

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

**ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

**FIBROMUL ȘI FIBROMATOZA UTERINĂ - DOUĂ
ENTITĂȚI DIFERITE. CONSECINȚE
ASUPRA ENDOMETRULUI**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. HUDIȚĂ DECEBAL

Student-doctorand:

CĂLIN FLORIN DANIEL

ANUL 2021

CUPRINS

Lista cu abrevieri:	1
INTRODUCERE	3
I. PARTEA GENERALĂ.....	9
1. Etiopatogenia fibromului uterin - nivelul actual al cunoașterii.	9
1.1. Epidemiologie.....	9
1.2. Teoriile etiopatogenice clasice - scurtă istorie.....	10
1.3. Factorii favorizanți	13
1.4. Etiopatogenie – teorii moderne	18
1.4.2. Factorii genetici implicați în etiologia fibromului uterin.....	20
1.4.3. Factorii hormonalii	25
1.4.4. Factorii de creștere	29
1.4.5. Citokinele	33
1.4.6. Matricea extracelulară sediul unor procese de mecanotransducție	36
1.4.7. Factorii epigenetici.....	38
1.5. Concluzii :	40
2. Clasificare histopatologică a fibromului uterin	42
3. Joncțiunea mio-endometrială și influențele fibromatozei asupra endometrului.....	49
4. Tratamentul fibromului uterin între clasic și modern.....	53
II. CONTRIBUȚII PERSONALE.....	61
5. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.	61
6. Metodologia generală a cercetării	63
7. Fibromul și Fibromatoza uterină difuză două entități diferite – studiu clinic, statistic și histopatologic.....	69
7.1. Introducere	69
7.2. Material și metodă.....	70
7.3. Rezultate	73
7.3.1. Analiza statistică a datelor generale epidemiologice.	73
7.3.2. Analiza comparativă a parametrilor generali și a simptomatologiei.	79
7.3.3. Analiza comparativă a factorilor de risc în raport cu lotul martor.	83
7.3.4. Corelațiile dintre parametrii fibromului, simptomatologie și parametrii operatori.	90
7.3.5. Analiza comparativă histopatologică.....	106
7.4. Discuții și concluzii:	122

8. Influențele fibromatozei uterine asupra endometrului și fertilității – studiu clinic, statistic și histopatologic.....	129
8.1. Introducere	129
8.2. Material si metoda.....	129
8.3. Rezultate	131
8.3.1. Corelații statistice între parametrii fibromului și fertilitate.....	131
8.3.2. Corelații statistice între aspectul endometrului și fertilitate.....	145
8.3.3. Analiza histologică comparativă a endometrului.....	154
8.4. Discuții și concluzii:	157
9. Fibromul uterin și Fibromatoza difuză – studiu comparativ imunohistochimic.	162
9.1. Introducere	162
9.3. Rezultate	167
9.3.1. Analiza TGFβ, bFGF, TNFα, MMP2, MMP9 și CD34 în miometru.....	167
9.3.2. Analiza TGFβ, bFGF, TNFα, MMP2, MMP9 și CD34 în endometru.....	179
9.4. Discuții și concluzii	191
10. Concluzii generale și contribuții personale.	198
10.1. Concluzii generale.	198
10.2. Contribuții personale.	207
Bibliografie	208
Lista de lucrări științifice publicate	234
ANEXE.....	235

Lista cu abrevieri:

ADN	acid dezoxiribonucleic
AMH	hormon anti-Müllerian
ARN	acid ribonucleic
ATS-DL	sindromul Alport asociat cu leiomiomatoza difuză
Bcl2	B cell lymphoma 2
BMI	index de masa corporală
BMP	bone morphogenetic protein
COC	contraceptive orale combinate
COL4A5	gena care codifică sinteza de colagen tip 4
COX-2	ciclo-oxigenaza 2
DIU	dispozitiv intrauterin
DMPA	medroxi-progesteron acetat depot
DZ	diabet zaharat
E	estrogen
E2	17 β estradiol
ECM	matrice extracelulară (extracellular matrix)
EGF	endothelial growth factor
ER	estrogen receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FACS	fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-associated protein with death domain
FAK	focal adhesionkinase
FGF	fibroblast growth factor
FH	fumarat hidratataza
FISH	fluorescence in situ hybridization
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor 2
GnRH	gonadotropin-releasing hormone
G6PDH	glucozo 6 fosfat dehidrogenaza
HIFs	factori inductibili de hipoxie
HIFU	high intensity focused ultrasound
HMGA	high mobility group AT hook2
HLRCC	hereditary leiomyoma tosisand renal cell carcinoma
17Bhsd	hidroxi-steroid dehidrogenaza
HTA	hipertensiune arteriala
IFN	interferon
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IHC	imunohistochimie
IL	interleukine
LIF	leukemia inhibitory factor
LH	hormon luteinizant
LMS	leiomiosarcom (leiomyosarcoma)

LPD	leiomiomatoza peritoneală diseminată
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MED12	mediatorul subunitatii de transcriptie 12
MMP	matrix metalloproteinase
MyoSP	celule stem progenitoare miometriale
MSC	celule stem mezenchimale
MSOF	multiple systems organ failure
NF1	neurofibromatoza generalizată
NK	natural killer
NAIDS	nonsteroidal anti-inflammatory drug
P/ PG	progesteron
PB-IGF3	binding protein al IGF3
PCNA	antigenul de proliferare nucleară
PCOS	polycystic ovary syndrome
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PG	Prostaglandin
PGK	Phospho-glycerate kinase
PR/PGR	progesteron receptor
RIP	receptor interacting protein
RMN	rezonanță magnetică nucleară
RNAPII	ARN polimeraza II
ROS	reactive oxygen species
SDRA	sindrom de detresă respiratorie acută
SERM	modulator selectiv al receptorului de estrogen
SFRP1	secreted frizzled-related protein 1
SHBG	sex hormone-binding globulin
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SMA	actina muschiului neted
SMC	smooth muscle cell
SODD	silencer of death domains
SPRM	selective progesterone receptor modulator
STUMP	smooth muscle tumor of uncertain malignant potential
TAK	TGF- β -activated kinase
TGF- β	transforming growth factor β
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TNFR	TNF- α receptor
TNF- α	tumor necrosis factor α
TRADD	tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain
TSCg	gena care codifică sinteza tuberinei
UF	uterine fibroid
UPA	ulipristal acetate
VEGF	vascular endothelial growth factor

INTRODUCERE

Fibromul uterin, fibromiomul sau leiomiomul este cea mai frecventă tumoră benignă întâlnită în sistemul reproductiv al femeii [1]. Fibroamele uterine apar la 20-25% dintre femei în general și la aproximativ 45-50% dintre femeile de peste 45 ani care încă mai prezintă menstruație [1]. Fibromul uterin sau fibromatoza uterină afectează anual milioane de femei la nivel global iar tratamentul este încă preponderent chirurgical, fibromul uterin reprezentând principalul diagnostic ce duce la histerectomie [2].

Ne-am asumat o mare responsabilitate abordând această temă datorită incidenței foarte mari a acestei patologii în populația feminină și atunci, încă de la început, a fost evidentă necesitatea unui studiu amplu, cu multe cazuri, pentru a fi statistic relevant dar și prin prisma faptului că fibromul uterin este un subiect îndelung și foarte amănunțit dezbătut și cercetat în toată lumea, astfel încât este foarte greu să mai descoperi ceva nou, concludent din punct de vedere științific.

În cadrul tezei noastre am plecat de la premiza că fibromul uterin este unul dintre acele subiecte aflate în permanentă actualitate și ne-am dorit aprofundarea cercetării în această direcție. Bineînțeles că am avut în vedere și importanța practică a subiectului, știind foarte clar că fibromul uterin afectează serios și câteodată, pe termen lung, calitatea vieții pacientelor noastre. Incidența acestei patologii este foarte mare, pacientele sunt de multe ori tinere iar viața lor poate fi afectată pe termen lung, în primul rând prin simptomatologia să zicem directă, prin durerea cronică, dispareunie, menometroragiile uneori severe, cu sindrom anemic consecutiv sau prin tulburările urinare și, în al doilea rând, prin implicațiile asupra fertilității.

Ipoteza inițială de cercetare și ideea centrală a tezei este că fibromul uterin și fibromatoza uterină difuză sunt două entități patologice care, deși seamănă foarte mult, sunt diferite. În opinia noastră, ele sunt diferite din perspectiva aspectului macroscopic și mai puțin din punct de vedere microscopic. În mod aproape evident însă, aceste două entități par diferite în ceea ce privește unele aspecte ale simptomatologiei, implicația diferită a unor factori predispozanți și mai ales din punct de vedere al aspectului endometrului și fertilității pacientelor. Aprofundând această idee, am suspectat cauze și

mecanisme patogenice diferite, aspecte ultrastructurale și de comunicare celulară diferite și, implicit, necesitatea unui management terapeutic diferit sau nuanțat.

Această ipoteză, că fibromul uterin și fibromatoza uterină difuză sunt două entități diferite, a reieșit din practica ginecologică, atât clinică cât și chirurgicală. Am constatat de-a lungul timpului două „pattern-uri” pentru această patologie și anume: fibromul uterin evidențiable clinic, imagistic, intraoperator și bineînțeles, histopatologic. Unic sau multiplu, cu diverse dimensiuni sau poziții în raport cu miometrul, fibromul este bine delimitat, în general având o capsulă sau o pseudocapsulă care îl delimitează față de miometrul înconjurător, cu vascularizație accentuată periferic și hiperplazie endometrială mai ales în zona cavitară supraiacentă fibromului submucos. Aceste paciente reușesc să obțină însă sarcini și pare că intervenția chirurgicală conservatoare (miomectomia sau miometrectomia) rezolvă nu doar simptomatologia ci, de cele mai multe ori, îmbunătățește foarte mult și fertilitatea.

Pe de altă parte, în cazul fibromatozei uterine difuze, nu găsim leiomioame evidențiable preoperator sau intraoperator. Ele sunt vizibile uneori microscopic. „Pattern-ul” pare diferit, apare o fibroză difuză, generalizată, a miometrului. Acesta e mai rigid, uterul în general are dimensiuni mai mici decât în prima categorie, vascularizația studiată în mod Doppler este difuz accentuată și de cele mai multe ori endometrul e mai subțire, cu tendințe chiar spre atrofie. Pacientele cu fibromatoză difuză au, în mod logic, mai puține simptome legate de volumul uterului dar prezintă mai frecvent sângerări cronice care de cele mai multe ori nu răspund la tratamentul medicamentos și pare că au o rată mai mare de infertilitate printr-un endometru nefavorabil implantării sau menținerii unei sarcini.

Principala direcție de cercetare a studiului nostru a fost corelarea datelor clinice cu cele anatomopatologice și de imunohistochimie, comparativ, în fibromul uterin bine delimitat și fibromatoza difuză, în încercarea de a caracteriza cât mai exact aceste două entități.

Obiectivele generale ale studiului nostru au fost:

- 1.Comparația între cele două loturi în ceea ce privește parametrii epidemiologici, clinici și operatori.
- 2.Implicația unor factori de risc (cum ar fi: vârsta, obezitatea, fumatul, DZ, HTA, consumul de COC, paritatea, menopauza, timpul scurs de la ultima naștere) în etiologia fibromului, analiza comparativă cu lotul martor.
- 3.Corelarea statistică a datelor morfopatologice, cum ar fi parametrii ce caracterizează fibromul (număr, dimensiuni, poziție), pe de-o parte și pe de altă parte, aspectul endometrului, cu parametrii de fertilitate cum ar fi numărul de sarcini oprite în evoluție, număr de avorturi spontane, rata de fertilitate, rata de sarcini oprite în evoluție, anii de sterilitate sau numărul de nașteri premature.
- 4.Observarea caracteristicilor histologice ale miometrului și endometrului la pacientele cu fibrom uterin unic sau multiplu - bine delimitat, respectiv în fibromatoza uterină difuză.
- 5.Studiul imunohistochimic al unor factori implicați în etiopatogenia fibromului uterin dar și în funcția endometrială - comparativ între cele două loturi.
- 6.Implementarea de metode moderne de diagnostic, eventual a unui protocol de diagnostic, prin imunohistochimie.
- 7.Stabilirea unei strategii terapeutice în cadrul modificărilor fluxului menstrual și a fertilității - la pacientele cu patologie fibromatoasă coexistentă.

PARTEA GENERALĂ

Teza este structurată conform standardului academic al „UMF Carol Davila”, București. Partea generală a lucrării cuprinde 4 capitole.

1.Etiopatogenia fibromului uterin – nivelul actual al cunoașterii.

În capitolul 1 - „ Etiopatogenia fibromului uterin”, (structurat în 5 subcapitole) plecând de la câteva date epidemiologice și demografice, am prezentat incidența globală a fibromului uterin și grupele de vârstă cu cea mai mare predispoziție pentru acest diagnostic (subcapitolul 1.1). În subcapitolul 1.2 am prezentat teoriile clasice care explicau cu peste

100 de ani în urmă apariția fibromului uterin cum ar fi: teoria iritativă - inflamatorie a lui Virchow (1855), teoria ereditară a lui Cohnheim (în 1868), teoria vasculară a lui Klebs (1876) și Pilliet (1894), teoria hormonală descrisă sub diverse forme de Hegar, Seitz, Faure și Witherspoon (1933) și teoria infecțioasă a lui Kolmann [7]. Lui Witherspoon îi aparține fraza care a „explicat” și în literatura medicală românească, în ultimele decade, etiopatogenia fibromatozei uterine. El afirma că: *„există o relație cauză-efect între acțiunea persistentă și necontrabalansată („unopposed”) a stimulului estrogenic, produsă de multiple chisturi foliculare ale ovarelor, pe endometrul uterin și miometru, care determină apariția hiperplaziei endometriale și a fibromatozei uterine”* [13].

Am continuat apoi, în subcapitolul 1.3, cu analizarea literaturii în ceea ce privește factorii de risc sau favorizanți. Factorii de mediu, factorii alimentari sau cei ereditari au fost printre primii studiați. Factorii favorizanți pentru apariția fibromatozei uterine, considerați semnificativi din punct de vedere statistic de majoritatea studiilor actuale, sunt: vârsta, rasa neagră, obezitatea, hipertensiunea arterială, starea de premenopauză, nuliparitatea, istoricul familial. De asemenea, studii mai recente au arătat un risc mai mare de a dezvolta fibrom uterin în cazul consumului de aditivi alimentari și de soia și un risc mai mic în cazul fumatului sau în cazul consumului îndelungat de contraceptive. Deși impactul multor dintre acești factori de risc a fost atribuit efectelor lor asupra nivelului de estrogen, progesteron sau asupra metabolismului în general, demonstrarea unor mecanisme fiziopatologice de acțiune a acestor factori este dificilă și de multe ori este doar statistică sau epidemiologică (tabel 1.3.1).

În subcapitolul 1.4 - „ Etiopatogenie - teorii moderne” am cercetat în mod „sistematic review”, cele mai noi studii care să ne facă să înțelegem în era „evidence based medicine” apariția și evoluția fibromatozei uterine. Etiopatogenia fibromului uterin nu este cunoscută cu exactitate sau mai bine zis este foarte complexă, nenumărate studii pe această temă sunt în derulare în toate centrele universitare din lume. Am sistematizat multitudinea de factori implicați în etiologia fibromului, în acest subcapitol, în 7 puncte: celulele stem mezenchimale, factori genetici, factori hormonal, factori de creștere, citokinele, matricea extracelulară - sediul unor procese de mecano-transducție și factori epigenetici.

Studiile histologice clasice au admis că fibromul uterin ia naștere din celulele **stem** musculare netede tinere (mioblaști), incomplet diferențiate dar făcând parte din elementele normale ale miometrului uterin. A fost demonstrat că fibromul este o tumoră **monoclonală**

care derivă din proliferarea unei singure clone de celule musculare netede - teoria lui Stanley și Linder, 1965 [63]. Totuși, această paradigmă care a stabilit că fibromul este o expansiune clonală a unei singure celule musculare netede [64] ignoră faptul că fibroblaștii constituie o componentă majoră celulară a fibroamelor care poate fi identificată prin imunohistochimie de rutină și sortarea celulelor [64, 65] și este încă în dezbatere și cercetare în numeroase centre universitare din lume. Celulele musculare netede uterine și, de asemenea, celulele fibroblast like ale stromei endometriale au origine comună, în celulele mezenchimale nediferențiate [66]. Această teorie etiopatogenică, a celulelor stem, susține că celulele mezenchimale nediferențiate influențate de diverși factori și aflate sub o condiționare genetică vor forma la nivelul miometrului progenitori ai fibromatozei. Acești progenitori vor crește apoi în perioada de activitate ovariană sub influența estrogenului și a progesteronului [67, 68].

Factorii **genetici** au fost incriminați de la început în etiologia fibromatozei uterine. Cercetările din ultimele decenii au demonstrat că anomaliile cromozomiale pot fi responsabile pentru inițierea, precum și pentru creșterea acestor tumori uterine benigne. Deși majoritatea leiomiomelor uterine au un cariotip normal, studiile genetice sugerează că 50% din aceste tumori poartă anomalii cromozomiale [94]. Folosind secvențierea întregului exon sau a întregului genom („whole-exome, whole-genome sequencing”) în leiomiomul uterin au fost identificate mai multe tipuri de modificări cromozomiale și, în funcție de acestea, s-a încercat împărțirea în mai multe subgrupe a fibroamelor sugerându-se chiar că aceste subgrupe ar avea mecanisme de inițiere a procesului patologic diferite. Principalele anomalii genetice care determină apariția fibromului uterin au fost împărțite în 4 subgrupe mari: mutațiile la nivelul subunității 12 a complexului mediator de transcripție MED12, translocații la nivelul HMGA2 („high mobility group AT-hook 2”), mutațiile genei FH (fumarat hidratataza), deleții la nivelul genelor care codifică sinteza de colagen (COL4A5-COL4A6) [95].

Factorii **hormonali** sunt extrem de importanți, fibromul uterin fiind detectat în mod excepțional înaintea menarhăi și involuând, în general, la menopauză. Fibroamele apar la 20 – 25% dintre femei și la aproximativ 40-50% dintre femeile peste 45 de ani care mai prezintă menstruație [1]. „Climatul hiperestrogenic”, speculat încă din 1933 de către J. T. Witherspoon nu reprezintă totuși o regulă, dimpotrivă, hiperestrogenemia este întâlnită doar în 10 – 20% din cazurile de leiomiom uterin [13]. Progesteronul plasmatic se reduce sub 10 ng/ml doar în 25% din, cazuri, raportul E/P este semnificativ crescut numai în 10%

din cazuri [148]. Estrogenemia nu constituie așadar un inductor primordial, fiind cvasinormală la circa 80% din femeile cu fibromiom uterin, după vârsta de 38-40 ani [149]! Mai degrabă ea reprezintă un mediu propice pentru activitatea altor factori, un fel de promotor al condițiilor care facilitează hiperplazia endometrială și hipertrofia benignă de miometru. Estrogenul contribuie la formarea și proliferarea leiomiomului pe calea receptorilor nucleari, prin transcripția aberantă de gene, respectiv, prin activarea aberantă a semnalizării celulare, supresia apoptozei și generarea/supraexpresia de factori de creștere pe calea receptorilor membranari [167]. Perturbarea echilibrului fin dintre estrogen și progesteron poate să ducă la anomalii de funcționare a rețelelor complicate de semnalizare celulară și poate să determine modificarea fenotipică a unor celule stem cu apariția precursorilor leiomiomului. Acțiunea în aval, cum am văzut, prin intermediul factorilor de creștere și vasculari, prin modificarea expresiei anumitor protein-kinaze sau receptori și prin inhibarea apoptozei duce la mitoză acestor celule modificate dar și la sinteza excesivă de ECM și, implicit, la creșterea în dimensiuni a acestor formațiuni tumorale.

