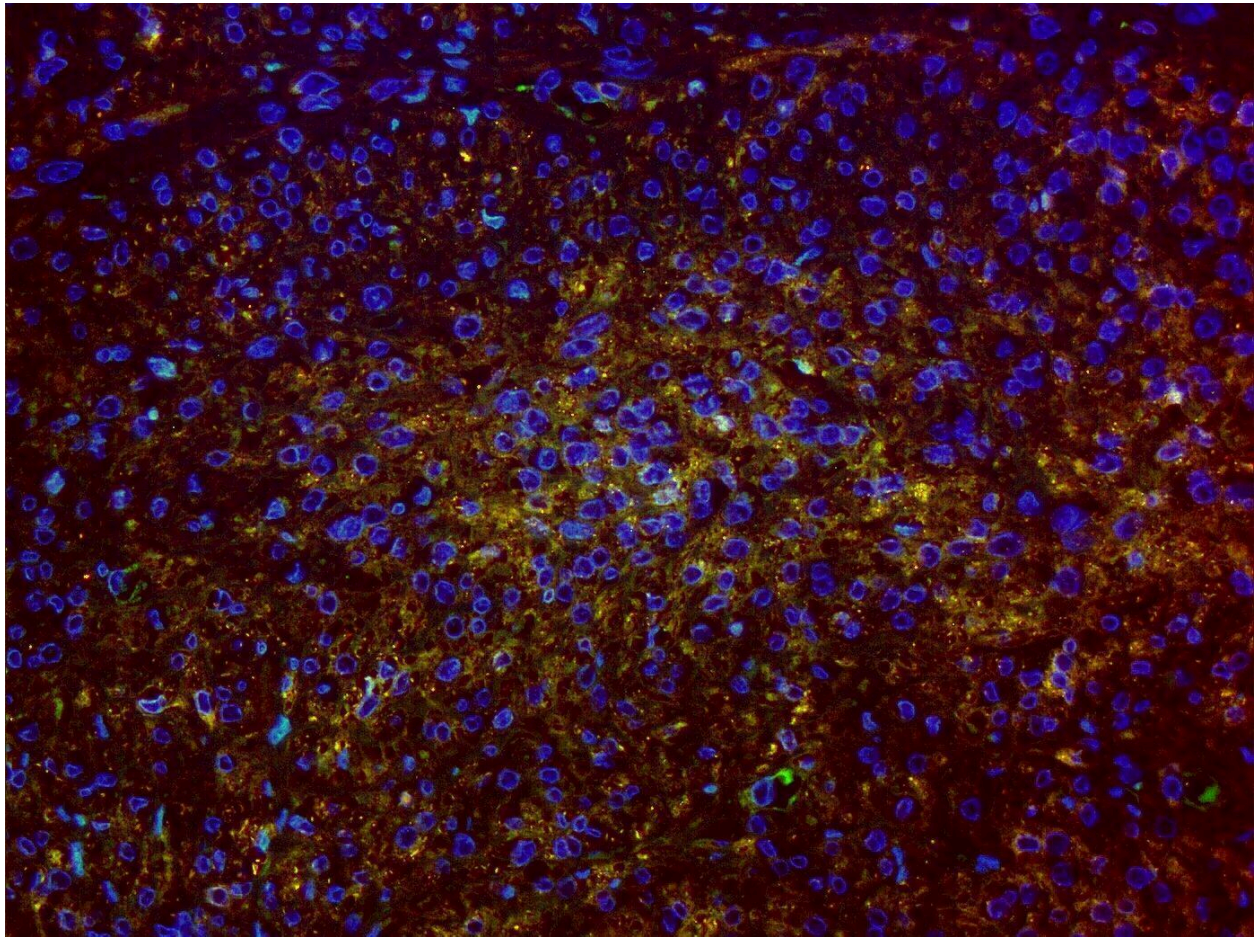


**Análisis cualitativo de la expresión de neurotensina y sus receptores en leiomiomas.
Efecto del tratamiento con acetato ulipristal.**

Qualitative analysis of neurotensin expression and its receptors in leiomyomas. Effect of
ulipristal acetate treatment.



Trabajo de Fin de Grado

Ancor Enrique Díaz García

Tutorizado por:

Dr. Ricardo Reyes Rodríguez y Dra. Aixa Rodríguez Bello

Grado en Biología. Julio 2024

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Etiología.....	2
2.2. Epidemiología.....	3
2.3. Factores de Riesgo.....	4
2.4. Fisiopatología.....	8
2.5. Neurotensina y sus receptores. Implicación en enfermedades tumorales.....	9
3. OBJETIVOS	11
4. MATERIAL Y MÉTODOS	12
4.1. Microtomía.....	13
4.2. Desparafinado e hidratación.....	13
4.3. Tinción.....	13
4.4. Inmunohistoquímica.....	14
4.5. Deshidratación, aclarado y montaje.....	17
4.6. Análisis cualitativo.....	17
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
5.1. Estudio histológico en leiomioma y miometrio adyacente en muestras de pacientes control y tratadas con UPA.....	17
5.2. Detección inmunohistoquímica del péptido neurotensina y sus receptores NTSR1, NTSR2 y NTSR3 en miometrio y leiomioma de pacientes control y tratadas con UPA.....	20
5.3. Caracterización de las poblaciones celulares que expresan NTS y sus receptores NTSR1, NTSR2 y NTSR3 en miometrio y leiomioma de pacientes control y tratadas con UPA.....	26
6. CONCLUSIONES	27
7. BIBLIOGRAFÍA	28

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutores Ricardo y Aixa por haberme guiado y apoyado en todo el desarrollo de este trabajo, sobre todo en esos momentos en los que uno más lo necesita. Son para mi una especie de padres, que me han enseñado a dar mis primeros pasos en este duro camino llamado investigación.

A mis grandes pilares, Quique y Yazmina, por ser ejemplo de perseverancia, esfuerzo y sacrificio, herramientas que se requieren para poder lograr todas tus metas. Sin la falta de ese combustible que te mantiene vivo, el amor.

A mis hermanos, Alejandro, Aythami y Yarel, pues no hay personas que pueda querer más en este mundo, soy y seré siempre vuestro astronauta, el cual os invita a pisar por primera vez la luna, enseñándoos lo tan bonito que puede ser el universo y lo que os queda por descubrir.

A mis amigos, Luca, Sabrina, Yumey, Alex, Mariana, Flavia, Guiri, Carlingui... Por su tiempo, su apoyo, por hacerme disfrutar, reír, llorar, en definitiva por hacerme sentir vivo. Este logro también es vuestro, ahora os toca brillar a ustedes.

A ti Gerard, por aparecer este año en mi vida y convencerme de que te llevaré siempre conmigo, no dejes nunca de ser tú, eres increíble, no lo dudes nunca.

En especial a ti Davide, pues eres una de las personas más maravillosas que he conocido, gracias por todos los momentos que hemos vivido, eres especial y ojalá todo el mundo tuviera la suerte de conocer a alguien como tú. Estoy seguro de que en la siguiente partida te volveré a encontrar.

A ti Irene, esa gomera que de repente se cruzó en mi camino y con la que estaría encantado de volverme a cruzar, gracias por estar ahí siempre, por tu amor, tu empatía, tu serenidad y locura que me encanta, estoy seguro de que lograrás todo aquello que te propongas, mami está orgullosísima de ti, Te quiero Rincoglionita.

Y por último, a ti abuela, que desde el cielo me has estado cuidando, dándome esa fuerza y cariño que en ocasiones uno necesita, espero que estes orgullosa, ojalá poder tenerte más cerca, Te quiero.

RESUMEN

Los leiomiomas uterinos (LMs), tumores benignos del miometrio dependientes de hormonas ováricas, constituyen las neoplasias más comunes del aparato reproductor femenino. Ocasionalmente ocasionan metrorragias, dolor pélvico e infertilidad siendo la causa principal de histerectomía. La etiología de los leiomiomas sigue siendo desconocida, aunque se han propuesto distintas hipótesis que implican numerosos factores y moléculas de la matriz extracelular. La neurotensina (NTS), un tridecapéptido regulado por estrógenos y progesterona, tiene un importante papel en el desarrollo de numerosos tumores, aunque está muy poco estudiado en leiomiomas. En este trabajo de fin de grado hemos estudiado la presencia y distribución de NTS y sus distintos receptores en muestras de leiomioma y miometrio adyacente de pacientes control y tratadas con acetato ulipristal (UPA), modulador selectivo de los receptores de progesterona, mediante técnicas de inmunoperoxidasa (IP) e inmunofluorescencia (IF). Los resultados muestran la presencia de NTS y sus receptores en todas las muestras estudiadas. La IF con desmina y vimentina, mostró que tanto el péptido como los receptores NTSR1 y NTSR3 están presentes en el músculo y el conjuntivo mientras que el NTR2 solo en el músculo. No se observaron diferencias entre las pacientes control y tratadas con UPA. En conjunto, nuestros resultados sugieren un papel para la NTS y sus receptores en los leiomiomas, no dependiente de la progesterona.

Palabras clave: Leiomiomas, neurotensina, receptores de neurotensina, acetato ulipristal, inmunohistoquímica.

ABSTRACT

Uterine leiomyomas (LMs), are myometrial benign tumors of uterine smooth muscle dependent on ovarian hormones and are the most common neoplasms of the female reproductive system. They cause metrorrhagia, pelvic pain, and infertility, being the main cause of hysterectomy. The etiology of leiomyomas remains unknown, although some hypotheses have been proposed involving numerous factors and molecules of the extracellular matrix. The neurotensin (NTS), a tridecapeptide regulated by estrogen and progesterone, plays an important role in the

development of multiple tumors, although it is very little studied in leiomyomas. In this undergraduate thesis, we investigated the presence and distribution of NTS and its various receptors in leiomyoma and adjacent myometrium samples from control patients and those treated with ulipristal acetate (UPA), a selective progesterone receptor modulator, using immunoperoxidase (IP) and immunofluorescence (IF) techniques. The results show the presence of NTS and its receptors in all the samples studied. IF with desmin and vimentin showed that both the peptide and the NTSR1 and NTSR3 receptors are present in muscle and connective tissue, whereas NTR2 is only in muscle. No differences were observed between control patients and those treated with UPA. In conclusion, our results suggest a role for NTS and its receptors in leiomyomas that is not dependent on progesterone.

Key words: Leiomyomas, neurotensin, neurotensin receptors, ulipristal acetate, immunohistochemistry.

INTRODUCCIÓN

Los leiomiomas uterinos (LMs), también denominados fibromas o miomas, son tumores de músculo liso y constituyen las neoplasias más comunes del aparato reproductor femenino con importantes consecuencias para la salud de las mujeres, además de suponer una importante carga económica para el sistema sociosanitario. Los LMs representan aproximadamente el 29% de todas las hospitalizaciones ginecológicas en mujeres de entre 15 y 54 años (Mathew et al., 2021). Aunque son tumores benignos, los LMs se asocian con una morbilidad significativa; son la causa principal de histerectomía y una fuente importante de disfunción ginecológica y reproductiva, que abarca desde hemorragia y dolor pélvico hasta infertilidad, abortos espontáneos recurrentes y parto prematuro (Yang et al., 2022).

1. Etiología

Los LMs, considerados tumores monoclonales que surgen del músculo liso uterino, son un tipo de neoplasia benigna compuesta por haces arremolinados de células musculares, además de contener fibroblastos y otras células del tejido conjuntivo con cantidades variables de matriz extracelular (MEC). La formación excesiva de MEC contribuye significativamente a la expansión del tumor. Estos tipos de tumores se comportan de manera benigna por lo general, aunque

existen determinados tipos histológicos o histopatológicos conocidos como tumores uterinos de músculo liso de potencial malignidad incierta (STUMP) que presentan un comportamiento clínico particular que no puede considerarse como completamente benigno (Bulun, 2013; Guntupalli et al., 2009; Yordanov et al., 2020).

