



**UNIVERSITÀ  
DI TORINO**

## **Università degli Studi di Torino**

*Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche e Oncologia*

### **Tesi di dottorato**

Tumori della muscolatura liscia uterina di potenziale maligno incerto:  
analisi retrospettiva multicentrica degli esiti di sopravvivenza e  
caratterizzazione molecolare mediante piattaforma NanoString

#### **Tutor**

Prof. Luca Marozio

#### **Candidato**

Fulvio Borella  
Dottorato: 36° ciclo  
Matricola 306945

# Indice

<b>Introduzione .....</b>	<b>3</b>
1. DEFINIZIONE .....	4
1.1 Leiomiomi .....	4
1.2 STUMP .....	5
1.3 LMS .....	6
2. EPIDEMIOLOGIA.....	7
2.1 Leiomiomi .....	7
2.2 STUMP .....	8
2.3 LMS .....	8
3. PATOGENESI .....	10
3.1 Leiomiomi .....	10
3.2 STUMP .....	12
3.3 LMS .....	12
4. ANATOMIA PATOLOGICA .....	13
4.1 Leiomiomi .....	14
4.2 STUMP .....	17
4.3 LMS .....	19
5. DIAGNOSTICA.....	20
5.1 Ecografia.....	21
5.2 Tomografia computerizzata .....	24
5.3 Risonanza magnetica .....	25
5.4 18F-Fluorodesossiglucosio PET/TC.....	27
5.5 Biomarcatori .....	28
6. MANAGEMENT CHIRURGICO .....	30
6.1 Leiomiomi .....	30
6.2 STUMP .....	36
6.3 LMS .....	37
<b>Studio sperimentale.....</b>	<b>40</b>
1. INTRODUZIONE .....	40
2. MATERIALI E METODI .....	41
2.1 Analisi statistica.....	42
3. RISULTATI .....	43
3.1 Dati clinici e di sopravvivenza .....	43

3.2 Dati istologici .....	<b>Errore. Il segnalibro non è definito.</b>
3.3 Dati molecolari .....	52
4. Discussione.....	68
5. Conclusioni.....	75
<b>Bibliografia .....</b>	<b>75</b>

# Introduzione

I tumori di derivazione mesenchimale che originano dalla muscolatura liscia dell'utero comprendono un gruppo variegato di neoplasie sia benigne che maligne.

Possono essere suddivise in tre categorie:

- Leiomiomi, lesioni comuni e benigne;
- Sarcomi, lesioni molto rare e maligne;
- Tumori della muscolatura liscia dell'utero a incerta malignità (smooth muscle Tumors of uncertain malignant potential - STUMP), lesioni rare il cui comportamento clinico e biologico non è prevedibile.

La diagnosi differenziale preoperatoria tra queste tre diverse entità non è semplice dal momento che i leiomiomi, le più diffuse tra le neoplasie pelviche nelle donne in età fertile, hanno una presentazione estremamente eterogenea dal punto di vista della localizzazione, dimensione e presentazione clinica. Inoltre, i leiomiomi, hanno frequentemente molte caratteristiche in comune con gli STUMP e con i LMS e, infatti, il rischio di diagnosticare un LMS in seguito all'intervento di rimozione di un sospetto leiomioma è bassa ma non del tutto trascurabile.

Di conseguenza, è indispensabile tener conto di queste difficoltà soprattutto durante il trattamento (in particolare quello chirurgico) poiché può avere un importante impatto sulla prognosi.

L'unica metodica che consente di fare una corretta diagnosi differenziale tra queste tre diverse entità è l'indagine istopatologica secondo la classificazione WHO 2020. Risulta quindi di notevole importanza identificare delle nuove tecnologie che possano mettere in evidenza le differenze tra le tre diverse entità nosologiche e che possano aiutare nel predire il comportamento degli STUMP.

# 1. DEFINIZIONE

## 1.1 Leiomiomi

I leiomiomi uterini, sono i tumori ginecologici con maggiore incidenza e prevalenza. Si tratta di tumori benigni che convenzionalmente vengono definiti come aventi origine dalla proliferazione di un singolo clone di cellule muscolari lisce. In realtà, si tratta di tumori piuttosto eterogenei per quanto riguarda la composizione cellulare. Risultano infatti costituiti da fibroblasti, matrice extracellulare (formata da collagene, proteoglicani e fibronectina), vasi, nervi, cellule infiammatorie e sono circondati da una sottile pseudocapsula di cellule muscolari lisce compresse. I fibroblasti hanno un ruolo cruciale in quanto contribuiscono alla sintesi e all'omeostasi della ECM e questa, a sua volta, sembra essere un elemento chiave nell'induzione della proliferazione tumorale.<sup>1</sup>

Nella maggior parte delle pazienti i miomi sono asintomatici e il riscontro è occasionale eseguendo ecografie ginecologiche di controllo routinarie, tuttavia, in alcuni casi, possono essere associati a disturbi aspecifici come la menorragia, dovuta all'aumentata vascolarizzazione tumorale e alla compromissione della contrattilità del miometrio con possibile sviluppo di anemia da sanguinamento. Inoltre, a causa delle notevoli dimensioni che questi tumori possono raggiungere è possibile la comparsa di sintomi da compressione come disturbi gastrointestinali (stipsi per defecazione ostruita) e disturbi urinari (pollachiuria, ritenzione urinaria, nicturia) oltre al senso di peso e al dolore in sede addominale e pelvica. Non sempre, però, le dimensioni sono direttamente proporzionali ai sintomi. Spesso donne con miomi i grandi dimensioni sono del tutto asintomatiche e, al contrario, donne con miomi di piccole dimensioni possono presentare una spiccata sintomatologia. I leiomiomi possono anche essere associati ad una compromissione della fertilità e a complicanze ostetriche quali malposizioni fetali, parto prematuro, distacco intempestivo di placenta, placenta previa, rottura intempestiva delle membrane, mancato secondamento, emorragia post-partum e taglio cesareo.<sup>2</sup>

Il comportamento dei miomi è tendenzialmente benigno; esistono, tuttavia, delle varianti di mioma che sviluppano una capacità di diffusione che generalmente è caratteristica delle lesioni maligne.<sup>3</sup> Possono diffondere attraverso le vene pelviche e la vena cava raggiungendo eventualmente il cuore, possono raggiungere la cavità peritoneale con la comparsa di noduli peritoneali o possono metastatizzare in siti a distanza come i polmoni; le localizzazioni secondarie mantengono comunque le caratteristiche della lesione primitiva e dunque sono benigne e stabili nel tempo e non invadono altri tessuti.<sup>4</sup>

Per quanto riguarda la classificazione, i miomi venivano originariamente distinti in tre sottocategorie

a seconda della loro localizzazione: sottomucosi se sporgono nella cavità dell'utero, intramurali se localizzati nello spessore del miometrio e sottosierosi se modificano il profilo esterno dell'utero. Questo tipo di suddivisione spesso non consentiva di descrivere al meglio la posizione del leiomioma, poiché non è raro trovare miomi in posizione intermedia. Nasce quindi la classificazione proposta dalla Federazione Internazionale di Ginecologia e Ostetricia che consente di localizzare il mioma in maniera altamente specifica identificando dieci sottocategorie <sup>5</sup> (fig. 1).

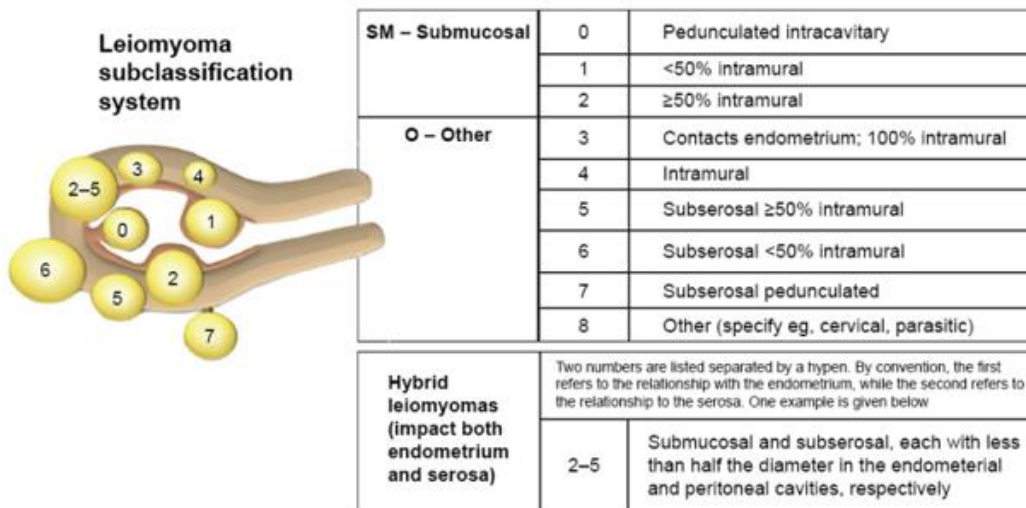


Immagine 1: classificazione FIGO dei leiomiomi

## 1.2 STUMP

Con il termine STUMP si indica un gruppo eterogeneo di tumori uterini che vanno distinti dai leiomiomi e dai LMS. Considerando i tre criteri istologici proposti da Stanford nel 1994 in merito alle lesioni della muscolatura liscia dell'utero, ossia atipia citologica, conta mitotica e necrosi delle cellule tumorali è possibile distinguere tra lesioni con comportamento maligno e lesioni con comportamento benigno <sup>6</sup>; tuttavia, esistono delle lesioni in cui è possibile osservare delle caratteristiche morfologiche intermedie e che quindi risultano di difficile classificazione. Per questo motivo è stata introdotta la categoria diagnostica degli STUMP<sup>7</sup>: tumori in cui le caratteristiche istologiche precludono la diagnosi certa di sarcoma ma non consentono neanche la diagnosi di mioma o delle sue varianti e il cui comportamento potrebbe essere inaspettatamente maligno. <sup>6</sup>

Le dimensioni dello STUMP possono essere molto variabili, dai 3 ai 30 cm di diametro, come anche nei sarcomi e nei miomi.

La sintomatologia è sovrapponibile a quella di un ordinario leiomioma; massa pelvica, dolore pelvico,

sanguinamento uterino anomalo con possibile sviluppo di anemia con pallore, astenia e tachicardia, dismenorrea, alterazioni della fertilità e possibili complicanze ostetriche e nel caso di dimensioni considerevoli possibili sintomi da compressione sugli organi adiacenti. <sup>8-10</sup>

### 1.3 LMS

I LMS (LMS) sono il più comune tipo di sarcomi uterini. Si tratta di neoplasie maligne molto aggressive che originano dalla muscolatura liscia dell'utero; nella maggior parte dei casi crescono come masse solitarie e nel 75% dei casi hanno dimensioni > 5 cm al momento della diagnosi.<sup>6</sup> Macroscopicamente tendono a crescere restando circoscritti al miometrio, tuttavia, in alcuni casi, possono presentarsi come masse polipoidi nella cavità endometriale, hanno generalmente una superficie di taglio morbida e rigonfia che mostra aree di emorragia e di necrosi.<sup>11</sup>

La presentazione clinica di un LMS è spesso indistinguibile da quella di un mioma, entità di gran lunga più frequente. I sintomi più comunemente associati alla malattia sono sanguinamento uterino anomalo (56%), masse pelviche palpabili o utero ingrandito (54%), senso di peso o dolore pelvico (22%).<sup>12,13</sup>

L'origine e la localizzazione del tumore all'interno del miometrio determinano una precoce diffusione dello stesso per via linfovaskolare e una disseminazione in sede extrapelvica.<sup>14</sup>

La stadiazione chirurgica dei LMS viene eseguita secondo i criteri della Federazione Internazionale di Ginecologia e Ostetricia del 2009. (tabella 1)

**Table 1**  
FIGO staging for uterine sarcomas (2009).

Stage	Definition
I	Tumor limited to uterus
IA	<5 cm in greatest dimension
IB	>5 cm in greatest dimension
II	Tumor extends beyond the uterus, within the pelvis
IIA	Adnexal involvement
IIB	Involvement of other pelvic tissues
III	Tumor invades abdominal tissues
IIIA	1 site
IIIB	>1 site
IIIC	Involves pelvic and/or para-aortic lymph nodes
IV	Tumor invades pelvic organs and/or distant metastasis
IVA	Invasion of bladder or rectum
IVB	Distant metastases

*Tabella 1: Classificazione FIGO dei sarcomi uterini*

## 2. EPIDEMIOLOGIA

### 2.1 Leiomiomi

I leiomiomi sono i tumori ginecologici più frequenti in assoluto, si stima, sulla base di dati raccolti tramite screening ecografico e anatomia patologica che fino al 70% delle donne in età fertile presenta dei leiomiomi.<sup>15,16</sup>

In Europa la prevalenza di leiomiomi diagnosticati in pazienti sintomatiche si aggira intorno all'11% in Francia e arriva al 24% in Italia; tuttavia, generalmente, passano molti anni prima che una donna sintomatica arrivi alla diagnosi.<sup>17,18</sup>

I due principali fattori di rischio per lo sviluppo di miomi sono l'età e l'etnia.<sup>19</sup>

Infatti, l'incidenza dei miomi a partire dalla pubertà (non sono descritti casi in epoca prepuberale) aumenta all'aumentare dell'età<sup>20</sup>, per poi ridursi in seguito alla menopausa.<sup>21</sup>

Inoltre, si osserva una differente incidenza tra le donne bianche e le donne di colore, con una maggior prevalenza tra queste ultime tra le quali l'incidenza è di due/tre volte superiore rispetto alle donne bianche a parità di altri fattori di rischio.<sup>15,22</sup> In uno studio sulle isterectomie per condizioni non cancerose si osserva che il 59% delle donne bianche e l'89% delle donne di colore aveva un mioma, con, rispettivamente, un'età media alla diagnosi di 41.6 anni nelle prime e 37.5 nelle seconde. Invece, in uno studio di screening ecografico condotto negli Stati Uniti si è osservata una comparsa di leiomiomi nelle donne di colore con circa 10 anni di anticipo rispetto alle donne bianche; il picco d'incidenza è intorno ai 25 anni per le donne di colore e ai 35 per le donne bianche fino a raggiungere una prevalenza rispettivamente dell'80% e del 70% a 50 anni d'età.<sup>15,20</sup>

Le donne di colore presentano inoltre una sintomatologia più spiccata, uteri di dimensioni maggiori e leiomiomi più grandi e numerosi oltre a ad avere miomi che non regrediscono di dimensioni dopo la menopausa, contrariamente a quello che accade nelle donne bianche.<sup>15,23</sup>

Un altro fattore che può influenzare lo sviluppo e la crescita dei miomi è la parità; Il rischio di sviluppare un mioma è inversamente proporzionale al numero di gravidanze (se la suddetta ha superato almeno le 20 settimane di gestazione) e si riduce se le gravidanze sono avvenute dopo i 25 anni di età. Le donne che hanno avuto una gravidanza prima dei 25 anni o che l'hanno avuta più di 10 anni fa hanno un rischio pari alle donne nullipare. Il ruolo della gravidanza oltre ad essere protettivo e quindi a ridurre il rischio di comparsa di un mioma sembra anche facilitarne l'eliminazione o comunque la riduzione delle dimensioni.<sup>15,24</sup>

Altri fattori di rischio ormonali includono il menarca precoce (<12 anni) e l'esposizione prenatale al dietilstilbestrolo.<sup>25,26</sup> L'aver utilizzato nel corso della propria vita contraccettivi orali non sembra influenzare lo sviluppo dei leiomiomi, anche se si osserva un lieve calo del rischio nel periodo di assunzione degli stessi.<sup>24,27</sup>

Esistono dei fattori di rischio minori come la dieta (un alto consumo di carne rossa aumenta il rischio che invece si riduce con una dieta ricca di frutta, verdura e latticini)<sup>28,29</sup> e il deficit di vitamina D (che infatti è più comune tra le donne di colore).<sup>30-32</sup>

## 2.2 STUMP

L'età media delle pazienti alla diagnosi di STUMP è di 43 anni, con un range di 25-75 anni, come per i leiomiomi e i LMS.<sup>8</sup>

Non sono ancora stati identificati dei fattori di rischio che incidono sul loro sviluppo, tuttavia, è stato dimostrato che il fumo, a differenza di quanto si potrebbe pensare, è un fattore protettivo e ne riduce l'incidenza.<sup>7</sup>

Gli STUMP sono tumori a lenta crescita e hanno per definizione potenziale incerto di malignità, infatti in alcuni casi possono dare recidive che si possono manifestare sia come STUMP sia come LMS con possibile successivo sviluppo di metastasi.<sup>6,7,33</sup> L'incidenza di recidive si aggira intorno al 36,4% con un tempo medio di ricorrenza di circa 51 mesi e una sopravvivenza globale a 5 anni tra il 92% e il 100%. Si tratta di percentuali molto difficili da stimare in quanto in letteratura vengono considerati numerosi criteri diagnostici differenti e tempi di follow-up molto vari.<sup>8</sup>

Si osservano delle caratteristiche istologiche che possono essere correlate ad un più alto rischio di recidiva: tumori con necrosi estesa, basso indice mitotico e scarse atipie hanno un rischio di recidiva che arriva fino al 28%; invece, i tumori che hanno un alto indice mitotico (> 15 mitosi per campo ad alta potenza) ma sono privi di necrosi e di atipie hanno un basso rischio di recidiva.<sup>6</sup>

In caso di recidiva la sopravvivenza varia molto a seconda delle caratteristiche istologiche della stessa: se la recidiva è avvenuta come STUMP la sopravvivenza è elevata, nei casi in cui la recidiva avviene come LMS la prognosi è infausta in quanto la malattia è molto aggressiva con il possibile coinvolgimento di siti come pelvi, osso, pleura, polmone, cervello e midollo spinale.<sup>6,7,33-35</sup>

## 2.3 LMS

I sarcomi uterini rappresentano il 3-7% di tutte le neoplasie uterine e sono un gruppo eterogeneo di tumori derivanti dalle cellule mesenchimali; includono i LMS, i più comuni tra i tumori mesenchimali, i sarcomi endometriali stromali e gli adenosarcomi. I LMS da soli rappresentano 1-2% delle neoplasie uterine e hanno un'incidenza di circa 0,8 su 100000; la rarità di questa entità nosografica contribuisce alla scarsità di informazioni sui fattori prognostici e sulle corrette opzioni terapeutiche.<sup>36-39</sup>

Inizialmente, all'interno del gruppo dei tumori mesenchimali, erano compresi anche i carcinosarcomi (50% dei casi) che sono stati poi riclassificati come una forma indifferenziata o metaplastica di carcinoma endometriale a causa del differente pattern con il quale si diffondono. Tuttavia, visto il loro comportamento estremamente maligno, spesso vengono ancora inclusi in molti studi sui sarcomi uterini.

L'età media alla diagnosi nei LMS è tra i 35 e i 75 anni di età, con un picco in età perimenopausale.<sup>40,41</sup> I sintomi di presentazione dei LMS sono indistinguibili da quelli di un leiomioma o uno STUMP; il sospetto clinico può nascere dalla rapida crescita di queste masse in post-menopausa, tuttavia, spesso le pazienti si presentano già con masse di notevoli dimensioni senza che sia possibile osservarne la crescita nel tempo.<sup>42</sup>

Anche se nella maggior parte delle donne con LMS non sono identificabili particolari fattori di rischio, esistono degli elementi che possono essere associati ad un'aumentata incidenza del tumore. Pazienti esposte a radiazioni<sup>43</sup> o con sindromi ereditarie genetiche che intaccano la normale capacità di riparazione del DNA (Sindrome di Li Fraumeni, Retinoblastoma ereditario)<sup>44</sup> hanno dimostrato di avere un aumentato rischio di sviluppare un sarcoma uterino, con un rischio assoluto che rimane comunque molto basso. Un altro fattore che aumenta il rischio di sviluppare un sarcoma uterino è l'esposizione prolungata (almeno cinque anni) al Tamoxifene o ad altri SERMs poiché questi farmaci agiscono come antagonisti degli estrogeni a livello del tessuto mammario, ma, al contrario, come agonisti estrogenici a livello uterino promuovendo lo sviluppo e la progressione della patologia.<sup>45,46</sup> Altri fattori di rischio minori sono l'età perimenopausale e l'etnia afroamericana.<sup>11</sup>

Nonostante una frequente (60%) diagnosi precoce i LMS sono associati ad una prognosi infausta con dei tassi di sopravvivenza molto bassi. Numerosi studi hanno dimostrato che la sopravvivenza globale a 5 anni dalla diagnosi si aggira tra il 25% e il 70%, la sopravvivenza in caso di malattia metastatica alla diagnosi scende al 10-15%.<sup>41</sup>

I tassi di recidiva variano dal 53% al 71% con differenti possibili sedi: polmone nel 40% delle pazienti e pelvi solo nel 13% dei casi; i tempi di recidiva sono molto variabili con un intervallo medio tra i 12 e i 24 mesi.<sup>12,37,47</sup>

Sono stati fatti numerosi studi per dimostrare una correlazione tra la sopravvivenza e diverse

caratteristiche come l'età della paziente, lo stadio tumorale, il tipo di margini, la presenza di necrosi, l'indice mitotico, le atipie cellulari e l'invasione vascolare. Tuttavia, nessuno di questi elementi ha dimostrato una relazione significativa con la sopravvivenza; l'unico elemento che sembra avere un peso sulla prognosi è la dimensione del tumore alla diagnosi: un tumore maggiore di 5 cm è un fattore prognostico negativo.<sup>48</sup>

### 3. PATOGENESI

#### 3.1 Leiomiomi

I leiomiomi sono tumori benigni che derivano dall'espansione clonale di cellule muscolari lisce e che sono caratterizzati da riarrangiamenti cromosomici. Si può dire, quindi, che le cellule staminali presenti nella muscolatura liscia del miometrio e i recettori per il progesterone e gli estrogeni rappresentano i due elementi chiave necessari per lo sviluppo e la crescita di un leiomioma. Tuttavia, si osserva una ridotta espressione di recettori per estrogeni e progesterone nelle cellule staminali rispetto a quella che caratterizza le cellule mature del miometrio o le stesse cellule del leiomioma. Questo suggerisce che lo sviluppo del mioma dipenda da un processo multistep che tramite un meccanismo paracrino passa dalla cellula staminale del miometrio alle cellule progenitrici del leiomioma.<sup>4</sup>

<sup>9</sup> Alla base di questo meccanismo paracrino si trova la segnalazione WNT/ $\beta$ -catenina (oltre all'iperpressione dei recettori degli estrogeni e del progesterone) che stimola a sua volta l'espressione del fattore di crescita trasformante TGF  $\beta$ 3 che induce l'espressione di fibronectina (una delle proteine costituenti la matrice extra-cellulare) e la proliferazione delle cellule del leiomioma.<sup>49,50</sup> Inoltre, le cellule del leiomioma sono caratterizzate dall'espressione di una varietà di geni, tra cui CRABP2, PGR e TGFBR2, in base alla quale differiscono le une dalle altre; queste differenze di espressione genica aiutano a spiegare l'eterogeneità biologica e clinica di questa tipologia di tumore.<sup>51</sup> I leiomiomi rappresentano una delle più importanti cause di sanguinamento uterino anomalo; questo può essere spiegato dalla disregolazione di fattori di crescita (o dei loro recettori) che si osserva nel tessuto tumorale. Normalmente questi fattori di crescita regolano il normale processo di angiogenesi, ma, all'interno della massa tumorale, l'alterazione della loro sintesi o della loro espressione o l'alterazione dei normali processi di sequestro è responsabile di un'anomala formazione di vasi e di un più facile sanguinamento uterino. I fattori di crescita protagonisti nella crescita del leiomioma e

dei suoi vasi sono: il fattore di crescita dei fibroblasti 2 (FGF2), il fattore di crescita EGF-legante eparina (HB-EGF) il fattore di crescita endoteliale (VEGF), e il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF).<sup>52</sup> Inoltre, il TGF  $\beta$ 3 sembra contribuire al sanguinamento andando a sopprimere l'espressione di fattori anticoagulanti locali nelle cellule endometriali adiacenti al mioma<sup>53</sup> ed è un importante regolatore della crescita cellulare dei leiomiomi promuovendo il rimodellamento, l'infiammazione e l'inibizione dell'apoptosi.<sup>54,55</sup>

La matrice extracellulare secreta dai fibroblasti ha un ruolo cruciale nella patofisiologia dei miomi; infatti, si osservano delle differenze rispetto alla ECM espressa nel normale miometrio, tra le quali a livello genico l'over espressione di TGF  $\beta$ 3 e TGF-RII e a livello strutturale l'alterata espressione di alcune proteine della matrice, tra cui la dermatopontina e il versicano, oltre ad una differente disposizione delle fibre collagene che appaiono più corte e disordinate.<sup>56</sup>

Esistono almeno 4 sottogruppi di miomi che differiscono sulla base delle alterazioni cromosomali o dei geni chiave colpiti da mutazioni somatiche. Il primo gruppo, nonché il più numeroso, comprendendo dal 50 all'85% dei miomi<sup>57-59</sup>, è caratterizzato dalla mutazione della subunità 12 del complesso mediatore MED12; il secondo gruppo è caratterizzato da un riarrangiamento cromosomico con conseguente deregolazione di HMGA2 (gruppo ad alta mobilità AT-hook 2); nel terzo gruppo la caratteristica chiave è una mutazione ereditaria inattivante della fumarato idratasi (FH); infine, il quarto gruppo presenta una delezione dei geni del collagene tipo IV  $\alpha$ 5 e  $\alpha$ 6 (COL4A5 e COL4A6).<sup>59,60</sup> Tutte le mutazioni appena citate sono mutualmente esclusive, di conseguenza possiamo affermare con certezza che sono coinvolti specifici pathway molecolari ben distinti per ciascun gruppo di miomi.<sup>49,61,62</sup>

Non solo dal punto di vista genetico, ma anche dal punto di vista epigenetico ci sono delle importanti differenze tra il normale miometrio e il leiomioma con un'anomala ipermetilazione di una vasta gamma di geni (tra cui geni oncosoppressori) in risposta all'attivazione del recettore degli estrogeni.<sup>63,64</sup>

Come citato precedentemente, estrogeno e progesterone hanno un ruolo chiave nella patogenesi dei miomi: l'estrogeno ha come ruolo primario quello di indurre l'espressione di recettori del progesterone, quest'ultimo invece è più che altro implicato nella proliferazione e nel mantenimento del volume del mioma. La conferma si è raggiunta sia in vitro sia clinicamente dimostrando che l'uso di regolatori selettivi del recettore del progesterone permette di ottenere degli ottimi risultati circa la gestione dei leiomiomi.<sup>65-67</sup>

Un altro elemento che sembra avere un ruolo nello sviluppo dei miomi è la vitamina D; infatti, le donne con un deficit di vitamina D hanno un rischio relativo di sviluppare un mioma significativamente maggiore rispetto alle donne con normali livelli sierici di vitamina D e a supportare

ulteriormente questa tesi si è osservato che numerosi geni coinvolti nel metabolismo della vitamina D risultano mutati nelle cellule dei miomi.<sup>68</sup>

Similmente anche l'acido retinoico sembra essere coinvolto nella patogenesi dei miomi in quanto responsabile della riduzione della proliferazione oltre che dell'induzione dell'apoptosi delle cellule muscolari lisce. Si è dimostrata la ridotta espressione dei principali geni coinvolti nel pathway dell'acido retinoico con una ridotta quota di acido retinoico biologicamente attivo presente all'interno del mioma stesso.<sup>68-70</sup>

Esistono altri recettori nucleari coinvolti nella biologia dei leiomiomi tra cui i recettori androgenici e il sottogruppo dei recettori nucleari 4A (NR4A). Le donne con livelli più elevati di testosterone hanno anche un'incidenza maggiore di leiomiomi, probabilmente a causa di un'iperespressione dell'aromatasi.<sup>67,68</sup>

Moltissime altre alterazioni genetiche sono state individuate nei leiomiomi uterini, si dibatte se siano secondarie o casuali.

### 3.2 STUMP

Alcuni studi che hanno tentato di mettere in evidenza le reali differenze molecolari di questi tumori rispetto ai miomi e ai LMS ottenendo vari risultati. Uno studio sull'espressione di Ki67, recettori del progesterone e p53 ha mostrato che gli STUMP hanno un profilo molecolare molto simile ai leiomiomi. Tuttavia, lo stesso non si può dire per quella quota di STUMP che va incontro a recidiva. In questo caso, infatti, sono molte di più le similitudini con un LMS.<sup>71</sup>

### 3.3 Leiomiosarcomi

Le differenze genetiche presenti tra i leiomiomi e i LMS consentono di affermare con certezza che si tratta di due lesioni con distinta origine e che quindi i sarcomi non sono il risultato della degenerazione maligna di un leiomioma (anche se esistono rari casi in cui si sospetta questa correlazione). Non ci sono specifiche anomalie geniche condivise tra sarcomi e miomi, i LMS sono lesioni altamente indifferenziate e con complessi riarrangiamenti cromosomici e cariotipi aneuploidi; queste caratteristiche rendono molto difficile trovare mutazioni caratteristiche e quindi target terapeutici.<sup>72,73</sup>

Un punto comune di diversi network di trasduzione che appaiono mutati nei sarcomi è il pathway

PI3K-AKT, regolato negativamente da PTEN (infatti, la delezione del cromosoma 10q, contenente PTEN, è associata ad un comportamento clinico estremamente aggressivo). Questo pathway è coinvolto nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare attraverso la regolazione della sintesi proteica, ed appare effettivamente fosforilato nelle cellule del sarcoma.<sup>74,75</sup>

Altre alterazioni frequentemente associate alla diagnosi di sarcoma sono TP53, RB1, ATRX e la subunità12 del complesso mediatore (MED12). Quest'ultima, in particolare, può essere utile per la diagnosi di quei rari casi di LMS derivato da leiomioma che risulta generalmente caratterizzato da una prognosi migliore. Altri geni recentemente portati all'attenzione sono alcuni geni iperespressi dalla lesione primaria quali osteocrina, neuroligina 4X, SLITRK4, TSPAN7.<sup>76</sup>

## 4. ANATOMIA PATOLOGICA

I tumori mesenchimali dell'utero vengono classificati secondo la classificazione WHO del 2020 (tabella 2).