Diverse studii au arătat că o multitudine de **factori de creștere** (Growth Factors) sunt direct implicați în procesul de tumorigeneză cu rol în apariția, supraviețuirea și proliferarea celulelor leiomiomatoase. Cei mai importanți sunt TGF- β , bFGF, EGF, VEGF, PDGF, IGF [181, 182]. Dintre aceștia un rol major par a juca TGF- β , bFGF și VEGF. TGF- β are un efect proliferativ și de creștere a metabolismului și stimulează dezvoltarea matricei extracelulare (ECM) [195,196]. TGF- β scade, de asemenea, receptivitatea endometrului uman prin scăderea expresiei receptorilor BMP fiind răspunzător pentru o parte din cazurile de infertilitate înregistrate la pacientele cu fibromatoză [202]. VEGF, sub controlul estrogenului, induce proliferarea celulelor endoteliale, promovează migrația celulară și inhibă apoptoza [214]. De asemenea, a fost demonstrat experimental rolul mitogen al bFGF, rolul în controlul angiogenezei și în sinteza unor enzime (colagenaze sau activatorul plasminogenului) ce remodelează matrixul extracelular [186, 231].

Citokinele influențează și ele angiogeneza, inflamația și remodelarea tisulară și astfel intervin în augmentarea simptomatologiei tipice din fibromul uterin [238]. Principalele citokine care intervin în etiopatogenia fibromului și în apariția simptomatologiei cum ar fi durerea, metroragia și infertilitatea sunt: IL-1, IL-6, IL-11, IL-13, IL-15, IFN- γ , TNF- α [239]. TNF- α este una din principalele citokine care acționează la nivelul miometrului. TNF- α este un important reglator al expresiei unor gene determinând proliferare celulară și, în ciuda proprietăților antineoplazice, nivelurile

ridicate de $TNF\alpha$ nu sunt întotdeauna capabile să distrugă toate celulele anormale [241]. Menstruația, infecțiile, leziunile mecanice și stresul oxidativ pot fi cauzele inflamației în uter. Miofibroblastele produc ECM ca răspuns la influența diferitelor citokine și a factorilor de creștere. Procesul poate fi reparator în condiții normale însă în cazul pierderii mecanismelor de reglare apar proliferare celulară accentuată, sinteza de ECM în exces, angiogeneză, fenomene care duc la apariția tumorilor [243, 244]. $TNF\alpha$ are un rol important în reglarea apoptozei în celulele leiomiomului [245, 246]. Deci $TNF\alpha$ este o citokină cu roluri multiple, implicată în etiologia fibromatozei dar în egală măsură în infertilitate, în fenomene precum apoptoza trofoblastului, nidație sau receptivitatea endometrului [253].

Leiomiomul este format din celule musculare netede transformate și o **matrice extracelulară** (ECM) abundentă, rezultată prin acumulare în special de collagen modificat și cantități diferite de glicozaminoglicani. În compoziția ECM mai intră: Fibronectina, Fibulina, TGIF, Laminine, Metaloproteinaze (MMP) [263]. O înțelegere completă a rolului proteinelor ECM, în special a collagenului și a efectului acestora asupra creșterii și dezvoltării fibroamelor trebuie să ia în considerare procesul de **mecanotransducție**, un sistem dinamic prin care forțele mecanice inițiază semnalizarea chimică în interiorul celulelor [264]. ECM este capabilă să inițieze procesul de mecanotransducție și servește ca rezervor pentru proteine, factori de creștere și citokine. S-a sugerat că prin această mecano-transducție se transferă semnale de la nivel extracelular în întreaga celulă mai rapid decât prin sistemul bazat pe difuzia substanțelor chimice [264, 265]. Fibroza apare atunci când o hiperproducție de collagen va duce, în lipsa unei remodelări adecvate prin proteoliză, la acumulare de ECM și prin rigidizarea acesteia, în final, la o modificare a micro-mediului extracelular. Această rigidizare întreține prin mecano-transducție în continuare procese ce se amplifică în cascadă de depunere de matrix și inhibarea remodelării [266]. Cercetări recente au arătat că MMP (metaloproteinazele) nu sunt doar niște proteaze cu rol în degradarea ECM ci au funcții complexe în migrarea celulelor, creșterea, diferențierea, apoptoză celulară, precum și în angiogeneză și controlul răspunsurilor inflamatorii [279]. Unele MMP au efect profibrotic, altele pot influența eliberarea sau activarea unor Growth factors sau citokine cum ar fi: EGF, VEGF, FGF, $TGF\beta$ sau $IFN\alpha$ [280, 281]. MMP au efect mitogen indirect prin eliberarea prin proteoliza a FGF și $TGF\beta$ de la nivelul ECM sau efect antiapoptotic prin proteoliza unor molecule cu rol în semnalizarea celulară [282,

283]. MMP2 acționează ca protează pe fibronectină, laminină, gelatină și asupra colagenului tip I, IV, V, VII, X și XI dar are și rol antiapoptotic și angiogenetic [284, 285].

Modificările **epigenetice** se referă la acele modificări intracelulare moștenite sau dobândite care nu implică modificări ale secvenței de ADN. Primele idei despre mecanismele de natură epigenetică au apărut în anii '80. Cele mai multe arătau modificări chimice ale proteinelor implicate în împachetarea ADN-ului [299]. Unele dintre aceste marcaje sau etichete chimice favorizează activitatea genelor, adică permit producerea proteinei corespunzătoare unei gene, în timp ce altele au efectul opus, dezactivând gena respectivă. Cele mai frecvente mecanisme epigenetice implicate în etiopatogeneza fibromatozei uterine, așa cum reiese din diverse studii recente, sunt: metilarea ADN-ului, expresia aberantă a micro ARN (miARN) și modificarea histonelor [303]. Prin aceste mecanisme gena nu poate fi activată și este considerată a fi redusă la tăcere (procesul de „silencing”) [301]. În procesul de „silencing” expresia unei gene este redusă, în timp ce în procesul de „knock-down”, gena este complet ștearsă din genomul organismului, ambele fenomene sunt studiate și intens folosite în experimente pe modele animale, pentru a înțelege determinismul genetic al unor boli și pentru a dezvolta noi metode terapeutice [302].

Am încheiat **capitolul 1** cu ideea că, așa cum ne așteptam, nu am identificat în literatura de specialitate „cauza precisă” a apariției fibromului uterin. În biologie și medicină rareori avem parte de soluții matematice, totul fiind într-o dinamică permanentă. În mod evident, mecanismele epigenetice sunt interconectate cu cele de determinism pur genetic și, de asemenea, cu funcția hormonilor sexuali, a Growth Factors, a Citokinelor și a ECM într-o foarte complexă mașinărie celulară. Oricare nivel al acestui sistem complex poate fi vulnerabil ducând la apariția diverselor boli.

Iată că ideea veche a părintelui anatomiei patologiei moderne și autorul celebrului dicton „omnis cellula e cellula”, Rudolf Virchow, prin care toate bolile sunt explicate de un dezechilibru la nivel celular se dovedește a fi nu doar inspirată ci și extrem de adevărată, 165 de ani mai târziu !

În **capitolul 2 - „Clasificarea histopatologică a fibromului uterin”** am prezentat cea mai recentă clasificare ICD („International Classification of Diseases”) a „WHO” a celor 12 tipuri histopatologice de fibrom uterin, descrise recent, în plus față de leiomiomul clasic (Tabel 2.1). Unele dintre aceste forme histopatologice mai rare, cum ar fi

leiomiomul celular, leiomiomul mitotic activ sau cel mixoid, impun diagnosticul diferențial prin imunohistochimie cu sarcomul stromal, leiomiosarcomul sau chiar cu tumorile ovariene. Le-am întâlnit și noi în cercetarea histologică efectuată și le-am exemplificat cu imagini din histoteca studiului în partea specială a tezei. De asemenea leiomiomul apoplectic trebuie diferențiat de o tumoră STUMP („smooth muscle tumors with uncertain malignant potential”) sau o tumoră MSMT („malignant smooth muscle tumors”) iar leiomiomul epitelioid de tumorile PEComas („uterine perivascular epithelioid cell tumors”).

Fibromatoza uterină difuză, frecvent întâlnită, asociată sau nu cu leiomiomul clasic, este caracterizată prin prezența a multipli noduli leiomiomatoși microscopici, confluați sau bine delimitați, disperați în întregul miometru. La examinarea macroscopică uterul este de obicei mărit simetric datorită înlocuirii aproape complete a miometrului normal [352]. La examenul microscopic nodulii sunt compuși din fascicule compacte și mănunchiuri de celule musculare netede cu aspect benign [353]. Etiopatogenia acestui tip de fibromatoză difuză nu este încă stabilită cu exactitate. Așa cum fibromul uterin clasic este acceptat ca fiind o tumoră benignă monoclonală, în fibromatoza uterină difuză etiopatogenia și aspectele de morfopatologie sunt mai puțin clare și aflate încă în dezbateri și în proiecte de cercetare în numeroase centre din lume. În cadrul unui astfel de studiu Baschinsky și colaboratorii au raportat că diverse „site-uri” tumorale din leiomiomatoza uterină difuză au origine clonală diferită, iar acest lucru susține originea independentă a clonelor neoplastice [355, 356].

În **capitolul 3 - „Joncțiunea mio-endometrială și influența fibromatozei asupra endometrului”**, am prezentat interdependența dintre miometru și endometru precum și rolul funcțional al joncțiunii mio-endometriale. În plus, am prezentat implicațiile fibromatozei în calitatea endometrului și implicit în fertilitate. Tocci și colaboratorii, au propus în 2008, în teoria lor, că „boala de întrerupere a unității funcționale a zonei de joncțiune dintre endometru și miometru” să fie considerată o entitate nouă și distinctă, exprimată în principal printr-o îngroșare patologică a miometrului subendometrial, adică posibilul loc de origine al fibroamelor submucoase și intramurale [376].

În prezent nu este clar stabilit modul în care fibromatoza influențează endometrul și mediul subendometrial sau mai bine zis mecanismele implicate sunt multiple și foarte complexe. În primul rând a fost menționat și demonstrat, în unele studii, factorul mecanic, fibromul uterin distorsionează cavitatea uterină și implicit endometrul. Fibromul mai ales

cel submucos poate bloca ostiumul tubar sau poate exercita efect compresiv asupra embrionului încă de la începutul sarcinii. Fibromul submucos alterează, de asemenea, receptivitatea endometrului, de obicei printr-o decidualizare deficitară și prin eliberarea unor factori care întrețin infamația locală [376]. Numeroase alte studii au demonstrat că inflamația locală, prin citokine în concentrații mari, crează un mediu ostil la nivelul endometrului ce poate afecta motilitatea spermatozoizilor și nidația [396, 400]. TNF α , o citokină asociată inițial doar inflamației, se găsește de-a lungul întregului tract reproductiv feminin, diverse cercetări demonstrând rolul foarte important pe care aceasta îl are în procesele autocrine și paracrine esențiale pentru reproducere, cum ar fi dezvoltarea gameților și a foliculilor, steroidogeneza, ciclicitatea endometrului [394, 395]. Donna C. Sinclair și colaboratorii au demonstrat că TGF- β 3 secretat de leiomiom induce rezistența BMP-2 (bone morphogenetic protein 2) în endometru, un factor vital în procesul de nidație, prin down-reglarea receptorului specific, BMPR-2, provocând probabil o decidualizare incompletă și implicit determinând infertilitate. TGF- β 3 reduce, de asemenea, expresia PAI-1, ATIII și a trombomodulinei în endometru, contribuind la o sângerare prelungită [401]. Vascularizația locală modificată de procesul de fibromatoză uterină datorită expresiei anormale a factorilor angiogeni, cum ar fi VEGF, FGFb și PDGF, are un rol important în infertilitate, cu o rată de implantare redusă la aceste paciente [402].

Afectarea fluxului microvascular determină atrofie endometrială și scăderea calității endometrului iar prin activarea anormală a citokinelor și chemokinelor locale, se pare că are un rol major și în patogeneza leiomioamelor uterine. Astfel, se întrețin mecanisme în cerc vicios: fibromul influențează endometru, cu fenomene ischemice și inflamatorii subsecvente, iar endometru, la rândul său, prin reacțiile de reparație stromală eliberează factori de creștere care promovează în continuare creșterea și multiplicarea leiomioamelor uterine [403].

Efectul fibromatozei asupra endometrului și implicit asupra fertilității a constituit și una din direcțiile majore de cercetare ale tezei de față iar rezultatele cercetării noastre sunt prezentate în capitolul 8.

În finalul părții generale, în cadrul **capitolului 4**, am prezentat „**Tratamentul fibromului uterin, între clasic și modern**”, insistând asupra metodelor terapeutice moderne, unele aflate încă în stadiu de cercetare dar care se pare că țintesc destul de precis diverse mecanisme etiopatogenice responsabile de apariția acestei tumori uterine. Sigur,

am trecut în revistă, pe scurt, tratamentul chirurgical aflat și el în progres în ultima perioadă, cu diverse metode prin abord clasic, laparoscopic sau robotic.

Tratamentul alternativ minim invaziv se referă la opțiuni terapeutice moderne (non-chirurgicale) precum: embolizarea arterei uterine, ocluzia laparoscopică a arterei uterine, ablația fibromului cu ultrasunete de intensitate înaltă (HIFU), ablația fibromului prin radio-frecvență ghidată cu o sondă de ultrasunete (Sistem VizAblate) [407, 412, 413].

Tratamentul medicamentos l-am sistematizat în simptomatic și etiologic. Tratamentul simptomatic presupune folosirea diverselor terapii medicamentoase cu scopul de a ameliora simptomele precum sângerarea și durerea, fiind reprezentat de: antiinflamatoare nesteroidiene, acid tranexamic, contraceptive orale combinate, progestative și dispozitivul intrauterin cu eliberare de levonogestrel [405, 406]. Tratamentul etiologic se referă la diverse terapii medicamentoase ce acționează asupra etiologiei implicate în producerea și creșterea leiomiomelor uterine, cum ar fi: SERM, SPRM, Danazolul, agonistii sau antagoniștii de GnRh. În momentul de față se explorează **noi strategii terapeutice** în tratamentul leiomiomelor care să intercepteze factorii de creștere, CK sau diverse enzime de la nivelul ECM. Cei mai studiați factori de creștere sunt EGF, PDGF, TGF- β , IGF-1, activină și miostatina. Până în prezent blocantul selectiv EGF-R (AG1478), inhibitorul EGF-R (TKS050) și inhibitorul kinazei TGF- β R (SB-525334) au arătat efecte favorabile, sunt însă necesare mai multe studii cu privire la rolul lor terapeutic [195]. Aici sperăm și noi să ne situăm cu studiul nostru sau măcar să deschidem un drum pentru cercetări suplimentare viitoare.

De asemenea terapia genetică care vizează receptorii de estrogen ar putea reprezenta o strategie interesantă de viitor în managementul terapeutic al leiomiomelor [426, 427].

CONTRIBUȚII PERSONALE

În partea specială a tezei, de contribuții personale, am prezentat în capitolul 5, ipoteza de lucru și obiectivele generale, în capitolul 6 - metodologia generală a cercetării apoi în capitolele 7, 8 și 9, cele trei studii care au reieșit din cercetarea noastră:

- 7. Fibromul și fibromatoza uterină difuză - două entități diferite, studiu clinic, statistic și histopatologic;
- 8. Influențele fibromatozei uterine asupra endometrului și fertilității - studiu clinic, statistic și histopatologic;
- 9. Fibromul uterin și fibromatoza difuză - studiu comparativ imunohistochimic.

Ipoteza inițială de cercetare (**capitolul 5**) și ideea centrală a tezei este că fibromul uterin și fibromatoza uterină difuză sunt două entități patologice care, deși seamană foarte mult, sunt diferite! Ele sunt diferite nu atât ca simptomatologie ci ca aspect macroscopic al uterului, dimensiuni, vascularizație, aspect histologic dar mai ales prin calitatea diferită a endometrului, în opinia noastră, cu diferențe majore care decurg de aici în ceea ce privește fertilitatea pacientelor. Această ipoteză de lucru a reieșit din practica ginecologică obișnuită, clinică și chirurgicală. Am constatat de-a lungul timpului două tipologii ale acestei boli: fibromul uterin evidențiable clinic, imagistic, intraoperator și bineînțeles, histopatologic. Unic sau multiplu, cu diverse dimensiuni sau poziții în raport cu miometrul, fibromul este bine delimitat, în general având o capsulă sau o pseudocapsulă care îl delimitează față de miometrul inconjurător, cu vascularizație accentuată periferic și hiperplazie endometrială mai ales în zona cavitară supraiacentă fibromului submucos [373]. Simptomatologia este dependentă, conform unor studii precedente, de număr, dimensiuni și poziția fibroamelor. Aceste paciente reușesc să obțină însă sarcini și pare că intervenția chirurgicală conservatoare (miomectomia sau miometrectomia) rezolvă nu doar simptomatologia ci, de cele mai multe ori, îmbunătățește foarte mult și fertilitatea.

Pe de altă parte, în cazul fibromatozei uterine difuze, nu găsim leiomiome evidențiable preoperator sau intraoperator. Ele sunt vizibile microscopic. „Pattern-ul” pare diferit, apare o fibroză difuză, generalizată, a miometrului. Acesta e mai rigid, uterul în general are dimensiuni mai mici decât în prima categorie, vascularizația studiată în mod

Doppler este mai scăzută în zona joncțiunii endo-miometrială și de cele mai multe ori endometrul este mai subțire, cu tendințe chiar spre atrofie [371]. Pacientele cu fibromatoză difuză au, în mod logic, mai puține simptome legate de volumul uterului dar prezintă mai frecvent sângerări cronice care de cele mai multe ori nu răspund la tratamentul medicamentos și pare că au o rată mai mare de infertilitate printr-un endometru nefavorabil implantării sau menținerii unei sarcini.

Obiectivele generale ale studiului nostru au fost:

1. Compararea între cele două loturi în ceea ce privește parametrii epidemiologici, clinici și operatori.
2. Implicația unor factori de risc (cum ar fi: vârsta, obezitatea, fumatul, DZ, HTA, consumul de COC, paritatea, menopauza) în etiologia fibromului, analiza comparativă cu un lot martor.
3. Corelarea statistică a datelor morfopatologice, cum ar fi parametrii ce caracterizează fibromul (număr, dimensiuni, poziție), pe de-o parte și pe de altă parte, aspectul endometrului, cu parametrii de fertilitate cum ar fi numărul de sarcini oprite în evoluție, număr de avorturi spontane, rata de fertilitate, rata de sarcini oprite în evoluție, anii de sterilitate sau numărul de nașteri premature.
4. Observarea caracteristicilor histologice ale miometrului și endometrului la pacientele cu fibrom uterin unic sau multiplu – bine delimitat, respectiv în fibromatoza uterină difuză.
5. Studiul imunohistochimic al unor factori implicați în etiopatogenia fibromului uterin dar și în funcția endometrială – comparativ între cele două loturi.
6. Implementarea de metode moderne de diagnostic prin imunohistochimie.
7. Stabilirea unei strategii terapeutice în cadrul modificărilor fluxului menstrual și a fertilității la pacientele cu patologie fibromatoasă coexistentă.

Metodologia generală a cercetării a fost detaliată în **capitolul 6**.