Una característica que destaca en los LMs es su sensibilidad a los esteroides ováricos: estrógenos y progesterona, lo que queda de manifiesto en su formación y crecimiento durante el periodo de actividad ovárica y su pérdida de tamaño en la menopausia. Las fluctuaciones en la producción de estrógenos y progesterona asociadas al ciclo ovárico y los elevados niveles de estas hormonas durante el embarazo afectan al crecimiento de los LMs (Bulun, 2013).

La progesterona y el receptor de progesterona (PR) desempeñan papeles clave en el crecimiento y desarrollo de los LMs. Se ha demostrado una mayor concentración de las dos isoformas descritas del PR (PR-A y PR-B) en el tejido leiomiomatoso, en comparación con el miometrio adyacente. La progesterona suprime la apoptosis y estimula la proliferación de las células del músculo liso de los LMs en cultivo, mientras que los moduladores del PR inhiben la proliferación e inducen la apoptosis en estas células (Yin et al., 2007).

La progesterona tiene un importante papel en la regulación del protooncogén bcl-2, induciendo al alza su expresión en LMs. Esto ocurre puesto que este gen contiene en su región promotora un sitio de unión de alta afinidad para el PR, lo que provocaría su sobreexpresión al producirse la unión hormona-receptor (Yin et al., 2007; Zhang et al., 2019).

En la actualidad los receptores de progesterona son una de las principales dianas terapéuticas debido a sus efectos en el crecimiento de los LMs (Machado-López et al., 2021).

2. Epidemiología

La prevalencia de los LMs ha estado históricamente subestimada por el tipo de estudios epidemiológicos centrados en mujeres sintomáticas, dejando de lado a una gran población de mujeres asintomáticas. La prevalencia de los LMs varía entre diferentes estudios y países (4.5%–68.6%), dependiendo del tipo de investigación, método de diagnóstico y características demográficas raciales/étnicas de la población estudiada (Giuliani et al., 2020).

El National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) informó que más del 80% de las mujeres afroamericanas y el 70% de las mujeres caucásicas desarrollan LMs antes de los 50 años de edad (Baird et al., 2003).

La alta prevalencia de los LMs tiene un impacto profundo en los costos del cuidado de la salud a nivel mundial. Se ha estimado que los costos anuales directos e indirectos relacionados con los LMs pueden alcanzar hasta los 34.4 mil millones de dólares estadounidenses en Estados Unidos, y costos anuales totales relacionados con hospitalizaciones de 348 millones de dólares estadounidenses en Alemania, 120 millones de dólares estadounidenses en Francia y 86 millones de dólares estadounidenses en Inglaterra (Giuliani et al., 2020).

3. Factores de Riesgo

Los estudios epidemiológicos realizados han puesto de manifiesto la importancia de una serie de factores de riesgo en el desarrollo de estos tumores:

- *Raza*

La raza es un factor de riesgo notable, en estudios recientes se evidencian diferencias raciales a nivel de expresión génica entre quienes padecen LMs. La comparación del nivel de expresión de varias proteínas entre LMs de afroamericanas y otros grupos raciales, reveló que, de 1470 genes identificados con expresión en LMs, 177 estaban sobreexpresados y 91 estaban atenuados en afroamericanas en comparación con mujeres blancas. También hay evidencia de diferencias en la expresión de micro-ARNs en tejido leiomiomatoso obtenido de afroamericanas frente a mujeres blancas. Vías potenciales implicadas en la etiología de los LMs y que podrían proporcionar información sobre las disparidades raciales incluyen: polimorfismos de genes involucrados en la síntesis de estrógenos y variaciones en la expresión de receptores nucleares de ácido retinoico e inhibidores de aromatasa (Katon et al., 2023).

Las diferencias en la expresión génica junto a condicionantes sociales, como el estrés y el racismo interpersonal además de factores conductuales, como una dieta deficiente, niveles más bajos de actividad física, deficiencia de vitamina D y una amplia gama de exposiciones ambientales y ocupacionales, son factores clave en la aparición de LMs (Katon et al., 2023).

- *Menarquia*

Varios estudios durante la última década han demostrado una asociación entre la edad temprana de la menarquia y el riesgo de desarrollar LMs. En particular, un aumento de un año en la edad de la menarquia se asoció de manera inversa con la presencia de LMs (Velez Edwards et al., 2003).

Es importante señalar que las mujeres con la edad más temprana de menarquia tuvieron el mayor riesgo de tener múltiples LMs (Velez Edwards et al., 2003). Los investigadores han especulado que la asociación entre la edad de la menarquia y los LMs puede estar basada en la duración y el grado de exposición a hormonas sexuales endógenas (Velez Edwards et al., 2003). Las dos hipótesis predominantes incluyen una mayor duración de exposición a estradiol y progesterona con una edad temprana de menarquia y un entorno hormonal único, lo que puede aumentar el riesgo de desarrollo de LMs (Styer & Rueda, 2016).

- *Embarazo*

Tener descendencia se ha relacionado con un menor riesgo de padecer LMs, con reducciones que varían entre el 20% y el 50% al comparar mujeres multíparas con nulíparas, y el riesgo parece disminuir con un mayor número de hijos en la mayoría. Esta aparente contradicción podría explicarse por la diferenciación del miometrio durante el embarazo, que hace que el tejido sea menos vulnerable a estímulos de crecimiento y alteraciones genéticas que causan la patogénesis de la enfermedad. Aunque se ha demostrado que el embarazo tiene un efecto protector directo, no se conoce nada sobre el proceso. La isquemia transitoria que se produce en el útero durante el parto y la expulsión de la placenta por varios mecanismos, se ha propuesto como un mecanismo que podría interferir en el desarrollo de los LMs al bloquear parcialmente la irrigación al tumor (Laughlin et al., 2010).

Datos experimentales en el modelo de rata Eker, mostraron efectos protectores directos para la paridad. Aunque se sabe poco sobre la causa, hay algunas ideas, incluidas las alteraciones en los perfiles endocrinos después de un primer o segundo embarazo. De manera similar, los niveles de receptores de estrógenos en el tejido miometrial pueden reducirse durante el embarazo. Por otro lado, la maternidad puede inhibir el crecimiento de LMs a través de vías no hormonales. Por ejemplo, la isquemia durante el parto y la remodelación uterina podrían erradicar

selectivamente los LMs debido a las diferencias de vascularización en comparación con el miometrio (Laughlin et al., 2010; Alali & Churnosov, 2023).

La asociación inversa entre la paridad y el desarrollo de LMs puede ser un artefacto de causalidad inversa. En este caso, donde los LMs pueden causar infertilidad y paridad reducida, las mujeres nulíparas parecen tener un mayor riesgo de desarrollar LMs (Laughlin et al., 2010), y la paridad parece ser protectora (Styer & Rueda, 2016).

- *Obesidad*

Diferentes estudios han encontrado que la obesidad es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de LMs, lo que se ha atribuido a las funciones metabólicas del tejido adiposo blanco, blanco debido a su importancia en la regulación de procesos fisiológicos y patológicos como la inmunidad e inflamación (Ellulu et al., 2015; Yang et al., 2022).

Los andrógenos adrenales se metabolizan a estrógenos mayoritariamente por la aromatasa en el tejido adiposo. La obesidad y, en particular, el exceso de grasa visceral puede complementarse con la producción reducida de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), que se une a las hormonas circulantes, alterando la actividad hormonal hacia los tejidos sensibles y, por lo tanto, influyendo en el delicado equilibrio hormonal en el cuerpo (Yang et al., 2022).

- *Disruptores endocrinos*

Se han propuesto varios factores en el origen de las células iniciadoras de tumores, incluyendo la inestabilidad genómica, el microambiente inflamatorio, la fusión celular, la transferencia lateral de genes y el daño ambiental durante el desarrollo. Los efectos de los disruptores endocrinos (EDs), químicos ambientales como los ftalatos, dioxinas, parabenos, estrógenos sintéticos (DES) o el bisphenol A son capaces de interferir con el sistema endocrino, sobre el desarrollo de los LMs asociados a su origen y evolución, parecen estar en relación con la inducción de inflamación, daño al ADN o alteración epigenética, lo que tiene un impacto sobre la señalización en proliferación celular y apoptosis (Ali et al., 2023). El efecto adverso del daño ambiental puede causar la desregulación de múltiples procesos durante el desarrollo, incluyendo la interrupción del nicho de células madre, la reprogramación epigenética y la alteración de las características de las células madre (Yang et al., 2022).

En los LMs, la exposición durante el desarrollo a EDs afectó a las características biológicas de las células madre mesenquimales en un modelo de rata Eker con mutación en el gen Tsc2. Este modelo animal desarrolla espontáneamente LMs uterinos con una incidencia del 63%. Sin embargo, la exposición temprana a EDs, como el dietilestilbestrol (DES), aumentó la penetrancia de la mutación Tsc2, resultando en una incidencia del 100%. Estos resultados sugieren que la exposición durante el desarrollo a EDs influye en las células madre mesenquimales alterando sus características, lo que puede provocar cambios epigenéticos y la iniciación de la patogénesis de LMs (Yang et al., 2022).

Las interacciones tempranas y tardías del epigenoma y el ambiente, pueden potencialmente impactar en la función uterina y aumentar el riesgo de LMs. Esta reprogramación epigenómica puede permanecer transcripcional y fenotípicamente silenciosa hasta ser desencadenada por un evento posterior en la vida, como la exposición a factores de riesgo (Figura 1) (Yang et al., 2022).

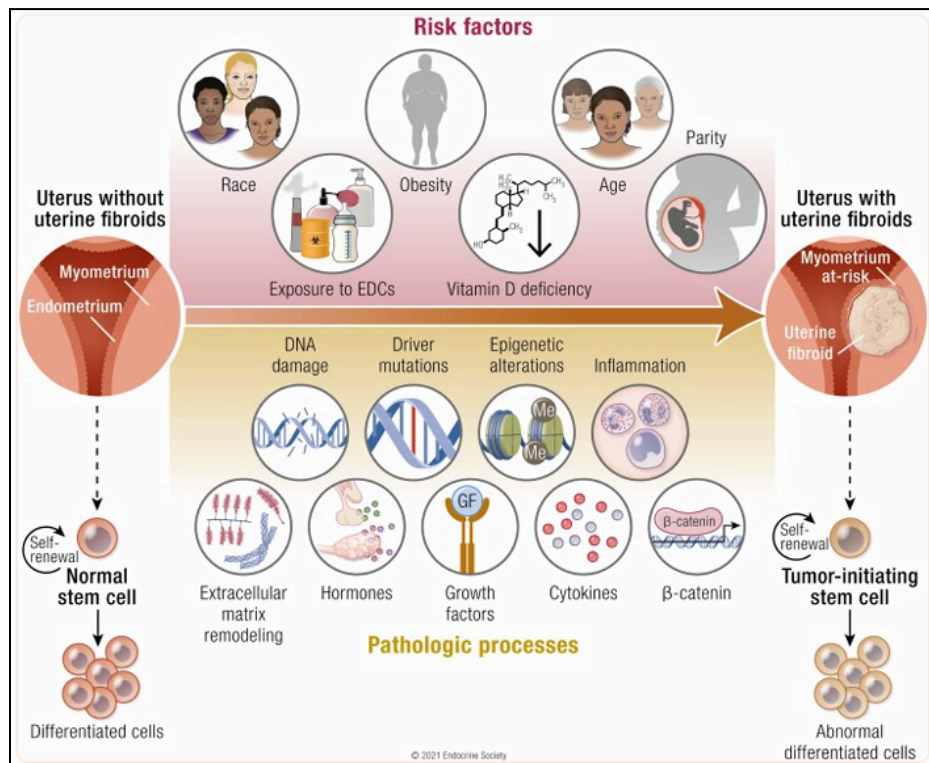


Figura 1. Factores de riesgo en el desarrollo de LMs uterinos. Extraído de (Yang et al., 2022)

4. Fisiopatología

El miometrio contiene células madre del músculo liso, que bajo ciertas condiciones pueden transformarse en células progenitoras de LMs. Estas células madre miometriales tienen niveles bajos o ausentes de receptores de hormonas sexuales pero requieren de estas hormonas para su crecimiento. El mecanismo para su desarrollo está mediado por la vía WNT- β -catenina, además de por estrógenos y progesterona. Esta vía puede estimular la expresión del factor de crecimiento transformante- β 3 (TGF β 3), que induce la expresión de fibronectina, una proteína de la matriz extracelular, y la proliferación celular en LMs preclínicos más que en el miometrio. Los LMs se componen de al menos cuatro tipos celulares: células del músculo liso, células del músculo liso vascular y dos tipos de fibroblastos (fibroblastos y fibroblastos asociados a LMs). Estos tipos celulares son clonales, lo que significa que derivan de la misma célula, es decir, la célula progenitora del LM (Stewart et al., 2016).