I tumori che originano dalla muscolatura liscia possono essere distinti a seconda del loro comportamento in tumori benigni, maligni o a comportamento incerto; al fine di poter effettuare questa suddivisione è essenziale l'analisi anatomo patologica effettuata al microscopio, in quanto a livello macroscopico spesso non sono presenti evidenti differenze.

Le caratteristiche istologiche che consentono di fare questa distinzione sono essenzialmente tre:

- Indice mitotico (contato per 10 campi ad alta potenza - HPF);
- Grado di atipia citologica (lieve, moderata o grave);
- Presenza di necrosi delle cellule tumorali, con la quale ci si riferisce alla necrosi coagulativa (diversa dalla necrosi ischemica che può essere presente sia nei tumori benigni che in quelli maligni).

Bisogna sempre tenere a mente che le caratteristiche sopra citate pur essendo dei valori oggettivi risentono della soggettività del patologo che analizza il campione e quindi della sua interpretazione ed esperienza; è importante fare attenzione in tutti quei casi in cui si riscontrino caratteristiche insolite o di difficile classificazione.<sup>77</sup>

### MESENCHYMAL TUMORS

Smooth muscle tumors
----------------------

- Leiomyoma
- Intravenous leiomyomatosis
- Smooth muscle cells tumor of uncertain malignant potential
- Metastasizing leiomyoma
- Leiomyosarcoma

#### Endometrial stromal and related tumors

- Endometrial stromal nodule
- Low-grade endometrial stromal sarcoma
- High-grade endometrial stromal sarcoma
- Undifferentiated uterine sarcoma

#### Miscellaneous mesenchymal tumors

- Uterine tumor resembling ovarian sex cord tumor
- Perivascular epithelioid cell tumor
- Inflammatory myofibroblastic tumor
- Other mesenchymal tumors

Tabella 2: classificazione dei tumori mesenchimali dell'utero

## Immunoistochimica

L'immunoistochimica viene utilizzata per distinguere i tumori della muscolatura liscia da tumori aventi differente origine; i primi, infatti, esprimono elevati livelli di proteine specifiche della muscolatura liscia come actina specifica del muscolo liscio, desmina, h-caldesmon. Inoltre, l'utilizzo dell'immunoistochimica potrebbe aiutare ad orientarsi in tutte quelle situazioni in cui la diagnosi anatomico patologica basata esclusivamente sui criteri morfologici è incerta a causa di caratteristiche dubbie o intermedie del tumore in questione. Da qui deriva la necessità di identificare biomarker in grado di discriminare tra lesioni benigne e lesioni maligne, con conseguenti importanti implicazioni cliniche. I potenziali biomarker proposti per identificare tumori della muscolatura liscia uterina a più alto rischio di comportamento maligno sono p16, p53, KI-67, p21, Twist, bcl-2, recettore degli estrogeni [ER] e recettore del progesterone [PR].<sup>36,78,79</sup> Secondo lo studio di Gadducci *et al.*<sup>8</sup> sono p16, p53 e Ki-67 ad essere significativamente aumentati nei LMS rispetto ai leiomiomi. Tuttavia, l'esperienza legata all'utilizzo di questi biomarcatori è ancora molto limitata e di conseguenza il loro utilizzo nella pratica diagnostica non rientra ancora tra le raccomandazioni.

## 4.1 Leiomiomi

I leiomiomi sono neoplasie benigne composte da cellule muscolari lisce e fusate, che presentano nuclei allungati con estremità smussate e citoplasma eosinofilo affusolato. Le cellule sono disposte in fascicoli intrecciati che si intersecano ad angolo retto. Questi tumori sono generalmente

ipercellulari rispetto al miometrio sano circostante.<sup>80</sup>

Nella quasi totalità dei casi i leiomiomi a cellule fusate (conosciuti anche come leiomiomi classici, tipici o convenzionali) presentano delle caratteristiche istologiche di benignità: indice mitotico inferiore a cinque mitosi per 10 HPF, lieve atipia cellulare, nessuna necrosi delle cellule tumorali (come precedentemente citato ci si riferisce alla necrosi coagulativa). Nonostante il basso indice mitotico si tratta comunque di tumori capaci di raggiungere notevoli dimensioni in tempi piuttosto ristretti; infatti, sono in grado di aumentare il loro volume fino al 138% in 6 mesi.<sup>23</sup>

Generalmente si tratta di tumori con una vascolarizzazione aberrante che causa aree di ischemia e necrosi. Nelle aree necrotiche le cellule di muscolatura liscia vengono sostituite da tessuto di degenerazione di tipo ialino, calcifico, cistico, mixoide, emorragico.<sup>80</sup>

Esistono delle varianti istologiche di leiomioma che, però, non possono essere distinte le une dalle altre né tramite la clinica, essendo caratterizzate dagli stessi segni e sintomi, né dall'imaging; l'unico modo efficace per diagnosticare le varianti istologiche è mediante esame anatomico patologico in seguito a resezione o ad isterectomia.

#### Leiomioma cellulare

Si definisce così un leiomioma con una cellularità significativamente aumentata rispetto al miometrio sano circostante, questa caratteristica, di per sé, non è un elemento preoccupante nei tumori della muscolatura liscia dell'utero.

Se correttamente diagnosticati i leiomiomi cellulari non dovrebbero rappresentare più del 5% della totalità dei leiomiomi.

Macroscopicamente non differisce dal leiomioma classico, tuttavia, a volte, può avere un aspetto più carnoso con una superficie marrone. A livello istologico possono esserci delle difficoltà nella diagnosi differenziale con noduli stromali endometriali e sarcomi stromali endometriali a causa della densa cellularità, vascolarizzazione prominente e margini irregolari. Tuttavia, il leiomioma cellulare presenta alcune caratteristiche peculiari, tra cui vasi di grosso calibro con spessa parete muscolare, pattern di crescita fascicolare e assenza di istiociti schiumosi. Generalmente presenta uno scarso tasso di mitosi (<2/10 HPF) e l'atipia cellulare è lieve o assente.<sup>81</sup>

#### Leiomioma con nuclei bizzarri

Il leiomioma con nuclei bizzarri è un sottotipo di leiomioma contenente cellule multinucleate, con nuclei multilobati oppure nuclei giganti e ipercromici; inoltre, è frequente il riscontro di pseudo

inclusioni citoplasmatiche e citoplasma abbondante, granulare ed eosinofilo. La distribuzione di queste cellule all'interno della massa tumorale può essere focale, multifocale oppure diffusa.

Le caratteristiche morfologiche di questa tipologia di leiomioma possono essere sovrapposte a quelle dei leiomiomi carenti di fumarato idratasi (FH).<sup>82</sup>

Considerando la presenza di importanti atipie cellulari l'aspetto più importante nella diagnosi dei leiomiomi con nuclei bizzarri è la diagnosi differenziale con uno STUMP o un LMS.<sup>2</sup>

#### Leiomioma mitoticamente attivo

Si tratta di un sottotipo di leiomioma caratterizzato da un indice mitotico > 5-10 mitosi per HPF (la soglia è differente a seconda del patologo che fa diagnosi). Il fattore che con più probabilità influenza l'indice mitotico della muscolatura liscia è il progesterone.

In alcuni casi può essere aumentata anche la cellularità; è fondamentale anche in questo caso la diagnosi differenziale con STUMP e LMS. Nei casi, seppur rari, in cui la conta mitotica è molto elevata (>15 per HPF) sarebbe più corretto classificare il tumore come STUMP.

#### Leiomioma mixoide

I leiomiomi mixoidi sono caratterizzati dalla presenza di una ricca matrice extracellulare composta da proteoglicani e glicosaminoglicani.<sup>83</sup> Lo stroma mixoide può essere più o meno rappresentato all'interno della massa tumorale e può essere disposto anche in modo focale; per poter definire un leiomioma come mixoide questa deve costituire almeno il 50% del volume del tumore.<sup>84</sup> Anche in questo caso è fondamentale la diagnosi differenziale con LMS mixoidi e STUMP che può essere fatta in presenza di un tumore ben circoscritto, con atipia citologica lieve ed uniforme, <2 figure mitotiche per HPF e assenza di necrosi delle cellule tumorali.<sup>84</sup>

#### Leiomioma epitelioido

I leiomiomi epitelioidi sono tumori della muscolatura liscia costituiti da cellule con forma da arrotondata a poligonale che ricordano le cellule epiteliali e che costituiscono almeno il 50% della massa tumorale. Un tumore epitelioido della muscolatura liscia è classificato come leiomioma quando è ben circoscritto, manca di atipie citologiche significative, ha un indice mitotico <3 per 10 HPF e non presenta necrosi delle cellule tumorali.<sup>83,84</sup> Risulta fondamentale differenziarlo da un carcinoma endometrioido, vista la particolare forma delle cellule tumorali simil-epiteliali, ma nella diagnosi

differenziale è importante anche distinguerlo da un tumore a cellule epitelioidi perivascolari (PEComa).<sup>85</sup>

## 4.2 STUMP

Gli STUMP sono tumori che presentano caratteristiche intermedie che non consentono una diagnosi univoca né di leiomioma né di LMS.

Nel 1994 Bell *et al.*<sup>86</sup> svolgendo un'analisi retrospettiva di 213 casi di tumori della muscolatura liscia dell'utero di significato incerto (non definendoli STUMP), hanno identificato quattro differenti classi istologiche:

1. Leiomioma atipico (esperienza limitata) (AL-LE): si tratta di un tumore con atipia focale o multifocale di grado moderato o grave, assenza di necrosi delle cellule tumorali e conta mitotica uguale o inferiore a 10 per 10 HPF;
2. Tumore del muscolo liscio a basso potenziale maligno (SMT-LMP): in questo caso è presente necrosi delle cellule tumorali, l'atipia cellulare è assente o minima e le mitosi sono inferiori a 10 per 10 HPF;
3. Leiomioma atipico con basso rischio di recidiva (AL-LRR): tumore che mostra atipia diffusa da moderata a grave, assenza di necrosi delle cellule tumorali e conta mitotica inferiore a 10 per 10 HPF;
4. Leiomioma mitoticamente attivo (esperienza limitata) (MAL-LE): in questo caso l'elemento caratteristico è l'aumentata attività mitotica che è pari o superiore a 20 per 10 HPF, con assenza di atipia e di necrosi delle cellule del tumore.

In seguito alla pubblicazione di questa classificazione, la WHO ha introdotto la definizione di STUMP per racchiudere tutti i tumori della muscolatura liscia che presentano caratteristiche istologiche preoccupanti che possono suggerire un comportamento maligno, ma che non soddisfano completamente i criteri di malignità di Stanford per la diagnosi di LMS e, d'altra parte, non possono neanche essere classificati come leiomiomi.<sup>6</sup>

Nel 2009 Guntupalli *et al.*<sup>7</sup> con uno studio sulle caratteristiche istopatologiche e gli esiti di 41 casi con diagnosi istologica certa di STUMP identificano cinque differenti categorie:

1. Tumori caratterizzati da necrosi tumorale ma assenza di atipia e indice mitotico < 10/10 HPF;
2. Tumori caratterizzati da atipia diffusa, assenza di necrosi delle cellule tumorali e indice mitotico < 10/10 HPF;

3. Tumori con un indice mitotico aumentato (>20/10 HPF) ma in assenza di atipia e di necrosi tumorale;
4. Tumori con aumentata attività cellulare con indice mitotico > 4/10 HPF;
5. Tumori caratterizzati da margini irregolari o invasione vascolare alla periferia della massa tumorale.

Si osserva in questa classificazione l'introduzione di alcune caratteristiche assenti nella classificazione di Stanford come l'aspetto dei margini, l'invasione vascolare e la cellularità del tumore.

Successivamente, nel 2010, D'angelo e Prat<sup>36</sup> hanno proposto i seguenti criteri per la diagnosi istologica di STUMP:

1. Presenza di necrosi delle cellule tumorali in un leiomioma tipico;
2. Necrosi di tipologia incerta con una conta mitotica maggiore o uguale a 10 per 10 HPF o atipia marcata e diffusa;
3. Atipia marcata focale o diffusa con una conta mitotica borderline;
4. Necrosi tumorale di difficile classificazione.

In aggiunta rimarcano anche l'importanza che il patologo faccia ogni sforzo per classificare un tumore della muscolatura liscia come benigno o maligno in quanto la maggior parte dei tumori classificati come STUMP ha un esito favorevole.

Un ulteriore contributo nell'espansione dei parametri istologici necessari per la diagnosi di STUMP è stato dato da Gupta *et al.*<sup>33</sup> che hanno riportato le caratteristiche cliniche e patologiche di 22 casi di STUMP. In questo studio gli autori hanno proposto le seguenti categorie diagnostiche:

1. Neoplasie in cui la necrosi tumorale è ambigua e difficile da classificare;
2. Tumori con atipia diffusa o multifocale e una conta mitotica borderline (8-9 mitosi per 10 HPF);
3. Tumori con assenza di atipie o necrosi ma con una conta mitotica superiore a 15 per 10 HPF;
4. Tumori con presenza di necrosi coagulativa/ischemica in foci multifocali o di forma irregolare;
5. Tumori con morfologia epiteloide e tumori mixoidi con atipia o aumentato indice proliferativo;
6. Tumori caratterizzati da invasione miometriale in assenza di altre caratteristiche istologiche di malignità;
7. Presenza di figure mitotiche atipiche in assenza di altre caratteristiche istologiche di malignità.

In questo ultimo lavoro le caratteristiche più comunemente associate ad un peggior outcome includevano l'atipia moderata o severa, caratteristiche epitelioidi, margini infiltrativi o irregolari, mitosi atipiche, invasione vascolare. Di conseguenza, gli autori hanno suggerito di includere la differenziazione epiteloide, mitosi atipiche, invasione vascolare, margini infiltrativi/irregolari nei criteri diagnostici per STUMP.

Histopathological parameters for the diagnosis of STUMP according to the largest published works.

Reference	Atypia	MF/10 HPF	Necrosis	Other features
Bell [1] Ip [3]	Focal/multifocal moderate-severe	≥10	Absent	-
	Absent or minimal atypia	<10	Present	-
	Diffuse moderate-to-severe	<10	Absent	-
	atypia			
	None	≥20	Absent	-
Oliva [2]	None	≥10	Uncertain	-
	Diffuse/multifocal, moderate to severe	Borderline/uncertain	Absent	-
	Focal/multifocal moderate-severe	<10	Absent	-
	Diffuse	<10	Absent	-
	None	<10	Present	-
Guntupalli [4]	None	>15	Absent	-
	None	<10	Present	-
	Diffuse	<10	Absent	-
	None	>20	Absent	-
	None	>4	Absent	-
D' Angelo and Prat [49]	-	-	-	Increased cellularity Irregular margins or vascular invasion
	None	Any	Present	-
	None	≥10	Ambiguous/difficult to classify	-
	Marked-diffuse	<10	Ambiguous/difficult to classify	-
	Marked-diffuse/focal	Borderline (8-9)	Absent	-
Gupta [10]	-	-	Ambiguous/difficult to classify	-
	Diffuse or multifocal	Borderline (range 8-9)	Absent	-
	None	>15	Absent	-
	-	-	-	Coagulative/ischemic necrosis in multifocal or irregularly-shaped foci
	-	-	-	Epithelioid morphology/myxoid smooth muscle tumors showing atypia
-	-	-	Epithelioid morphology/myxoid smooth muscle tumors showing increased proliferative activity	
-	-	-	Myometrial invasion	
-	-	-	Atypical mitotic figures	

Tabella 3: classificazione dei parametri istologici diagnostici di STUMP

### 4.3 LMS

La maggior parte dei LMS si presenta come una massa solitaria, generalmente di grosse dimensioni (il 75% ha dimensioni >5cm alla diagnosi). Questi tumori crescono invadendo il miometrio circostante o, molto raramente, crescono come masse polipoidi nella cavità uterina; macroscopicamente presentano una superficie morbida con aree di emorragia e di necrosi.<sup>6</sup> Per fare diagnosi di LMS è necessario che il tumore presenti almeno due delle seguenti tre caratteristiche istologiche: indice mitotico > 10 mitosi per 10 HPF, atipia citologica da moderata a grave, presenza di necrosi delle cellule tumorali.<sup>86</sup> Ulteriori caratteristiche istologiche che possono essere presenti in un LMS includono cellule fusiformi con nuclei smussati, nuclei pleiomorfi, ipercellularità con pattern di crescita fascicolare, necrosi coagulativa e infiltrazione del miometrio sano circostante.<sup>6</sup>

Ciò che rende in alcuni casi la diagnosi complessa ed incerta è che non sempre sono presenti tutte le caratteristiche istologiche appena citate e, inoltre, può capitare che anche un leiomioma presenti alcune di queste caratteristiche.<sup>87</sup>

La necrosi coagulativa è uno degli aspetti chiave nella diagnosi di LMS e va distinta dalla necrosi ialina, che può essere osservata sia in lesioni dal comportamento maligno, sia in lesioni dal comportamento benigno; la distinzione tra le due è un aspetto complesso che può rappresentare una sfida anche per i patologi più esperti.<sup>77</sup>

Alcune caratteristiche addizionali che dovrebbero essere presenti in un LMS sono quelle del fenotipo di cellula muscolare liscia: citoplasma eosinofilo e fibrillare e cellule con nuclei smussati. L'invasione vascolare è presente in circa il 10-20% dei casi.

I LMS non presentano una classificazione in gradi in quanto non esiste una correlazione tra gradi più alti e minor sopravvivenza come invece accade per i carcinomi.<sup>88</sup>

La diagnosi differenziale da un punto di vista istologico include gli STUMP, le varianti dei leiomiomi (in particolare leiomioma cellulare, leiomioma mitoticamente attivo, leiomioma con nuclei bizzarri), sarcoma endometriale stromale, mesotelioma sarcomatoide e in alcuni rari casi anche con carcinomi (quando il LMS assume un aspetto epitelioide).

I LMS mixoidi ed epitelioidi sono molto rari ma vanno tenuti in considerazione in quanto il blando pleiomorfismo nucleare e la ridotta attività mitotica che li caratterizzano possono portare a confusione diagnostica. Si tratta di varianti rare, ma spesso aggressive, nonostante un'atipia cellulare lieve, indice mitotico basso e assenza di necrosi.<sup>84,89</sup>

Il cariotipo delle cellule del LMS è generalmente complesso con aberrazione cromosomiche strutturali e numeriche. Si possono osservare mutazioni puntiformi di TP53 oltre che la perdita di eterozigosi in numerosi geni oncosoppressori (es. RB1, DCC, NM23, WT1, P16...).<sup>90,91</sup>

## 5. DIAGNOSTICA

La diagnosi differenziale tra un leiomioma, un LMS e uno STUMP non può basarsi esclusivamente sulla clinica, in quanto queste tre entità spesso hanno una presentazione sovrapponibile. Risulta quindi di fondamentale importanza l'utilizzo della diagnostica per immagini, dal momento che il management chirurgico di queste lesioni sarà del tutto differente richiedendo un approccio per lo più conservativo per le lesioni benigne e un approccio radicale per quelle maligne.

I sistemi di imaging non invasivo più utilizzati sono quelli standard come l'ecografia trans addominale (TAS), l'ecografia trans vaginale (TVS), la risonanza magnetica (MRI) e la tomografia

computerizzata (TC). Accanto a queste metodiche morfologiche tradizionali si stanno sviluppando anche tecnologie di imaging funzionale e quantitativo come la valutazione della diffusione nella risonanza magnetica e la tomografia ad emissione di positroni/TC (PET/TC); questi esami possono essere utili sia nella valutazione iniziale della malattia ma anche nella stadiazione e nella valutazione post trattamento, in particolare le tecniche di imaging quantitativo sono sempre più usate per la stratificazione prognostica pretrattamento.<sup>13</sup>

## 5.1 Ecografia

L'ecografia è generalmente la prima metodica diagnostica impiegata nella diagnosi della patologia del miometrio, grazie alla sua alta sensibilità e alta specificità. L'ecografia trans vaginale (TVS) è la tecnica prediletta in quanto consente una miglior valutazione soprattutto in pazienti con utero retroverso o retroflesso, inadeguata distensione vescicale, eccesso di gas nell'intestino oppure nelle pazienti obese; tuttavia, l'ecografia trans addominale (TAS) risulta più indicata nelle situazioni in cui ci si trovi davanti a grosse masse o a leiomiomi del fondo uterino.<sup>13</sup> Il più grande limite di entrambe le metodiche è che si tratta di esami operatore dipendenti, di conseguenza la loro efficacia è strettamente correlata all'esperienza e alle capacità dell'operatore.<sup>92</sup>

Durante l'esecuzione dell'ecografia è sempre indicata l'esecuzione del color doppler, in quanto la vascolarizzazione può essere un importante predittore di malignità della lesione. Si tratta di una metodica che resta di prima scelta grazie all'accessibilità dei costi e alla sicurezza per la paziente essendo priva di radiazioni ionizzanti.

Il valore dell'ecografia per la diagnosi dei tumori mesenchimali dell'utero è stato provato per la prima volta da uno studio condotto da Bonneau *et al.* nel 2014 in cui sono stati confrontati i risultati dell'ecografia e della risonanza magnetica di 85 leiomiomi e 23 tumori mesenchimali maligni o di incerto potenziale di malignità. Il risultato è stato che la presenza di un singolo tumore, l'assenza di ombre acustiche e la presenza di versamento ascitico erano associate ad un potenziale maligno o incerto. Tuttavia, un grande limite è rappresentato dal considerare LMS e STUMP come unica entità.<sup>93</sup>

I leiomiomi all'indagine ecografica appaiono come masse ben definite, solide, concentriche che mostrano un grado variabile di ombre acustiche; si tratta di lesioni in cui l'ecogenicità può variare di molto a seconda della quantità di tessuto fibroso e di calcificazioni presenti all'interno della massa passando da lesioni ipoecogene a isoecogene fino a lesioni iperecogene. In alcuni casi possono presentare delle aree anecogene come risultato di una necrosi centrale e in altri casi di più complessa

diagnosi possono presentarsi come piccole masse isoecogene in cui l'unico segno ecografico visibile è un rigonfiamento del miometrio circostante. Nel caso dei leiomiomi del segmento uterino inferiore un possibile segno ecografico di facile riconoscimento è rappresentato dall'accumulo di fluido nel canale endometriale. All'analisi con l'eco color doppler i leiomiomi mostrano una vascolarizzazione periferica arteriosa lieve o moderata con numerosi vasi che vascolarizzano la massa (a differenza dei polipi endometriali in cui è presente un singolo vaso). La diagnosi differenziale è fondamentale e tra le entità più complesse da distinguere da un mioma troviamo l'adenomiosi e i polipi endometriali.<sup>92,94</sup>

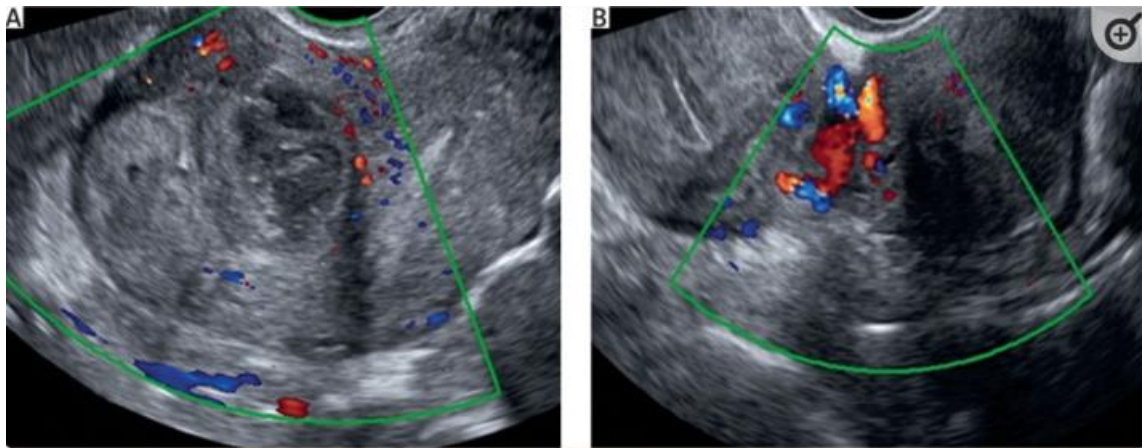
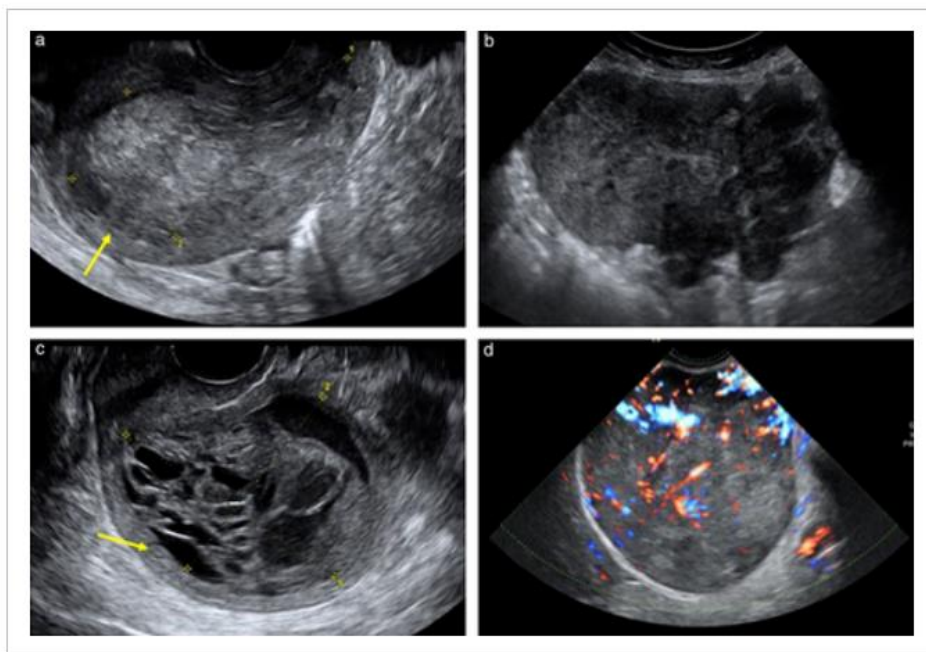


Immagine 2: A) ecocolordoppler di leiomioma intramurale; B) ecocolordoppler di leiomioma pedunculato <sup>92</sup>

I LMS appaiono generalmente come masse solide disomogenee, di grosse dimensioni con aree cistiche e pareti irregolari; in circa un quinto dei casi le masse sono associate a ombre interne ma raramente ombre a ventaglio (che sono invece tipiche dei leiomiomi) e sono caratterizzate da una vascolarizzazione (prevalentemente centrale) da moderata a forte, la presenza di calcificazioni è invece molto rara e infatti correla con una lesione di tipo benigno. È stata proposta una definizione “*cooked appearance*” per descrivere l'aspetto del tessuto solido nei sarcomi che corrisponde molto probabilmente alle aree di necrosi. Esattamente come i leiomiomi, anche i LMS possono presentarsi con una ecogenicità molto variabile e frequenti aree di necrosi centrale.<sup>95</sup>



**Figure 2**

[Open in figure viewer](#)

[↓ PowerPoint](#)

Ultrasound images of uterine sarcomas. According to assessment by original examiner, there was normal visible myometrium (yellow arrows) in 149/195 (76.4%) cases (a,c), 151/195 (77.4%) sarcomas manifested inhomogeneous echogenicity of solid tissue (a,b,d), 87/195 (44.6%) contained cystic areas (c), 103/195 (52.8%) had irregular tumor borders (b) and 127/187 (67.9%) manifested moderate or rich vascularization (d).

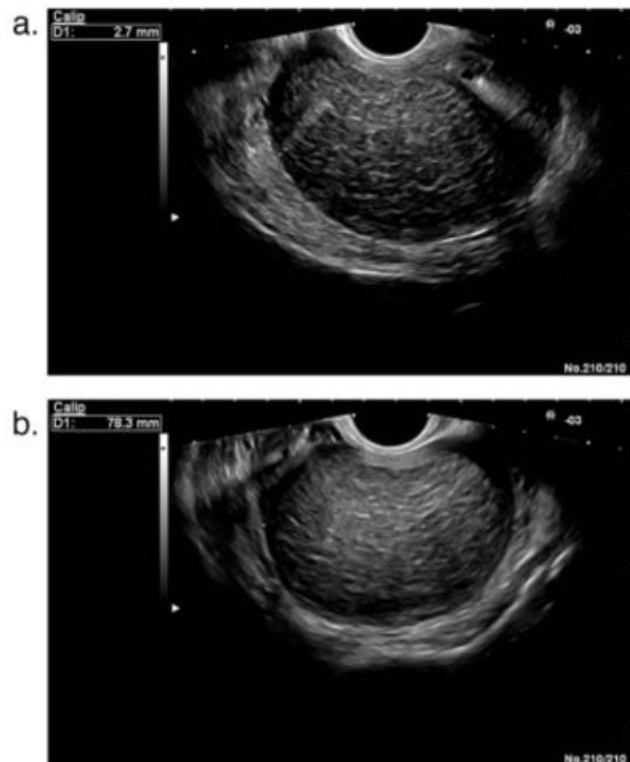
### *Immagine 3: immagini ecografiche di LMS uterini*<sup>95</sup>

Confrontando l'indice di resistenza arteriolare medio tra leiomiomi e LMS non si è trovata alcuna differenza statisticamente significativa.<sup>92,94</sup>

Per quanto riguarda gli STUMP sono stati ottenuti risultati diversi a seconda dello studio condotto. Bacanakgil *et al.*<sup>34</sup> propongono come elementi predittivi di STUMP la presenza di una singola lesione iperecogena con caratteristiche solide, la presenza di un'ombra acustica e margini netti. Infatti, secondo uno studio retrospettivo condotto da questo gruppo su 6 pazienti con diagnosi istopatologica di STUMP almeno l'80% delle masse era caratterizzato da una capsula tumorale ben definita, e di conseguenza margini netti, il 65% aveva un aspetto ecografico iperecogeno in assenza di aree cistiche (tipiche invece dei sarcomi) e con ombreggiamento acustico, tutte le lesioni erano eterogenee e il 50% presentava calcificazioni.

