pasos a seguir durante la tinción general con Hematoxilina/eosina.....	39
Figura 8. Diagrama de los pasos a seguir durante la tinción Tricrómico de Masson.	41
Figura 9. Imágenes de microscopia de luz, de miometrio adyacente y LU con tinción de hematoxilina/eosina.....	44
Figura 10. Microscopia de luz, de miometrio adyacente y LU con tinción Tricrómico de Masson.....	45
Figura 11. Cuantificación de MCP-1 en LU y miometrio adyacente.	46
Figura 12. Cuantificación de IL-8 en leiomiomas y miometrio adyacente.....	47

1. Resumen

Los leiomiomas uterinos (LU) son tumores monoclonales de músculo liso del útero humano, están compuestos por grandes cantidades de matriz extracelular (MEC), son de crecimiento lento y la degeneración maligna de estos tumores es menor a 1%. En la actualidad, a pesar de la prevalencia de los LU, los factores que regulan su crecimiento han sido investigados parcialmente y en su mayoría a nivel de expresión de su ARNm, poniendo poca atención a la proteína traducida. Una de estas proteínas son citocinas que regulan la quimio-atracción de células inmunológicas en ambientes inflamatorios como son la IL-8 y la MCP-1. Estas citocinas desempeñan un papel importante en el desarrollo y crecimiento de los LU además de ser importantes durante el proceso de remodelación tisular. Por lo que en este estudio proponemos analizar las concentraciones de IL-8 y MCP-1 en LU y útero. Los tejidos del estudio fueron obtenidos a partir de biopsias uterinas de tejido tumoral (LU) n=8 y miometrio adyacente sano n=8. Los tejidos fueron analizados histológicamente mediante las técnicas Hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson. Las citocinas fueron cuantificadas mediante análisis múltiple de moléculas en suspensión (Bio-Plex). Los LU contienen mayor cantidad de colágena respecto al miometrio adyacente, IL-8 se encontró en mayor concentración y MCP-1 se encontró en menor concentración en los LU con respecto al miometrio adyacente. Existen diferencias en la concentración de citocinas producidas por un mismo tejido uterino, dependiendo de su condición y procedencia fisiológica (leiomiomas uterinos o miometrio adyacente) en donde la sobre producción de IL-8 y MCP-1 estarían contribuyendo a establecer un microambiente inflamatorio, sin embargo las concentraciones, aunque altas, probablemente no son suficientes para llevar a cabo su función.

2. Introducción

2.1 Leiomiomas uterinos (LU)

Los leiomiomas uterinos (LU) son el tipo más común de tumor en mujeres en edad reproductiva. Constituyen el grupo de tumores benignos que surgen del miometrio uterino, o del cérvix. Son conocidos comúnmente como miomas uterinos, fibromiomas, leiomiomata o fibroides (Weston y Healy, 2011).

Los LU son tumores monoclonales de músculo liso del útero humano, se originan por efecto de una mutación somática debido a la compleja interacción entre hormonas y factores de crecimiento. Estos tumores están compuestos por grandes cantidades de matriz extracelular (MEC), específicamente de colágeno tipo I y II, fibronectina y proteoglicanos; son de crecimiento lento y la degeneración maligna de éstos tumores es menor a 1% (Khan *et al.*, 2014).

2.2 Etiología

La etiología precisa de los LU sigue sin conocerse. Se sabe que cada LU es monoclonal, desarrollándose a partir de una sola célula y su desarrollo está relacionado con un evento que da lugar a la transformación de una célula miometrial normal en una célula anormal. Los posibles factores iniciadores de esta patología incluyen anomalías miometriales intrínsecas como elevación de receptores de estrógeno en el miometrio, cambios hormonales e isquemia (Parker, 2007).

En la actualidad existen diversos estudios enfocados a la comprensión de los diferentes factores involucrados en el crecimiento de los LU, como son los hormonales y los genéticos (Flake *et al.*, 2003).

Los factores genéticos han sido ampliamente estudiados. Alrededor del 40% de los miomas presentan anomalías cromosómicas, con cambios en su expresión génica (tanto a la alta como a la baja), relacionados con el receptor a estrógenos α , el receptor a estrógenos β , el receptor a progesterona β , el receptor de la hormona

de crecimiento, el receptor de prolactina, genes de MEC, colagenasas, el proto-oncogen MET y el gen citocromo P450 (Lee *et al.*, 2005) que están relacionados con la regulación del crecimiento, la diferenciación, la proliferación y la mitogénesis celular (Parker, 2007). Existen algunas clases de LU que son debidos a mutaciones en un solo gen, como la que sucede en la enzima mitocondrial, fumarato hidratasa, involucrada en el ciclo de Krebs y responsable del síndrome de Reed (síndrome de leiomiomas cutáneos y leiomiomas múltiples) (Weston y Healy, 2011).

Una vez que se ha iniciado la formación del LU , el crecimiento tumoral ocurre bajo la influencia de hormonas esteroideas sexuales, ya que este tipo de tumores es dependiente de estrógenos y progesterona, los hechos clínicos que lo soportan es la observación de que los LU se desarrollan después de la menarca, crecen durante la vida reproductiva y disminuyen de tamaño después de la menopausia aumentando de manera significativa las concentraciones de algunas proteínas que influyen sobre la proliferación celular, como es el caso de la proteína Bcl-2 antiapoptótica (Matsuo *et al.* 1997).

Un gran número de factores de crecimiento son producidos localmente en los LU y miometrio adyacente. Se han documentado que algunos de ellos se encuentran sobre expresados en los LU, los factores de crecimiento identificados son el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF). Se ha planteado una hipótesis en la cual los LU son causados por un evento inflamatorio del sistema inmune, donde predominan las células T-cooperadoras 17 (TH-17) y un nivel bajo de células T-reguladoras (Tregs) (Sozen, 2002). Weiss y colaboradores (2009) describieron que la inflamación altera la receptividad endometrial y desempeña una importante función en la reparación del tejido uterino y su remodelación. La respuesta inflamatoria inicia en los vasos sanguíneos locales con secreción de proteínas plasmáticas e infiltración de leucocitos en el tejido. La vasodilatación y el aumento

de la permeabilidad vascular disminuye el flujo sanguíneo permitiendo que los quimiocinas actúen con factores quimiotácticos específicos para atraer, acumular y activar células leucocitarias hacia las células endoteliales y así promover el crecimiento de los LU (Figura 1).

Representación esquemática de la etiología de los LU

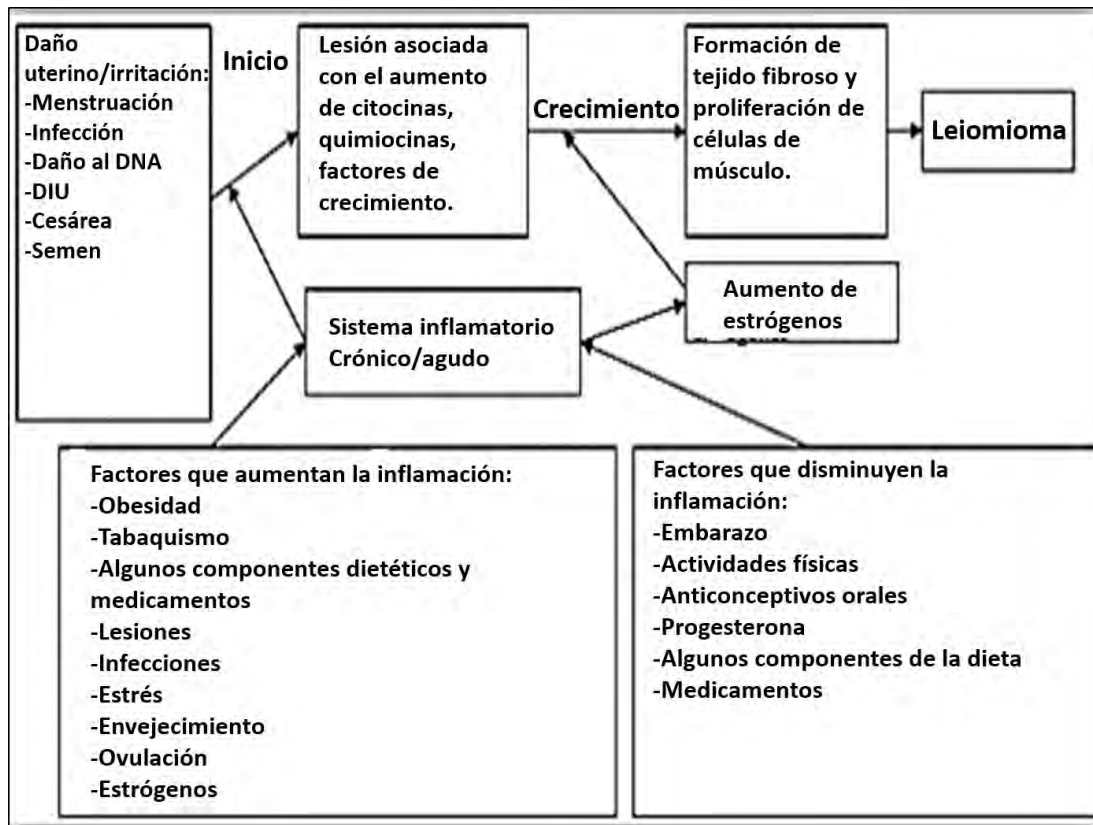


Figura 1. Modelo hipotético de la relación entre la inflamación y los leiomiomas. En la hipótesis propuesta, si el útero sufre un daño o una serie de daños en una mujer con un perfil inmune inflamatorio crónico, reflejado por un sistema inmune desbalanceado, la respuesta del sistema inmune se inclina hacia una respuesta inflamatoria, permitiendo la formación de tejido fibroso y proliferación de células de músculo liso, lo que da lugar a la formación de los LU. El estado inflamatorio crónico incrementa las concentraciones de estrógenos, lo cual a su vez incrementa el tamaño de los LU (Tomado y modificado de Wegienka, 2012).

2.3 Clasificación anatómica

Los LU se desarrollan en la pared muscular del útero, son de consistencia dura, habitualmente redondeados, de aspecto fasciculado y bien delimitado del miometrio sano. Su tamaño es variable y van desde milímetros hasta grandes tumores que ocupan toda la cavidad abdominal. Pueden presentarse como uno solo, aunque también existe la posibilidad de que puedan ser identificados como un cúmulo de tumores (Pérez-Carbajo *et al.*, 2009).

Los LU pueden desarrollarse hacia el exterior del útero por debajo del peritoneo (LU subserosos-sésil o pedunculado), en el interior del útero por debajo del endometrio (LU submucosos) o en el espesor del miometrio (LU, intramurales) (**Figura 2**).

La clasificación de los LU se basa en su localización en las capas del útero, algunas de sus características principales son (Levy *et al.*, 2013):

LU intramurales: estos miomas se desarrollan dentro de la pared uterina y se expanden, lo que provoca que se torne más grande el útero; siendo así el factor principal que se tiene en cuenta en el diagnóstico. Esta clase de LU están separados del miometrio normal por una capa delgada de tejido conectivo que forma la llamada pseudocápsula y pueden ser causantes de flujo menstrual abundante, ganas frecuentes de orinar y en algunos casos dolor pélvico y de espalda. Estos tipos de LU son los más comunes, con una tasa de aparición del 60%.

LU subseroso o pedunculado: se desarrollan en la porción externa del útero, están recubiertos con peritoneo y continúan su crecimiento hacia la cavidad peritoneal. Para que puedan clasificarse como subserosos más del 50% de su masa debe proyectarse más allá del miometrio. A veces, estos miomas crecen en forma de tallo, por lo general no afectan el flujo menstrual pero pueden causar dolor pélvico, de espalda y presión generalizada en los órganos de la parte baja abdominal causando complicaciones de tipo fisiológico al comprimir órganos como la vejiga y los intestinos.

Esta clase de LU constituye el 35% de los casos de miomatosis uterina y pueden alcanzar un tamaño considerable sin producir síntomas. En la mayoría de los casos su presencia se revela cuando causan complicaciones en los órganos adyacentes como se expuso anteriormente y en raras ocasiones pueden degenerar causando dolor.

LU submucosos: se desarrollan justo debajo de la pared de la cavidad uterina (endometrio) y en algunos casos llegan a sobresalir de la cavidad uterina. Pueden causar sangrados abundantes y periodos menstruales anormalmente largos (hemorragia uterina disfuncional) originando anemia en la mujer, además pueden causar infertilidad, abortos espontáneos y son los que más probabilidades tienen de malignizarse (convertirse en tumores malignos o cancerosos). Estos tipos de LU son los menos frecuentes, con una tasa de aparición del 5% (Pérez-Carbajo, 2009).

