Curso 2012/13
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/49
I.S.B.N.: 978-84-15939-25-2

YURENA RODRÍGUEZ DÍAZ

Tumores uterinos de músculo liso con distinto comportamiento clínico. Interacciones entre hormonas gonadales y péptidos en su desarrollo y caracterización

Directoras
AIXA C. RODRÍGUEZ BELLO
DELIA R. BÁEZ QUINTANA

SERVICIO DE PUBLICACIONES
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

AGRADECIMIENTOS

Me resulta muy difícil reflejar con palabras la gratitud que siento hacia todas esas personas que de un modo u otro me han ayudado a lo largo de estos años. Tampoco es tarea fácil resumir sus contribuciones en unas pocas líneas y que de ellas se desprenda la relevancia que se merecen. Para todos ellos, – familia, docentes, amigos y compañeros -, mi más sincera gratitud.

A mis padres, por su incondicional apoyo y cariño, y, sobre todo, por saber darme fuerzas para continuar hasta el final.

A la Dra. Aixa R. Bello, por aceptarme en su equipo y permitirme dar mis primeros pasos en el mundo de la ciencia, por su honestidad y buen hacer y porque, independientemente de la naturaleza de los contratiempos surgidos, siempre he podido contar con ella.

A la Dra. Delia Báez, por su mediación para las becas, por su buen humor y mejor disposición, y por lo mucho que me ha animado siempre.

Al Dr. Francisco Valladares, por su ayuda incondicional y por recordarme que la ciencia está muy bien, pero no por ello hay que abandonar la música.

Al Dr. Francisco Montes de Oca, por su inestimable colaboración en la obtención de muestras y la recopilación de los datos estadísticos.

A la Dra. Candelaria García, por su importante labor en la unificación del criterio diagnóstico de las muestras utilizadas.

A la Dra. Carmen Damas por ayudarme con el procesamiento estadístico y por su eterna amabilidad.

A la Dra. Teresa Almeida y a todo el equipo de genética por su ayuda con las técnicas moleculares.

Al Profesor Armando Aguirre, por guiarme en la metodología del estudio de casos – controles, por todo el tiempo que me dedicó con paciencia y por su apoyo.

Al Dr. Ricardo Reyes, por su ayuda en el laboratorio, por compartir conmigo sus conocimientos y sobre todo, por su amistad.

A Dª Idaira Dorta, por su inestimable ayuda en el laboratorio, por el "ratito del café" y por su alegría contagiosa.

A todos los compañeros de la UDI de Biología, Maritina y Teresa, Moisés, Elena, Miriam, Fernando, Nicanor, Jose… por sus continuas muestras de apoyo y afecto.

A Wen, por su sonrisa.

Índice

Introducción 13

1. MIOMETRIO. NEOPLASIAS DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO MIOMETRIAL. 15

2. ESTRÓGENOS EN MIOMETRIO Y SUS NEOPLASIAS 25

3. PÉTIDOS Y NEOPLASIAS 31

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS 36

Material y métodos 41

1. MATERIAL 43

2. MÉTODOS 47

2.1.ESTUDIO DE MUESTRAS. 47

2.1.1. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS 47

2.1.2. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA MICROSCOPÍA ÓPTICA 49

2.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARNm-*NTS* MEDIANTE HIBRIDACIÓN IN SITU NO RADIACTIVA 52

2.3. OBTENCIÓN Y ESTUDIO DE LAS IMÁGENES 56

2.3.1. ANÁLISIS CUANTITATIVO 56

2.3.2. ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO 58

2.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARNm-*NTSR1* POR RT-PCR 58

2.4.1. EXTRACCIÓN DE ARNm 59

2.4.2. DETECCIÓN Y ANÁLISIS DE PRODUCTOS PCR 60

2.5. PROCESAMIENTO DE DATOS PARA EL ESTUDIO CASOS – CONTROLES DE FACTORES ASOCIADOS A LAS HORMONAS ESTEROIDEAS EN RELACIÓN A LOS LEIOMIOMAS 61

Resultados 63

1. DISTRIBUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN CELULAR DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS α Y β EN TUMORES UTERINOS DE MIOMETRIO EN RELACIÓN AL MIOMETRIO SANO. 65

1.1. RECEPTOR DE ESTRÓGENO ALFA 66

1.2. RECEPTOR DE ESTRÓGENO BETA 69

1.3. ESTUDIO CUANTITATIVO. RATIO REα/REβ en M, LM, LA y LMS 74

2. DETECCIÓN DE INMUNORREACTIVIDAD PARA LA ENZIMA AROMATASA Y EL FACTOR DE PROLIFERACIÓN Ki-67. CORRELACIÓN CON EL RATIO REα/REβ 76

2.1. ENZIMA AROMATASA 76

2.2. FACTOR DE PROLIFERACIÓN Ki-67 78

3. DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL PÉPTIDO NEUROTENSINA EN LM, LA Y LMS EN RELACIÓN AL MIOMETRIO SANO. 80

3.1 PÉPTIDO NTS 80

3.2. COLOCALIZACIÓN DEL PÉPTIDO NTS CON LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS EN LM, LA Y LMS 82

3.3. ESTUDIO CUANTITATIVO COMPARADO DE LAS CÉLULAS INMUNORREACTIVAS PARA NTS EN LMs PROCEDENTES DE MUJERES EN CONDICIONES HORMONALES NORMALES Y EN LMs PROCEDENTES DE MUJERES SOMETIDAS A PROCESOS DE FERTILIZACIÓN IN VITRO 84

4. DETECCIÓN DEL ARNm-*NTS* *85*

5. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE NEUROTENSINA DE ALTA AFINIDAD NTSR1..... 86

5.1 DETECCIÓN DE NTSR1-IR. 86

5.2. COLOCALIZACIÓN NTS-NTSR1 89

5.3 EXPRESIÓN DE ARNm*NTSR1* POR RT-PCR 91

6. ESTUDIO CASOS-CONTROLES DE ASOCIACIÓN DE FACTORES HORMONALES CON LEIOMIOMAS SINTOMÁTICOS..... 93

6.1. COMPARACIÓN SIMPLE ENTRE CASOS Y CONTROLES 93

6.2. ANÁLISIS DE REGRESIÓN 96

Discusión 101

1. RECEPTORES DE ESTRÓGENOS EN NEOPLASIAS DE MIOMETRIO: LM, LA Y LMS EN RELACIÓN AL MIOMETRIO SANO 104

2. EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO NEUROTENSINA Y SU RELACIÓN CON LOS ESTRÓGENOS EN LM, LA Y LMS Vs M 114