I risultati ottenuti da questo studio non sono stati confermati da studi successivi in cui si è osservato che circa il 90% degli STUMP non presentava ombre acustiche e nessuno aveva calcificazioni e come dato aggiuntivo si è osservata la contemporanea presenza di un leiomioma in una buona percentuale di casi. Quest'ultimo studio porta quindi a descrivere ecograficamente gli STUMP come lesioni singole o multiple con ecogenicità mista, prive di calcificazioni e di ombre acustiche nella maggior parte dei casi, con margini regolari, aree microcistiche anecogene e vascolarizzazione variabile sia

circonferenziale (come nei leiomiomi) sia intralesionale (come nei sarcomi).<sup>96</sup>



*Immagine 4: immagine ecografica di STUMP con aree microcistiche, no aree di ombra e margini ben definiti.* <sup>96</sup>

## 5.2 Tomografia computerizzata

La TC ha un ruolo molto limitato nella diagnosi iniziale e nella stadiazione locale delle lesioni del miometrio.<sup>13</sup> Rispetto alle altre metodiche, però, ha un'alta sensibilità per le calcificazioni, frequentemente presenti nei leiomiomi e, seppur molto più raramente, in alcuni casi presenti anche nei LMS.<sup>97</sup>

Inoltre, è molto utile nella prima valutazione di una paziente con dolore addominale acuto; questo, infatti, può essere il sintomo di una torsione di un leiomioma sottosieroso che può successivamente

andare incontro a necrosi emorragica rendendo più complessa la diagnosi.<sup>98,99</sup>



*Immagine 5: immagine TC di torsione acuta di un leiomioma peduncolato.*<sup>98</sup>

Nelle pazienti con LMS la TC ha come utilizzo principale quello di stadiare la malattia tumorale cercando possibili metastasi a distanza (in particolare a fegato e polmoni) e di valutare l'eventuale ricorrenza post-terapia.<sup>100</sup>

La TC è anche la prima scelta per valutare l'anatomia pelvica post-operatoria consentendo la diagnosi di eventuali complicanze chirurgiche come l'ostruzione o il danno intestinale o ureterale, danni vescicali e fistole urinarie.<sup>101</sup>

### 5.3 Risonanza magnetica

La risonanza magnetica è la metodica di prima scelta per la valutazione delle masse del miometrio e per delineare la diffusione locale delle masse maligne.<sup>102-104</sup>

In accordo con le linee guida della Società Europea di Radiologia Urogenitale la RM prima di essere effettuata richiede un periodo di digiuno e una vescica moderatamente distesa per poter dare delle immagini ottimali, in associazione alla somministrazione di farmaci antiperistaltici per ottimizzare la qualità delle immagini. Ad oggi esiste uno standard di sequenze che vanno effettuate e l'intensità di segnale della lesione da valutare viene confrontata rispettivamente in T1 con il midollo osseo della sinfisi pubica, in T2 con il miometrio circostante e in DWI con l'endometrio.

Generalmente in RM i leiomiomi si presentano come masse ben delineate di dimensioni variabili che

possono essere singole o multiple, con bassa intensità di segnale nelle sequenze T1 e T2 pesate a causa dell'alto contenuto di cellule muscolari lisce. Il coefficiente di diffusione è generalmente basso a meno che non ci sia una degenerazione cistica o mixomatosa della massa tumorale. L'enhancement è variabile, si osserva una precoce presa di contrasto nelle lesioni ad alta cellularità e una ridotta presa di contrasto nei leiomiomi degenerati. È frequente la presenza di calcificazioni che suggeriscono che la massa ha subito necrosi, tipicamente in leiomiomi in cui è avvenuta una riduzione del flusso ematico (per embolizzazione dell'arteria uterina o dopo il parto) oppure nelle pazienti in post menopausa in cui si osserva un fisiologico calo del flusso sanguigno all'utero.<sup>105</sup>

I LMS si presentano come grosse masse solitarie ed eterogenee con margini scarsamente demarcati; dimensioni superiori a 10 cm sono associate ad una prognosi peggiore. L'aspetto nelle sequenze T1 pesate è variabile, può essere a bassa o intermedia intensità come per i leiomiomi oppure, più frequentemente, mostrare aree ad alta intensità che corrispondono ad aree di necrosi o emorragia. Nelle sequenze T2 pesate i LMS mostrano alta intensità così come sono alti i valori del coefficiente di diffusione. In seguito alla somministrazione intravenosa di mezzo di contrasto hanno un enhancement precoce, vigoroso ed eterogeneo con frequenti aree di necrosi centrale che non captano mezzo di contrasto.<sup>13,106,107</sup>

Quindi, una massa con alta intensità di segnale (in particolare nelle sequenze T2 pesate) ha un alto valore predittivo negativo, tuttavia, non si può affermare che l'elevata intensità di segnale sia un segno inequivocabile di sarcoma uterino.<sup>108,109</sup>

Gli aspetti che sembrano essere più frequentemente associati al LMS sono quindi l'iperintensità, l'assenza di calcificazioni, margini irregolari ed emorragia intralesionale.<sup>107</sup> Secondo uno studio effettuato successivamente da Lakhman *et al.* le caratteristiche maggiormente rappresentate da una lesione maligna sembrano essere: bordi nodulari, aree scure in T2, aree centrali prive di enhancement ed emorragia intralesionale. La combinazione di tre o più di queste caratteristiche sembra essere un elemento chiave nella distinzione tra leiomioma atipico e LMS.<sup>40</sup>

Anche la risonanza magnetica ponderata per diffusione sembra avere un importante ruolo per distinguere i leiomiomi classici dai sarcomi e dai leiomiomi cellulari.<sup>110</sup>

È stata ideata una flowchart che mette insieme le caratteristiche che la lesione può avere nelle immagini ottenute con la risonanza magnetica e aiuta nella diagnosi differenziale tra lesioni benigne e lesioni maligne. Tuttavia, non esiste ancora una raccomandazione definitiva per la gestione della paziente basata esclusivamente sull'imaging preoperatorio ed è fondamentale effettuare ulteriori ricerche.<sup>11,13</sup>

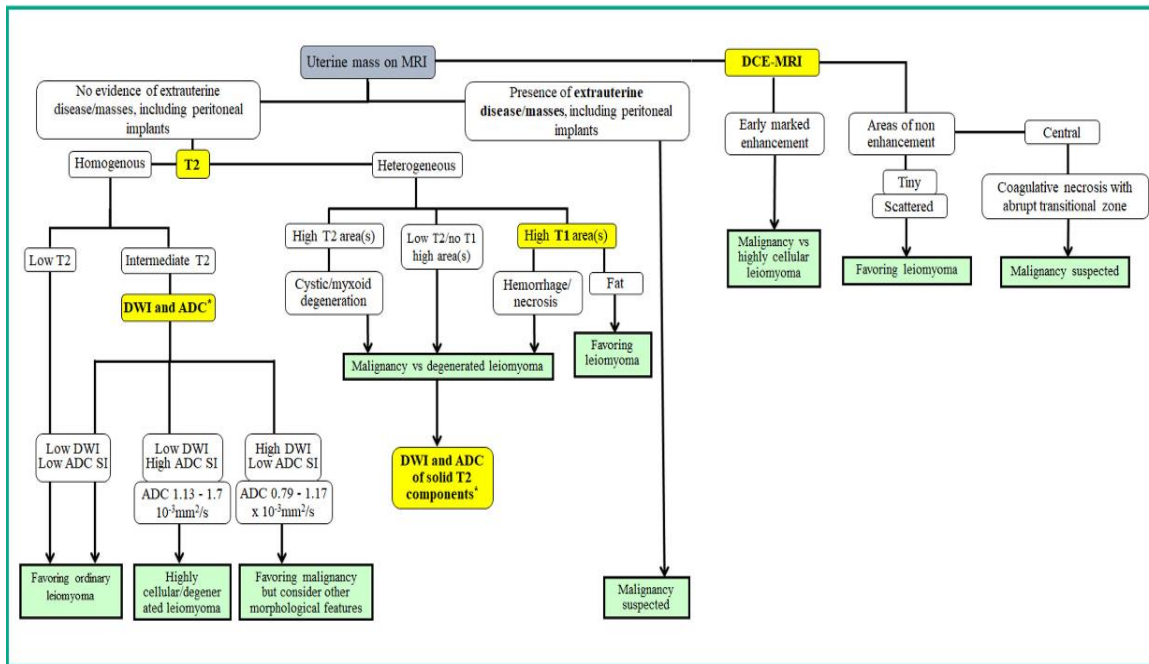


Immagine 6: algoritmo diagnostico delle masse uterine mediante MRI <sup>13</sup>

## 5.4 18F-Fluorodesossiglucosio PET/TC

La combinazione della tecnologia della TC, che da sola non consente una diagnosi differenziale tra leiomioma e LMS, con la 18F-Fluorodesossiglucosio PET ha dimostrato di avere utilità nella diagnosi delle lesioni uterine che rimangono indeterminate in seguito all'esecuzione della RM.<sup>111,112</sup>

Infatti, nelle cellule tumorali si assiste ad una up regolazione dei trasportatori di glucosio (GLUT) per un aumento degli enzimi cellulari e per una sintesi di nuovi trasportatori dovuta alla mutazione di oncogeni.<sup>113</sup> In base a questo ci si aspetta un maggior uptake di 18F-FDG in un LMS rispetto a un leiomioma.

Sono stati svolti alcuni studi a riguardo, tra questi lo studio svolto da Umesaki *et al.* ha dimostrato una sensibilità del 100% della 18F-FDG PET nella diagnosi di LMS con un cut off di SUV di 2,5;<sup>114</sup> tuttavia, la casistica presa in analisi era molto limitata e, inoltre, studi successivi hanno dimostrato che in rari casi anche i leiomiomi, in particolare i leiomiomi cellulari o leiomiomi ipervascolarizzati<sup>115</sup>, possono avere un SUV anche fino a 9. Di conseguenza un alto valore di SUV può orientare verso una diagnosi di LMS ma non consente di escludere a priori una diagnosi di leiomioma.<sup>116</sup>

Più di recente, Kusunoki *et al.*<sup>112</sup> hanno dimostrato con uno studio condotto su 15 LMS e 19 leiomiomi, che la media di SUV era di 12 nei LMS e 4,1 nei leiomiomi. Un SUV maggiore di 7,5 consente di escludere la diagnosi di leiomioma con una sensibilità del 80,8% e una specificità del 100%, inoltre, l'outcome chirurgico tende ad essere correlato al valore di SUV anche se non in maniera statisticamente significativa.

Inoltre, è stato valutato che l'utilizzo di 3'-deossi-3'- [18 F]-flurotimidina (18F-FLT) come tracciante alternativo al 18F-FDG consente di ottenere una miglior performance diagnostica con un minor uptake anche nei leiomiomi che mostravano un uptake aumentato con il 18F-FDG; di conseguenza, questo tracciante potrebbe essere utilizzato in tutte le lesioni in cui la diagnosi resta incerta.<sup>117</sup>

Uno studio condotto da Ho *et al.* conferma la correlazione esistente tra SUVmax e aggressività del tumore, in particolare dimostra che alti valori di SUVmax sono caratteristici di lesioni con un alto indice mitotico. Lo stesso studio si sofferma poi sulle caratteristiche del pattern di assorbimento del glucosio; essendo la necrosi coagulativa un criterio diagnostico fondamentale per i LMS si è ipotizzato che un parametro in grado di riflettere la presenza di questo tipo di necrosi potesse essere molto utile nella distinzione tra lesioni benigne e maligne. Dal punto di vista istologico la necrosi coagulativa è caratterizzata dal brusco passaggio da cellule tumorali attive e tessuto necrotico, di conseguenza un margine netto tra tessuto vitale e necrotico può essere un importante segno distintivo dei LMS nelle immagini PET. Questo tipo di pattern di uptake prende il nome di "hollow ball", e risulta effettivamente assente in tutti i casi di leiomioma presi in considerazione e può essere considerato caratteristico delle lesioni maligne o a potenziale incerto di malignità. Tuttavia, in alcuni casi questo segno può essere assente o equivoco e in questi casi lo studio suggerisce l'utilità del rapporto *metabolic tumor/necrosis ratio* che può essere calcolato sulla base delle immagini PET.<sup>103</sup>

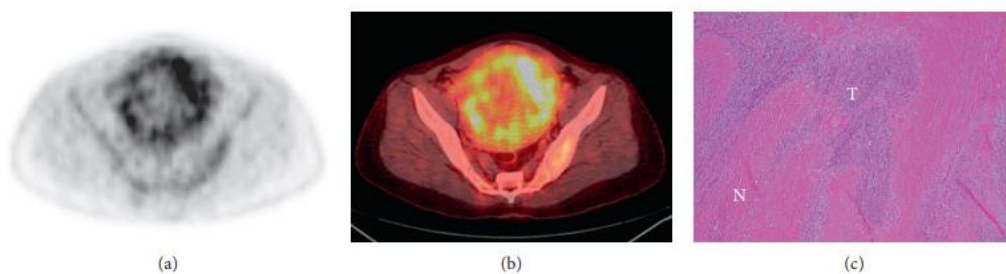


FIGURE 4: Illustrative images of a patient with a smooth muscle tumor of uncertain malignant potential (STUMP). The "hollow ball" sign was evident on the transaxial view of FDG PET image (a) and PET/CT fusion image (b). The histopathological examination revealed foci of necrosis (letter N) among tumor cells (letter T) (hematoxylin and eosin staining, 100x magnification) (c).

*Immagine 7: immagini di STUMP, con evidente hollow ball sign*<sup>103</sup>

L'utilità della PET/TC, oltre che nella diagnosi differenziale tra lesioni benigne e lesioni maligne, si esplica anche nella rilevazione di metastasi peritoneali o a distanza, nella ricerca di recidiva di malattia e come fattore prognostico.<sup>13</sup>

## 5.5 Biomarcatori

I biomarcatori sono componenti biologici che possono essere ottenuti dal siero o da altri tessuti facilmente accessibili e riflettono processi fisiologici o patologici. I biomarcatori in grado di aiutare nella diagnosi, differenziazione, stratificazione del rischio e valutazione della risposta alla terapia dei leiomiomi e LMS sono ad oggi assenti dalla pratica clinica in quanto mancano di un valore predittivo tale da migliorare il processo diagnostico; infatti, un biomarcatore per essere considerato adeguato deve avere una sensibilità > 75% e una specificità > 99%.

Sono stati presi in considerazione diversi biomarcatori tra cui prolattina, antigene HLA-G, VEGF, grelina, LDH, CA125.<sup>118</sup>

In uno studio recente condotto su 2211 pazienti con una diagnosi definitiva di leiomioma e 43 pazienti con una diagnosi di sarcoma, combinando con una relazione algebrica il valore di LDH3 ed LDH1 si raggiungeva una sensibilità del 100% e una specificità del 99,6% nel predire i sarcomi. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per confermare l'utilità dell'LDH come fattore diagnostico e prognostico così come per gli altri marker precedentemente citati.<sup>119</sup>

### **Marcatori di infiammazione sistemica**

Si tratta di parametri semplici, innovativi e a basso costo che consentono di valutare lo stato infiammatorio di un paziente. In particolare, comprendono:

- Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR)
- Platelet-to-lymphocyte ratio (PLR)
- Systemic immune-inflammation index (SII)

Questi parametri sono molto utili in diversi campi di applicazione.

Ad esempio, NLR<sup>120</sup> è stato utilizzato nella stratificazione della mortalità per eventi cardiaci maggiori<sup>121,122</sup> e per l'infezione da Sars-Cov2<sup>123</sup>, oltre che per la valutazione prognostica in diversi tipi di tumore<sup>124</sup> (colon<sup>125</sup>, polmone<sup>126</sup>, esofago<sup>127</sup>, pancreas<sup>128</sup>, mammella<sup>129</sup> e rene<sup>130</sup>) e come predittore e marker di patologie infiammatorie ed infettive e di complicanze post-operatorie.<sup>131,132</sup>

Nel dettaglio, in ambito ginecologico, sono stati condotti numerosi studi che indagano il possibile utilizzo di questi marcatori di infiammazione sistemica nei tumori dell'endometrio<sup>133-135</sup>, tumori della cervice uterina<sup>136</sup>, tumori dell'ovaio<sup>137</sup> e nei sarcomi uterini<sup>138</sup>; in tutte queste patologie tumorali un elevato NLR si associa a una prognosi infausta e quindi a risultati clinici negativi. In uno studio molto recente sono stati indagati valori diagnostici di parametri ematologici dimostrando che un NLR > 2,157 predice in maniera significativa la presenza di un LMS consentendo quindi di fare diagnosi differenziale tra massa benigna e maligna.<sup>139</sup>

## 6. MANAGEMENT CHIRURGICO

### 6.1 Leiomiomi

Il trattamento è riservato ai casi sintomatici di leiomioma; nelle pazienti asintomatiche è raccomandato esclusivamente il follow-up annuale, in particolare nelle pazienti che sono vicine alla menopausa.

I leiomiomi rappresentano il modello ottimale sul quale sviluppare nuove tecniche chirurgiche mini-invasive che possono essere successivamente applicate anche a tumori maligni, si tratta infatti di tumori con margini netti e facili da individuare, oltre che tumori benigni in cui una resezione non radicale non ha conseguenze per la paziente.

Nelle donne sintomatiche esiste una vasta gamma di trattamenti disponibili che spaziano dalla gestione farmacologica dei sintomi al trattamento chirurgico di miomectomia fino all'isterectomia. La scelta del trattamento dipende da diversi fattori, tra cui la sintomatologia, il desiderio di fertilità, l'età della paziente, il numero, la sede e la dimensione dei leiomiomi.<sup>140,141</sup>

#### **Trattamento farmacologico**

Il trattamento farmacologico non è un trattamento radicale in quanto non consente l'eliminazione del leiomioma ma ne controlla esclusivamente la sintomatologia, in alcuni casi portando anche ad una, seppur temporanea, lieve riduzione delle dimensioni.

Il trattamento di prima linea nelle donne sintomatiche con leiomiomi sottomucosi resta comunque la terapia chirurgica, il trattamento farmacologico va quindi considerato come seconda scelta. Tuttavia, va considerato che questo tipo di trattamento può rendere l'intervento chirurgico più semplice o renderlo inutile in quelle donne che entrano successivamente in menopausa.

Tra i trattamenti farmacologici disponibili ci sono due opzioni non ormonali che sono l'acido Tranexamico, che agisce sul sanguinamento uterino anomalo, e i FANS, che agiscono meno efficacemente sul sanguinamento ma agiscono anche sulla dismenorrea e sui dolori associati al leiomioma.

Per quanto riguarda le terapie ormonali diversi studi suggeriscono che sia la terapia ormonale combinata (estrogeno e progestinico) sia il progestinico da solo sono in grado di ridurre il rischio di sviluppare leiomiomi clinicamente significativi e che la presenza di leiomiomi non va considerata come controindicazione alla somministrazione della terapia ormonale combinata. La

somministrazione di progesterone orale ha l'effetto di ridurre il sanguinamento uterino associato alla presenza di leiomiomi andando a ridurre l'iperplasia endometriale con efficacia nel 25-50% delle pazienti, sia assunto nella seconda metà del ciclo mestruale sia assunto come contraccettivo per 21 giorni; l'alternativa ugualmente efficace è il dispositivo intrauterino al Levonorgestrel che induce atrofia endometriale riducendo il sanguinamento e aumentando i livelli di emoglobina, tuttavia, non sembra avere effetto sulla dimensione dei leiomiomi ed esiste il rischio che possa venire espulsa.

Tra i trattamenti ormonali una valida opzione è rappresentata dagli agonisti del GnRH che possono essere utilizzati sia come trattamento nelle donne in perimenopausa sia come trattamento preoperatorio per 3-4 mesi; infatti, in seguito a qualche mese di terapia oltre a ridursi il sanguinamento uterino e quindi l'anemia associata, si osserva anche una riduzione del volume uterino e del volume tumorale che rendono più facile eseguire l'intervento con approccio endoscopico o transvaginale. Il principale limite sono gli effetti collaterali associati allo stato di menopausa indotto dal farmaco tra cui climaterio, disturbi del sonno, secchezza vaginale, depressione, osteoporosi; per questi effetti i GnRH agonisti possono essere usati solo per brevi lassi di tempo e non per un utilizzo prolungato. Eventualmente l'aggiunta di Tibolone consente di ridurre gli effetti collaterali del farmaco senza intaccare gli effetti di riduzione del volume tumorale.

Il Danazolo sembra essere efficace nel breve periodo nel ridurre il volume tumorale e il sanguinamento uterino, ma ha comunque effetti limitati se paragonato ai GnRH agonisti.

I modulatori selettivi dei recettori del progesterone agiscono come agonisti o antagonisti a seconda dell'organo sul quale agiscono e ci sono vari studi per valutarne l'efficacia nel trattamento dei leiomiomi. I risultati suggeriscono che il trattamento per breve periodo (in particolare con Ulipristal) consente di ridurre i sintomi, le dimensioni e il sanguinamento associati al leiomioma con miglioramento della qualità di vita. Il confronto tra Ulipristal e GnRH agonisti ha dimostrato una pari efficacia nella gestione dei sintomi con il vantaggio dell'Ulipristal di non dare gli stessi effetti collaterali poiché non sopprime la sintesi di estrogeni.<sup>140,141</sup>

### **Resezione isteroscopica**

Per le donne sintomatiche con leiomiomi sottomucosi (FIGO 0/1) la prima scelta terapeutica è rappresentata dalla miomectomia isteroscopica. Si tratta di una procedura ambulatoriale, mini-invasiva che consente la rimozione del leiomioma senza effettuare incisioni e mantenendo l'integrità della parete uterina. Si tratta di una tecnica operatoria associata a un basso rischio di complicanze come perdita ematica, infezioni o aderenze. Proprio per questo è la prima scelta in tutte le donne che hanno desiderio di fertilità e può essere proposta anche alle pazienti asintomatiche con distorsione

della cavità uterina causata dal leiomioma.

È raccomandata per i leiomiomi fino a 5 cm, può essere tentata anche per quelli con dimensioni maggiori (così come per i FIGO 2) aumentando però il rischio di escissione in due tempi o di mancata radicalità.

L'approccio più adeguato sembra essere quello che prevede l'utilizzo di energia bipolare e gel anti adesione (acido ialuronico) che riduce ulteriormente il rischio di sinechie post-operatorie.<sup>141</sup>

### **Tecniche alternative**

Le possibili tecniche alternative ed innovative comprendono l'embolizzazione delle arterie uterine, i trattamenti termoablativi guidati dall'imaging e l'ablazione a radiofrequenze.

L'embolizzazione delle arterie uterine (UAE) è una tecnica mini invasiva che consente di controllare la sintomatologia associata al leiomioma, oltre che di ridurre le dimensioni. La tecnica è eseguita dai radiologi interventisti e consiste nel determinare l'occlusione delle arterie uterine, passando attraverso le arterie femorali, utilizzando nella maggior parte dei casi il PVA come agente embolizzante; l'occlusione viene confermata mediante angiografia e la procedura viene tendenzialmente eseguita in anestesia spinale e ha una durata di circa un'ora. L'intervento ha successo se avviene una completa occlusione delle arterie uterine, in seguito alla quale il normale miometrio riceve il flusso attraverso vasi collaterali provenienti dalla vascolarizzazione ovarica e vaginale; i leiomiomi, al contrario, sono caratterizzati da una vascolarizzazione terminale e in seguito all'occlusione vanno incontro ad un'importante riduzione di volume con conseguente riduzione anche dei sintomi. L'impatto della procedura sulla fertilità non è del tutto chiaro, in quanto tra le potenziali complicanze può esserci una insufficienza ovarica causata da un alterato flusso sanguigno all'ovaio o infezioni alle tube. Inoltre, possono esserci complicanze durante la gravidanza o il parto come rottura dell'utero, alterazioni del normale flusso placentare<sup>142</sup>. Tuttavia, ci sono anche numerosi esempi di gravidanze portate a termine con successo in seguito all'esecuzione dell'UAE. Sebbene sia molto efficace nella riduzione dei sintomi per riduzione delle dimensioni e del sanguinamento, il rischio di re-intervento è piuttosto alto (15-20% in seguito ad intervento andato a buon fine e fino al 50% nei casi di embolizzazione incompleta).<sup>143</sup>

In una revisione del 2016 viene confermato che il desiderio di conservare la fertilità resta una controindicazione relativa, in quanto non ci sono ancora dati a sufficienza per affermare la completa sicurezza della procedura prima di una gravidanza.<sup>144</sup>

L'ablazione guidata dagli ultrasuoni è una tecnica molto utilizzata in Asia, dove la tecnica utilizzata è la tecnica HIFU<sup>145,146</sup>; nel resto del mondo è più utilizzata l'ablazione guidata da risonanza

magnetica con la tecnica MRgFUS. Si tratta di una procedura svolta in regime ambulatoriale in sedazione che si effettua applicando multiple sonde ad ultrasuoni alla parete addominale.<sup>147,148</sup>

La MRgFUS è una tecnica non invasiva che utilizza ultrasuoni diretti in maniera altamente selettiva sul target in modo da consentire il raggiungimento di temperature in eccesso di 56°C rispetto a quelle standard presenti nel tessuto, con conseguente denaturazione delle proteine, morte cellulare e necrosi coagulativa. Questa tecnologia combina la capacità ablativa dei “*focused ultrasound*” con la guida imaging della risonanza magnetica in modo da monitorare l’outcome della terapia in tempo reale in modo da indurre l’ablazione del leiomioma preservando il tessuto sano circostante. Le pazienti candidabili a questo tipo di trattamento vengono attentamente selezionate mediante l’esecuzione di una MRI pre-operatoria per identificare eventuali elementi di esclusione come la posizione del leiomioma troppo vicina a strutture anatomiche nobili, ostacoli all’ablazione, presenza di altre patologie. Le candidate ideali a questo tipo di trattamento hanno tre o meno leiomiomi, dimensione massima inferiore a 10 cm, leiomiomi omogenei e scuri alle immagini pesate in T2, ben vascolarizzati e privi di calcificazioni.<sup>149,150</sup>

Per il trattamento dei leiomiomi con sintomi compressivi un’altra tecnica approvata è l’ablazione a radiofrequenze con guida ecografica endoaddominale che, rispetto alla miomectomia open ha un minor tasso di complicanze operatorie (in particolare perdite ematiche e lunga degenza).<sup>151</sup>

Esistono altre tecniche alternative laparoscopiche, come crioterapia o legatura delle arterie uterine, per le quali non esistono studi soddisfacenti a riguardo che ne giustificano l’utilizzo nella clinica.<sup>141,152</sup>

## **Miomectomia**

Per le pazienti sintomatiche che desiderano una gravidanza o per le pazienti che non sono candidabili alla miomectomia isteroscopica il trattamento d’elezione è la miomectomia che può essere eseguita con approccio laparoscopico, trans vaginale o open.

La scelta tra i diversi tipi di approccio chirurgico dipende dal numero, dalle dimensioni e dalla posizione dei leiomiomi e non sembra avere un peso sull’andamento di eventuali successive gravidanze.<sup>153</sup> Poiché il tasso di formazione di nuovi leiomiomi dopo la miomectomia è molto elevato l’intervento chirurgico dovrebbe essere eseguito non troppo tempo prima dell’instaurarsi di una eventuale gravidanza.

Tra le varie tecniche, la miomectomia laparoscopica è quella che offre maggiori vantaggi. Consente di ridurre la morbilità ed è caratterizzata da tempi di recupero più brevi, tuttavia, può non essere consentita dalle caratteristiche del leiomioma oltre che dall’esperienza del chirurgo.<sup>154</sup>

Le pazienti per le quali la miomectomia laparoscopica può essere presa in considerazione sono quelle con:

- Dimensione dell'utero <17 settimane;
- Leiomiomi sottosierosi o intramurali. Le pazienti in cui si osservano dei miomi sottomucosi e concomitanti miomi intramurali/sottosierosi possono essere candidate ad un approccio misto con miomectomia laparoscopica e isteroscopica concomitante;
- Numero limitato di leiomiomi (generalmente inferiore a cinque)<sup>155</sup> L'esecuzione di una miomectomia laparoscopica in pazienti con miomi molto grandi o molto numerosi richiede tempi più lunghi e molto spesso anche la morcellazione, questo può comportare una maggior perdita di sangue che può essere controllata meglio con la tecnica open;
- Leiomiomi anteriori o fundici, per via laparoscopica sono più facili da rimuovere rispetto a quelli posteriori o prossimi ad altre strutture importanti come casi uterini o tube di falloppio.