La MEC secretada por los fibroblastos es un componente importante en la fisiopatología de los LMs. Los factores de crecimiento que se encuentran en la MEC y que podrían regular la formación de LMs incluyen: el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento epidermal similar a la heparina prolifigante (HB-EGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Además, se sugiere que la cantidad y la topología de la MEC en los LMs se altera en comparación con el miometrio, y algunas evidencias indican que el estrés mecánico provocado por el crecimiento del LM actúa como señalización celular para su propio desarrollo. Los fibroblastos secretan la mayoría de los componentes de la MEC y son, por lo tanto, elementos clave en la fisiopatología de los LMs (Stewart et al., 2016).

Los estrógenos y la progesterona, junto con sus receptores, ER y PR respectivamente, han sido considerados durante mucho tiempo como reguladores clave de la biología de los LMs. Un factor de transcripción que se ha demostrado que es clave en la señalización de PR y, por lo tanto, para la proliferación de las células leiomiomatosas es KLF11. Además, análogos de la progesterona también tienen acciones que podrían tener significado funcional, incluyendo la activación de la vía AKT, que promueve el crecimiento de los LMs al fomentar la supervivencia celular e inhibir la apoptosis (Stewart et al., 2016).

5. Neurotensina y sus receptores. Implicación en enfermedades tumorales

Los péptidos constituyen un conjunto amplio de moléculas que realizan numerosas acciones tanto en tejidos sanos como patológicos (Christou et al., 2020; Nikolaou et al., 2020). De entre los numerosos péptidos descritos, la neurotensina (NTS) ha demostrado tener un importante papel regulador en diferentes funciones. La NTS es un péptido de 13 aminoácidos aislado del hipotálamo bovino y descrito por primera vez en 1973 (Carraway & Leeman, 1973), cuya expresión se localiza principalmente en células endocrinas del intestino delgado y en neuronas del sistema nervioso central (SNC) (Kislauskis et al., 1988; Zhao & Pothoulakis, 2006), aunque también se ha descrito su presencia en órganos endocrinos como la hipófisis (Bello et al., 1992, 1999, 2004) y las gónadas (González-Gómez et al., 2023), donde su producción está fuertemente influenciada por la acción de los esteroides sexuales. En el tracto digestivo la NTS modula diferentes funciones como la motilidad intestinal y la absorción de determinados nutrientes, mientras que a nivel del SNC actúa modulando la mayor parte de los sistemas de neurotransmisión (Armstrong et al., 1986; Tschumi & Beckstead, 2019). La acción de la NTS está mediada por tres receptores, dos receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteína G: los receptores NTSR1 y NTSR2, de alta y baja afinidad respectivamente, y el receptor NTSR3 perteneciente a la familia de receptores Vps10p con un único dominio transmembrana codificado por el gen α -NTSR3/sortilina (Mazella & Vincent, 2006; Dupouy et al., 2011; Nikolaou et al., 2020).

La NTS se une al NTSR1, solo o en asociación con la sortilina en la membrana celular, y activa cuatro vías principales de señalización: (1) Rho GTPasas, (2) liberación de Ca^{2+} intracelular, (3) PKC/RAF-1/MAPK-ERK1/2, y (4) PI3K/AKT. A continuación, cada una de estas vías de señalización activa efectores y factores de transcripción que participan en la transcripción de genes implicados en la supervivencia y proliferación celular, así como en la dinámica del citoesqueleto y la migración celular (Christou et al., 2020).

Además de en tejidos sanos, la expresión de NTS y de sus receptores ha sido descrita en diferentes cánceres como el cáncer de pulmón, páncreas, tiroides y mama entre otros (Alifano et al., 2010; Christou et al., 2020; Nikolaou et al., 2020), en los que se ha puesto de manifiesto la implicación del complejo NTS/NTSR1 en la progresión de los mismos, desde el crecimiento, con

efectos proliferativos y de supervivencia, hasta la propagación metastásica con crecimiento independiente de anclaje, y efectos pro-migratorios y pro-invasivos (Dupouy et al., 2011; Christou et al., 2020; Nikolaou et al., 2020). Asimismo, la presencia de NTS ha sido descrita en determinados tumores benignos entre los que se encuentran los LMs uterinos, en los que se ha demostrado su fuerte dependencia de los esteroides gonadales (Rodríguez et al., 2010, 2011), observando como mujeres con LMs que eran sometidas a tratamiento para fertilización *in vitro* (FIV) experimentaban aumentos de más del doble en el número de células leiomiomas NTS-ir (Rodríguez et al., 2010).

En la actualidad no existen tratamientos farmacológicos eficaces para el tratamiento de estos tumores, por lo que la cirugía, miomectomía e hysterectomía, siguen siendo la opción terapéutica más habitual. Su dependencia de los esteroides sexuales, fundamentalmente de la progesterona cuyos receptores son inducidos por los estrógenos, ha hecho que los tratamientos farmacológicos desarrollados hasta el momento estén dirigidos a inhibir la producción de hormonas con análogos de la hormona GnRH (GnRHa), o bien a modular los niveles de estrógenos, con inhibidores de aromatasa, o los receptores de progesterona con moduladores selectivos de estos (SPRMs), a pesar de la falta de conocimiento sobre los mecanismos de acción de estos fármacos (Singh et al., 2023). De los SPRMs, el más utilizado en la práctica clínica ha sido el acetato ulipristal (UPA), un modulador selectivo del receptor de progesterona, que ejerce efectos selectivos mixtos de agonista y antagonista de la progesterona en el tejido miometrial y endometrial (Gainer & Ulmann, 2003; Salas et al., 2021). Esta acción antagonista de la progesterona puede resultar en un efecto estrogénico no contrarrestado y, por lo tanto, podría causar hiperplasia y lesiones malignas en el endometrio.

Además de los efectos sobre el crecimiento de los LMs y el bloqueo de la ovulación, el UPA también podría inducir efectos endometriales específicos que resultan en amenorrea. Estos efectos se caracterizan histológicamente por glándulas dilatadas, distorsión epitelial, apoptosis y baja actividad mitótica en glándulas y estroma (De Milliano et al., 2017).

En estudios realizados en Europa en una población predominantemente blanca, el UPA demostró ser más efectivo que el placebo y no inferior al acetato de leuprolida, un GnRHa, en el control del sangrado excesivo y en la reducción del tamaño de los LMs. UPA se asoció además

con menos síntomas hipoestrogénicos como sofocos y efectos en los marcadores de recambio óseo. Este ensayo de fase 3 fue diseñado para evaluar la eficacia y tolerancia del UPA en el tratamiento intermitente de LMs sintomáticos en una población diversa (Liu et al., 2018).

Por consiguiente, los tratamientos disponibles actualmente son tratamientos sintomáticos centrados en reducir fundamentalmente las menorragias. Este tipo de tratamientos, por otra parte, no están exentos de efectos secundarios que en algunos casos como los GnRHa acotan su uso a periodos concretos, o como el UPA que puede llegar a comprometer la función hepática en determinadas pacientes, por lo que también su utilización en clínica se ha visto limitada (Islam et al., 2013; Ali & Al-Hendy, 2017; Shin et al., 2018).

A pesar del amplio abanico de moléculas estudiadas y ensayadas hasta el presente, son escasas las herramientas farmacológicas eficaces y seguras disponibles, para tratar este tipo de tumores. Por todo ello, se hace necesario la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento para el abordaje de estos tumores. Considerando los datos existentes en relación al papel de la NTS en determinados tipos de cáncer, que su presencia así como la de su receptor 1, NTSR1, ha sido descrita en células leiomiomasas y que la expresión de ambos, NTS y NTSR1 está fuertemente influenciada por la acción de las hormonas ováricas, resulta de enorme interés para intentar entender el papel que está ejerciendo la NTS en la biología de los LMs, estudiar su distribución y la de sus diferentes receptores en el tejido uterino normal y patológico.

OBJETIVOS

Actualmente, la información que se tiene sobre la expresión de la NTS en LMs y la implicación en su biología es escasa. Por lo que resulta de gran interés estudiar la distribución de este péptido y sus receptores, ya que en conjunto pueden tener efectos significativos en el desarrollo y evolución del tumor, y teniendo en cuenta la alta incidencia de LMs, es de vital importancia estudiar y conocer a fondo el papel de estos factores generando así el conocimiento previo para futuras investigaciones sobre sus posibles usos como dianas terapéuticas. Además, teniendo en cuenta la dependencia de la NTS y sus receptores de las hormonas ováricas reviste igualmente interés estudiar el efecto que fármacos como los SPRMs

pueden tener sobre la presencia del péptido y sus receptores, por todo ello, nos hemos planteado en este trabajo de fin de grado los siguientes objetivos:

1. Estudiar inmunohistoquímicamente la presencia y distribución de NTS y sus receptores NTSR1, NTSR2 Y NTSR3 en muestras de miometrio y leiomioma pareadas procedentes de pacientes control.
2. Estudiar inmunohistoquímicamente la presencia y distribución de NTS y sus receptores NTSR1, NTSR2 Y NTSR3 en muestras de miometrio y leiomioma pareadas procedentes de pacientes tratadas con UPA.
3. Caracterizar las poblaciones celulares que presentan NTS y sus receptores mediante dobles marcajes inmunofluorescentes con desmina y vimentina.
4. Comparar la presencia y distribución del péptido y sus receptores entre muestras control y tratadas con UPA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar el siguiente estudio, se utilizaron muestras de miometrio y LM, tanto de pacientes control como de pacientes tratadas con UPA, obtenidas de los Servicios de Ginecología y Obstetricia y Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Canarias (HUC).

En total se analizaron 9 muestras, 5 muestras de miometrio y LM pareados de pacientes tratadas con UPA y 4 muestras de miometrio y LM pareados de pacientes control. De cada una de las 9 muestras pareadas se obtuvieron 6 series montadas en paralelo, procesadas de la siguiente manera:

1. Tinción de Hematoxilina-Eritrosina.
2. Tinción de Tricrómico de Masson.
3. Inmunohistoquímica para neurotensina (NTS).
4. Inmunohistoquímica para el receptor 1 (NTSR1).
5. Inmunohistoquímica para el receptor 2 (NTSR2).
6. Inmunohistoquímica para el receptor 3 (NTSR3).

PROCESADO DE MUESTRAS

1. Microtomía

Con las muestras obtenidas, ya fijadas e incluidas previamente, se realizaron 6 cortes por bloque, pertenecientes a las 6 réplicas por muestra para el estudio. Se realizaron cortes de 5 µm con un microtomo de rotación (Thermo Scientific Shandon Finesse 325). Las secciones se montaron en baño de maría a 37°C sobre portaobjetos adherentes (Thermo Scientific). Los cortes montados se introdujeron en estufa a 37°C al menos durante 24h para su secado.