3. ASOCIACIÓN DE DISTINTAS CONDICIONES ESTROGÉNICAS CON LA PRESENCIA DE MIOMAS 120

Conclusiones 124

Bibliografía 127

Publicaciones y congresos 145

INTRODUCCIÓN

Introducción

1. MIOMETRIO. NEOPLASIAS DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO MIOMETRIAL.

El útero es un órgano muscular hueco, impar y ubicado en la cavidad pelviana. En este órgano, se llevan a cabo la implantación del embrión y el mantenimiento, desarrollo y protección del feto durante el embarazo. El útero está revestido interiormente por una mucosa glandular llamada endometrio, estando constituida la parte más gruesa de la pared uterina por el miometrio. Finalmente, una membrana serosa recubre parcialmente su superficie. El endometrio es un epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado, sostenido por un estroma celular de tejido conjuntivo laxo que aloja numerosas glándulas tubulares simples. El miometrio está constituido por haces de fibras musculares lisas separadas por una cantidad variable de tejido conectivo. Aunque no están bien definidos, en el miometrio hay varios estratos de fibras musculares que varían en su disposición, siendo el estrato central más grueso, con fibras dispuestas de forma circular y abundantes vasos sanguíneos. La serosa peritoneal, es la capa más externa y está formada por conjuntivo laxo y un epitelio plano o mesotelio (FIG.1).

Los tejidos que constituyen el útero, al igual que los restantes tejidos del aparato reproductor femenino, son sensibles a los esteroides gonadales, estrógenos y progesterona, teniendo ambas hormonas un papel crucial en la regulación de la fisiología tanto normal como patológica de dichos tejidos. Así, el desequilibrio en la regulación de estas hormonas puede tener efecto sobre la promoción y desarrollo de transformaciones tumorales en todos ellos (FIG.2).

En el útero son posibles transformaciones epiteliales, musculares o de tejido conjuntivo (FIG.2). Sin embargo, las neoplasias de músculo liso miometrial son las más comunes de este órgano, además de constituir las neoplasias ginecológicas más frecuentes.

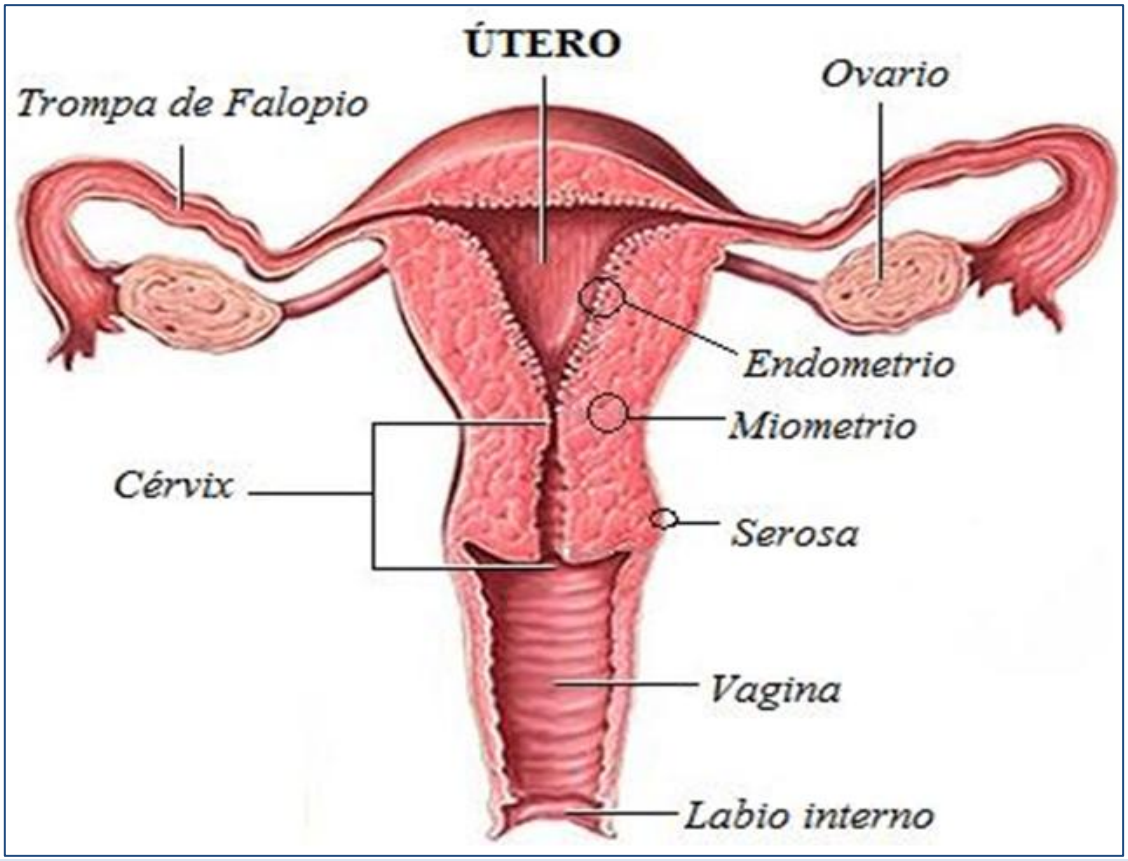


FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL ÚTERO. TOMADO DE CLÍNICA DAM.COM

La mayoría de estas formaciones tumorales constituyen tumores benignos denominados **leiomiomas (LM)**, considerados como leiomiomas típicos, mientras que menos de un 1% corresponde a **leiomiosarcomas (LMS)** o tumores malignos de miometrio (Walker y Stewart, 2005; Evans y Brunsell, 2007; Yanai y cols., 2010).

La clasificación de las distintas neoplasias del miometrio está basada en la presencia de atipias, el índice mitótico y necrosis celular coagulativa, dando lugar a una clasificación más extensa. Así, además de los leiomiomas típicos, existe un número de variantes de los mismos, que

incluye leiomiomas mitóticamente activos, leiomiomas celulares y leiomiomas atípicos. Para todas estas variantes se ha considerado, al carecer de necrosis coagulativa, el mismo comportamiento clínico que los leiomiomas típicos, es decir, benignos (Bell y cols., 1994; Wilkinson y Rollanson, 2001). Por otro lado, se consideran tumores malignos de músculo liso o leiomiosarcomas, aquellos en los que se dan al menos dos de las características citadas, siendo decisiva para el diagnóstico la presencia de necrosis. Los tumores con potencial de malignidad incierto (STUMP) aún constituyen otro grupo pobremente definido de tumores de miometrio, al que pertenecen todos aquellos que no presentan características de ninguno de los tipos descritos, y por lo tanto, no es segura su clasificación como benignos o malignos (Guntupalli y cols., 2009).