In seguito all'intervento è possibile l'instaurarsi di una gravidanza, ma bisogna tenere a mente che l'incisione uterina che risulta da un approccio laparoscopico può avere una tenuta inferiore a quella che risulta da un approccio laparoscopico open con conseguenti complicanze durante la gravidanza.<sup>156</sup>

La tecnica laparoscopica nei casi di miomi di grosse dimensioni può richiedere la morcellazione del tumore o dell'utero in modo da ridurne le dimensioni; questa tecnica se eseguita senza sistemi di contenimento e quindi all'interno della cavità peritoneale, però, espone ad un alto rischio di disseminazione di cellule potenzialmente maligne, in quanto la massa apparentemente benigna in alcuni casi nasconde un LMS. Per questi motivi nel 2014 la FDA si è espressa contro l'utilizzo di questa tecnica con un conseguente aumento delle miomectomie laparoscopiche e quindi delle complicanze chirurgiche (aumento dei tempi operatori, aumento del rischio di sanguinamento e infezione); nel 2020 la FDA ha quindi rilasciato un update dichiarando che la morcellazione può essere eseguita a patto che venga effettuata con dei sistemi di contenimento e non sia quindi una morcellazione "open" e non può essere proposta alle pazienti in post menopausa o con più di 50 anni né alle pazienti candidate alla rimozione "en bloc". Inoltre, va proposta solo dopo un adeguato screening preoperatorio per escludere la presenza di caratteristiche di malignità all'imaging e condividendo la scelta con la paziente.<sup>157</sup>

La tecnica laparotomica viene riservata ai leiomiomi di grosse dimensioni, generalmente quelli che superano i 10 cm di diametro (o uteri con dimensioni maggiori di 16 settimane) oppure alle pazienti con multipli leiomiomi con localizzazioni diverse nell'utero; la tecnica open è sicura quando eseguita da chirurghi esperti, ma è gravata da un più alto numero di complicanze rispetto alla tecnica

laparoscopica.<sup>158,159</sup>

## **Isterectomia**

L'isterectomia consente di eliminare in maniera radicale i leiomiomi e di conseguenza i sintomi associati alla lesione. Va considerata in tutte le pazienti in cui le altre opzioni terapeutiche hanno fallito o non sono percorribili e nelle pazienti che non desiderano conservare la propria fertilità.

Oltre l'80% delle isterectomie eseguite negli Stati Uniti ha come causa una malattia benigna; oltre la metà di queste isterectomie vengono eseguite per la presenza di un leiomioma uterino e in generale il rischio per una donna di andare incontro ad isterectomia si aggira intorno al 40%, rendendolo il secondo intervento chirurgico più eseguito nelle donne in età fertile dopo il cesareo.<sup>160,161</sup>

L'isterectomia è una terapia radicale in quanto elimina sia il rischio di sviluppare nuovi leiomiomi, rischio che invece persiste in seguito a miomectomia, sia i sintomi associati al leiomioma; questo comporta un miglioramento della qualità di vita che regge il confronto con quello apportato dalla miomectomia.<sup>162-164</sup>

Gli esiti a breve termine sono eccellenti, tuttavia l'isterectomia è associata a diverse morbidità a lungo termine sia che venga eseguita con ovariectomia bilaterale sia che venga eseguita conservando le ovaie. Gli studi effettuati sulla isterectomia con ovariectomia (raramente eseguita per i leiomiomi) dimostrano che comporta un aumento del rischio di frattura per indebolimento della trama ossea, morbidità cardiovascolare e neurologica, mortalità, peggioramento del tono dell'umore e della qualità del sonno.<sup>156</sup> Tuttavia, anche l'isterectomia con conservazione ovarica ha dei possibili effetti collaterali a lungo termine tra i quali il rischio di menopausa precoce<sup>165</sup>, diminuzione della riserva ovarica<sup>166,167</sup>, disturbi dell'umore<sup>168</sup> e morbidità cardiovascolare<sup>169</sup>.

Nonostante i possibili effetti collaterali è comunque raccomandata l'esecuzione dell'isterectomia con conservazione ovarica, con l'eccezione delle donne affette da mutazioni come BRCA1/BRCA2. Nelle patologie benigne come il leiomioma, il ricorso all'isterectomia dovrebbe essere riservato a quella quota di pazienti non desiderose di prole e in cui altri trattamenti meno radicali non hanno avuto effetto oppure alle pazienti con importanti comorbidità come adenomiosi, prolasso uterino o displasia cervicale per le quali l'isterectomia rappresenta una soluzione terapeutica per entrambe le patologie.<sup>156</sup>

## 6.2 STUMP

A causa del comportamento clinico incerto degli STUMP non sono ancora state approvate delle linee guida per il trattamento di questo tipo di lesione tumorale e l'approccio terapeutico da seguire resta controverso.<sup>170</sup>

In ogni caso la prima scelta terapeutica resta la chirurgia, mentre la terapia ormonale adiuvante e la chemioterapia non sono utilizzate in quanto non hanno mostrato utilità nella prevenzione delle recidive post-intervento. A causa dell'imprevedibilità del comportamento degli STUMP, ad oggi, il gold standard per il trattamento chirurgico nelle donne che non hanno desiderio di conservare la propria fertilità è rappresentato dall'isterectomia. Pur essendo l'isterectomia la prima scelta, nella donna giovane un'alternativa è la miomectomia; in letteratura ci sono numerosi esempi di gravidanze portate a termine con successo in seguito a miomectomia per STUMP, tuttavia, è bene informare accuratamente la paziente che sceglie un trattamento conservativo dell'alto rischio di ricorrenza di questo tipo di lesione, che può ripresentarsi sia come STUMP sia come LMS, e quindi della necessità di effettuare un rigido programma di follow-up in seguito all'intervento. Dunque, nelle donne giovani è fondamentale saper bilanciare correttamente il rischio di recidiva e la preservazione della fertilità in modo da scegliere correttamente l'approccio chirurgico discutendo con la paziente del rapporto rischio-beneficio e considerando le caratteristiche istologiche della lesione, l'impatto psicologico di un'eventuale isterectomia in una paziente giovane, le possibili conseguenze durante la gravidanza di una miomectomia e l'ambiguità clinica degli STUMP.<sup>7,9,171</sup>

In uno studio condotto nel 2012 da Vilos *et al.* prendendo in considerazione 76 pazienti affette da STUMP e sottoposte a miomectomia, si è osservato che quasi il 7% è andato incontro a recidiva e l'1,3% è deceduto a causa di questa recidiva. Questo dimostra non solo l'alta percentuale di recidive post trattamento non radicale, ma anche il potenziale di malignità degli STUMP.<sup>172</sup>

Inoltre, non è nota la modalità più corretta di gestione delle ovaie nell'ipotesi di esecuzione di un'isterectomia; anche in questo caso è importante una discussione dettagliata con la paziente tenendo in considerazione le caratteristiche della neoplasia e gli effetti collaterali a lungo termine dati dalla rimozione delle ovaie.

La maggior parte delle recidive da STUMP avviene entro i 5 anni dalla diagnosi, ma la presenza di pochi dati in letteratura non consente di stilare delle linee guida in merito ad un appropriato programma di follow-up; ciò che è certo è che tutte le pazienti sottoposte a interventi non radicali per risparmiarne la fertilità necessitano di essere seguite negli anni successivi per identificare precocemente un'eventuale recidiva. Diversi studi suggeriscono che data l'imprevedibilità del comportamento degli STUMP il follow-up dovrebbe avvenire ad intervalli di sei mesi per cinque anni

e successivamente con cadenza annuale fino a dieci anni dalla diagnosi, dato il rischio dimostrato da Ip *et al.* di avere recidive tardive. Il follow-up dovrebbe consistere in una valutazione clinica sia ginecologica che toracica (essendo il polmone il principale sito di recidiva) eseguita ogni sei mesi associata a una TC total body annuale che andrebbe proposto anche alle donne sottoposte a isterectomia; nelle pazienti che hanno subito un intervento di miomectomia, visto il più alto rischio di recidiva, dovrebbe essere implementato con una ecografia ogni sei mesi e RM total body e RX torace eseguite annualmente.<sup>7,173,174</sup>

Il trattamento di un'eventuale recidiva (il cui rischio oscilla tra il 9% e l'11%) è rappresentato dall'intervento chirurgico, mentre il ruolo di un'eventuale terapia adiuvante resta controverso. Il trattamento delle recidive sembra essere determinato prevalentemente dalle preferenze del medico curante e, vista la varietà di trattamenti proposti, diventa difficile stabilire una linea d'azione priva di ambiguità. Esempi di questa ambiguità sono stati riportati da diversi studi, tra cui uno studio condotto da Bell *et al.*<sup>86</sup> in cui quattro casi di STUMP recidivati sono stati trattati con chirurgia e successiva radio-chemioterapia adiuvante con Doxorubicina e Cisplatino, ma ci sono anche esempi di pazienti trattate con terapia ormonale come nello studio di Atkins *et al.*<sup>175</sup> che riporta dei casi di recidiva peritoneale e linfonodale trattati con progesterone in seguito all'intervento di debulking con successo della terapia o lo studio di Berretta *et al.*<sup>176</sup> che riporta di un caso di STUMP recidivato al polmone e trattato con chirurgia e successiva terapia ormonale con GnRH agonisti e inibitori dell'aromatasi. Nonostante questi studi i dati relativi all'utilizzo della terapia adiuvante, che sia ormonale, chemioterapia o radioterapia, non sono sufficienti per raccomandare questi trattamenti.

### 6.3 LMS

Le linee guida del National Comprehensive Cancer Network raccomandano come terapia del LMS la resezione chirurgica radicale seguita da terapia adiuvante chemioterapia e/o radioterapica a seconda dello stadio della patologia alla diagnosi.<sup>177</sup> Le pazienti con una diagnosi preoperatoria di LMS devono essere indirizzate verso centri specialistici di primo livello, poiché l'esecuzione di un intervento chirurgico radicale e corretto è il più importante fattore prognostico per questa tipologia di tumore.<sup>178</sup> Sono numerosi gli studi che supportano il ruolo dell'isterectomia radicale come gold standard terapeutico nel caso di LMS confinato all'utero e che associano la riuscita della chirurgia ad una maggior sopravvivenza libera da malattia.<sup>179,180</sup>

Tuttavia, è importante tenere in considerazione che fino al 65% delle diagnosi di LMS avviene solo in seguito all'intervento chirurgico (isterectomia o miomectomia) su presunti leiomiomi benigni.<sup>181</sup>

In particolare, si stima che tra le donne che vengono sottoposte ad un intervento chirurgico per sospetto leiomioma la prevalenza di LMS occulti sia dello 0,2% (1 su 500).<sup>182</sup>

Nonostante iniziali studi sembravano sostenere che la sola miomectomia fosse sufficiente per LMS in stadio iniziale, ad oggi è universalmente noto che l'isterectomia con la completa resezione del tumore sia la scelta ottimale; ciò che resta ancora controversa è l'estensione della resezione anche alle ovaie e ai linfonodi.

Le metastasi di LMS all'ovaio sono rare, interessando solo il 5% delle pazienti; nonostante sia quasi sempre effettuata durante l'intervento chirurgico, non ci sono ancora sufficienti studi che sostengano che l'ovariectomia bilaterale comporti un effettivo beneficio sulla sopravvivenza.<sup>12,41,183</sup> Infatti, in uno studio condotto da Nasioudis *et al.* si è osservato che le donne le cui ovaie erano state conservate durante l'intervento presentavano una miglior sopravvivenza a 5 anni (72,8% vs 68,9%), e nonostante i risultati ottenuti non abbiano raggiunto valori statisticamente significativi è importante considerare come l'ovariectomia non comporti un miglioramento della sopravvivenza.<sup>184</sup> Considerando queste premesse e gli effetti collaterali a lungo termine dati dalla menopausa iatrogena indotta dall'ovariectomia, è indicata l'omissione dell'ovariectomia nelle pazienti con ovaie di normale aspetto e che possono trarre beneficio clinico da questa scelta.<sup>11</sup>

Così come per l'ovariectomia, anche la linfadenectomia è controversa; infatti, solo il 5-11% dei linfonodi rimossi nelle pazienti affette da LMS risultano positivi.<sup>185</sup> Tuttavia, è anche vero che il riscontro di una positività ai linfonodi modifica il percorso post-operatorio indirizzando la paziente verso una terapia adiuvante. In uno studio condotto da Kapp *et al.* su 348 donne affette da LMS di cui 23 sottoposte anche a linfadenectomia è stato evidenziato che omettere la linfadenectomia è possibile nelle pazienti che non hanno evidenza di malattia metastatica e nelle quali non c'è stato il riscontro di linfonodi di dimensioni aumentate durante l'intervento chirurgico.<sup>183</sup> Dunque, nonostante le informazioni prognostiche che potrebbero essere ricavate dalla positività linfonodale, la rarità delle metastasi linfonodali e la mancanza di protocolli di chemioterapia adiuvante escludono la linfadenectomia dalle raccomandazioni della terapia chirurgica standard per LMS e la relegano ai casi in cui i linfonodi pelvici appaiono ingranditi e palpabili durante l'intervento.<sup>12,41,186</sup>

Le pazienti in cui la malattia è già in stadio avanzato hanno una prognosi infausta e rappresentano circa il 35% del totale. Il più frequente sito di metastasi è il polmone, seguito da cavità peritoneale, tessuti molli, fegato e osso. Nei casi in cui la malattia sia estesa ma confinata alla pelvi può essere tentato un approccio chirurgico citoriduttivo seguito da terapia adiuvante, ma nelle pazienti con malattia disseminata la chirurgia non ha indicazione se non con intento di palliazione dei sintomi dati dalla massa tumorale.<sup>180</sup> Tuttavia, in una quota altamente selezionata di pazienti con recidiva localizzata o malattia metastatica limitata, la resezione chirurgica può offrire un vantaggio in termini

di sopravvivenza; i dati a supporto di questo approccio sono limitati a piccole coorti.<sup>65-67</sup> Le candidate migliori per questo tipo di approccio sono quelle che si ripresentano dopo un intervallo libero da progressione di almeno 12-18 mesi e con un sito isolato di recidiva suscettibile di completa resezione; esempi di siti suscettibili di resezione sono metastasi isolate polmonari<sup>187</sup> o cerebrali<sup>188</sup>.

Le pazienti che vengono sottoposte a isterectomia per sospetto leiomioma in cui in seguito all'esame istologico si identifica la presenza di LMS non vengono sottoposte a un secondo intervento chirurgico né per stadiare né per effettuare l'annessiectomia. Esistono alcune eccezioni che richiedono un reintervento, sono: intervento di isterectomia sopracervicale, è necessario rimuovere la cervice; intervento di miomectomia, in seguito al quale è mandatorio eseguire l'isterectomia; precedente morcellazione, in seguito alla quale è necessario effettuare un intervento esplorativo della pelvi con eliminazione di eventuale malattia peritoneale.<sup>189</sup>

In particolare, per quanto riguarda la morcellazione è particolarmente rischiosa poiché in presenza di un LMS misconosciuto in pazienti con presunto leiomioma, determina lo spargimento di cellule tumorali nella cavità peritoneale. Il numero di LMS erroneamente morcellati non è facile da determinare, ma uno studio condotto da Pritts et al. nel 2015 ha stimato che fossero circa 1 su 2000-8000, e che queste pazienti avessero un alto rischio di diffusione a distanza della malattia.<sup>190</sup> Un ulteriore studio ha indagato l'importanza della riesplorazione in seguito a morcellazione e la rapidità di diffusione osservando pazienti senza evidenza di malattia extrauterina al momento dell'intervento chirurgico e a cui è stato diagnosticato un LMS in seguito ad intervento chirurgico con morcellazione; effettuando la riesplorazione immediatamente (entro 50 giorni) tre pazienti su otto sono passate allo stadio III o IV di malattia.<sup>191</sup> Per questo, nel 2020, la FDA ha stabilito che la morcellazione potesse essere utilizzata esclusivamente nelle pazienti in pre menopausa e dopo un'attenta analisi imaging della neoplasia che possa quindi ridurre al minimo il rischio di morcellazione di un LMS.<sup>157</sup>

# Studio sperimentale

## 1. INTRODUZIONE

Gli STUMP sono per definizione tumori di potenziale maligno incerto, e, in quanto tali, predirne il comportamento risulta molto spesso complesso. Dal punto di vista delle caratteristiche cliniche e di imaging hanno un profilo sovrapponibile sia ai leiomiomi che ai LMS e la diagnosi differenziale tra queste tre diverse entità avviene generalmente soltanto dopo aver eseguito un intervento mediante l'analisi istologica.

Ad oggi la gestione di un sospetto leiomioma, data la natura benigna di questa tipologia di tumore, prevede l'utilizzo di tecniche conservative come la miomectomia, l'isterectomia sopracervicale, la radiologia interventistica e la terapia medica che consentono di risparmiare l'utero o comunque di essere il meno demolitive possibili; tra queste, le terapie non escissionali non consentono di prelevare materiale tumorale utile alla diagnosi istologica e, di conseguenza, non permettono di ottenere una diagnosi istologica definitiva con il rischio, in caso di patologia maligna, di crescita e disseminazione della lesione. D'altra parte, il grosso limite delle tecniche chirurgiche conservative, è il rischio di lasciare in sede cellule tumorali residue o disseminarle nella cavità pelvica e addominale mediante la morcellazione.

Nel caso in cui venga utilizzata una tecnica chirurgica conservativa e la diagnosi istologica ottenuta in seguito all'intervento sia di STUMP può essere utile conoscere quali sono le caratteristiche molecolari che correlano con il comportamento del tumore in questione in modo da poter instaurare il corretto iter terapeutico e migliorare la sopravvivenza della paziente. Gli STUMP, infatti, comprendono entità con un comportamento clinico sovrapponibile a un leiomioma ma anche entità che possono comportarsi in modo più simile ad un LMS andando incontro a recidive o disseminazione; quindi, in caso di diagnosi di STUMP, la sopravvivenza delle pazienti può essere molto variabile. Riconoscere le fondamenta molecolari di questi diversi comportamenti e come queste correlano con la sopravvivenza può avere un'importante implicazione clinica e, ad oggi, le conoscenze circa l'espressione genica e la caratterizzazione molecolare degli STUMP sono ancora molto scarse.

Inoltre, in caso di diagnosi di STUMP, anche se correttamente gestito dal punto di vista chirurgico, non è ancora del tutto chiaro quale sia la più corretta gestione della paziente nei mesi e negli anni successivi all'intervento dal punto di vista del follow up; identificare le caratteristiche molecolari predittive di un comportamento più aggressivo può andare ad incidere sulla gestione della paziente

consentendo di riconoscere precocemente quali sono i casi in cui si rende necessario un follow up più intensivo poiché più a rischio di recidiva.

Inoltre, le conoscenze a disposizione circa l'ambiente immunitario tumorale e la risposta delle cellule immunitarie dell'ospite nei confronti della massa tumorale nei tumori della muscolatura liscia dell'utero ad oggi sono estremamente limitate; avere una maggior consapevolezza di queste caratteristiche tumorali e di come differiscono da un'entità tumorale all'altra può aprire nuovi orizzonti terapeutici come, ad esempio, l'uso dell'immunoterapia nelle pazienti affette da STUMP aggressivi o LMS.

In questo studio abbiamo confrontato le caratteristiche anatomo-patologiche degli STUMP recidivati e non recidivati. Inoltre, mediante l'utilizzo del *nCounter PanCancer IO 360 Panel (NanoString® Technologies)* abbiamo analizzato il profilo dell'espressione genica di STUMP e altre neoplasie della muscolatura liscia dell'utero usando come target 770 mRNAs correlati con la biologia tumorale, il microambiente tumorale e la risposta immunitaria in modo da trovare le basi molecolari che consentano di predire il comportamento della massa tumorale.

## 2. MATERIALI E METODI

Abbiamo condotto uno studio retrospettivo, multicentrico, valutando dati clinici, istologici, molecolari e di sopravvivenza di pazienti sottoposte a una resezione chirurgica di tumore uterino. Tutte le pazienti hanno ricevuto una diagnosi definitiva istologica di STUMP. Tutti i casi derivano da centri di riferimento per la gestione di neoplasie ginecologiche: ospedale Sant'Anna – AOU città della salute e della Scienza di Torino; Azienda ospedaliera Ordine Mauriziano di Torino, Istituto di Candiolo IRCCS, Istituto Europeo di Oncologia di Milano e il Centro Ospedaliero Leon-Berard (Lione, Francia).

I criteri di inclusione sono stati la possibilità di revisionare i casi per ottenere una conferma diagnostica istopatologica, la possibilità di avere informazioni cliniche, anamnestiche e anatomo-patologiche complete e, nelle pazienti incluse nell'analisi molecolare mediante piattaforma *NanoString*, la possibilità di avere campioni adeguati da sottoporre alla metodica.

Tutte le diagnosi sono state classificate secondo la Classificazione dei tumori degli organi riproduttivi femminili WHO 2020.

Per ogni paziente sono state estrapolate diverse informazioni dalle cartelle ospedaliere: età, parità, BMI, fumo di sigaretta, menopausa e presenza di sintomi come sanguinamento uterino anomalo,

dolore e senso di peso, comparsa di un'eventuale recidiva e, infine, eventuale decesso. Per i casi di STUMP utilizzati per ottenere un confronto tra le caratteristiche anatomo-patologiche di STUMP recidivati e non recidivati sono stati considerati aspetti quali: il numero di mitosi per 10 HPF, la percentuale di espressione di Ki67, recettore degli estrogeni e recettore del progesterone; oltre a questi, ulteriori caratteristiche prese in considerazione sono state la presenza di necrosi, la presenza di atipie cellulari, la presenza di mitosi atipiche, l'ipercellularità della lesione, la presenza di aspetti epitelioidi, mixoidi e degenerativi, la presenza di intrusioni vascolari e l'apoptosi.

Per le pazienti coinvolte nello studio con la piattaforma *NanoString* questa tecnologia ha permesso di estrapolare diverse informazioni circa l'espressione di specifici geni, l'analisi di pathway peculiari e l'ottenimento di un profiling delle cellule immunitarie presenti nell'ambiente tumorale in modo da poter ottenere un confronto tra leiomiomi (LM), LMS (LMS), STUMP in generale, STUMP non recidivati (nrSTUMP) e STUMP recidivati (rSTUMP).

In particolare, sono stati presi in considerazione geni come S100A9, S100A8 e LY96 coinvolti nel compartimento mieloide; CD86 coinvolto nell'adesione delle cellule immunitarie e nella loro migrazione, oltre che nel compartimento linfoide; MAML2 coinvolto nel signaling di Notch; CCNO implicato in meccanismi di proliferazione cellulare e riparazione di danni al DNA; CXCL9 che vede un ruolo nella segnalazione mediante citochine e chemochine e nel controllo delle cellule linfocitiche e CCL4 che ha un compito speculare per quanto riguarda il compartimento mieloide; ANGPT1 implicato nell'angiogenesi e nel signaling di MAPK, oltre che nei pathway che si attivano in condizioni di ipossia; CTSS tra i geni responsabili della presentazione dell'antigene, del rimodellamento della matrice e della formazione di metastasi. Questi fanno parte dei più significativi tra i 770 mRNA analizzati dal macchinario e, come salta all'occhio, molti di questi sono coinvolti nel richiamo e nel funzionamento delle cellule immunitarie sia del compartimento mieloide sia del compartimento linfoide. Infatti, un altro aspetto analizzato è stato il profiling delle cellule immunitarie costituenti il microambiente tumorale con un focus sui macrofagi, neutrofili e linfociti.

Infine, sono stati analizzati i pathway maggiormente correlati all'attività tumorale, come quelli coinvolti nel rimodellamento della matrice e nella formazione di metastasi, quelli coinvolti nella regolazione del compartimento mieloide e linfoide, il pathway di segnalazione mediante citochine e chemochine, quello coinvolto nei sistemi di riparazione dei danni al DNA, ma anche quelli coinvolti nell'angiogenesi, proliferazione cellulare, regolazione epigenetica e autofagia.

## 2.1 Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software IBM SPSS versione 23 (SPSS Inc., Chicago, IL). Le differenze nelle proporzioni tra le variabili categoriche delle pazienti che hanno

avuto una recidiva e quelli che non l'hanno avuta sono state valutate utilizzando il test del chi-quadrato di Pearson o il test esatto di Fisher. Per le variabili continue, è stato utilizzato il test di Shapiro-Wilk per verificare la normalità dei dati, e successivamente il test U di Mann-Whitney per il confronto dei dati. La sopravvivenza è stata analizzando mediante le curve di Kaplan-Meier e i confronti sono stati effettuati con il test log-rank. Il valore prognostico delle variabili è stato testato mediante analisi univariata e multivariata con il modello di regressione di Cox. I valori statisticamente significativi dalle analisi univariate di Cox sono stati inseriti in un'analisi multivariata utilizzando il modello di regressione di Cox a selezione inversa. Tutte le analisi sono state condotte con un intervallo di confidenza (CI) del 95% e un valore p bilaterale di 0,05 è stato considerato statisticamente significativo.

### 3. RISULTATI

Inizialmente sono stati considerati un totale di 103 pazienti. Sedici pazienti senza conferma istologica alla revisione patologica (n=12, 7 riclassificati come variante di leiomioma, 5 come LMS) o con un follow-up inferiore a 6 mesi (n=4) sono stati esclusi. 87 pazienti con una diagnosi confermata di STUMP sono stati inclusi nello studio (Tabella 1). Infine, per l'analisi molecolare mediante piattaforma NanoString, la necessità di avere dei campioni idonei da sottoporre alla metodica che avessero un profilo di mRNA leggibile ha ristretto l'analisi a 33 pazienti di cui 11 con STUMP (5 recidive e 6 non recidive), 11 leiomiomi e 11 LMS.

#### 3.1 Outcomes clinici e di sopravvivenza

L'età media alla diagnosi era di 46 anni (deviazione standard (DS) 10, range 19-82 anni), l'etnia più frequente era caucasica (83 su 87, 95% dei pazienti) e il follow-up medio era di 67 mesi (DS  $\pm$  65, range 6-256 mesi).

Il BMI medio era 25 (DS 4, range 19-40, 20 dati mancanti), 51 su 79 pazienti (65%, 8 dati mancanti) avevano gravidanze precedenti, 11 su 74 erano fumatori (15%, 13 dati mancanti) e 65 su 85 (76%, 2 dati mancanti) erano sintomatici al momento della diagnosi.

La maggior parte dei pazienti ha subito un'isterectomia (59 su 87, 68% dei pazienti), mentre un approccio laparoscopico è stato eseguito solo in 12 su 87 (14%) pazienti.

In 28 su 87 (32%) casi, il tumore è stato morcellato o frammentato intraoperatoriamente. In 12 su 28 (43%) pazienti che inizialmente hanno subito una miomectomia, è stata eseguita un'isterectomia dopo la diagnosi istologica di STUMP.

Tutti gli STUMP erano confinati al corpo uterino al momento del primo intervento chirurgico, con una dimensione massima media di 73 mm (DS 44, range 5-230 mm).

Sono state analizzate le seguenti caratteristiche istopatologiche dei STUMP: atipie citologiche moderate o severe sono state osservate in 28 su 87 (68%) casi, mentre atipie citologiche diffuse in 27 su 87 (33%). La necrosi è stata osservata in 34 su 87 (39%) casi: in 24 (71%) campioni i risultati erano coerenti con necrosi ischemica, e in 10 (29%) con necrosi coagulativa. Elevata cellularità è stata osservata in circa la metà dei STUMP (42 su 87, 48% dei casi), e figure apoptotiche in 26 su 87 (30%) casi. Altre caratteristiche istopatologiche (pattern epitelioidi o mixoidi, caratteristiche degenerative e presenza di mitosi atipiche e/o intrusioni vascolari) erano raramente presenti. Il valore medio delle mitosi/10 HPF era 6 (DS 7, range 1-43) e i casi con un conteggio mitotico/10 HPF  $\geq 6$  e  $> 10$  erano rispettivamente 35 (40%) e 13 (15%). Il valore medio di Ki-67 (10 dati mancanti) era 16% (DS 15%, range 1-80%), mentre un valore di Ki-67  $> 20\%$  è stato osservato in 15 su 77 (20%) casi. La percentuale media di cellule ER- e PR-positive era rispettivamente 72% (21 dati mancanti, DS  $\pm 20$ , range 5-100%) e 83% (21 dati mancanti, DS 18%, range 0-100%).

L'espressione di ER  $< 72\%$  è stata osservata in 32 su 66 (48%) casi, e l'espressione di PR  $< 83\%$  in 19 su 66 (29%) STUMP. Infine, p53 e p16 sono stati trovati espressi in 16 su 57 (30 dati mancanti, 28%) e 19 su 47 (40 dati mancanti, 40%) casi.

Leiomiomi e/o adenomiosi associati sono stati riportati rispettivamente in 46 su 86 (1 dato mancante, 54%) e 11 su 86 (1 dato mancante, 13%) dei campioni chirurgici.

Complessivamente, 18 (20,7%) casi hanno avuto una recidiva: 11 come LMS (12%) e 7 come STUMP (7,8%). Il tempo medio alla recidiva è stato di 79 mesi (DS 55, range 10-174). Dei 18 STUMP che sono recidivati, 5 pazienti (5,7%) sono deceduti a causa di questa malattia [sopravvivenza specifica della malattia (DSS): 94,3%].

Non sono state osservate differenze significative tra i pazienti con e senza recidiva della malattia in termini di età, numero di gravidanze precedenti, BMI, tipo di sintomi, stato menopausale e abitudine al fumo.

Sebbene le percentuali di casi di recidiva non differiscano in base alla specifica procedura chirurgica o all'approccio utilizzato, sono state osservate più recidive dopo la frammentazione/morcellazione intraoperatoria del tumore ( $p = 0,003$ ).

Le seguenti caratteristiche istopatologiche e immunoistochimiche hanno mostrato una distribuzione significativamente diversa in base alla recidiva: (a) presenza di caratteristiche epitelioidi ( $p = 0,009$ ), (b) numero mitotico maggiore/10 HPF ( $p = 0,01$ ), (c) conteggio mitotico  $\geq 6/10$  HPF (valore medio del conteggio mitotico nell'intera serie) ( $p = 0,042$ ) e  $> 10$  per 10 HPF ( $p = 0,004$ ), (d) valore di Ki-67  $> 20\%$  ( $p = 0,04$ ), (e) espressione di PR inferiore ( $p = 0,048$ ), (f) espressione di PR  $< 83\%$  (valore medio dell'espressione di PR nell'intera serie) ( $p = 0,036$ ) e (g) espressione diffusa di p16 ( $p = 0,01$ ).

La distribuzione di tutte le caratteristiche cliniche e istopatologiche in base alla recidiva è presentata nella Tabella 1.

