

**La localización de beta-catenina y neurotensina en células
de miometrio y leiomiomas uterinos es sensible a
tratamientos hormonales**

**Subcellular localization of beta-catenin and neurotensin in
myometrium and uterine leiomyomas is sensitive to
hormonal treatments**

Trabajo de Fin de Grado

ALICIA MARTÍN PADILLA

Tutorizado por Aixa Celina Rodríguez Bello y Ana María Lancha Bernal
Grado en Biología. Julio 2017.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Resumen | 1 |
| Abstract | 1 |
| Introducción | 3 |
| Miometro y leiomiomas uterinos..... | 3 |
| Beta catenina..... | 6 |
| Neurotensina..... | 7 |
| Objetivos | 8 |
| Material y Métodos | 9 |
| Material..... | 9 |
| Métodos | 9 |
| Procesado de las muestras..... | 9 |
| Tinciones histológicas | 10 |
| Tinción topográfica con hematoxilina-eritrosina..... | 10 |
| Tinción Cleveland-Rucker -Wolfe..... | 11 |
| Técnica inmunohistoquímica..... | 12 |
| Control de especificidad de la reacción inmunohistoquímica | 13 |
| Anticuerpos | 13 |
| Observación y fotografía | 14 |
| Resultados | 15 |
| Localización celular y subcelular de β -catenina en leiomioma y miometrio pareados | 15 |
| Distribución celular y subcelular de la proteína β -catenina tras tratamientos con progestágenos, análogos de GnRh o Acetato de Ulipristal (ESMYA)..... | 16 |
| Distribución celular y subcelular del péptido neurotensina..... | 19 |
| Distribución celular y subcelular del péptido neurotensina tras el tratamiento con progestágenos, análogos de GnRH o Acetato Ulipristal (ESMYA)..... | 20 |
| Discusión | 24 |
| Conclusiones | 27 |
| Conclusions | 27 |
| Referencias Bibliográficas | 28 |

Resumen

Los tejidos uterinos son sensibles a los esteroides gonadales. El desequilibrio en la regulación de una de estas hormonas, o de ambas, causará un efecto en el inicio y desarrollo de neoplasias. Las neoplasias más abundantes son los leiomiomas o tumores benignos de músculo liso. Se han diseñado distintos tratamientos para evitar los síntomas que producen los leiomiomas. Entre los tratamientos existentes se han estudiado progestágenos, antagonistas de la hormona gonadotropina (GnRH) y acetato de Ulipristal (ESMYA). La vía de señalización de Wnt/ β -catenina juega un papel importante en los procesos de regulación, diferenciación, proliferación y muerte celular, estando implicada en numerosas anormalidades. El desplazamiento al núcleo de la β -catenina en células neoplásicas induce su proliferación mediando la expresión del péptido neurotensina. La activación de Wnt/ β -catenina en el miometrio está mediada por esteroides gonadales. En este trabajo mediante la técnica inmunohistoquímica, mostramos que la ruta Wnt/ β -catenina está presente en células leiomiomatosas y de miometrio al observar una localización nuclear y /o citoplásmica de la β -catenina. Sólo los tratamientos que inhiben la producción hormonas gonadales, antagonistas de GnRH, parecen anular su actividad al no observarse inmunorreactividad ni en células tumorales ni de miometrio. Sin embargo, después del tratamiento con ESMYA, hay una activación de la ruta Wnt/ β -catenina en el miometrio adyacente. La activación de la ruta Wnt/ β -catenina induce la síntesis de neurotensina en las células leiomiomatosas dependiendo del ambiente hormonal.

Palabras clave: leiomioma, β -catenina, neurotensina, inmunohistoquímica, progestágenos, análogos de GnRH, acetato de Ulipristal.

Abstract

Uterine tissues are sensitive to gonadal steroids. Imbalance in the regulation of one or both of these hormones will have an effect on the promotion and development of neoplasms. The most abundant neoplasms are: s or benign smooth muscle tumors. Different treatments have been designed to avoid the symptoms produced by leiomyomas. Among the existing treatments, progestins, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists and Ulipristal acetate (ESMYA) have been studied. The Wnt/ β -catenin signaling pathway plays an important role in the processes of regulation, differentiation, proliferation and cell death, being involved in many abnormalities. The displacement of β -catenin to the nucleus in

neoplastic cells induces its proliferation mediating the expression of neurotensin. Activation of Wnt/ β -catenin in the myometrium is mediated by gonadal steroids. In this work, by means of immunohistochemistry we show that Wnt / β -catenin pathway is present in leiomyomatous and myometrial cells since nuclear and/or cytoplasmic location of β -catenin are observed. Only treatments that inhibit the production of gonadal hormones, GnRH antagonists, seem to cancel out their activity since no immunoreactivity is observed in tumor cells or myometrium. However, after treatment with ESMYA, Wnt/ β -catenin pathway appears to be activated in the adjacent myometrium. Activation of Wnt/ β -catenin pathway induces neurotensin synthesis in leiomyomatous cells in a hormonal environment depending way.

Key words: leiomyoma, β -catenin, neurotensin, immunohistochemistry, progestins, GnRH antagonists, Ulipristal acetate.

Introducción

Introducción

Miometrio y leiomiomas uterinos

El útero (Fig. 1) es un órgano muscular hueco, impar y ubicado en la cavidad pélvica que forma parte del aparato reproductor femenino. Está constituido histológicamente por tres estratos celulares: 1) el endometrio, epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado que rodea la cavidad uterina y está sostenido por un estroma de tejido conectivo laxo el cual aloja numerosas glándulas tubulares simples, 2) el miometrio, que está constituido por haces de fibras musculares lisas separadas por una cantidad variable de tejido conectivo, y 3) una membrana serosa que recubre parcialmente el órgano (Fig. 1).

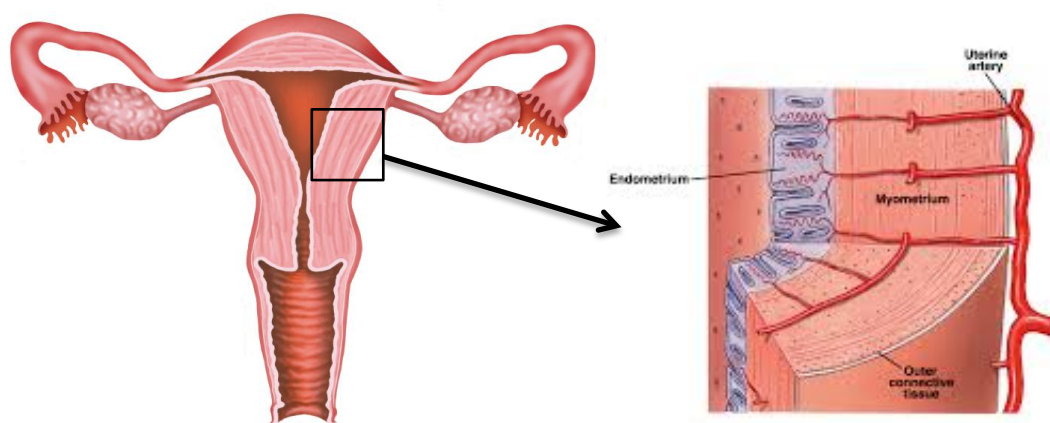


Figura 1. Representación esquemática del útero y sus partes. Tomadas de <https://health.onehowto.com> y <https://www.austincc.edu/rfofi/NursingRvw/PhysText/Reproductive.html>

Los tejidos uterinos son sensibles a los esteroides gonadales, estrógenos y progesterona; ambas hormonas desempeñan un papel fundamental en la regulación fisiológica normal, así como en sus patologías. El desequilibrio en la regulación de una de estas dos hormonas, o en ambas, causará un efecto en el inicio y desarrollo de neoplasias. Aunque pueden desarrollarse neoplasias tanto epiteliales como musculares o de tejido conjuntivo, las más abundantes, que además son las neoplasias más frecuentes del aparato reproductor, son las musculares; concretamente, los leiomiomas o tumores benignos de músculo liso.

Desde un punto de vista macroscópico, los leiomiomas son masas de células redondeadas, circundadas y pseudoencapsuladas, que pueden medir desde 1 mm a 30 cm (Blake, 2007) (Fig. 2). Según su localización en el útero serán denominados: **intramural**, cuando crecen enteramente dentro del compartimento miometrial; **seroso**, cuando sobresale de la superficie serosa del útero hacia la cavidad peritoneal y **submucoso**, cuando se

proyectan hacia la cavidad uterina. Tanto los serosos como submucosos pueden estar pediculados (Fig. 2).

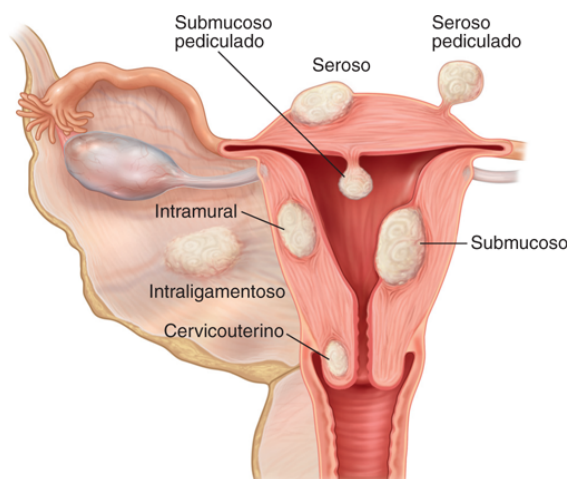


Figura 2. Clasificación de leiomiomas según su localización. Tomada de Hoffman *et al.* McGraw-Hill Education.

Microscópicamente, los leiomiomas son tumores de células de músculo liso, orientadas en haces entrelazados y rodeadas por una matriz extracelular más o menos abundante (Fig.3).

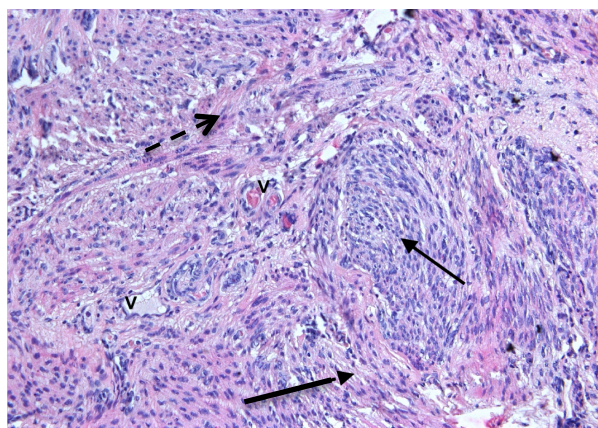


Figura 3. Estructura histológica del leiomioma. Se observa tejido muscular (flecha continua) y tejido conectivo (flecha discontinua). Vasos sanguíneos (V). Coloración: **Hematoxilina-eritrosina.**

Los leiomiomas uterinos son los tumores benignos más abundantes en la mujer, presentando una incidencia entre 70-80% de las mujeres en edad reproductora (Cramer y Patel, 1990; Walker y Stewart, 2005).