Tipos de LU

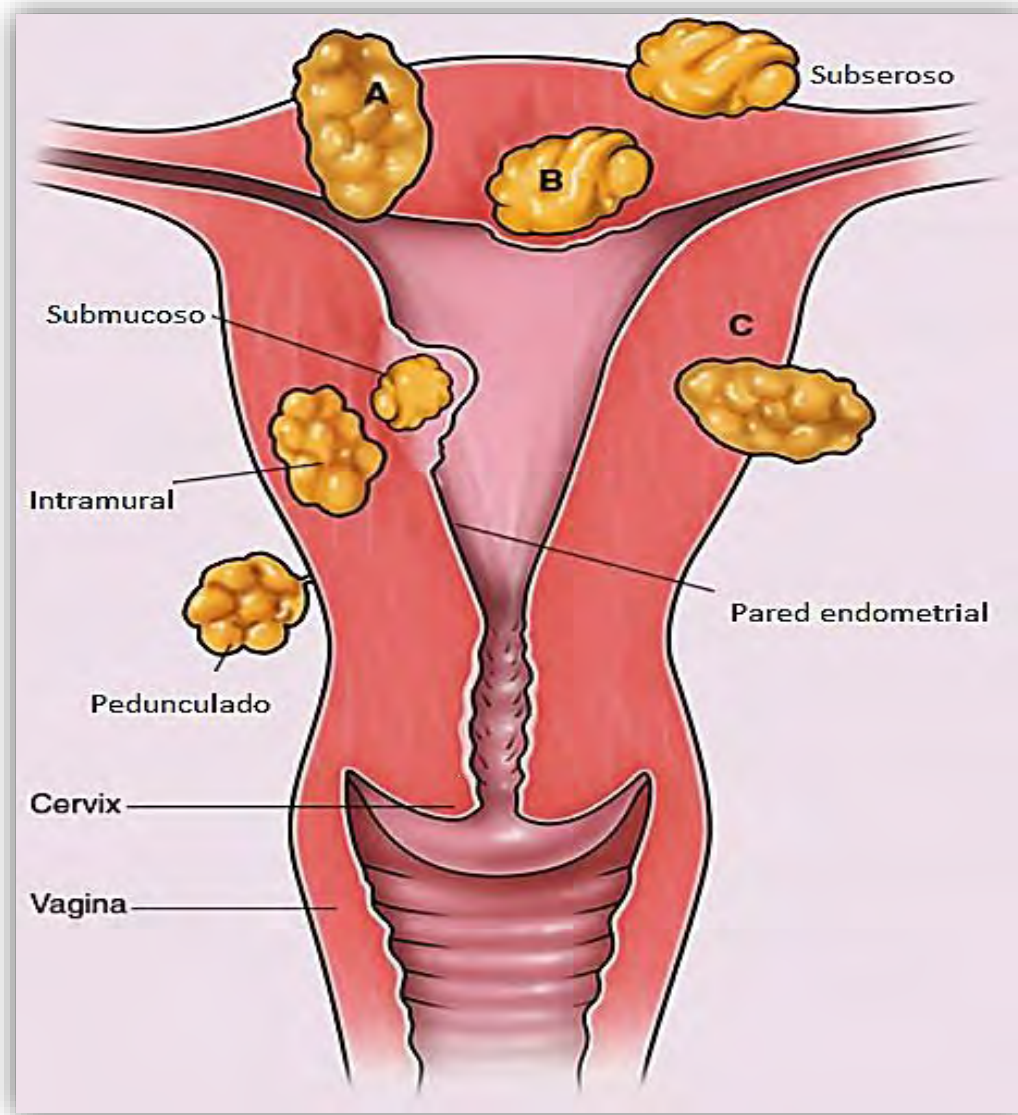


Figura 2. Representación esquemática de la localización de los LU. A) Los miomas submucosos se localizan en la cavidad uterina; B) Los intramurales están dentro de la pared del útero, y C) Los subserosos están sobre el útero. La mayoría de los miomas son de tipo mixto (A, B, y C) (Tomado y modificado de Victory *et al.*, 2006).

2.4 Síntomas

Aunque la presencia de LU casi nunca se asocia con la mortalidad, pueden causar morbilidad y afectar la calidad de vida (Parker, 2007); la mayoría de los LU no producen síntomas, solo del 20 al 40% de ellos son sintomáticos, los demás son descubiertos por un examen genital o ultrasonográfico o más raramente por la paciente que se descubre una tumoración abdominal (Bustos-López *et al.*, 2002). Los síntomas se correlacionan con su localización, número, tamaño o con algún cambio degenerativo (Ortiz *et al.*, 2009).

Los síntomas varían y los más frecuente son:

Sangrado uterino anormal siendo éste el más común, dolor pélvico crónico, molestias urinarias, dispaneuria, presión pélvica, infertilidad, aborto involuntario, parto prematuro, hemorragias después del parto, desprendimiento de placenta y retardo de crecimiento intrauterino.

Sangrado uterino: la menorragia y la hipermenorragia son el patrón más común de sangrado, los miomas submucosos tienden a producir con mayor frecuencia sangrado (Stovall, 2001).

Tumoración pélvica: los LU subserosos son los más relacionados con este síntoma, la presión pélvica aparece cuando el útero incrementa de tamaño. Al crecer el útero, la presión sobre órganos adyacentes, especialmente en el tracto urinario y recto se acentúa (Stovall, 2001).

Dolor: no es un síntoma frecuente y se asocia usualmente con la torsión de un LU pediculado, dilatación cervical por un mioma submucoso o por una degeneración asociada al embarazo (Wallach y Vlahos, 2004).

Infertilidad: Los LU se asocian a la infertilidad en un 5 a 10% de los casos. Los LU intramurales y subserosos tienden a producir mayor disfunción reproductiva. Los mecanismos mediante los cuales disminuye la fertilidad son la alteración del contorno endometrial que interfiere con la implantación, distorsión anatómica que reduce el acceso al cérvix del espermatozoide, contractilidad uterina alterada, y la

persistencia de sangrado uterino o coágulos que interfieren con la implantación (Ortiz *et al.*, 2009).

En mujeres jóvenes, a pesar de que la miomectomía es prácticamente posible, puede llevarles a la pérdida del útero y por ende, de su capacidad reproductiva. Además, puede causar complicaciones en el control y tratamiento de la postmenopausia o enmascarar el diagnóstico de neoplasias graves (Bulun, 2013).

2.5 Factores de Riesgo

A lo largo del tiempo se han descrito diferentes factores de riesgo, entre los epidemiológicos más significativos se encuentran la edad y la raza, aunque el impacto y prevalencia varía entre poblaciones (Victory *et al.*, 2008).

Edad y paridad. El rango de edad de aparición de los miomas uterinos puede ir desde los 20 hasta los 70 años, con mayor incidencia entre los 35 y 45 años (Ciavattini *et al.* 2013). Por otro lado, la nuliparidad y la infertilidad han sido asociadas con el desarrollo de LU, pero aún es desconocido si los LU causan la infertilidad o la infertilidad causa los LU (Victory *et al.*, 2008).

Etnicidad. En cuanto a la raza, se ha descrito que la incidencia es menor en mujeres asiáticas, seguido por mujeres blancas, después por mujeres hispanas y un incremento notable en mujeres de descendencia africana con un ritmo de crecimiento más acelerado (Peddada *et al.*, 2008).

Factores hormonales. Se conoce que la exposición prologada a estrógenos incrementa la aparición de LU, los factores hormonales que aumentan esta exposición son, la menarca temprana, flujo menstrual abundante, duración del ciclo mayor a 6 días, tumores ováricos productores de estrógenos, ingesta de altas dosis y por tiempo prolongado de anticonceptivos (Wegienka, 2012).

Peso. La obesidad incrementa el riesgo de desarrollar miomas por el efecto estrogénico sostenido (Zimmermann *et al.*, 2012).

Antecedentes familiares. Los familiares de primer grado de pacientes con LU tienen 2.5 veces más riesgo de presentar miomatosis uterina que aquellos sin antecedentes (Parker, 2007).

Embarazo. Se ha sugerido que a altas concentraciones de esteroides sexuales asociados al embarazo comúnmente causan crecimiento de los LU, así como su sintomatología. Ya que los LU comparten características del miometrio normal durante el embarazo, como el incremento de MEC y el aumento de los receptores para péptidos y hormonas esteroideas (Ortiz *et al.*, 2009).

Lesión del tejido. Es posible que la formación del LU sea una respuesta a una lesión, parecido a una placa aterosclerótica que se forma en respuesta a la hipoxia del músculo arterial. La hipoxia de las células miometriales durante la menstruación puede promover la transformación de los miocitos normales y la subsecuente formación del LU (Faerstein *et al.*, 2001).

Infecciones. En los humanos las infecciones virales o bacterianas son una causa común de inflamación. Se ha planteado la hipótesis de que estas infecciones podrían provocar inflamación y daño uterino, lo cual contribuiría al desarrollo potencial de LU (Wegienka, 2012).

Estrés. Se ha propuesto que el estrés psicológico agudo o crónico lleva a que el sistema inmune genere una respuesta inflamatoria (Wegienka, 2012), por otro lado el estrés podría conducir a la formación de LU causando el aumento de las concentraciones de estrógeno y progesterona, debido a la activación del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal y la liberación de cortisol, hormona del estrés (Sparic *et al.*, 2015).

Otros factores. Ha habido evidencia reciente que sugiere una relación entre el consumo de alcohol y cafeína con un riesgo de desarrollo de LU, parece haber una respuesta a la dosis, tanto para la duración del consumo de alcohol como para el número de bebidas por día. Por otro lado, se ha estudiado la ingesta de soya, y tiende a tener efectos anti-estrogénicos cuando los estrógenos endógenos son altos

(mujeres pre menopáusicas), por lo que se ha planteado la hipótesis de que la ingesta de soya podría reducir el riesgo de presentar LU. Estas áreas de interés son actualmente hipotéticas y necesitan más estudios para elucidar su papel en la etiología de los LU (Khan, 2014).

2.6 Prevalencia

En mujeres los LU son los tumores benignos más comunes y la principal indicación para histerectomía. Se estima que aproximadamente de 3 a 5 billones de dólares se gastan al año en el diagnóstico y tratamiento de los LU en lo Estados Unidos, realizándose 200,000 histerectomías anuales (Merrill, 2008).

La prevalencia mundial de LU varía del 5 al 21%. En un estudio donde se seleccionaron mujeres al azar de entre 35 a 49 años las cuales fueron sometidas a una revisión ginecológica la incidencia de LU por edad fue de 40% a 35 años, incrementando a un 70% a la edad de 50 años en mujeres caucásicas, los resultados evidenciaron que la prevalencia aumenta con la edad: 1.8% en mujeres jóvenes y 14.1% en el grupo de ± 40 años. La edad de diagnóstico media es similar en varios países, está entre los 33.5 y 36.1 años y depende del acceso y provisión del sistema de salud del país (Zimmermann *et al.*, 2012).

Los miomas uterinos se presentan con mayor frecuencia entre los 30 y 50 años, siendo la causa más frecuente de histerectomía (Jeréz *et al.*, 2015).

En nuestro país, en el Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” (INPerIER) cerca del 48.5% de las mujeres que acuden son diagnosticadas con esta patología, por lo que es considerada como un problema de salud pública (Bustos-López *et al.*, 2002).

2.7 Histología

El útero está compuesto por tres capas, el endometrio que es la mucosa del útero, el miometrio que es la capa muscular gruesa que está en continuidad con la capa muscular de las trompas uterinas y de la vagina, y el perimetrio que es la capa serosa externa o la cubierta peritoneal visceral del útero (Ross y Pawlina, 2007).

El miometrio es el estrato más grueso del útero y está compuesto por tres capas de músculo liso de límites mal definidos: la capa muscular media contiene una cantidad abundante de vasos sanguíneos grandes (plexos venosos) y vasos linfáticos y se denomina estrato vascular. Es la capa más gruesa y posee haces musculares lisos entrelazados con orientación circular o espiralada. Los haces musculares lisos de las capas interna y externa tienen una orientación predominantemente paralela al eje longitudinal del útero (Ross y Pawlina, 2007) (**Figura 3, C**).

Macroscópicamente los LU son masas sólidas bien definidas de color que varía desde ligeramente más pálida que el miometrio circundante hasta blanco grisáceo (**Figura 3, A**), que al corte presenta un aspecto arremolinado, conformado por fibras de colágeno desarregladas y heterogéneas (Ortiz *et al.*, 2009). Durante su crecimiento comprime las estructuras circundantes (el miometrio y el tejido conectivo), causando la formación progresiva de una especie de pseudocápsula, rica en colágeno, neurofibras y vasos sanguíneos; la superficie de la pseudocápsula es interrumpida por puentes de fibras de colágeno y vasos que anclan el LU al miometrio. Esto ocasiona la formación de un plano de división claro entre el LU y la pseudocápsula, y entre la pseudocápsula y el miometrio circundante. Esta pseudocápsula produce una acción de desplazamiento (no destructivo) sobre el miometrio (Sparic *et al.*, 2015) (**Figura 3, B**).

Microscópicamente, los LU se componen de fascículos entrelazados de células musculares lisas. Las células musculares son alargadas, con citoplasma eosinófilo, núcleos uniformes y las figuras mitóticas son prácticamente inexistentes. Las células se encuentran dispuestas de forma más cercana entre sí que en el miometrio normal, dándole un aspecto hiper celular al tumor. La característica más distintiva de los LU es una excesiva síntesis y deposición de MEC (Ortiz *et al.*, 2009) (**Figura 3, D**).