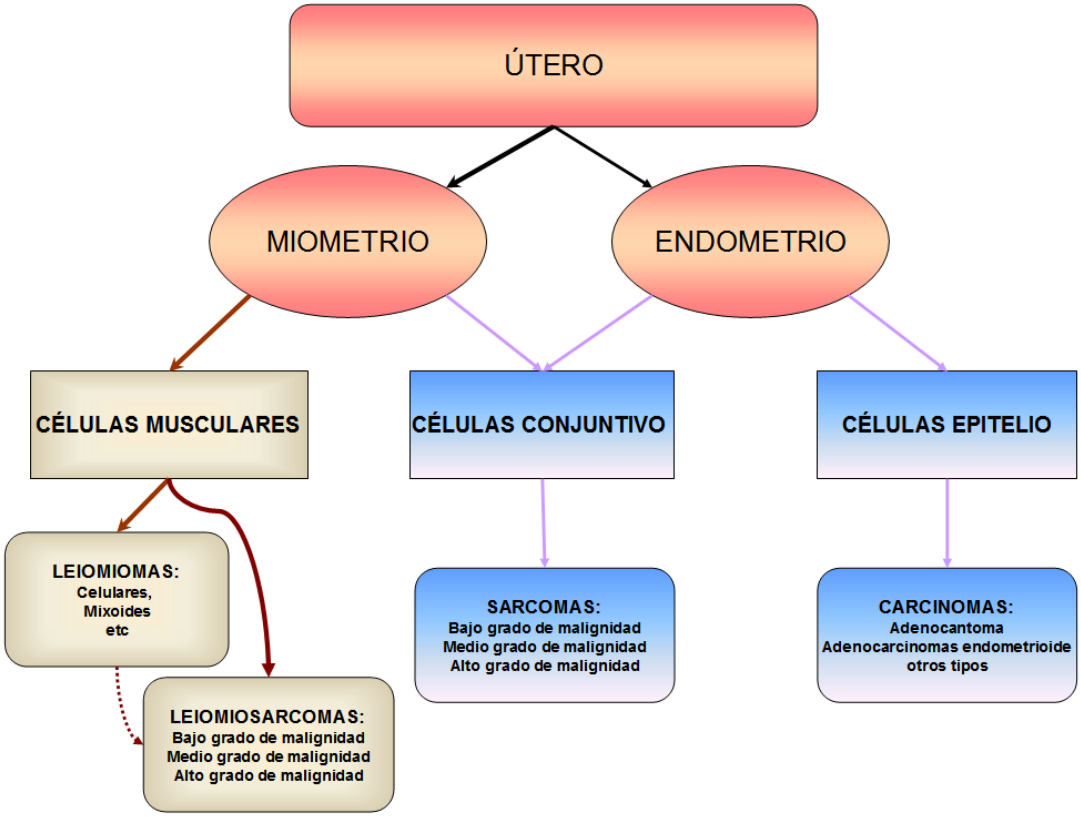


FIGURA 2. TUMORES UTERINOS FRECUENTES, EN FUNCIÓN DE LA ESTIRPE CELULAR QUE LES DA ORIGEN.

Aunque se considera que la malignización de los LMs o sus variantes es escasa e improbable, estudios recientes realizados analizando retrospectivamente muestras de pacientes tratadas de LMS, han puesto de manifiesto que un número significativo de pacientes fallecidas por esta causa, habían sido diagnosticadas de alguna variante de leiomioma (Giuntoli y cols., 2007), lo que indica su probable malignización. Nuevos datos sobre la transformación de variantes de LM en LMS o de las características que presentan en común con los LMS, han sido mostrados recientemente (Yanai y cols., 2010; Taran y cols., 2010). Éstos y otros estudios (Sung y cols., 2009), han mostrado el potencial de malignización que presentan los **leiomiomas atípicos (LA)**, (también conocidos como "bizarros"), con células pleomórficas, bajo índice mitótico y necrosis no coagulativa, y celulares (leiomiomas con hipercelularidad) por su posible evolución a LMS. Por otro lado, tampoco se descarta la posibilidad de malignización de leiomiomas típicos. Así, un estudio realizado por Indraccolo en 2008, mostró como dos leiomiomas pequeños de una paciente se transformaron en LMS al llegar a la menopausia.

Las causas que originan los LMSs están aún por clarificar y aunque su frecuencia es escasa tienen un comportamiento clínico muy agresivo. Poseen una alta capacidad metastásica y elevada proporción de recurrencia, aunque el diagnóstico tenga lugar en las fases iniciales. Por el momento no se conoce si los LMS pueden desarrollarse desde un leiomioma preexistente (Singh y cols., 2006) o *de novo* a partir de la malignización de las células musculares del miometrio por lo que, los recientes hallazgos anteriormente expuestos, tienen un gran valor y permiten seguir profundizando en este interesante estudio sobre la posible malignización de, al menos, ciertos tipos de leiomiomas.

LEIOMIOMAS

Como hemos señalado anteriormente, los leiomiomas típicos constituyen la neoplasia más común del tracto genital femenino. A pesar de que son usados varios términos para caracterizarlos, (miofibroma, fibromioma, leiomiofibroma, leiomioma, fibroma o mioma, y que comúnmente son denominados fibromas), leiomioma es el término que más exactamente define esta neoplasia y que hace referencia a cualquier tumor benigno con origen en las células musculares lisas (Blake, 2007).

Los leiomiomas uterinos pueden crecer enteramente dentro del compartimiento miometrial, (leiomiomas intramurales), sobresalir de la superficie serosa del útero en la cavidad peritoneal, (leiomioma subseroso), o proyectar en la cavidad uterina, (leiomioma submucoso), (FIG. 3).