2. Desparafinado e hidratación

Una vez secas y previamente a los tratamientos de tinción e inmunohistoquímica, se realizó el desparafinado e hidratación de las secciones de acuerdo con el protocolo descrito en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Protocolo de desparafinado e hidratación

Desparafinado e hidratación	
Reactivos	Tiempo
Toluol I	10 minutos
Toluol II	10 minutos
Toluol III	10 minutos
Alcohol 100°	5 minutos
Alcohol 96°	5 minutos
Alcohol 70°	5 minutos
Agua destilada	5 minutos x 2 baños

3. Tinción

Tras el desparafinado e hidratación de las muestras, se realizaron las tinciones de Hematoxilina-eritrosina y Tricrómico de Masson para estudio histológico y de la matriz extracelular respectivamente según los protocolos descritos en las *tablas 2 y 3* respectivamente.

Tabla 2. Protocolo de Hematoxilina-eritrosina

Tinción Hematoxilina-eritrosina	
Reactivos	Tiempo
Desparafinado e hidratación	
Hematoxilina de Harris	2 minutos
Agua corriente (Lavado bajo el grifo)	5 minutos
Agua destilada	1 minuto
Eritrosina 0,5%	2 minutos
Agua destilada (lavado rápido)	Meter y sacar la cestilla al instante
Desparafinado e hidratación	

Tabla 3. Protocolo de Tinción Tricrómico de Masson

Tinción Tricrómico de Masson	
Reactivos	Tiempo
Desparafinado e hidratación	
Fijador de Bouin	12 horas
Lavado en agua corriente para decolorar	5 minutos
Lavado en agua destilada	1 minuto
Hematoxilina de Weigert	10 minutos
Lavado en agua corriente para decolorar	5 minutos
Lavado en agua destilada	1 minuto
Biebrich Escarlata-Fucsina	2 minutos
Lavado en agua destilada	1 minuto
Ac. Fosfotungstico-Fosfomolibdico	2 minutos
Lavado en agua destilada	1 minuto
Azul de Anilina	5 minutos
Lavado en agua destilada	1 minuto
Ácido Acético 1%	4 minutos
Lavado rápido en agua destilada	Meter y sacar la cestilla al instante
Deshidratación, aclarado y montaje	

4. Inmunohistoquímica

4.1 Inmunoperoxidasa

Para analizar inmunohistoquímicamente la presencia y distribución de la NTS y sus receptores NTSR1, NTSR2 Y NTSR3 en ambos tejidos, hicimos uso de la técnica inmunoenzimática indirecta, que nos permite visualizar la localización y distribución del antígeno gracias al uso de anticuerpos primarios y secundarios.

Su metodología se basa en la interacción antígeno-anticuerpo y en el uso de un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, el revelado de cuya actividad genera un precipitado insoluble de color marrón que permite visualizar la localización en el tejido de las moléculas objeto de estudio.

Para realizar la técnica de inmunoperoxidasa se siguió el protocolo descrito en la tabla 4.

Tabla 4. Protocolo y revelado de inmunohistoquímica indirecta (inmunoenzimática)

Inmunohistoquímica indirecta (inmunoenzimática)	
Reactivos	Tiempo
Desparafinado e hidratación	
Lavar con TBS (Tris Buffer Saline pH=7.4)	2 x 5 minutos
Desenmascarar (Buffer de Citrato pH 6.0) ¹	5 minutos a 90°C
Incubar en solución de bloqueo (FBS 1/100)	30 minutos
Lavar con TBS	3 x 5 minutos
Lavar con TBS-Tritón X-100 0.2%	10 minutos
Incubar con el antisuero específico a T° ambiente en solución de bloqueo	24 horas
Lavar con TBS	3 x 10 minutos
Lavar con TBS-Tritón X-100 0.2%	10 minutos
Incubar con el antisuero secundario a T° ambiente en TBS-Tritón X-100 0.2%	1 hora
Lavar con TBS	3 x 5 minutos
Lavar con TBS-Tritón X-100 0.2%	10 minutos
Incubar con Streptavidina-Peroxidasa en TBS-Tritón X-100 0.2%	1 hora
Lavar con TBS	3 x 5 minutos
Revelado (inmunoenzimática)	
Reactivos	Tiempo
Lavar con Tris-HCl (pH=7.6)	5 minutos
Revelar con solución de 3,3' Diaminobenzidina al 0.02% y H ₂ O ₂ al 0.02% en Tris-HCl	Quitar la cestilla según el color observado
Parar el revelado y lavar con TBS	El tiempo que sea necesario
Contratinción de núcleos	
Reactivos	Tiempo
Sumergir en Hematoxilina de Harrys	30 segundos
Lavado en agua corriente	5 minutos
Lavado en agua destilada	1 minuto
Deshidratación, aclarado y montaje	

4.2 Inmunofluorescencia

Para caracterizar las poblaciones celulares que presentan NTS y sus diferentes receptores, utilizamos la técnica de doble marcaje inmunofluorescente. Este método se basa en el uso de anticuerpos específicos obtenidos en especies diferentes y anticuerpos secundarios frente a estos, conjugados a diferentes fluoróforos. Estos fluoróforos, excitados con la longitud de onda adecuada, emitirán fluorescencia indicando la presencia y localización de los antígenos en el tejido.

Para realizar la técnica de inmunofluorescencia se siguió el protocolo descrito en la tabla 5.

Tabla 5. Protocolo y montaje de inmunohistoquímica indirecta (inmunofluorescencia)

Inmunohistoquímica indirecta (inmunofluorescencia)	
Reactivos	Tiempo
Desparafinado e hidratación	
Lavar con TBS (Tris Buffer Saline pH=7.4)	2 x 5 minutos
Desenmascarar (Buffer de Citrato pH 6.0) ²	5 minutos a 90°C
Incubar en solución de bloqueo (FBS 1/100)	30 minutos
Lavar con TBS	3 x 5 minutos
Lavar con TBS-Tritón X-100 0.2%	10 minutos
Incubar con el antisuero específico a T° ambiente en solución de bloqueo	24 horas
Lavar con TBS	3 x 10 minutos
Lavar con TBS-Tritón X-100 0.2%	10 minutos
Incubar con el antisuero secundario a T° ambiente en TBS-Tritón X-100 0.2%	1 hora
Lavar con TBS	3 x 5 minutos
Lavar con TBS-Tritón X-100 0.2%	10 minutos
Incubar con Estreptavidina conjugada a Cy3 en TBS-Tritón X-100 0.2% ³	1 hora
Lavar con TBS	3 x 5 minutos
Montaje (fresco)	
Reactivos	Tiempo
Montaje con medio acuoso conteniendo DAPI	1 minuto

4.3 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios y secundarios, así como las diluciones empleadas en las técnicas inmunohistoquímicas han sido los siguientes:

Anticuerpos primarios

- Anti Human NTS 672 Rabbit 1/200
- Anti Human NTSR1 636 Rabbit 1/200
- Anti Human NTSR2 Polyclonal Antibody Rabbit 1/200 (*Elabscience^R*)
- Anti Human NTSR3 Polyclonal Antibody Rabbit 1/100 (*abcam*)
- Anti Human Desmine Monoclonal Antibody Mouse 1/100 (*Elabscience^R*)
- Anti Human Vimentin Monoclonal Antibody Mouse 1/100 (*Elabscience^R*)

Anticuerpos secundarios

- Biotin Goat Anti Rabbit IgG 1/500 (*Jackson ImmunoResearch*)
- Donkey Anti- Mouse IgG Polyclonal Antibody conjugated FITC 1/300 (*Merck*)¹

¹ Usado contra Anti Human Desmine Monoclonal Antibody Mouse 1/100 (*Elabscience^R*)

- CyTM3-conjugated Streptavidin 1/500 (*Jackson ImmunoResearch*)
- Peroxidase-conjugated Streptavidin 1/500 (*Jackson ImmunoResearch*)

5. Deshidratación, aclarado y montaje

Una vez realizadas las tinciones de H-Er, Tricrómico de Masson y las series de inmunoperoxidasa indirecta, las secciones se deshidrataron y montaron según el protocolo descrito en la *Tabla 6*. Las muestras procesadas para inmunofluorescencia se montaron con un medio glicerinado conteniendo DAPI (Fluoroshield DAPI - *SIGMA*) para la contratinción de los núcleos.

Tabla 6. Protocolo de Deshidratación, aclarado y montaje

Deshidratación, aclarado y montaje	
Reactivos	Tiempo
Alcohol 96°	1 minuto
Alcohol 100°	1 minuto
Alcohol 100°	1 minuto
Toluol I	2 minutos
Toluol II	2 minutos
Montaje con Eukit	Depende de la destreza del investigador

6. Análisis cualitativo

Las muestras fueron analizadas con un microscopio óptico DM4000B (Leica Microsystems, Germany) con lámpara de fluorescencia (Leica ebq 100. ISOLATED) y cámara digital (Leica DFC300 FX), con la que se realizaron las correspondientes capturas de imagen, para su posterior tratamiento y análisis mediante el software Leica Q-Win (Leica Microsystems, Germany) e ImageJ (Bethesda, Maryland, USA). Se realizaron 5 capturas por muestra a diferentes aumentos. Por medio de las tinciones de *H-Er*, *Tricrómico de Masson* e *Inmunofluorescencia*, realizamos una comparación entre miometrio y leiomioma de las muestras control y tratadas con UPA, describiendo y caracterizando las poblaciones celulares que expresan NTS, NTSR1, NTSR2, y NTSR3, con desmina y vimentina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudio histológico en leiomioma y miometrio adyacente en muestras de pacientes control y tratadas con UPA.

- *Pacientes Control*

La coloración topográfica de Masson nos ha permitido observar cualitativamente, diferencias, en la distribución y proporción de la MEC y el tejido muscular entre el miometrio (Figura 2-A) y el leiomioma (Figura 2-B). Así en miometrio, se observa una mayor presencia de paquetes de músculo liso (Figura 2-A flechas negras) en relación con la MEC (Figura 2-A flechas blancas), mientras que en el tejido leiomiomatoso, se observa menor proporción de células musculares respecto a la MEC. Por otro lado, el músculo en el leiomioma presenta una disposición más desorganizada que en el miometrio (Figura 2-B).

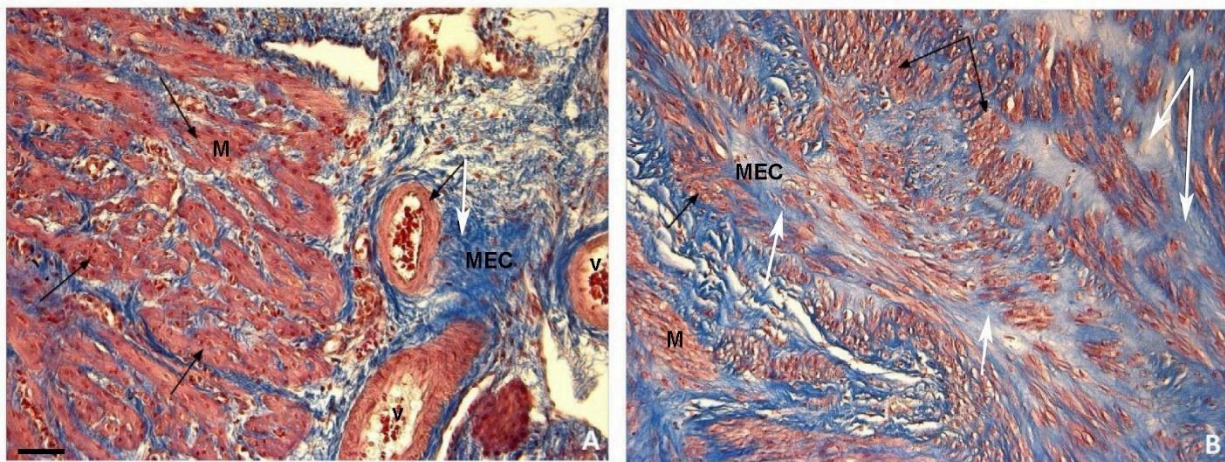


Figura 2. Distribución de la MEC y el tejido muscular liso en miometrio (A) y leiomioma (B) de pacientes control. Tinción Tricrómico de Masson. Las flechas negras indican los paquetes de músculo liso (rojo) mientras que las flechas blancas señalan la MEC en el tejido conjuntivo. M: músculo liso; MEC: matriz extracelular; v: vaso sanguíneo. Barra de escala: 80µm.