Cercetarea s-a făcut în cadrul unui studiu de cohortă, prospectiv, desfășurat în clinica universitară de obstetrică și ginecologie a Spitalului Clinic de Urgență „Sfântul Pantelimon” din București. A fost un studiu vast, întins pe 5 ani, între 2015 și 2019 și care a reușit să înroleze 480 de paciente cu fibrom uterin, recrutate conform unor criterii stricte, din 28809 paciente internate în clinică în acest interval. Pacientele cu diagnosticul de

fibrom/fibromatoză au fost împărțite în două loturi: Lotul A - cele cu fibrom uterin bine delimitat, unic sau multiplu și lotul B - pacientele cu fibromatoză uterină difuză. Toate pacientele au avut indicație de tratament chirurgical, asta ne-a permis ca pe lângă studiul clinic și statistic să completăm cercetarea noastră și cu date histopatologice și de imunohistochimie.

6.1.Criteriile de includere în studiu au fost:

- paciente cu diagnosticul de fibrom sau fibromatoză difuză clar stabilit clinic și imagistic;
- paciente cu simptomatologie severă: metroragie, sindrom anemic, durere abdominală severă sau cronică, tulburări de dinamică urinară sau sexuală, tulburări de fertilitate;
- pacientele cu simptomatologie moderată dar neameliorată sub tratament medicamentos cronic și care au consimțit intervenția chirurgicală;
- pentru o mai bună uniformitate a obținerii datelor histologice, în special a celor care au analizat endometrul, toate pacientele incluse în studiu au fost în faza secretorie timpurie sau medie cu excepția celor aflate în menopauză.

6.2.Criteriile de excludere au fost:

- hiperplazia endometrială, adenomioza și endometrioza diagnosticate anterior;
- neoplaziile de col, corp uterin sau endometru au fost excluse, acestea având protocoale de management terapeutic complet diferit față de fibromatoza uterină;
- pacientele aflate recent sub tratament cu COC, progesteron sau agonisti de GnRh (mai recent de 2 luni);
- au mai fost excluse, pentru o comparație mai corectă a celor două cohorte, pacientele la care examenul final histopatologic, obținut postoperator (prin histerectomie, miomectomie sau, în câteva cazuri, prin miometrectomie) a arătat un aspect mixt cu fibrom uterin bine delimitat dar și fibromatoză uterină difuză.

Menționăm că loturile noastre au fost obținute aplicând cu strictețe criteriile de includere și de excludere, numărul total de paciente cu fibrom precum și numărul total de histerectomii în clinică fiind evident mult mai mare în acest interval de timp de 5 ani, așa cum se va vedea în continuare.

În funcție de aspectul uterului intra și postoperator și mai ales pe baza diagnosticului final histopatologic s-a făcut reîncadrarea pacientei în cohorta corespunzătoare atunci când diagnosticul ecografic inițial nu a fost concordant cu realitatea. Toate pacientele au avut indicație de tratament chirurgical, asta ne-a permis ca pe lângă studiul clinic și statistic să completăm cercetarea noastră și cu date histopatologice și de imunohistochimie.

De asemenea, în plus, s-a constituit un Lot M (martor) din 180 de paciente cu alte diagnostice de internare și care a fost folosit pentru anumite comparații statistice în vederea aprecierii importanței factorilor de risc.

6.3. Pe lângă criteriile de selecție a celor trei cohorte, am stabilit o metodologie generală standardizată care ne-a permis să urmărim, prospectiv, un număr foarte mare de date. Au fost constituite:

6.3.1. **Un caiet general de paciente** în care am înregistrat pacientele selectate cu datele de identificare: număr de ordine, nume și prenume pacientă, numărul fișei de observație (FO), data internării și externării, data operației.

6.3.2. **Dosarul de studiu al pacientei** - pentru fiecare pacientă înrolată în studiu s-a constituit un dosar ce a cuprins: o fișă de studiu a pacientei (model atașat în capitolul Anexe al tezei) cu date extensive: date personale, date clinice și paraclinice din FO, stabilirea diagnosticului și a indicației operatorii; tipul operației, protocolul operator folosit, durata operației, durata spitalizării, sângerare intraoperatorie, alte complicații etc. De asemenea am adăugat rezultate și imagini de ecografie sau de CT/RMN, acolo unde a fost cazul și imagini intraoperatorii sau realizate imediat postoperator prin secționarea pieselor. Ulterior am completat acest dosar cu rezultatele histopatologice și de imunohistochimie pentru fiecare pacientă inclusă în studiu.

6.3.3. **Consițământul informat:** înaintea includerii în studiu pacientele au fost informate, împreună cu medicul curant, despre metodologia studiului, probele biologice care vor fi recoltate și tratamentul indicat. Fiecare pacientă a semnat consițământul informat, respectându-se condițiile de etică medicală și etică a cercetării, acesta se regăsește în dosarul de studiu.

6.3.4. Înregistrarea în baza de date: După ce am verificat dacă pacienta îndeplinește criteriile de includere în studiu, am completat fișa de studiu a pacientei. Aceasta a fost prelucrată ulterior pentru înregistrarea în baza de date a studiului și eliberarea dosarului de studiu a pacientei. Cu această ocazie s-a eliberat și eticheta specială a studiului cu numele bolnavei și numărul de înregistrare în studiu, care a însoțit atât dosarul de studiu cât și probele biologice recoltate de la pacienta respectivă. Baza de date alcătuită în Microsoft Excel (inclusiv în licență Office 2019) a fost alcătuită din fișiere separate pentru Loturile A și B, respectiv pentru Lotul M (martor).

Au fost analizate și monitorizate în timp, comparativ pentru cele două loturi A și B, 53 de parametri la fiecare pacientă, împărțiți în 6 categorii, începând cu parametri epidemiologici și anamnestici clasici (vârstă, greutate, BMI, HTA, fumat, DZ, afecțiuni tiroidiene, COC, dislipidemie, obezitate, anemie, nașteri, avorturi, menarha, menopauza, timp de la ultima naștere, vârsta la prima sarcină), continuând apoi cu parametri clinici sau paraclinici (durere, dispareunie, metroragii, plenitudine, incontinență urinară) sau legați de fertilitate (nașteri, sarcini oprite în evoluție, rata de pierdere recurentă de sarcină, rata de avort spontan, nașteri premature, sterilitate-ani, sarcini oprite în evoluție), până la parametri intraoperatori (durata operației, pierdere sânge, drenaj pelvin, necesarul de transfuzie sangvină), parametri ce caracterizează fibromul (număr, poziție, dimensiuni) sau histopatologici (aspectul miometrului, aspectul endometrului, alte asocieri histopatologice).

6.3.5. Analiza statistică.

Datele au fost prelucrate cu ajutorul Microsoft Office Excel 2019, analiza statistică a fost efectuată în programul SPSS-v26, semnificația statistică fiind considerată la o valoare **p<0,05**. Pentru compararea variabilelor de tip numeric am folosit testul T Student și testul ANOVA sau testul Kruskal - Wallis, iar pentru compararea variabilelor calitative testul Fisher. Testul Hi-patrat a fost utilizat pentru stabilirea reprezentativității eșantionului. Relațiile dintre anumiți parametri au fost evaluate cu ajutorul testelor de corelație: metoda Pearson pentru variabilele continue, cu distribuție normală, metoda Spearman pentru variabilele ordinale, cu distribuție anormală sau cu ajutorul calculării coeficientului de corelație Kendall. Pentru verificarea suplimentară a corectitudinii corelațiilor am folosit testul Likelihood ratio.

Variabilele calitative au fost analizate atât ca frecvențe absolute cât și ca frecvențe relative. Variabilele cantitative au fost analizate din punct de vedere al distribuției. În cazul distribuției gaussiene s-au calculat indicatorii de tendință centrală (media) și de dispersie (deviația standard). În cazul variabilelor care au distribuție non-gaussiană s-au analizat, de asemenea, indicatorii de tendință centrală (mediana, percentila 50) și de dispersie (valoarea minimă, maximă, percentila 25 și percentila 75).

Prin regresie logistică am determinat parametrii independent corelați cu prezența anumitor simptome. De asemenea, am mai folosit testul nonparametric al ipotezei nule, U test sau testul Mann-Whitney pentru aprecierea relației dintre anumiți parametri selectați aleatoriu din cele două populații și testul Wald cu ajutorul căruia am evaluat constrângerile asupra parametrilor statistici folosiți.

Sigur că analiza statistică, histopatologică și imunohistochimică a fost condusă plecând de la obiectivele generale ale studiului și că am încercat să ne focusăm doar pe acele corelații semnificative din punct de vedere al temei de cercetare propusă. Având o bază de date foarte vastă cu mulți parametri monitorizați pe parcursul a 5 ani am împărțit cercetarea noastră, pentru o mai bună claritate, în trei studii așa cum vom detalia în paginile următoare, în capitolele 7, 8 și 9.

7. Fibromul și Fibromatoza uterină difuză două entități diferite – studiu clinic, statistic și histopatologic

7.1. Introducere

În cadrul acestui prim studiu am verificat principala ipoteză și ideea centrală a tezei și anume că fibromul uterin și fibromatoza uterină difuză sunt două entități patologice diferite din punct de vedere al aspectului macroscopic și microscopic dar mai ales în ceea ce privește implicația diferită a unor factori de risc și a unor mecanisme patogenice probabil diferite. Subsecvent am cercetat și ipoteza unui comportament diferit în ceea ce privește simptomatologia și corelațiile acestora cu parametrii fibromului și cu parametrii operatori.

7.2. Material și metodă

Material: Am folosit cele două loturi: **lotul A**–paciente cu fibrom uterin bine delimitat și **lotul B**–paciente cu fibromatoză difuză, incluse în studiu, precum și un **lot M** (Martor) format din paciente internate cu alte patologii, în vederea aprecierii impactului unor factori de risc.

În cadrul acestui prim studiu ne-am propus și am realizat:

1. Comparație între cele două loturi în ceea ce privește parametrii epidemiologici, clinici și operatori.
2. Implicația unor factori de risc (menarha precoce, menopauza tardivă, gradul de paritate, diabetul zaharat, obezitatea, fumatul, consumul de COC, AHC) în etiologia fibromului sau fibromatozei difuze, analiza comparativă cu un lot martor.
3. Corelarea statistică a datelor morfopatologice ce caracterizează fibromul (dimensiuni, număr, poziție) cu simptomatologia (durerea, dispareunia, metroragia) dar și cu parametrii operatori (durata operației, durata spitalizării, volumul de sânge aspirat intraoperator, volumul drenajului postoperator sau necesarul transfuzional).
4. Observarea caracteristicilor histologice ale miometrului la pacientele cu fibrom uterin unic sau multiplu - bine delimitat, respectiv în fibromatoza uterină difuză.
5. Analiza altor asocieri histopatologice.
6. Prezentarea unor cazuri particulare de fibrom uterin.

Metodă: Cercetarea a avut la bază un protocol standardizat de cercetare pentru fiecare pacientă inclusă în studiu, care a cuprins 3 etape: 1.recoltarea și prelucrarea probelor tisulare; 2.diagnosticul histopatologic; 3.interpretarea și analiza statistică a rezultatelor.

După includere în formol 10%, piesa a fost examinată pentru diagnostic și includere în studiu. Recoltarea de țesut uterin în cadrul studiului nostru s-a realizat în condiții metodologice identice: medicul anatomopatolog a recoltat 2 fragmente biopsice, de minim 15x10 mm fiecare, de calitate egală (dimensiune, viabilitate) din zona de leiomiom evident sau din zona de fibromatoză difuză, având grijă ca piesele respective să cuprindă atât miometru dar și endometru subiacent, respectiv din zone de miometru indemn – pentru

stabilirea lotului de control (atunci când a existat miometru indemn în uterul respectiv!). Piesele au fost fixate în blocuri de parafină în condiții identice, apoi au fost etichetate și păstrate separat față de blocurile realizate în mod obișnuit de către departamentul de anatomie patologică, într-o biobancă a studiului.

Din punct de vedere macroscopic, după includerea pieselor în soluție de formol 10%, s-au realizat imagini cu secțiunile și aspectele macroscopice ale uterului care au fost stocate într-o bază de date electronică și s-a decis încadrarea cazului în lotul A sau lotul B. Apoi pentru fiecare piesă (din lotul A) studiată au fost notate numărul, dimensiunea și poziția nodulilor fibromatoși, parametrii ce au fost incluși în baza de date și analizați statistic ulterior.

Din punct de vedere microscopic, pe măsura includerii în studiu a cazurilor, s-a efectuat de către medicul anatomopatolog evaluarea existenței de material histologic suficient și de bună calitate în blocurile de parafină corespunzătoare. Din aceste blocuri s-au efectuat secțiuni de 5 micrometri grosime care au fost etalate pe lame. După colorațiile standard cu Hematoxilina Eozina, împreună cu medicul Anatomopatolog, am urmărit:

- aspectul celulelor miometriale
- aspectul celulelor stromale
- aspectul vascularizației – număr, formă, aspect, ramificații, prezența unor sufuziuni sanguine, vase de neoformație, densitate (număr vase/ unitatea de suprafață).

7.4. Rezultate, discuții și concluzii

7.4.1.Date generale și epidemiologice.

Prevalența generală, pe 5 ani, a diagnosticului de fibrom sau fibromatoză uterină, în studiul nostru, a fost între 26,12% și 32%, anual, din totalul cazurilor ginecologice internate în clinică. Fibromul uterin a fost al doilea cel mai frecvent diagnostic după boala inflamatorie pelvină. Am constatat că un procent foarte mare din pacientele cu diagnosticul de fibrom sau fibromatoză ajung la histerectomie, între 30,3% și 41,05% anual! Deasemenea, am descoperit că din 1511 histerectomii realizate în clinică, în 5 ani, 1136 au fost efectuate pentru fibrom uterin, ceea ce reprezintă un procent extrem de mare (75,18%).

Dintre toate tipurile de histerectomie a fost preferată histerectomia totală pe cale abdominală clasică (71,39%), celelalte tipuri (vaginală, laparoscopică sau asistată laparoscopic) fiind în procente mult mai mici.

7.4.2. Analiza comparativă între loturile A și B a parametrilor generali, a distribuției pe grupe de vârstă și a simptomatologiei.

Prin studiul parametrilor generali în cele două loturi, am constatat diferențe semnificative statistic în ceea ce privește: vârsta - cu o medie mai ridicată, de 48,76 ani în lotul B, față de 46,74 ani, în lotul A; greutatea medie a pacientelor - cu o tendință mai mare la obezitate în lotul A; volumul mediu al uterului în lotul A aproape dublu față de volumul mediu corespunzător lotului B și respectiv cantitatea de sânge aspirat intraoperator, semnificativ mai mare în lotul A. Cea mai mare incidență a diagnosticului a fost constatată în grupa de vârstă 40-49 de ani, în ambele loturi. Cu cât a fost mai înaintată vârsta pacientelor am constatat o incidență mai mare în lotul B, cu fibromatoză difuză, fără a avea însă diferențe semnificative statistic între cele două loturi.

În ceea ce privește simptomatologia, analizând statistic, am obținut diferențe semnificative pentru: dismenoree, senzația de plenitudine și dispareunie, toate întâlnite mai frecvent în lotul cu fibrom uterin bine delimitat (lotul A) !

Și în cazul bolilor asociate am întâlnit câteva diferențe semnificative: anemia asociată, dislipidemia, tumorile ovariene sau diabetul zaharat au fost mai frecvente în lotul B ! Interesant a fost și faptul că, deși procentul de paciente cu metroragii a fost extrem de asemănător în cele două loturi, 74,7% în lotul A, respectiv 71,7% în lotul B (așa cum se poate observa în tabelul 7.3.9), anemia cronică a fost prezentă într-un procent mult mai mare în lotul B (tabelul 7.3.10), fenomen pe care nu l-am putut explica decât printr-o sângerare cronică cu durată mult mai mare în lotul B de paciente, chiar dacă la internare procentul de paciente cu metroragii a fost cvasi-identic în ambele loturi !

7.4.3. Analiza comparativă a factorilor de risc în raport cu lotul martor.

Prin cercetarea factorilor de risc și analizarea lor statistică în loturile A și B, comparativ cu lotul M (martor) am obținut rezultate interesante:

- Menarha precoce este factor de risc pentru pacientele din lotul A cu fibrom uterin, nu și pentru pacientele din lotul B;
- Vârsta înaintată la prima sarcină este mai importantă statistic pentru pacientele din lotul B. Implicit, se remarcă procente net superioare cu cât crește vârsta, în „favoarea” pacientelor din lotul B, așa cum se observă în figura 7.3.7. Cu alte cuvinte, există și o tendință de obținere a sarcinii la vârstă mai înaintată pentru pacientele cu fibromatoză uterină difuză.
- Din punct de vedere al timpului scurs de la ultima sarcină am constatat diferențe cu semnificație statistică cu cât intervalul de timp a fost mai mare. În grupa 20-25 de ani (de la ultima naștere) precum și în grupa de peste 25 ani au existat diferențe importante între loturile A și M, precum și între loturile B și M. Astfel a rezultat foarte clar că acest factor de risc este important pentru ambele loturi, A și B.
- Gradul de paritate a fost, de asemenea, analizat statistic și am obținut diferențe semnificative doar la gradul de paritate 0 adică la pacientele fără nașteri. Procentul de paciente secundipare sau tertipare a fost foarte apropiat în cele trei loturi iar în cazul gradului de paritate 4 sau 5 au existat diferențe dar fără semnificație statistică (Fig. 7.3.9). Putem deci afirma, într-o oarecare măsură, că paritatea de grad înalt poate fi considerată un factor protectiv pentru apariția fibromatozei, pacientele multipare având un comportament asemănător cu cele din grupul martor din acest punct de vedere.
- Nuliparitatea nu s-a dovedit a fi un factor de risc semnificativ statistic !
- Am constatat diferențe semnificative în ceea ce privește asocierea cu diabetul zaharat. Acesta a fost caracteristic și s-a dovedit a fi un factor de risc important pentru pacientele din lotul B.
- În cazul dislipidemieii, am obținut semnificație statistică prin comparația cu lotul martor pentru pacientele din lotul A dar și pentru cele din lotul B (tabel 7.3.15). Procentul de paciente cu dislipidemia a fost în lotul B (33,3%) față de lotul A (29%) în timp ce în lotul M am întâlnit un procent de 15,6%.
- Hipertensiunea arterială, deși frecvent întâlnită la pacientele noastre, nu s-a dovedit a fi un factor de risc cu semnificație statistică în nici un lot !
- În cazul consumului de contraceptive orale combinate am analizat numărul de paciente care au folosit aceste substanțe și timpul mediu de consum (exprimat în ani) pentru fiecare lot în parte. S-au identificat diferențe semnificative între loturile

A și B dar și între A și M (tabelul 7.3.15). Rezultatele au demonstrat că aceste substanțe pot fi încadrate în grupul factorilor de risc pentru pacientele din lotul A.

- La analizarea antecedentelor heredo-colaterale pozitive pentru fibrom sau fibromatoză uterină, am obținut, așa cum era de așteptat, rezultate semnificative statistic pentru ambele loturi A și B, în raport cu lotul martor (tabelul 7.3.15).

7.4.4. Analiza statistică a corelațiilor dintre parametrii fibromului, simptomatologie și parametrii operatori.

- Analiza statistică a arătat că volumul uterului influențează destul de uniform durerea, în ambele loturi, cu cât volumul a fost mai mare cu atât numărul de paciente care au descris durere cronică a fost mai mare iar punctajele din scala durerii (o scală de autoapreciere a durerii folosită în studiu) au arătat o durere de intensitate mai crescută.
- Am obținut o corelație semnificativă statistic între volumul uterului și dispareunie doar în cazul pacientelor din lotul A.
- Deși incontinența urinară a fost prezentă în procente aproape identice în cadrul celor două loturi, mai precis 16% din paciente în lotul A, respectiv 16,11% în lotul B, volumul uterin s-a asociat statistic semnificativ cu incontinența urinară doar pentru pacientele cu fibromatoză difuză din lotul B.
- Procentele de paciente cu metroragii au fost foarte mari în ambele loturi (74,66% în lotul A, respectiv 71,1% în lotul B). Totuși la analiza statistică nu a rezultat că volumul uterului influențează semnificativ metroragia.
- În ceea ce privește asocierea dintre volumul uterin și parametrii operatori (durata operației, durata spitalizării, volumul sângelui aspirat intraoperator sau al drenajului pelvin înregistrat postoperator, necesarul transfuzional) nu au fost identificate corelații semnificative în nici un lot ! Am demonstrat că acești parametri operatori nu au fost corelați semnificativ nici cu parametrii fibromului analizați de noi (numar, dimensiune, pozitie fibrom).