Caratteristiche cliniche	Nessuna recidiva	Qualunque recidiva	
<b>Etnia</b>			
Caucasica	65 (78%)	18 (22%)	0.57
Altro	4 (100%)	0 (0%)	
<b>Età media (years) SD (range)</b>	46 ± 8 (29–77)	47 ± 16 (19–82)	0.49
<b>Età (years)</b>			
< 46	39 (83%)	8 (17%)	0.36
≥ 46	30 (75%)	10 (25%)	
<b>Numero di gravidanze (NA 8)</b>			
0	20 (71%)	8 (29%)	0.11
≥ 1	44 (86%)	7 (14%)	
<b>Menopausa (NA 1)</b>			
No	59 (82%)	13 (18%)	0.16
Yes	9 (64%)	5 (36%)	
<b>BMI medio SD (range)</b>	25.4 ± 3.8 (19–40)	24 ± 6 (19–39)	0.49
<b>Fumo (NA 13)</b>			
No	52 (82%)	11 (18%)	0.21
Yes	7 (64%)	4 (36%)	
<b>AUB (NA 2)</b>			
No	17 (85%)	3 (15%)	0.59
Yes	50 (77%)	15 (23%)	
<b>Dolore pelvico (NA 2)</b>			

No	50 (81%)	12 (19%)	0.50
Yes	17 (74%)	6 (26%)	
<b>Aumento di volume addominale (NA 2)</b>			
No	54 (78%)	15 (22%)	1.00
Yes	13 (81%)	3 (19%)	
<b>Procedura chirurgica</b>			
Isterectomia	46 (78%)	13 (22%)	0.78
Miomectomia	23 (82%)	5 (18%)	
<b>Approccio chirurgico</b>			
Laparotomia	57 (82%)	13 (18%)	0.48
Vaginale	3 (75%)	1 (25%)	
Laparoscopia	9 (67%)	4 (33%)	
<b>Frammentazione/morcellazione</b>			
No	52 (88%)	7 (12%)	<b>0.003</b>
Yes	17 (60%)	11 (40%)	
<b>Procedura chirurgica (escludendo i casi frammentati/morcellati)</b>			
Isterectomia	38 (88%)	5 (12%)	1.00
Miomectomia	14 (88%)	2 (12%)	
Diametro massimo medio (mm) (NA = 7) SD (range)	72.9 ± 45 (5–230)	73.8 ± 42 (20–150)	0.94
<b>Caratteristiche istopatologiche</b>			
<b>Leiomiomi associati (NA 1)</b>			

No	31 (78%)	9 (22%)	0.74
Yes	37 (80%)	9 (20%)	
<b>Adenomiosi associata (NA 1)</b>			
No	58 (78%)	17 (22%)	0.44
Yes	10 (91%)	1 (9%)	
<b>Grado di atipia</b>			
Assente/lieve	47 (78%)	12 (22%)	0.87
Moderata/severa	22 (80%)	6 (20%)	
<b>Atipia (estensione)</b>			
Focale	48 (80%)	12 (20%)	0.81
Diffusa	21 (78%)	6 (22%)	
<b>Necrosi</b>			
No	43 (81%)	10 (19%)	0.60
Si	26 (76%)	8 (24%)	
Ischemica	20 (83%)	4 (17%)	0.19
Coagulativa	6 (60%)	4 (40%)	
<b>Ipercellularità</b>			
No	38 (84%)	7 (16%)	0.22
Si	31 (74%)	11 (26%)	
<b>Aspetti epitelioidi</b>			
No	64 (84%)	12 (16%)	<b>0.009</b>
Si	5 (46%)	6 (54%)	

<b>Aspetti mixoidi</b>			
No	66 (80%)	16 (20%)	0.27
Si	3 (60%)	2 (40%)	
<b>Aspetti degenerativi</b>			
No	57 (79%)	15 (21%)	1.00
Si	12 (80%)	3 (20%)	
<b>Mitosi atipiche</b>			
No	65 (80%)	16 (20%)	0.59
Si	4 (67%)	2 (33%)	
<b>Apoptosi</b>			
No	49 (80%)	12 (20%)	0.72
Si	20 (77%)	6 (23%)	
<b>Intrusioni vascolari</b>			
No	66 (80%)	17 (20%)	1.00
Yes	3 (75%)	1 (15%)	
<b>Numero medio di mitosi/10 HPFs SD (range)</b>	4.5 ± 4 (1–18)	11 ± 11 (1–43)	<b>0.01</b>
<b>Numero di mitosi (usando come cut-off la media)</b>			
< 6	45 (86%)	7 (14%)	<b>0.042</b>
≥ 6	24 (69%)	11 (31%)	
<b>Numero di mitosi (cutoff 10/10 HPFs)</b>			
≤ 10	61 (82%)	10 (18%)	<b>0.004</b>
> 10	8 (62%)	8 (38%)	

<b>Espressione media di Ki-67 (%) SD (range) (NA = 10)</b>	13 ± 12 (1–70)	25 ± 23 (1–80)	<b>0.007</b>
<b>Ki-67 (NA = 10) (usando come cut-off la media)</b>			
≤ 16%	45 (83%)	9 (17%)	0.17
>16%	16 (70%)	7 (30%)	
<b>Ki-67 (cutoff 20%) (NA = 10)</b>			
≤ 20%	52 (84%)	10 (16%)	<b>0.04</b>
> 20%	9 (60%)	6 (40%)	
<b>Espressione media di ER (%) SD (range) (NA = 21)</b>	72 ± 18 (20–99)	69 ± 26 (5–100)	0.55
<b>Espressione di ER (according to the mean value) (NA = 21)</b>			
≥ 72%	26 (76%)	8 (24%)	0.98
< 72%	24 (75%)	8 (25%)	
<b>Espressione media di PR (%) SD (range)</b>	85 ± 14 (30–100)	75 ± 26 (0–100)	<b>0.048</b>
<b>Espressione di PR (usando la media come cut-off) (NA = 21)</b>			
≥ 83%	39 (83%)	8 (17%)	<b>0.036</b>
< 83%	11 (58%)	8 (42%)	
<b>Espressione di p53 (NA = 30)</b>			
Negativa	35 (85%)	6 (15%)	0.44
Positiva	12 (75%)	4 (25%)	
<b>Espressione di p16 (NA = 40)</b>			
Assente/focale	27 (96%)	1 (4%)	<b>0.01</b>
Diffusa	13 (68%)	6 (32%)	

Tabella 1. Distribuzione delle caratteristiche cliniche e patologiche in funzione della presenza o meno di recidiva (in grassetto i valori di p significativi)

L'analisi di regressione di Cox univariata ha mostrato che la frammentazione/morcellazione chirurgica (HR 3.68, IC 95% 1.42–9.54,  $p = 0.007$ ), le caratteristiche epitelioidi (HR 3.14, IC 95% 1.17–8.40,  $p = 0.022$ ), un conteggio mitotico più elevato (HR 1.04, IC 95% 1.005–1.084,  $p = 0.03$ ), la presenza di  $> 10$  mitosi/10 HPF (HR 2.84, IC 95% 1.10–5.19,  $p = 0.04$ ), un indice di proliferazione Ki-67 più elevato (HR 1.033, IC 95% 1.009–1.057,  $p = 0.006$ ), Ki-67  $> 20\%$  (HR 3.06, IC 95% 1.07–8.73,  $p = 0.06$ ), l'espressione di PR  $< 83\%$  (HR 4.15, IC 95% 1.47–11.7,  $p = 0.007$ ) e l'espressione diffusa di p16 (HR 13.1, IC 95% 1.56–11.7,  $p = 0.08$ ) sono stati associati a una sopravvivenza libera di recidiva (RFS) più breve. L'analisi Cox multivariata ha confermato che la morcellazione/frammentazione (HR 5.65, IC 95% 1.53–20.8,  $p = 0.009$ ) e il conteggio mitotico considerato come variabile lineare (HR 1.073, IC 95% 1.019–1.130,  $p = 0.008$ ) sono associati indipendentemente alla RFS.

Tutte le variabili risultate significative nell'analisi univariata hanno avuto un impatto anche sulla sopravvivenza libera da recidiva (RFS) calcolata con il metodo di Kaplan–Meier (Figura. 1).

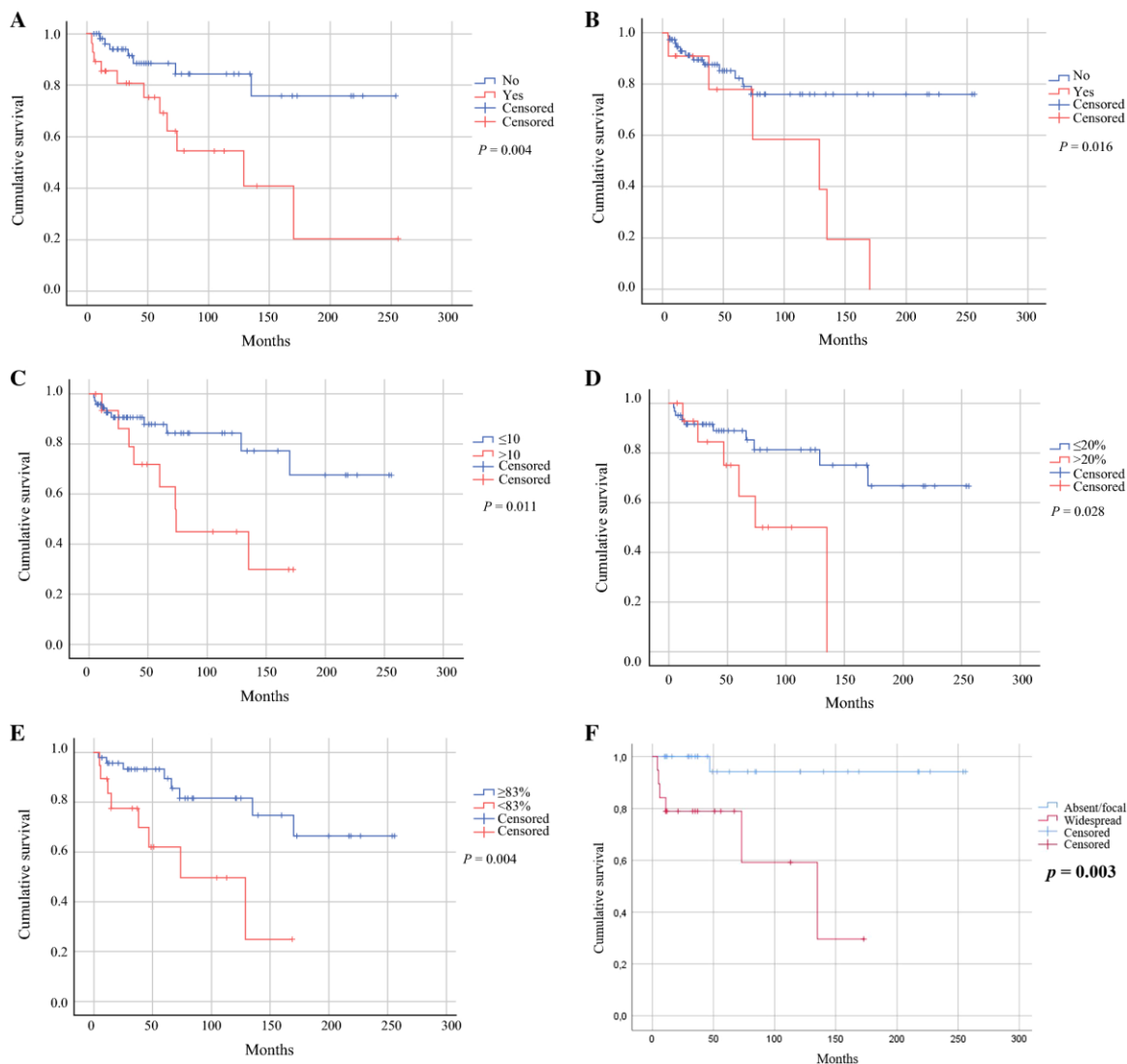


Figura 1. Curve di Kaplan–Meier per la recidiva di STUMP in base a A) morcellazione, B) caratteristiche epitelioidi, C) numero di mitosi > 10 per HPF, D) valore di Ki-67 > 20%, E) valore di PR  $\geq 83\%$  e F) espressione di p16

### 3.2 Outcomes molecolari

I dati molecolari ottenuti sono stati ricavati analizzando il profilo dell'espressione genica mediante l'utilizzo del macchinario *nCounter PanCancer IO 360 Panel* (NanoString® Technologies) targettando 770 mRNA correlati con la biologia tumorale, il microambiente immunitario del tumore e la risposta immunitaria dell'ospite.

Sono stati analizzati 33 casi, costituiti da 11 casi di STUMP di cui 5 recidivati in LMS (rSTUMP) e 6 non recidivati (nrSTUMP), 11 casi di LMS (LMS) e 11 casi di leiomiomi (LM) come controllo.

I risultati ottenuti sono stati successivamente confrontati mediante confronti crociati tra:

- STUMP vs LMS
- nrSTUMP vs LMS;
- rSTUMP vs LMS;
- STUMP vs LM;
- rSTUMP vs LM;
- LMS vs LM;
- nrSTUMP vs LM.
- nrSTUMP vs rSTUMP

Per ciascuno di questi confronti sono stati presi in considerazione l'espressione differenziale tra specifici geni, le differenze in pathway implicati nella biologia tumorale e le differenze nel profilo di cellule immunitarie costituenti il microambiente tumorale; da questi confronti sono stati ottenuti dei p-value per valutare la significatività statistica delle differenze osservate.

### 3.3.1 STUMP vs LMS

La tabella 2 mostra i principali geni per i quali esiste una differenza di espressione statisticamente significativa tra STUMP e LMS.

I geni per cui esiste una differenza di espressione statisticamente significativa sono quelli che risultano down-regolati negli STUMP e sono per lo più coinvolti nel reclutamento di cellule immunitarie nel microambiente tumorale; altri geni sono invece coinvolti nell'angiogenesi, nella proliferazione cellulare e nella riparazione di danni al DNA.

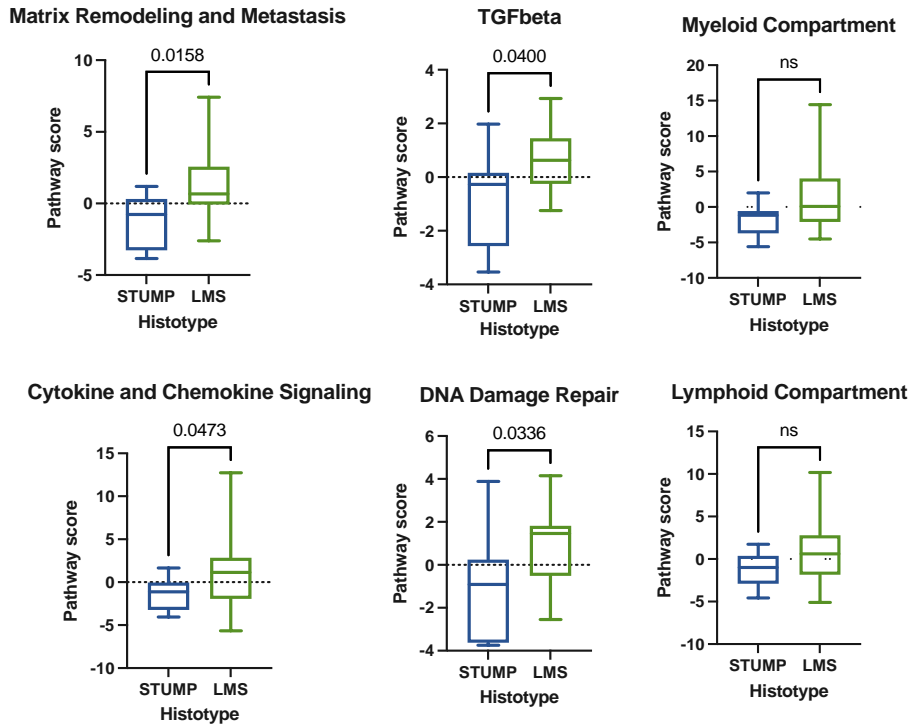
<b>GENE</b>	<b>LOG2FOLD CHANGE</b>	<b>P-VALUE</b>	<b>FUNZIONE</b>
<b>S100A9</b>	-4,55	0,0219	<i>Myeloid Compartment</i>
<b>CD86</b>	-3,71	0,0219	<i>Costimulatory Signaling, Immune Cell Adhesion and Migration, Lymphoid Compartment</i>
<b>MAML2</b>	-1,06	0,0219	<i>Notch Signaling</i>
<b>S100A8</b>	-4,09	0,0219	<i>Myeloid Compartment</i>
<b>LY96</b>	-2,21	0,0219	<i>Apoptosis, Myeloid Compartment</i>

<b>CCNO</b>	-3,33	0,0233	<i>Cell Proliferation, DNA Damage Repair</i>
<b>CXCL9</b>	-3,59	0,0233	<i>Cytokine and Chemokine Signaling, Lymphoid Compartment</i>
<b>CCL4</b>	-2,35	0,027	<i>Antigen Presentation, Cytokine and Chemokine Signaling, Myeloid Compartment</i>
<b>ANGPT1</b>	-2,59	0,0333	<i>Angiogenesis, Hypoxia, MAPK, Myeloid Compartment, PI3K-Akt</i>
<b>CTSS</b>	-2,54	0,0393	<i>Antigen Presentation, Matrix Remodeling and Metastasis</i>
<b>RIPK2</b>	-1	0,0393	<i>Costimulatory Signaling</i>

Tabella 2: espressione genica STUMP vs LMS

L'aumentata espressione di geni correlati al compartimento mieloide nei LMS non trova conferma nell'analisi dei pathway; infatti, tra i pathway che risultato up-regolati nei LMS rispetto agli STUMP quelli con un p-value maggiormente significativo sono quelli implicati nel rimodellamento della matrice e formazione di metastasi e nei sistemi di riparazione al DNA.

Figura 2: differenze nei pathway tra STUMP e LMS



Per quanto riguarda il profilo delle cellule immunitarie presenti nel microambiente tumorale, le differenze statisticamente significative sono quelle che coinvolgono il compartimento mieloide. Nel grafico 3 si osserva una differenza per quanto riguarda i macrofagi e i neutrofili, che risultano maggiormente rappresentati nel microambiente dei LMS.

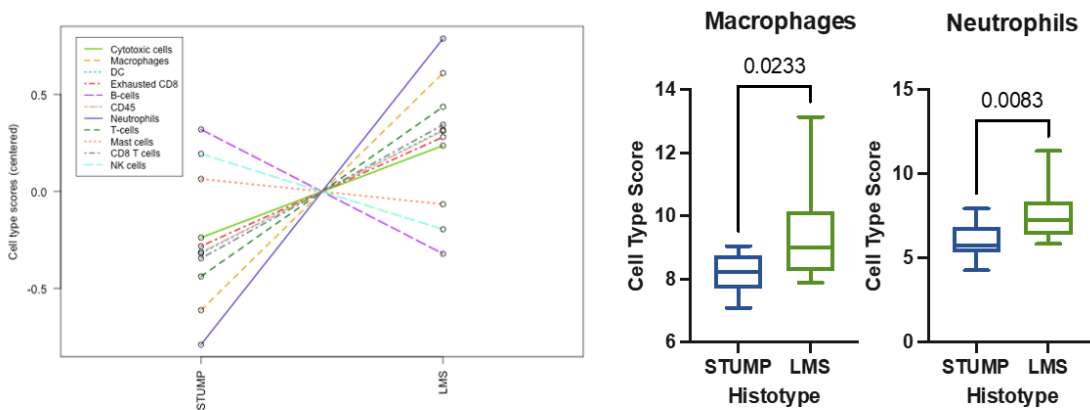


Figura 3: differenze nel microambiente tumorale tra STUMP e LMS

### 3.3.2 nrSTUMP vs LMS

Nella tabella 3 sono rappresentati i principali geni per i quali esiste una differenza statisticamente significativa tra gli STUMP non recidivati e i LMS. Alcuni di questi geni sono sovrapponibili a quelli trovati nell'analisi STUMP vs LMS, altri, in particolare quelli implicati nella proliferazione cellulare e nella riparazione dei danni al DNA differiscono rispetto ai precedenti.

<b>GENE</b>	<b>LOG2FOLD CHANGE</b>	<b>P-VALUE</b>	<b>FUNZIONE</b>
<i>CXCL8</i>	-6,96	0,0033	<i>Cytokine and Chemokine Signaling, Metabolic Stress</i>
<i>CCNO</i>	-5,64	0,00519	<i>Cell Proliferation, DNA Damage Repair</i>
<i>TNFRSF9</i>	-6,23	0,00519	
<i>CCNB1</i>	-2,89	0,00704	<i>Cell Proliferation</i>
<i>RUNX3</i>	-5,7	0,00704	
<i>S100A8</i>	-5,62	0,00779	<i>Myeloid Compartment</i>
<i>CXCL11</i>	-5,5	0,0119	<i>Cytokine and Chemokine Signaling, Lymphoid Compartment</i>
<i>AREG</i>	-5,87	0,0245	<i>Myeloid Compartment</i>
<i>BRIP1</i>	-2,85	0,0286	<i>DNA Damage Repair</i>
<i>S100A9</i>	-5,25	0,0286	<i>Myeloid Compartment</i>
<i>SREBF1</i>	-1,51	0,0381	
<i>KIF2C</i>	-3,42	0,0381	<i>Antigen Presentation, Cell Proliferation</i>

Tabella 3: differenze di espressione genica nrSTUMP vs LMS

Analizzando le differenze per quanto riguarda i pathway, sono molti di più quelli che risultano attivati maggiormente nei LMS rispetto ai nrSTUMP rispetto a quelli che si osservano nel confronto tra STUMP e LMS.

Si tratta in particolare di pathway implicati nell'angiogenesi, nel rimodellamento della matrice e nella formazione di metastasi, nella proliferazione cellulare, nella riparazione di danni al DNA e nella regolazione epigenetica.

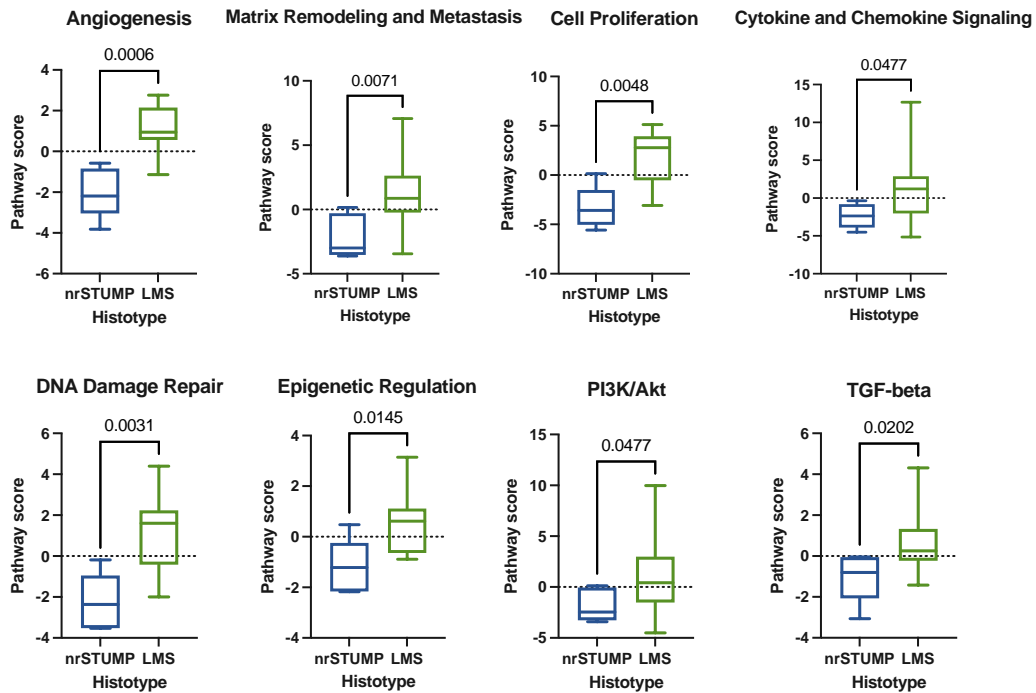
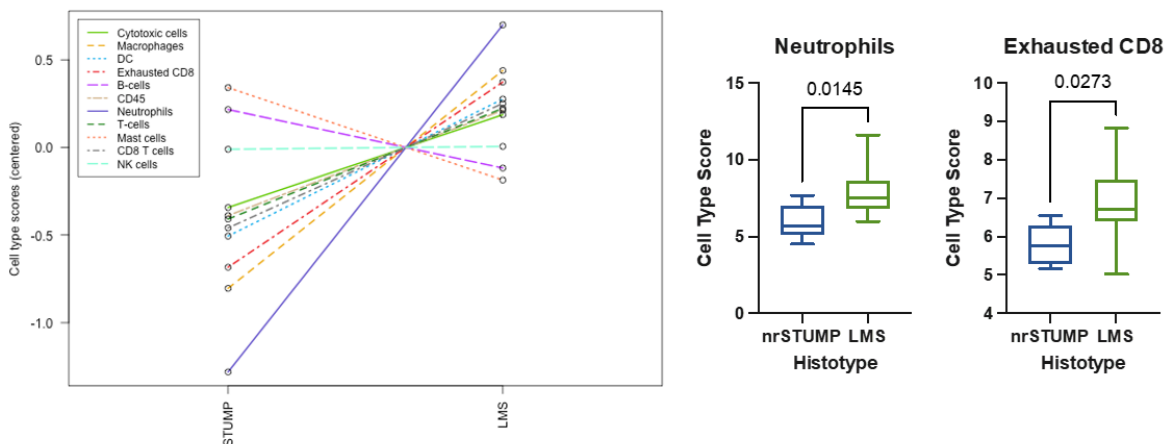


Figura 4: differenze nei pathway tra nrSTUMP e LMS

Per quanto concerne la rappresentazione di cellule immunitarie nel microambiente tumorale, rispetto al precedente confronto non esiste più una differenza significativa nella presenza dei macrofagi, ma resta per i neutrofili. Inoltre, si osserva una differenza statisticamente significativa per gli *Exhausted* CD8 che sono maggiormente rappresentati nel microambiente dei LMS.

Figura 5: differenze nel microambiente tumorale tra nrSTUMP e LMS



### 3.3.3 *rSTUMP* vs *LMS*

L'analisi dell'espressione genica di *STUMP* recidivati e *LMS* non ha consentito di individuare nessun gene per il quale esista una differenza di espressione statisticamente significativa tra le due entità. La tabella 9 racchiude i 15 geni per i quali esiste la maggior differenza, molti di questi sono in comune

con quelli precedentemente citati nei confronti tra STUMP e LMS; tuttavia, in questo caso, le differenze sono estremamente ridotte rispetto ai confronti precedenti e, infatti, non sono significative.

<b>GENE</b>	<b>LOG2FOLD CHANGE</b>	<b>P-VALUE</b>	<b>FUNZIONE</b>
<i>CXCL11</i>	-5,92	0,0808	<i>Cytokine and Chemokine Signaling, Lymphoid Compartment</i>
<i>TNFRSF9</i>	-5,22	0,0808	
<i>AREG</i>	-5,62	0,177	<i>Myeloid Compartment</i>
<i>CD86</i>	-4,33	0,177	<i>Costimulatory Signaling, Immune Cell Adhesion and Migration, Lymphoid Compartment</i>
<i>CD3D</i>	-4,08	0,206	<i>Costimulatory Signaling, Lymphoid Compartment</i>
<i>LY96</i>	-2,43	0,238	<i>Apoptosis, Myeloid Compartment</i>
<i>BNIP3</i>	1,43	0,356	<i>Autophagy, Epigenetic Regulation</i>
<i>MAML2</i>	-1,06	0,454	<i>Notch Signaling</i>
<i>CCL4</i>	-2,68	0,454	<i>Antigen Presentation, Cytokine and Chemokine Signaling, Myeloid Compartment</i>
<i>MS444A</i>	-3,14	0,454	
<i>SELL</i>	-2,86	0,455	<i>Immune Cell Adhesion and Migration</i>
<i>CTSS</i>	-2,89	0,483	<i>Antigen Presentation, Matrix Remodeling and Metastasis</i>
<i>VEGFA</i>	1,48	0,483	<i>Angiogenesis, Hypoxia, MAPK, Metabolic Stress, PI3K-Akt</i>
<i>S100A9</i>	-4,06	0,483	<i>Myeloid Compartment</i>
<i>RIPK2</i>	-1,09	0,488	<i>Costimulatory Signaling</i>

Tabella 3: differenze di espressione genica tra rSTUMP e LMS

L'assenza di differenze molecolari statisticamente significative tra STUMP recidivati e LMS trova conferma nell'analisi dei pathway. Anche in questo caso, infatti, non sono state identificate differenze

significative; come si evince dal grafico 7, il pathway con il p-value più basso è quello implicato nell'autofagia.

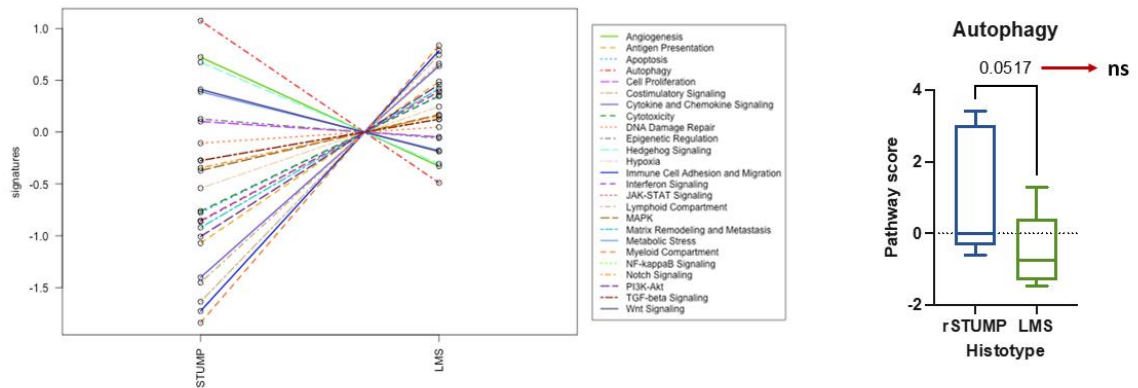


Figura 5: differenze nei pathway tra rSTUMP e LMS

Anche per quanto riguarda la presenza di cellule immunitarie all'interno del microambiente tumorale, non esistono differenze significative. Come si evince dal grafico 6 i macrofagi sembrano essere presenti in ugual modo, i neutrofili sono aumentati nei LMS mentre le cellule NK sono aumentate nei rSTUMP.