Estos datos apoyan resultados obtenidos en diversos estudios, que ponen de manifiesto una mayor proporción de MEC en leiomiomas y una disminución del tejido muscular, así como una alteración en el empaquetamiento y disposición de este (Rafique et al., 2017). Estudios moleculares han demostrado que además de su distribución, la matriz leiomiomatoso presenta diferencias en su composición respecto al miometrio apuntando a una sobreproducción y aumento de glicosilaciones en glicosaminoglicanos sulfatados como el sulfato de dermatán y el sulfato de condroitina. Estos, interactúan en el ensamblaje de la MEC y debido a su alto grado de glicosilación e hidratación, provocan una expansión de la misma por el aumento de la presión osmótica (Rafique et al., 2017; Flake et al., 2018). En cuanto a la desorganización del tejido muscular liso parece deberse principalmente a una consecuencia del aumento de la MEC,

ya que esta provoca el aislamiento de los miocitos en fascículos, así como también aumenta la distancia entre ellos y con respecto a los vasos sanguíneos circundantes (Flake et al., 2018; Mesa-Provecho, 2020).

- *Pacientes tratadas con UPA*

En las muestras de pacientes tratadas con UPA, se pudieron observar las mismas diferencias en cuanto a la distribución y organización del tejido conjuntivo y el músculo liso entre el miometrio (Figura 3-A) y el tejido leiomiomatoso (Figura 3-B) con respecto a las muestras control. Sin embargo, sí se pudo observar una mayor densidad de MEC en el tejido conjuntivo del LM de las pacientes tratadas. Esto puede estar en relación con las observaciones realizadas por algunos autores que demuestran un incremento de la expresión de los genes de colágeno y un aumento del entrecruzamiento de las fibras maduras (Stewart et al., 1994; Rafique et al., 2017). Además, han señalado una proporción alterada de los tipos de colágeno con un aumento del colágeno tipo V en la matriz del leiomioma y un aumento del ARNm de los colágenos tipo I y tipo III (Stewart et al., 1994; Rafique et al., 2017). Sin embargo, en trabajos previos realizados por el grupo (Mesa-Provecho, 2020; Benedicto-Marrero, 2021), se ha observado una disminución en la cantidad de MEC después del tratamiento con UPA.

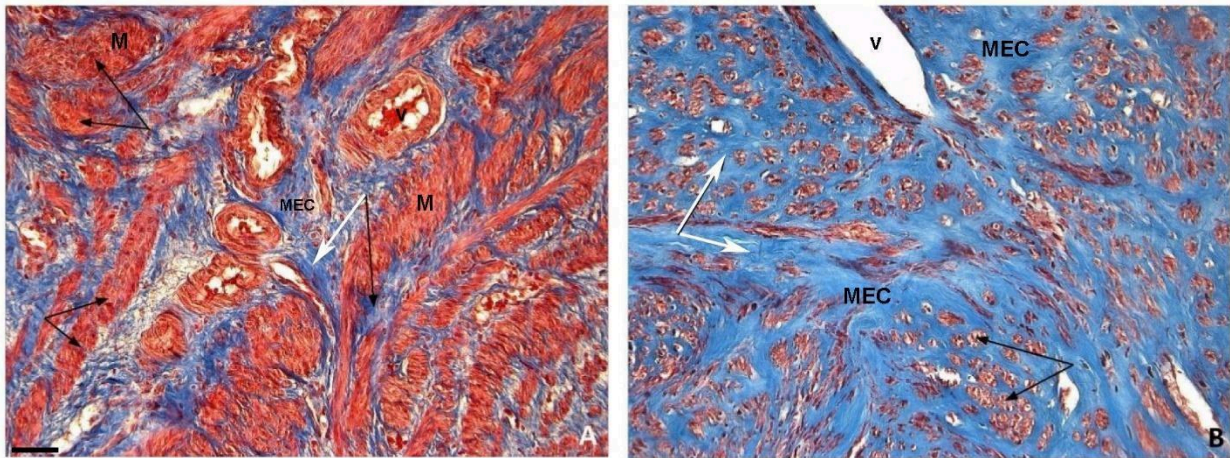


Figura 3. Distribución de la MEC y el tejido muscular liso en miometrio (A) y leiomioma (B) de pacientes tratadas con UPA. Tinción Tricrómico de Masson. Las flechas negras indican los paquetes de músculo liso (rojo) mientras que las flechas blancas señalan la MEC en el tejido conjuntivo. Barra de escala: 80µm. M: músculo liso; MEC: matriz extracelular; v: vaso sanguíneo. Barra de escala: 80µm.

2. Detección inmunohistoquímica del péptido neurotensina y sus receptores NTSR1, NTSR2 y NTSR3 en miometrio y leiomioma de pacientes control y tratadas con UPA.

- Pacientes Control (NTS y NTSR1)

Las técnicas inmunoenzimáticas, nos permitieron poner de manifiesto la presencia de células inmunorreactivas para NTS (NTS-ir) y su receptor de alta afinidad NTSR1, tanto en miometrio (Figura 4-A,C) como en leiomioma (Figura 4-B,D), mayoritariamente en el tejido conjuntivo.

En el tejido leiomiomatoso, además de en el tejido conjuntivo, se observaron algunas células musculares inmunorreactivas para ambos anticuerpos, así como células fuertemente inmunorreactivas en el tejido conjuntivo cuya morfología sugiere que podría tratarse de células cebadas (Figura 4 B).

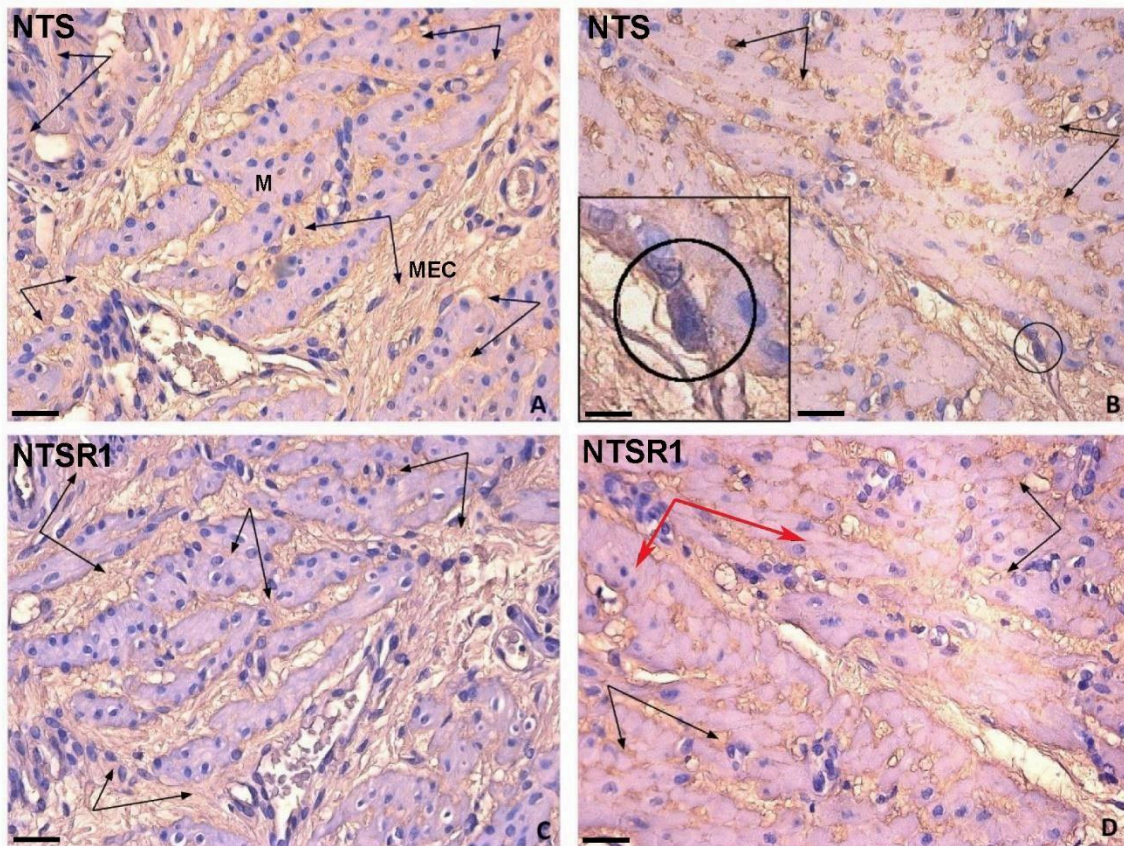


Figura 4. Distribución de NTS y el receptor NTSR1 en miometrio (A,C) y leiomioma (B,D) de pacientes control. Técnica de inmunoperoxidasa indirecta. Las flechas negras señalan la presencia de NTS-ir en el tejido conjuntivo. Las flechas rojas en la imagen D señalan la presencia de NTSR1-ir en células musculares leiomiomatosas. El inserto en la imagen B muestra una célula de gran tamaño presente en el tejido conjuntivo, probablemente una célula cebada que presenta una fuerte inmunoreacción para NTS. M: músculo liso; MEC: matriz extracelular. Barras de escala: (A-D): 40µm; inserto imagen B: 10µm.

- *Pacientes tratadas con UPA (NTS y NTSR1)*

De la misma forma, en muestras de pacientes tratadas con UPA se pudo observar NTS y NTSR1 inmunorreactividad tanto en miometrio (Figura 5-A,C) como en LM (Figura 5-B,D) con una distribución mayoritaria en el tejido conjuntivo, siendo muy similar a la distribución observada en las muestras de pacientes control. Además, encontramos células endoteliales fuertemente inmunorreactivas frente a NTSR1 (Figura 5-A,B y D). No se observaron diferencias en las muestras de pacientes tratadas con UPA.