Al menos el 50% de los leiomiomas diagnosticados son sintomáticos. El tamaño del leiomioma y/o su localización pueden causar sintomatologías clínicas severas, ocasionando metrorragias, hemorragias anemizantes y dolor abdominal, aumento de la infertilidad, abortos y una reducción de la eficacia en los tratamientos de reproducción asistida (Okolo, 2008).

Los distintos tratamientos utilizados, por el momento, han sido diseñados para evitar estos síntomas, siendo necesaria la cirugía en muchos de los casos (Donnez *et al.*, 2012). De hecho, los leiomiomas son la indicación más frecuente de histerectomía (Wallach y Vlahos, 2004). El excesivo sangrado es uno de los síntomas más graves y para el cuál se han ensayado distintos tratamientos fundamentalmente hormonales, teniendo en cuenta las numerosas evidencias, epidemiológicas, clínicas o experimentales que apoyan la acción de las hormonas ováricas en la patogénesis de los leiomiomas uterinos (Reis *et al.*, 2016). Entre estos tratamientos se encuentra el uso de progestágenos, que pueden producir, como efecto adverso, proliferación en los leiomiomas (Kim y Sefton, 2011); antagonistas del GnRH, con efectos similares a la menopausia y posible pérdida de masa ósea (Donnez *et al.*, 2012) y recientemente, acetato de Ulipristal (ESMYA) (Donnez *et al.*, 2012) un modulador de los receptores de progesterona cuyos posibles efectos adversos no se han descrito por el momento.

Se desconoce la etiología de los leiomiomas aunque probablemente se trate de cambios genéticos adquiridos por las células del miometrio que posteriormente se ven influenciadas por promotores (hormonas) y efectores (factores de crecimiento). Se piensa que los leiomiomas son tumores monoclonales originados a partir de células de miometrio; sin embargo, no está claro si se originan de células diferenciadas o de células madre miometriales (Ono *et al.*, 2014; Mas *et al.*, 2014). Tanto el miometrio como el leiomioma presentan células madre (Ono *et al.*, 2012). Los efectos de las hormonas esteroideas en la patogénesis de los leiomiomas, implica la mediación de receptores, factores de crecimiento, factores de transcripción y otros factores autocrinos y paracrinos. Estos factores actuarían sobre las células madre que presentan escasos receptores hormonales, provenientes de las células diferenciadas (Fig. 4).

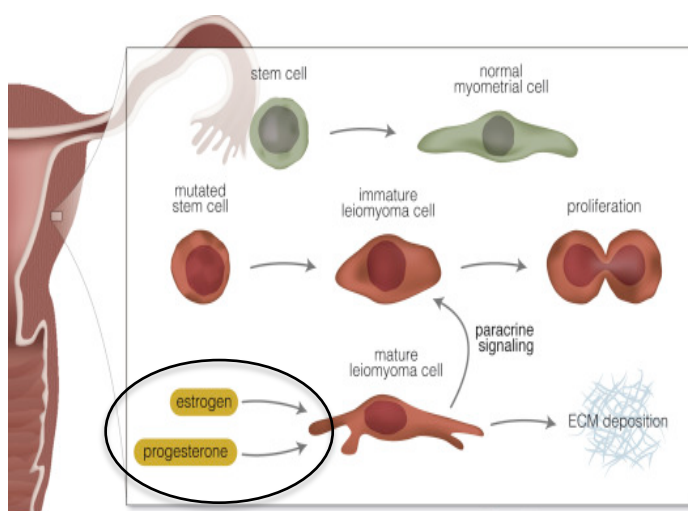


Figura. 4. Representación del papel de estrógenos y progesterona en la patogénesis de leiomiomas uterinos. Tomada de Reis FM *et al.*, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.11.015>.

Beta catenina

Ono *et al.*, 2013, demostraron que la ruta Wnt/ β -catenina tenía un papel fundamental en la mediación del efecto paracrino de las hormonas esteroideas sobre las células madre tumorales en leiomiomas. La vía de señalización de Wnt/ β -catenina juega un papel importante en los procesos de regulación, diferenciación, proliferación y muerte celular; estando implicada en numerosas anomalías del desarrollo embrionario, crecimiento y homeostasis, es una vía conservada evolutivamente y muy versátil (Shang *et al.*, 2017).

Las proteínas Wnt son glucoproteínas de secreción que actúan como ligandos para estimular vías de transducción de señal mediadas por receptores de la familia Frizzled pertenecientes a receptores acoplados a proteína G. La actividad de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina depende de la concentración citoplasmática de la proteína β -catenina, principal componente de la ruta Wnt/ β -catenina, también involucrada en procesos de adhesión celular. En condiciones normales, esta proteína se encuentra en bajas concentraciones dentro del citoplasma gracias su ubiquitinización y rápida degradación en proteosomas, proceso que mantiene a la β -catenina fuera del núcleo. La llegada del ligando Wnt activa la vía e inhibe la fosforilación de β -catenina, por consiguiente inhibe su degradación, produciéndose su acumulación en el citoplasma (Pai *et al.*, 2017). El desplazamiento de la β -catenina al núcleo va a activar la transcripción de un grupo de genes cuyos productos proteicos participan en procesos de división celular, desarrollo embrionario y morfogénesis.

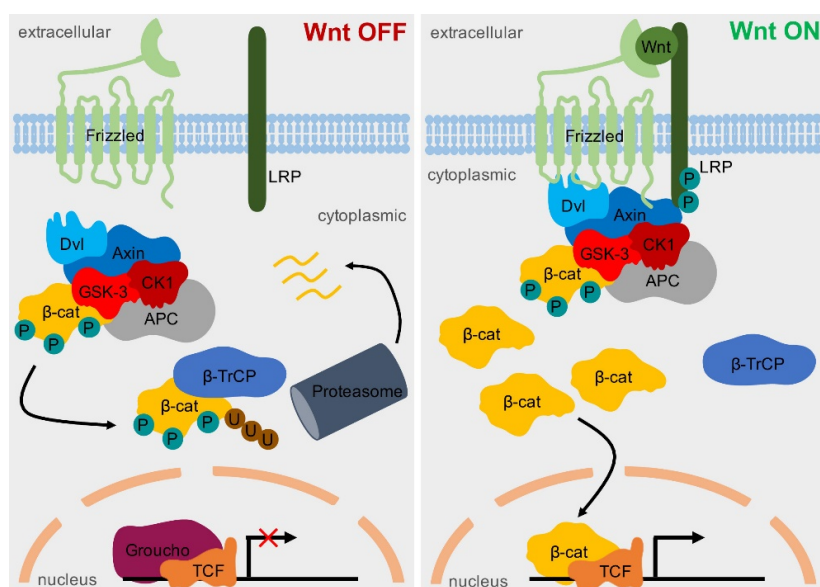


Figura 5. Representación esquemática de la señalización Wnt/ β -catenina, que está inactiva en ausencia de ligando (izquierda) o activa cuando se une un ligando Wnt (derecha). Tomada de Kai *et al.*, 2017.

La activación aberrante de la vía puede estar relacionada con mutaciones genéticas o silenciamiento epigenético de los oncogenes o genes supresores de tumor asociados con una gran variedad de cánceres (Kim *et al.*, 2015).

Neurotensina

Uno de los factores de crecimiento, que parece inducir la proliferación en las células musculares de leiomioma, es el péptido neurotensina (Rodríguez *et al.*, 2010). La neurotensina (NTS) es un péptido de 13 aminoácidos, que puede funcionar como neurotransmisor o neuromodulador en el sistema nervioso central (SNC) o como factor paracrino, autocrino o endocrino en tejidos periféricos (Evers *et al.*, 2006). NTS contribuye al crecimiento de diversos tejidos sanos y, también estimula el crecimiento en varios tipos de neoplasias. En el miometrio, lo podemos encontrar en el tejido conectivo de muestras sanas, pero está ausente en las células musculares lisas. Sin embargo, en las muestras tumorales de leiomioma sí que se encuentra en estas células (Rodríguez *et al.*, 2010). Las acciones de NTS están mediadas a través de tres receptores (NTSR1, NTSR2 y NTSR3). NTSR1 es el receptor de alta afinidad y se considera el mediador predominante de los efectos de NTS en la proliferación celular, la migración y la invasión de células cancerosas. Kim *et al.*, 2015, demostraron en líneas celulares de tumores neuroendocrinos que expresan y secretan neurotensina, que los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteína neurotensina fueron modulados por inhibidores o activadores de la vía Wnt/ β -catenina. Estos autores concluyeron que la NTS es una diana directa de la ruta Wnt/ β -catenina pudiendo ser un mediador del crecimiento tumoral.

Objetivos

Objetivos

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, nos hemos planteado el siguiente **objetivo general**:

Demostrar, a nivel celular, la presencia de la ruta Wnt/ β -catenina en leiomiomas uterinos en relación al miometrio adyacente y estudiar el efecto de los tratamientos relacionados con los esteroides gonadales sobre la distribución de β -catenina y el péptido neurotensina, factor de proliferación tumoral regulado por la ruta Wnt/ β -catenina.

Para ello nos planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

- Determinar la distribución celular y subcelular de la proteína β -catenina en leiomioma y miometrio pareados de pacientes sin tratamientos.
- Determinar la distribución celular y subcelular de la proteína β -catenina en leiomioma y miometrio pareados procedentes de pacientes tratadas con:
 - Progestágenos
 - Análogos de GnRH
 - Acetato de Ulipristal (ESMYA), modulador del receptor de progesterona.
- Determinar la distribución del péptido neurotensina en los casos de tratamiento, en relación con miometrio y leiomioma de pacientes no tratadas.

Material y métodos

Material y Métodos

Material

Las muestras con las que se ha realizado el estudio provienen de pacientes del Hospital Universitario de Canarias (HUC) y del Hospital Quirón que han sido sometidas a una histerectomía debido a la presencia de leiomiomas sintomáticos. Las muestras se obtuvieron de pacientes que previamente habían dado su consentimiento. El trabajo está encuadrado en un proyecto de investigación que ha obtenido previamente la aprobación del Comité Ético del HUC.

A cada muestra proporcionada por el ginecólogo se le adjudica un código para su reconocimiento.

Hemos analizado 9 muestras pareadas de leiomioma y miometrio adyacente, todos los leiomiomas con localización intramural, de mujeres con edades comprendidas entre los 40-50 años. Parte de las muestras procedían de pacientes sometidas a distintos tratamientos (progestágenos, análogos de GnRH o ESMYA).