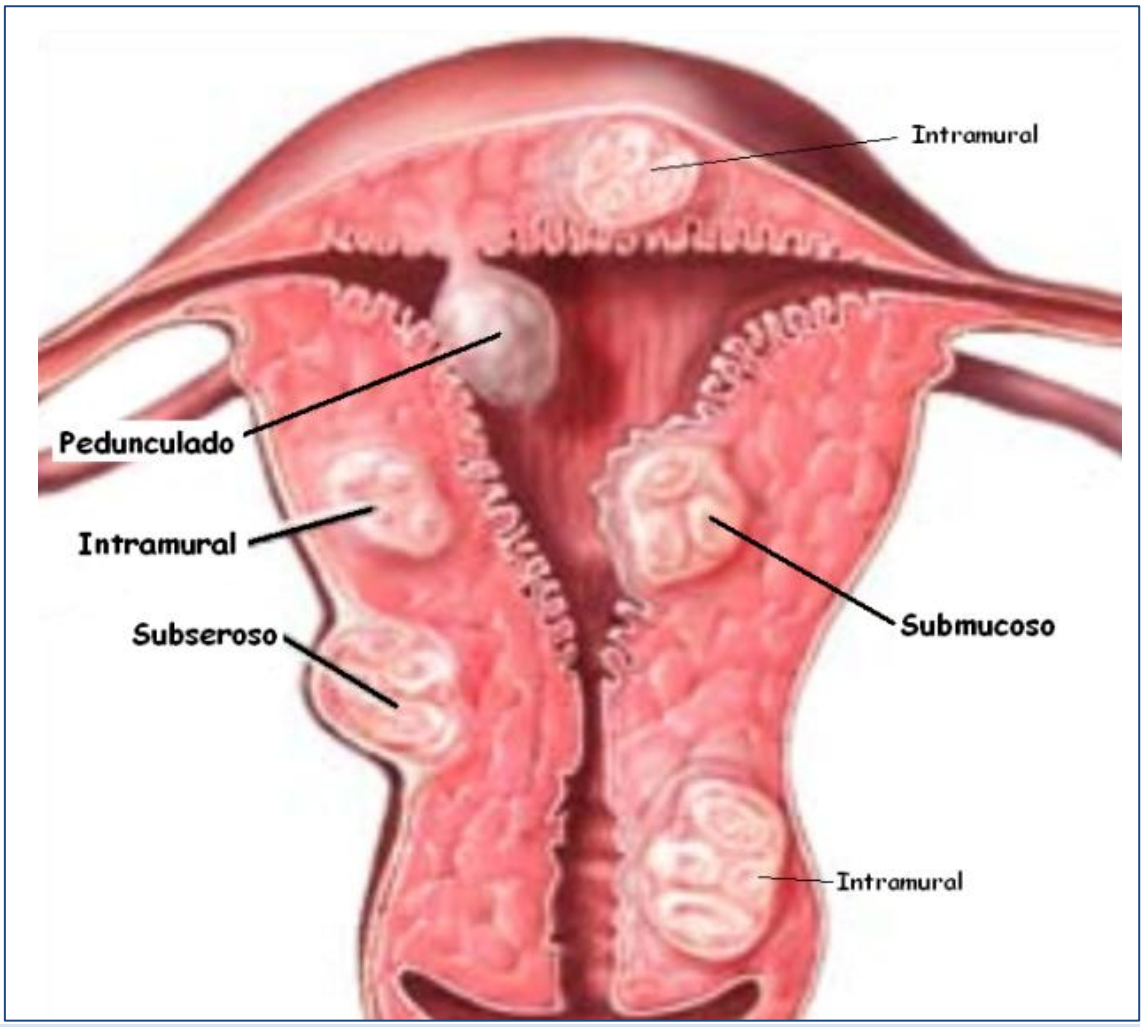


FIGURA 3. CLASIFICACIÓN DE LOS LEIOMIOMAS EN FUNCIÓN DE SU LOCALIZACIÓN ANATÓMICA. TOMADO DE CLÍNICA DAM.COM

Macroscópicamente, los leiomiomas son masas redondeadas bien circunscritas y seudoencapsuladas, de 1 mm a 30 cm (Blake, 2007), (FIGURAS 3 Y 4). Microscópicamente, son tumores monoclonales de células de músculo liso, típicamente bien diferenciadas que conservan su fenotipo de músculo liso, dispuestas en haces entrelazados y rodeadas por una matriz extracelular más o menos abundante (FIG. 4). Además, estos tumores son hormono-dependientes, considerándose que su crecimiento está modulado por las hormonas ováricas, estrógenos y progesterona.

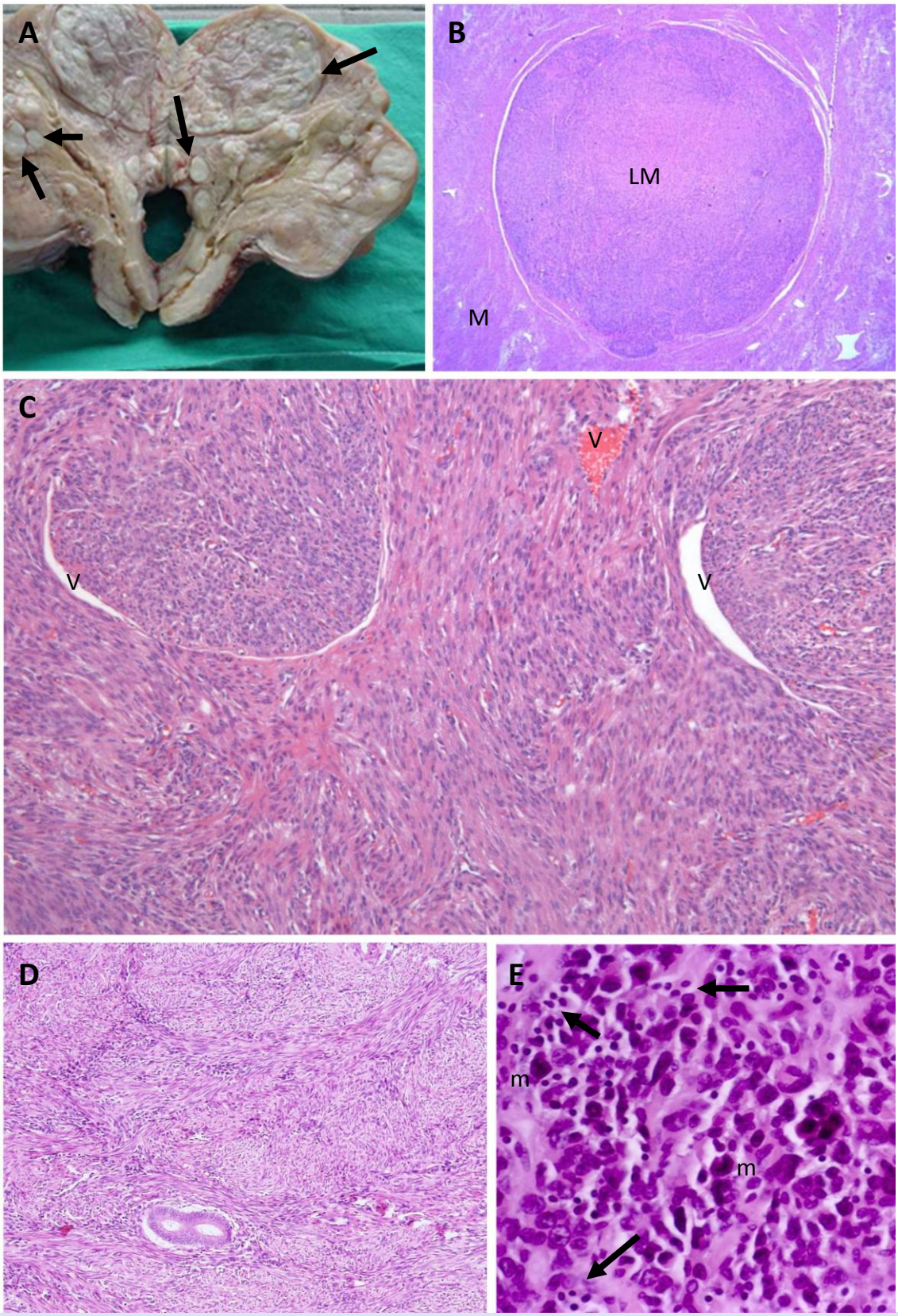


FIGURA 4. (A) IMAGEN MACROSCÓPICA ÚTERO. LOS LEIOMIOMAS SE PRESENTAN COMO ESTRUCTURAS BLANQUECINAS (FLECHAS). (B) IMAGEN MICROSCÓPICA DE UN LEIOMIOMA (LM) RODEADO DE TEJIDO SANO (M). (C) MIOMETRIO SANO. (D) CÉLULAS MUSCULARES LISAS CON DISPOSICIÓN ARREMOLINADA EN UN LEIOMIOMA. (E) LEIOMIOSARCOMA CON CÉLULAS INDIFERENCIADAS, CÉLULA EN MITOSIS (m), CÉLULAS NECRÓTICAS (FLECHAS).