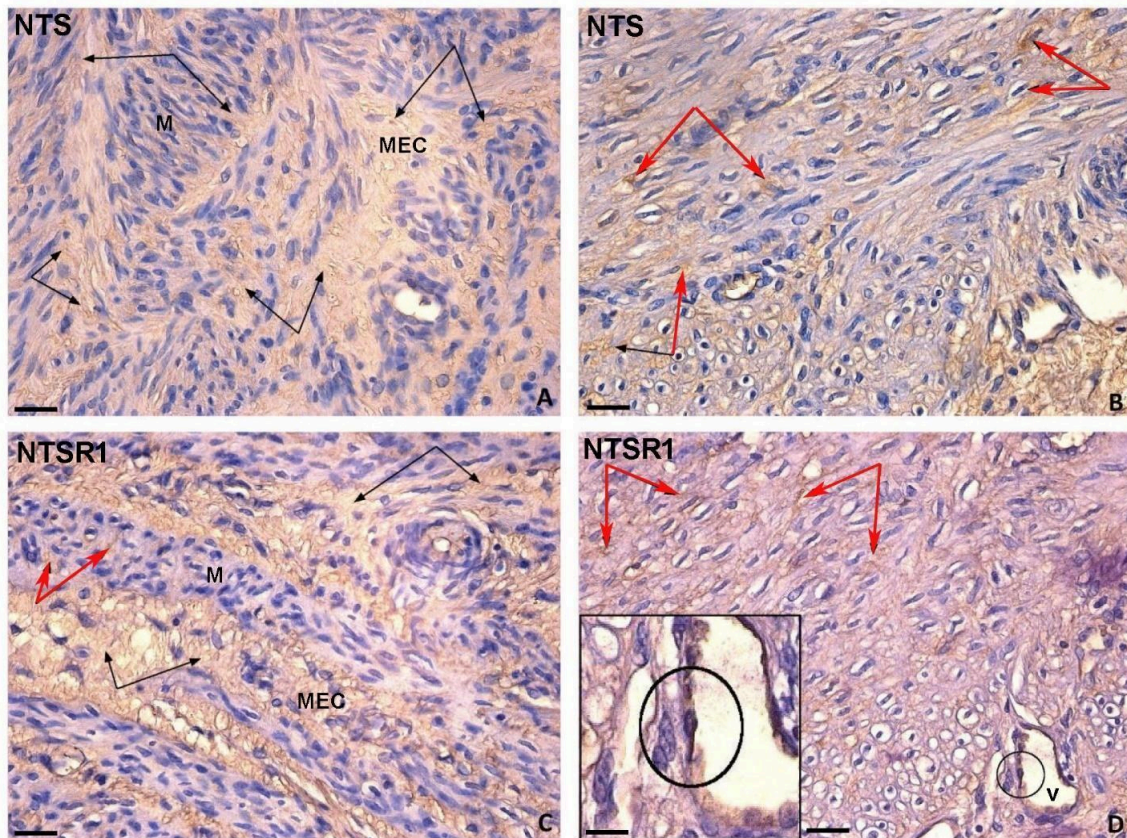


Figura 5. Distribución de NTS y el receptor NTSR1 en miometrio (A,C) y leiomioma (B,D) de pacientes tratadas con UPA. Técnica de inmunoperoxidasa indirecta. Las flechas negras señalan la presencia de inmunoreacción en el tejido conjuntivo, mientras que las flechas rojas señalan la presencia de células NTS-ir y NTSR1-ir en células de músculo liso miometrial (C) y leiomiomatoso (B y D). El inserto en la imagen D, muestra un detalle de células endoteliales NTSR1-ir en vasos presentes en el tejido leiomiomatoso. M: músculo liso; MEC: matriz extracelular; v: vaso sanguíneo. Barras de escala: (A-D): 30µm; inserto imagen D: 10µm.

La presencia de NTS y su receptor NTSR1 se ha puesto de manifiesto en diversos tumores malignos, en los cuáles se relaciona con una importante acción antiapoptótica y prooncogénica, lo que contribuye al desarrollo, progresión y metástasis de varios tipos de cáncer, especialmente

en el cáncer de mama (Dupouy et al., 2009; 2011) y los cánceres digestivos (Christou et al., 2020)

Cuando la NTS se une a su receptor NTSR1, se desencadenan una serie de eventos intracelulares bien conocidos. El primer paso consiste en la activación de una enzima llamada fosfolipasa C- γ (PLC- γ), que a su vez produce dos moléculas importantes: inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). Estas moléculas movilizan el calcio dentro de la célula y activa otra enzima llamada proteína quinasa C (PKC). La PKC tiene un papel crucial en la activación de la vía de señalización de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2). Además, la PKC activa la proteína quinasa D, que a su vez activa el factor de transcripción nuclear kappa B (NFkB). La vía MAPK-ERK1/2 activa varios factores de transcripción importantes, como AP-1, NFkB, Egr-1, Elk-1 y c-myc, que son esenciales para la supervivencia y proliferación celular. Además, la NTS también activa las GTPasas Rho, la quinasa de adhesión focal (FAK) y la proteína tirosina quinasa protooncogénica Src, modulando así la dinámica del citoesqueleto y facilitando la migración celular (Christou et al., 2020) lo que demuestra el papel mitogénico de la NTS mediado por el NTSR1.

- *Pacientes Control (NTSR2 y NTSR3)*

La inmunorreacción para NTSR2 y NTSR 3, mostró diferencias cualitativas en su distribución con respecto a la NTS y el receptor NTSR1. La presencia de ambos receptores fue predominante en el citoplasma de las células musculares, presentando una débil inmunorreacción en el tejido conjuntivo. Además, se observaron células de músculo liso vascular inmunorreactivas para ambos receptores tanto en miometrio como en LM (Figura 6-E,F), así como presuntas células cebadas intensamente inmunorreactivas para NTSR3 (Figura 6-G,H).

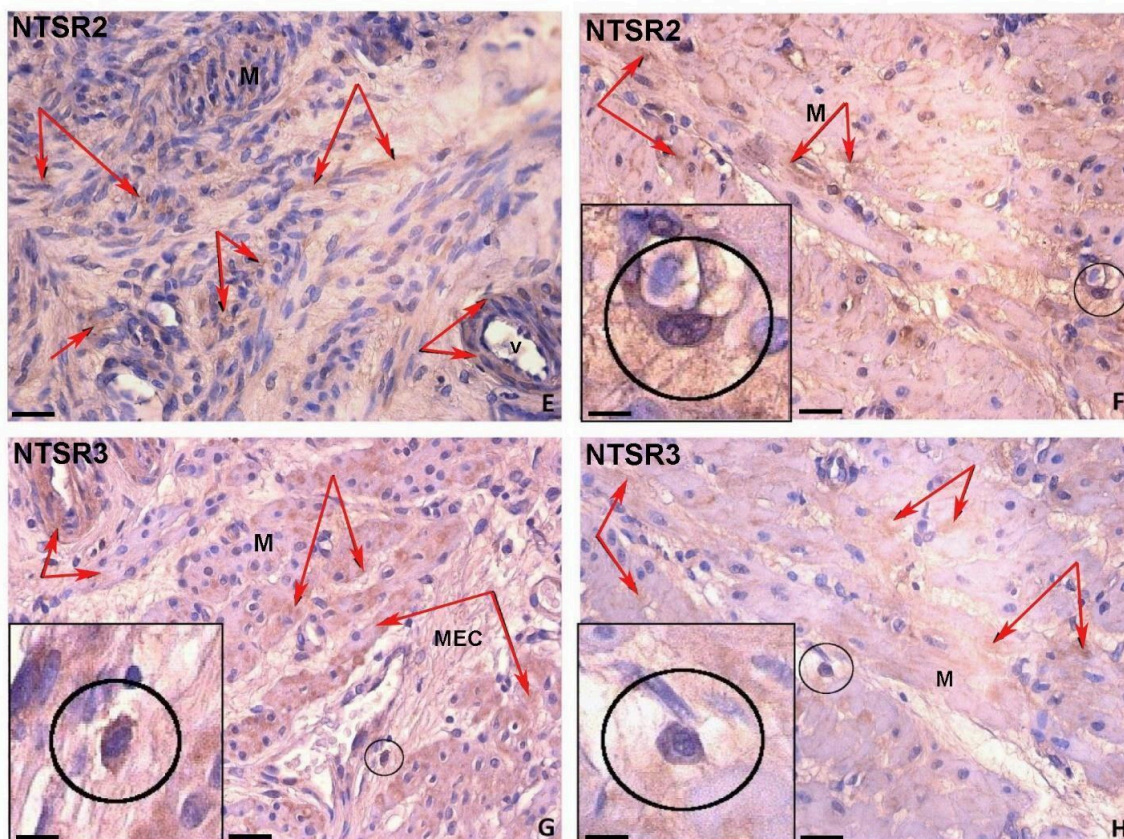


Figura 6. Distribución de los receptores NTSR2 y NTSR3 en miometrio (E,G) y leiomioma (F,H) de pacientes control. Técnica de inmunoperoxidasa indirecta. Las flechas rojas señalan células musculares NTSR2-ir y NTSR3-ir tanto en el miometrio (E y G) como en el leiomioma (F y H). El inserto en la imagen F, señala en detalle la presencia de una célula NTSR2 fuertemente en el tejido conjuntivo leiomiomatoso. Los insertos en las imágenes G y H señalan también células NTSR3 fuertemente presentes en el tejido conjuntivo tanto del miometrio (G) como del leiomioma (H). Por su morfología y las características del marcaje, es probable que se trate de células cebadas. . M: músculo liso; MEC: matriz extracelular; v: vaso sanguíneo. Barras de escala: (E-H): 30 μ m; insertos imágenes F,G y H: 10 μ m.

- *Pacientes tratadas con UPA (NTSR2 y NTSR3)*

Células NTSR2 y NTSR3 inmunorreactivas se observaron de forma predominante, en el tejido muscular, tanto en el miometrio como en el LM, con una distribución citoplásmica. También se observó una débil inmunorreacción para ambos receptores en el tejido conjuntivo (Figura 7). No se observaron diferencias entre las pacientes control y las tratadas con UPA.

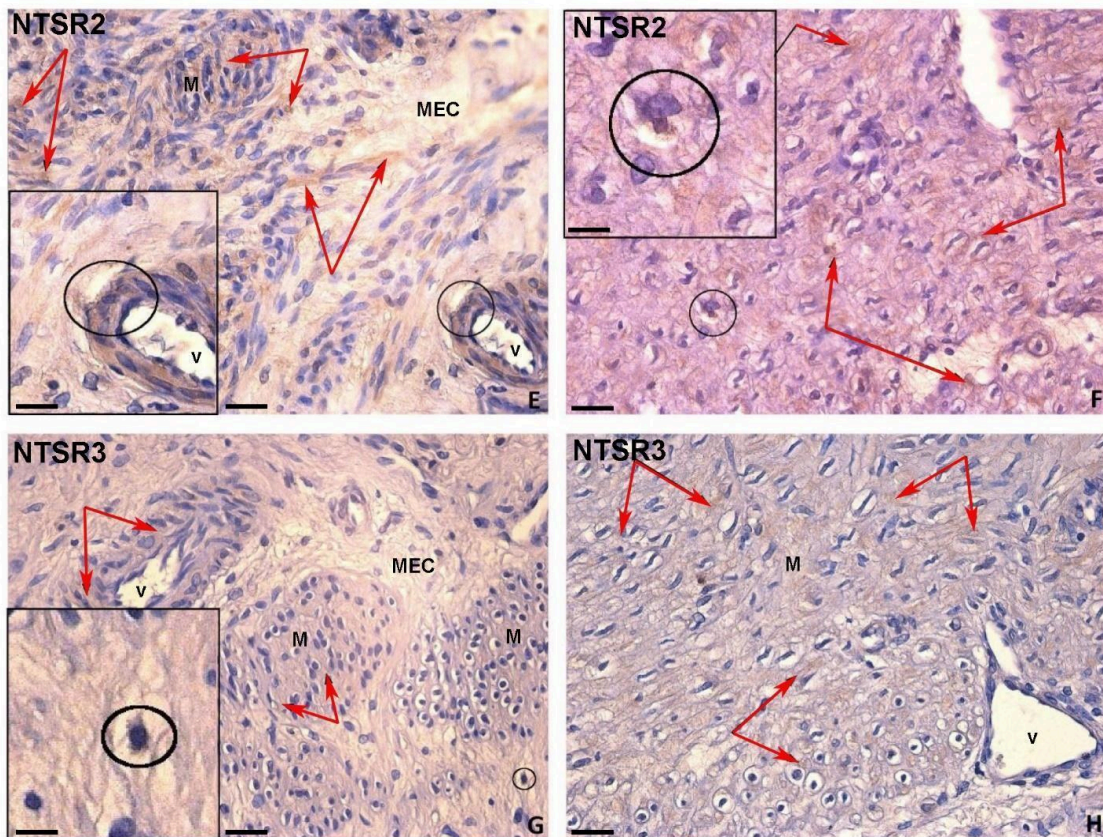


Figura 7. Distribución de los receptores NTSR2 y NTSR3 en miometrio (E,G) y leiomioma (F,H) de pacientes tratadas con UPA. Técnica de inmunoperoxidasa indirecta. Las flechas rojas señalan células musculares NTSR2-ir y NTSR3-ir tanto en el miometrio (E y G) como en el leiomioma (F y H). El inserto en la imagen E, muestra una intensa inmunorreacción para NTSR2 en las células del músculo liso vascular. El inserto en la imagen F señala una célula leiomiomatosa NTSR2 fuertemente marcada. El inserto en la imagen G señala en detalle la presencia de una célula NTSR3-ir en el tejido conjuntivo miometrial. M: músculo liso; MEC: matriz extracelular; v: vaso sanguíneo. Barras de escala: (E-H) 40 μ m; insertos imágenes E,F y G: 15 μ m.