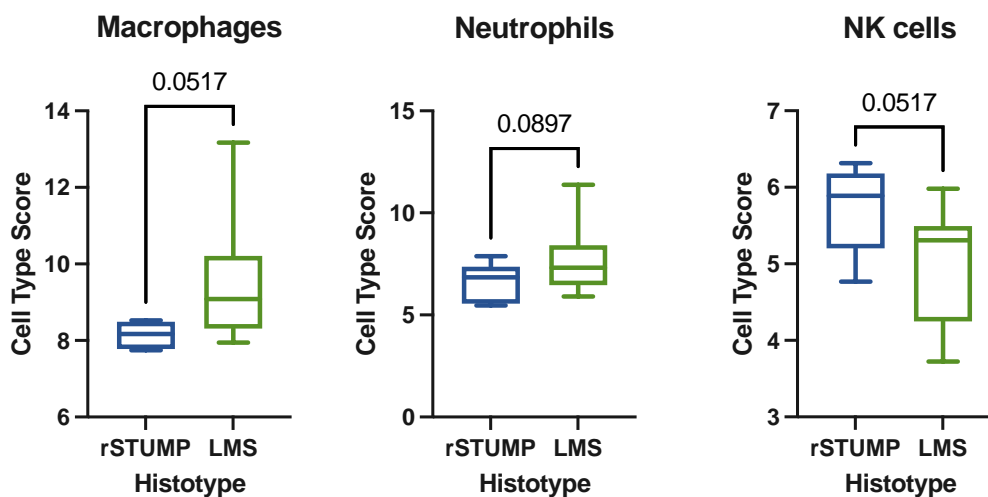


Figura 6: differenze nel microambiente tumorale tra rSTUMP e LMS

### 3.3.4 STUMP vs LM

Nella figura 7 sono riportanti i principali geni per i quali esiste una differenza tra STUMP e LM.

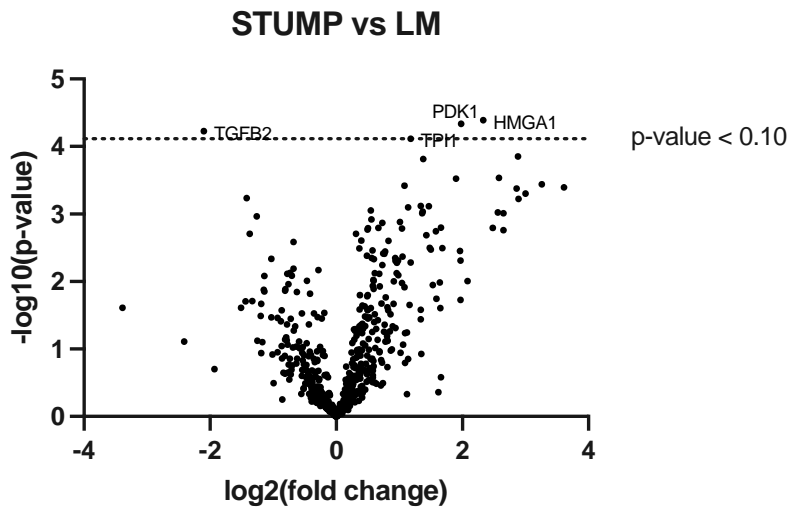
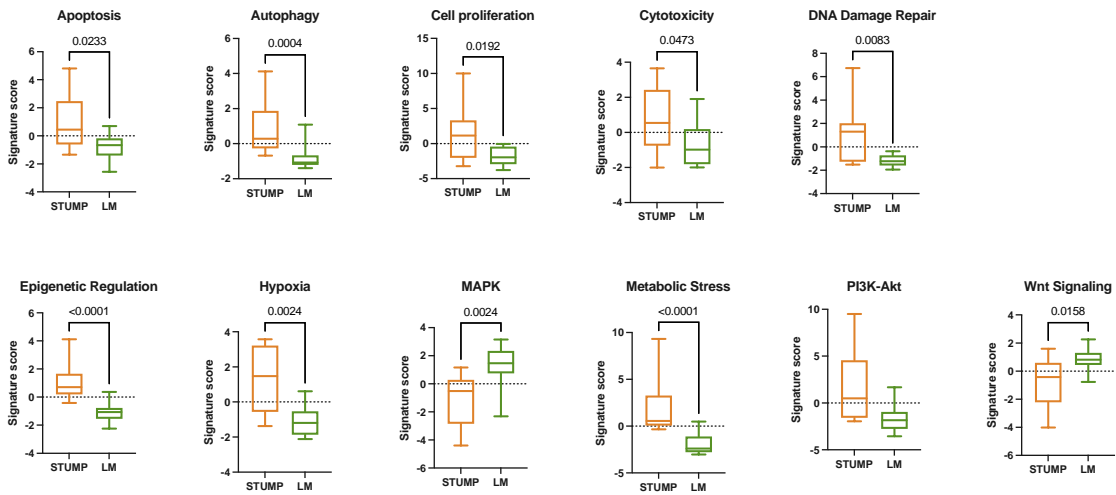


Figura 7: differenze di espressione genica tra STUMP e LM

I pathway per i quali esiste una differenza statisticamente significativa tra STUMP e LM sono molto più numerosi rispetto ai singoli geni. Si tratta di pathway implicati nella proliferazione cellulare, riparazione di danni al DNA, stress metabolico, apoptosi e regolazione epigenetica.

Figura 8: differenze di pathway tra STUMP e LM



Tuttavia, non sono state trovate differenze in merito alla presenza di cellule immunitarie all'interno del microambiente tumorale.

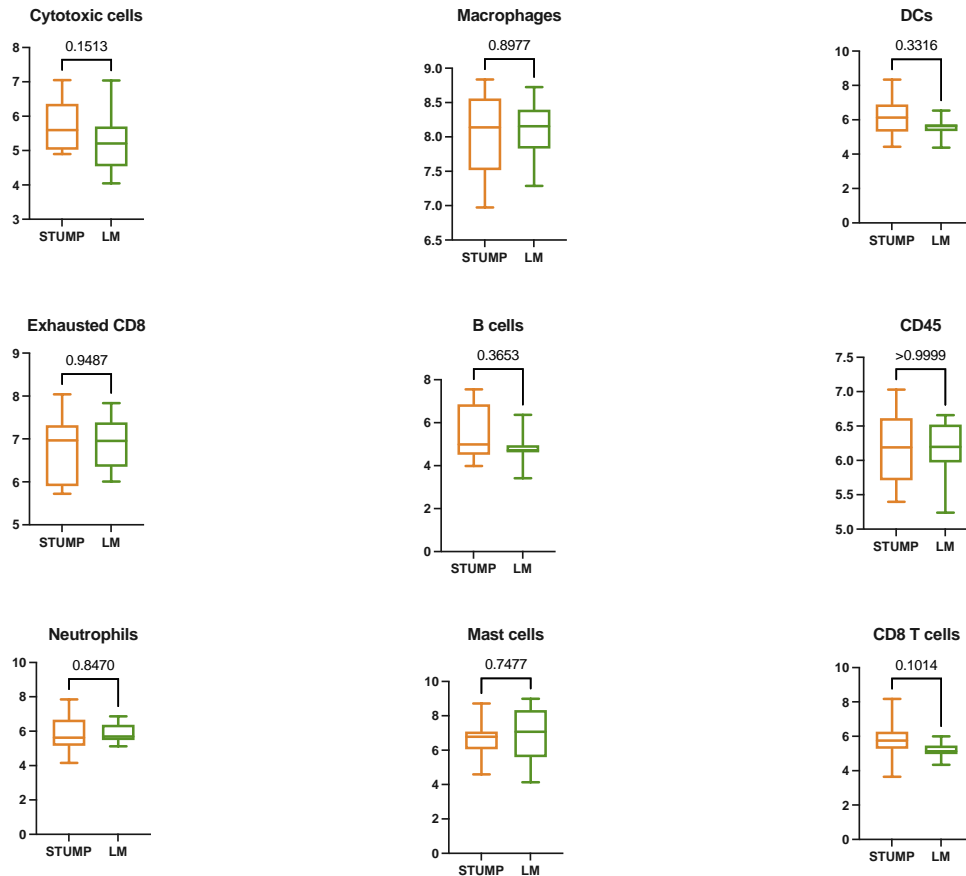


Figura 9: differenze nel microambiente tumorale tra STUMP e LM

### 3.3.5 *rSTUMP* vs LM

Il confronto tra STUMP recidivati e leiomiomi porta in evidenza numerosi geni per i quali esiste una differenza di espressione statisticamente significativa; molti di questi geni sono gli stessi che risultano differenti anche nel confronto tra LM e LMS.

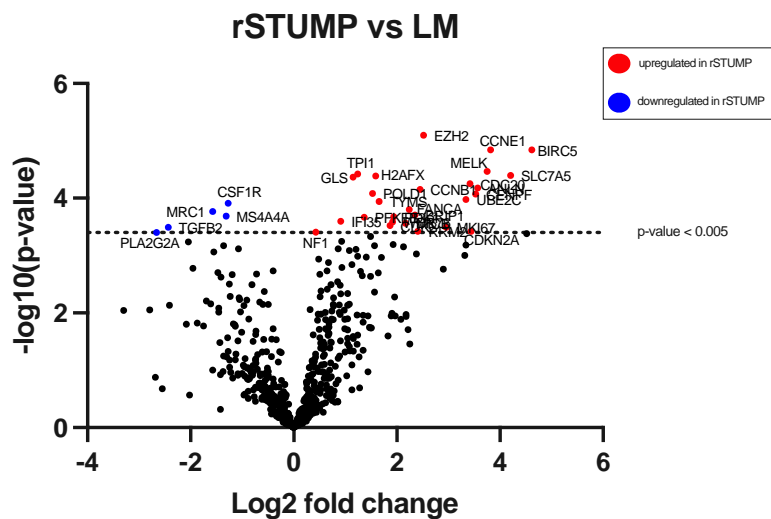


Figura 10: distribuzione delle differenze nell'espressione genica

Nella tabella 4 sono riportati i principali geni per i quali è stata osservata una differenza, in rosso sono rappresentati quelli osservati anche nel confronto LMS vs LM.

<b>GENE</b>	<b>FUNZIONE</b>
<b>EZH2-MRNA</b>	Angiogenesis, Epigenetic Regulation, Metabolic Stress
<b>BIRC5-MRNA</b>	Apoptosis, Cell Proliferation
<b>CCNE1-MRNA</b>	Angiogenesis, Cell Proliferation, Metabolic Stress, PI3K-Akt
<b>MELK-MRNA</b>	Cell Proliferation
<b>TPI1-MRNA</b>	Metabolic Stress
<b>SLC7A5-MRNA</b>	Metabolic Stress
<b>H2AFX-MRNA</b>	Cell Proliferation, DNA Damage Repair, Epigenetic Regulation, Metabolic Stress
<b>GLS-MRNA</b>	Metabolic Stress
<b>CDC20-MRNA</b>	Antigen Presentation, Cell Proliferation
<b>ANLN-MRNA</b>	Cell Proliferation
<b>CCNB1-MRNA</b>	Cell Proliferation
<b>POLD1-MRNA</b>	Cell Proliferation, DNA Damage Repair
<b>CENPF-MRNA</b>	Cell Proliferation
<b>UBE2C-MRNA</b>	Antigen Presentation, Cell Proliferation, Metabolic Stress
<b>TYMS-MRNA</b>	Cell Proliferation
<b>CSF1R-MRNA</b>	Cytokine and Chemokine Signaling, MAPK, Myeloid Compartment, PI3K-Akt
<b>FANCA-MRNA</b>	DNA Damage Repair
<b>MRC1-MRNA</b>	Antigen Presentation, Myeloid Compartment
<b>BRIP1-MRNA</b>	DNA Damage Repair
<b>MS444A-MRNA</b>	

Tabella 4: differenze nell'espressione genica tra rSTUMP e LM

Anche l'analisi dei pathway permette di identificare numerose differenze tra queste due entità tumorali. I pathway per i quali esistono le maggiori differenze sono quelli legati all'autofagia, alla proliferazione cellulare, stress metabolico e regolazione epigenetica. Un dato interessante è l'ipoespressione del pathway MAP chinasi negli STUMP recidivati rispetto ai leiomiomi.

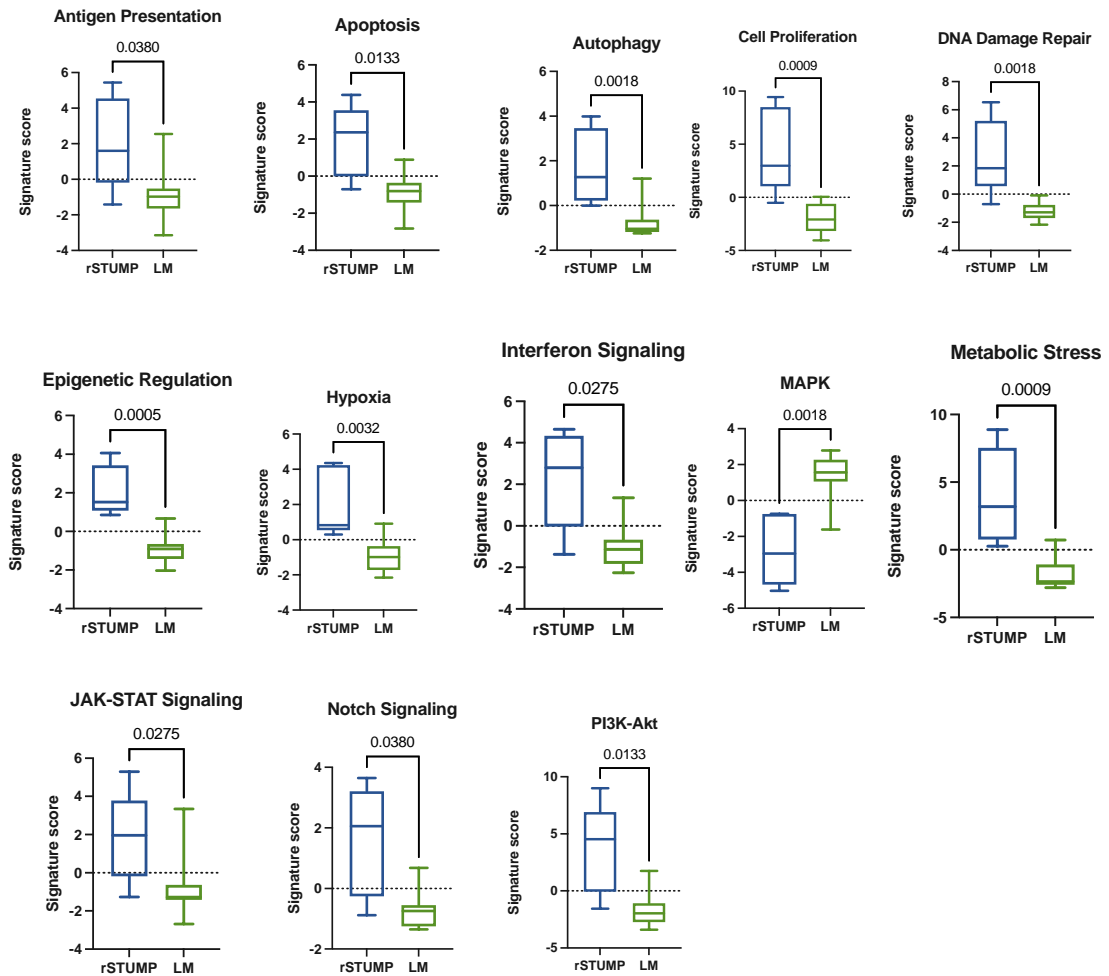


Figura 11: differenze di pathway tra rSTUMP e LM

Il profiling delle cellule immunitarie presenti nel microambiente tumorale non ha consentito di identificare differenze statisticamente significative tra STUMP recidivati e leiomiomi. Le due popolazioni cellulari per le quali esiste il p-value più basso sono i linfociti T e B.

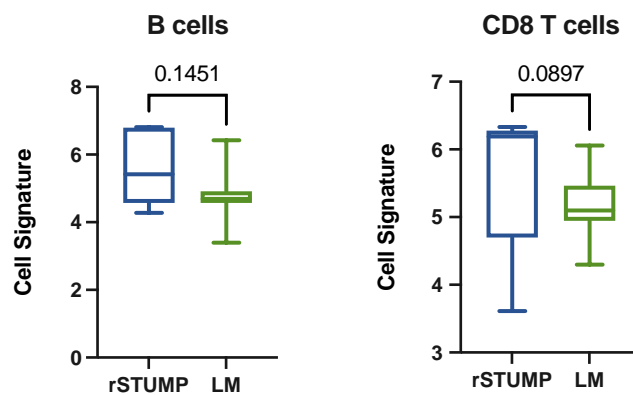


Figura 12: differenze nel microambiente tumorale tra rSTUMP e LM

### 3.3.6 LMS vs LM

L'analisi e il confronto dei pathway di leiomiomi e LMS ha identificato numerose differenze, dei pathway per i quali esiste una differenza statisticamente significativa 8 su 13 sono gli stessi che differivano tra rSTUMP e LM. L'autofagia è l'unico ad avere un trend inverso rispetto al confronto precedente.

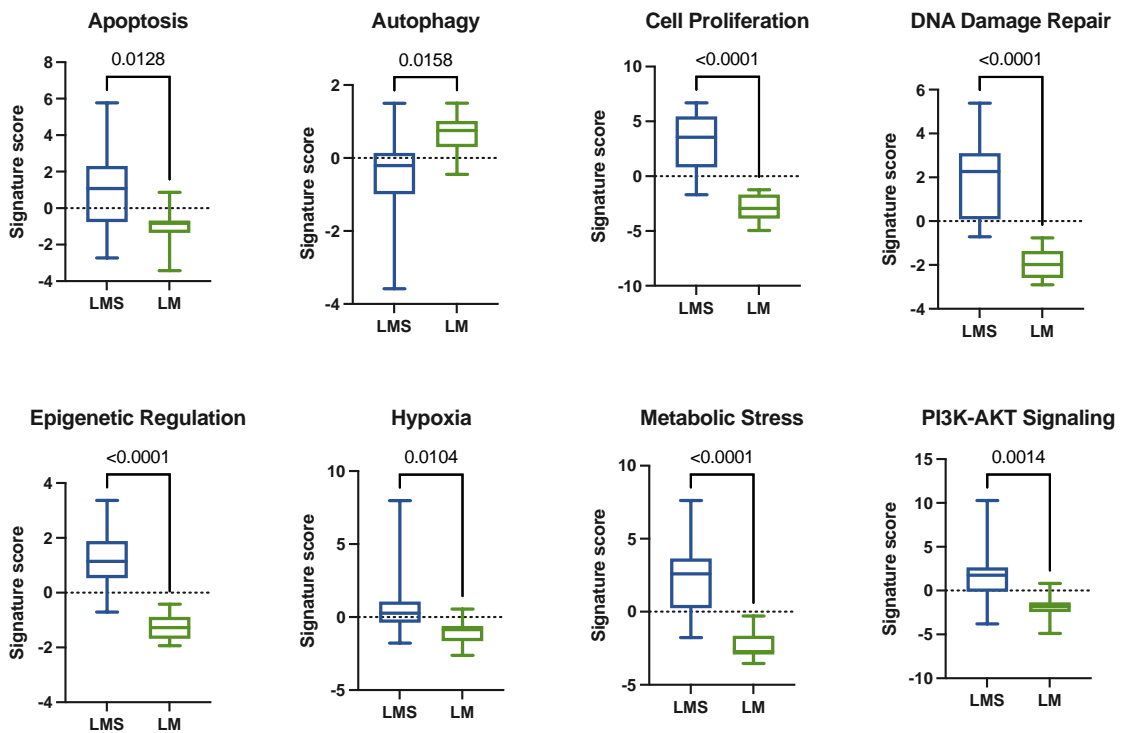


Figura 13: differenze nei pathway tra LMS e LM

Il confronto delle cellule immunitarie presenti nel microambiente tumorale in questo caso mostra una differenza significativa per quanto riguarda i linfociti T CD8+, ma in generale il trend per i linfociti B e T CD8+ è molto simile a quello osservato nel confronto tra rSTUMP e LM. Inoltre, compaiono tra le differenze con p-value significativo anche i CD45, neutrofili e linfociti T.

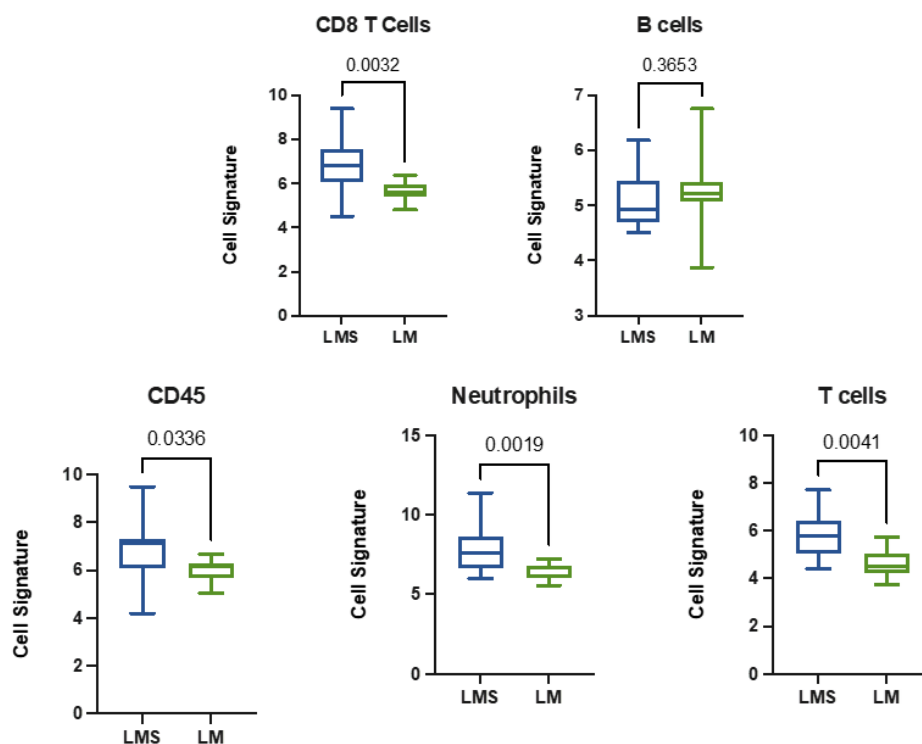


Figura 14: differenze nel microambiente tumorale tra LMS e LM

### 3.3.7 *nrSTUMP* vs LM

L'analisi dell'espressione genica di *STUMP* non recidivati e leiomiomi non ha trovato nessun gene la cui espressione risulti significativamente diversa tra le due entità tumorali. Come si evince dalla tabella 9 il gene la cui espressione è maggiormente differente è *HMG1*, coinvolto nella regolazione epigenetica.

<b>GENE</b>	<b>LOG2FOLD CHANGE</b>	<b>P-VALUE</b>	<b>FUNZIONE</b>
<i>HMG1</i>	2,21	0,285	Epigenetic Regulation, Metabolic Stress
<i>PDK1</i>	1,96	0,536	Hypoxia, Metabolic Stress
<i>PLA2G2A</i>	-2,09	0,919	MAPK
<i>TGFB2</i>	-1,95	1	MAPK, Matrix Remodeling and Metastasis, TGF-beta Signaling
<i>HSD11B1</i>	3,45	1	
<i>TPI1</i>	1,06	1	Metabolic Stress
<i>POLD1</i>	0,437	1	Cell Proliferation, DNA Damage Repair

<i>TGFBRI</i>	-1,46	1	MAPK, TGF-beta Signaling
<i>PTEN</i>	-0,746	1	Autophagy, Costimulatory Signaling, Metabolic Stress, PI3K-Akt
<i>PPARG</i>	1,57	1	
<i>SREBF1</i>	-1,16	1	
<i>PARP4</i>	0,485	1	DNA Damage Repair
<i>FLNB</i>	0,518	1	Interferon Signaling, MAPK
<i>MXII</i>	1,09	1	
<i>TYMS</i>	0,994	1	Cell Proliferation
<i>LDHA</i>	1,43	1	Hypoxia, Metabolic Stress
<i>NOD2</i>	-0,941	1	
<i>CCL19</i>	-1,87	1	Cytokine and Chemokine Signaling
<i>ITGAE</i>	0,425	1	Immune Cell Adhesion and Migration, Matrix Remodeling and Metastasis
<i>SLC16A1</i>	-1,19	1	Metabolic Stress

Tabella 5: differenze nell'espressione genica tra nrSTUMP e LM

L'analisi dei pathway ha mostrato risultati molto simili, l'unico pathway per il quale esistono delle differenze statisticamente significative è quello implicato nella regolazione epigenetica e che risulta iperespresso negli STUMP non recidivati.

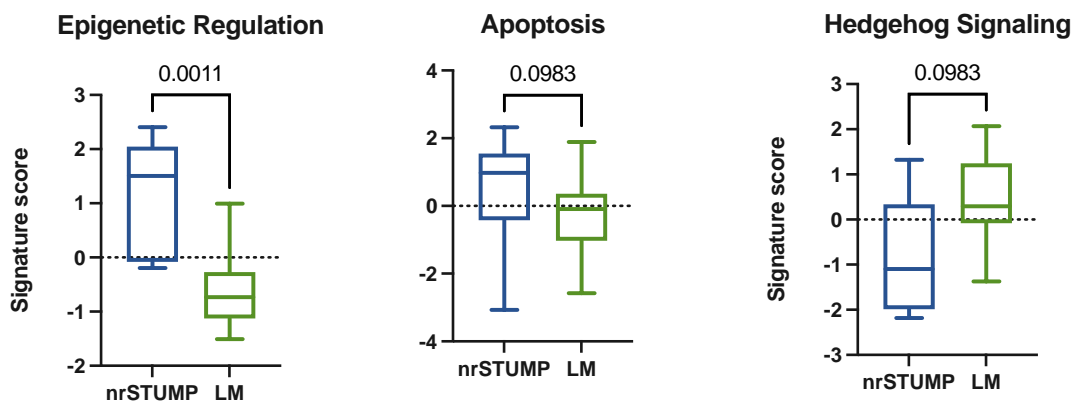
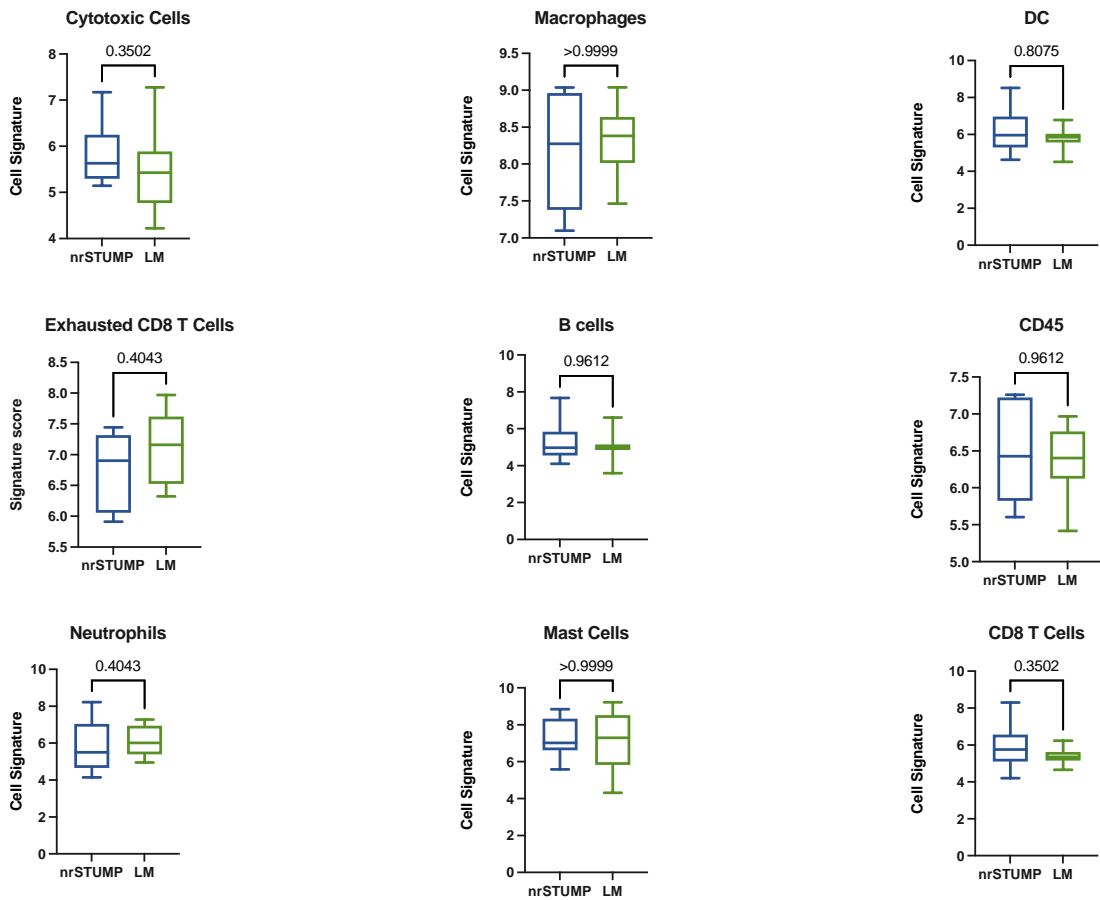


Figura 15: differenze nei pathway tra nrSTUMP e LM

Anche le cellule che costituiscono in microambiente tumorale non variano tra le due entità tumorali.