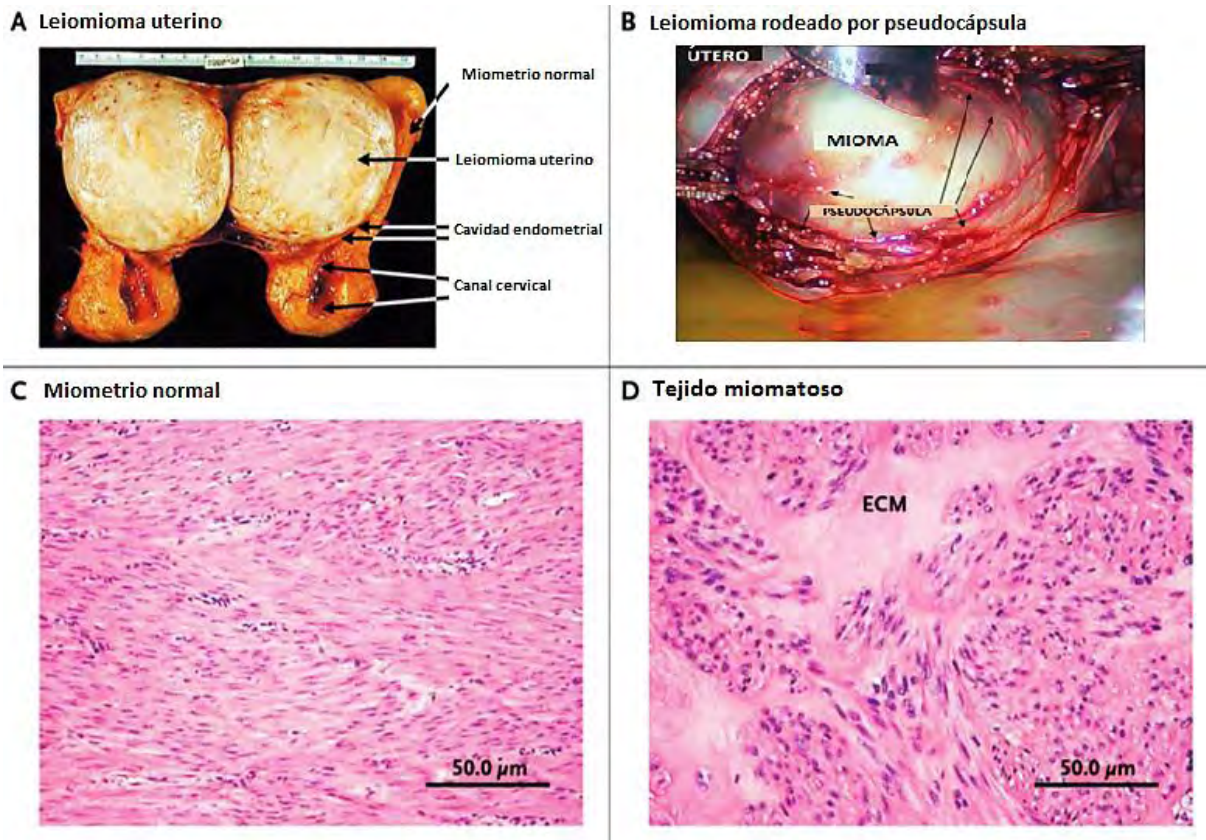


Figura 3. Características anatómicas e histológicas de los LU. **A)** Un LU puede ocupar por completo el fondo uterino y la cavidad endometrial. **B)** LU rodeado de su pseudocápsula. Las flechas indican la pseudocápsula del LU, como una red conectiva fibrovascular alrededor del LU. **C)** Miometrio normal, células del músculo liso bien organizadas con núcleos relativamente pequeños y citoplasma abundante. **D)** En los LU se observan cúmulos de células desordenadas de músculo liso con núcleos grandes separadas por abundante MEC (Tomado y modificado de Bulun, 2013).

2.8 Citocinas

Las citocinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular (de entre 10-50 kDa). Estas proteínas son secretadas por diferentes tipos celulares como macrófagos y linfocitos T entre otras, las cuales se unen a receptores específicos presentes en las células donde van a ejercer su función, iniciando una cascada de transducción de señales intracelular que pueden alterar el patrón de expresión génica, de modo que las células diana podrán ejercer una determinada respuesta biológica (Islam *et al.*, 2013).

Dentro del grupo de las citocinas se incluyen las interleucinas (IL), los factores de necrosis tumoral (TNF), los interferones (IFN), los factores estimulantes de colonias (CSF) y las quimiocinas. Las citocinas, a concentraciones del orden de nano o picomoles, actúan como reguladores sistémicos, modulando la actividad de un amplio grupo de tipos celulares. Por otro lado, las citocinas también pueden actuar como factores de crecimiento locales, a través de un mecanismo autocrino (sobre la propia célula), paracrino (sobre una célula vecina), yuxtacrino (implicando interacciones intercelulares) o retrocrino (a través de formas solubles de ciertos receptores de membrana) (Torres y Cavalheiro, 2015).

2.8.1 Interleucina 8 (IL-8)

IL-8 es representativa de la familia de las α quimiocinas, también ha sido denominada proteína activadora de neutrófilos-1 (NAP-1) ya que estimula la liberación de neutrófilos. Su gen está localizado en el cromosoma 4, además contiene una secuencia Glu-Leu-Arg (ELR) en la parte amino terminal la cual es esencial para la unión a su receptor (Sokol y Luster, 2015). Es sintetizada como un precursor de 99 aminoácidos y secretada como un péptido de 72 aminoácidos (Senturk *et al.*, 2001). Esta interleucina es secretada por células mesoteliales, endoteliales y neutrófilos (Koensgen *et al.*, 2014).

Principalmente, la IL-8 tiene como función atraer y activar neutrófilos granulocitos durante reacciones inmunitarias, sin embargo su producción no es constitutiva pero

ocurre en la presencia de un estímulo inflamatorio como lipopolisacárido (LPS), IL-1 y por el TNF- α (Koensgen *et al.*, 2014). La IL-8 actúa sobre sus células blanco, induciendo el reordenamiento del citoesqueleto, mediante cambios en las concentraciones de Ca²⁺ intracelular, activación de integrinas, exocitosis de proteínas granulares y estallido respiratorio (Torres y Cavalheiro, 2015).

IL-8 también se ha asociado a la angiogénesis y mitogénesis, dos procesos que son característicos de crecimiento de células tumorales (Senturk *et al.*, 2001).

Hay algunas enfermedades inflamatorias crónicas, tales como la psoriasis, la artritis reumatoide, así como enfermedades pulmonares, en las que se sobre-expresa IL-8, también se observan altas concentraciones de IL-8 después de un choque séptico o en la administración sistémica de endotoxinas (Torres y Cavalheiro, 2015).

2.9 Quimiocinas

Las quimiocinas corresponden a una familia de pequeñas proteínas con un peso molecular de 7-15 kDa, que se unen a 19 diferentes receptores que señalizan vía proteínas G. Los receptores para las quimiocinas pertenecen a la superfamilia de receptores con siete dominios transmembranales tipo serpina o rodopsina, con tres asas intracelulares y tres extracelulares. Todos presentan un extremo N-terminal extracelular y un C-terminal intracelular. La porción intracelular carboxiterminal contiene residuos de serina y treonina, los cuales son fosforilados y participan en la transducción de señales (DeVries *et al.*, 2006).

Esta familia de proteínas comparten una característica bioquímica común, que es la conservación de cuatro residuos de cisteína que se unen formando dos puentes disulfuro esenciales para la activación de la molécula. Se han clasificado como dos subconjuntos de quimiocinas (α y β) y a su vez divididos en cuatro grupos, CC, CXC, C y CX₃C de acuerdo a la localización cromosómica de los genes y la posición relativa de los dos primeros residuos de cisteína (Yadav *et al.*, 2010).

Estas proteínas y sus receptores cuentan entre sus funciones el controlar la migración y adhesión de todas las células inmunes. Algunas quimiocinas son consideradas proinflamatorias y su liberación puede ser inducida durante una respuesta inmune, otras son consideradas como homeostáticas y están relacionadas con el control de la migración de células en el desarrollo de tejido o su mantenimiento. La importancia fisiológica de esta familia de quimiocinas se basa en su especificidad. Durante un proceso inflamatorio se liberan quimiocinas y se genera un gradiente quimiotáctico a los vasos sanguíneos cercanos; la migración celular tiende a ir a través de una concentración local alta de quimiocinas (Torres y Cavalheiro, 2015).

2.9.1 Proteína quimioadyacente de monocitos (MCP-1)

La MCP-1, es un miembro de la familia de quimiocinas β de clase CC y es una de las quimiocinas clave en el inicio de la inflamación. Es secretada en dos formas con un peso molecular de 9 y 13 kDa como resultado de una O-glicosilación (Yadav *et al.*, 2010). La región amino terminal de las MCPs es importante para su actividad biológica, los residuos 1-6 se requieren para ejercer su actividad quimioatrayente y el aminoácido Asp-3, en particular es clave en esta actividad. Al mismo tiempo, el aminoácido en posición 1 es importante para la formación de la estructura secundaria y la unión directa al receptor (Deshmane *et al.*, 2009).

MCP-1 es un potente quimioatrayente para monocitos, pero también es importante para la memoria celular, como en el caso de linfocitos T y células "natural killer". Además, junto con la IL-8, MCP-1 desencadena la adhesión de monocitos y promueven la diapedéisis al endotelio vascular (Weber *et al.*, 1999).

Por otro lado, MCP-1 incrementa la expresión de la integrina B2 en la superficie de las células monocíticas y activa esta molécula para promover la adhesión de monocitos a las proteínas de la MEC (Melgarejo *et al.*, 2008).

Las quimiocinas son proteínas que ejercen sus efectos a través de unión a los receptores en la superficie de las células blanco para la activación y la migración celular (O'hayre *et al.*, 2008).

La expresión de MCP-1 es regulada a nivel transcripcional por diferentes mediadores solubles, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (INF- γ), y el PDGF. En contraste los factores que parecen inhibir su expresión son, el ácido retinoico, glucocorticoides y estrógenos (Matsui *et al.*, 2011). El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB) es un mediador clave ya que éste puede ser rápidamente activado por muchos estímulos patógenos, como por TNF- α , IL-1, lipoproteína oxidada de baja densidad (ox-LDL) y homocisteína (Chuang y Khorram, 2014).

MCP-1 juega un papel clave en muchas patologías (**Figura 4**). MCP-1 se expresa en una serie de condiciones inflamatorias asociadas con el reclutamiento de monocitos, incluyendo reacciones retardadas de hipersensibilidad, infección bacteriana, artritis y enfermedades renales (Yadav *et al.*, 2010).

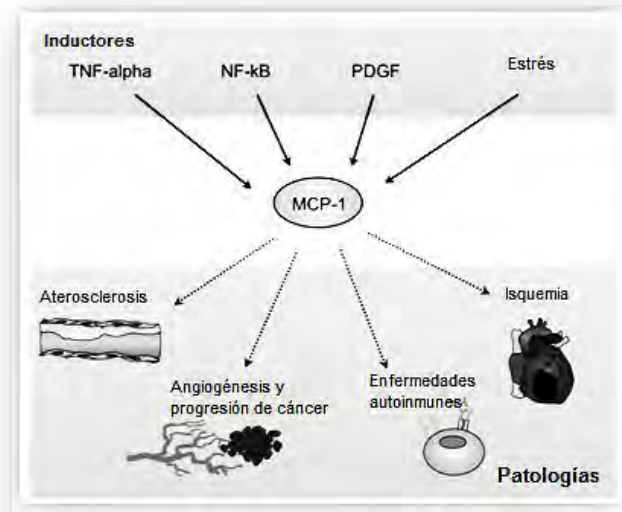


Figura 4. Factores que estimulan la transcripción de MCP-1 y algunas patologías asociadas con su sobreexpresión (Tomado y modificado de Melgarejo *et al.*, 2009).

Una de las principales enfermedades donde ha sido ampliamente estudiada la MCP-1 es en el cáncer, ya que está sobre expresada en los tumores de varios tipos de cáncer como en gliomas, en cáncer de ovario, mama y esófago. Además, su expresión en las células tumorales ha sido correlacionada con la infiltración de macrófagos y la vascularización de éstos, por otro lado se ha reportado la relación de MCP-1 con la progresión y neo-vascularización de los tumores, estadio tumoral avanzado, y la implicación de los ganglios linfáticos (O'hayre *et al.*, 2008).

MCP-1 se ha sugerido como posible blanco para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias y prevalentes, incluyendo la aterosclerosis y el cáncer. Ya que se ha demostrado que el principal constituyente del té verde reduce la expresión de MCP-1 y la capacidad de la línea celular humana mastocística (HMC-1) de atraer monocitos. Además, el desarrollo de inhibidores específicos de esta quimiocina para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias es una necesidad y puede influir en el reclutamiento de leucocitos a los sitios de inflamación ya que éstos contribuyen a la patogénesis de varias enfermedades (Melgarejo *et al.*, 2009).