Los LMs pueden llegar a tener un gran tamaño y son habitualmente múltiples. El tamaño del leiomioma o su localización pueden causar fenotipos clínicos más severos, ocasionando metrorragias, hemorragias anemizantes y dolor abdominal; además de aumentar la infertilidad (en el 1-3% de los casos son la única causa), abortos y reducción de la eficacia de los tratamientos de reproducción asistida (Stowall y cols., 1998; Hart y cols., 2001). Igualmente, los leiomiomas uterinos pueden metastatizar en distintos destinos como por ejemplo en el tejido pulmonar (WalKer 2005). Según Sankaran y Manyonda, 2008; Levy y cols., 2012, son sintomáticos en un 20-50% de los casos, con un fuerte impacto en la salud de la mujer y su calidad de vida. A pesar de este impacto en la salud femenina, el hecho de haberse considerado poco frecuente o improbable su malignización, ha hecho que reciban poca atención, hasta los últimos años, en cuanto al estudio de su etiología y patogénesis.

La incidencia de estos tumores no está bien determinada pero en la actualidad se considera que afectan a un 60% de mujeres en la edad fértil, llegando a un 80% si consideramos todo el periodo vital (Laughlin y cols., 2010) con variaciones según la raza (Okolo, 2008). La verdadera frecuencia de leiomiomas entre la población femenina habitualmente está subestimada, si tenemos en cuenta que un porcentaje importante de los mismos son asintomáticos y no presentan incidencia clínica (Okolo, 2008). Aún así, la cantidad de pacientes con leiomiomas que necesitan atención clínica es muy elevada, lo que supone un coste sanitario estimado por paciente de 2,5 veces más en relación a las mujeres sin miomas (Wegienka, 2012). El elevado coste se debe fundamentalmente a que la cirugía es la elección terapéutica predominante para mujeres con leiomiomas sintomáticos, constituyendo la principal indicación para

histerectomía en Norteamérica, Europa y Japón (Flynn y cols., 2006; Hodge y Morton, 2007; Parker, 2007).

La prevalencia de leiomiomas parece ser menor en poblaciones europeas y asiáticas (Sato y cols., 2002; Heinemann y cols., 2003; Marino y cols., 2004). En España, los datos del Instituto Nacional de Estadística muestran que el 10% de las altas hospitalarias de mujeres se producen en relación a los leiomiomas, suponiendo el 49% del total de neoplasias benignas que causan ingreso hospitalario (Fernandez y cols., 2009). Además, por estos datos sabemos que el número de histerectomías es muy elevado, mayoritariamente en la perimenopausia, aunque se ha observado a lo largo de los últimos años, la presencia de leiomiomas que necesitaron cirugía en edades cada vez más tempranas.

Los leiomiomas afectan a la calidad de vida y productividad de la mujer en distintas partes del mundo, como demuestran Downes y cols., 2010 en un estudio de cinco países europeos o Zimmermann y cols., 2012 en 8 países incluyendo Europa, América y Asia.

Los factores que afectan al desarrollo de leiomiomas pueden afectar a distintas fases del mismo y así se clasifican como factores de riesgo, iniciadores, promotores y/o efectores. El estudio de los factores de riesgo, características generalmente identificadas por estudios epidemiológicos, puede dar claves sobre todo para la prevención de la formación de los LMs mientras que, el estudio del comportamiento celular ante moléculas relacionadas con dichos factores, puede ayudar al conocimiento de su etiología y posterior desarrollo. Por otro lado, este estudio celular y molecular sumado al comportamiento clínico, ayudará a conocer qué moléculas están implicadas en la fase del desarrollo del tumor y así facilitar la obtención de terapias menos agresivas que la cirugía.

A pesar del hecho de que el origen de los LMs sigue siendo desconocido, diversos factores como la raza, componentes genéticos o factores ambientales han sido asociados a la aparición de leiomiomas uterinos y por ello se consideran factores de riesgo (Baird y Dunson, 2003; Parker, 2007). También hay suficientes evidencias del papel de factores hormonales como factores de riesgo, promotores y/o efectores aunque se desconozcan los mecanismos de acción. Las primeras evidencias al respecto se deducen de las observaciones clínicas referidas a que no están presentes antes de la pubertad, desaparecen o se reducen en la menopausia y con el uso de antagonistas de estrógenos.

Aunque hay evidencias de la acción de los factores previamente mencionados, parece claro que la transformación desde miometrio a leiomioma y la regulación del crecimiento del tumor, está basada principalmente en una compleja interacción de esteroides sexuales y factores de crecimiento locales (Evers, 2006; Blake, 2007; Carraway y Hassan, 2007).

Centrándonos en el factor hormonal, hay que tener en cuenta que la exposición de las mujeres a estrógenos y progesterona está influenciada por su historia reproductiva, además del posible consumo de contraceptivos orales o probables tratamientos de fertilización.

Los datos disponibles hasta ahora sobre factores que afectan el estado hormonal como el uso de anticonceptivos o la paridad, con los leiomiomas, son bastante contradictorios por lo que es necesario interpretarlos con cautela. Esta controversia en los resultados se debe en parte a la no uniformidad en el diseño de los estudios en cuanto al tiempo, características de la población en estudio, etc.

Por otro lado, también es necesario considerar otras fuentes endógenas de esteroides a circunstancias como la obesidad, cuya asociación con la presencia de leiomiomas e incremento de la incidencia parece algo aceptado en los distintos estudios (Parker, 2007). La obesidad conlleva una hipertrofia del tejido adiposo. Una de las moléculas más importantes sintetizada por las células de este tejido es la leptina, una hormona que regula el apetito y el balance energético. Estudios recientes (Markowska y cols., 2005 y 2006) han demostrado que esta hormona producida por los adipocitos, induce la expresión de aromatasa, enzima clave para la producción de estrógenos, en el tejido leiomiomatoso pero no en el miometrio sano (Bulun y cols., 1994; Markowska y cols., 2005), contribuyendo a crear un ambiente hiperestrogénico en el tumor.