În cursul cercetării, în lotul A, am identificat câteva corelații semnificative statistic, determinate de anumiți parametri ai fibromului uterin, după cum urmează:

- Diametrul maxim al fibromului intramural a influențat semnificativ durerea cronică. Diametrul maxim al fibromului intramural influențează durerea în ceea ce

privește numărul de paciente care prezintă acest simptom dar și intensitatea ei. Cu cât diametrul este mai mare cu atât durerea este mai frecvent întâlnită iar intensitatea ei, autoapreciată de paciente, este mai mare.

- De asemenea, am demonstrat o relație de cauzalitate între diametrul maxim al fibromului submucos și metroragie, cum era de așteptat.
- Surprinzător oarecum, nu am găsit semnificație statistică în aprecierea relației de cauzalitate dintre numărul de fibroame intramurale și durere sau metroragie.
- Similar, nu a existat relație de cauzalitate semnificativă statistic nici între numărul de fibroame submucoase și metroragie !

7.4.5. Analiza comparativă histopatologică.

Din punct de vedere **macroscopic** s-au notat diferențe ce țin de formă, dimensiuni, aspect și uneori consistență între cazurile din loturile noastre A, respectiv B.

Uterul cu leiomiom evident, unic sau multiplu (lotul A), este mult mărit de volum, frecvent asimetric prin prezența unor noduli fibromatoși care îl deformează. Pe secțiuni se observă clar prezența acestor macronoduli cu diverse poziții și dimensiuni precum și aspect polipoid sau hiperplazic al endometrului (fig. 7.3.21).

În fibromatoza uterină difuză (lotul B) uterul este de obicei mărit simetric datorită înlocuirii aproape complete a miometrului de micronoduli vizibili doar microscopic, cu dimensiuni medii mai reduse față de cazurile din lotul A. Pe secțiuni am constatat absența macronodulilor și mai frecvent aspect atrofic al endometrului (fig. 7.3.22).

În ceea ce privește dimensiunile medii ale uterului și volumul mediu acestea au fost mult mai mari în lotul A, diferențele calculate fiind semnificative statistic. În cadrul lotului A (300 paciente) am însumat un total de 914 noduli fibromatoși diagnosticați histopatologic, cei mai mulți, 538, reprezentând 61%, cu dispoziție intramurală - Fig 7.3.24. Nodulii subseroși au fost în număr de 188 (21%) iar cei submucoși 158 (18%), dintre care 30 au fost intracavitari. Diametrul mediu al fibromului submucos (în lotul A) a fost de 3,06 cm, al fibromului intramural 6,46 cm iar al fibromului subseros de 3,82 cm. Diametrul maxim al fibromului submucos a fost de 6 cm, al fibromului intramural 16 cm iar al fibromului subseros de 4 cm. În mod evident în lotul B nu a fost posibilă o astfel de cuantificare aici fiind vorba despre o fibromatoză uterină difuză, microscopică.

Microscopic am constatat diferențe discrete între cele două loturi, ne semnificative din punct de vedere statistic (tabelul 7.3.28).

În cazurile cu leiomiom bine delimitat (lotul A) se observă celulele tumorale asemănătoare fibrelor musculare netede normale dar cu densitate celulară mai mare, cu citoplasmă eozinofilă și cu nuclei alungiți, ovalari, tăiați drept la capete, cu mitoze rare, fără atipii și frecvent cu arii de sclero-hialinizare (fig. 7.3.25 și 7.3.26).

Pentru fibromatoza difuză, la examenul microscopic se constată că micronodulii sunt compuși tot din fascicule sau mănunchiuri de celule musculare netede cu aspect benign dar mai scurte, cu distribuție mai compactă. Nodulii pot fi confluați între ei și contopiți imperceptibil cu miometrul normal mai puțin celular din jur sau, mai frecvent, disparați în întregul miometru. Similar, s-a constatat citoplasmă eozinofilă și nuclei alungiți, ovalari, fără atipii. Mult mai rar am întâlnit hialinizare sau degenerare.

În ceea ce privește cele mai frecvente patologii asociate, am constatat diferențe notabile, semnificative statistic, în cazul asocierii cu tumorile ovariene și cu leziunile de col. Astfel, chistul seros ovarian a fost mai frecvent întâlnit în lotul B, în timp ce chistul hemoragic sau endometrioic a fost mai frecvent în lotul A. Leziunile de col, în ansamblu, au fost mult mai frecvent întâlnite în lotul B (31,6% în lotul B față de 15,3% în lotul A), înregistrându-se procente mai mari la toate subcategoriile: L-SIL, H-SIL, CIS sau Neoplasm invaziv (tabelul 7.3.29).

Foarte interesante și diferite statistic au fost asocierile cu adenomioza, prezentă la 38,6% din pacientele lotului A față de 26,1% din pacientele lotului B, precum și asocierile cu endometrul anormal mult mai frecvent întâlnit în lotul B, 80,5% în lotul B față de 36,3% în lotul A (tabelul 7.3.30 și tabelul 7.3.31).

În finalul cercetării histopatologice am analizat și prezentat câteva cazuri speciale, rare de fibrom uterin. Incidența lor a fost extrem de scăzută 4,37%, mai precis 40 din 914 noduli fibromatoși analizați având aceste diagnostice histopatologice deosebite, așa cum am exemplificat în subcapitolul 7.3.5, importantă fiind însă una deosebită, prin necesitatea realizării diagnosticului diferențial cu patologia malignă a uterului, mai ales cu leiomiosarcomul uterin, dar și cu tumorile borderline STUMP („smoothmuscle tumor of uncertain malignant potential”), cu sarcomul stromal endometrial sau uneori cu alte tumori pelvine (ovar, trompă, intestin, peritoneu, etc.).

7.4.6. Concluzii

Analizând rezultatele obținute din acest prim studiu, am reușit să stabilim câteva concluzii. În primul rând am notat incidența foarte mare a diagnosticului de fibrom uterin, în jur de 30% din totalul diagnosticelor ginecologice în intervalul studiat, de 5 ani, grupa de vârstă cu incidență maximă fiind între 40 și 49 de ani. De aici a rezultat importanța deosebită a acestei patologii și necesitatea stabilirii unor strategii terapeutice adecvate. Pe de altă parte, am constatat, în ceea ce privește managementul acestei patologii în clinica noastră, că abordarea a fost preponderent chirurgicală, un procent foarte mare din pacientele cu fibrom ajungând la histerectomie, între 30% și 41%, în fiecare an. În cadrul comparațiilor din acest prim studiu am obținut o vârstă medie a pacientelor mai mare în lotul B, o tendință la obezitate și simptomatologie (dismenoree, plenitudine, dispareunie) mai pregnantă în lotul A.

Diferențele din punct de vedere histopatologic au fost evidente în ceea ce privește aspectul macroscopic (dimensiuni și volum uterin mult mai mari în lotul A, precum și prezența macro-nodulilor) și mult mai discrete, fără semnificație statistică, din punct de vedere microscopic în ceea ce privește aspectul miometrial. Totuși nu putem să nu remarcăm faptul că cele două loturi au fost diferite în ceea ce privește asocierea cu adenomioza, mai frecventă în lotul A și asocierea cu endometrul anormal, mult mai frecvent întâlnit în lotul B, respectiv 80,5% față de 36,3% în lotul A !

Mai mult, o altă observație rezultată din acest studiu ni s-a părut de o importanță covârșitoare: deși procentul pacientelor cu metroragii a fost aproape identic (74,66% în lotul A și 71,66% în lotul B) diferența în ceea ce privește anemia subsecventă a fost semnificativă (40,66% din paciente în lotul A, respectiv 77,77% din paciente în lotul B), cu un procent aproape dublu în lotul B, fenomen explicat prin sângerarea mai îndelungată în cazul pacientelor cu fibromatoză uterină difuză.

Aceste diferențe obținute în cadrul cercetării privind asocierea cu adenomioza, mai frecventă în lotul A, anemia mai importantă în lotul B dar mai ales diferența impresionantă în ceea ce privește aspectul histologic al endometrului, cu un procent foarte mare de endometru anormal în lotul B, ne-au întărit crezul că cele două entități patologice, fibromul uterin bine delimitat și fibromatoza uterină difuză, au mecanisme etiopatogenice, precum și mecanisme de semnalizare și control al funcțiilor celulare diferite și implicit, influențe diferite asupra endometrului subiacent !

8. Influențele fibromatozei uterine asupra endometrului și fertilității – studiu clinic, statistic și histopatologic

8.1. Introducere

Influența fibromului asupra endometrului reprezintă o temă actuală de cercetare mai ales în ceea ce privește fertilitatea pacientelor. Fibromatoza influențează nefast, așa cum am detaliat în capitolul 3, calitatea endometrului, prin: efecte mecanice, efecte datorate peristalticii accentuate, efecte datorate supresiei sau modificării unor gene și efectele pro-inflamatorii. Afectarea fluxului microvascular, prin activarea anormală a citokinelor și chemokinelor locale, determină atrofie endometrială, scăderea calității endometrului și alterarea sintezei unor factori importanți în nidație [371].

Din aceste considerente am analizat în acest capitol, comparativ între cele două loturi, diferențele legate de aspectele histologice ale endometrului și consecințele asupra fertilității pacientelor, în contextul patologiei fibromatoase coexistente.

8.2. Material si metodă

Material: Am analizat datele clinice și histologice obținute de la pacientele incluse în studiu conform metodologiei generale descrise în capitolul 6. Toate datele au fost extrase din baza de date electronică iar cercetarea histopatologică a folosit probele tisulare incluse în biobanca studiului. Au fost studiate toate cazurile incluse în studiu, cele 300 de paciente din cadrul lotului A, respectiv cele 180 de paciente din lotul B !

Metodă: Am folosit un protocol standardizat, similar cu cel din primul studiu al tezei, descris în capitolul 7, ce a cuprins:

8.2.1 Protocolul de recoltare și prelucrare - a fost descris în cadrul primului studiu, la subcapitolul 7.2.1. Evident că, de data aceasta, din blocurile incluse în parafină, păstrate în biobanca studiului, s-au efectuat secțiuni de 5 microni și apoi lame cu aspecte ale endometrului.

8.2.2 Protocolul de cercetare histopatologică: S-a desfășurat în secția de Anatomie Patologică a Spitalului Clinic de Urgență „Sfântul Pantelimon” - București. După colorația lamelor cu HE am analizat, împreună cu medicul anatomopatolog, comparativ, în cele două loturi: aspectul celulelor epiteliale glandulare, aprecierea gradului de proliferare, a hiperplaziei sau a gradului de atipie, acolo unde a fost cazul. De asemenea a fost studiată vascularizația endometrului și aspectul stromal.

8.2.3 Analiza statistică s-a efectuat folosind programul SPSS-v26 și testele statistice descrise în subcapitolul 6.3.5. Datele au fost stocate într-o bază de date efectuată cu ajutorul programului Microsoft Office Excel 2019.

În acest al doilea studiu al cercetării noastre **obiectivele** propuse și realizate au fost:

1. Corelarea statistică a datelor morfopatologice ce caracterizează fibromul (număr, dimensiuni, poziție) sau endometrul (aspect normal, inflamația acută, cronică, hiperplazia, atrofia) - cu parametrii de fertilitate (tabelul 8.2.1).
2. Observarea caracteristicilor histologice ale endometrului la pacientele cu fibrom uterin unic sau multiplu - bine delimitat (lotul A), respectiv în fibromatoza uterină difuză (lotul B).

În acest capitol am analizat parametrii care caracterizează fertilitatea, mai precis: numărul de nașteri, numărul de avorturi spontane, numărul de sarcini oprite în evoluție, numărul de nașteri premature și durata în ani a sterilității, comparativ, statistic, între cele două loturi de paciente (tabelul 8.2.1). Mai mult, au fost studiate corelațiile acestor parametrii de fertilitate cu parametrii fibromului, în lotul A, unde aceștia din urmă au fost cuantificabili și anume cu numărul, dimensiunea și poziția fibroamelor.

Ținând cont de faptul că loturile noastre A și B nu au fost egale, sigur că au fost comparate, pentru corectitudinea statistică, medii sau procente exprimate pentru fiecare lot în parte. De asemenea, am folosit încă doi indicatori de mare acuratețe, rata de avort spontan și rata de sarcină oprită în evoluție, definite ca raportul dintre numărul de avorturi spontane, respectiv numărul de sarcini oprite în evoluție și numărul total de sarcini obținute pe fiecare lot. Pe lângă corelațiile menționate anterior, cercetarea noastră a urmărit și a realizat și corelații statistice între aspectele histopatologice ale endometrului și parametrii de fertilitate, precum și analiza comparativă din punct de vedere histologic a endometrului, în loturile A și B.

Reamintim că pentru o bună uniformitate a obținerii datelor histologice, toate pacientele din studiu, conform criteriilor amintite la începutul părții speciale, au fost în faza secretorie timpurie sau medie cu excepția celor aflate în menopauză (înregistrând aici una din limitele studiului nostru și anume faptul că probele tisulare au fost analizate comparativ între cele două loturi A și B, nu și pe grupe de vârstă în cadrul loturilor !).

8.4. Rezultate, discuții și concluzii

8.4.1. Corelații statistice între parametrii fibromului și fertilitate – în lotul A.

În lotul A, cu fibrom uterin bine delimitat, am demonstrat că unii dintre parametrii folosiți de noi pentru a caracteriza fibromul au influențat semnificativ fertilitatea. Astfel, am constatat că între numărul de fibroame intramurale și numărul de nașteri premature a existat o relație de cauzalitate.

De asemenea, am obținut o corelație statistic semnificativă între diametrul maxim al fibromului intramural și parametrul sterilitate-ani. Cu cât acest diametru a fost mai mare cu atât perioada de sterilitate a fost mai mare.

În mod similar, numărul de fibroame submucoase dar și diametrul maxim al fibromului submucos s-au corelat pozitiv cu perioada de sterilitate !

O corelație foarte puternică din punct de vedere statistic am obținut în cazul asocierii dintre numărul de fibroame submucoase sau diametrul maxim al fibromului submucos, pe de-o parte și sarcina oprită în evoluție, pe de altă parte !

În mod surprinzător, am constatat că numărul de fibroame submucoase și diametrul maxim al fibromului submucos nu s-au corelat semnificativ statistic cu aspectul endometrului, în lotul A !

8.4.2. Corelații statistice între aspectul endometrului și fertilitate – în loturile A și B.

În cadrul comparației din punct de vedere al fertilității, între cele două loturi s-au constatat diferențe notabile (tabel 8.3.30). Am demonstrat statistic că există o tendință mai mare, a pacientelor din lotul A, la avort spontan și că procentul de paciente cu sterilitate

secundară este net superior celor din lotul B. În acest lot B am observat, mai degrabă, sterilitate primară (10,5% din paciente) și o tendință mai mare la sarcini oprite în evoluție. Astfel, la aceste paciente s-a observat o rată mai mare de sarcini oprite în evoluție față de pacientele din lotul A unde a fost mai mare rata de avorturi spontane, diferențele fiind semnificative statistic (tabelul 8.3.19).

Pacientele cu avort recurent, cu mai mult de 3 sarcini pierdute prin avort spontan, au fost în procent mai mare în lotul A (5%) față de lotul B (3,33%). Iată că, deși numărul mediu de nașteri pe pacientă este aproape identic în cele două loturi (2,13 - în lotul A față de 2,10 - în lotul B), pacientele din lotul B obțin, în medie, mai puține sarcini (2,56) față de cele din lotul A (2,86), diferența rezultând tocmai din această tendință mai mare la sterilitate primară și la oprirea din evoluție a sarcinilor, caracteristice în cazul pacientelor cu fibromatoză uterină difuză (tabelul 8.3.30) !

În lotul A s-a dovedit, destul de surprinzător, că nici un parametru de fertilitate (numărul de nașteri, numărul de avorturi spontane, numărul de sarcini oprite în evoluție, numărul de nașteri premature și durata în ani a sterilității) nu a fost influențat de aspectul endometrului !

În schimb, în lotul B am obținut o corelație semnificativă între sarcina oprită în evoluție și aspectul endometrului.

8.4.3. Analiza histologică comparativă a endometrului – în loturile A și B.

Macroscopic nu au fost constatate diferențe ale aspectului endometrial, semnificative din punct de vedere statistic între cele două loturi. În schimb, din punct de vedere al structurii microscopice, cercetarea noastră a relevat mai multe diferențe foarte interesante:

Un aspect normal al endometrului a fost identificat la 30,33% din pacientele din primul lot în raport cu 19,44%, la pacientele din lotul B, cu fibromatoză uterină difuză (tabelul 8.3.28). Din studiul nostru comparativ am mai observat un aspect infamator acut al endometrului în lotul A într-un procent mare, 31,66% din paciente, în timp ce la pacientele din lotul B aspectul a fost mai degrabă de inflamație cronică (45,55%), diferențele fiind

semnificative statistic (tabel 8.3.28). De asemenea, în lotul B s-a remarcat o tendință spre endometru atrofic, 11,66%, față de 7,33% în lotul A.

În plus, am constatat o incidență mult mai mare a atipiilor celulare și a adenocarcinomului in situ în lotul B, 1,66% față de 0,33% (în lotul A), diferența nefiind însă semnificativă din punct de vedere statistic. În cazul proliferării de tip polipoid s-au observat diferențe semnificative, cu valori mai ridicate în lotul A, 10% din cazuri, față de doar 1,11% din cazuri în lotul B. O altă diferență semnificativă descoperită a fost în ceea ce privește incidența neoplaziei endometriale în lotul B, care a fost de peste 8 ori mai mare în raport cu lotul A, respectiv 2,77% față de 0,33% (tabel 8.3.28) !

Însumând cazurile de endometrită cronică și atrofică, diferența a fost și mai mare, 57,22% din pacientele din lotul B, față de 28% din pacientele din lotul A, prezentând aceste două tipuri de diagnostice histopatologice (tabel 8.3.28).

8.4.4. Concluzii

Analizarea rezultatelor obținute din studiul 2 al cercetării noastre ne-a arătat o tendință a pacientelor din lotul B mai degrabă către o sterilitate primară (10,5% din paciente). Astfel, la aceste paciente s-a observat o rată mai mare de sarcini oprite în evoluție față de pacientele din lotul A unde a fost mai mare rata de avorturi spontane. Pacientele cu avort recurent, cu mai mult de 3 sarcini pierdute prin avort spontan au fost în procent mai mare în lotul A (5%) față de lotul B (3,33%). Probabil rata mai mare de avorturi spontane în lotul A a fost datorată efectelor mecanice (deformare a peretelui și presiune) exercitate de nodulii fibromatoși precum și peristalticii accentuate a musculaturii uterine.

Numărul de fibroame submucoase dar și diametrul fibromului submucos au influențat semnificativ fertilitatea în ceea ce privește anii de sterilitate și numărul de sarcini oprite în evoluție, în lotul A.

Interesant și oarecum surprinzător, am constatat că nici numărul de fibroame submucoase, nici diametrul maxim al fibromului submucos nu s-au corelat semnificativ statistic cu aspectul endometrului, în lotul A !