3. Antecedentes

La característica más distintiva de los LU es la excesiva síntesis y deposición de proteínas de MEC, así como su crecimiento dependiente de hormonas ováricas; sin embargo, los estudios *in vitro* realizados en tejidos humanos para demostrar el efecto de las hormonas ováricas en el crecimiento de los LU, han proporcionado resultados inconsistentes, que han sugerido la existencia de mecanismos intermediarios o efectores intermediarios como son las citocinas o factores de crecimiento, por medio de los cuales las hormonas ováricas pueden estimular el crecimiento de los leiomiomas regulando la expresión de diferentes genes relacionados con el incremento en la proliferación celular, acumulación de MEC o una combinación de estos dos fenómenos (Sozen y Arici, 2006).

3.1 MCP-1 en Leiomiomas uterinos

Se sabe que en el útero residen diferentes poblaciones celulares, entre ellas macrófagos, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos y son capaces de secretar una diversidad de citocinas y quimiocinas en respuesta a diferentes condiciones como en el caso de procesos hormonales (endocrinos) y locales (paracrinos) que actúan en el miometrio para el control de la migración de monocitos, así como la replicación y la función de estas células dentro del miometrio (Sozen *et al.*, 1998).

Se ha investigado la presencia de MCP-1 en leiomiomas y se ha observado que su expresión se encuentra significativamente elevada en el miometrio normal en comparación con los leiomiomas (Sozen *et al.*, 1998). Los niveles de ARNm de MCP-1 en el miometrio varían durante el ciclo menstrual, siendo mayores durante la fase lútea respecto a la fase folicular, demostrando que el estradiol inhibe la expresión de MCP-1 (Sozen y Arici, 2006). Posteriormente se investigó si el incremento de MCP-1 en el miometrio es acompañado de un incremento de macrófagos y se llegó a la conclusión de que MCP-1 podría actuar directamente y

no a través de los macrófagos asociados al tumor (Sozen *et al.*, 2001). A MCP-1 se le asocia con un papel protector contra el crecimiento de los leiomiomas, además también se ha demostrado en la rata que es capaz de inhibir el crecimiento de las células del músculo liso vascular (Sozen *et al.*, 1998).

Por otro lado, se ha reportado que mujeres con LU no presentan cambios en las concentraciones de citocinas con respecto a las estaciones del año a diferencia de las mujeres control, sugiriendo un sistema inmunológico funcionalmente diferenciado que es desproporcionadamente inflamatorio entre estos grupos (Wegienka *et al.*, 2013).

3.2 IL-8 en Leiomiomas uterinos

Se ha mostrado la existencia de concentraciones elevadas de IL-8 y de su receptor en el miometrio que rodea a los leiomiomas. Estos hallazgos han sido acompañados de evidencias que señalan que la proliferación celular en los úteros leiomiomatosos puede ser inhibida cuando la IL-8 es bloqueada por un anticuerpo neutralizante, lo cual sugiere un posible papel mitogénico de IL-8 (Sozen *et al.*, 2001). Otros autores también han reportado que existe un aumento en la expresión de ARNm y su receptor en el miometrio adyacente en comparación con el LU (Syssoev *et al.*, 2008).

Sin embargo existen también resultados inconsistentes que han reportado que no existe una diferencia significativa en los niveles de expresión para IL-8 entre pacientes con LU y endometriosis así como en miometrio adyacente (Sozen *et al.*, 2001). Por lo anterior, IL-8 es una citocina que muestra un papel controversial en el crecimiento de los LU.

4. Planteamiento del problema

A pesar de los esfuerzos por tratar de comprender la etiopatogenia de la leiomiomatosis uterina, solo se cuenta con datos que muestran el incremento o disminución de varios factores relacionados con inflamación y angiogénesis de los LU.

Hasta ahora, en cuanto a la IL-8 y MCP-1 el problema ha sido abordado a nivel de expresión de genes sin explorar o darle importancia necesaria a lo que pasa a nivel proteico. La técnica de multiplex promete dar mejores resultados (tiene una mayor sensibilidad, confiabilidad y reproducibilidad de resultados) que los obtenidos hasta la fecha con otras metodologías, en identificar diferencias en los patrones de citocinas al comparar muestras patológicas contra muestras testigo.

Por otro lado, la diferencia en incidencia de la leiomiomatosis entre razas, la falta de estudios en población mexicana y las evidencias que indican a la leiomiomatosis uterina como un evento de tipo inflamatorio, señalan que el análisis de estas citocinas podría ser útil para iniciar la caracterización diferencial de proteínas presentes en estos tumores mediante un estudio experimental de casos y controles; en este contexto nuestra pregunta de investigación es la siguiente.

¿Existen diferencias en la concentración de las proteínas MCP-1 e IL-8 entre el miometrio adyacente y los LU?

5. Hipótesis

Si el crecimiento de los LU se debe a la acumulación de MEC y está influenciado por las concentraciones de citocinas y quimiocinas en el mismo tejido, entonces se espera que los LU tengan una menor concentración de MCP-1 y una mayor concentración de IL-8 con respecto al miometrio adyacente en pacientes diagnosticadas con leiomiomatosis uterina.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Analizar las concentraciones de las citocinas IL-8 y MCP-1 en extractos proteicos de LU y miometrio adyacente correspondiente, como posibles participantes en la formación de LU.

6.2 Objetivos específicos

- Cuantificar las concentraciones de MPC-1 e IL8 en extractos proteicos de LU y miometrio adyacente.
- Analizar si existen cambios en la distribución de MEC presente en los LU y miometrio adyacente.
- Establecer si existen cambios en el contenido de colágena en LU respecto al miometrio adyacente.

7. Diseño Experimental

7.1 Tipo de investigación

Experimental

7.2 Tipos de diseños

Casos y controles

7.3 Características del estudio

- a) Por la participación del investigador: Analítico
- b) Por temporalidad del estudio: Transversal
- b) Por la lectura de los datos: Prolectivo
- d) Por el análisis de datos: Análítico

7.4 Procedimiento

No aleatorio de casos consecutivos.

7.5 Universo o población

Mujeres que acuden al Instituto Nacional de Perinatología con leiomiomatosis uterina y que fueron evaluadas para histerectomía.

7.6 Tamaño de la muestra

Por ser un estudio piloto, se seleccionarán 8 casos y 8 controles para ser analizados.

7.7 Características de la población

Mujeres que acuden al Instituto Nacional de Perinatología, que de acuerdo a sus signos y síntomas se diagnostican con leiomiomatosis uterina y que fueron evaluadas para histerectomía, cuyas edades estaban entre los 25 y 40 años.

7.7.1 Consideraciones éticas

Previamente a la obtención de las muestras, a las mujeres que decidieron ingresar al protocolo se les explicó la finalidad del proyecto de investigación. Además, se les mencionó que la obtención de la muestra de leiomioma y miometrio adyacente sería tomada por médicos especialistas que colaboran con el desarrollo del proyecto y que el procedimiento no afectará su bienestar, y no repercutirá en costos ni en la atención médica. Finalmente, se les proporcionó una carta de consentimiento informado que firmaron de manera libre.

7.7.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Inclusión: Pacientes diagnosticadas con leiomiomas, con buena salud y que aceptaron participar en el estudio.

Exclusión: Patologías cardiovasculares, tromboembolismo venoso, diabetes mellitus, disfunción renal, enfermedades hepáticas, hipertensión, y el uso de drogas y hormonas hipolipemiantes. También, se tomó en cuenta que ninguna de las pacientes tomara ninguna medicación durante al menos 1 año, que pudiera afectar el sistema inmunológico.

Eliminación: Muestras obtenidas después de 5 minutos de cirugía, no congeladas inmediatamente o insuficientes. Cuando la paciente decidió retirarse del estudio. Cuando el expediente de la paciente estuvo incompleto.

7.8 Lugar donde se realizó el trabajo

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunobioquímica de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”.

7.9 Material biológico

Para la realización de este trabajo se utilizaron LU obtenidos en la Unidad de Tococirugía del INPerIER. Los tejidos del estudio fueron obtenidos a partir de biopsias uterinas de tejido tumoral (leiomiomas) (n=8) y miometrio adyacente (n=8) de pacientes candidatas a histerectomía.

8. Métodos

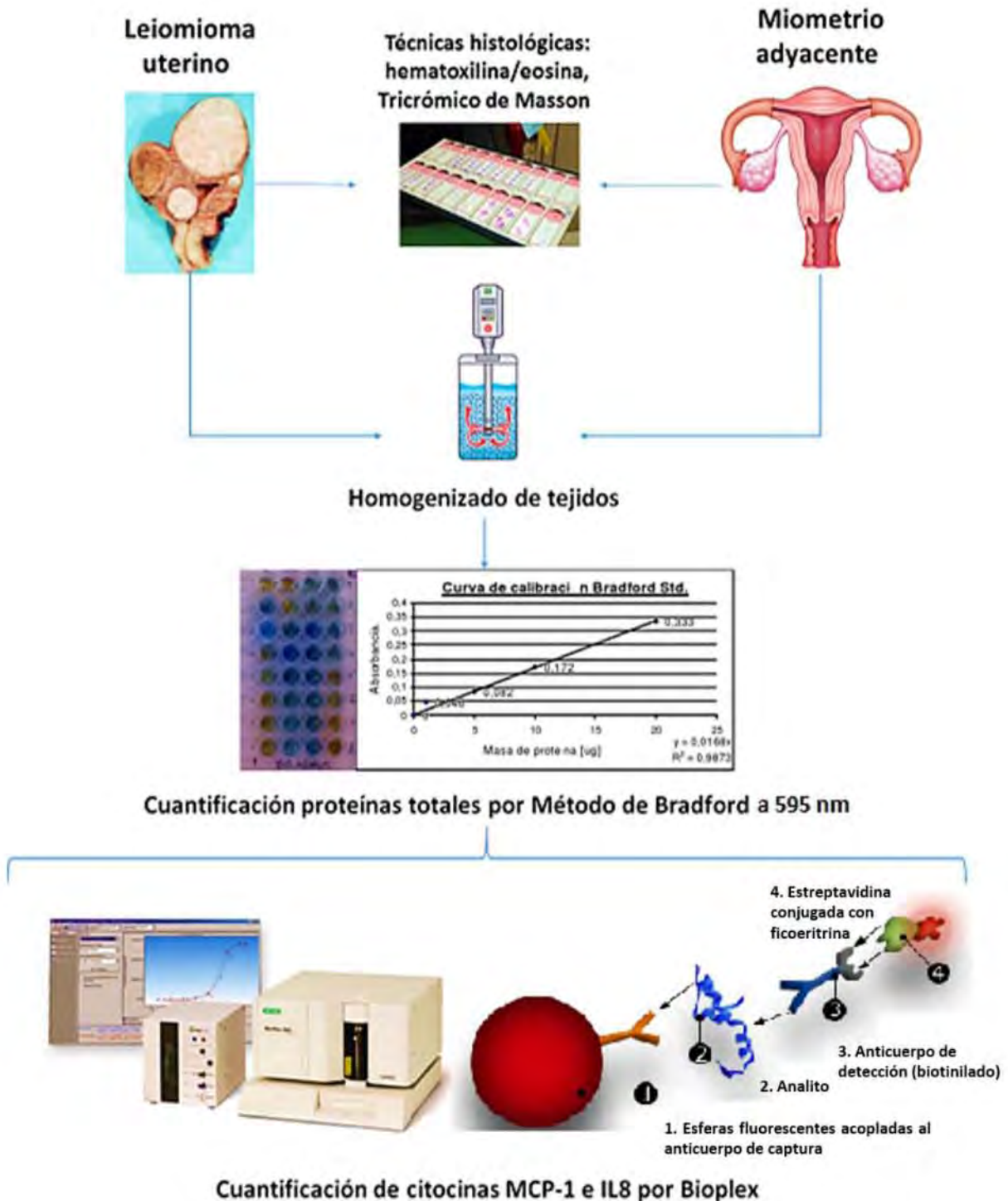


Figura 5. Esquema que muestra el método empleado para cubrir los objetivos planteados en este trabajo experimental.

8.1 Obtención y disposición de muestras

Las muestras fueron transportadas al laboratorio en buffer PBS a 4°C. Posteriormente se les retiró el exceso de sangre o cualquier otro fluido con solución salina fisiológica para su procesamiento. Ambos tejidos se dividieron en dos partes, uno destinado para cortes histológicos los cuales se fijaron en paraformaldehído al 4% y el otro para la extracción de proteínas. El tejido utilizado como control fue miometrio adyacente, tomando en consideración que los LU se originan en el miometrio uterino, además de considerar que las normas de ética clínica y de investigación del Instituto no permiten ningún procedimiento para la obtención de tejido miometrial de pacientes clínicamente sanas.

8.2 Procedimiento histológico

Los tejidos destinados para cortes histológicos, que ya estaban fijados en paraformaldehído (los cuales no excedieron los 10 mm por lado), fueron incluidos en parafina. La inclusión en parafina consistió en la deshidratación de los tejidos con etanol, en gradación creciente con 2 cambios de 5 minutos cada uno de la siguiente manera: H₂O; etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y Xileno, posteriormente fueron sumergidos en parafina líquida con 2 cambios de 60 minutos cada uno con temperatura; al final fueron embebidos en parafina líquida y se esperaron 24 horas a su enfriamiento para la obtención del bloque de parafina con el tejido incluido, y después obtener cortes finos de entre 3 y 10 micras.