Métodos

Procesado de las muestras

Las muestras fueron fijadas en formol acuoso al 10% e incluidas en parafina según el siguiente protocolo:

| | | |
|--|--------------------------------|------------------------|
| <p><i>Fijación</i></p> <p>La fijación tiene por objeto conservar las células, hasta donde sea posible, en el estado en que se encontraban durante la vida. Por lo tanto, es un método destinado a obtener preparados duraderos que conserven la estructura morfológica y química de las células y tejidos in vivo y que posteriormente permite realizar, las técnicas de coloración y/o de inmunohistoquímica.</p> | <p>Formol al 10%</p> | <p>12 horas</p> |
| | <p>Formol: alcohol 90% 1:1</p> | <p>1 hora</p> |

| | | |
|--|---|--|
| <p><i>Deshidratación</i></p> <p>Las piezas al ser retiradas del fijador están hidratadas; impidiendo que sean penetradas por la parafina. Por lo tanto, en primer lugar, debemos deshidratar los tejidos sumergiéndolos en líquidos anhidros que sean miscibles en el agua. Para evitar alteraciones provocadas por una deshidratación brusca, se procede a una deshidratación escalonada utilizando alcohol etílico de graduación creciente.</p> | <p>Alcohol 90%</p> <p>Alcohol 96%</p> <p>Alcohol 100%</p> | <p>2x1 hora</p> <p>3x1 hora</p> <p>3x1 hora</p> |
| | <p>Alcohol 100%:tolueno 1:1</p> | <p>45 minutos</p> |
| <p><i>Impregnación por un disolvente de la parafina (aclarado)</i></p> <p>Las piezas perfectamente deshidratadas se sumergen en el disolvente, en este caso toluol que es miscible tanto en alcohol como en la parafina.</p> | <p>Tolueno</p> | <p>45 minutos</p> |
| <p><i>Penetración de la parafina</i></p> <p>Se sumergen las piezas en parafina (56-58° de punto de fusión), mantenida líquida en la estufa a no más de 62°C.</p> | <p>Parafina I</p> <p>Parafina II</p> | <p>3 horas</p> <p>2x 12 horas</p> |
| <p>Realización del bloque</p> <p>Para este paso se utilizan moldes de metal y cassettes de plástico. Se coloca el cassette en el molde de metal, encima el tejido a incluir y se cubre todo con parafina líquida. Cuando la parafina se solidifica se puede desmoldar el bloque al que quedará unido el cassette que permitirá unirlo al microtomo.</p> | | |

Los bloques fueron cortados en microtomo Thermo Shandon Finesse 325 a 4 µm de grosor. Los cortes se montaron en una placa calefactora, sobre portaobjetos con una solución de albúmina diluida (0'5 ml de solución madre en 35 ml de agua destilada).

Una vez secos en una estufa a 37°C, los cortes fueron desparafinados y rehidratados en una serie decreciente de alcoholes hasta agua destilada para su posterior coloración para el estudio de sus características histológicas.

Tinciones histológicas

Tinción topográfica con hematoxilina-eritrosina

Para la observación de las características de los tejidos en estudio se realizó la tinción de **hematoxilina-eritrosina**, la cual tiñe los núcleos de azul.

| Tinción hematoxilina – eritrosina (HE) | |
|---|-----------|
| Desparafinado e hidratación | --- |
| Hematoxilina de Harris (Sigma) | 2 minutos |
| Agua corriente | 5 minutos |
| Agua destilada | 2 minutos |
| Eritrosina acuosa (1%) (Sigma) | 2 minutos |
| Deshidratación y montaje | ---- |

Tinción Cleveland-Rucker -Wolfe

Para la realización de esta técnica realizamos una modificación de la tinción siguiendo este protocolo:

| Tinción | |
|--------------------------------|-----------|
| Desparafinado e hidratación | --- |
| Hematoxilina de Groat | 7 minutos |
| Agua corriente | 5 minutos |
| Eritrosina acuosa (1%) (Sigma) | 7 minutos |
| Agua destilada | 2 minutos |
| Azul de anilina (1%) | 1 minuto |
| Deshidratación y montaje | ---- |

Tinción metacromática con solución de Giemsa (mezcla de azul de metileno y eosina)

El uso del colorante metacromático, azul de metileno, nos permitió identificar los mastocitos presentes en el tejido conectivo. Tras desparafinar e hidratar los cortes, se tiñeron con Giemsa durante 20 minutos. Se lavaron con agua destilada y, posteriormente fueron deshidratados y montados con Eukit.

Contratinción nuclear

Hematoxilina: Con el fin de detectar los núcleos celulares, cuando se realizó el revelado con DAB se contratiñó con hematoxilina, que tiñe el contenido nuclear de color azul.

Técnica inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es un técnica por la cual se detectan antígenos en secciones tisulares utilizando anticuerpos específicos marcados de tal manera que la interacción con el antígeno pueda ser detectada.

Se utilizó el método inmunoenzimático indirecto. Este proceso, en un primer paso, se lleva a cabo incubando la muestra con un anticuerpo específico (anticuerpo primario) desarrollado contra el antígeno que queremos identificar. Posteriormente, se incuba con otro anticuerpo (anticuerpo secundario) desarrollado contra el anticuerpo primario. Este segundo anticuerpo está conjugado con una molécula de biotina. Una vez realizado este proceso, se agregará estreptavidina unida a la enzima peroxidasa de tal manera que se forma el complejo biotina-estreptavidina-peroxidasa.

Para que la reacción sea visible se procede al revelado, que consiste en añadir una solución tamponada del cromógeno, 1-cloro-4-naftol o diaminobenzidina (DAB), y el sustrato de la enzima, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), produciendo finalmente un precipitado coloreado.

Desarrollo del método:

| TRATAMIENTO | TIEMPO |
|--|----------|
| Lavado con Tris salino 0.05M (TBS); Trizma Base 0.05M, NaCl 0.9%) pH 7.4. | 3 x 10' |
| Saturación con caseína al 0.5%. Bloquea las posibles uniones inespecíficas del anticuerpo primario. | 20' |
| Lavado con TBS. Lavado para eliminar el exceso de la dilución utilizada en el paso anterior. | 10' |
| Lavado con TBS. | 10' |
| Lavado con TBS+ tritón al 0.2%. El tritón es un agente que permeabiliza las membranas plasmáticas y permite la entrada del anticuerpo y su unión con el antígeno. | 10' |
| Incubación con el anticuerpo primario diluido en TBS + tritón. | 12 horas |
| Lavado con TBS. | 3 x 10' |

| | |
|--|--------|
| Lavado con TBS + tritón al 0.05%. | 10' |
| Anticuerpo secundario. En un primer paso, se trata con biotina, una proteína asociada a inmunoglobulinas dirigidas contra el anticuerpo primario. Diluido en TBS + tritón al 0.05%. | 60' |
| Lavado con TBS. | 3 x 5' |
| Lavado con TBS tritón. | 5' |
| Estreptavidina marcada con peroxidasa. En el segundo paso, se trata con la proteína estreptavidina, con afinidad muy alta con la biotina, por lo que se unirán. La estreptavidina está conjugada con la enzima peroxidasa. | 60' |
| Lavado con tampón tris salino pH 7.4. Lavados para eliminar exceso de estreptavidina y limpiar la muestra. | 2 x 5' |
| Lavado con tampón tris HCl pH 7.6. Este tampón tiene un valor de pH de 7.6 porque es al que se activa la enzima peroxidasa. | 5' |
| Revelado. Permite que la reacción que ha sido llevada a cabo sea visible. Para ello se han utilizado como cromógenos, la diaminobenzidina (DAB), que da un color marrón y el 4-cloro-1-naftol (cloronaftol), que da un color azul oscuro. El cromógeno diluido en tampón, junto con el sustrato de la peroxidasa, el peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂), da color a aquellos lugares donde hubo unión del anticuerpo con el antígeno. | |
| Montaje. Para poder observar las muestras al microscopio, se realizó el montaje de un cubreobjeto con glicerina tamponada, en el caso del revelado con 4-cloro-1-naftol y con eukit después de deshidratación en el caso de la DAB. | |

Control de especificidad de la reacción inmunohistoquímica

El control de la especificidad de la reacción inmunohistoquímica consistió en la sustitución del antisuero específico por tampón TBS.

Anticuerpos

Para nuestra reacción hemos utilizado anticuerpos policlonales, que son aquellos que reconocen varios epítomos dentro del mismo antígeno.

Los anticuerpos utilizados para este trabajo son los mostrados en la siguiente tabla:

| | |
|------------------------------|---|
| Anticuerpos primarios | Anti-neurotensina. Policlonal desarrollado en conejo. Dilución 1/200 |
| | Anti-β-catenina. Policlonal desarrollado en conejo. Dilución 1/50 |

| | |
|--------------------------------|---|
| Anticuerpos secundarios | Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Rabbit Anti-Goat IgG, Fc Fragment Specific. Dilución 1/1000 |
| | Peroxidase-conjugated Streptavidin. Dilución 1/1000. |

Observación y fotografía

Las muestras histológicas e inmunohistoquímicas fueron observadas en el microscopio óptico Leica DM4000B (Leica Microsystems, Germany) y las imágenes fueron tomadas con cámara digital Leica DFC300FX, usando el software de análisis de imagen Leica Q-Win (Leica, Barcelona, España).

Resultados

Resultados

Localización celular y subcelular de β -catenina en leiomioma y miometrio pareados

Para este objetivo se utilizaron tres muestras de leiomioma intramural y miometrio adyacente de pacientes sin ningún tipo de tratamiento.

En el **miometrio**, se observaron células musculares y de conjuntivo inmunorreactivas con el anti- β -catenina (Células β -catenina-ir) (Fig. 6 A y B).

La localización subcelular de la β -catenina, fue fundamentalmente citosólica. (Fig. 6 A). Además, se observaron citoplasmas de células endoteliales y de músculo liso vascular β -catenina-ir (Fig. 6A). Curiosamente, se observaron abundantes células cebadas en el miometrio (Fig. 7 A, A') que muestran la metacromasia que las caracteriza al ser tratadas con la solución de Giemsa (Fig. 7B, B').

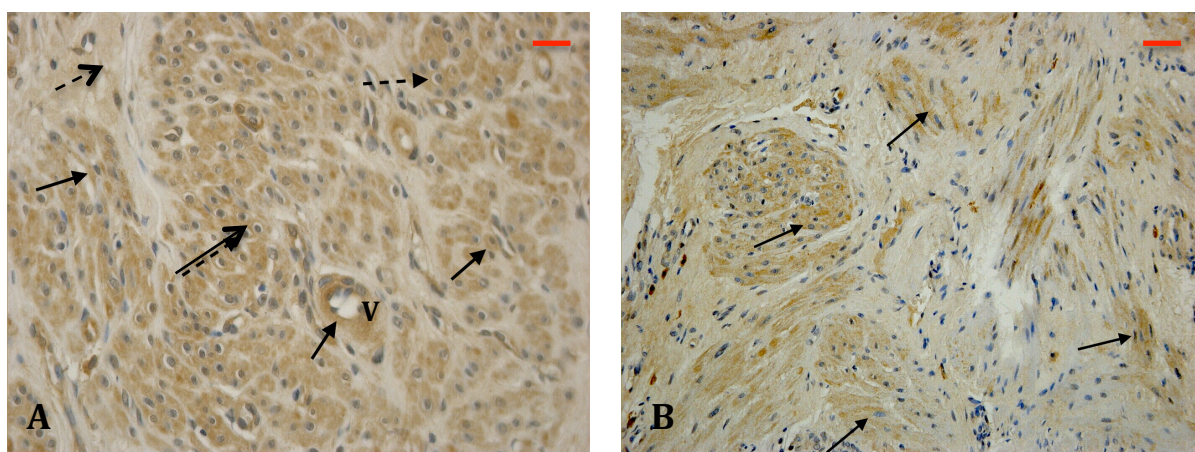


Figura 6. Distribución de células β -catenina-ir en miometrio A y B. Se observan células musculares β -catenina-ir (flechas continuas), de conjuntivo (flechas discontinuas) endoteliales y musculares de vasos (V). Inmunorreacción citoplasmática en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 20 μ m.