Figura 16: differenze nel microambiente tumorale tra nrSTUMP e LM



L'analisi dei pathway ha evidenziato numerose differenze tra queste due entità, che possono essere sovrapposte a quelle osservate tra LM e LMS. I pathway maggiormente significativi sono quelli coinvolti nella presentazione dell'antigene, nel compartimento mieloide e nell'interferon signaling.

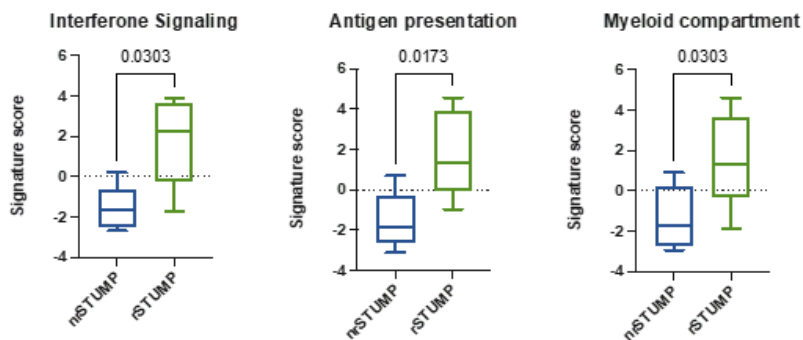


Figura 17: differenze nei pathway tra nrSTUMP e rSTUMP

## 4. Discussione

Abbiamo valutato in modo completo una vasta gamma di caratteristiche cliniche, chirurgiche e patologiche per accertare la loro associazione con il rischio di recidiva nei STUMP.

Per quanto riguarda le variabili cliniche e chirurgiche, il principale risultato del presente studio è l'associazione tra morcellazione/frammentazione e il rischio di recidiva/minore RFS. In generale, l'approccio chirurgico ottimale per rimuovere i STUMP è un argomento di dibattito poiché non ci sono prove chiare sul fatto che la radicalità chirurgica offra un vantaggio di sopravvivenza; inoltre, gli STUMP possono essere diagnosticati anche durante l'età riproduttiva in pazienti che desiderano una gravidanza, quindi deve essere presa in considerazione una procedura conservativa. Nel nostro studio, non abbiamo trovato differenze in termini di tassi di recidiva in base alle procedure chirurgiche, simili ai risultati riportati da altri autori. Lo stesso non era vero per la morcellazione: le recidive erano significativamente più frequenti dopo qualsiasi tipo di morcellazione (morcellazione elettrica o manuale). Questo risultato supporta fortemente le limitate evidenze disponibili finora che suggeriscono questa associazione. In uno studio su sette pazienti con diagnosi di STUMP o sarcoma stromale endometriale che hanno subito una morcellazione elettrica o manuale durante un'isterectomia o una miomectomia, sono stati osservati sei casi di recidiva dopo la riesplorazione chirurgica. Interessantemente, una recidiva è stata osservata anche in un caso che utilizzava un sistema di sacchetti contenitori. Un recente studio su 152 pazienti affetti da LMS uterino in stadio iniziale ha anche mostrato che qualsiasi tipo di morcellazione è legato al rischio di recidiva. Inoltre, in uno studio retrospettivo multicentrico su 125 pazienti affetti da sarcomi uterini o STUMP, le donne sottoposte a morcellazione elettrica o manuale hanno avuto un aumento del rischio di morte di tre volte rispetto ai pazienti che non l'hanno avuta ( $p = 0.02$ ), e una tendenza all'aumento del rischio di recidiva è stata specificamente trovata nella serie limitata ( $n = 11$ ) di donne sottoposte a morcellazione per STUMP (HR 7.7,  $p = 0.09$ ). La Food and Drug Administration (FDA) e l'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) hanno dichiarato che la

morcellazione dovrebbe essere evitata nei pazienti di età superiore ai 50 anni, mentre per i pazienti più giovani la possibilità di un intervento chirurgico minimamente invasivo dovrebbe essere attentamente considerata soppesando il rapporto rischio-beneficio. In questo contesto, la morcellazione in sacchetto potrebbe ridurre o annullare il rischio di recidiva; tuttavia, mancano evidenze solide.

I nostri dati supportano che la morcellazione/frammentazione non dovrebbe essere eseguita se si sospetta un STUMP e, se eseguita, è consigliato un follow-up ravvicinato.

Per quanto riguarda le differenze istopatologiche presenti tra STUMP recidivati e non recidivati, prendendo in considerazione l'espressione recettoriale e le mitosi, sia come numero di mitosi per 10 HPF sia considerato l'indice proliferativo Ki67, l'unico aspetto risultato significativamente differente tra le due categorie è il numero di mitosi per 10 HPF.

L'attività proliferativa e la conta mitotica rappresentano un importante fattore prognostico in numerosi tumori, tuttavia, il significato della conta mitotica per gli STUMP è controverso e in alcuni studi<sup>192,193</sup> non è risultato un parametro prognostico significativo. In altri studi, invece, è stata osservata una conta mitotica significativamente più bassa nei casi che non vanno incontro a recidiva ed è stato proposto un cut-off di 10 mitosi per 10 HPF come soglia di rischio per la recidiva.<sup>174,194,195</sup> Questo trova conferma nei risultati ottenuti dal nostro studio che mostrano una conta mitotica significativamente più alta negli STUMP recidivati con una media di 19 per 10 HPF (quindi >10 per 10 HPF).

Per quanto riguarda l'espressione percentuale di Ki67, pur essendo raddoppiato nei casi recidivati (20%) rispetto a quelli non recidivati (10%), non è risultato significativo; anche secondo altri autori<sup>196,197</sup> il Ki67 non deve essere considerato come un fattore prognostico utile per valutare il rischio di sopravvivenza degli STUMP, tuttavia molti di questi studi non prendevano in considerazione una coorte di pazienti affette da STUMP sufficientemente ampia e non si concentravano sulle differenze tra STUMP recidivati e non recidivati. Un recente studio<sup>195</sup> suggerisce

un cut-off di Ki67>20% come fattore correlato sia alla recidiva sia al tempo libero da malattia, effettivamente le nostre analisi mostrano una media di Ki67 del 20% nei casi di STUMP andanti incontro a recidiva.

Lo studio dell'espressione recettoriale non ha mostrato una differenza statisticamente significativa per quanto concerne ER e PgR, nonostante in un recente studio<sup>195</sup> si era osservata una correlazione tra una minor espressione di recettore del progesterone e un più alto rischio di recidiva; tuttavia, queste differenze potrebbero essere dovute alla scarsa numerosità nel campione di STUMP recidivati preso in considerazione dal nostro studio. Infatti, sarebbe più logico aspettarsi una minor espressione di recettore del progesterone negli STUMP recidivati anche vista la scarsa espressione dello stesso nei LMS, considerando le similitudini molecolari e genetiche che esistono tra queste due categorie diagnostiche. Per i LMS una maggior espressione di recettore del progesterone è molto rara (circa il 10% dei casi)<sup>198</sup> e sembra correlare con una maggior sopravvivenza e una minor progressione di malattia<sup>199,200</sup>, la maggior parte dei LMS, infatti, ha una scarsissima espressione di recettore del progesterone e una pessima prognosi.

Per quanto riguarda le restanti caratteristiche istologiche prese in considerazione dal nostro studio l'unica ad essere significativamente diversa tra le due categorie è la presenza di aspetti epitelioidi, nonostante altri studi<sup>33</sup> suggeriscono che oltre a questo anche le intrusioni vascolari e le mitosi atipiche correlino con un più alto rischio di recidiva.

Gli aspetti epitelioidi sono stati associati a un comportamento biologico più aggressivo non solo negli STUMO, ma in tutti i tumori della muscolatura liscia dell'utero.<sup>201,202</sup>

Nonostante quanto si possa pensare neanche l'ipercellularità e la presenza di necrosi possono essere considerati fattori prognostici per gli STUMP.

Le analisi effettuate mediante la piattaforma *NanoString*, hanno consentito di ottenere dei confronti crociati tra le diverse entità tumorali in modo da poterne comprendere le similitudini e le differenze che possano spiegare le affinità o le discrepanze nel comportamento di queste lesioni.

Il confronto dell'espressione genica tra STUMP e LMS ha consentito di osservare numerose differenze significative; i geni la cui espressione è maggiormente differente sono quelli che risultano down-regolati negli STUMP rispetto ai LMS e sono per lo più implicati nel reclutamento di cellule immunitarie (compartimento mieloide, adesione e migrazione delle cellule immunitarie, segnalazione mediante chemochine, compartimento linfoide) e in parte anche nella proliferazione e nell'angiogenesi. Questo suggerisce un ruolo cruciale dell'immunità nella genesi tumorale e trova conferma nell'analisi dei pathway, in cui si osserva nei LMS un'aumentata espressione di pathway correlati all'immunità, in particolare al compartimento mieloide, oltre che un aumento dei pathway implicati nella genesi di metastasi. Il profilo delle cellule immunitarie presenti nel microambiente tumorale evidenzia una maggior presenza di macrofagi e, soprattutto, di neutrofili nei LMS.

Anche il confronto tra nrSTUMP e LMS ha individuato numerose differenze statisticamente significative nell'espressione genica che riguardano per lo più gli stessi geni evidenziati nel confronto appena citato, tuttavia, in questo caso le differenze sembrano essere più spiccate suggerendo che i nrSTUMP e i rSTUMP (esclusi da questo secondo confronto) siano due entità molto diverse tra loro. Anche l'analisi dei pathway mostra delle differenze significative, che appaiono anche in questo caso più numerose rispetto al confronto precedentemente citato. Tra i pathway espressi in maniera differenziale troviamo quello implicato nella regolazione epigenetica, maggiormente espresso nei LMS; potrebbe essere interessante mettere a confronto la metilazione delle due diverse entità poiché, visti i risultati da noi ottenuti, questo potrebbe aiutare a distinguerle una dall'altra.

Il confronto tra rSTUMP e LMS, invece, non ha evidenziato nessun gene espresso in maniera significativamente differente; i geni per i quali esiste la maggior differenza sono quelli coinvolti nel funzionamento del compartimento mieloide e linfoide e nella segnalazione mediante chemochine, tuttavia, le differenze non sono statisticamente significative. Anche i pathway sono del tutto sovrapponibili e quello che si avvicina di più alla significatività è legato all'autofagia.

Per quanto riguarda la composizione cellulare del microambiente tumorale, è da notare un aumento

delle cellule NK, seppur non significativo, nei rSTUMP che si discosta dal trend delle altre popolazioni cellulari che, invece, tendono ad essere maggiormente numerose nei LMS; la maggior espressione di cellule NK nei rSTUMP potrebbe essere legata all'attività antitumorale svolta da queste cellule negli stadi iniziali delle neoplasie, suggerendo che la corretta interpretazione di un rSTUMP sia quella di un LMS nella prime fasi evolutive.

Queste analogie molecolari presenti tra rSTUMP e LMS rappresentano un'importante scoperta, poiché confermano che dal punto di vista genetico gli STUMP che vanno incontro a recidiva possono essere considerati alla stregua di un LMS. Di conseguenza sarebbe necessario chiedersi, di fronte ad uno STUMP con queste caratteristiche molecolari, se non sarebbe più corretto parlare già di LMS e trattarlo clinicamente come tale.

Il confronto tra STUMP e LM, esattamente al contrario rispetto al loro confronto con i LMS, non mostra alcun tipo di differenza statisticamente significativa nell'espressione genica e nella composizione del microambiente tumorale. Le uniche differenze sono riscontrabili nell'analisi dei pathway e alcuni esempi sono quelli coinvolti nella regolazione epigenetica, nella proliferazione, nell'autofagia. Ciò suggerisce che queste due entità, se consideriamo gli STUMP nel loro insieme e non quelli che hanno un comportamento clinico aggressivo, sono sovrapponibili dal punto di vista molecolare e, infatti, hanno un comportamento clinico molto simile.

Al contrario, il confronto tra rSTUMP e LM ha identificato numerosi geni la cui espressione è significativamente differente tra queste due entità e molti di questi si sovrappongono a quelli dell'analisi delle differenze tra LMS e LM a suggerire, ancora una volta, le similitudini esistenti tra gli STUMP che vanno incontro a recidiva e i LMS. Tra i geni in questione troviamo EZH2, probabilmente correlato alla nicchia di cellule staminali da cui originano i rSTUMP e i LMS e coinvolto anche nella metilazione degli istoni. Anche nell'analisi dei pathway sono numerose le differenze tra rSTUMP e LM e 8 pathway con un'espressione significativamente diversa su 13 si mantengono anche nel confronto tra LMS e LM. Tra i pathway in questione troviamo quello implicato

nella proliferazione cellulare, che ancora una volta suggerisce la possibilità che quelli che chiamiamo STUMP e che vanno incontro a recidiva siano in realtà dei LMS. I pathway implicati nella presentazione dell'antigene e nell'interferon signaling sono aumentati nei rSTUMP ma non nei LMS, la motivazione potrebbe essere quella di un reshaping del sistema immunitario e una parziale risposta antitumorale negli STUMP recidivati rispetto ai LMS. Il pathway implicato nell'autofagia ha invece una tendenza inversa nei LMS, in cui risulta ridotto nel confronto con i LM, rispetto al corrispettivo confronto per i rSTUMP; anche in questo caso potrebbe avere un significato protettivo.

Per quanto riguarda le cellule immunitarie non ci sono differenze statisticamente significative nel confronto tra rSTUMP e LM, ma il p-value più significativo è quello correlato ai linfociti B e T probabilmente a causa della fase di iniziazione tumorale. Il confronto tra LMS e LM, invece, mostra numerose differenze nel microambiente tumorale, con una presenza di cellule immunitarie (in particolare linfociti T CD8<sup>+</sup> e neutrofili) nettamente superiore nei LMS rispetto ai leiomiomi.

Il confronto tra nrSTUMP e LM ha dato risultati molto simili al confronto tra la totalità degli STUMP e i LM; non sono stati evidenziati geni la cui espressione fosse significativamente diversa e quello con il p-value più vicino alla significatività è HMGA1 coinvolto nella regolazione epigenetica e in particolare nell'apertura della cromatina, che abbiamo spesso visto essere coinvolta nelle differenze tra queste entità tumorali. Anche l'analisi dei pathway conferma queste similitudini e l'unico pathway significativo è infatti quello implicato nella regolazione epigenetica. Si potrebbe ipotizzare che, vista l'iper-espressione di HMGA1 nei nrSTUMP, potrebbe essere correlato a una sorta di stato evolutivo di questa lesione rispetto ad un semplice leiomioma.

Infine, il confronto tra nrSTUMP e rSTUMP conferma l'esistenza di differenze a livello di pathway; quelli più significativi sono ancora una volta implicati nel funzionamento delle cellule immunitarie e risultano iper-espressi nei rSTUMP.

In conclusione, possiamo affermare che le principali differenze sono riscontrabili non solo tra LM e LMS, ma anche tra LM e rSTUMP e tra nrSTUMP e rSTUMP, e che, invece, gli STUMP che vanno

incontro a recidiva sono sovrapponibili a un LMS.

Le principali differenze genetiche e molecolari evidenziate dal nostro studio sono quelle inerenti alla proliferazione cellulare e alla genesi di metastasi e, soprattutto, al reclutamento delle cellule immunitarie nel microambiente tumorale e alla regolazione epigenetica.

Il ruolo dell'immunità nella genesi tumorale non è una novità ed è già stato esplorato per numerose entità tumorali da diversi studi presenti in letteratura; i risultati ottenuti dal nostro studio, che vedono una maggior rappresentazione di cellule immunitarie nel microambiente di LMS e rSTUMP e una maggior espressione da parte degli stessi di geni correlati al funzionamento del compartimento mieloide e linfoide, si allineano con le informazioni presenti in letteratura.<sup>203</sup> In particolare, l'iperespressione dei neutrofili nel microambiente tumorale dei LMS e dei rSTUMP trova spiegazione nel fatto che si tratta di cellule plastiche dotate di un importante effetto pro-tumorale e che hanno un ruolo nell'iniziazione e progressione tumorale, nella genesi di metastasi e nella recidiva delle masse tumorali. Quello che alcuni studi suggeriscono è che avvenga una riprogrammazione dei neutrofili in senso pro-tumorale da parte del tumore stesso mediante la secrezione di citochine, chemochine e altri fattori con una conseguente acquisizione, da parte dei neutrofili, di proprietà immunosoppressive. Inoltre, anche l'ipossia sembra avere un ruolo nel determinare un maggior reclutamento di neutrofili e una loro riprogrammazione.<sup>204</sup> Prevenire la riprogrammazione dei neutrofili potrebbe essere un'importante strategia terapeutica per i LMS e, vista la loro analogia, anche per gli STUMP con comportamento clinico aggressivo.

Anche le differenze nella regolazione epigenetica, maggiormente espressa sia come pathway sia come geni correlati alla metilazione nei LMS e nei rSTUMP, trovano conferma in studi presenti in letteratura. In particolare, potrebbe essere interessante concentrarsi sulle distinte *DNA methylation signatures* presenti nei diversi tumori che potrebbero aiutare a caratterizzare ulteriormente le neoplasie della muscolatura liscia dell'utero, in particolare nei casi che rappresentano una sfida diagnostica.<sup>205</sup>

## 5. Conclusioni

Gli STUMP sono tumori il cui comportamento è difficilmente prevedibile, di conseguenza, identificare la corretta modalità di gestione terapeutica e di follow-up è complesso e può portare a errori da parte del clinico che possono avere gravi ripercussioni sulla sopravvivenza della paziente. Conoscere quali sono le caratteristiche istopatologiche e i fondamenti molecolari che stanno alla base dei diversi comportamenti, e quindi della diversa sopravvivenza, di queste entità tumorali può avere un grande risvolto sulla gestione di questo tipo di neoplasia. Infatti, identificare precocemente in seguito all'intervento quali sono i fattori predittivi di un comportamento più aggressivo può far propendere verso un follow-up più serrato o, in altri casi, verso un trattamento adiuvante. Inoltre, la conoscenza delle caratteristiche del microambiente tumorale e dell'espressione di mRNA implicati nella regolazione della risposta immunitaria può aprire le porte a nuovi orizzonti terapeutici, come l'immunoterapia.

I limiti di questo studio sono legati prevalentemente alla relativa bassa numerosità del campione di pazienti con STUMP recidivati a nostra disposizione, dovuti alla rarità di questo tumore, e al fatto che le caratteristiche da noi analizzate sono tutte valutabili solo nel post-intervento tramite l'analisi del pezzo operatorio e quindi non possono avere un impatto sulla gestione chirurgica della paziente, ma solo nel follow-up.

Tuttavia, si tratta di uno studio che ha consentito di analizzare aspetti non ancora esplorati degli STUMP utilizzando una tecnologia all'avanguardia e di ottenere dei confronti non ancora presenti in letteratura circa le caratteristiche di espressione genica e del microambiente tumorale dei tumori della muscolatura liscia dell'utero.

## Bibliografia

1. Holdsworth-Carson, S. J., Zaitseva, M., Vollenhoven, B. J. & Rogers, P. A. W. Clonality of smooth muscle and fibroblast cell populations isolated from human fibroid and myometrial tissues. *Mol. Hum. Reprod.* **20**, 250–259 (2014).
2. Stewart, E. A. *et al.* Uterine fibroids. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2**, 16043 (2016).
3. Uterine fibroids (leiomyomas): Variants and smooth muscle tumors of uncertain malignant potential. <https://www.medilib.ir/uptodate/show/15676>.

4. Elizabeth A. Stewart, M. D. *Uterine Fibroids*. (2007). doi:10.56021/9780801887000.
5. Munro, M. G., Critchley, H. O. D., Broder, M. S. & Fraser, I. S. FIGO - Sistema di classificazione (PALM-COEIN) delle cause di sanguinamento uterino anomalo in donne non gravide e in età riproduttiva.
6. RJ, K., ML, C., CS, H. & RH, Y. *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*.
7. Guntupalli, S. R. *et al.* Uterine smooth muscle tumor of uncertain malignant potential: a retrospective analysis. *Gynecol. Oncol.* **113**, 324–326 (2009).
8. Gadducci, A. & Zannoni, G. F. Uterine smooth muscle tumors of unknown malignant potential: A challenging question. *Gynecol. Oncol.* **154**, 631–637 (2019).
9. Dall'Asta, A. *et al.* Uterine smooth muscle tumors of uncertain malignant potential (STUMP): pathology, follow-up and recurrence. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 8136–8142 (2014).
10. Mp, W. Uterine Smooth Muscle Tumors of Uncertain Malignant Potential (STUMP): Review of Pathophysiology, Classification, Diagnosis, Treatment, and Surveillance. *J. Healthc. Commun.* **02**, (2017).
11. Roberts, M. E., Aynardi, J. T. & Chu, C. S. Uterine leiomyosarcoma: A review of the literature and update on management options. *Gynecol. Oncol.* **151**, 562–572 (2018).
12. Giuntoli, R. L. *et al.* Retrospective review of 208 patients with leiomyosarcoma of the uterus: prognostic indicators, surgical management, and adjuvant therapy. *Gynecol. Oncol.* **89**, 460–469 (2003).
13. Sun, S. *et al.* How to differentiate uterine leiomyosarcoma from leiomyoma with imaging. *Diagn. Interv. Imaging* **100**, 619–634 (2019).
14. Gadducci, A. *et al.* Uterine leiomyosarcoma: analysis of treatment failures and survival. *Gynecol. Oncol.* **62**, 25–32 (1996).
15. Baird, D. D., Dunson, D. B., Hill, M. C., Cousins, D. & Schectman, J. M. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **188**, 100–107 (2003).
16. Cramer, S. F. & Patel, A. The frequency of uterine leiomyomas. *Am. J. Clin. Pathol.* **94**, 435–438 (1990).

17. Downes, E. *et al.* The burden of uterine fibroids in five European countries. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **152**, 96–102 (2010).
18. Borah, B. J., Nicholson, W. K., Bradley, L. & Stewart, E. A. The impact of uterine leiomyomas: a national survey of affected women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **209**, 319.e1-319.e20 (2013).
19. Marsh, E. E. *et al.* Racial differences in fibroid prevalence and ultrasound findings in asymptomatic young women (18-30 years old): a pilot study. *Fertil. Steril.* **99**, 1951–1957 (2013).
20. Laughlin, S. K., Baird, D. D., Savitz, D. A., Herring, A. H. & Hartmann, K. E. Prevalence of uterine leiomyomas in the first trimester of pregnancy: an ultrasound-screening study. *Obstet. Gynecol.* **113**, 630–635 (2009).
21. Selo-Ojeme, D. *et al.* The incidence of uterine leiomyoma and other pelvic ultrasonographic findings in 2,034 consecutive women in a north London hospital. *J. Obstet. Gynaecol. J. Inst. Obstet. Gynaecol.* **28**, 421–423 (2008).
22. Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9397113/>.
23. Peddada, S. D. *et al.* Growth of uterine leiomyomata among premenopausal black and white women. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19887–19892 (2008).
24. Marshall, L. M. *et al.* A prospective study of reproductive factors and oral contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyomata. *Fertil. Steril.* **70**, 432–439 (1998).
25. Baird, D. D. & Newbold, R. Prenatal diethylstilbestrol (DES) exposure is associated with uterine leiomyoma development. *Reprod. Toxicol. ELMSford N* **20**, 81–84 (2005).
26. HUYCK, K. L. *et al.* The Impact of Race as a Risk Factor for Symptom Severity and Age at Diagnosis of Uterine Leiomyomata among Affected Sisters. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **198**, 168.e1-168.e9 (2008).
27. Wise, L. A. *et al.* Reproductive factors, hormonal contraception, and risk of uterine leiomyomata in African-American women: a prospective study. *Am. J. Epidemiol.* **159**, 113–123 (2004).
28. Wise, L. A., Radin, R. G., Palmer, J. R., Kumanyika, S. K. & Rosenberg, L. A prospective study of dairy intake and risk of uterine leiomyomata. *Am. J. Epidemiol.* **171**, 221–232 (2010).

29. Wise, L. A. *et al.* Intake of fruit, vegetables, and carotenoids in relation to risk of uterine leiomyomata. *Am. J. Clin. Nutr.* **94**, 1620–1631 (2011).
30. Baird, D. D., Hill, M. C., Schectman, J. M. & Hollis, B. W. Vitamin d and the risk of uterine fibroids. *Epidemiol. Camb. Mass* **24**, 447–453 (2013).
31. Eggemoen, Å. R. *et al.* Vitamin D deficiency and supplementation in pregnancy in a multiethnic population-based cohort. *BMC Pregnancy Childbirth* **16**, 7 (2016).
32. Nesby-O’Dell, S. *et al.* Hypovitaminosis D prevalence and determinants among African American and white women of reproductive age: third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 187–192 (2002).
33. Gupta, M., Laury, A. L., Nucci, M. R. & Quade, B. J. Predictors of adverse outcome in uterine smooth muscle tumours of uncertain malignant potential (STUMP): a clinicopathological analysis of 22 cases with a proposal for the inclusion of additional histological parameters. *Histopathology* **73**, 284–298 (2018).
34. Bacanakgil, B. H., Deveci, M., Karabuk, E. & Soyman, Z. Uterine Smooth Muscle Tumor of Uncertain Malignant Potential: Clinicopathologic-Sonographic Characteristics, Follow-Up and Recurrence. *World J. Oncol.* **8**, 76–80 (2017).
35. Basaran, D. *et al.* The Clinicopathological Study of 21 Cases With Uterine Smooth Muscle Tumors of Uncertain Malignant Potential: Centralized Review Can Purify the Diagnosis. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* **28**, 233–240 (2018).
36. D’Angelo, E. & Prat, J. Uterine sarcomas: a review. *Gynecol. Oncol.* **116**, 131–139 (2010).
37. Major, F. J. *et al.* Prognostic factors in early-stage uterine sarcoma. A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* **71**, 1702–1709 (1993).
38. Abeler, V. M. *et al.* Uterine sarcomas in Norway. A histopathological and prognostic survey of a total population from 1970 to 2000 including 419 patients. *Histopathology* **54**, 355–364 (2009).
39. Skorstad, M., Kent, A. & Lieng, M. Uterine leiomyosarcoma - incidence, treatment, and the impact of morcellation. A nationwide cohort study. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **95**, 984–990 (2016).

40. Lakhman, Y. *et al.* Differentiation of Uterine Leiomyosarcoma from Atypical Leiomyoma: Diagnostic Accuracy of Qualitative MR Imaging Features and Feasibility of Texture Analysis. *Eur. Radiol.* **27**, 2903–2915 (2017).
41. Seagle, B.-L. L. *et al.* Prognosis and treatment of uterine leiomyosarcoma: A National Cancer Database study. *Gynecol. Oncol.* **145**, 61–70 (2017).
42. Perri, T. *et al.* Uterine leiomyosarcoma: does the primary surgical procedure matter? *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* **19**, 257–260 (2009).
43. Robinson, E., Neugut, A. I. & Wylie, P. Clinical aspects of postirradiation sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **80**, 233–240 (1988).
44. Ognjanovic, S., Olivier, M., Bergemann, T. L. & Hainaut, P. Sarcomas in TP53 germline mutation carriers: a review of the IARC TP53 database. *Cancer* **118**, 1387–1396 (2012).
45. Association of tamoxifen and uterine sarcoma - PubMed.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12039943/>.
46. Wysowski, D. K., Honig, S. F. & Beitz, J. Uterine sarcoma associated with tamoxifen use. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1832–1833 (2002).
47. Bartosch, C. *et al.* Distant Metastases in Uterine Leiomyosarcomas: The Wide Variety of Body Sites and Time Intervals to Metastatic Relapse. *Int. J. Gynecol. Pathol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Pathol.* **36**, 31–41 (2017).
48. Mbatani, N., Olawaiye, A. B. & Prat, J. Uterine sarcomas. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **143**, 51–58 (2018).
49. Ono, M. *et al.* Paracrine activation of WNT/ $\beta$ -catenin pathway in uterine leiomyoma stem cells promotes tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 17053–17058 (2013).
50. Zhou, S. *et al.* Proteomics identification of annexin A2 as a key mediator in the metastasis and proangiogenesis of endometrial cells in human adenomyosis. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **11**, M112.017988 (2012).

51. Holdsworth-Carson, S. J., Zaitseva, M., Girling, J. E., Vollenhoven, B. J. & Rogers, P. A. W. Common fibroid-associated genes are differentially expressed in phenotypically dissimilar cell populations isolated from within human fibroids and myometrium. *Reprod. Camb. Engl.* **147**, 683–692 (2014).
52. Stewart, E. A. & Nowak, R. A. Leiomyoma-related bleeding: a classic hypothesis updated for the molecular era. *Hum. Reprod. Update* **2**, 295–306 (1996).
53. Sinclair, D. C., Mastroyannis, A. & Taylor, H. S. Leiomyoma simultaneously impair endometrial BMP-2-mediated decidualization and anticoagulant expression through secretion of TGF- $\beta$ 3. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 412–421 (2011).
54. Lee, B. S. & Nowak, R. A. Human leiomyoma smooth muscle cells show increased expression of transforming growth factor-beta 3 (TGF beta 3) and altered responses to the antiproliferative effects of TGF beta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 913–920 (2001).
55. Fleischer, R., Weston, G. C., Vollenhoven, B. J. & Rogers, P. A. W. Pathophysiology of fibroid disease: angiogenesis and regulation of smooth muscle proliferation. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **22**, 603–614 (2008).
56. Leppert, P. C. *et al.* Comparative ultrastructure of collagen fibrils in uterine leiomyomas and normal myometrium. *Fertil. Steril.* **82 Suppl 3**, 1182–1187 (2004).
57. Halder, S. K. *et al.* Novel MED12 gene somatic mutations in women from the Southern United States with symptomatic uterine fibroids. *Mol. Genet. Genomics MGG* **290**, 505–511 (2015).
58. Mäkinen, N. *et al.* MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas. *Science* **334**, 252–255 (2011).
59. Mehine, M., Mäkinen, N., Heinonen, H.-R., Aaltonen, L. A. & Vahteristo, P. Genomics of uterine leiomyomas: insights from high-throughput sequencing. *Fertil. Steril.* **102**, 621–629 (2014).
60. Mehine, M. *et al.* Characterization of uterine leiomyomas by whole-genome sequencing. *N. Engl. J. Med.* **369**, 43–53 (2013).