Para realizar el tratamiento histológico se desparafinaron los cortes en dos cambios de Xileno cada uno de 20 minutos y se hidrataron en alcoholes graduales y agua destilada de 5 minutos cada uno (**Figura 6**).

Procedimiento histológico

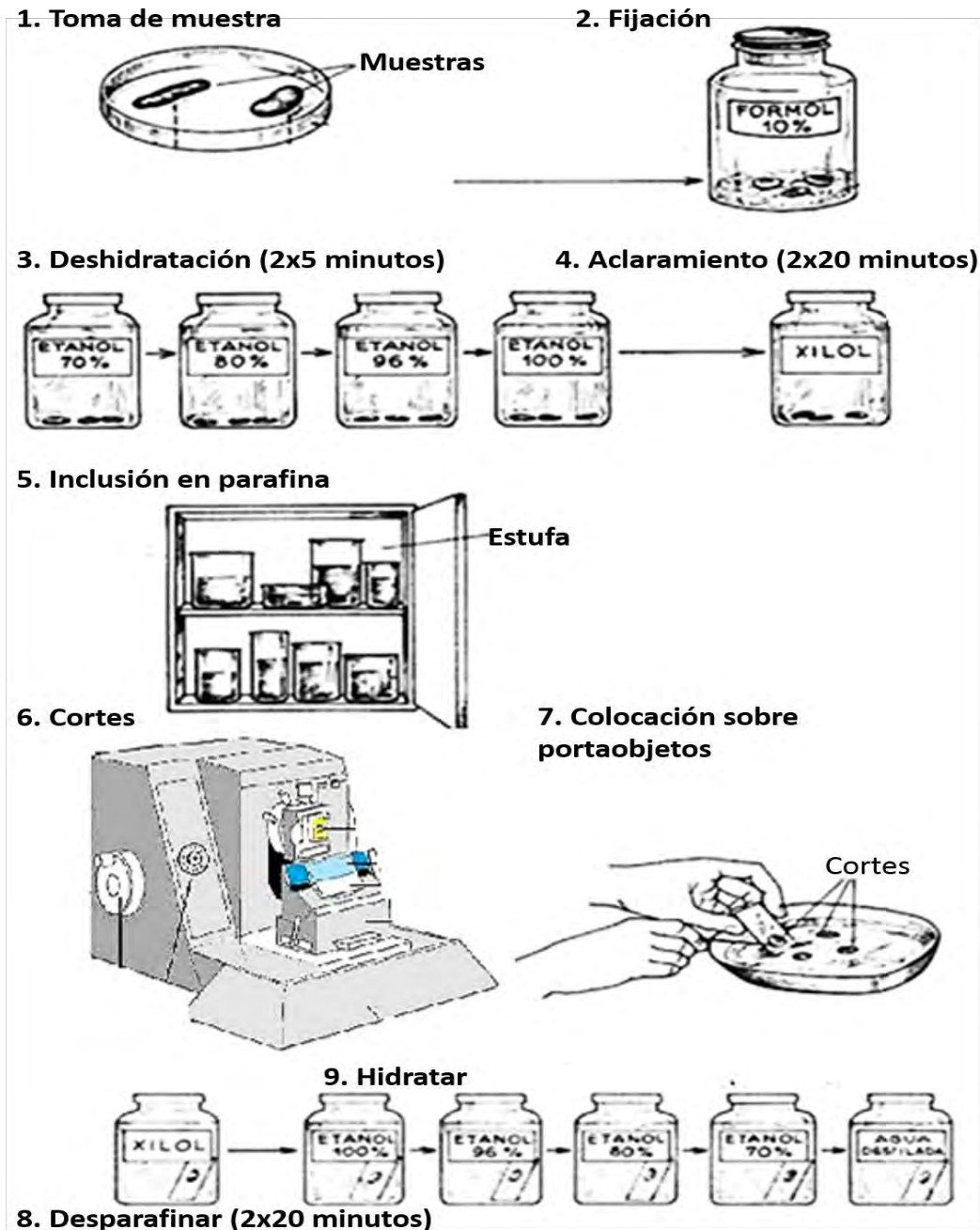


Figura 6. Diagrama general del procedimiento histológico a seguir para obtener los cortes en portaobjetos listos para la tinción. Tomado y modificado de <http://www.simplebooklet.com/publish.histologiaanimal.asp>

8.3 Tinción con hematoxilina y eosina

En la tinción de hematoxilina y eosina (catiónica o básica), los núcleos se tiñen mediante hematoxilina (basófilo), previamente oxidada y transformada en hemateína, los que se colorean de azul, azul morado, violeta, pardo oscuro o negro, dependiendo de los agentes oxidantes que se utilizaron. El citoplasma y material extracelular se tiñen utilizando la eosina (acidófila) que les confiere diversos grados de color rosado.

Una vez desparafinados los cortes, las laminillas con los tejidos fueron sumergidos en una solución de Hematoxilina de Harris por 3 minutos. Se lavaron con agua del grifo y agua destilada. Posteriormente se realizó la tinción con eosina por 30 segundos y se lavaron con agua destilada. Al finalizar los tejidos fueron deshidratados mediante etanol y xilol y se colocaron en el medio de montaje y un cubre objetos para poder observar los cortes histológicos (**Figura 7**).

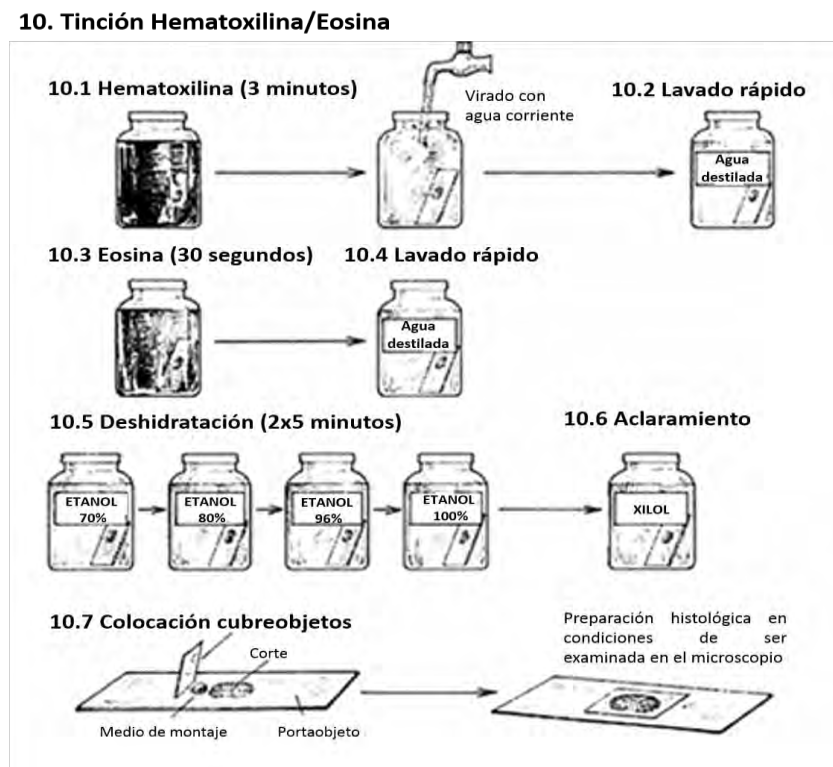


Figura 7. Diagrama de los pasos a seguir durante la tinción general con Hematoxilina/eosina. Tomado y modificado de <http://www.simplebooklet.com/publish.histologiaanimal.asp>

8.4 Tricrómico de Masson

Esta técnica fue utilizada para evidenciar las fibras de colágeno del tejido muscular, ya que es una tinción diferencial y policrómica. En general la tinción tricrómica emplea tres colorantes que permiten diferenciar las fibras de colágeno, el núcleo y el citoplasma. La regla general en la tinción con tricrómico es que el tejido se fija primero con la solución de Bouin, de este modo se conserva la capacidad del tejido para unir colorantes mediante la formación de enlaces iónicos con grupos básicos (del ácido) que se une con los componentes del tejido acidófilo. Los núcleos son teñidos con con hematoxilina férrica de Weigert, mientras que el citoplasma y músculo son teñidos con fucsina ácida-escarlata de Biebrich, el colágeno finalmente es teñido con azul de anilina (Gomori, 1950).

Las muestras se desparafinaron de manera estándar y fueron teñidas con el kit Tinciones Tricrómicas Accustain-Masson (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO; Cat. HT15) primero fueron colocadas en solución de Bouin (previamente calentada a 56°C) durante 15 minutos. Posteriormente fueron lavadas con agua corriente, se hizo la tinción con hematoxilina férrica de Weigert durante 15 minutos, y solución de fucsina ácida-escarlata de Biebrich durante 5 minutos. Después a las muestras se les colocó solución de trabajo de ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico durante 5 minutos. La tinción de las muestras se continuó con azul de anilina durante 5 minutos y ácido acético al 1% durante 2 minutos, para finalmente deshidratar con alcohol, aclarar en xileno, montar y finalmente observar al microscopio (**Figura 8**).

11. Tinción Tricrómico de Masson

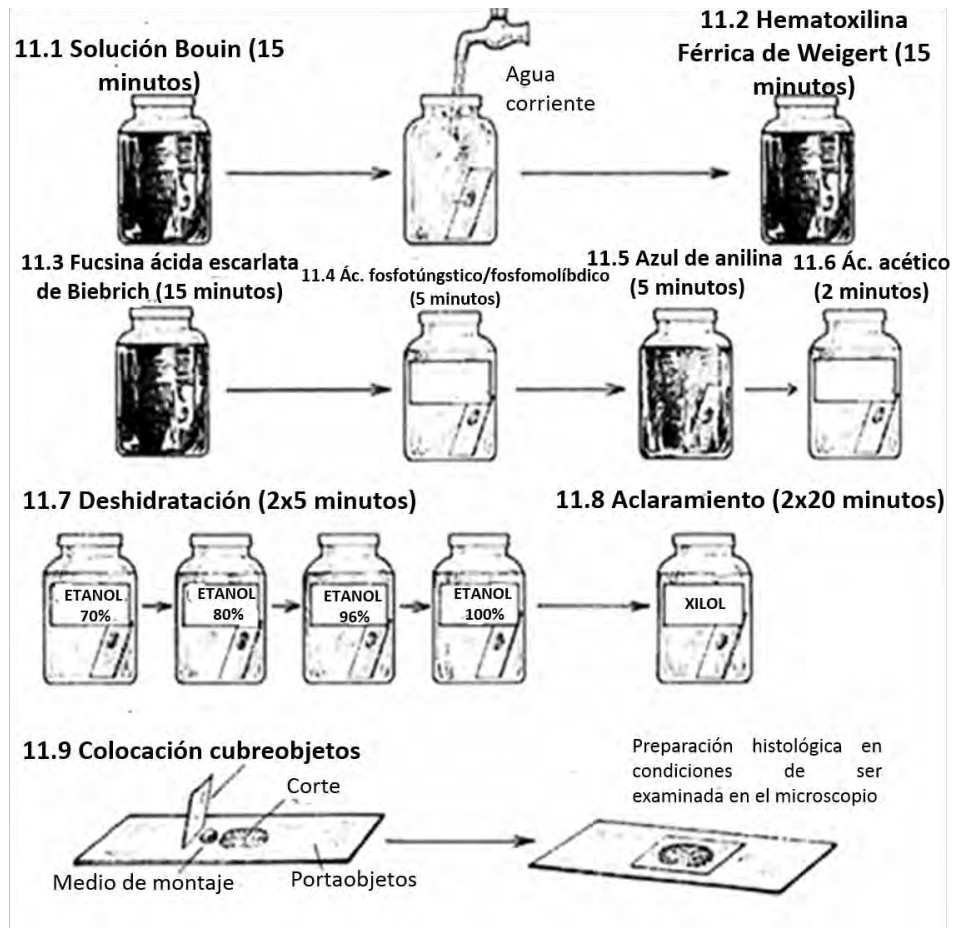


Figura 8. Diagrama de los pasos a seguir durante la tinción Tricrómico de Masson. Tomado y modificado de <http://www.simplebooklet.com/publish.histologiaanimal.asp>

8.5 Extractos proteicos

La extracción de proteínas tanto de los LU como del miometrio adyacente se realizó mediante la homogenización con un Polytron (Switzerland), en solución amortiguadora de tris-cloruro de sodio pH 4 a 4°C y en presencia de inhibidores de proteasas. Posteriormente los extractos proteicos fueron centrifugados a 14000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Se desechó la pastilla y conservó el sobrenadante a -70°C hasta su análisis posterior.

Los extractos proteicos fueron empleados para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford y determinación de citocinas por ensayo multiplex.