Es la primera vez que se describe la presencia de los receptores NTSR2 y NTSR3 en miometrio y LM. Nuestros resultados muestran que el receptor NTSR2 se distribuye de manera similar al NTSR3 tanto en el tejido sano como en el tejido leiomiomatoso. Saada et al., (2012) detectaron la presencia de NTSR2 en líneas de células B humanas y células B periféricas de pacientes con leucemia linfocítica crónica y linfoma difuso de células B. Se encontró que NTSR2 estaba sobreexpresado en células B tumorales en ambas neoplasias, con diferencias en su nivel de expresión entre ganglios linfáticos tumorales y normales. Se ha confirmado además que la activación de NTSR2 no involucra a la NTS, sino que NTSR2 sobreexpresado promueve la supervivencia celular y la resistencia a la apoptosis en presencia del ligando del receptor de

tirosina quinasa B (TrkB), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (Saada et al., 2012; Yang et al., 2024).

Actualmente, la mayoría de los estudios relacionados con NTSR2 se centran en las características de su expresión, y solo se ha confirmado completamente una vía de señalización activada por este receptor en el linfoma difuso de células B (Yang et al., 2024).

NTSR3, sin embargo, ha sido más estudiado a nivel celular, desde su traducción hasta su destino en la membrana plasmática. Se ha descrito que NTSR3 está asociado a la membrana en el retículo endoplásmico, la red trans-Golgi y finalmente en la membrana plasmática después de su transporte en vesículas. Se ha indicado que solo el 10% de la proteína está asociada a la membrana plasmática, mientras que el 90% restante permanece de manera intracelular. NTSR3 puede ser liberado hacia la matriz por exosomas (Mazella, 2022). Ello explica la distribución encontrada en este trabajo, con un predominio en el citoplasma de las células musculares y de las presuntas células cebadas.

El receptor NTSR3 juega un papel crucial en el cáncer, especialmente en el cáncer colorrectal (CCR), tanto en su forma asociada a membrana como en su forma soluble. Su sobreexpresión en el CCR se asocia con resistencia al 5-fluorouracilo (5-FU) y un mal pronóstico. A nivel de la membrana, Sortilina/NTSR3 puede inducir proliferación celular al asociarse con los receptores de neurotrofinas TrkA/B/C, o muerte celular al asociarse con p75NTR. La forma soluble del NTSR3 se libera tras la activación de la PKC y puede participar en varias vías de señalización, incluida la activación de PKC α . Esto, contribuye a la autorregulación de la proteína en células HT29, afectando la proliferación y diseminación celular (Mazella, 2022).

Teniendo en cuenta las acciones e implicaciones descritas para ambos receptores, NTSR2 y NTSR3, en leucemia linfocítica crónica, linfoma difuso de células B y en CRC, su presencia en leiomiomas uterinos sugiere también una posible implicación de ambos en el origen y evolución de estos tumores, haciendo necesarios más y más detallados estudios para profundizar en sus acciones a nivel celular y molecular, tanto en las células del músculo liso uterino como en las del tejido conjuntivo.

3. Caracterización de las poblaciones celulares que expresan NTS y sus receptores NTSR1, NTSR2 y NTSR3 en miometrio y leiomioma de pacientes control y tratadas con UPA.

Con el fin de caracterizar las diferentes poblaciones celulares inmunorreactivas para NTS y sus receptores, se utilizaron anticuerpos contra la desmina (DES) presente en células de músculo liso y la vimentina (VIM) para marcar células de conjuntivo. Los dobles marcajes mostraron la colocalización de NTS con VIM en el miometrio (Figura 8-A), mientras que en el LM colocalizó tanto con VIM como con DES (Figura 8-B,C). Con respecto a los receptores, tanto el NTSR1 como el NTSR3 colocalizaron con ambos marcadores, DES y VIM, tanto en el miometrio como en el LM (Figura 8-D,E y Figura 8-G,H), mientras que el NTSR2 mostró colocalización únicamente con DES en el miometrio y en el LM (Figura 8-F). No se observaron diferencias en cuanto a colocalización entre pacientes control y tratadas con UPA.

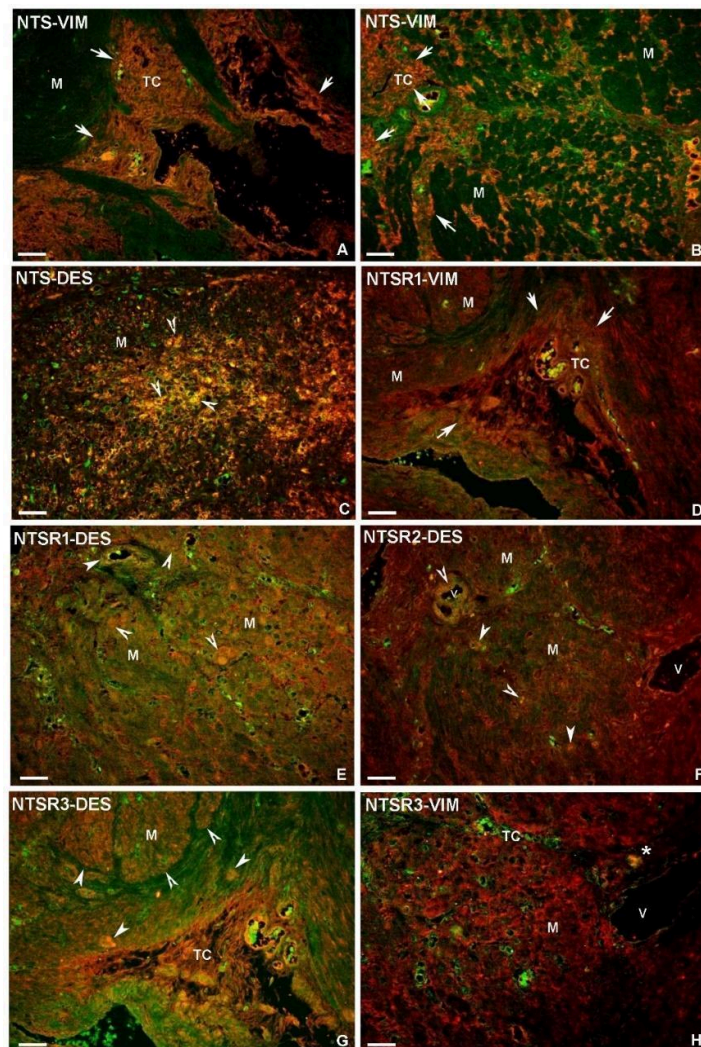


Figura 8. Caracterización de las poblaciones celulares NST-ir y NTSRs-ir. Técnica de doble marcaje inmunofluorescente: NTS y NTSRs (marcaje en rojo) desmina (DES) y vimentina (VIM) (marcaje en verde). Imágenes representativas de miometrio y leiomioma de pacientes control que muestran la presencia de doble marcaje NTS-ir, NTSR1-ir, NTSR2-ir y NTSR3-ir con desmina y con vimentina. En la imagen A que corresponde a miometrio, las flechas blancas señalan una zona correspondiente al tejido conjuntivo doblemente marcada mientras que el resto de las imágenes corresponden a leiomioma. En ellas se señalan con flechas las zonas doblemente marcadas correspondientes al tejido conjuntivo, mientras que las células musculares doblemente marcadas con DES o VIM se señalan con puntas de flecha. M: músculo liso; TC: tejido conjuntivo; v: vaso sanguíneo. Barra de escala: (A-H) 70µm.

CONCLUSIONES

Del presente trabajo se han extraído las siguientes conclusiones:

1. Células NTS-ir estuvieron presentes en el tejido conjuntivo del miometrio, mientras que se observaron tanto en el tejido conjuntivo como en el músculo liso del leiomioma. En el miometrio las células NTS-ir también fueron VIM-ir mientras que en el leiomioma las células NTS-ir fueron tanto VIM-ir como DES-ir.
2. NTSR1-ir estuvo presente en células del tejido conjuntivo y del músculo liso tanto en el miometrio como en el tejido leiomiomatoso. En ambos casos colocalizó con DES y VIM.
3. Por primera vez se ha puesto de manifiesto la presencia y caracterización celular de NTSR2-ir y NTSR3-ir en tejido miometrial y leiomiomatoso.
4. NTSR2-ir solo estuvo presente en células musculares tanto del miometrio como del leiomioma. La doble inmunofluorescencia solo mostró colocalización con DES en ambos casos.
5. NTSR3-ir estuvo presente en el tejido conjuntivo y el músculo liso tanto en el miometrio como en el tejido leiomiomatoso. En ambos casos colocalizó con DES y VIM.
6. El NTSR1 y el NTSR3 mostraron una distribución similar tanto en miometrio como en leiomioma.
7. No se observaron diferencias, con ninguno de los anticuerpos utilizados, entre las muestras control y las de pacientes tratadas con UPA
8. La presencia de NTS y sus receptores NTSR1, NTSR2, NTSR3 tanto en células de leiomioma como de miometrio adyacente, no parece depender de la progesterona.

CONCLUSIONS

The following conclusions have been drawn from this work:

1. NTS-ir cells were present in the connective tissue of the myometrium, while they were observed in both the connective tissue and smooth muscle of the leiomyoma. In the myometrium, NTS-ir cells were also VIM-ir, whereas in the leiomyoma, NTS-ir cells were both VIM-ir and DES-ir.
2. NTSR1-ir was present in cells of the connective tissue and smooth muscle in both the myometrium and leiomyoma tissue. In both cases, it colocalized with DES and VIM.
3. For the first time, the presence and cellular characterization of NTSR2-ir and NTSR3-ir in myometrial and leiomyoma tissue have been demonstrated.
4. NTSR2-ir was only present in muscle cells of both the myometrium and leiomyoma. Double immunofluorescence showed colocalization only with DES in both cases.
5. NTSR3-ir was present in connective tissue and smooth muscle in both the myometrium and leiomyoma tissue. In both cases, it colocalized with DES and VIM.
6. NTSR1 and NTSR3 showed similar distribution in both the myometrium and leiomyoma.
7. No differences were observed, with any of the antibodies used, between the control samples and those from patients treated with UPA.
8. The presence of NTS and its receptors NTSR1, NTSR2, and NTSR3 in both leiomyoma cells and adjacent myometrium does not appear to depend on progesterone.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alali, O. M., & Churnosov, M. I. (2023). The etiopathogenesis of uterine leiomyomas: A review. *Gynecology*, 25(1), 22-30.
2. Alifano, M., Souazé, F., Dupouy, S., Camilleri-Broët, S., Younes, M., Ahmed-Zaïd, S. M., Takahashi, T., Cancellieri, A., Damiani, S., Boaron, M., Broët, P., Miller, L. D., Gespach, C., Regnard, J. F., & Forgez, P. (2010). Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(17), 4401–4410.
3. Ali, M., Bariani, M. V., Vafaei, S., Omran, M. M., Yang, Q., Madueke-Laveaux, O. S., & Al-Hendy, A. (2023). Prevention of uterine fibroids: Molecular mechanisms and potential clinical application. *Journal of endometriosis and uterine disorders*, 1, 100018.
4. Ali, M., & Al-Hendy, A. (2017). Selective progesterone receptor modulators for fertility preservation in women with symptomatic uterine fibroids. *Biology of reproduction*, 97(3), 337-352.