2. ESTRÓGENOS EN MIOMETRIO Y SUS NEOPLASIAS

Los estrógenos regulan el crecimiento, diferenciación y fisiología de la mayoría de los tejidos y órganos reproductores además de influir en los procesos patológicos de los mismos como el cáncer u otros tumores menos agresivos.

Los efectos biológicos de los estrógenos, están mediados por su unión a dos receptores específicos, (REs), REα y REβ, que pertenecen a la familia de factores de transcripción regulada por ligando y son transcritos desde genes distintos, localizados en cromosomas diferentes.

Los REα y REβ difieren mayoritariamente en el dominio A/B, N-terminal (FIG. 5), que media la activación transcripcional. El dominio de unión al ligando (E) está moderadamente conservado entre ambos receptores, a pesar de lo cual, presenta diferencias en su especificidad por el ligando. El extremo C-terminal está altamente conservado y contiene el

dominio de unión al ADN (C). Estos receptores no sólo muestran diferente afinidad por el ligando sino que están expresados de manera diferencial en los distintos tejidos. Además, cuando son coexpresados, REβ parece presentar una acción inhibitoria sobre la expresión génica mediada por el REα, además de poder actuar con acciones opuestas sobre ellos (Matthews y Gustafsson, 2003; Taylor y cols, 2010).

Estos dos tipos de receptor de estrógenos, son coexpresados en distintos órganos del aparato reproductor durante el desarrollo. En el útero del organismo adulto, la expresión de REβ disminuye respecto a la de REα. Por otro lado, las cascadas de señalización de los subtipos de REs parecen ser específicas de cada tejido presentando incluso acciones opuestas en distintos órganos (Huang G. 2010).

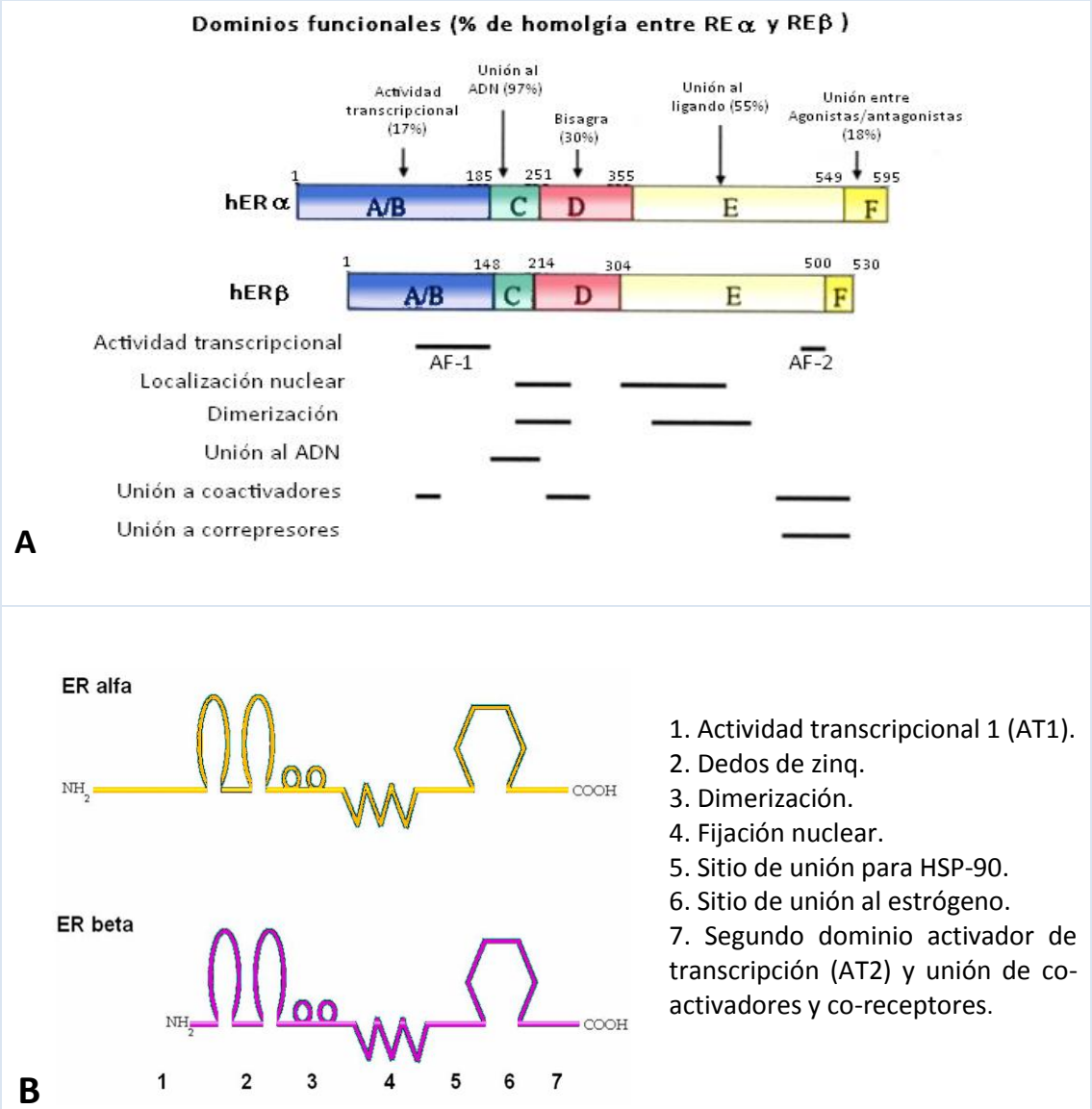


FIGURA 5. (A) DOMINIOS FUNCIONALES DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO. PORCENTAJE DE HOMOLOGÍA ENTRE LAS ISOFORMAS α Y β. (B) ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO. COMPARACIÓN ENTRE LAS ISOFORMAS α Y β.

Los estrógenos pueden ejercer efectos sobre las células sensibles a ellos, a través de distintos mecanismos.

El mecanismo clásico, vía genómica o de respuesta lenta, implica la formación de homo o heterodímeros de los receptores y la consiguiente unión de este complejo a la secuencia, elemento de respuesta a estrógeno (ERE), de la región promotora de genes diana, llevando a un incremento o disminución en los niveles de ARNm, la producción de las proteínas

asociadas y finalmente una respuesta fisiológica. Esta vía genómica ocurre típicamente en un periodo de horas (FIG. 6).