8.6 Cuantificación de proteínas (Bradford)

La concentración de proteínas totales se realizó mediante el método ya descrito por Bradford, que consiste en realizar una curva patrón con albúmina sérica bovina en concentraciones de 2, 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g/mL}$, y adicionar 300 μL del reactivo de Bradford a cada uno de los estándares. Se siguió el mismo procedimiento para cada una de las muestras. La lectura de las absorbancias se realizó a 595 nm en un espectrofotómetro (Beackman Coulter, Inc. DU800; Kraemer Blvd., Brea, CA).

8.7 Identificación y cuantificación de la concentración de citocinas en extractos proteicos de LU y miometrio adyacente

Para determinar la concentración de MPC1 e IL-8 presente en los LU y miometrio adyacente se utilizó el sistema de análisis múltiple de moléculas en suspensión Bio-Plex, Multiplex Luminex. El sistema está basado en tecnología de microesferas, posee una sensibilidad mayor que las técnicas convencionales de ELISA. Esta tecnología se basa en la utilización de microesferas fluorescentes, las cuales son cuantificadas a través de un analizador específico asociado a un procesador de alta velocidad que hace incidir sobre cada una dos rayos láser, el primero, en rojo, excita la esfera y detecta el código de la misma, discriminando una molécula de otra; el segundo láser (verde) excita el marcaje fluorescente y de esta forma, cuantifica la señal emitida por cada una de las esferas.

El Kit utilizado, Bio-Plex Cytokine Assay System (Bio-Plex de Bio-Rad, Hercules, Cal.) fue:

Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay. Cat. #M500KCAF0Y: El kit incluye 1 placa de 96 pozos con perlas magnéticas acopladas, anticuerpos de detección, estándares, buffer de ensayo, buffer de lavado, diluyente de muestra, diluyente estándar, diluyente de anticuerpo de detección, estreptavidina-PE y una cinta de sellado.

Se realizó el experimento de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Procedimiento:

1. Se prepararon todos los reactivos, muestras y estándares, según indicaciones del fabricante.
2. Se adicionaron 50 μ L de las muestras estándar de concentración conocida de cada citocina y extracto proteico de las muestras, en las placas de 96 pocillos, con 50 μ L de anticuerpos conjugados con múltiples microesferas fluorescentes de captura específicos para cada citocina.
3. Se incubó por 30 minutos a 37°C, y se lavó 3 veces para retirar las moléculas de citocinas no capturadas.
4. Se añadieron 25 μ L de anticuerpos biotinilados, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación y se lavó 3 veces.
5. Se incubaron con 50 μ L de estreptavidina-PE durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavó 3 veces.
6. Por último se re suspendió en 125 μ L de Buffer de ensayo y se procedió inmediatamente a la lectura en el equipo Luminex100.

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante una prueba t-student y un valor de $p < 0.05$ fue considerado como evidencia de diferencias significativas. Utilizamos el programa informático STATA, versión 11.0 (StataCorp, 4905 Lakeway Drive, College Station, Texas, EEUU).

9. Resultados

9.1 Histoquímica

Las tinciones con hematoxilina y eosina realizadas a los tejidos de miometrio adyacente y leiomiomas uterinos observadas con microscopía de luz a diferentes aumentos (**Figura 9**), revelaron que los tejidos de leiomiomas uterinos (**C y D**) tienen una mayor cantidad de MEC (en color rosado), las células se encuentran en menor cantidad, además de que sus núcleos (en color púrpura) se encuentran alargados y en general se tiene una microarquitectura desorganizada en comparación con el miometrio adyacente (**A y B**).

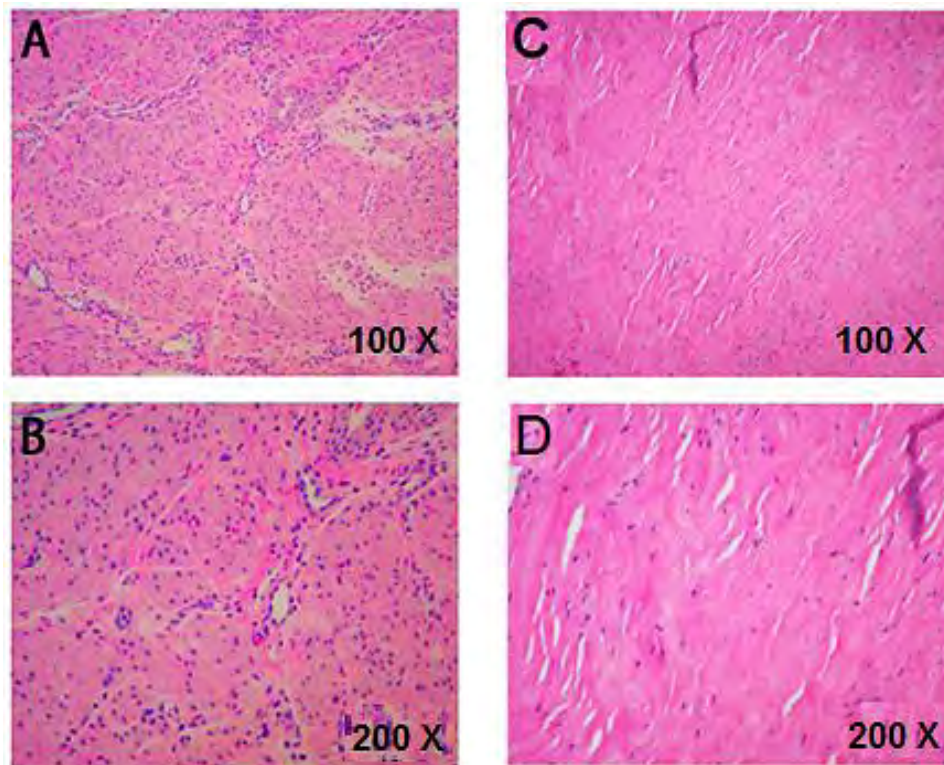


Figura 9. Imágenes de microscopía de luz, de miometrio adyacente (A, B) y LU (C, D) a diferentes aumentos totales (100X, 200X), con tinción de hematoxilina/eosina, núcleos celulares en morado y MEC rosa.

9.2 Tricrómico de Masson

La técnica de Tricrómico de Masson realizada a los tejidos de miometrio adyacente y leiomiomas uterinos observadas con microscopía de luz a diferentes aumentos (**Figura 10**), revelaron que los tejidos de leiomiomas uterinos poseen una excesiva deposición de fibras de colágeno (en color azul) y una menor cantidad de células musculares (en color rosado) en comparación con las de miometrio adyacente.

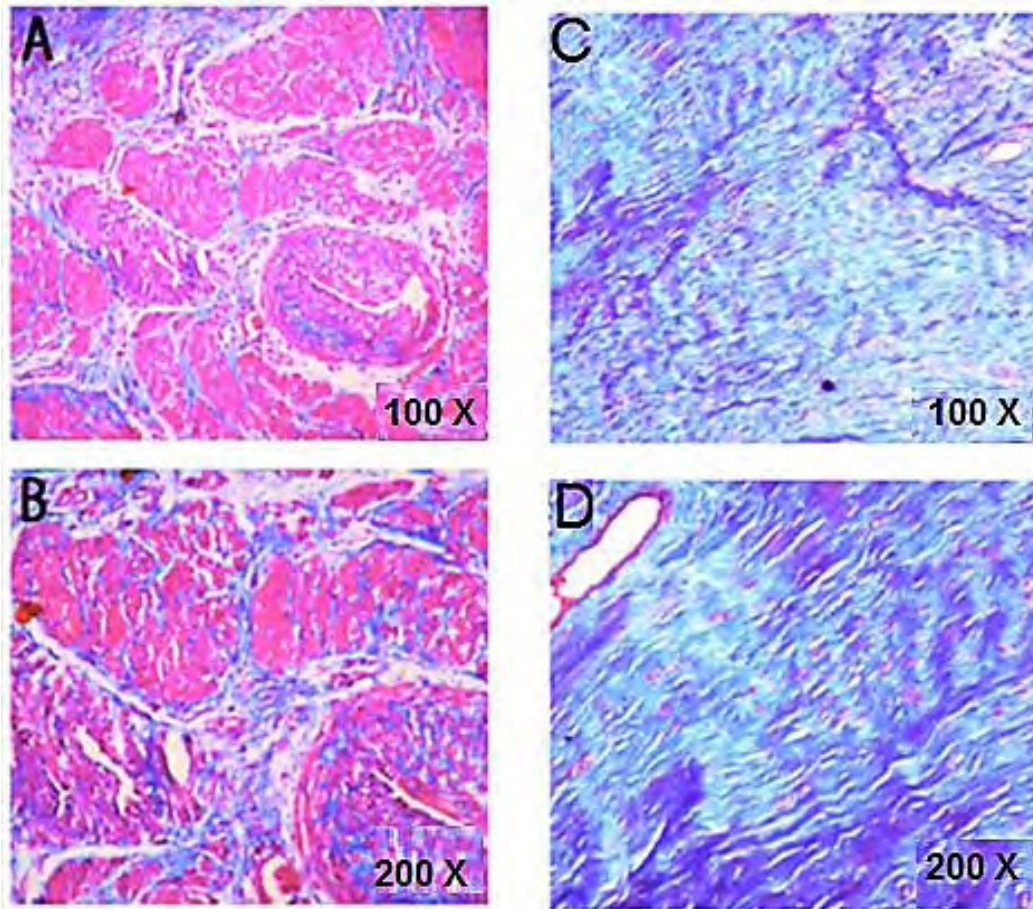
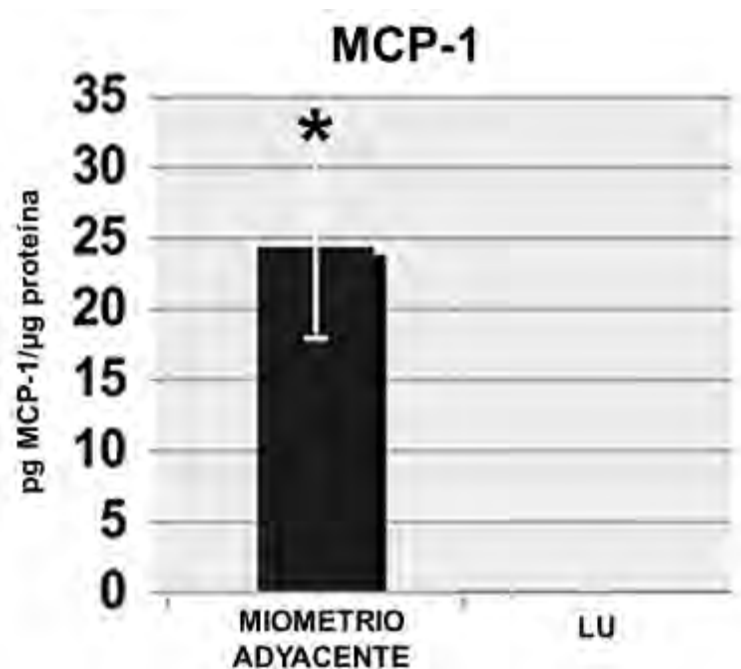


Figura 10. Microscopia de luz, de miometrio adyacente (A, B) y LU (C, D) a diferentes aumentos (100X, 200X), con tinción Tricrómico de Masson, fibras de colágeno en azul, fibras musculares en rosa.

9.3 Concentración de MCP-1 e IL-8 en Leiomiomas y Miometrio adyacente.

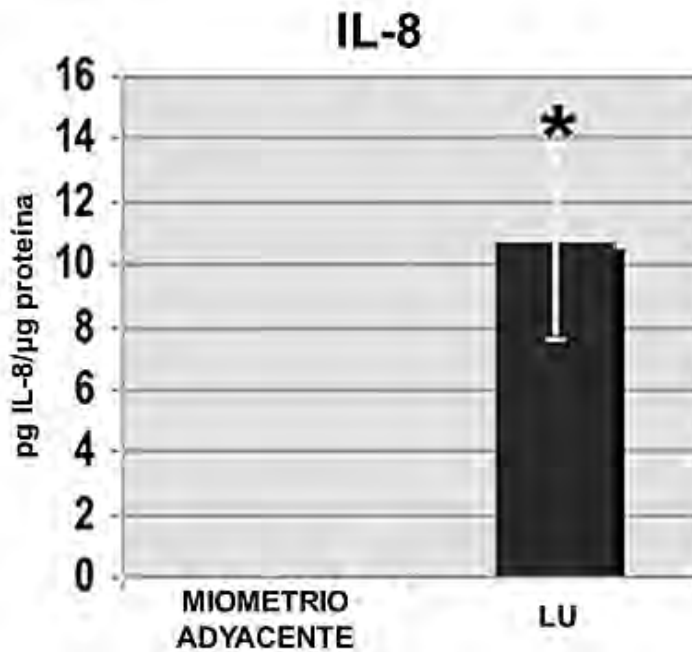
Al cuantificar la concentración proteica de MCP-1 (**Figura 11**) tanto en LU como en el miometrio adyacente pudimos observar que los LU tienen muy baja concentración comparada con la obtenida en el miometrio adyacente, siendo esta diferencia significativa ($p < 0.05$).