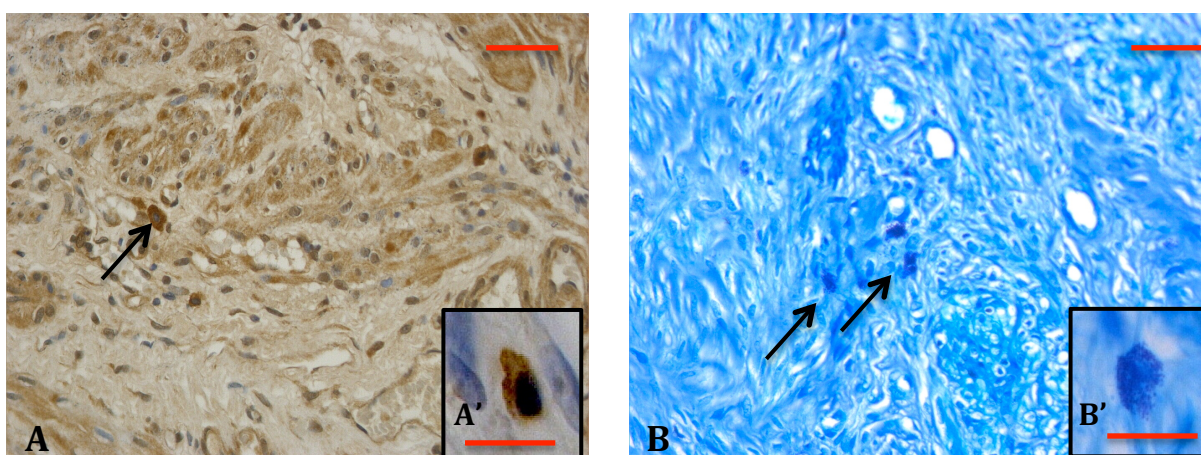


Figura 7. Distribución de células cebadas en miometrio (A y B). A, A'. Células cebadas β -catenina-ir en el tejido conectivo (flechas continuas) e inserto. Inmunorreacción citoplasmática en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. B, B'. Observación de células cebadas en color violeta con coloración Giemsa. Barra de escala: 20 μ m Ay B; 10 μ m A' y B'.

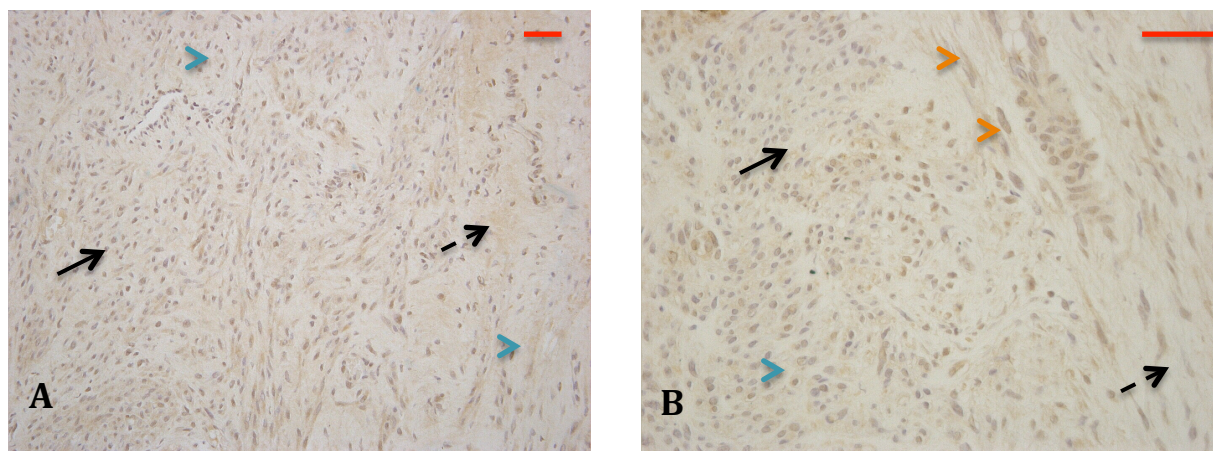


Figura 8. Distribución de células β -catenina-ir en leiomioma (A y B). Células musculares (flechas continuas) y de conjuntivo (flechas discontinuas) β -catenina-ir con localización citoplasmática (punta de flecha naranja) y nuclear (punta de flecha azul). Inmunorreacción citoplasmática en marrón. (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 20 μ m.

Distribución celular y subcelular de la proteína β -catenina tras tratamientos con progestágenos, análogos de GnRh o Acetato de Ulipristal (ESMYA)

En este apartado, estudiamos muestras procedentes de pacientes tratadas con tratamientos que, directa o indirectamente, afectan al ambiente hormonal de tumor.

En el caso de muestras procedentes de pacientes tratadas con **progestágenos**, se observaron células β -catenina-ir en tejido muscular tanto miometrial como leiomiomatoso (Fig. 9). La inmunorreacción en ambos casos se observó localizada en algunas regiones de la muestra. Subcelularmente, en ambos tejidos se observó inmunorreacción citoplasmática. En tejido leiomiomatoso, además se observaron núcleos β -catenina-ir.

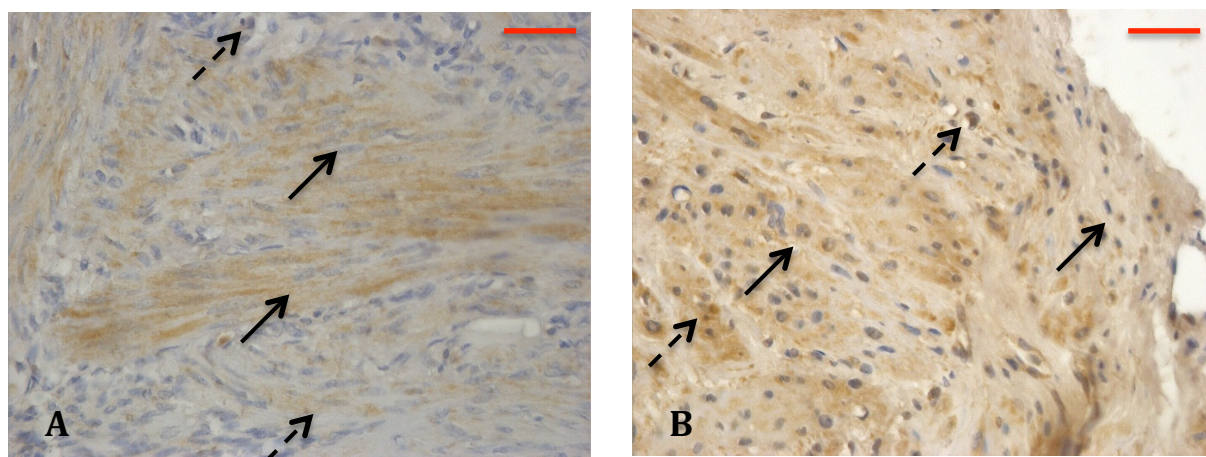


Figura 9. Distribución de células β -catenina-ir en miometrio y leiomioma después de tratamiento con progestágenos (A y B). A. Células musculares β -catenina-ir (flechas continuas) y de tejido conectivo (flechas discontinuas) con localización citoplásmica. B. Células musculares β -catenina-ir en el citoplasma (flechas continuas) y núcleos (flechas discontinuas). Inmunorreactividad citoplasmática en marrón (DAB). Contrateñido nuclear con hematoxilina. Barra de escala: 20 μ m.

Otro de los tratamientos de estudio fue con **análogos de GnRH**. Con la técnica inmunohistoquímica, se observaron escasas células β -catenina-ir tanto en miometrio como leiomioma. (Fig. 10 A y B).

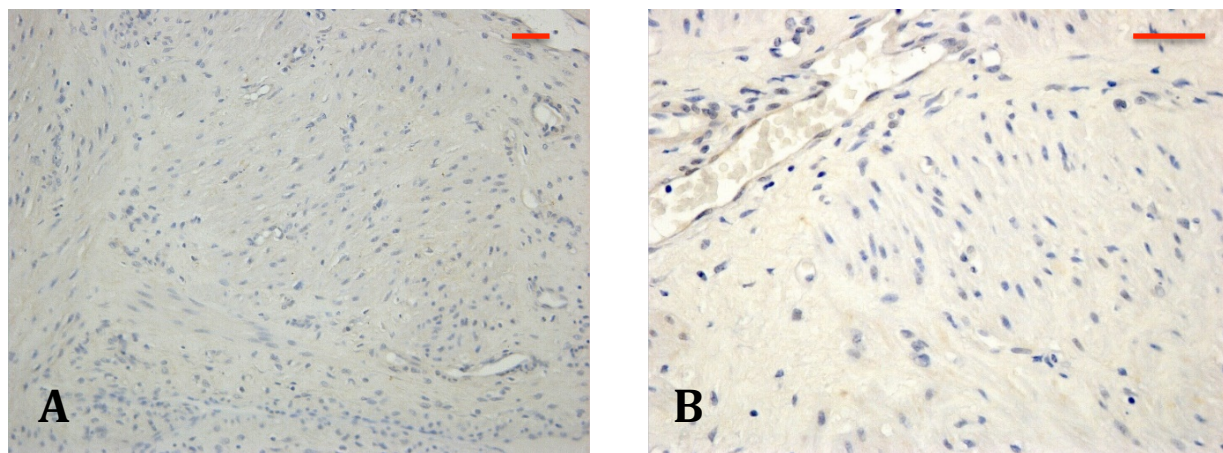


Figura 10. Distribución de células β -catenina-ir en miometrio (A) y leiomioma (B) después de tratamiento con análogos de GnRH. Se observan escasas células β -catenina-ir. Inmunoreacción citoplasmática en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 20 μ m.

Tratamiento con **Acetato de Ulipristal (ESMYA)**. Tras la observación de leiomioma y miometrio adyacente de pacientes tratadas con este fármaco, observamos que ambos tejidos presentan células musculares débilmente β -catenina-ir (Fig. 11A y B). En células de miometrio, además de reacción citoplasmática, se observaron núcleos β -catenina-ir (Fig. 11A). También se observó en el miometrio, células musculares de vasos sanguíneos β -catenina-ir (Fig. 11B).

El tejido leiomiomatoso después de este tratamiento se caracteriza por una gran cantidad de matriz extracelular como puede verse en la Fig. 12A teñida con azul anilina-eritrosina (matriz extracelular teñida de azul). Las células musculares β -catenina-ir mostraron una inmunorreacción sólo citoplasmática (Fig. 12B).