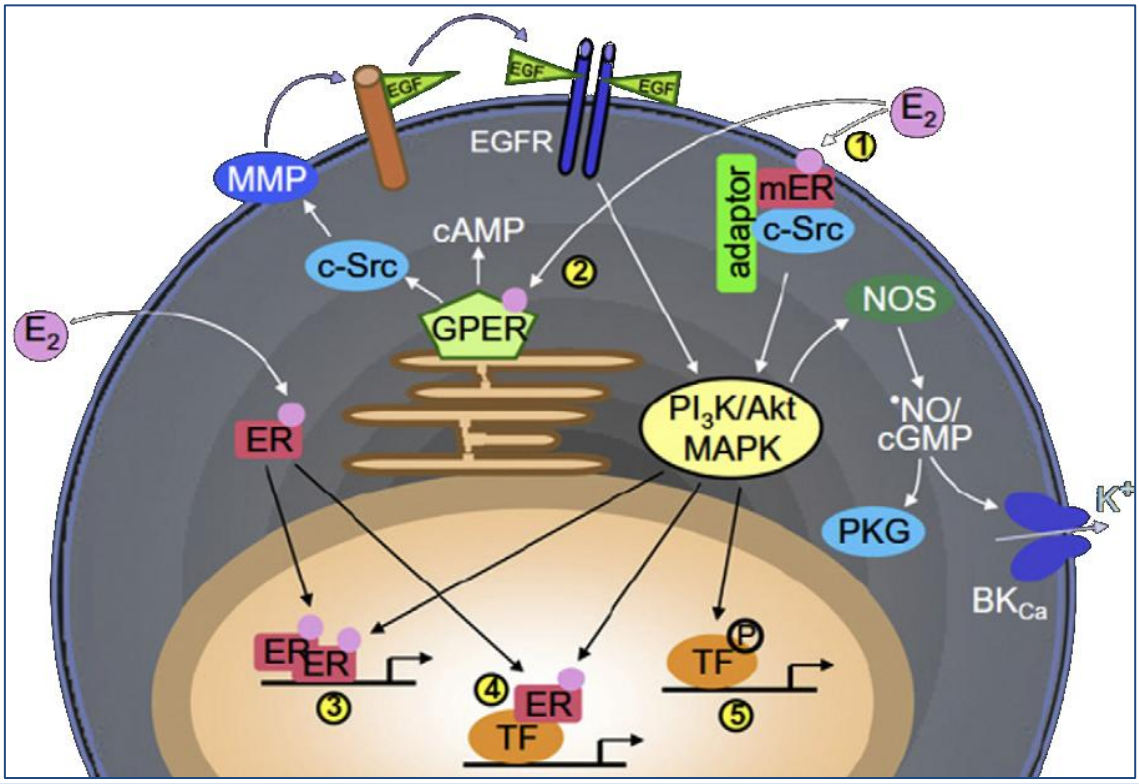


FIGURA 6. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO. EN LA **RESPUESTA RÁPIDA (NO GENÓMICA)**, EL 17B-ESTRADIOL (E_2) ENDÓGENO ACTIVA LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS ALFA Y BETA DE LA MEMBRANA (mER) QUE INTERACTÚAN CON LAS PROTEÍNAS ADAPTADORAS Y LAS MOLÉCULAS DE SEÑALIZACIÓN (1). E_2 TAMBIÉN SE UNE A RECEPTORES DE ESTRÓGENO LIGADOS A PROTEÍNA G (GPER), PRINCIPALMENTE LOCALIZADOS EN EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO (2). EN LA **RESPUESTA LENTA (GENÓMICA)**, EL E_2 REGULA LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE LA UNIÓN DE DÍMEROS DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO (ER) EN LA REGIÓN PROMOTORA DE GENES DIANA (3), A TRAVÉS DE LA INTERACCIÓN DEL ER CON OTROS TIPOS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN (TF) (4), O POR LA REGULACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN (5). (BARTON, 2012).

En la vía no genómica, el estrógeno puede actuar en segundos o minutos, a través de REs localizados en la membrana plasmática, (Björnström y Sjöberg, 2005), o adyacentes a ella (Chen y cols. 2008) (FIG. 6). Dependiendo del tipo celular, este tipo de respuesta no genómica o respuesta rápida implica la movilización de varios segundos mensajeros por ejemplo, AMPc, Ca^{++}, quinasa PI3, (Kolkova y cols., 2010), interacción con receptores de membrana, por ejemplo con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), o activación de vías intracelulares (FIG. 6). Estas observaciones sugirieron que un receptor acoplado a proteína G

mediaba estos efectos (Kolkova y cols., 2010). El receptor de estrógeno denominado GPR30 fue clonado en 1996 (Owman y cols., 1996). Recientemente, sus propiedades como receptor de estrógenos han sido demostradas, siendo el primer reporte sobre su expresión y localización tisular en tejidos reproductivos, en endometrio (Kolkova y cols., 2010). Según estos autores, no se observa inmunorreactividad en músculo liso de vasos sanguíneos o miometrio. Sin embargo, diversos estudios ponen de manifiesto que en miometrio normal y leiomiomatoso, respuestas rápidas de estrógenos y factores de crecimiento pueden converger actuando sobre múltiples vías que promueven la progresión del ciclo celular (Nierth-Simpson y cols., 2009).

Recientemente, Tian R. y cols. 2012, han mostrado la presencia de GPR30 en miometrio y una sobreexpresión del mismo en núcleos de células musculares leiomiomatosas. Sin embargo, resultados preliminares de nuestro grupo de investigación muestran una abundante presencia de GPR30 tanto en miometrio sano como en leiomioma y con una mayor representación en los citoplasmas.

Por el momento sabemos que la alteración de la expresión de los REs α y β, está implicada en diversas condiciones patofisiológicas, incluyendo la progresión del cáncer en tejidos hormono-dependientes (Taylor y cols., 2010). En general, se acepta que el proceso carcinogénico mediado por estrógenos, puede depender del órgano o del tipo celular específicamente y que este efecto puede estar influenciado principalmente por la relación de ambos receptores dentro del tejido, como ha sido reportado en cáncer de mama (Chen y cols., 2008). En efecto, es el ratio REα-REβ más que el número de receptores individuales,

lo que parece estar asociado con el riesgo de que un carcinoma común de mama progrese hacia un cáncer invasivo (Shaaban y Speirs, 2005).

Al igual que ocurre en los tejidos de la mama, el REα es mayoritario en los tejidos del útero sano. Sin embargo, inversamente a lo observado en el cáncer de mama, en el cáncer de endometrio el ratio REα-REβ disminuye, y ratios menores de 1 parecen ser un factor predictivo de una supervivencia más corta (Jongen y cols., 2009; Mylonas y cols., 2005). A pesar de la importancia por las posibles implicaciones en el útero de los tratamientos hormonales contra el cáncer de mama, ésta relación entre los REs se deconoce en las neoplasias de miometrio.