5. Andersen, J., & Barbieri, R. L. (1995). Abnormal gene expression in uterine leiomyomas. *The Journal of the Society for Gynecologic Investigation: JSGI*, 2(5), 663-672.
6. Armstrong, M. J., Parker, M. C., Ferris, C. F., & Leeman, S. E. (1986). Neurotensin stimulates [3H] oleic acid translocation across rat small intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 251(6), G823-G829.
7. Baird, D. D., Dunson, D. B., Hill, M. C., Cousins, D., & Schectman, J. M. (2003). High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. *American journal of obstetrics and gynecology*, 188(1), 100-107.
8. Bello, A. R., Dubourg, P., Kah, O., & Tramu, G. (1992). Identification of neurotensin-immunoreactive cells in the anterior pituitary of normal and castrated rats. A double immunocytochemical investigation at the light-and electron-microscopic levels. *Neuroendocrinology*, 55(6), 714-723.
9. Bello, A. R., Hernández, G., González, M., Reyes, R., Negrín, I., Marrero, A., Sánchez-Criado, J. E., Tramu, G., & Alonso, R. (1999). Immunoreactive neurotensin in gonadotrophs and thyrotrophs is regulated by sex steroid hormones in the female rat. *Journal of neuroendocrinology*, 11(10), 785-794.
10. Bello, A. R., Reyes, R., Hernández, G., Negrín, I., González, M., Tramu, G., & Alonso, R. (2004). Developmental expression of neurotensin in thyrotropes and gonadotropes of male and female rats. *Neuroendocrinology*, 79(2), 90-99.
11. Benedicto Marrero, C. (2021). Inflamación miometrial y desarrollo de leiomiomas uterinos.
12. Bulun S. E. (2013). Uterine fibroids. *The New England journal of medicine*, 369(14), 1344-1355.
13. Carraway, R., & Leeman, S. E. (1973). The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *Journal of Biological Chemistry*, 248(19), 6854-6861.
14. Christou, N., Blondy, S., David, V., Verdier, M., Lalloué, F., Jauberteau, M. O., Mathonnet, M., & Perraud, A. (2020). Neurotensin pathway in digestive cancers and clinical applications: an overview. *Cell death & disease*, 11(12), 1027.
15. De Milliano, I., Van Hattum, D., Ket, J. C., Huirne, J. A., & Hehenkamp, W. J. (2017). Endometrial changes during ulipristal acetate use: a systematic review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 214, 56-64.
16. Dupouy, S., Mourra, N., Gompel, A., Alifano, M., & Forgez, P. (2011). The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. *Biochimie*, 93(9), 1369-1378.
17. Ellulu, M. S., Patimah, I., Khaza'ai, H., Rahmat, A., & Abed, Y. (2017). Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Archives of medical science: AMS*, 13(4), 851-863.
18. Flake, G. P., Moore, A. B., Sutton, D., Flagler, N., Clayton, N., Kissling, G. E., Hall, B. W., Horton, J., Walmer, D., Robboy, S. J., & Dixon, D. (2018). The Life Cycle of the Uterine Fibroid Myocyte. *Current obstetrics and gynecology reports*, 7(2), 97-105.
19. Gainer, E. E., & Ulmann, A. (2003). Pharmacologic properties of CDB (VA)-2914. *Steroids*, 68(10-13), 1005-1011.
20. Giuliani, E., As-Sanie, S., & Marsh, E. E. (2020). Epidemiology and management of uterine fibroids. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 149(1), 3-9.
21. González-Gómez, M., Reyes, R., Damas-Hernández, M. D. C., Plasencia-Cruz, X., González-Marrero, I., Alonso, R., & Bello, A. R. (2023). NTS, NTSR1 and ERs in the Pituitary-Gonadal Axis of Cycling and Postnatal Female Rats after BPA Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7418.
22. Greathouse, K. L., Bredfeldt, T., Everitt, J. I., Lin, K., Berry, T., Kannan, K., Mittelstadt, M. L., Ho, S. M., & Walker, C. L. (2012). Environmental estrogens differentially engage the histone methyltransferase EZH2 to increase risk of uterine tumorigenesis. *Molecular cancer research : MCR*, 10(4), 546-557.
23. Guntupalli, S. R., Ramirez, P. T., Anderson, M. L., Milam, M. R., Bodurka, D. C., & Malpica, A. (2009). Uterine smooth muscle tumor of uncertain malignant potential: a retrospective analysis. *Gynecologic oncology*, 113(3), 324-326.
24. Islam, M. S., Protic, O., Stortoni, P., Grechi, G., Lamanna, P., Petraglia, F., Castellucci, M., & Ciarmela, P. (2013). Complex networks of multiple factors in the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Fertility and sterility*, 100(1), 178-193.

25. Katon, J. G., Plowden, T. C., & Marsh, E. E. (2023). Racial disparities in uterine fibroids and endometriosis: a systematic review and application of social, structural, and political context. *Fertility and sterility*, 119(3), 355-363.
26. Kislauskis, E., Bullock, B., McNeil, S., & Dobner, P. R. (1988). The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression, and evolution of exon sequences. *Journal of Biological Chemistry*, 263(10), 4963-4968.
27. Laughlin, S. K., Schroeder, J. C., & Baird, D. D. (2010). New directions in the epidemiology of uterine fibroids. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 28, No. 03, pp. 204-217). Published in 2010 by Thieme Medical Publishers.
28. Lewis, T. D., Malik, M., Britten, J., San Pablo, A. M., & Catherino, W. H. (2018). A comprehensive review of the pharmacologic management of uterine leiomyoma. *BioMed research international*, 2018(1), 2414609.
29. Liu, J. H., Soper, D., Lukes, A., Gee, P., Kimble, T., Kroll, R., Mallick, M., Chan, A., Gillard, P., Harrington, A., Sniukiene, V., & Shulman, L. P. (2018). Ulipristal Acetate for Treatment of Uterine Leiomyomas: A Randomized Controlled Trial. *Obstetrics and gynecology*, 132(5), 1241–1251.
30. Machado-Lopez, A., Simón, C., & Mas, A. (2021). Molecular and cellular insights into the development of uterine fibroids. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 8483.
31. Mathew, R. P., Francis, S., Jayaram, V., & Anvarsadath, S. (2021). Uterine leiomyomas revisited with review of literature. *Abdominal Radiology*, 46(10), 4908-4926.
32. Mazella J. (2022). Deciphering Mechanisms of Action of Sortilin/Neurotensin Receptor-3 in the Proliferation Regulation of Colorectal and Other Cancers. *International journal of molecular sciences*, 23(19), 11888.
33. Mazella, J., & Vincent, J. P. (2006). Functional roles of the NTS2 and NTS3 receptors. *Peptides*, 27(10), 2469-2475.
34. Mesa Provecho, E. (2020). Estudio cualitativo y cuantitativo de la matriz extracelular de leiomioma y miometrio: efecto del tratamiento con acetato de Ulipristal.
35. Nikolaou, S., Qiu, S., Fiorentino, F., Simillis, C., Rasheed, S., Tekkis, P., & Kontovounisios, C. (2020). The role of neurotensin and its receptors in non-gastrointestinal cancers: A review. *Cell Communication and Signaling*, 18, 1-10.
36. Rafique, S., Segars, J. H., & Leppert, P. C. (2017). Mechanical signaling and extracellular matrix in uterine fibroids. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 35, No. 06, pp. 487-493). Thieme Medical Publishers.
37. Rein, M. S. (2000). Advances in uterine leiomyoma research: the progesterone hypothesis. *Environmental health perspectives*, 791-793.
38. Rodríguez, Y., Almeida, T. A., Valladares, F., Báez, D., Montes de Oca, F., García, C., Dorta, I., Hernández, M., Reyes, R., & Bello, A. R. (2010). Neurotensin and neurotensin receptor 1 expression in human myometrium and uterine leiomyomas. *Biology of reproduction*, 83(4), 641–647.
39. Rodríguez, Y., Báez, D., de Oca, F. M., García, C., Dorta, I., Reyes, R., Valladares, F., Almeida, T. A., & Bello, A. R. (2011). Comparative analysis of the ER α /ER β ratio and neurotensin and its high-affinity receptor in myometrium, uterine leiomyoma, atypical leiomyoma, and leiomyosarcoma. *International journal of gynecological pathology: official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 30(4), 354–363.
40. Saada, S., Marget, P., Fauchais, A. L., Lise, M. C., Chemin, G., Sindou, P., Martel, C., Delpy, L., Vidal, E., Jaccard, A., Troutaud, D., Lalloué, F., & Jauberteau, M. O. (2012). Differential expression of neurotensin and specific receptors, NTSR1 and NTSR2, in normal and malignant human B lymphocytes. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 189(11), 5293–5303.
41. Salas, A., Vázquez, P., Bello, A. R., Báez, D., & Almeida, T. A. (2021). Dual agonist-antagonist effect of ulipristal acetate in human endometrium and myometrium. *Expert review of molecular diagnostics*, 21(8), 851–857.
42. Shin, S. J., Kim, J., Lee, S., Baek, J., Lee, J. E., Cho, C., & Ha, E. (2018). Ulipristal acetate induces cell cycle delay and remodeling of extracellular matrix. *International journal of molecular medicine*, 42(4), 1857–1864.

43. Singh, A., Tripathi, D., Singh, P., & Agrawal, S. (2023). Histopathological evaluation of abnormal uterine bleeding with immunohistochemical study of significant estrogen receptor expression in endometrium of women with different age groups. *Int J Res Med Sci*, 11(5), 1769-1774.
44. Stewart, E. A., Friedman, A. J., Peck, K., & Nowak, R. A. (1994). Relative overexpression of collagen type I and collagen type III messenger ribonucleic acids by uterine leiomyomas during the proliferative phase of the menstrual cycle. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 79(3), 900–906.
45. Stewart, E. A., Laughlin-Tommaso, S. K., Catherino, W. H., Lalitkumar, S., Gupta, D., & Vollenhoven, B. (2016). Uterine fibroids. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16043.
46. Styer, A. K., & Rueda, B. R. (2016). The epidemiology and genetics of uterine leiomyoma. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 34, 3-12.
47. Tschumi, C. W., & Beckstead, M. J. (2019). Diverse actions of the modulatory peptide neurotensin on central synaptic transmission. *European Journal of Neuroscience*, 49(6), 784-793.
48. Velez Edwards, D. R., Baird, D. D., & Hartmann, K. E. (2013). Association of age at menarche with increasing number of fibroids in a cohort of women who underwent standardized ultrasound assessment. *American journal of epidemiology*, 178(3), 426-433.
49. Yang, Y., Zhang, W., Wei, K., Hu, F., Wu, S., Ma, Y., & Ouyang, Q. (2024). Physiological and Pathological Roles of NTSR2 in Several Organs and Diseases (Review). *Protein and peptide letters*, 31(1), 3–10.
50. Yang, Q., Ciebiera, M., Bariani, M. V., Ali, M., Elkafas, H., Boyer, T. G., & Al-Hendy, A. (2022). Comprehensive review of uterine fibroids: developmental origin, pathogenesis, and treatment. *Endocrine reviews*, 43(4), 678-719.
51. Yin, P., Lin, Z., Cheng, Y. H., Marsh, E. E., Utsunomiya, H., Ishikawa, H., Xue, Q., Reierstad, S., Innes, J., Thung, S., Kim, J. J., Xu, E., & Bulun, S. E. (2007). Progesterone receptor regulates Bcl-2 gene expression through direct binding to its promoter region in uterine leiomyoma cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92(11), 4459-4466.
52. Yordanov, A., Tantchev, L., Vasileva, P., Strashilov, S., Vasileva-Slaveva, M., & Konsoulova, A. (2020). Uterine smooth muscle tumours of uncertain malignant potential: Single-centre experience and review of the literature. *Menopause Review/Przegląd Menopauzalny*, 19(1), 30-34.
53. Zhang, L., Feng, Q., Wang, Z., Liu, P., & Cui, S. (2019). Progesterone receptor antagonist provides palliative effects for uterine leiomyoma through a Bcl-2/Beclin1-dependent mechanism. *Bioscience reports*, 39(7), BSR20190094.
54. Zhao, D., & Pothoulakis, C. (2006). Effects of NT on gastrointestinal motility and secretion, and role in intestinal inflammation. *Peptides*, 27(10), 2434-2444.