	MIOMETRIO ADYACENTE	LU
Valor de la media	24.333	0.0076
Desviación estándar	6.382	0.00754

Figura 11. Cuantificación de MCP-1 en LU y miometrio adyacente. Las barras representan la media \pm DS, * $p < 0.05$ vs LU (Cuantificación de MCP-1 por ensayo multiplex; $n=8$; prueba t student).

Respecto a la concentración de IL-8 (**Figura 12**), esta citocina mostró que en LU se encuentra en mayor concentración comparada con el tejido correspondiente al miometrio adyacente, siendo este un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$).



	MIOMETRIO ADYACENTE	LU
Valor de la media	0.0079	10.70
Desviación estándar	0.005	3.071

Figura 12. Cuantificación de IL-8 en leiomiomas y miometrio adyacente. Las barras representan la media \pm DS, * $p < 0.05$ vs Miometrio adyacente (Cuantificación de IL-8 por ensayo multiplex; $n=8$; prueba t student).

10. Discusión

IL-8 es una citocina conocida también por su función quimioatrayente de neutrófilos, basófilos y linfocitos T. Su producción no es constitutiva más bien ocurre en respuesta a un estímulo inflamatorio (como LPS, IL-1 y TNF) a nivel local (Gmyrek *et al.*, 2005).

IL-8 ha sido ampliamente estudiada en varias enfermedades inflamatorias como en artritis reumatoide, psoriasis y en síndrome respiratorio. En estas patologías se ha propuesto que la IL-8 promueve la infiltración de neutrófilos a nivel local y como consecuencia la proteólisis del tejido infiltrado (Harada *et al.*, 1998). También, está relacionada con propiedades angiogénicas en células endoteliales y en estudios de varios tipos de cáncer exhibiendo sus propiedades mitogénicas (Koensgen *et al.*, 2015; Stronach *et al.*, 2015).

En relación a los leiomiomas uterinos, se han demostrado mayor concentración de IL-1 en suero de sangre periférica de mujeres con leiomiomas uterinos, la cual se ha reportado promueve la expresión de la IL-8, por lo que también es considerada como promotora de procesos inflamatorios (Sikorski *et al.*, 2001), además el ARNm del receptor (CXCR1) y de IL-8 ha sido identificado con una elevada expresión en el miometrio adyacente en comparación con leiomiomas uterinos. Cabe destacar que la edad de las mujeres que participaron en este estudio fue entre 34-45 años (Syssoev *et al.*, 2008), lo cual no coincide con los resultados obtenidos en esta tesis, ya que se encontró una mayor concentración de IL-8 a nivel proteico en los LU en comparación con el miometrio adyacente, lo que sugiere la participación de eventos post-transcripcionales. Aunque el papel de IL-8 ha resultado controversial para muchos autores, en este trabajo IL-8 podría estar actuando como una citocina mitogénica y podríamos suponer que las alteraciones hormonales según la edad probablemente modulan la expresión local de quimiocinas, que es seguido por los cambios en la función proliferativa de las células del miometrio.

MCP-1 es considerada como una quimiocina inflamatoria y un poderoso quimioatrayente para monocitos/macrófagos. Algunas funciones que se le han atribuido es la de inducir el estallido respiratorio, la expresión de integrinas β_2 y la producción de las interleucinas IL-1 e IL-6 (Dahm-Kähler *et al.*, 2009).

MCP-1 ha sido ampliamente estudiada en cáncer y se ha demostrado que se encuentra sobre-expresada en tumores y se le considera como un factor que regula la angiogénesis, proliferación celular y la metástasis (Yan, 2016; Genc *et al.*, 2007).

En relación a los leiomiomas uterinos, se ha estudiado el papel de esta quimiocina evaluando la expresión del ARNm en los leiomiomas uterinos y miometrio adyacente, usando como agonista a la Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH-a) y se observó mayor expresión en el miometrio adyacente en comparación con el leiomioma uterino (Sozen *et al.*, 1998); estos resultados concuerdan con los resultados reportados en esta tesis diferenciándose en que no hubo un tratamiento previo con un agonista a la GnRH, descartando que los esteroides sean los únicos moduladores de la tumorigénesis y crecimiento de los LU y que tengan un efecto directo sobre ésta quimiocina, ya que a nivel de proteína encontré mayor concentración de MCP-1 en el miometrio adyacente en comparación con los leiomiomas uterinos, lo cual puede ser debido a que el tejido miometrial que rodea al leiomioma puede producir altas cantidades de MCP-1 como respuesta al crecimiento del leiomioma para establecer una barrera que sirve para delimitar el crecimiento de este tumor, atrayendo y activando macrófagos en el miometrio para tratar de destruir el LU.

Sin embargo, estudios anteriores han evaluado si el aumento de MCP1 en el miometrio inducía el reclutamiento de macrófagos, los resultados no muestran una correlación entre el aumento de MCP-1 en el miometrio y la infiltración de macrófagos, concluyendo que MCP-1 puede actuar en forma directa y no a través del reclutamiento de macrófagos (Sozen *et al.*, 2001), poniendo en duda que MCP-1 tenga un papel protector (Miura *et al.*, 2006), por lo que es posible que esta

quimiocina únicamente establezca y promueva un ambiente inflamatorio en el tejido que rodea a los leiomiomas uterinos.

Por otro lado, es importante mencionar que en estudios *in vitro* donde se induce la producción de IL-8 y MCP-1 por otras citocinas proinflamatorias las concentraciones son de 100 ng/mL y 50 ng/mL respectivamente y de esta manera se obtienen mejores resultados en la migración celular (Badolato *et al.*, 1997), en nuestros resultados obtuvimos concentraciones en promedio de ± 10 pg/ug de proteína y ± 25 pg/ug de proteína respectivamente por lo que posiblemente no sea suficiente para ejercer su función fisiológica.

Debido a lo anterior, resulta importante acrecentar evidencias (aumentar la población de estudio) de la participación de IL-8 y MCP-1 en el crecimiento de los LU y evaluar la presencia de células inmunológicas en los tejidos correspondientes.

El estudio del tejido humano en esta patología tiene algunas limitaciones, ya que solo se pueden obtener fragmentos de tejido para el estudio cuando la paciente es sometida a histerectomía, lo cual se realiza clínicamente como última instancia. Algunos investigadores, haciendo un análisis entre leiomiomas uterinos, miometrio adyacente y útero sano han documentado solo diferencias mínimas en el sarcolema acompañadas de una disminución en la concentración de calcio en el miometrio adyacente en comparación con el útero sano, lo cual impactaría en estudios donde sean evaluados factores fisiológicos o funcionales (Inagaki *et al.*, 2003).

Los cambios entre los leiomiomas uterinos y el miometrio adyacente obtenidos en este trabajo fueron los siguientes: 1. Las concentraciones de citocinas son diferentes en el leiomioma uterino y miometrio adyacente (previamente discutido). 2. En el tejido leiomiomatoso hay una gran cantidad de matriz extracelular distribuida de manera homogénea en comparación con el miometrio adyacente que no mostró un aumento de matriz extracelular, correspondiente a un tejido sin alteraciones en la síntesis y degradación de la misma. 3. En cuanto a la morfología celular, los leiomiomas uterinos mostraron una morfología irregular, con núcleos alargados posiblemente debido a que estas células se encuentran en constante división celular

y el miometrio adyacente mostró una morfología nuclear clásica sin alteraciones notables como ha sido reportado por otros autores (Sozen y Arici, 2002; Giannandrea y Parks, 2014; Steward, 2001).

Por lo anterior, se evidencio que sí pueden identificarse diferencias en la producción de citocinas y matriz extracelular en el mismo tejido dependiendo de su condición y procedencia fisiológica. Posiblemente debido al gran acumulo de colágeno en el leiomioma uterino. Ya que el colágeno interactúa con las células a través de varios receptores, y tiene un papel importante en la regulación del crecimiento celular, la diferenciación y la migración a través de la unión de sus receptores (Ricard-Blum, 2011), exacerbando el aislamiento del tumor y limitando la interacción con células inmunológicas que deberían ser atraídas al lugar de inflamación, además como ya se conoce que el exceso de colágeno se deposita en la matriz extracelular durante la fibrosis, entonces la fibrilógenesis es un nuevo objetivo para limitar la fibrosis bloqueando las interacciones mediadas por el telopéptido de las moléculas de colágeno (Chung et al., 2008). En los leiomiomas uterinos se han reportado sobre expresados diferentes subtipos de colágenas, como COL1A1, 4A2, 6A1, 6A2, 7A1, y 16A1 (Ciavattini, 2013).

Se ha intentado explicar el papel de las citocinas (entre ellas las evaluadas en este trabajo) en la regulación de la expresión de las MMPs (metaloproteinasas de matriz extracelular que participan en el recambio, reparación de tejidos y la tumorigénesis), para ello se han propuesto diferentes mecanismos. Entre los que se encuentran: 1. El mecanismo de la escisión de las proteínas de la MEC por las citocinas que da como resultado la liberación de factores de crecimiento, como TGF- β 1. 2. El mecanismo de la generación de moléculas precursoras o activadoras para producir las formas activas de citocinas como TGF- β 1, IL-1 β y TNF- α , sin embargo ninguno de los dos ha proporcionado evidencias concluyentes de la interacción entre citocinas y MMPs. Por lo antes mencionado en nuestro laboratorio se llevó a cabo el análisis de MMPs en las muestras de LU y miometrio adyacente. Los resultados de ese trabajo muestran que, las enzimas MMP-1 y MMP-13 están disminuidas y

esto puede contribuir al gran acúmulo de colágena de tipo fibrilar en leiomiomas uterinos reportado por Parra-Hernández. Y su disminución puede estar relacionada con alguna molécula intermediaria (citocinas), como la interleucina 1- beta (IL1- β) o el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) entre otras (Pei *et al.*, 2006).

Este trabajo fue un estudio piloto que nos permitió identificar la participación de IL-8 y MCP-1 a nivel proteico, ya que en su mayoría los estudios de leiomiomas uterinos han sido abordados a nivel de expresión de genes, además que podría establecer las bases para posteriores estudios que evalúen el papel que tienen las citocinas en los leiomiomas uterinos de la población mexicana.

11. Conclusiones

La sobreproducción de IL-8 en el leiomioma uterino y MCP-1 en el miometrio adyacente están asociadas con el establecimiento de un microambiente inflamatorio que favorece el acumulo de matriz extracelular, característica de los leiomiomas uterinos.

Existen diferencias en la concentración de citocinas producidas por un mismo tejido uterino, dependiendo de su condición y procedencia fisiológica (leiomiomas uterinos o miometrio adyacente).

12. Perspectivas

Es necesario hacer más estudios a nivel de proteínas (estudios de proteómica) implicadas en la patología de los leiomiomas uterinos, que eluciden el papel funcional de las proteínas involucradas en el desarrollo de los eventos fibrótico. Además de poder encontrar posibles moléculas que actúen como blancos terapéuticos en el tratamiento de los leiomiomas uterinos.

Aumentar el número de muestras analizar, evaluar las citocinas en sangre periférica y dilucidar el uso de la IL-8 como un posible biomarcador clínico de la patología.

13. Bibliografía

1. Badolato R, Negro PA, Milesimo M, Notarangelo LD y Musso T. (1997). Interleukin 15 (IL-15) Induces IL-8 and Monocyte Chemotactic Protein 1 Production in Human Monocytes. *Blood*. 90(7): 2804-2809.
2. Bustos-López HH, Leger MV, Jurado MJ, Oviedo GO, y Rojas-Poceros G. (2002). Leiomiomatosis uterina, un viejo problema con nuevas soluciones. *Asociación Mexicana de Cirugía Endoscópica, A. C.* 3(3): 123-130.
3. Bulun SE. (2013). Uterine Fibroids. *The New England Journal of Medicine*. 369: 1344–1355.
4. Chuang T-D y Khorram O. (2014). miR-200c Regulates IL8 expression by Targeting IKBKB: A Potential Mediator of Inflammation in Leiomyoma Pathogenesis. *Plos One*. 9(4): e95370-e95370.
5. Chung HJ, Steplewski A, Chung KY, Uitto J, Fertala A. (2008). Collagen fibril formation. A new target to limit fibrosis. *The Journal of biological chemistry*. 283: 25879–25886
6. Ciavattini A, Giuseppe JD, Stortoni P, Montik N, Giannubilo SR, Litta P, Islam S, Tranquillo AL, Reis FM y Ciarmela P. (2013). Uterine fibroids: pathogenesis and interactions with endometrium and endomyometrial junction. *Obstetrics and Gynecology International*. 2013(173184):1-11.
7. Dahm-Kähler P, Ghahremani M, Lind A-K, Sundfeldt K y Brannstrom M. (2009). Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), its receptor, and macrophages in the perifollicular stroma during the human ovulatory process. *Fertility and Sterility*. 91(1): 231–239.
8. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S y Sawaya BE. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 29(6): 313–326.
9. DeVries ME, Kelvin AA, Xu L, Ran L, Robinson J y Kelvin DJ. (2006). Defining the origins and evolution of the chemokine/chemokine receptor system. *The Journal of Immunology*. 176(1): 401-415.