A rezultat că fibromul submucos influențează puternic fertilitatea, în lotul A, dar se pare că nu neapărat prin afectarea calității endometrului, spre deosebire de fibromatoza difuză, care acționează tocmai prin această alterare a endometrului !

În schimb, în lotul B aspectul endometrului a influențat semnificativ numărul de sarcini oprite în evoluție. În acest lot, cu fibromatoza uterină difuză, am constatat procente mult mai mari de paciente cu sterilitate primară și cu sarcină oprită în evoluție, explicate printr-un endometru anormal, nefavorabil nidației și menținerii unei sarcini normale.

Procentul net superior în ceea ce privește endometrul anormal în lotul B precum și faptul că la analiza statistică am obținut corelație pozitivă între aspectul endometrului și sarcina oprită în evoluție doar în cadrul lotului B, ne-au demonstrat fără echivoc că influențele fibromatozei asupra endometrului în cele două loturi, cu implicații iată în aspectul histologic dar și cu consecințe importante în ceea ce privește fertilitatea sunt complet diferite în cele două loturi!

9. Fibromul uterin și Fibromatoza difuză – studiu comparativ imunohistochimic

9.1. Introducere

Imunohistochimia este o metodă diagnostică și de cercetare care combină tehnicile histologice cu cele imunologice și biochimice cu scopul identificării unor componente tisulare specifice (antigeni proteici, diverși markeri sau receptori) printr-o reacție antigen-anticorp. Actual este folosită pe scară largă pentru diagnosticarea celulelor anormale sau care exprimă anormal diverși receptori, mai ales în neoplazii. Metoda poate fi însă folosită și pentru diverse diagnostice diferențiale, în studiul unor patologii benigne sau în cercetare medicală.

Știm în momentul de față, așa cum am descris în capitolul 1, că în etiopatogenia fibromului sau fibromatozei uterine difuze intervin o multitudine de factori ce acționează prin diverse mecanisme celulare. Toate aceste mecanisme, în care sunt implicați hormonii

sexuali, factori genetici, factori de creștere (Growth Factors), citokinele (CK), diverse componente ale matrixului extracelular (ECM), sunt interconectate, orice dezechilibru ducând la hiperproducție de ECM, proliferare celulară și supraviețuirea unor clone tumorale anormale.

În primele două studii am sesizat diferențe între cele două loturi de paciente în ceea ce privește miometrul dar mai ales din punct de vedere al aspectului histologic al endometrului cu consecințele complet diferite asupra fertilității. De aici a rezultat și necesitatea unei cercetări la un nivel mai profund pentru a încerca să înțelegem mecanismele intrinseci care determină aceste diferențe.

Leiomiomul este format din celule musculare netede transformate și o matrice extracelulară (ECM) abundentă, rezultată prin acumulare în special de colagen modificat și cantități diferite de glicozaminoglicani. În compoziția ECM mai intră: Fibronectina, Fibulina, Laminine, Metaloproteinaze (MMP) [263].

Miofibroblastele produc ECM ca răspuns la influența diferitelor citokine și a factorilor de creștere. Procesul poate fi reparator în condiții normale, însă, în cazul pierderii mecanismelor de reglare, apar proliferare celulară accentuată, sinteză de ECM în exces, angiogeneză, fenomene care duc la apariția tumorilor [243]. Aceste miofibroblaste, cu funcție de celule stem, determină apariția clonelor celulare anormale. Ele sunt prezente în leiomiom, așa cum am văzut în diverse studii detaliate în capitolul 1. Prea puține date am găsit însă în literatură legat de implicația lor în fibromatoza uterină difuză, așa că am dorit aprofundarea cercetării în această direcție.

Așa cum am arătat extensiv în capitolul 1, unii factori au un rol cu totul deosebit în etiopatogenia fibromului dar și în controlul unor funcții endometriale.

Potrivit multor cercetători, **TGF- β** (Transforming Growth Factor β) este considerat a fi printre cei mai importanți mediatori care intervin pe de o parte în formarea și proliferarea fibromului uterin și pe de altă parte, în cazul fibromului format, în infertilitate și metroragiile tipice din această patologie.

Deasemenea, a fost demonstrat experimental rolul mitogen al **bFGF** (basic Fibroblast Growth Factor), precum și rolul în controlul angiogenezei și în sinteza unor enzime (colagenaze sau activatorul plasminogenului) ce remodelează matrixul extracelular [186, 231]. FGF- β (sau bFGF) a fost primul factor de creștere purificat care s-a dovedit a avea rol angiogenic și de asemenea rol în proliferarea, migrarea și diferențierea celulelor endoteliale, a celulelor musculare netede și a fibroblastelor, folosind experimentele pe culturi celulare [232].

TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) este una din principalele citokine care acționează la nivelul miometrului. Controlează faza acută a răspunsului inflamator și este extrem de important în ciclul celular controlând creșterea celulară, diferențierea, apoptoza, adeziunea celulară și fagocitoza [240]. S-a demonstrat că TNF- α este un important reglator al expresiei unor gene, determinând proliferare celulară și că, în ciuda proprietăților antineoplazice, nivelurile ridicate de TNF α nu sunt întotdeauna capabile să distrugă toate celulele anormale și, paradoxal, pot provoca simptomatologie severă sau multiplicarea unor clone celulare anormale [241]. TNF α are un rol major și în controlul unor procese autocrine și paracrine esențiale pentru reproducere, inclusiv dezvoltarea gameților și a foliculilor, steroidogeneza, ciclicitatea uterină, diferențierea placentară, dezvoltarea embrionului și naștere [253]. Deci TNF α este o citokină cu roluri multiple, implicată în etiologia fibromatozei dar în egală măsură în infertilitate, în fenomene precum apoptoza trofoblastului, nidație sau receptivitatea endometrului.

Cercetări recente au arătat că **MMP** (metaloproteinazele) nu sunt doar niște proteaze cu rol în degradarea ECM ci au funcții complexe în migrarea celulelor, creșterea, diferențierea, apoptoza, precum și în angiogeneză și controlul răspunsurilor inflamatorii [279]. MMP2 și MMP9 au efect profibrotic și pot influența eliberarea sau activarea unor Growth factors sau citokine cum ar fi: EGF, VEGF, FGF, TGF β sau IFN α [280, 281]. MMP2 și MMP9 au efect mitogen indirect prin eliberarea prin proteoliza a FGF și TGF β de la nivelul ECM iar la nivelul endometrului pot induce apoptoză cu metroragie subsecventă [282].

Întrucât efectele în aval asupra endometrului în ceea ce privește sângerarea cronică și fertilitatea au fost diferite în cele două loturi, așa cum am arătat în capitolele 8 și 9, logic, am decis să analizăm o parte dintre cei mai importanți factori implicați în etiopatogenia leiomiomului și probabil, într-o oarecare măsură, și a fibromatozei difuze. Elementul de noutate absolută al studiului nostru constă tocmai în faptul că am analizat imunohistochimic distribuția unor factori și rolul lor în controlul unor funcții celulare endometriale dar și în procesul de fibromatoză, comparativ în loturile cu fibrom bine delimitat (A), fibromatoza difuză (B) și un lot martor, constituit din miometru normal. Astfel, în studiul nostru, am decis analizarea a doi Growth Factors (TGF β și bFGF), a unei citokine (TNF α) și a două metaloproteinaze foarte importante din compoziția matricei extracelulare (MMP2 și MMP9). În plus, prin studiul glicoproteinei membranare CD34 am cercetat microvascularizatia precum și distribuția celulelor stem miofibroblastice în cele 3

loturi (A, B și martor), cunoscut fiind rolul definitoriu pe care îl au aceste celule stem în etiopatogenia fibromului, acesta fiind un alt element de originalitate al cercetării noastre !

9.2. Material și metodă

Material:

Au fost selecționate aleatoriu din biobanca studiului 30 de blocuri tisulare incluse în parafină din lotul A de paciente, respectiv 30 de blocuri din lotul B. Din acestea s-au realizat multiple secțiuni fixate pe lame pentru analiza separată și comparativă a miometrului și respectiv endometrului. În plus, din lotul B, am extras 30 de probe de miometru cu aspect histopatologic normal, ce au constituit un lot folosit ca martor (M) în cercetarea imunohistochimică.

Obiectiv:

Pentru a aprofunda cercetarea și a determina rolul pe care îl au acești factori (TGF β , bFGF, TNF α , MMP2, MMP9 și CD34), am decis să analizăm distribuția și funcția lor, atât la nivelul miometrului cât și în endometru, în loturile noastre de studiu (A și B), comparativ cu lotul de control (M).

Metodă:

9.2.1. Protocolul de cercetare imunohistochimică:

Studiul imunohistochimic (IHC) a fost efectuat în cadrul centrului de excelență „Onco Team Diagnostic”, din București. S-au realizat secțiuni de 3 μ m obținute din blocurile tisulare înglobate în parafină și fixate în formalină 10% conform metodei IHC după o tehnică indirectă, bistadială, efectuată cu un sistem de detectare pe bază de polimeri (Ultra Vision Quanto Detection System-HRP DAB, Thermo Fischer Scientific, SUA). Secțiunile tisulare au fost întinse pe lame, acoperite cu poli-L-lizină, imersate de 3 ori în soluție de xilen și rehidratate apoi folosind o serie de diverse grade de alcool.

Demascarea antigenului a fost efectuată în cuptorul cu microunde. În fiecare secțiune, peroxidaza endogenă a fost blocată prin incubare de 10 min în peroxid de hidrogen, 3%. Secțiunile s-au reincubat ulterior cu anticorp primar specific, așa cum am notat în tabelul 9.2.1, timp de 30 de ore. Ultra Vision Quanto Detection System-HRP a fost apoi aplicat timp de 10 minute. În cele din urmă, secțiunile au fost incubate în 3'3-diaminobenzidină timp de 5 minute, contracolorate cu Hematoxilina Meyer și montate.

Lamele finale au fost examinate și fotografiate cu ajutorul unui Microscop Leica DM750, imaginile obținute fiind stocate într-o bază de date. Controalele negative au fost obținute prin înlocuirea anticorpului primar cu ser neimun. Pentru controlul pozitiv a fost folosită o secțiune de țesut uterin.

9.2.3 Analiza statistică s-a efectuat folosind programul SPSS-v26 și testele statistice descrise în subcapitolul 7.2.3. Rezultatele cercetării IHC au fost inițial introduse într-o bază de date Excel, separată de primele două studii (model - Anexa t).

Pentru a putea prelucra statistic rezultatele obținute, am folosit o codificare standardizată a interpretărilor IHC, pentru toate cele 360 de lame studiate, astfel:

- 0: colorație negativă
- 1: slab pozitiv în peretele vascular sau în rare miofibroblaste/ histiocite
- 2: slab pozitiv zonal
- 3: pozitiv zonal
- 4: pozitiv difuz/ intens pozitiv

Interpretarea statistică a distribuției markerilor s-a efectuat prin analiza separată, la nivelul endometrului, respectiv miometrului, iar rezultatele au arătat diferențe semnificative.

9.4. Rezultate, discuții și concluzii

9.4.1. Analizând distribuția celor 6 markeri la nivelul **miometrului** am observat că :

1. Distribuția **TGFβ** este net diferită în loturile A, B și M. Cu cât rezultatele au „virat” de la slab pozitiv (0) către intens sau difuz pozitiv (4) am constatat că procentele de TGFβ cresc în loturile A și B față de lotul M, ceea ce demonstrează o implicare clară în

etiopatogenia bolii a acestui factor de creștere. În plus, în categoriile 3 și 4 observăm procente semnificativ mai mari ale TGF β în lotul B față de lotul A (Fig. 9.3.6)! Acest lucru arată, fără echivoc, faptul că cele două loturi A și B sunt diferite și că implicația TGF β pare mai importantă în etiopatogenia cazurilor de fibromatoză uterină difuză (B) !

2. În cazul **bFGF** am obținut, la categoria 2 (slab pozitiv zonal), un procent mai mare în lotul B, în timp ce la categoria 3 (pozitiv zonal), procentul a fost net superior în lotul A, cu fibrom uterin (96,7%) ! În orice caz, la categoriile 3 și 4 se observă (ca și în cazul TGF β) procente mult mai mari în loturile A și B față de lotul martor (Fig. 9.3.11), această distribuție demonstrând implicarea evidentă a bFGF în procesele patologice de la nivelul miometrului, mai ales în cazul fibromului uterin bine delimitat (A).

3. **TNF α** este negativ (categoria 0) în aproape 50% din cazuri, la nivelul miometrului, în toate cele 3 loturi! Distribuția obținută a arătat procente ceva mai mari în lotul A - la categoria 1, respectiv în lotul B - la categoria 2. Totuși se remarcă procente mai mari în loturile A și B față de lotul M dar fără diferențe semnificative statistic (Fig. 9.3.15). Judecând după această distribuție a rezultat că, aparent, TNF α este mai discret implicat în procesele de fibromatoză la nivel miometrial față de TGF β și bFGF.

4. În cazul distribuției **MMP2**, la categoriile 3 și 4 am obținut procente mult mai mari în lotul B, față de lotul M. Am constatat colorații intense pozitive la nivelul histiocitelor din țesutul conjunctiv interstițial și fixare mult mai slabă la nivelul miofibroblastelor sau vaselor. În lotul A am constatat MMP2 negativ în procent extrem de mare (70%) în timp ce la categoriile 3 și 4 procentul a fost 0% (Fig. 9.3.19). Asta înseamnă că MMP2 nu este implicată în etiopatogenia fibromului uterin bine delimitat decât în foarte mica măsură în timp ce în fibromatoza difuză este larg distribuit mai ales la nivelul ECM și mai puțin în miocite și că, în consecință, este răspunzătoare de o parte din procesele celulare patologice de la nivelul miometrului.

5. Enzima **MMP9** este mai frecvent întâlnită în lotul A, pentru categoria 3 (pozitiv zonal), față de loturile B și M. La categoria 2 însă (slab pozitiv zonal), MMP9 este prezentă în procent mult mai mare în lotul B (Fig. 9.3.23). Deci, această enzimă, aparținând matrixului extracelular, este distribuită în ambele loturi cu patologie fibromatoasă (A și B). Totuși, la categoria 3, se observă prezența ei în procente mult mai mari în loturile A și B, în raport cu lotul martor, acest lucru demonstrând implicarea ei în patogenia bolii fibromatoase.

6. Pentru **CD34** am constatat o distribuție destul de egală, la categoriile 1 și 2, împărțită între loturile A și M. În schimb, la categoria 3 (pozitiv zonal sau pozitiv în vase) remarcăm procente de CD34 pozitiv mai mari în loturile A și B, față de lotul M. De asemenea, se observă colorații mult mai intense în lotul B (Fig. 9.3.26). Cu alte cuvinte CD34 este prezent mai ales în fibromatoza uterină difuză unde demonstrează o vascularizație difuză accentuată. Prezentă intens și la nivel interstițial, nu doar în peretele vascular, identifică, foarte probabil, o multitudine de miofibroblasti stem, distribuiți difuz, ceea ce este concordant cu micronodulii fibromatoși disperați în întregul miometru, constatați microscopic în lotul B.

Astfel am demonstrat implicarea tuturor acestor markeri în procesele patogenice prin comparația cu lotul martor. De asemenea, am constatat o distribuție inegală deci o implicare diferită a acestor factori în loturile noastre de studiu, A și B (Tabel 9.3.13).

TGFβ și MMP2 au fost mai prezente și mai active la nivelul miometrului în lotul B, în timp ce bFGF a avut expresie mai mare în lotul A. MMP9 și TNFα au avut expresie similară în cele două loturi. Microvascularizația, identificată cu antigenul membranal CD34, a fost mult mai pronunțată în miometrul corespunzător lotului B ! Toți markerii studiați au avut expresie mai mare în cele două loturi A și B, în raport cu lotul martor, M !

În mod evident de aici rezultă și că cele două entități studiate, fibromul bine delimitat și fibromatoza uterină difuză, nu sunt identice, câtă vreme nu au un comportament IHC și patogenetic identic!

9.4.2. Analizând distribuția celor 6 markeri la nivelul **endometrului** am observat că :

1. Pentru **TGFβ**, la categoria 0 (colorație negativă), am obținut un procent mare (43,3%) în lotul M. Practic în aproape jumătate din cazurile aparținând lotului martor nu există TGFβ în endometru! Am descoperit că TGFβ se pozitivează doar foarte slab la nivelul peretelui vascular. La categoriile 2 (slab pozitiv zonal) și mai ale 3 (pozitiv zonal) procentele de TGFβ au fost net mai mari în lotul B, față de lotul A și în special față de lotul M, unde acest factor de creștere a fost practic absent (Fig. 9.3.34)! Asta demonstrează clar o prezență intensă a TGFβ la nivelul endometrului în primul rând la pacientele cu fibromatoză uterină difuză unde, se pare, joacă un rol foarte important în procesele celulare patogenice. Această expresie foarte intensă a TGFβ la nivel endometrial în lotul B ne poate

explica decidualizarea incompletă și procentele mai mari de sarcină oprită în evoluție, constatate în studiul de la capitolul 8 și durata mai mare a metroragiilor probabil prin nivelul scăzut de PAI-1 și ATIII la nivelul endoteliului, așa cum am văzut în capitolul 7.

2. În cazul factorului de creștere **bFGF** am obținut, la categoriile 1 și 2, o distribuție destul de asemănătoare, în loturile B și M. La categoria 3 procentul de bFGF a fost mult mai mare în lotul A. În plus, la categoria 4 am constatat pozitivare intensă doar în cazurile aparținând lotului A, în timp ce în loturile B și M nu am avut deloc expresie (Fig. 9.3.38). De aici a rezultat că bFGF este intens exprimat și mult mai implicat în patogenie, la nivelul endometrului, în lotul A.

3. Pentru **TNF α** am observat un procent mare de pozitivare slabă (categoria 1) în lotul M. La categoriile 2 și 3, de pozitivare mai intensă, am obținut procente ale TNF α net superioare, semnificativ statistic, în lotul A (50%, respectiv 46,7%), față de loturile B și M. De altfel, în lotul B, se poate observa că TNF α este absent (categoria 0) în endometru într-un procent de 53,3% (Tabel 9.3.9 și Fig. 9.3.42)! Așadar, TNF α este aproape absent la nivelul endometrului, în lotul B, deci nu pare să fie răspunzător de procesele patologice endometriale din fibromatoza difuză. În schimb, în lotul A avem o pozitivare intensă în procente semnificativ mai mari. Asta înseamnă că TNF α este foarte prezent și foarte „activ” în endometru, în lotul cu fibrom uterin bine delimitat, această observație reprezentând o posibilă explicație a eșecului de implantare și a numărului crescut de avorturi spontane din lotul A!

4. **MMP2** are o distribuție foarte scăzută la nivelul endometrului, în categoria 0 încadrându-se cele mai mari procente în toate loturile de studiu: A (70%), B (86,7%) și respectiv M (80%). La categoria 1 procentul de MMP2 este mai mare în lotul 1, diferențele însă nefiind semnificative (Fig. 9.3.46). Rezultă că MMP 2 are o distribuție foarte scăzută și implicat un rol mărunț în procesele celulare patologice, la nivelul endometrului, în loturile A și B.

5. **MMP9** se distribuie în procente destul de asemănătoare la categoria 0 între cele 3 loturi de studiu. La categoria 1 observăm prezența MMP9 într-un procent mai mare în lotul M. La categoria 2, procentul este mai important în lotul B, iar la categoria 3 (pozitiv zonal) am obținut un procent mai mare pentru lotul A, diferențele nefiind însă semnificative statistic. Totuși la categoriile 2 și 3, procentele de MMP9 distribuite în loturile A și B sunt mult mai mari decât cele corespunzătoare lotului martor (Fig. 9.3.50). Asta înseamnă că avem o

expresie mult mai pronunțată a MMP9 în endometru, în loturile cu patologie fibromatoasă (A și B) față de lotul martor, acest fenomen demonstrând rolul patogenic al acestei enzime citosolice.