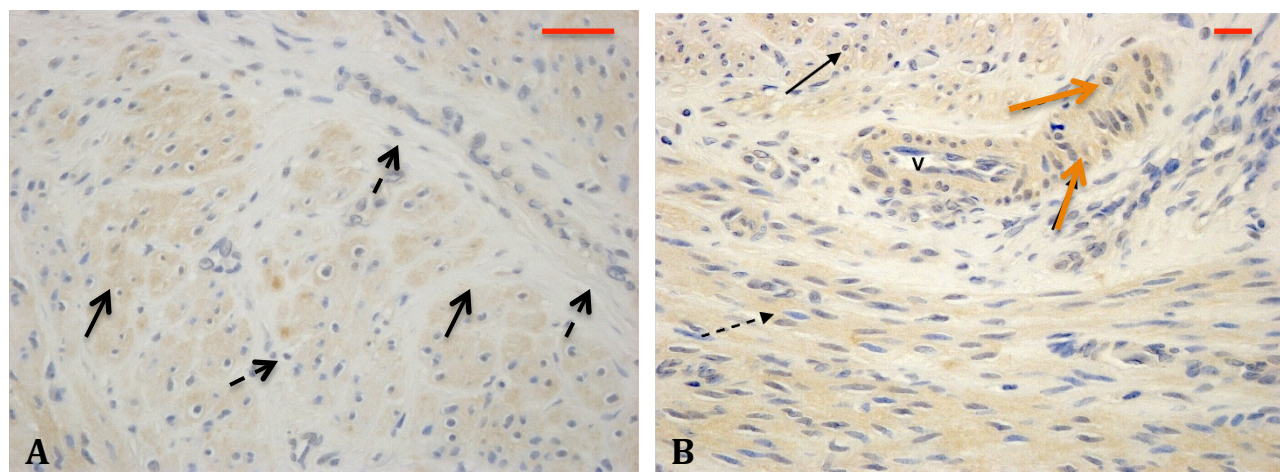


Figura 11. Distribución de células β -catenina-ir en miometrio después de tratamiento con Acetato de Ulipristal (A y B). Se observan células β -catenina-ir en los citoplasma de células musculares (flechas continuas) y núcleos (flechas discontinuas). Presencia de β -catenina-ir en células musculares de vasos sanguíneos (flechas naranja). Inmunoreacción citoplasmática en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 20 μ m.

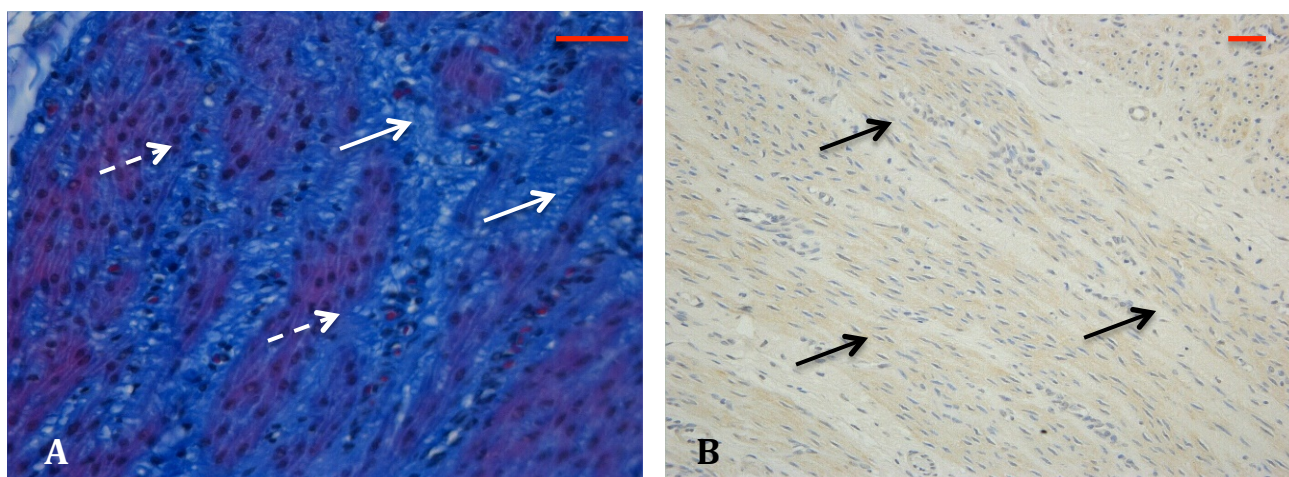


Figura 12. Tejido leiomiomatoso después de tratamiento con Acetato de Ulipristal (A y B). **A.** Abundante matriz extracelular mostrada con azul anilina (flechas continuas) entre escasos paquetes musculares teñidos con eritrosina (flechas discontinuas). **B.** Células musculares β -catenina-ir (flecha continua). Inmunoreacción citoplasmática en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 20 μ m.

En algunos casos el tratamiento con ESMYA no consigue su finalidad, disminuir las hemorragias. Con el fin de tener más datos sobre este fármaco, utilizamos muestras procedentes de una paciente para la que el tratamiento había fracasado .

En el tejido miometrial, se observan numerosas células β -catenina-ir con localización tanto citoplasmática como nuclear (Fig. 13A). De la misma manera, en el tejido leiomiomatoso observamos presencia β -catenina-ir tanto en el citoplasma como en algunos núcleos de células musculares (Fig. 13B).

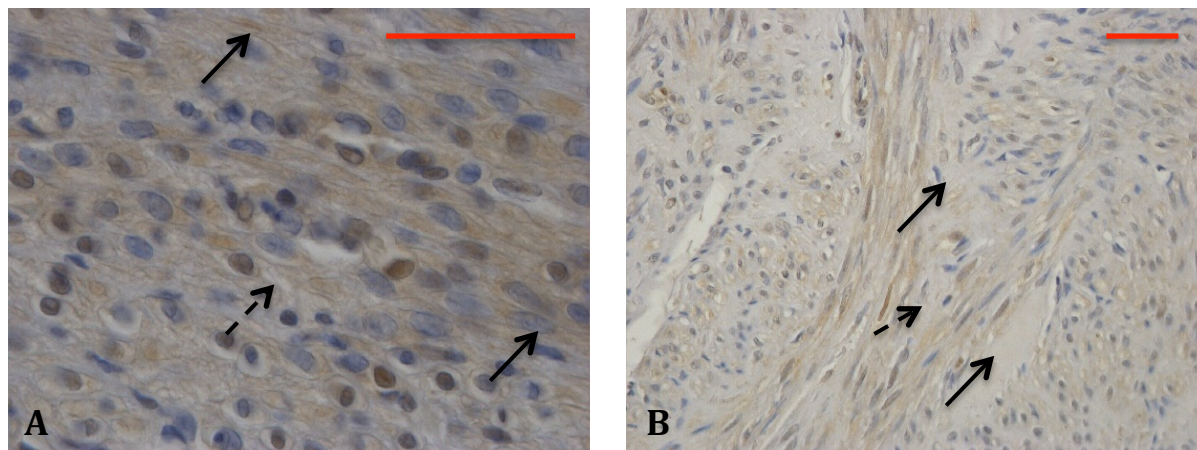


Figura 13. Localización de células β -catenina-ir en miometrio y leiomioma después de fracasar el tratamiento con ESMYA (A y B). A. Células β -catenina-ir en los citoplasma de células musculares (flechas continuas) y en núcleos (flechas discontinuas) de miometrio. B. Células musculares leiomiomatosas β -catenina-ir con localización citosólica (flechas continuas) y nuclear (flechas discontinuas). Inmunoreacción citoplasmática en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 20 μ m.

Distribución celular y subcelular del péptido neurotensina

En el miometrio, como había sido mostrado previamente por Rodríguez *et al.*, 2010. se observaron células inmunorreactivas con anti-neurotensina (células NTS-ir), solamente en el tejido conjuntivo (Fig. 14 A y B). En cambio, en el tejido leiomiomatoso se observaron células NTS-ir en ambos tejidos (Fig. 15A y B).

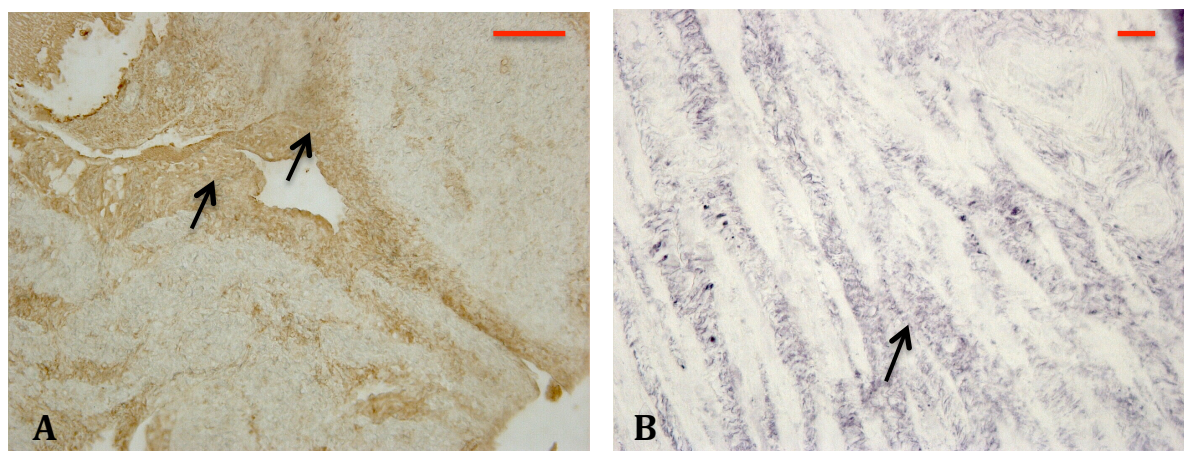


Figura 14. Distribución de células NTS-ir en miometrio (A) y (B). A. Células NTS-ir en el tejido conjuntivo (flechas continuas). Inmunoreactividad citoplasmática marrón (DAB). Sin contrateñición. B. Células NTS-ir en el tejido conjuntivo con inmunoreactividad azul (4-Cl-1 Naf). Barra de escala: 20 μ m.

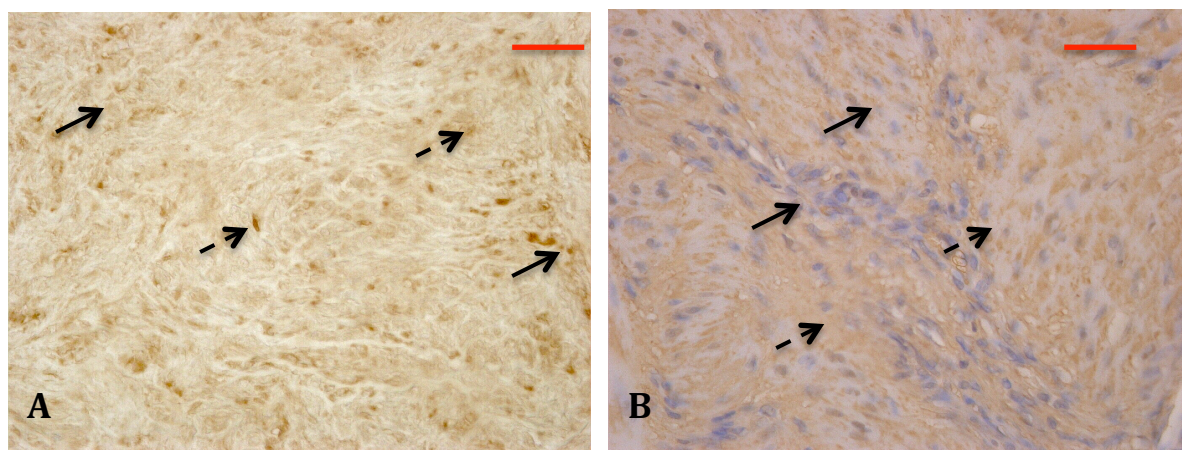


Figura 15. Distribución de células neurotensina-ir en leiomioma (A y B). Localización de la neurotensina en el tejido conjuntivo (flechas continuas) y en el tejido muscular (flechas discontinuas). **A.** Inmunorreactividad citoplasmática en marrón (DAB). Sin Contrateñido. **B.** Inmunorreacción citoplasmática en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 20 μ m.