10. Faerstein E, Szklo M y Rosenshein N. (2001). Risk factors for uterine leiomyoma: a practice-based case-control study. I. African-American heritage, reproductive history, body size, and smoking. *American Journal of Epidemiology*. 153(1): 1–10.
11. Flake GP, Andersen J y Dixon D. (2003). Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: A review. *Environmental Health Perspectives*. 111(8): 1037-1054.
12. Genc S, Attar E, Gurdol F, Kendigelen S, Bilir A y Serdaroglu H. (2007). The effect of COX-2 inhibitor, nimesulide, on angiogenetic factors in primary endometrial carcinoma cell culture. *Clinical and Experimental Medicine*. 7(1): 6-10.
13. Giannandrea M y Parks WC. (2014). Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Disease models & mechanisms*. 7(2): 193-203.
14. Gmyrek GB, Sozanski R, Jerzak M, Chrobak A, Wickiewicz D, Skupnik A, Sieradzka U, Fortuna W, Gabrys M y Chelmonska-Soyta A. (2005). Evaluation of monocyte chemoattractant protein-1 levels in peripheral blood of infertile women with endometriosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 122(2): 199–205.
15. Gomori G. (1950). A rapid one-step trichrome stain. *American Journal of Clinical Pathology*. 20(7): 661-664.
16. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N y Matsushima K. (1998). Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 56(5): 559–564.
17. Inagaki N, Ung L, Otani T, Wilkinson D y Lopata A. (2003). Uterine cavity matrix metalloproteinases and cytokines in patients with leiomyoma, adenomyosis or endometrial polyp. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*. 111(2):197–203.
18. Islam S, Protic O, Stortoni P, Grechi G, Lamanna P, Petraglia F, Castellucci M y Ciarmela P. (2013). Complex networks of multiple factors in the

- pathogenesis of uterine leiomyoma. *Fertility and Sterility*. 100 (1): 178-193.
19. Jerez JAC, Chils VAK, Quesada SA, Guerra JM, Arceo ME y Fernández RL. (2015). Mioma uterino: un trastorno frecuente en mujeres en edad fértil. *Revista 16 de Abril*. 54 (2579): 59-70.
20. Khan AT, Shehmar M y Gupta JK. (2014). Uterine fibroids: Current perspectives. *International Journal of Women's Health*. 6(1): 95–114.
21. Koensgen D, Bruennert D, Ungureanu S, Sofroni D, Braicu EI, Sehouli J, Sumnig A, Delogu S, Zygmunt M, Goyal P, Evert M, Olek S, Biebler KE y Mustea A. (2015). Polymorphism of the IL-8 gene and the risk of ovarian cancer. *Cytokine*. 71(2): 334-338.
22. Lee EJ, Kong G, Lee SH, Rho SB, Park CS, Kim BG, Bae DS, Kavanagh JJ y Lee JH. (2005). Profiling of differentially expressed genes in human uterine leiomyomas. *International Journal of Gynecological Cancer*. 15(1): 146-154.
23. Levy G, Hill MJ, Plowden TC, Catherino WH y Armstrong AY. (2013). Biomarkers in uterine leiomyoma. *Fertility and Sterility*. 99(4):1146–1152.
24. Matsui S, Yasui T, Uemura H, Yamamoto S, Matsuzaki T, Tsuchiya N, Yuzurihara M, Kase Y y Irahara M. (2011). Induction of circulating monocyte chemoattractant protein-1 in women with gonadotropin-releasing hormone agonist. *Journal of Reproductive Immunology*. 90(2): 227–234.
25. Matsuo H, Maruo T y Samoto T. (1997). Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone. *The Journal of Clinical and Endocrinology and Metabolism*. 82(1): 293–299.
26. Maruo T, Ohara N, Wang J y Matsuo H. (2004). Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Human Reproduction Update*. 10(3): 207-220
27. Melgarejo E, Medina MA, Sánchez-Jiménez M y Urdiales JL. (2008). Monocyte chemoattractant protein-1: A key mediator in inflammatory processes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 41(9): 998–1001.
28. Merrill RM. (2008). Hysterectomy surveillance in the United States, 1997

- through 2005. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 14(1): CR24–R31.
29. Miura S, Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Moriyama S, Masuzaki H, Samejima T, Fujishita A y Ishimaru T. (2006). Differential infiltration of macrophages and prostaglandin production by different uterine leiomyomas. *Human Reproduction*. 21(10): 2545–2554.
30. O'hayre M, Salanga CL y Allen SJ. (2008). Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *The Biochemical Journal*. 409(3): 635–649.
31. Ortiz MER, Matute AM y Martínez-Consuegra N. (2009). Miomatosis uterina. *Anales Medicos*. 54(41): 222–233.
32. Parra-Hernández SB. (2016). Metaloproteasas de matrix extracelular MMP-1 y MMP-13 (Colagenasa 1 y 3) en Leiomiomas uterinos y Miometrio adyacente (Tesis de Licenciatura). *Universidad Nacional Autónoma de México*. Ciudad de México.
33. Parker WH. (2007). Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertility and Sterility*, 87(4): 725–736.
34. Peddada SD, Laughlin SK, Miner K, Guyon JP, Haneke K, Vahdat HL, Semelka RC, Kowalik A, Armao D, Davis B y Day DB. (2008). Growth of uterine leiomyomata among premenopausal black and white women. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(50): 1-6.
35. Pérez-Carbajo E, Martín-Arias y Kazlauskas S. (2009). Patología Tumoral Benigna Del Cuerpo Uterino : Mioma y patología endometrial. *Fundamentos de GINECOLOGÍA (SEGO)*. 7(19): 391–402.
36. Pei Y, Harvey A, Yu XP, Chandrasekhar S y Thirunavukkarasu K. (2006). Differential regulation of cytokine-induced MMP-1 and MMP-13 expression by p38 kinase inhibitors in human chondrosarcoma cells: potential role of Runx2 in mediating p38 effects. *Osteoarthritis Cartilage*. 14(1): 749-758.
37. Ricard-Blum S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3(1): a004978.

38. Ross HM y Pawlina W. (2007). Histología. *Medica Panamericana*. 52(4): 974.
39. Senturk LM, Sozen I, Gutierrez L y Arici A. (2001). Interleukin 8 production and interleukin 8 receptor expression in human myometrium and leiomyoma. *American journal of obstetrics and gynecology*. 184(4): 559–566.
40. Sikorski R, Kapec E y Zaleska W. (2001). Serum levels of proinflammatory cytokines in women with uterine myomas. *Ginekologia Polska*. 72(12A): 1485–1488.
41. Sokol CL y Luster AD. (2015). The Chemokine System in Innate Immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 7(5): 1-20.
42. Sozen I y Arici A. (2006). Biología celular de los miomas : interacción de los esteroides sexuales con las citocinas y los factores de crecimiento. *Clínicas Obstétricas y Ginecológicas de Norteamérica*. 33: 41–58.
43. Sozen I y Arici A. (2002). Interactions of cytokines, growth factors, and the extracellular matrix in the cellular biology of uterine leiomyomata. *Fertility and Sterility*. 78(1): 1–12.
44. Sozen I, Olive DL y Arici A. (1998). Expression and hormonal regulation of monocyte chemotactic protein-1 in myometrium and leiomyomata. *Fertility and Sterility*. 69(6): 1095–1102.
45. Sozen I, Senturk LM y Arici A. (2001). Effect of gonadotropin-releasing hormone agonists on monocyte chemotactic protein-1 production and macrophage infiltration in leiomyomatous uterus. *Fertility and Sterility*. 76(4): 792-796.
46. Sparic R, Mirkovic L, Malvasi A y Tinelli A. (2015). Epidemiology of uterine myomas: A review. *International Journal of Fertility and Sterility*. 9(4): 424-435.
47. Stewart EA. (2001). Uterine Fibroids. *The Lancet*. 357(7): 293-298.
48. Stronach EA, Cunnea P, Turner C, Guney T, Aiyappa R, Jeyapalan S, De Sousa CH, Browne A, Magdy N, Studd JB, Sriraksa R, Gabra H y El-Bahrawy M. (2015). The role of interleukin-8 (IL-8) and IL-8 receptors in platinum response in high grade serous ovarian carcinoma. *Oncotarget*. 6(31): 31593–

- 31603.
49. Stovall DW. (2001). Clinical symptomatology of uterine leiomyomas. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 44(2): 364-71.
 50. Syssoev KA, Kulagina NV, Chukhlovin AB, Morozova EB y Totolian AA. (2008). Expression of mRNA for chemokines and chemokine receptors in tissues of the myometrium and uterine leiomyoma. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 145(1): 84–89.
 51. Torres DCP y Cavaleiro LM. (2015). Chemokines and immunity Quimiocinas e imunidade. *einstein*. 13(3): 469–73.
 52. Victory R, Romano W, Bennet J, Diamond MD. (2008). Uterine Leiomyomas. En Bieber EJ, Sanfilippo JS y Horowitz IR, (Primera edición), *General Gynecology*. pp: 179-204 . Livingstone, Philadelphia: Elsevier Inc.
 53. Wallach EE y Vlahos NF. (2004). Uterine myomas: An overview of development, clinical features, and management. *Obstetrics and Gynecology*. 104 (2): 393-404.
 54. Weber KSC, Draude G, Erl W, de Martin R y Weber C. (1999). Monocyte Arrest and Transmigration on Inflamed Endothelium in Shear Flow Is Inhibited by Adenovirus-Mediated Gene Transfer of IkappaB-alpha. *Blood*. 93(11): 3685–3693.
 55. Wegienka G. (2012). Are uterine leiomyoma a consequence of a chronically inflammatory immune system?. *Medical Hypotheses*. 79(2012): 226-231.
 56. Wegienka G, Day DB, Cooper T, Woodcroft KJ y Havstad S. (2013). Cytokine Patterns Differ Seasonally between Women with and without Uterine Leiomyomata. *American Journal of Reproductive Immunology*. 70(1): 327-335.
 57. Weiss G, Goldsmith LT, Taylor RN, Bellet D y Tayl HS. (2009). Inflammation in reproductive disorders. *Reproductive Science*. 16(2): 216–229.
 58. Weston G, Healy DL. (2011). Fibromas uterinos. En Shaw R.W., Luesley D., Monga A., (Cuarta edición), *Ginecología*. Kidlington, United kingdom: Elseiver Limited. pp: 567-589.

59. Yadav A, Saini V y Arora S. (2010). MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. *Clinica Chimica Acta*. 411: 1570-1579.
60. Yan C, Song X, Yu W, Wei F, Li H, Lv M, Zhang X, y Ren X. (2015). Human umbilical cord mesenchymal stem cells delivering sTRAIL home to lung cancer mediated by MCP-1/CCR2 axis and exhibit antitumor effects. *Tumor Biology*. 37(6): 8425-8435.
61. Zimmermann A, Bernuit D, Gerlinger C, Schaeffers M y Geppert K. (2012). Prevalence, symptoms and management of uterine fibroids: an international internet-based survey of 21,746 women. *BMC Women's Health*, 12(6): 1-11.

14. Abreviaturas

Abreviatura	Nombre
%	Porcentaje
±	Más-menos
°C	Grados celcius
100 X	Cien aumentos
200 X	Doscientos aumentos
Arg	Arginina
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
Asp-3	Precursor de la proteasa aspártica 3
bFGF	Factor de crecimiento fibroblastico básico
Ca ²⁺	Ion calcio
COL16A1	Colágeno tipo 16 alpha 1
COL1A1	Colageno tipo 1 alpha 1
COL4A2	Colageno tipo 4 alpha 2
COL6A1	Colageno tipo 6 alpha 1
COL6A2	Colageno tipo 6 alpha 2
COL7A1	Colágeno tipo 7 alpha 1
CSF	Factor estimulante de colonias
CXCR1	Receptor 1 de interleucina 8
DS	Desviación estándar
<i>et al</i>	Y otros
Glu	Ácido glutámico
GnRH-a	Agonista de la Hormona Liberadora de Gonadotropina

HMC-1	Línea celular humana mastocística 1
IGF	Factor de crecimiento parecido a la insulina
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INF	Interferon
INFγ	Interferon gamma
INPerIER	Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"
kDa	Kilodaltons
Leu	Leucina
LPS	Lipopolisacaridos
LU	Leiomioma uterino
MCP-1	Proteína quimioatrayente de macrófagos -1
MCPs	Proteínas quimioatrayentes de macrófagos
MEC	Matriz extracelular
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MMP-1	Metaloproteinasa de matriz extracelular 1
MMP-13	Metaloproteinasa de matriz extracelular 13
MMPs	Metaloproteinasas de matriz extracelular
NAP-1	Proteína de ensamblaje de nucleosoma 1
NF-κB	Factor nuclear kappa B
nm	Nanómetros
PBS	Buffer fosfato salino

PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
pg	Picogramos
pH	Potencial de hidrogeniones (Medida de acidez o alcalinidad)
rpm	Revoluciones por minuto
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TH17	Linfocitos T colaboradores 17
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFα	Factor de necrosis tumoral alpha
Tregs	Linfocitos T reguladores
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
α	Alpha
β	Beta
mg	Microgramos
μL	Microlitros
μm	Micrómetros