61. Zaitseva, M., Vollenhoven, B. J. & Rogers, P. A. W. Retinoids regulate genes involved in retinoic acid synthesis and transport in human myometrial and fibroid smooth muscle cells. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **23**, 1076–1086 (2008).
62. Bertsch, E. *et al.* MED12 and HMGA2 mutations: two independent genetic events in uterine leiomyoma and leiomyosarcoma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **27**, 1144–1153 (2014).
63. Maekawa, R. *et al.* Genome-Wide DNA Methylation Analysis Reveals a Potential Mechanism for the Pathogenesis and Development of Uterine Leiomyomas. *PLoS ONE* **8**, e66632 (2013).
64. Navarro, A. *et al.* Genome-wide DNA methylation indicates silencing of tumor suppressor genes in uterine leiomyoma. *PloS One* **7**, e33284 (2012).
65. Donnez, J. *et al.* Long-term treatment of uterine fibroids with ulipristal acetate ☆. *Fertil. Steril.* **101**, 1565-1573.e1–18 (2014).
66. Donnez, J. *et al.* Ulipristal acetate versus leuprolide acetate for uterine fibroids. *N. Engl. J. Med.* **366**, 421–432 (2012).
67. Ishikawa, H. *et al.* Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. *Endocrinology* **151**, 2433–2442 (2010).
68. Brakta, S., Diamond, J. S., Al-Hendy, A., Diamond, M. P. & Halder, S. K. Role of vitamin D in uterine fibroid biology. *Fertil. Steril.* **104**, 698–706 (2015).
69. Catherino, W. H. & Malik, M. Uterine leiomyomas express a molecular pattern that lowers retinoic acid exposure. *Fertil. Steril.* **87**, 1388–1398 (2007).
70. Zaitseva, M., Vollenhoven, B. J. & Rogers, P. A. W. Retinoic acid pathway genes show significantly altered expression in uterine fibroids when compared with normal myometrium. *Mol. Hum. Reprod.* **13**, 577–585 (2007).
71. Bodner, K., Bodner-Adler, B., Kimberger, O., Czerwenka, K. & Mayerhofer, K. Estrogen and progesterone receptor expression in patients with uterine smooth muscle tumors. *Fertil. Steril.* **81**, 1062–1066 (2004).

72. Parker, W. H. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertil. Steril.* **87**, 725–736 (2007).
73. Walker, C. L. & Stewart, E. A. Uterine fibroids: the elephant in the room. *Science* **308**, 1589–1592 (2005).
74. Hernando, E. *et al.* The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas. *Nat. Med.* **13**, 748–753 (2007).
75. Cuppens, T., Tuyaerts, S. & Amant, F. Potential Therapeutic Targets in Uterine Sarcomas. *Sarcoma* **2015**, 243298 (2015).
76. Tsuyoshi, H. & Yoshida, Y. Molecular biomarkers for uterine leiomyosarcoma and endometrial stromal sarcoma. *Cancer Sci.* **109**, 1743–1752 (2018).
77. Lim, D. *et al.* Interobserver variability in the interpretation of tumor cell necrosis in uterine leiomyosarcoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **37**, 650–658 (2013).
78. O'Neill, C. J., McBride, H. A., Connolly, L. E. & McCluggage, W. G. Uterine leiomyosarcomas are characterized by high p16, p53 and MIB1 expression in comparison with usual leiomyomas, leiomyoma variants and smooth muscle tumours of uncertain malignant potential. *Histopathology* **50**, 851–858 (2007).
79. Chen, L. & Yang, B. Immunohistochemical analysis of p16, p53, and Ki-67 expression in uterine smooth muscle tumors. *Int. J. Gynecol. Pathol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Pathol.* **27**, 326–332 (2008).
80. Williams Gynecology, 4e | AccessObGyn | McGraw Hill Medical.  
<https://obgyn.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2658&sectionid=217599855>.
81. Wilkinson, N. & Rollason, T. P. Recent advances in the pathology of smooth muscle tumours of the uterus. *Histopathology* **39**, 331–341 (2001).
82. Ly, A. *et al.* Atypical leiomyomas of the uterus: a clinicopathologic study of 51 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **37**, 643–649 (2013).
83. Willems, S. M., Wiweger, M., van Roggen, J. F. G. & Hogendoorn, P. C. W. Running GAGs: myxoid matrix in tumor pathology revisited. *Virchows Arch.* **456**, 181–192 (2010).

84. Parra-Herran, C. *et al.* Myxoid Leiomyosarcoma of the Uterus: A Clinicopathologic Analysis of 30 Cases and Review of the Literature With Reappraisal of Its Distinction From Other Uterine Myxoid Mesenchymal Neoplasms. *Am. J. Surg. Pathol.* **40**, 285–301 (2016).
85. Schoolmeester, J. K. *et al.* Perivascular epithelioid cell neoplasm (PEComa) of the gynecologic tract: clinicopathologic and immunohistochemical characterization of 16 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **38**, 176–188 (2014).
86. Bell, S. W., Kempson, R. L. & Hendrickson, M. R. Problematic uterine smooth muscle neoplasms. A clinicopathologic study of 213 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **18**, 535–558 (1994).
87. Downes, K. A. & Hart, W. R. Bizarre leiomyomas of the uterus: a comprehensive pathologic study of 24 cases with long-term follow-up. *Am. J. Surg. Pathol.* **21**, 1261–1270 (1997).
88. Pautier, P. *et al.* Analysis of clinicopathologic prognostic factors for 157 uterine sarcomas and evaluation of a grading score validated for soft tissue sarcoma. *Cancer* **88**, 1425–1431 (2000).
89. Prayson, R. A., Goldblum, J. R. & Hart, W. R. Epithelioid smooth-muscle tumors of the uterus: a clinicopathologic study of 18 patients. *Am. J. Surg. Pathol.* **21**, 383–391 (1997).
90. Dal Cin, P. Cytogenetics of Mesenchymal Tumors of the Female Genital Tract. *Surg. Pathol. Clin.* **2**, 813–821 (2009).
91. Zhai, Y.-L. *et al.* Frequent Occurrence of Loss of Heterozygosity among Tumor Suppressor Genes in Uterine Leiomyosarcoma. *Gynecol. Oncol.* **75**, 453–459 (1999).
92. Woźniak, A. & Woźniak, S. Ultrasonography of uterine leiomyomas. *Przegląd Menopauzalny Menopause Rev.* **16**, 113–117 (2017).
93. Bonneau, C. *et al.* Value of ultrasonography and magnetic resonance imaging for the characterization of uterine mesenchymal tumors. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **93**, 261–268 (2014).
94. Aviram, R. *et al.* Uterine sarcomas versus leiomyomas: gray-scale and Doppler sonographic findings. *J. Clin. Ultrasound JCU* **33**, 10–13 (2005).

95. Ludovisi, M. *et al.* Imaging in gynecological disease (15): clinical and ultrasound characteristics of uterine sarcoma. *Ultrasound Obstet. Gynecol. Off. J. Int. Soc. Ultrasound Obstet. Gynecol.* **54**, 676–687 (2019).
96. Cotrino, I. *et al.* Ultrasound and clinical characteristics of uterine smooth muscle tumors of uncertain malignant potential (STUMPs). *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **251**, 167–172 (2020).
97. Rha, S. E. *et al.* CT and MRI of Uterine Sarcomas and Their Mimickers. *Am. J. Roentgenol.* **181**, 1369–1374 (2003).
98. CT features for diagnosing acute torsion of uterine subserosal leiomyoma - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29224115/>.
99. Roy, C., Bierry, G., El Ghali, S., Buy, X. & Rossini, A. Acute torsion of uterine leiomyoma: CT features. *Abdom. Imaging* **30**, 120–123 (2005).
100. Sarcomas of abdominal organs: computed tomography and magnetic resonance imaging findings - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21963162/>.
101. Tonolini, M. Multidetector CT of expected findings and complications after hysterectomy. *Insights Imaging* **9**, 369–383 (2018).
102. Uterine sarcomas: then and now - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22733915/>.
103. Ho, K.-C. *et al.* Presurgical Identification of Uterine Smooth Muscle Malignancies through the Characteristic FDG Uptake Pattern on PET Scans. *Contrast Media Mol. Imaging* **2018**, 7890241 (2018).
104. Gaetke-Udager, K. *et al.* Diagnostic Accuracy of Ultrasound, Contrast-enhanced CT, and Conventional MRI for Differentiating Leiomyoma From Leiomyosarcoma. *Acad. Radiol.* **23**, 1290–1297 (2016).
105. Van den Bosch, T., Coosemans, A., Morina, M., Timmerman, D. & Amant, F. Screening for uterine tumours. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **26**, 257–266 (2012).
106. Schwartz, L. B., Zawin, M., Carcangiu, M. L., Lange, R. & McCarthy, S. Does pelvic magnetic resonance imaging differentiate among the histologic subtypes of uterine leiomyomata? *Fertil. Steril.* **70**, 580–587 (1998).

107. Samuel, A., Fennessy, F. M., Tempany, C. M. C. & Stewart, E. A. Avoiding treatment of leiomyosarcomas: the role of magnetic resonance in focused ultrasound surgery. *Fertil. Steril.* **90**, 850.e9-850.e12 (2008).
108. Thomassin-Naggara, I. *et al.* How to differentiate benign from malignant myometrial tumours using MR imaging. *Eur. Radiol.* **23**, 2306–2314 (2013).
109. Amant, F., Coosemans, A., Debiec-Rychter, M., Timmerman, D. & Vergote, I. Clinical management of uterine sarcomas. *Lancet Oncol.* **10**, 1188–1198 (2009).
110. Tamai, K. *et al.* The utility of diffusion-weighted MR imaging for differentiating uterine sarcomas from benign leiomyomas. *Eur. Radiol.* **18**, 723–730 (2008).
111. Kakhki, V. R. D. *et al.* Diagnostic performance of fluorine 18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging for detection of primary lesion and staging of endometrial cancer patients: systematic review and meta-analysis of the literature. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* **23**, 1536–1543 (2013).
112. Kusunoki, S. *et al.* Efficacy of PET/CT to exclude leiomyoma in patients with lesions suspicious for uterine sarcoma on MRI. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* **56**, 508–513 (2017).
113. Brown, R. S. *et al.* Glucose transporters and FDG uptake in untreated primary human non-small cell lung cancer. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **40**, 556–565 (1999).
114. Umesaki, N. *et al.* Positron emission tomography with (18)F-fluorodeoxyglucose of uterine sarcoma: a comparison with magnetic resonance imaging and power Doppler imaging. *Gynecol. Oncol.* **80**, 372–377 (2001).
115. Kitajima, K., Murakami, K., Yamasaki, E., Kaji, Y. & Sugimura, K. Standardized uptake values of uterine leiomyoma with 18F-FDG PET/CT: variation with age, size, degeneration, and contrast enhancement on MRI. *Ann. Nucl. Med.* **22**, 505–512 (2008).
116. Chura, J. C. *et al.* Positron emission tomography and leiomyomas: clinicopathologic analysis of 3 cases of PET scan-positive leiomyomas and literature review. *Gynecol. Oncol.* **104**, 247–252 (2007).

117. Yamane, T., Takaoka, A., Kita, M., Imai, Y. & Senda, M. 18F-FLT PET performs better than 18F-FDG PET in differentiating malignant uterine corpus tumors from benign leiomyoma. *Ann. Nucl. Med.* **26**, 478–484 (2012).
118. Levy, G., Hill, M. J., Plowden, T. C., Catherino, W. H. & Armstrong, A. Y. Biomarkers in uterine leiomyoma. *Fertil. Steril.* **99**, 1146–1152 (2013).
119. Di Cello, A. *et al.* A more accurate method to interpret lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes' results in patients with uterine masses. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **236**, 143–147 (2019).
120. Forget, P. *et al.* What is the normal value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio? *BMC Res. Notes* **10**, 12 (2017).
121. Gibson, P. H. *et al.* Preoperative neutrophil-lymphocyte ratio and outcome from coronary artery bypass grafting. *Am. Heart J.* **154**, 995–1002 (2007).
122. Azab, B., Chainani, V., Shah, N. & McGinn, J. T. Neutrophil-lymphocyte ratio as a predictor of major adverse cardiac events among diabetic population: a 4-year follow-up study. *Angiology* **64**, 456–465 (2013).
123. Kudlinski, B. *et al.* Systemic Inflammatory Predictors of In-Hospital Mortality in COVID-19 Patients: A Retrospective Study. *Diagnostics* **12**, 859 (2022).
124. Proctor, M. J. *et al.* A comparison of inflammation-based prognostic scores in patients with cancer. A Glasgow Inflammation Outcome Study. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **47**, 2633–2641 (2011).
125. Hung, H.-Y. *et al.* Effect of preoperative neutrophil-lymphocyte ratio on the surgical outcomes of stage II colon cancer patients who do not receive adjuvant chemotherapy. *Int. J. Colorectal Dis.* **26**, 1059–1065 (2011).
126. Tomita, M., Shimizu, T., Ayabe, T., Yonei, A. & Onitsuka, T. Preoperative neutrophil to lymphocyte ratio as a prognostic predictor after curative resection for non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* **31**, 2995–2998 (2011).
127. Sharaiha, R. Z. *et al.* Elevated preoperative neutrophil:lymphocyte ratio as a predictor of postoperative disease recurrence in esophageal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **18**, 3362–3369 (2011).

128. Garcea, G. *et al.* Preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) is associated with reduced disease-free survival following curative resection of pancreatic adenocarcinoma. *World J. Surg.* **35**, 868–872 (2011).
129. Azab, B. *et al.* Usefulness of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting short- and long-term mortality in breast cancer patients. *Ann. Surg. Oncol.* **19**, 217–224 (2012).
130. Keizman, D. *et al.* The association of pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio with response rate, progression free survival and overall survival of patients treated with sunitinib for metastatic renal cell carcinoma. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **48**, 202–208 (2012).
131. Ishizuka, M., Shimizu, T. & Kubota, K. Neutrophil-to-lymphocyte ratio has a close association with gangrenous appendicitis in patients undergoing appendectomy. *Int. Surg.* **97**, 299–304 (2012).
132. Kahramanca, S. *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictor of acute appendicitis. *Ulus. Travma Ve Acil Cerrahi Derg. Turk. J. Trauma Emerg. Surg. TJTES* **20**, 19–22 (2014).
133. Song, H. *et al.* Preoperative neutrophil-to-lymphocyte, platelet-to-lymphocyte and monocyte-to-lymphocyte ratio as a prognostic factor in non-endometrioid endometrial cancer. *Int. J. Med. Sci.* **18**, 3712–3717 (2021).
134. Matsubara, S., Mabuchi, S., Takeda, Y., Kawahara, N. & Kobayashi, H. Prognostic value of pre-treatment systemic immune-inflammation index in patients with endometrial cancer. *PLOS ONE* **16**, e0248871 (2021).
135. Leng, J., Wu, F. & Zhang, L. Prognostic Significance of Pretreatment Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio, Platelet-to-Lymphocyte Ratio, or Monocyte-to-Lymphocyte Ratio in Endometrial Neoplasms: A Systematic Review and Meta-analysis. *Front. Oncol.* **12**, 734948 (2022).
136. Zou, P., Yang, E. & Li, Z. Neutrophil-to-lymphocyte ratio is an independent predictor for survival outcomes in cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **10**, 21917 (2020).
137. El Bairi, K., Al Jarroudi, O. & Afqir, S. Inexpensive Systemic Inflammatory Biomarkers in Ovarian Cancer: An Umbrella Systematic Review of 17 Prognostic Meta-Analyses. *Front. Oncol.* **11**, (2021).

138. Kim, H. S. *et al.* Neutrophil to lymphocyte ratio for preoperative diagnosis of uterine sarcomas: a case-matched comparison. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* **36**, 691–698 (2010).
139. Suh, D. S. *et al.* Preoperative Blood Inflammatory Markers for the Differentiation of Uterine Leiomyosarcoma from Leiomyoma. *Cancer Manag. Res.* **13**, 5001–5011 (2021).
140. Pérez-López, F. R. *et al.* EMAS position statement: management of uterine fibroids. *Maturitas* **79**, 106–116 (2014).
141. Marret, H. *et al.* Therapeutic management of uterine fibroid tumors: updated French guidelines. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **165**, 156–164 (2012).
142. Gupta, J. K., Sinha, A., Lumsden, M. A. & Hickey, M. Uterine artery embolization for symptomatic uterine fibroids. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD005073 (2012) doi:10.1002/14651858.CD005073.pub3.
143. Gupta, J. K., Sinha, A., Lumsden, M. A. & Hickey, M. Uterine artery embolization for symptomatic uterine fibroids. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD005073 (2012) doi:10.1002/14651858.CD005073.pub3.
144. Zupi, E. *et al.* Nonsurgical Alternatives for Uterine Fibroids. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **34**, 122–131 (2016).
145. Chen, J. *et al.* Evaluation of high-intensity focused ultrasound ablation for uterine fibroids: an IDEAL prospective exploration study. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **125**, 354–364 (2018).
146. Chen, J. *et al.* Safety of ultrasound-guided ultrasound ablation for uterine fibroids and adenomyosis: A review of 9988 cases. *Ultrason. Sonochem.* **27**, 671–676 (2015).
147. Stewart, E. A. *et al.* Focused ultrasound treatment of uterine fibroid tumors: safety and feasibility of a noninvasive thermoablative technique. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **189**, 48–54 (2003).
148. Fennessy, F. M. *et al.* Uterine leiomyomas: MR imaging-guided focused ultrasound surgery--results of different treatment protocols. *Radiology* **243**, 885–893 (2007).
149. Hesley, G. K., Gorny, K. R., Henrichsen, T. L., Woodrum, D. A. & Brown, D. L. A clinical review of focused ultrasound ablation with magnetic resonance guidance: an option for treating uterine fibroids. *Ultrasound Q.* **24**, 131–139 (2008).

150. Yoon, S.-W. *et al.* Patient selection guidelines in MR-guided focused ultrasound surgery of uterine fibroids: a pictorial guide to relevant findings in screening pelvic MRI. *Eur. Radiol.* **18**, 2997–3006 (2008).
151. Brucker, S. Y. *et al.* Laparoscopic radiofrequency volumetric thermal ablation of fibroids versus laparoscopic myomectomy. *Int. J. Gynaecol. Obstet. Off. Organ Int. Fed. Gynaecol. Obstet.* **125**, 261–265 (2014).
152. Bergamini, V. *et al.* Laparoscopic radiofrequency thermal ablation: a new approach to symptomatic uterine myomas. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **192**, 768–773 (2005).
153. Metwally, M., Raybould, G., Cheong, Y. C. & Horne, A. W. Surgical treatment of fibroids for subfertility. *Cochrane Database Syst. Rev.* **1**, CD003857 (2020).
154. Parker, W. H. & Rodi, I. A. Patient selection for laparoscopic myomectomy. *J. Am. Assoc. Gynecol. Laparosc.* **2**, 23–26 (1994).
155. Gargiulo, A. R. *et al.* Robot-assisted laparoscopic myomectomy compared with standard laparoscopic myomectomy. *Obstet. Gynecol.* **120**, 284–291 (2012).
156. Uterine fibroids (leiomyomas): Treatment overview - UpToDate.  
<https://www.uptodate.com/contents/uterine-fibroids-leiomyomas-treatment-overview#H3559194752>.
157. Uterine Morcellation for Presumed Leiomyomas. **137**, (2021).
158. West, S., Ruiz, R. & Parker, W. H. Abdominal myomectomy in women with very large uterine size. *Fertil. Steril.* **85**, 36–39 (2006).
159. Oladapo, O. T. & Akinsanya, A. F. Relative morbidity of abdominal myomectomy for very large uterine fibroids in a developing country hospital. *Arch. Gynecol. Obstet.* **283**, 825–830 (2010).
160. Stewart, E. A., Shuster, L. T. & Rocca, W. A. Reassessing hysterectomy. *Minn. Med.* **95**, 36–39 (2012).
161. Wright, J. D. *et al.* Nationwide trends in the performance of inpatient hysterectomy in the United States. *Obstet. Gynecol.* **122**, 233–241 (2013).
162. Nicholson, W. K. *et al.* Short-Term Health-Related Quality of Life After Hysterectomy Compared With Myomectomy for Symptomatic Leiomyomas. *Obstet. Gynecol.* **134**, 261–269 (2019).

163. Kuppermann, M. *et al.* Contributions of hysterectomy and uterus-preserving surgery to health-related quality of life. *Obstet. Gynecol.* **122**, 15–25 (2013).
164. Kuppermann, M. *et al.* Predictors of hysterectomy use and satisfaction. *Obstet. Gynecol.* **115**, 543–551 (2010).
165. Farquhar, C. M., Sadler, L., Harvey, S. A. & Stewart, A. W. The association of hysterectomy and menopause: a prospective cohort study. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **112**, 956–962 (2005).
166. Trabuco, E. C., Moorman, P. G., Algeciras-Schimmich, A., Weaver, A. L. & Cliby, W. A. Association of Ovary-Sparing Hysterectomy With Ovarian Reserve. *Obstet. Gynecol.* **127**, 819–827 (2016).
167. Moorman, P. G. *et al.* Effect of hysterectomy with ovarian preservation on ovarian function. *Obstet. Gynecol.* **118**, 1271–1279 (2011).
168. Laughlin-Tommaso, S. K. *et al.* Long-term risk of de novo mental health conditions after hysterectomy with ovarian conservation: a cohort study. *Menopause N. Y. N* **27**, 33–42 (2020).
169. Sk, L.-T. *et al.* Cardiovascular and metabolic morbidity after hysterectomy with ovarian conservation: a cohort study. *Menopause N. Y. N* **25**, (2018).
170. Rizzo, A. *et al.* Recurrent Uterine Smooth-Muscle Tumors of Uncertain Malignant Potential (STUMP): State of The Art. *Anticancer Res.* **40**, 1229–1238 (2020).
171. Hughes, L., Roex, A. & Parange, A. STUMP, a surprise finding in a large fibroid uterus in a 20-year-old woman. *Int. J. Womens Health* **10**, 211–214 (2018).
172. Vilos, G. A. *et al.* Uterine smooth muscle tumors of uncertain malignant potential: diagnostic challenges and therapeutic dilemmas. Report of 2 cases and review of the literature. *J. Minim. Invasive Gynecol.* **19**, 288–295 (2012).
173. Ip, P. P. C., Tse, K. Y. & Tam, K. F. Uterine smooth muscle tumors other than the ordinary leiomyomas and leiomyosarcomas: a review of selected variants with emphasis on recent advances and unusual morphology that may cause concern for malignancy. *Adv. Anat. Pathol.* **17**, 91–112 (2010).
174. Ip, P. P. C. & Cheung, A. N. Y. Pathology of uterine leiomyosarcomas and smooth muscle tumours of uncertain malignant potential. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **25**, 691–704 (2011).

175. Atkins, K. A., Arronte, N., Darus, C. J. & Rice, L. W. The Use of p16 in enhancing the histologic classification of uterine smooth muscle tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* **32**, 98–102 (2008).
176. Berretta, R., Rolla, M., Merisio, C., Giordano, G. & Nardelli, G. B. Uterine smooth muscle tumor of uncertain malignant potential: a three-case report. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* **18**, 1121–1126 (2008).
177. Tung, H.-J. *et al.* Management and Prognosis of Patients with Recurrent or Persistent/Progressive Uterine Carcinosarcoma. *Curr. Oncol.* **29**, 7607–7623 (2022).
178. Tropé, C. G., Abeler, V. M. & Kristensen, G. B. Diagnosis and treatment of sarcoma of the uterus. A review. *Acta Oncol.* **51**, 694–705 (2012).
179. Dinh, T. A., Oliva, E. A., Fuller, A. F., Lee, H. & Goodman, A. The treatment of uterine leiomyosarcoma. Results from a 10-year experience (1990-1999) at the Massachusetts General Hospital. *Gynecol. Oncol.* **92**, 648–652 (2004).
180. Park, J.-Y. *et al.* Prognostic factors and treatment outcomes of patients with uterine sarcoma: analysis of 127 patients at a single institution, 1989-2007. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **134**, 1277–1287 (2008).
181. Sagae, S. *et al.* Preoperative diagnosis and treatment results in 106 patients with uterine sarcoma in Hokkaido, Japan. *Oncology* **67**, 33–39 (2004).
182. Raine-Bennett, T. *et al.* Occult Uterine Sarcoma and Leiomyosarcoma: Incidence of and Survival Associated With Morcellation. *Obstet. Gynecol.* **127**, 29–39 (2016).
183. Kapp, D. S., Shin, J. Y. & Chan, J. K. Prognostic factors and survival in 1396 patients with uterine leiomyosarcomas. *Cancer* **112**, 820–830 (2008).
184. Nasioudis, D., Chapman-Davis, E., Frey, M. & Holcomb, K. Safety of ovarian preservation in premenopausal women with stage i uterine sarcoma. *J. Gynecol. Oncol.* **28**, (2017).
185. Leitao, M. M., Sonoda, Y., Brennan, M. F., Barakat, R. R. & Chi, D. S. Incidence of lymph node and ovarian metastases in leiomyosarcoma of the uterus. *Gynecol. Oncol.* **91**, 209–212 (2003).

186. Goff, B. A. *et al.* Uterine leiomyosarcoma and endometrial stromal sarcoma: lymph node metastases and sites of recurrence. *Gynecol. Oncol.* **50**, 105–109 (1993).
187. Leitao, M. M. *et al.* Surgical Resection of Pulmonary and Extrapulmonary Recurrences of Uterine Leiomyosarcoma. *Gynecol. Oncol.* **87**, 287–294 (2002).
188. Wroński, M., de Palma, P. & Arbit, E. Leiomyosarcoma of the Uterus Metastatic to Brain: A Case Report and a Review of the Literature. *Gynecol. Oncol.* **54**, 237–241 (1994).
189. Einstein, M. H. *et al.* Management of uterine malignancy found incidentally after supracervical hysterectomy or uterine morcellation for presumed benign disease. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* **18**, 1065–1070 (2008).
190. Pritts, E. A. *et al.* The prevalence of occult leiomyosarcoma at surgery for presumed uterine fibroids: a meta-analysis. *Gynecol. Surg.* **12**, 165–177 (2015).
191. Oduyebo, T. *et al.* The value of re-exploration in patients with inadvertently morcellated uterine sarcoma. *Gynecol. Oncol.* **132**, 360–365 (2014).
192. Şahin, H. *et al.* Uterine smooth muscle tumor of uncertain malignant potential: fertility and clinical outcomes. *J. Gynecol. Oncol.* **30**, e54 (2019).
193. Shim, J. I. *et al.* Clinical experience of uterine smooth muscle tumor of uncertain malignant potential in two gynecological centers: Oncological and obstetrical aspects. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **246**, 7–13 (2020).
194. Huo, L. *et al.* Oncologic and Reproductive Outcomes of Uterine Smooth Muscle Tumor of Uncertain Malignant Potential: A Single Center Retrospective Study of 67 Cases. *Front. Oncol.* **10**, (2020).
195. Borella, F. *et al.* Clinical and Histopathological Predictors of Recurrence in Uterine Smooth Muscle Tumor of Uncertain Malignant Potential (STUMP): A Multicenter Retrospective Cohort Study of Tertiary Centers. *Ann. Surg. Oncol.* **29**, 8302–8314 (2022).
196. Mayerhofer, K. *et al.* Ki-67 expression in patients with uterine leiomyomas, uterine smooth muscle tumors of uncertain malignant potential (STUMP) and uterine leiomyosarcomas (LMS). *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **83**, 1085–1088 (2004).

197. A, T. *et al.* p53, p16 and ki67 as immunohistochemical prognostic markers in uterine smooth muscle tumors of uncertain malignant potential (STUMP). *Pathol. Res. Pract.* **226**, (2021).
198. The selected biomarker analysis in 5 types of uterine smooth muscle tumors - PubMed.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29258902/>.
199. O’Cearbhaill, R. *et al.* Treatment of advanced uterine leiomyosarcoma with aromatase inhibitors. *Gynecol. Oncol.* **116**, 424–429 (2010).
200. Leitao, M. M. *et al.* Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors and outcomes in patients with newly diagnosed uterine leiomyosarcoma. *Gynecol. Oncol.* **124**, 558–562 (2012).
201. Oliva, E. Practical issues in uterine pathology from banal to bewildering: the remarkable spectrum of smooth muscle neoplasia. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **29 Suppl 1**, S104-120 (2016).
202. Atkins, K., Bell, S., Kempson, R. & Hendrickson, M. Epithelioid smooth muscle tumors of the uterus. in *LABORATORY INVESTIGATION* vol. 81 132A-132A (NATURE PUBLISHING GROUP 75 VARICK ST, 9TH FLR, NEW YORK, NY 10013-1917 USA, 2001).
203. Manzoni, M. *et al.* The Adaptive and Innate Immune Cell Landscape of Uterine Leiomyosarcomas. *Sci. Rep.* **10**, 702 (2020).
204. Xiong, S., Dong, L. & Cheng, L. Neutrophils in cancer carcinogenesis and metastasis. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **14**, 173 (2021).
205. Kommos, F. K. F. *et al.* DNA methylation-based profiling of uterine neoplasms: a novel tool to improve gynecologic cancer diagnostics. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **146**, 97–104 (2020).