Distribución celular y subcelular del péptido neurotensina tras el tratamiento con progestágenos, análogos de GnRH o Acetato Ulipristal (ESMYA)

En muestras tratadas con **progestágenos**, se observaron, tanto en el tejido miometrial (Fig. 16 A y B) como en el tejido leiomiomatoso (Fig. 17A y B), células musculares y de conjuntivo NTS-ir.

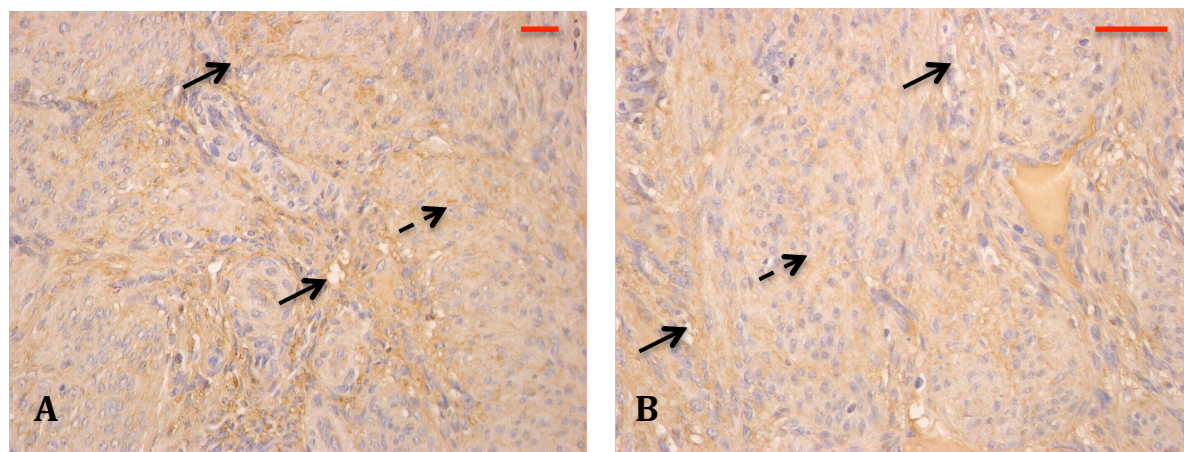


Figura 16. Distribución de células NTS-ir en miometrio después de tratamiento con progestágenos (A y B). Células NTS-ir en tejido conjuntivo (flechas continuas) y en tejido muscular (flechas discontinuas). Inmunorreacción citoplasmática en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 20 μ m.

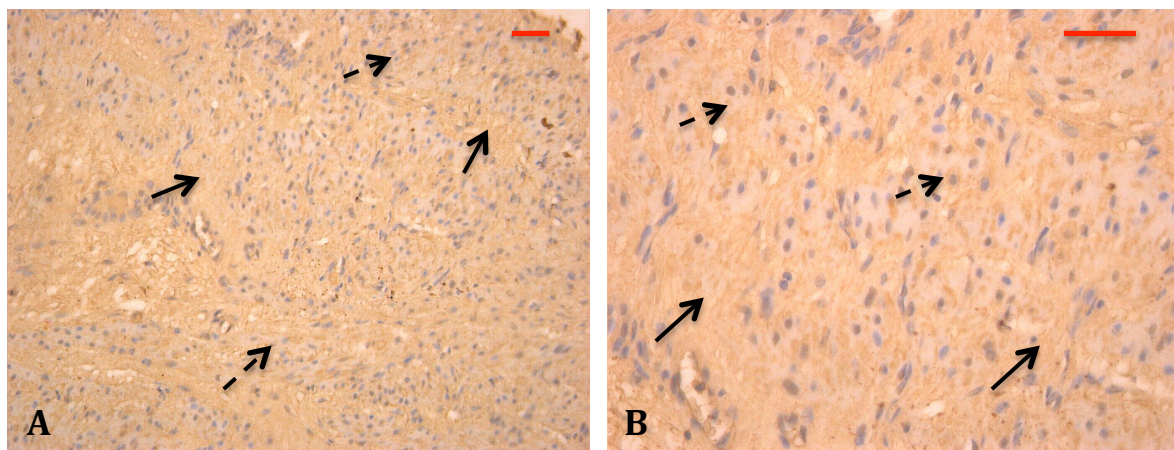


Figura 17. Distribución de células NTS-ir en leiomioma después de tratamiento con progestágenos (A y B). Células NTS-ir en tejido conjuntivo (flechas continuas) y en tejido muscular (flechas discontinuas). Inmunoreacción citoplasmática en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 20 μ m.

Al estudiar las muestras procedentes de pacientes tratadas con análogos de GnRH se observaron en el miometrio células NTS-ir en el tejido conjuntivo y en zonas aisladas del tejido muscular (Fig. 18) lo mismo ocurrió en muestras de tejido leiomiomatoso; se observaron células inmunorreactivas con anti NTS, en tejido conjuntivo y en algunas zonas del tejido muscular. (Fig. 19).

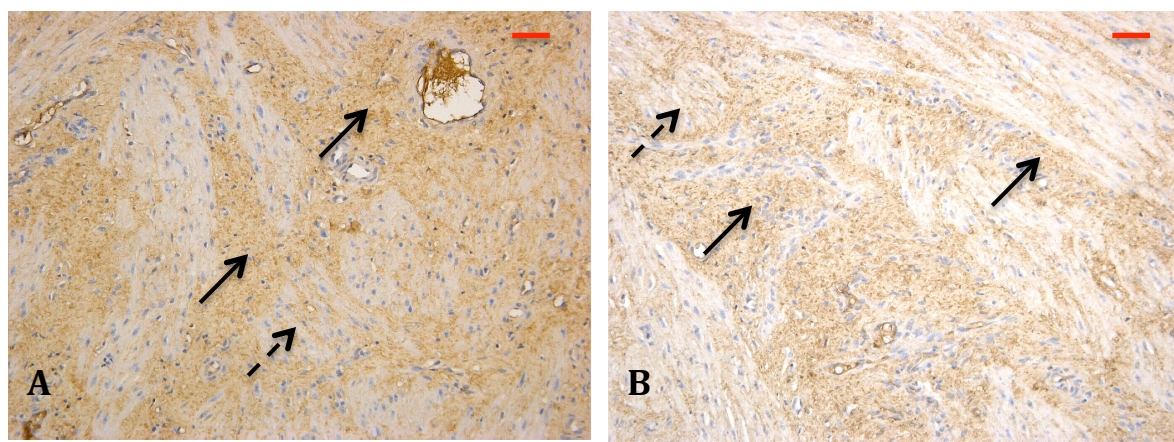


Figura 18. Distribución de células NTS-ir en miometrio después de tratamiento con análogos de GnRH (A y B). Células NTS-ir en el tejido conjuntivo (flechas continuas) y en zonas escasas de tejido muscular (flechas discontinuas). Inmunoreacción citoplasmática en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 20 μ m.

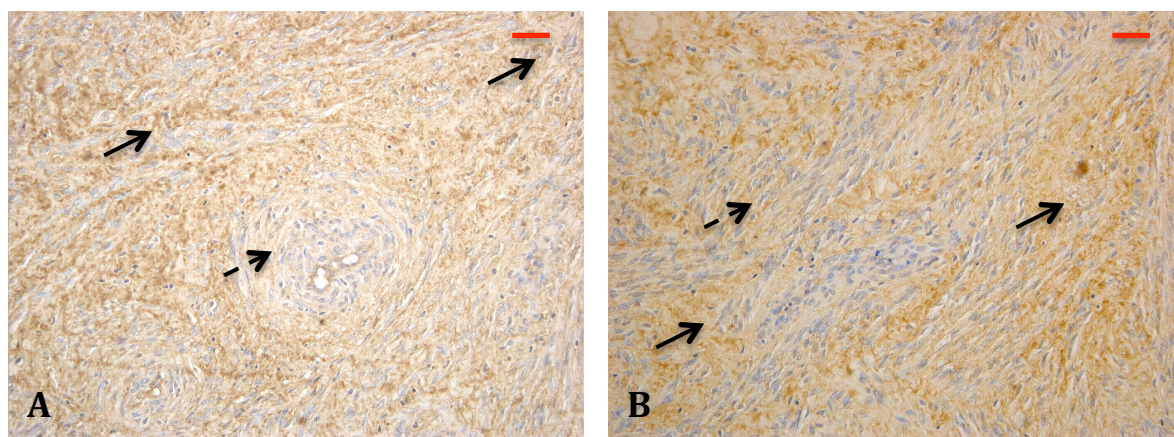


Figura 19. Distribución de células NTS-ir en leiomioma después de tratamiento con análogos de GnRH (A y B). Células NTS-ir en el tejido conjuntivo (flechas continuas) y en tejido muscular zonas escasas (flechas discontinuas). Inmunoreacción citoplasmática en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 20 μ m.

En muestras procedentes de pacientes tratadas con Acetato Ulipristal (ESMYA), tanto en el tejido miometrial (Fig. 20 A y B) como en el tejido leiomiomatoso (Fig. 21 A y B) sólo se observaron células NTS-ir en el tejido conjuntivo.

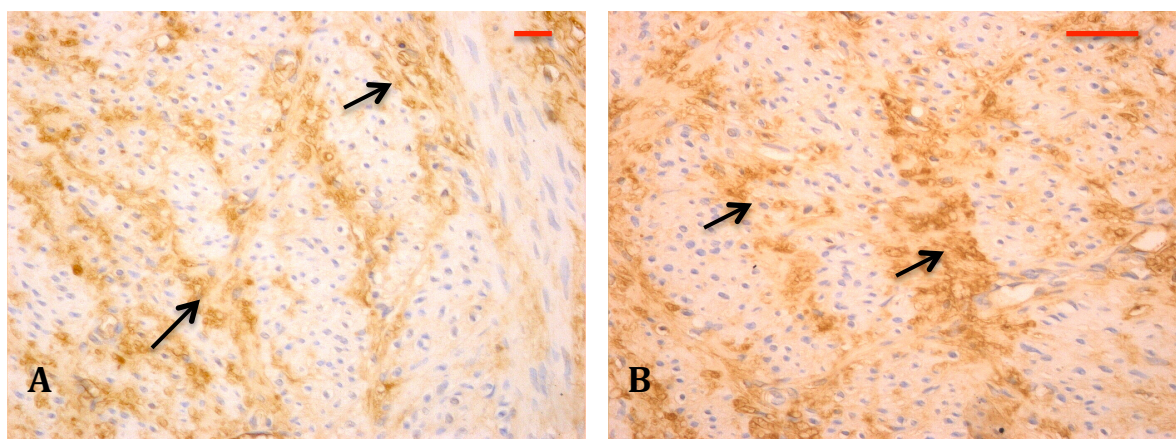


Figura 20. Distribución de células NTS-ir en miometrio después de tratamiento con ESMYA (A y B). Células NTS-ir en el tejido conjuntivo (flecha continua). Inmunoreacción citoplasmática en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 20 μ m.