6. Pentru **CD34**, am obținut un procent mult mai mare, la categoria 1, în lotul B. La categoriile 2 și 3 procentele au fost net superioare în lotul A față de M și față de lotul B. La categoria 3, procentul de CD34 în lotul A a fost de 36,7% față de numai 3,3% în lotul B. De asemenea, în categoria 4 avem un procent de CD34 extrem de redus (3,3%) în lotul B (Fig. 9.3.54). Astfel, a rezultat că microvascularizația este mult mai bogată la nivelul endometrului în lotul A. Implicit am constatat, diferențele fiind semnificative statistic, un aspect cu vascularizație mult diminuată în lotul B, acest lucru reprezentând o posibilă explicație a tendinței la atrofie a endometrului în acest lot cu fibromatoză difuză.

Astfel, în ceea ce privește expresia la nivelul endometrului, am constatat o prezență mai mare a bFGF și a TNF α în lotul A, în timp ce în lotul B, a fost mai exprimat TGF β . MMP2 și MMP9 au avut expresie scăzută la nivelul endometrului, în ambele loturi iar CD34 a arătat de data aceasta o vascularizație mai scăzută în lotul B (Tabel 9.3.14).

10. Concluzii generale și contribuții personale

10.1. Concluzii generale

În primul rând am obținut o incidență foarte mare a diagnosticului de fibrom uterin, concordantă cu datele din literatură, în jur de 30% din totalul diagnosticelor ginecologice, grupa de vârstă cu incidență maximă fiind între 40 și 49 de ani. Pe de altă parte, am constatat, în prima parte a cercetării noastre, că abordarea a fost preponderent chirurgicală, în clinică, un procent foarte mare din pacientele cu fibrom ajungând la histerectomie, între 30% și 41%, în fiecare an.

Pentru lotul A am obținut următoarele rezultate semnificative în cadrul analizei statistice: Volumul uterin a influențat durerea cronică, cu cât a crescut volumul cu atât am întâlnit un număr mai mare de paciente cu durere iar aceasta a avut intensitate mai mare. Volumul a mai influențat semnificativ și dispareunia. Diametrul maxim al fibromului

intramural s-a corelat semnificativ cu durerea, aceasta fiind mai mare cu cât diametrul a crescut iar diametrul maxim al fibromului submucos a fost corelat, așa cum era de așteptat, cu metroragia. Surprinzător, volumul uterin precum și numărul de fibroame intramurale sau submucoase nu s-au corelat statistic cu metroragia. Diametrul maxim al fibromului intramural nu a influențat, nici el, metroragia.

Pentru lotul B volumul uterin a fost corelat statistic cu durerea cronică. Volumul uterin a influențat, de asemenea, incontinența urinară a pacientelor din acest lot.

În cadrul comparațiilor din primul studiu am obținut o vârstă medie a pacientelor mai mare în lotul B, o tendință la obezitate și simptomatologie (dismenoree, plenitudine, dispareunie) mai pregnantă în lotul A.

Diferențele din punct de vedere histopatologic au fost evidente în ceea ce privește aspectul macroscopic (dimensiuni și volum uterin mult mai mari în lotul A, precum și prezența macronodulilor) și mult mai discrete, fără semnificație statistică, din punct de vedere microscopic în ceea ce privește aspectul miometrial. Totuși nu putem să nu remarcăm faptul că cele două loturi au fost diferite în ceea ce privește asocierea cu adenomioza, mai frecventă în lotul A și cu endometrul anormal, mult mai frecvent întâlnit în lotul B, 80,5% față de 36,3% în lotul A !

Mai mult, o altă observație rezultată din cercetarea noastră, ni s-a părut de o importanță covârșitoare: deși procentul pacientelor cu metroragii a fost aproape identic (74,66% în lotul A și 71,66% în lotul B) diferența în ceea ce privește anemia subsecventă a fost semnificativă (40,66% din paciente în lotul A, respectiv 77,77% din paciente în lotul B), cu un procent aproape dublu în lotul B, fenomen explicat prin sângerarea mai îndelungată în cazul pacientelor cu fibromatoză uterină difuză.

Aceste diferențe obținute în cadrul cercetării privind asocierea cu adenomioza, mai frecventă în lotul A, anemia mai importantă în lotul B dar mai ales diferența impresionantă în ceea ce privește aspectul histologic al endometrului, cu un procent foarte mare de endometru anormal în lotul B, ne-au întărit crezul că cele două entități patologice, fibromul uterin bine delimitat și fibromatoza uterină difuză, au mecanisme etiopatogenice diferite și foarte probabil mecanisme de semnalizare și control al funcțiilor celulare diferite și implicit, influențe diferite asupra endometrului subiacent !

Fibromatoza difuză nu este adenomioză! Am clarificat acest lucru în cadrul cercetării histopatologice. Simptomatologia poate fi asemănătoare (durere, meno-metroragii). Macroscopic se confundă uneori, ambele prezentând perete uterin îngroșat difuz, dar aspectele microscopice sunt net diferite. Fibromatoza este caracterizată de micronoduli dispași în întregul miometru, formați din celule musculare netede modificate, în timp ce adenomioza înseamnă prezența de țesut epitelial cilindric și glande endometriale la nivelul miometrului.

Rezultatele obținute în studiul 2 al cercetării noastre ne-au arătat o tendință a pacientelor din lotul B mai degrabă către o sterilitate primară (10,5% din paciente). Astfel, la aceste paciente s-a observat o rată mai mare de sarcini oprite în evoluție față de pacientele din lotul A unde a fost mai mare rata de avorturi spontane. Pacientele cu avort recurent, cu mai mult de 3 sarcini pierdute prin avort spontan, au fost în procent mai mare în lotul A (5%) față de lotul B (3,33%). Probabil rata mai mare de avorturi spontane în lotul A a fost datorată efectelor mecanice (deformare a peretelui și presiune) exercitate de nodulii fibromatoși precum și peristalticii accentuate a musculaturii uterine.

Numărul de fibroame submucoase dar și diametrul fibromului submucos au influențat semnificativ fertilitatea în ceea ce privește anii de sterilitate și numărul de sarcini oprite în evoluție, în lotul A.

Interesant și oarecum surprinzător, am constatat că nici numărul de fibroame submucoase, nici diametrul maxim al fibromului submucos nu s-au corelat semnificativ statistic cu aspectul endometrului, în lotul A !

A rezultat că fibromul submucos influențează puternic fertilitatea, în lotul A, dar se pare că nu neapărat prin afectarea calității endometrului, spre deosebire de fibromatoza difuză, care acționează tocmai prin această alterare a endometrului !

În schimb, în lotul B aspectul endometrului a influențat semnificativ numărul de sarcini oprite în evoluție. În acest lot, cu fibromatoză uterină difuză, am constatat procente mult mai mari de paciente cu sterilitate primară și cu sarcină oprită în evoluție, explicate printr-un endometru anormal, nefavorabil nidației și menținerii unei sarcini normale.

Procentul net superior în ceea ce privește endometru anormal în lotul B precum și faptul că la analiza statistică am obținut corelație pozitivă între aspectul endometrului și sarcina oprită în evoluție doar în cadrul lotului B, ne-au demonstrat fără echivoc că

influențele fibromatozei asupra endometrului, cu implicații iată în aspectul histologic dar și cu consecințe importante în ceea ce privește fertilitatea sunt complet diferite în cele două loturi!

Afectarea fluxului microvascular, prin activarea anormală a citokinelor și chemokinelor locale, determină atrofie endometrială, scăderea calității endometrului și alterarea sintezei unor factori importanți în nidație.

În cadrul cercetării aspectului histopatologic, în cazul miometrului am întâlnit diferențe macroscopice și mai puțin semnificative din punct de vedere microscopic. Invers, în cazul studiului endometrului de la capitolul 8, am observat diferențe majore din punct de vedere microscopic și mai puține ca aspect macroscopic.

Însumând cazurile de endometrită cronică și atrofică, diferența a fost și mai mare, 57,22% din pacientele din lotul B, față de 28% din pacientele din lotul A, prezentând aceste două tipuri de diagnostice histopatologice (tabel 8.3.1).

Efectul real al fibroamelor asupra fertilității nu este nici complet cunoscut, nici înțeles pe deplin. Fibroamele submucoase de orice dimensiune și fibroamele intramurale de peste 4 cm, conform cu majoritatea studiilor, afectează fertilitatea. Prezența mioamelor subseroase are un efect mic sau foarte redus asupra fertilității. Miomectomia pare să aibă un efect în îmbunătățirea fertilității în anumite cazuri. Rezultatele chirurgiei deschise sau endoscopice sunt, în general, similare, tratamentul endoscopic este abordarea recomandată în prezent, datorită avantajelor sale în ceea ce privește invazivitatea mai redusă și datorită recuperării rapide a pacientelor, postoperator.

Am demonstrat prin **studiul IHC** implicarea tuturor markerilor studiați în procesele patogenice prin comparația cu lotul martor. De asemenea, am constatat o distribuție inegală deci o implicare diferită a acestor factori în loturile noastre de studiu, A și B.

Astfel, TGFβ și MMP2 au fost mai prezente și mai active la nivelul **miometrului** în lotul B, în timp ce bFGF a avut expresie mai mare în lotul A. MMP9 și TNFα au avut expresie similară în cele două loturi. Microvascularizația, identificată cu antigenul membranal CD34, a fost mult mai pronunțată în miometrul corespunzător lotului B ! Cu alte cuvinte CD34 este prezent mai ales în fibromatoza uterină difuză unde demonstrează o vascularizație difuză accentuată.

CD34 a fost intens pozitiv și la nivel interstițial, nu doar în peretele vascular ! Astfel, am identificat, foarte probabil, o multitudine de miofibroblasti stem, distribuiți difuz, ceea ce este concordant cu prezența sau apariția în continuare a micronodurilor fibromatoși dispași în întregul miometru ! Practic, acest rezultat pe care l-am obținut în studiul IHC sugerează etiologia fibromatozei difuze și corespunde cu teoria lui **Linder și Gartler** [69] și anume cu ideea apariției unor progenitori ai fibromatozei difuze probabil prin metaplazia celulelor stem mezenchimale sub influența unor factori care țin fie de micromediul celular, fie de semnalizarea intercelulară sau de anumiți factori externi.

Toți markerii studiați, la nivel miometrial, au avut expresie mai mare în cele două loturi A și B, în raport cu lotul martor (M) iar analiza statistică a arătat că 4 din 6 markeri studiați au avut distribuție diferită în cele două loturi, A și B !!

În ceea ce privește expresia la nivelul **endometrului**, am constatat o prezență mai mare a bFGF și a TNF α în lotul A, în timp ce în lotul B, a fost mai exprimat TGF β . Această expresie foarte intensă a TGF β la nivel endometrial în lotul B ne poate explica decidualizarea incompletă și procentele mai mari de sarcină oprită în evoluție, constatate în studiul de la capitolul 8 și durata mai mare a metroragiilor probabil prin nivelul scăzut de PAI-1 și ATIII la nivelul endoteliului, așa cum am văzut în capitolul 7.

MMP2 și MMP9 au avut expresie scăzută la nivelul endometrului în ambele loturi iar CD34 a arătat, de data aceasta, o vascularizație mai scăzută în lotul B. Astfel, a rezultat că microvascularizația este mult mai bogată la nivelul endometrului în lotul A. Implicit am dedus, diferențele fiind semnificative statistic, un aspect cu vascularizație mult diminuată în lotul B, acest lucru reprezentând o posibilă explicație a tendinței la atrofie a endometrului în acest lot cu fibromatoză difuză.

TNF α a fost aproape absent la nivelul endometrului, în lotul B, deci nu pare să fie răspunzător de procesele patologice endometriale din fibromatoza difuză. În schimb, în lotul A avem o pozitivare intensă, în procente semnificativ mai mari. Asta înseamnă că TNF α este foarte prezent și foarte „activ” în endometru, în lotul cu fibrom uterin bine delimitat, această observație reprezentând o posibilă explicație a eșecului de implantare și a numărului crescut de avorturi spontane din lotul A!

Și la nivelul endometrului calculul statistic ne-a arătat o distribuție diferită în loturile A și B a 4 din cei 6 markeri studiați !

Iată că, din acest al treilea studiu, a rezultat că cele două entități, fibromul bine delimitat și fibromatoza uterină difuză, nu sunt identice, câtă vreme nu au un comportament IHC și patogenie identice!

Mai mult, prin analiza suprapusă a datelor privind distribuția markerilor studiați în miometru respectiv în endometru (tabelul 9.3.15), am extras câteva **deosebiri** majore între loturile cu fibrom uterin bine delimitat (A) și fibromatoza difuză (B):

În lotul **A**:

- bFGF intens pozitiv în miometru și endometru
- TNF α intens pozitiv în endometru
- CD34 intens pozitiv în endometru (microvascularizația)

În lotul **B**:

- TGF β intens pozitiv în miometru și endometru
- MMP2 intens pozitiv în miometru
- CD34 intens pozitiv în miometru (microvascularizația)

Pe baza rezultatelor studiului IHC am reușit să trasăm mai clar asemănările (tabel 10.1.1) și diferențele (tabel 10.1.2) dintre entitățile cercetate și să stabilim așa cum ne propusesem, încă de la început, **un protocol de diagnostic** pentru fibromatoza uterină difuză (tabel 10.1.3).

Tabel 10.1.1: Asemănări între loturile A și B.

ASEMĂNĂRI	LOT A / LOT B
Vârsta cu incidența maximă	40-49 ani
Simptomatologie	Metroragii - procente asemănătoare: 74% și 71%
Factori de risc	Timp scurs de la ultima naștere Antecedente heredo-colaterale Nuliparitatea și HTA nu s-au dovedit factori de risc !
Factori protectori	Paritatea de grad înalt
Aspect microscopic	Celule tumorale asemănătoare cu f. musculare netede normale dar cu densitate celulară mai mare; citoplasma eozinofilă, Nc ovalari – alungiți; mitoze rare; fără atipii
IHC miometru	Distribuția TNF α Distribuția MMP9
IHC endometru	Distribuția MMP2 Distribuția MMP9

Tabel 10.1.2: Deosebiri între loturile A și B.

DEOSEBIRI	LOT A	LOT B
Semne/ Simptome	Dismenoree, dispareunie, plenitudine	Incontinența urinară
Patologii asociate	Obezitate	Anemie, dislipidemie, DZ, tumori ovariene
Fact. de risc semnificativi	Menarha precoce, COC	Vârsta la prima sarcină
Aspect macroscopic	Volum uterin mare, macronoduli	Volum mic, fără macronoduli
Miometrul - aspect microscopic	Celule musculare alungite dispuse în vârtejuri; sclero-hialinizare; subtipuri cu Hp special/atipice	Micronoduli dispași, formați din cel. musculare netede dar mai scurte; rar hialinizare; foarte rar aspecte atipice
Calitatea endometrului	Inflamație acută/hemoragică; aspect proliferativ/ polipoid	Inflamație cronică/ atrofie
Fertilitate	Sterilitate secundară; rată mare de avort spontan/ avort recurent	Sterilitate primară; rată mare de sarcini oprite în evoluție
IHC miometru	-bFGF intens pozitiv -CD34 (micro-vasc.) mai scăzut	-TGF β intens pozitiv; -MMP2 intens pozitiv; -CD34 (micro-vasc.) intens pozitiv
IHC endometru	-bFGF intens pozitiv; -TNF α intens pozitiv; -CD34 (micro-vasc.) intens pozitiv	TGF β intens pozitiv CD34 (micro-vasc.) scăzut

Tabel 10.1.3: Protocol pentru diagnosticul fibromatozei uterine difuze.

PROTOCOL DE DIAGNOSTIC	
Semne/ simptome	Meno-metroragii persistente (dificil de controlat medicamentos); Anemie; Incontinență urinară; La femei mai tinere: sterilitate primară sau rată mare de sarcini oprite în evoluție.
Clinic	Uter dur, rigid uniform, dimensiuni ușor mărite, suprafață regulată, nedureros de obicei.
Imagistic	Uter cu dimensiuni ușor crescute, contur regulat, fără macronoduli; Miometru neomogen cu imagini ecogene punctiforme - difuz distribuite; Vascularizație discret accentuată difuz - în mod Doppler.
Biopsie endometru	HP: endometru cu inflamație cronică, frecvent atrofic. IHC: TGFβ intens pozitiv.
Biopsie miometru	HP: micronoduli dispași în întregul miometru, formați din celule musculare netede modificate. IHC:TGFβ intens pozitiv; MMP2 pozitiv în matrixul extracelular; CD34 intens pozitiv în vase și în interstițiu.
Diagnostic	FIBROMATOZĂ UTERINĂ DIFUZĂ !
Management specific !	

De asemenea, am stabilit **două protocoale de management terapeutic** nuanțate pentru fibromul uterin bine delimitat, respectiv fibromatoza uterină difuză (Fig. 10.1.1 și Fig. 10.1.2). Dacă în primul caz intervențiile conservatoare sau minim invazive ocupă un rol extrem de important și uneori rezolvă patologia, îmbunătățind foarte mult și fertilitatea, în cazul fibromatozei uterine difuze, nefiind posibilă extirparea micronodulilor dispași în întregul miometru, tratamentul medicamentos ar reprezenta o soluție. Analogii de GnRH au fost folosiți în diverse trialuri, cu oarecare succes, efectele secundare limitează însă administrarea pe termen lung. S-au mai tentat SERM și SPRM dar sunt necesare în continuare studii suplimentare care să demonstreze eficacitatea și siguranța.

Figura 10.1.1: Protocol management terapeutic pentru fibromul uterin.

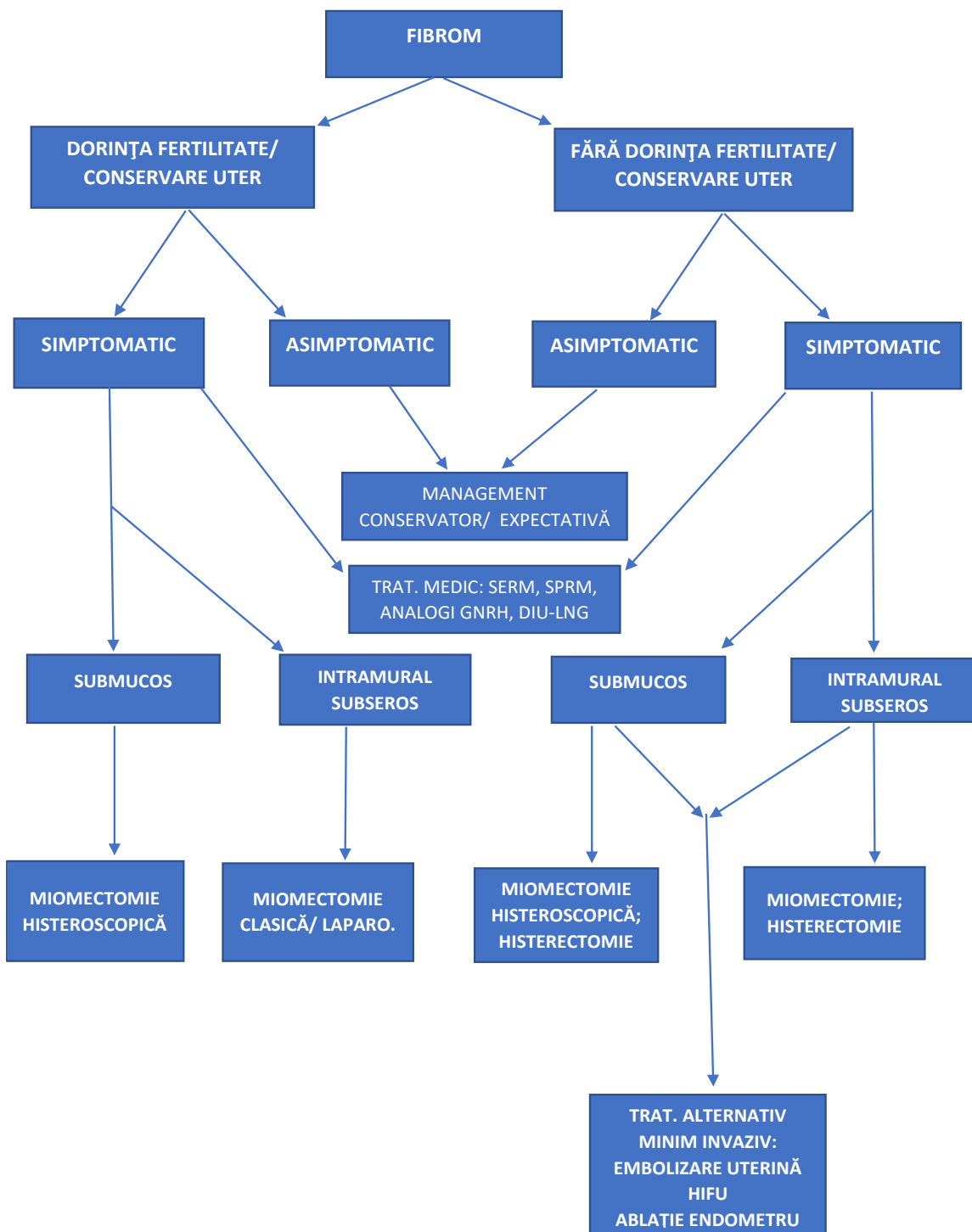
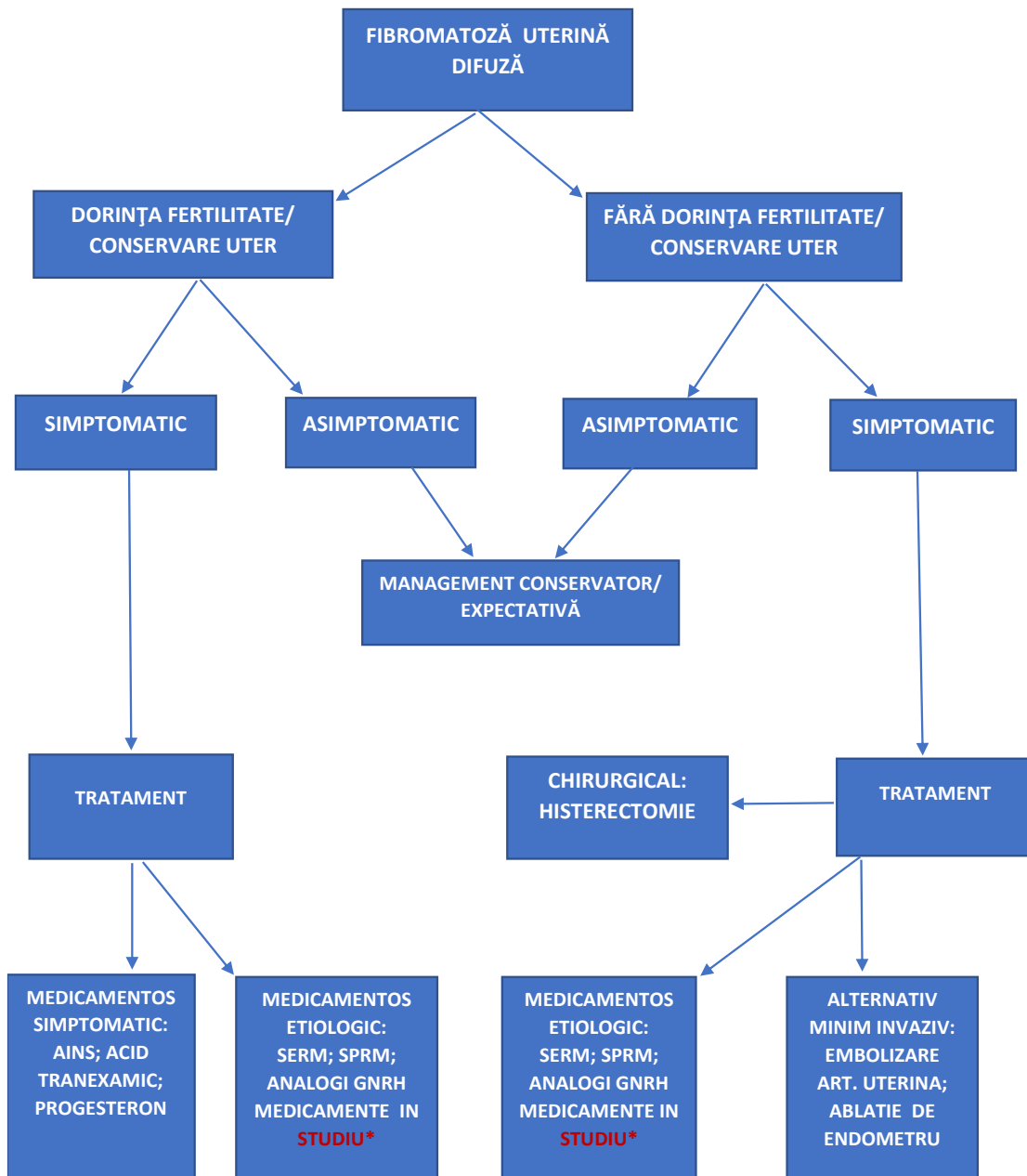


Figura 10.1.2: Protocol management terapeutic pentru fibromatoza uterină.



*Medicamente aflate **deja în studiu**: anti VEGF; blocantul selectiv EGF-R (AG1478), inhibitorul EGF-R (TKS050) .

Propunerea noastră : Medicament anti TGFβ; anti bFGF; anti TNFα, anti MMP2 !!

Datorită implicării demonstrate în studiul nostru a TGF β , bFGF, TNF α și chiar a MMP2 în patogenia fibromatoasă, atât la nivelul miometrului cât și la nivelul endometrului, este evident că un medicament care să intercepteze acești factori ar controla etiologic nu doar simptomatic boala și ar îmbunătăți mult, în opinia noastră, calitatea endometrului și implicit fertilitatea pacientelor noastre. Aceasta este și direcția de cercetare pe care ne-o propunem în continuare, conștienți fiind de importanța unui astfel de tratament, mai ales pentru pacientele tinere care își doresc păstrarea fertilității sau a uterului.

10.2. Contribuții personale

- Am caracterizat fibromatoza uterină difuză din punct de vedere clinic, histopatologic și imunohistochimic, foarte puține articole există pe această temă !
Încurajăm folosirea acestui termen în buletinele HP, separat de diagnosticul de fibrom uterin bine delimitat !
- Am exemplificat tipuri speciale histopatologice de fibrom uterin, stabilind criterii de diagnostic diferențial.
- Am demonstrat că fibromul uterin bine delimitat este diferit de fibromatoza uterină difuză - clinic, histopatologic și IHC !
- Am constatat aspecte histologice ale endometrului net diferite în cele două entități și de aici și necesitatea unei abordări terapeutice diferite sau nuanțate !
- Am demonstrat implicațiile diferite pe care le au cele două patologii asupra endometrului și implicit asupra fertilității !
- Am cercetat IHC separat la nivelul endometrului și miometrului, în cele două categorii de boală fibromatoasă factori implicați în etiologie și controlul celular.
- Am stabilit corelații și concordanțe între aspectele histopatologice, cele IHC și parametrii de fertilitate.
- Am stabilit un Protocol de diagnostic pentru fibromatoza uterină difuză !
- Propunem câte un Protocol de management al patologiei fibromatoase în cele două subtipuri cercetate !

Considerăm că cercetarea doctorală și-a îndeplinit obiectivele reușind să caracterizeze într-o manieră comparativă cele două entități, fibromul uterin bine delimitat respectiv fibromatoza uterină difuză.

În primele două studii am demonstrat diferențe între cele două loturi de paciente în ceea ce privește miometrul dar mai ales din punct de vedere al aspectului histologic al endometrului. Întrucât efectele în aval asupra endometrului în ceea ce privește sângerarea cronică și fertilitatea au fost diferite în cele două loturi, am decis să analizăm, în al treilea studiu, o parte dintre cei mai importanți factori implicați în etiopatogenia procesului de fibromatoză.

Elementul de noutate absolută al studiului nostru constă tocmai în faptul că am analizat imunohistochimic distribuția unor factori și rolul lor în controlul unor funcții celulare miometriale și respectiv endometriale, comparativ în loturile cu fibrom bine delimitat (A), fibromatoza difuză (B) și un lot martor constituit din miometru normal.

În plus, prin studiul glicoproteinei membranare CD34 am cercetat microvascularizația precum și distribuția celulelor stem miofibroblastice. În lotul B, CD34 a fost intens pozitiv și la nivel interstițial, nu doar în peretele vascular ! Astfel, am identificat, foarte probabil, o multitudine de miofibroblasti stem, distribuiți difuz, ceea ce este concordant cu prezența micronodulilor fibromatoși disperați în întregul miometru !

Practic, acest rezultat pe care l-am obținut în studiul IHC sugerează etiologia fibromatozei difuze și corespunde cu teoria apariției unor progenitori ai fibromatozei difuze probabil prin metaplazia celulelor stem mezenchimale sub influența unor factori care țin fie de micro-mediul celular, fie de semnalizarea intercelulară sau de anumiți factori externi, acesta fiind un alt element de originalitate al cercetării noastre !

Deschidem astfel un foarte important drum în cercetare – cu necesitatea continuării studiului în vederea descoperirii unui tratament care să vizeze factorii de creștere (TGFβ, bFGF), anumite citokine (TNFα) sau metaloproteinaze (MMP2) implicate în patologia fibromatoasă !

Bibliografie selectivă:

Arthur H. Curtis. The Etiology of Fibromyoma of the Uterus. *The Journal of Infectious Disease*, Vol.19, Issue 5, November 1916, Pages 712-717, <http://doi.org/10.1093/infdis/19.5.712>.

Alexander Lipschotz and Louis Vargas Jr. Structure and Origin of Uterine and Extragenital Fibroids Induced Experimentally in the Guinea Pig by Prolonged Administration of Estrogens. *Cancer Res.* 1941.1:236-249. Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on May 18, 2020. American Association for Cancer.

Allison C Schier, Dylan J Taatjes. Structure and Mechanism of the RNA Polymerase II Transcription Machinery. *Genes Dev* 2020 Apr 1;34 (7-8): 465-488. doi: 10.1101/gad.335679.119.

Aymara Mas, Irene Cervelló, Ana Fernández-Álvarez, Amparo Faus, Ana Díaz, Octavio Burgués, Marta Casado, Carlos Simón. Overexpression of the truncated form of High Mobility Group A proteins (HMGA2) in human myometrial cells induces leiomyoma-like tissue formation . *Molecular Human Reproduction*, Volume 21, Issue 4, April 2015, Pages 330–338, doi.org/10.1093/molehr/gau114.

Aharoni A, Reiter A, Golan D, Paltiely Y, Sharf M. Patterns of growth of uterine leiomyomas during pregnancy. A prospective longitudinal study. *Br J Obstet Gynaecol.* 1988 May; 95(5):510-3. [PubMed] [Ref list].

Ambros V (September 2004). "The functions of animal microRNAs". *Nature.* 431 (7006): 350–5. Bibcode:2004 Natur.431..350A. doi:10.1038/nature02871. PMID 15372042. S2CID 205210153.

Baird DD, et al. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 188(1):100–107. [PubMed: 12548202].

Baird DD, Travlos G, Wilson R, Dunson DB, Hill MC, D'Aloisio AA, London SJ, Schectman JM. Uterine leiomyomata in relation to insulin-like growth factor-I, insulin, and diabetes. *Epidemiology.* 2009 Jul;20(4):604-10. doi: 10.1097/EDE.0b013e31819d8d3f.

Bernstein L, et al. Estrogen and sex hormone-binding globulin levels in nulliparous and parous women. *J Natl Cancer Inst.* 1985; 74(4):741–745. [PubMed: 3857369].

Brosens I. A., Lunenfeld B., Donnez J., Pathogenesis and medical management of uterine fibroids, Parthenon Publishing Group Inc.1999. Section I, pp 3-16.

Busque L, Zhu J, Dehart D, Griffith B, Willman C, Carroll R, Black PM, Gilliland DG. An expression based clonality assay at the human androgen receptor locus (HUMARA) on chromosome X. *Nucleic Acids . Res* 1994;22:697–698.

Bhattacharya N , Banerjee AK , Sengupta J . Ossification of leiomyoma. *Journal of the Indian Medical Association*, 01 Mar 1998, 96(3):99. PMID: 9828561.

Clark MK, Sowers MF, Levy BT, et al. Magnitude and variability of sequential estradiol and progesterone concentrations in women using depot medroxyprogesterone acetate for contraception. *Fertil Steril.* 2001;75:871-7. PMID:11334896. DOI:10.1016/s0015-0282(01)01748-4.

Chiaffarino F, Parazzini F, La Vecchia C, Chatenoud L, Di Cintio E, Marsico S. 1999. Diet and uterine myomas. *Obstet Gynecol* 94:395–398.

Cui T, Leng F. Specific recognition of AT-rich DNA sequences by the mammalian high mobility group protein AT-hook 2: a SELEX study. *Biochemistry*. 2007 Nov 13; 46(45):13059-66. PMID: 17956125. DOI: 10.1021/bi701269s.

1Calabrese G, et al: Chromosome abnormalities in breast fibroadenomas. *Genes Chromosomes Cancer* 3:202-204, 1991.

Ciarmela P., Islam M.S., Reis F.M., Gray P.C., Bloise E., Petraglia F., Vale W., Castellucci M. Growth factors and myometrium: Biological effects in uterine fibroid and possible clinical implications. *Hum. Reprod. Update*. 2011; 17:772–790. doi: 10.1093/humupd/dmr031. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].

Ciebiera M, Włodarczyk M, Wrzosek M, et al. Role of Transforming Growth Factor β in Uterine Fibroid Biology. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(11):2435. Published 2017 Nov 17. doi:10.3390/ijms18112435.

F.D. Călin, C. A. Ionescu, M.C.T. Dimitriu, A.M. Ciobanu, C.D. Badiu, A. Neacșu, B. Socea, D. Hudiță. „The impact of uterine fibromatosis on the endometrium and fertility” - *Jurnal of Surgical Sciences*, vol7, Nr 2, pag 45-51, iunie, 2020. ISSN: 2360-3038. <https://doi.org/10.33695/jss.v7i2.350>.

Călin D., Haradja H., Pacu I., Brătîla E., Gheorghiu D., Rahimian H., Ionescu C. „Laparoscopic myomectomy in infertility treatment”. *ARS Medica Tomitana*, vol.20, no.3, 2015, pp.139-143. <https://doi.org/10.2478/arism-2014-0025>

Călin D., Dimitriu M., Ciobanu A.M., Vlădescu T., Ionescu C., Hudită D. „Uterine fibroid and diffuse uterine fibromatosis - Two different entities - A prospective study”. *Archives of the Balkan Medical Union*. vol. 51, no. 1, 2016. pp. 12-17.

Ciavattini, A., Di Giuseppe, J., Stortoni, P., Montik, N., Giannubilo, S. R., Litta, P., Islam, M. S., Tranquilli, A. L., Reis, F. M., & Ciarmela, P. (2013). Uterine fibroids: pathogenesis and interactions with endometrium and endomyometrial junction. *Obstetrics and gynecology international*, 2013, 173184. <https://doi.org/10.1155/2013/173184>.

Dorgan JF, et al. Relationships of age and reproductive characteristics with plasma estrogen and androgens in premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1995; 4(4):381–386. [PubMed: 7655334].

Digna. R. Velez Edwards, M. Wellons, K. Hartmann, T. L. Edwards. The role of type 2 Diabetes in modifying the risk for fibroids. P 145 Tuesday, October 20, 2015.

Dominique Nadine Markowski, Sabine Bartnitzke, Thomas Löning, Norbert Drieschner, Burkhard Maria Helmke, Jörn Bullerdiek. MED12 mutations in uterine fibroids—their relationship to cytogenetic subgroups. *Cancer Genetics*. 05 January 2012. <https://doi.org/10.1002/ijc.27424>.

Deutscher E, Hung-Chang Yao H. Essential roles of mesenchyme-derived beta-catenin in mouse Müllerian duct morphogenesis. *Dev Biol* 2007; 307: 227–36.142. Dal Cin P, Moerman P, Deprest J, Brosens I, Van den Berghe H. A new cytogenetic subgroup of uterine leiomyoma is characterized by a deletion of the long arm of chromosome 3. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995; 13: 219-220.

Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med.* 2009 Sep;27(5):351-7. doi: 10.1055/s-0029-1237423. Epub 2009 Aug 26. PMID: 19711245; PMCID: PMC2791696.

Elizabeth Bertsch, Wenan Qiang, Qing Zhang, Margarita Espona-Fiedler, Stacy Druschitz, Yu Liu, Khush Mittal, Beihua Kong, Takeshi Kurita, Jian-Jun Wei. MED12 and HMGA2 Mutations: Two Independent Genetic Events in Uterine Leiomyoma and Leiomyosarcoma. *Mod Pathol.* 2014 Aug;27(8):1144-53. doi: 10.1038/modpathol.2013.243. Epub 2014 Jan 3. PMID: 2439022.

Ellmann S, Sticht H, Thiel F, Beckmann MW, Strick R, Strissel PL. Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(15): 2405-2426.

Levin ER. Membrane oestrogen receptor alpha signalling to cell functions. *J Physiol.* 2009;587(pt 21):5019-5023.

Eiletz J, Genz T, Pollow K. 1980. Sex steroid levels in serum, myometrium, and fibromyomata in correlation with cytoplasmic receptors and 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in different age groups and phases of the menstrual cycle. *Arch Gynecol.* 229:13–20.

Florence E. Willey, M.D. Some Notes on the Histology of the Smaller Fibromyomata. "Changes in Fibromatous Uteri," *Brit. Gyn. Journ., Lond.,* 1902-3, xviii, p. 270. [https://journals.sagepub.com / doi/pdf/10.1177/003591570900200828](https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/003591570900200828).

Faerstein E, Szklo M, Rosenshein N. 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.* 2001; 153(1):1–10. [PubMed: 11159139].

Fukuhara K, Kariya M, Kita M, Shime H, Kanamori T, Kosaka C, Orii A, Fujita J, Fujii S. Secreted frizzled related protein 1 is overexpressed in uterine leiomyomas, associated with a high estrogenic environment and unrelated to proliferative activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002. Apr;87(4):1729-36. PMID:11932307. DOI:10.1210/jcem.87.4.8375.

Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997;18:4–25. doi:10.1210/er.18.1.4. [PubMed] [Google Scholar].

Kjerulff KH, et al. Uterine leiomyomas: racial differences in severity, symptoms, and age at diagnosis. *J Reprod Med.* 1996; 41(7):483–490. [PubMed: 8829060].

Kurman RJ. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. New York: Springer, 2002.p 148-156.

Konishi I, Fujii S., Okamura H., Mori T. Development of smooth muscle in the human fetal uterus: an ultrastructural study. *J. Anat.* (1984), 139, 2, pp. 239-252. PMCID: PMC1164372. PMID: 6490516.