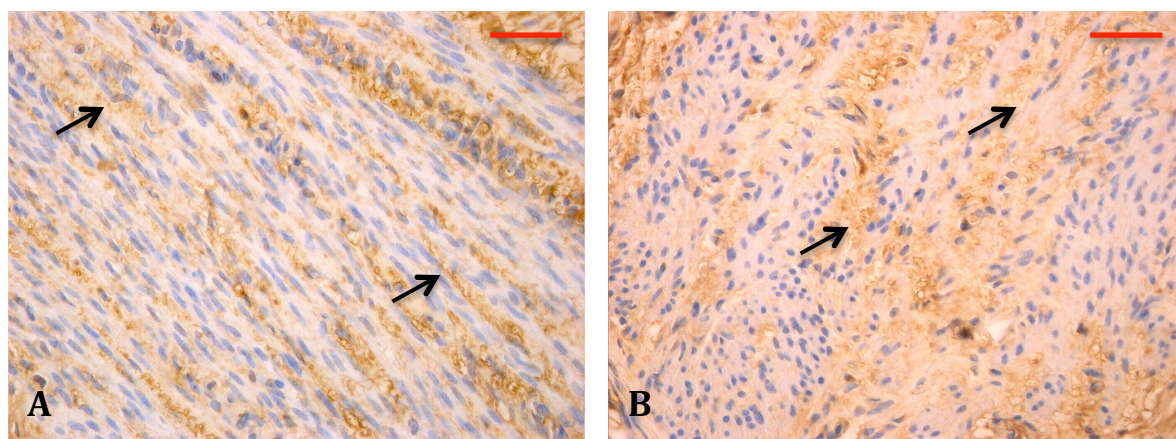


Figura 21. Distribución de células NTS-ir en tejido leiomiomatoso después de tratamiento con ESMYA (A y B). Células NTS-ir en el tejido conjuntivo (flechas continuas). Inmunorreacción citoplasmática en marrón (DAB). Núcleos contrateñidos con hematoxilina. Barra de escala: 20 μ m.

En muestras procedentes de pacientes en las que el tratamiento con ESMYA fue un fracaso, en el **miometrio**, se observaron células de conjuntivo NTS-ir (Fig. 22), mientras que en el tejido leiomiomatoso se observaron abundantes células musculares NTS-ir (Fig. 23).

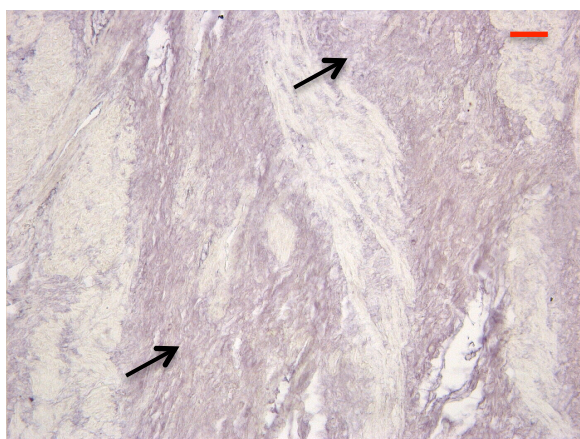


Figura 22. Distribución de células NTS-ir en miometrio después de fracasar el tratamiento con ESMYA. Células NTS-ir en el tejido conjuntivo (flecha continua). Inmunorreactividad azul (4-Cl-1 Naf). Barra de escala: 20 μ m.

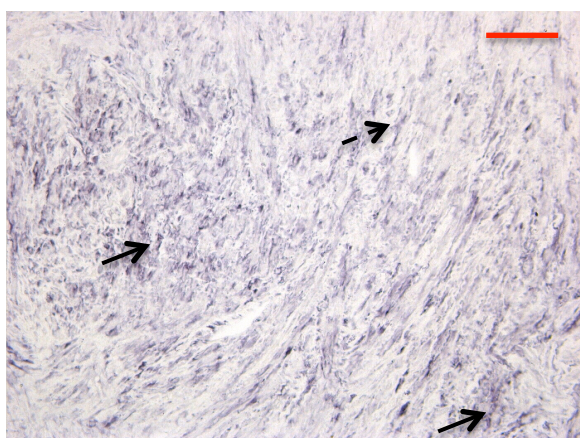


Figura 23. Distribución de células NTS-ir en tejido leiomiomatoso después de fracasar el tratamiento con ESMYA. Células NTS-ir en tejido conjuntivo (flecha continua) y tejido muscular (flecha discontinua). Inmunorreactividad azul (4-Cl-1 Naf). Barra de escala: 20 μ m.

Discusión

Discusión

Los principales hallazgos obtenidos en este trabajo han sido: en primer lugar, haber puesto de manifiesto la presencia de la ruta Wnt/ β -catenina activada, en células de leiomioma y miometrio adyacente; en segundo lugar, el aporte de evidencias sobre lo que los tratamientos para la sintomatología de los leiomiomas más utilizados, inducen en las células en relación a la expresión celular de la β catenina y NTS. Por otro lado, mostramos que tanto el desplazamiento de β -catenina al núcleo en células musculares de leiomioma, como la presencia de NTS-ir ocurre simultáneamente después del tratamiento con progesterona.

Los leiomiomas son las neoplasias de origen muscular, más abundantes del aparato reproductor femenino (Tanwar *et al.*, 2009). La desregulación de la ruta Wnt es algo común a numerosos tumores de origen epitelial o en poblaciones de células madre (Van Es y Clevers, 2005; Angers y Luna, 2009) así como en tumores de conjuntivo (Haydon *et al.*, 2002). En el útero, Jung *et al.*, 2008, encontraron que el desplazamiento nuclear de la β -catenina observada inmunohistoquímicamente, en tejidos fijados con formol, podía servir como un marcador diagnóstico de tumores de estroma endometrial. Estos autores consideraron negativa la inmunorreacción para anti- β -catenina en endometrio sano y en leiomiomas, al no considerar como positiva la inmunorreacción citoplasmática. Posteriormente, Tanwar *et al.*, 2009 utilizaron un modelo de ratón expresando de forma constitutiva β -catenina activada en el mesénquima uterino, encontrando que desarrollaron tumores con características histológicas y moleculares de leiomiomas humanos. Estos tumores, así como el miometrio, mostraban β -catenina-ir con localización citoplásmica y nuclear. Nuestros resultados muestran una localización nuclear de la β -catenina-ir en células musculares de leiomioma, además de abundante inmunorreactividad en citoplasma de células tanto tumorales como del músculo liso de vasos sanguíneos. Una intensa inmunorreactividad citoplasmática se observó también en las células musculares del miometrio adyacente, lo que podría indicar el inicio de la activación de la ruta Wnt en posibles células madre miometriales. Esto estaría de acuerdo con la proposición de Ono *et al.*, 2004, de que las células que sirven como progenitoras del leiomioma pueden ser la diana de la ruta Wnt/ β -catenina en el desarrollo del tumor.

La proteína mediadora de la transcripción de la subunidad 12 de la ARN polimerasa II (MED12) es una enzima codificada por el gen *med12*. Se ha mostrado que mutaciones en este gen juegan un importante papel en la patogénesis de leiomiomas uterinos (Mäkinen *et al.*, 2011) y recientemente, Al-Hendy *et al.*, 2017 demostraron que Med12 juega un importante

papel en la regulación de la proliferación de las células leiomiomas, modulando vías de señalización asociadas al crecimiento de leiomiomas, como la vía Wnt/ β -catenina. Además, la ruta Wnt/ β -catenina en el útero está influenciada por la acción de las hormonas esteroideas y tiene un papel significativo en la iniciación, desarrollo y función del tracto reproductor femenino (Van der Horst *et al.*, 2012). Así, durante el periodo reproductivo, la regulación hormonal del ciclo menstrual está mediada por la activación estrogénica y la inhibición de la progesterona de la ruta Wnt/ β -catenina (Wang *et al.*, 2009). Además del papel fisiológico sobre endometrio y/o miometrio, la activación estrogénica de la ruta Wnt/ β -catenina en estos tejidos parece inducir desórdenes como la adenomiosis (Tanwar *et al.*, 2009), hiperplasia endometrial que puede llevar a cáncer endometrial, y la progresión de este cáncer (Moreno-Bueno *et al.*, 2002).

En la patogénesis de leiomiomas los procesos inflamatorios también tienen una gran importancia observándose un aumento en el número de células implicadas en los mismos como macrófagos o mastocitos (Protic *et al.*, 2016). Hay que tener en cuenta que un microambiente inflamatorio parece ser un importante cofactor para el desarrollo de neoplasias (Chow *et al.*, 2012). Nuestros resultados muestran una cantidad de mastocitos superior en miometrio adyacente al leiomioma que en el interior del tumor, lo que podríamos interpretar como que el inicio del tumor implica una desregulación de células miometriales así como una liberación por parte de estas células de factores inflamatorios y factores de crecimiento que induzcan la proliferación. Estas células las hemos detectado como β -catenina-ir. Su maduración en tejidos periféricos parece estar promovida por la ruta Wnt/ β -catenina como demostraron Yamaguchi *et al.*, 2016.

En nuestro estudio hemos comparado muestras procedentes de pacientes sometida a distintos tratamientos, siempre en leiomiomas intramurales, los cuales tienen el tratamiento farmacológico como primera opción (Benetti-Pinto *et al.*, 2016). Lo observado en las muestras procedentes de pacientes que habían recibido algún tipo de tratamiento, difiere para cada uno de ellos, excepto en la no presencia de células cebadas inmunorreactivas lo que podría indicar que todos son capaces de atenuar el proceso inflamatorio asociado al tumor. Por lo que se refiere a la expresión de β -catenina en las células miometriales o leiomiomas. Después del uso de los progestágenos, que se sabe tienen acción antiinflamatoria (Benetti-Pinto *et al.*, 2016) se observaron, sin embargo, abundantes células musculares del miometrio y leiomiomas β -catenina-ir, que podría tener relación con la proliferación celular observada después de este tratamiento (Kim y Sefton, 2011). Con el

tratamiento con análogos de GnRH, al tratarse de la inhibición total de la producción de hormonas ováricas, no se observó inmunorreacción para β -catenina en ninguno de los tejidos de estudio; esto apoya el papel de la ruta Wnt/ β -catenina en la proliferación, teniendo en cuenta la reducción de tamaño de los leiomiomas después de este tratamiento (Lee *et al.*, 2017). Dado los efectos adversos de este tratamiento y la acción proliferativa de la progesterona sobre los leiomiomas, recientemente se han diseñado fármacos como el Acetato de Ulipristal (ESMYA) que forma parte de un grupo de fármacos moduladores de los receptores de progesterona (PRM). Este fármaco inhibe la ovulación sin reducir drásticamente los niveles de estradiol (Donnez *et al.*, 2012). Si bien su acción evita los efectos adversos del GnRH, la no inhibición hormonal explicaría que sigamos observando células β -catenina-ir fundamentalmente en el miometrio adyacente al leiomioma. De especial interés resultó la observación, en las muestras de pacientes donde fracasó el tratamiento como inhibidor del excesivo sangrado, de una inmunorreacción para el anti β -catenina, más intensa incluso que en las muestras no tratadas por fármacos. Sobre todo, es de interés la gran cantidad de núcleos β -catenina-ir en el miometrio adyacente. Sería necesario un estudio más amplio con mayor número de muestras y teniendo en cuenta la expresión de otros factores para determinar posibles efectos adversos de este fármaco sobre los tejidos uterinos.