Kati Kämpjärvi, Min Ju Park, Miika Mehine, Nam Hee Kim, Alison D Clark, Ralf Bützow, Tom Böhling, Jan Böhm, Jukka-Pekka Mecklin, Heikki Järvinen, Ian P M Tomlinson, Zephne M van der Spuy, Jari Sjöberg, Thomas G Boyer, Pia Vahteristo. Mutations in Exon 1 Highlight the Role of MED12 in Uterine Leiomyomas. *Hum Mutat.* 2014 Sep; 35(9): 1136-41. doi: 10.1002/ humu. 22612. Epub 2014 Jul 21. PMID: 24980722.

Gordon P. Flake, Janet Andersen and Darlene Dixon. Etiology and Pathogenesis of uterine leiomyomas: A review. Comparative Pathobiology Group, Laboratory of Experimental Pathology, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina, USA; Environmental Health Perspectives . Volume 111. Number 8. June 2003.

Gargett CE. Uterine stem cells: what is the evidence. Hum Reprod Update. 2007 Jan-Feb; 13(1): 87-101. Epub 2006 Sep 7. PMID:16960017. DOI: 10.1093/humupd/dml045.

Greaves M & Maley CC. Clonal evolution in cancer. Nature. 2012. 481 306–313. doi:10.1038/nature10762.

Hashimoto K., Azuma C., Kamiura S., Kimura T., Nobunaga T., Kanai T., Sawada M., Noguchi S., Saji F., Clonal Determination of Uterine Leiomyomas by Analyzing Differential Inactivation of the X-Chromosome-Linked Phosphoglycerokinase Gene. Gynecol Obstet Invest 1995; 40:204–208. <https://doi.org/10.1159/000292336>.

He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. Stem Cells. 2007 Jan;25(1):69-77. Epub 2006 Sep 14. PMID:16973831. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0335.

Heidet L, Cai Y, Sado Y, et al. Diffuse leiomyomatosis associated with X-linked Alport syndrome: extracellular matrix study using immunohistochemistry and in situ hybridization. Lab Invest. 1997;76(2):233-243.

Ishiai M, et al: Isolation of human and fission yeast homologues of the budding yeast origin recognition complex subunit ORC5: Human homologue (ORC5L) maps to 7q22. Genomics 46:294-298, 1997.

Ishikawa H, Ishi K, Serna VA, et al. Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. Endocrinology 2010;151:2433e42.

Islam M.S., Ciavattini A., Petraglia F., Castellucci M., Ciarmela P. Extracellular matrix in uterine leiomyoma pathogenesis: A potential target for future therapeutics. Hum. Reprod. Update. 2018;24:59–85. doi: 10.1093/humupd/dmx032.

International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. 10th Revision (ICD-10). WHO version for 2019. www.icd.who.

Yamagata Y, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Tamura I, Tamura H, Ogane J, Hattori N, Shiota K, Sugino N. Aberrant DNA methylation status in human uterine leiomyoma. Mol Hum Reprod 2009;15:259–267.

Yamada T, Nakago S, Kurachi O, et al. Progesterone down-regulates insulin-like growth factor-I expression in cultured human uterine leiomyoma cells. Hum Reprod. 2004;19(4):815-821. doi:10.1093/humrep/deh146.

Yu Q, Stamenkovic I (January 2000). "Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis". Genes Dev. 14 (2): 163–76. PMC 316345. PMID 10652271.

Yu, K., Di, G., Fan, L. et al. Lack of an association between a functional polymorphism in the interleukin-6 gene promoter and breast cancer risk: a meta-analysis involving 25,703 subjects. *Breast Cancer Res Treat* 122, 483–488 (2010). <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0706-5>.

Yang Q, Mas A, Diamond MP, Al-Hendy A. The Mechanism and Function of Epigenetics in Uterine Leiomyoma Development. *Reprod Sci.* 2016; 23(2): 163-175. doi:10.1177/ 1933719 115584449.

Jennelle C Hodge, Tae-Min Kim, Jonathan M Dreyfuss, Priya Somasundaram, Nicole C. Christacos, Marissa Rousselle, Bradley J Quade, Peter J Park, Elizabeth A Stewart, Cynthia C Morton. Expression Profiling of Uterine Leiomyomata Cytogenetic Subgroups Reveals Distinct Signatures in Matched Myometrium: Transcriptional Profiling of the t(12;14) and Evidence in Support of Predisposing Genetic Heterogeneity. *Hum Mol Genet.* 2012 May 15;21(10):2312-29. PMID: 22343407. DOI: 10.1093/hmg/dds051.

Jan R Brants , Torik A.Y Ayoubi , Kiran Chada , Kathleen Marchal , Wim J.M Van de Ven , M.R. Marleen Petit. Differential regulation of the insulin-like growth factor II mRNA-binding protein genes by architectural transcription factor HMGA2. *FEBS Letters* 569 (2004) 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.05.075>.

Jarvela I, Tekay A, Jouppila P. The effect of a levonorgestrel-releasing intrauterine system on uterine artery blood flow, hormone concentrations and ovarian cyst formation in fertile women. *Hum Reprod.* 1998; 13:3379–83. [PubMed: 9886518].

Klein S, Roghani M, Rifkin DB 1997 Fibroblast growth factors as angiogenesis factors: new insights into their mechanism of action. *EXS* 79:159–192.

Lauren A. Wise and Shannon K. Laughlin-Tommaso. Epidemiology of Uterine Fibroids - From Menarche to Menopause. *Clin Obstet Gynecol.* 2016 March ; 59(1): 2–24. doi:10.1097/ GRF. 0000000000000164.

Lippman SA, et al. Uterine fibroids and gynecologic pain symptoms in a population-based study. *Fertil Steril.* 2003; 80(6):1488–1494. [PubMed: 14667888].

Linder D, Gartler SM. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mosaicism: utilization as a cell marker in the study of leiomyomas. *Science* 1965; Vol. 150, Issue 3692, Pp:67–69. PMID: 5833538. DOI:10.1126/science.150.3692.67.

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 USA.* 1991; 88: 3739–3743. doi:10.1073/pnas.88.9.3739. [PMC free article] [PubMed].

Lackie John. "Cytokine". *A Dictionary of Biomedicine.* Oxford University Press. 2010. ISBN 978-0199549351.

Marshall LM, et al. Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. *Obstet Gynecol.* 1997; 90(6):967–973. [PubMed: 9397113].

Michnovicz JJ, et al. Increased 2-hydroxylation of estradiol as a possible mechanism for the anti-estrogenic effect of cigarette smoking. *N Engl J Med.* 1986; 315:1305–1309. [PubMed: 3773953].

Mutter GL, Boynton KA. X chromosome inactivation in the normal female genital tract: implications for identification of neoplasia. *Cancer Res* 1995; 55:5080–5084.

Masanori Ono, Tetsuo Maruyama, Hirotaka Masuda, Takashi Kajitani, Takashi Nagashima, Toru Arase, Mamoru Ito, Kuniaki Ohta, Hiroshi Uchida, Hironori Asada, Yasunori Yoshimura, Hideyuki Okano and Yumi Matsuzaki. Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. *PNAS* November 20, 2007 104 (47) 18700-18705; <https://doi.org/10.1073/pnas.0704472104>.

Michael Drosch, Dominique Nadine Markowski, Nicole Schmidt, Thomas Zollner. The CD24hi smooth muscle subpopulation is the predominant fraction in uterine fibroids. *Molecular Human Reproduction* 20(7) · March 2014 with 81 Reads. DOI: 10.1093/molehr/gau 022.

Miika Mehine, Hanna-Riikka Heinonen, Nanna Sarvilinna, Esa Pitkänen, Netta Mäkinen, Riku Katainen, Sari Tuupanen, Ralf Bützow, Jari Sjöberg, Lauri A. Aaltonen. Clonally related uterine leiomyomas are common and display branched tumor evolution. *Human Molecular Genetics*, Volume 24, Issue 15, 1 August 2015, Pages 4407–4416, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv177>.

Nilbert M, Strombeck B. Independent origin of uterine leiomyomas with karyotypically identical alterations. *Gynecol Obstet Invest* 1992;33:246–248.

Netta Mäkinen et al. MED12, the Mediator Complex Subunit 12 Gene, Is Mutated at High Frequency in Uterine Leiomyomas. *Science* 14 Oct 2011: Vol. 334, Issue 6053, pp. 252-255 DOI: 10.1126/science.1208930.

Nilbert M, Heim S, Mandahl N, Flodérus U.-M, Willén H, Åkerman M, Mitelman F. Ring formation and structural rearrangements of chromosome 1 as secondary changes in uterine leiomyomas with t(12;14)(q14-15;q23-24). *Cancer Genet Cytogenet*. 1988; 36: 183-190.

Nisolle M, Gillerot S, Casanas-Roux F, Squifflet J, Berliere M, Donnez . Immunohistochemical study of the proliferation index, oestrogen receptors and progesterone receptors A and B in leiomyomata and normal myometrium during the menstrual cycle and under gonadotrophin-releasing hormone agonist therapy. *Hum Reprod* 1999; 14: 2844-50.

Oudman, I. Creatine kinase and blood pressure: Clinical and therapeutic implications. 2013. Chapter 5: 66-76. High blood pressure in women with uterine fibroids.

Ohtake F, et al. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*. 2003; 423(6939): 545–550. [PubMed: 12774124].

Ozisik YY, et al: Deletion 7q22 in uterine leiomyoma. A cytogenetic review *Cancer Genet Cytogenet* 71:1-6, 1993.

Ozisik Y.Y, Meloni A.M., Surti U., Davare J, Sandberg A.A. Inversion (X)(p22q13) in a uterine leiomyoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1992; 61: 131-133.

Oliva E, Young RH, Clement PB, Bhan AK, Scully RE. Cellular benign mesenchymal tumors of the uterus. A comparative morphologic and immunohistochemical analysis of 33 highly cellular leiomyomas and six endometrial stromal nodules, two frequently confused tumors. *Am J Surg Pathol*. 1995;19:757–68.

- Parazzini F, Negri E, La Vecchia C, Chatenoud L, Ricci E, Guarnerio P. 1996. Reproductive factors and risk of uterine fibroids. *Epidemiology* 7:440–442.
- Porter KB, Tsibris JC, Nicosia SV, et al. Estrogen-induced guinea pig model for uterine leiomyomas: do the ovaries protect? *Biol Reprod* 1995;52:824e32.
- Papapetropoulos A, García-Cardena G, Madri JA, et al. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1997;100:3131–9.
- Protic O.; Islam M.S.; Greco S.; Giannubilo S.R.; Lamanna P.; Petraglia F.; Ciavattini A.; Castellucci M.; Hinz B.; Ciarmela P. Activin A in inflammation, tissue repair, and fibrosis: Possible role as inflammatory and fibrotic mediator of uterine fibroid development and growth. *Semin. Reprod. Med.* 2017, 35, 499–509.
- Palmer SS, Haynes-Johnson D, Diehl T, Nowak RA. Increased expression of stromelysin 3 mRNA in leiomyomas (uterine fibroids) compared with myometrium. *J Soc Gynecol Investig* 1998;4:203–209.
- Ryan GL, Syrop CH, Van Voorhis BJ. Role, epidemiology, and natural history of benign uterine mass lesions. *Clin Obstet Gynecol.* 2005;48:312–324.
- Ross RK, Pike MC, Vessey MP, Bull D, Yeates D, Casagrande JT. 1986. Risk factors for uterine fibroids: reduced risk associated with oral contraceptives. *Br Med J (Clin Res Ed)* 293:359–362.
- Ramcharan S, Pelligrin FA, Ray R, et al. The Walnut Creek Contraceptive Drug Study. A prospective study of the side effects of oral contraceptives. *Center Popul Res Monogr.* 1981:69–74.
- Reichman ME, et al. Effects of alcohol consumption on plasma and urinary hormone concentrations in premenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 1993; 85:722–727. [PubMed: 8478958].
- Reis FM, et al., Hormones and pathogenesis of uterine fibroids, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.11.015>.
- Stewart F. Cramer, M.D., Arti Patel, B.A. The Frequency of Uterine Leiomyomas. *American Journal of Clinical Pathology*, Volume 94, Issue 4, 1 October 1990, Pages 435–438, <http://doi.org/10.1093/ajcp/94.4.435>.
- Samadi AR, Lee NC, Flanders WD, Boring JR, 3rd, Parris EB. 1996. Risk factors for self-reported uterine fibroids: a case-control study. *Am J Public Health* 86:858–862.
- Sato F, Miyake H, Nishi M, Mori M, Kudo R. 2000b. Early normal menstrual cycle pattern and the development of uterine leiomyomas. *J Womens Health Gend Based Med* 9:299–302.
- Sparic R, Mirkovic L, Malvasi A, Tinelli A. Epidemiology of Uterine Myomas: A Review. *Int J Fertil Steril.* 2016;9(4):424-435. doi:10.22074/ijfs.2015.4599.
- Sarah J. Holdsworth-Carson, Marina Zaitseva, Beverley J. Vollenhoven, Peter A. W. Rogers. Clonality of smooth muscle and fibroid cells populations isolated from human fibroid and myometrial tissues. *Molecular human reproduction.* Vol.20, No.3 pp. 250–259, 2013 doi:10.1093/molehr/gat083.

Shingo Fujii, Ikuo Konishi, Hidetaka Katabuchi, Hitoshi Okamura. Ultrastructure of smooth muscle tissue in the female reproductive tract: uterus and oviduct. Book Chapter published 1990 in *Ultrastructure of Smooth Muscle* on pages 197 to 220. DOI 10.1007/978-1-4613-0683-2_10.

Sakaguchi H, Fujimoto J, Aoki I, Tamaya T (2003) *Steroids*, Elsevier 2003, Vol 68, Issue 1, pp:11–19, [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(02\)00111-3](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(02)00111-3).

Tham DM, Gardner CD, Haskell WL. 1998. Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2223–2235.

Tallini G, Dal Cin P . HMGI(Y) and HMGI-C dysregulation: a common occurrence in human tumors. *Adv Anat Pathol*. 1999 Sep;6(5):237-46.PMID: 10472377.

Tallini G, R Vanni, G Manfioletti, B Kazmierczak, G Faa, P Pauwels, J Bullerdiek, V Giacotti, H Van Den Berghe, P Dal Cin. HMGI-C and HMGI(Y) Immunoreactivity Correlates With Cytogenetic Abnormalities in Lipomas, Pulmonary Chondroid Hamartomas, Endometrial Polyps, and Uterine Leiomyomas and Is Compatible With Rearrangement of the HMGI-C and HMGI(Y) Genes. *Lab Invest*. 2000 Mar;80(3):359-69. doi: 10.1038/labinvest.3780040. PMID: 10744071.

Tian R, Wang Z, Shi Z, et al. Differential expression of G-protein coupled estrogen receptor-30 in human myometrial and uterine leiomyoma smooth muscle. *Fertil Steril*. 2013;99(1):256-263.

Tsigkou A, Reis FM, Ciarmela P, Lee MH, Jiang B, Tosti C, Shen FR, Shi Z, Chen YG, Petraglia F. Expression levels of myostatin and matrix metalloproteinase 14 mRNAs in uterine leiomyoma are correlated with dysmenorrhea. *Reprod Sci* .2015;12:1597–1602.

Tocci A, Greco E, Ubaldi FM. Adenomyosis and 'endometrial-subendometrial myometrium unit disruption disease' are two different entities. *Reprod Biomed Online*. 2008 Aug;17(2):281-91. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60207-6.

Veronica Medikare, Lakshmi Rao Kandukuri, Venkateshwari Ananthapur, Mamata Deenadayal, Pratibha Nallari. The Genetic Bases of Uterine Fibroids. A Review. *J Reprod Infertil*. 2011 Jul-Sep; 12(3): p181–191. PMCID: PMC 3719293. PMID: 23926501.

Vladislav S. Baranov, Natalia S. Osinovskaya and Maria I. Yarmolinskaya. Pathogenomics of Uterine Fibroids Development. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec; 20(24): 6151. doi: 10.3390/ijms20246151. PMCID: PMC6940759.

Vanni R, et al: Endometrial polyp: Another benign tumor characterized by 12q13-q15 changes. *Cancer Genet Cytogenet* 68:32-33, 1993.

Vrtacnik P, Ostanek B, Mencej-Bedrac S, Marc J. The many faces of estrogen signaling. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014;24(3): 329-342.

Vilos GA, Hollett-Caines J, Burbank F. Uterine artery occlusion: what is the evidence? *Clin. Obstet. Gynecol* 2006;49:798–810.

Witherspoon J. T. and Butler V. W. : The etiology of uterine fibroids, with special reference to the frequency of their occurrence in the negro, *Surg., Gynec. & Obst.* 58: 57, 1934.

Witherspoon J. T. : The interrelationship between ovarian follicle cysts, endometrial hyperplasia and fibromyomata, *Surg., Gynec. & Obst.* 56 : 1026, 1933.

Walker CL, et al. Protective effect of pregnancy for development of uterine leiomyoma. *Carcinogenesis*. 2001; 22(12):2049–2052. [PubMed: 11751438].

Walker CL, Stewart EA. Uterine Fibroids: The Elephant in the Room. *Science*. 10 Jun 2005; Vol. 308, Issue 5728, pp. 1589-1592, DOI: 10.1126/science.1112063.

Wang X, Kumar D, Seidman JD. Uterine lipoleiomyomas: a clinicopathologic study of 50 cases. *Int JGynecolPathol*. 2006 Jul;25(3):239-42. PMID:16810060. DOI:10.1097/01.pgp.0000192273.66931.29

Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. 1999;283:1482–1488. [PubMed] [Google Scholar].

Williams AJ, et al: HMGI(Y) expression in human uterine leiomyomata: Involvement of another HMG architectural factor in a benign neoplasm. *Am J Pathol* 150:911-918, 1997.

Xiao S, et al: HMGI(Y) activation by chromosome 6p21 rearrangements in multilineage mesenchymal cells from pulmonary hamartoma. *Am J Pathol* 150:901-910, 1997.

Zhou J, Mochizuki T, Smeets H, et al. Deletion of the paired alpha 5(IV) and alpha 6(IV) collagen genes in inherited smooth muscle tumors. *Science*. 1993;261(5125):1167-1169. doi:10.1126/science.8356449.1993.

Zeng WR, et al: Loss of heterozygosity and reduced expression of the CUTL1 gene in uterine leiomyomas. *Oncogene* 14:2355-2365, 1997.

Zavadil J, Ye H, Liu Z, Wu JJ, Lee P, Hernando E, Soteropoulos P, Toruner GA, Wei JJ. Profiling and Functional Analyses of MicroRNAs and Their Target Gene Products in Human Uterine Leiomyomas. Published: *PLoS One*. August 24, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012362>.

Lista de lucrări științifice publicate

1. **Călin D.**, Haradja H., Pacu I., Brătila E., Gheorghiu D., Rahimian H., Ionescu C. „Laparoscopic myomectomy in infertility treatment”. ARS Medica Tomitana, vol.20, no.3, 2015, pp.139-143. <https://doi.org/10.2478/arism-2014-0025>.
2. **Călin D.**, Dimitriu M., Ciobanu A.M., Vlădescu T., Ionescu C., Hudită D. „Uterine fibroid and diffuse uterine fibromatosis – Two different entities - A prospective study”. Archives of the Balkan Medical Union. vol. 51, no. 1, 2016. pp. 12-17.
3. **F.D. Călin**, C. A. Ionescu, M.C.T. Dimitriu, A.M. Ciobanu, C.D. Badiu, A. Neacșu, B. Socea, D. Hudită. „The impact of uterine fibromatosis on the endometrium and fertility” - Jurnal of Surgical Sciences, vol7, Nr 2, pag 45-51, iunie, 2020. ISSN: 2360-3038. <https://doi.org/10.33695/jss.v7i2.350>.