En cuanto a la presencia de células NTS-ir, nuestros resultados confirman estudios previos que muestran la presencia de NTS sólo en el tejido conjuntivo de miometrio y en conjuntivo y células musculares de leiomioma (Rodríguez *et al.*, 2010). En las células musculares leiomiomatosas parece haber una correspondencia entre el desplazamiento al núcleo de la β -catenina y la presencia de NTS-ir en estas células, tal y como observaron Kim *et al.*, 2015, en tumores neuroendocrinos. Estos autores demostraron que en estas células el contenido de NTS y su secreción estaba mediado por la ruta Wnt/ β -catenina.

En cuanto a los tratamientos, hemos observado una correspondencia parcial entre la presencia de NTS-ir y β -catenina-ir. Esta correspondencia fue observada, tanto en miometrio como en leiomioma, después de tratamiento con progestágenos, lo que apoya el papel de la progesterona para inducir la proliferación (Ishikawa *et al.*, 2010). Nuestras observaciones con otros fármacos parecen indicar la existencia de otros factores que controlan la síntesis de NTS en estos tumores. Con estos datos podríamos decir que el papel proliferativo de la NTS en leiomiomas uterinos, puede estar mediado, en parte, por la ruta Wnt/ β -catenina.

Conclusiones

Conclusiones

De los resultados obtenidos se desprenden las siguientes conclusiones:

1. La ruta Wnt/ β -catenina está presente en células musculares y de conjuntivo en leiomiomas uterinos.
2. La localización subcelular de Wnt/ β -catenina en el núcleo de muchas de estas células implica la activación de la ruta en células leiomiomatosas.
3. En el miometrio adyacente una gran cantidad de células implicadas en la inflamación, son β -catenina inmunorreactivas.
4. Las hormonas esteroideas inducen la activación de la ruta Wnt/ β -catenina puesto que sólo el tratamiento con antagonistas de GnRH, que inhiben totalmente el eje gonadal, produjo una total ausencia de β -catenina-ir en las células miometriales y leiomiomatosas.
5. Después de 3 meses de tratamiento con ESMYA sin reducción del sangrado, hay una activación de la ruta Wnt/ β -catenina especialmente en el miometrio adyacente.
6. La activación de la ruta Wnt/ β -catenina podría activar, sólo en parte, la síntesis de neurotensina en las células leiomiomatosas, dependiendo del ambiente hormonal.

Conclusions

From the results obtained it can be concluded that:

1. The Wnt/ β -catenina pathway is present in muscle and connective cells in uterine leiomyomas.
2. The subcellular localization of Wnt/ β -catenina in the nucleus of many of these cells involves activation of the pathway in leiomyomatous cells.
3. In the adjacent myometrium a large number of cells involved in inflammation-are β -catenina-ir.
4. Steroid hormones induce activation of the Wnt/ β -catenina pathway since only treatment with GnRH antagonists, which totally inhibit the gonadal axis, produced a total absence of β -catenina-ir in myometrial and leiomyomatous cells.
5. After 3 months of treatment with ESMYA without reduction in bleeding, there is an activation of the Wnt/ β -catenina pathway especially in the adjacent myometrium.
6. Activation of the Wnt / β -catenin pathway could activate, only in part, the synthesis of NTS in leiomyomatous cells in a hormonal environment depending way.

Referencias Bibliográficas

Referencias Bibliográficas

- Al-Hendy, A., Laknaur, A., Diamond, M. P. et al.** 2017. Silencing Med12 Gene Reduces Proliferation of Human Leiomyoma Cells Mediated via Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Endocrinology*. No. 158 (3): pp. 592-603.
- Angers, S., Luna, R. T.** 2009. Proximal events in Wnt signal transduction. *t Rev Mol Cell Biol*. No. 10 (7): pp. 468-77.
- Benetti-Pinto, C., Giraldo, H., Ferreira, V. et al.** 2016. Standard hormone therapy is inadequate for bone density in premature ovarian insufficiency. *Gynecol Endocrinol*. No. 33 (4): pp. 283-286.
- Blake, R.** 2007. Leiomyomata uteri: hormonal and molecular determinants of growth. *Journal National Medical Association*. No. 10: pp. 1170-1184.
- Chow, L., Kamrava, M., Chung, M. P. et al.** 2012. Electronic brachytherapy for postsurgical adjuvant vaginal cuff irradiation therapy in endometrial and cervical cancer: a retrospective study. *Brachytherapy*. No. 12 (2): pp. 141-7.
- Cramer, S. F., Patel, A.** 1990. The frequency of uterine leiomyomas. *Clin Pathol*. No. 4: 435-8.
- Donnez, J., Tomaszewski, J., Vázquez, F. et al.** 2012. Ulipristal acetate versus leuprolide acetate for uterine fibroids. *N Engl J Med*. No. 366 (5): pp. 421-32.
- Evers, S. A., Mandelin, E., Koistinen, R. et al.** 2006. Glycodelin is present in pinopodes of receptive-phase human endometrium and is associated with down-regulation of progesterone receptor B. *Steril*. No. 85 (6): pp. 1803-1811.
- Haydon, R. C., Deyrup, A., Ishikawa, A. et al.** 2002. Cytoplasmic and/or nuclear accumulation of the beta-catenin protein is a frequent event in human osteosarcoma. *Int J Cancer*. No. 102 (4): pp. 338-42.
- Ishikawa, H., Nakayama, N., Shamima, Y. et al.** 2010. Gene amplification CCNE1 is related to poor survival and potential therapeutic target in ovarian cancer. *Cancer*. No. 116 (11): pp. 22621-34.
- Jung, C. K., Jung, J. H., Lee, Y. S. et al.** 2008. Diagnostic use of nuclear beta-catenin expression for the assessment of endometrial stromal tumors. *Mod Pathol*. No. 21 (6): pp. 756-63.
- Kai, K., Masuda, M., Aishima, S.** 2017. Inverse correlation between CD8+ inflammatory cells and E-cadherin expression in gallbladder cancer: Tissue microarray and imaging analysis. *World J Clin Cases*. No. 5 (1): pp. 1-8.
- Kim, J. J., Sefton, C. E.** 2011. The role of progesterone signaling in the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Mol Cell Endocrinol*. No. 358 (2): pp. 223-3.
- Kim, J.T., Chunming, L., Yekaterina, Y. et al.** 2015. Neurotensin, a novel target of Wnt/ β -catenin pathway, promotes growth of neuroendocrine tumor cells. *Int J Cancer*. No. 136 (6): pp. 1475-1481.
- Lee, M. J., Li, H., Zhang, J. et al.** 2017. OIP5, a target of miR-15b-5p, regulates hepatocellular carcinoma growth and metastasis through the AKT/mTORC1 and β -catenin signaling pathways. *Oncotarget*. No. 8 (11): pp. 18129-19144.
- Mäkinen, N., García-Solano, J., Conesa-Zamora, P. et al.** 2011. Immunohistochemical expression profile of β -catenin, E-cadherin, P-cadherin, laminin-5 γ 2 chain, and SMAD4 in colorectal serrated adenocarcinoma. *Hum Pathol*. No. 43 (7): pp. 1094-102.
- Mas, A., Cervello, I., Gil-Sanchis, C., Simón, C.** 2014. Current understanding of somatic stem cells in leiomyoma formation. *Steril*. No. 102 (3): pp. 613-20.
- Moreno-Bueno, G., Hardisson, D., Sánchez, C. et al.** 2002. Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene*. No. 21 (52): pp. 7981-90.
- Okolo, S.** 2008. Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. No. 22 (4): pp. 571-88.
- Ono, M., Miyamoto, S., Endoh, Y. et al.** 2004. Nuclear beta-catenin accumulation as a prognostic factor in Dukes' D human colorectal cancers. *Oncol Rep*. No. 12 (2): pp. 245-51.
- Ono, M., Qiang, W., Serna, V. A. et al.** 2012. Role of stem cells in human uterine leiomyoma growth. *Epub*. No. 7 (5): pp.10.1372.
- Ono M., Maruyama, T., Yoshimura, Y.** 2013. Somatic stem cells in the myometrium and in myomas. *Semin Reprod Med*. No. 31 (1): pp. 77-81.
- Ono, M., Moravek, M. B., Yin, P. et al.** 2014. Ovarian steroids, stem cells and uterine leiomyoma: therapeutic implications. *Human Reprod Update*. No. 21. pp. 1-12.

- Pai, S. G., Carneiro, B. A., Mauricio, J. et al.** 2017. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *J Hematol Oncol.* No. 10 (1): pp. 101-10.
- Protic, O., Toti, P., Islam, M. S. et al.** 2016. Possible involvement of inflammatory/repairative processes in the development of uterine fibroids. *Cell Tissue Res.* No. 364 (2): pp. 415-27.
- Reis, FM., Bloise, E., Ortiga-Carvalho, T.M.** 2016. Hormones and pathogenesis of uterine fibroids. *Mejor Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* No. 34: pp 13-24.
- Rodríguez, Y., Almeida, T. A., Valledares, F. et al.** 2010. Neurotensin and neurotensin receptor 1 expression in human myometrium and uterine leiomyomas. *Biol Reprod.* No. 83 (4): pp. 641-7.
- Shang, S., Hua, F., Hu, Z. W.** 2017. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget.* No. 8: pp. 33972-33989.
- Tanwar, P. S., Lee, H. J., Zhang, L. et al.** 2009. Constitutive activation of Beta-catenin in uterine stroma and smooth muscle leads to the development of mesenchymal tumors in mice. *Biol Reprod.* No. 81 (3): pp. 545-52.
- Van der Horst, P. H., Wang, Y., Vandenput, I. et al.** 2012. Progesterone inhibits epithelial-to-mesenchymal transition in endometrial cancer. *PLoS One.* No. 7 (1): pp. 1-12.
- Van Es, J. H., Clevers, H.** 2005. Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for intestinal neoplastic disease. *Trends Mol Med.* No. 11 (11): pp. 496-502.
- Walker, Ch., Stewart, E. A.** 2005. Uterine fibroids. *Science* vol. 308. No. 5728: pp 1589-1592.
- Wallach, E. E., Vlahos, N. F.** 2004. Uterine myomas: an overview of development, clinical features, and management. *Gynecol Obstet.* No. 104 (2): pp. 393-406.
- Wang, K. S., Berg, T., Delanghe, S. et al.** 2009. β -catenin regulates mesenchymal progenitor cell differentiation during hepatogenesis. *J. Surg. Res.* No. 164 (2): pp. 276-85.
- Yamaguchi, T., Nishijima, M., Tashiro, K., Kawabata, K..** 2016. Wnt- β -Catenin Signaling Promotes the Maturation of Mast Cells. *Biomed Res Int.* 2.048.987.