En los leiomiomas, aunque se desconocen sus mecanismos de acción en la etiología o en el desarrollo de las mismos, hay suficientes evidencias para el papel relevante que juegan los estrógenos tanto como factores de riesgo, promotores y estimuladores de efectores o factores de crecimiento (Flake y cols., 2003). Se sabe que las células leiomiomatosas presentan una sensibilidad aumentada a la estimulación con estrógenos, respecto a la de las células musculares de útero sano (Okolo, 2008). Por otro lado, la acción de la progesterona que parece favorecer la actividad mitogénica de las células de leiomioma en cultivo (Xu y cols., 2005) y promover la supervivencia de las células de leiomioma regulando la expresión de la proteína Bcl-2 (Yin y cols., 2007), está mediada por dos tipos de receptores cuya transcripción está inducida por estrógenos (Kato y cols., 1991).

A pesar de la controversia que muestran los trabajos sobre la expresión de REs α y β en LMs, (Wang y cols., 2009; Kovács y cols., 2001; Roan y cols., 2005), parece clara la presencia de los dos tipos de receptores clásicos en sus células y el papel relevante de las hormonas

gonadales en el desarrollo del tumor (Blake, 2007). Los niveles de REs parecen más altos en leiomiomas que en el útero sano (Brandon y cols., 1993) y el segundo tipo de RE, REβ, parece expresarse a niveles de ARNm de forma preferente en leiomiomas respecto del miometrio sano (Benassayag y cols., 1999). A nivel de caracterización celular, hay algunos datos contradictorios sobre la localización de ambos receptores en las células leiomiomatosas, habiéndose obtenido datos distintos dependiendo del tipo de estudio, *in vivo* o *in vitro* (Gargett y cols., 2002; Jakimiuk y cols., 2004).

En otras variantes de LMs, el estatus de ambos receptores es desconocido y los pocos estudios en LMSs y STUMP (leiomiomas de incierto potencial maligno) presentan datos sólo de un tipo de receptor, supuestamente el REα, considerándose que en general carecen de ellos o están en menor proporción que en los leiomiomas (Bodner K 2004). En 2005, Akhan S. y cols. propusieron que una positividad para REs en LMSs superior al 10%, podía estar asociado con un mejor pronóstico de la enfermedad. Datos más recientes indican que el estatus de REs puede ser útil como un potencial marcador pronóstico o como una diana terapéutica en esta fatal enfermedad (Ioffe y cols., 2009).

3. PÉTIDOS Y NEOPLASIAS

El descubrimiento de los péptidos como moléculas reguladoras biológicamente activas ha sido uno de los grandes acontecimientos de la fisiología moderna. Estas moléculas, producidas fundamentalmente por células endocrinas del tracto gastrointestinal, fueron también aisladas del sistema nervioso, donde pueden actuar como neurotransmisores. Además de su función endocrina, posteriormente se les ha atribuido una

acción autocrina o paracrina que afecta la función de numerosas células en el organismo. Una de las funciones primordiales de los péptidos gastrointestinales es su acción trófica en tejidos sanos y neoplásicos (Thomas R. 2002), estando sus receptores sobreexpresados en muchas células tumorales en relación al tejido sano (Okarvi SM 2007)

Estas hormonas peptídicas presentan una serie de características comunes tales como formar parte de grandes moléculas precursoras, tener distintas isoformas o unirse a diferentes receptores desencadenando distintas cascadas de señalización.

Una característica interesante es que uno de los factores que induce la expresión de estos péptidos y sus receptores son las hormonas gonadales (Hyder y Stancer, 1999).

NEUROTENSINA

La neurotensina es un péptido de 13 aminoácidos identificado por Carraway y Leeman en 1973 en extractos de hipotálamo ovino. Células productoras de este péptido fueron localizadas principalmente en el Sistema Nervioso Central (CNS) y el tracto gastrointestinal. La neurotensina actúa fundamentalmente como neurotransmisor y/o neuromodulador en el sistema nervioso y modulador paracrino o endocrino en tejidos periféricos (Evers, 2006). Los efectos de este péptido están mediados principalmente por su receptor de alta afinidad NTSR1, (proteína transmembrana de 7 pasos), acoplado a proteína G. Esta proteína de 418 amino ácidos ha sido identificada en el cerebro, intestino delgado, hígado y en varios tipos de cáncer.

Se ha demostrado que la transcripción de NTS puede estar inducida por el estradiol en tejidos neuroendocrinos de rata (Alexander y Leeman;

1994; Bello y cols., 1999). En humanos, el estradiol aumenta los niveles de expresión de la NTS en células epiteliales de mama en humanos (Dupouy y cols., 2009).

Se han descrito diversas vías de señalización después de la estimulación de NTSR1. Una de las cascadas inducidas por la neurotensina incluye la activación de proteinquinasas mitogénicas que conlleva una estimulación de la proliferación celular.

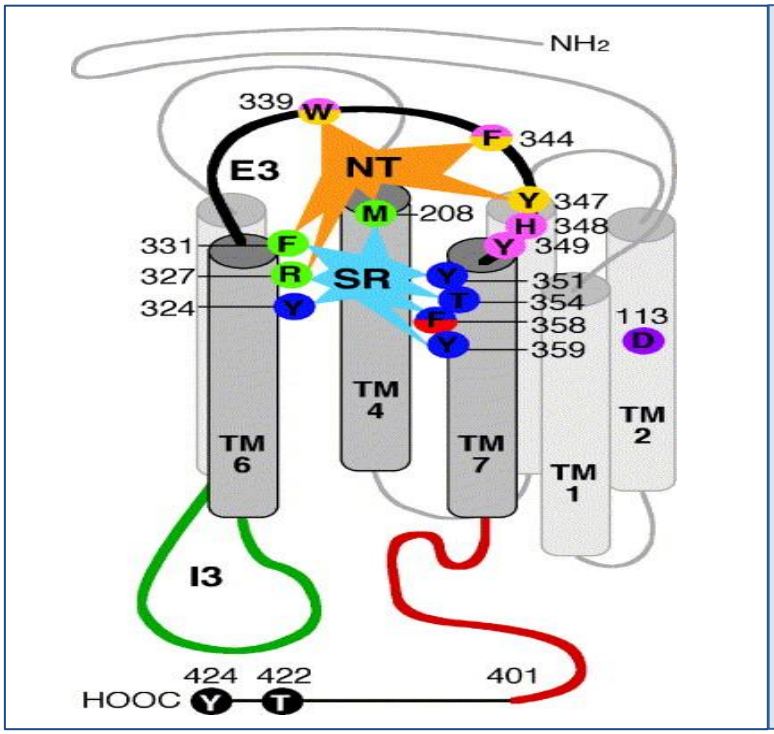


FIGURA 7. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL RECEPTOR DE NTS (NTSR-1) DONDE SE MUESTRAN LOS SIETE DOMINIOS TRANSMEMBRANA (TM).

(KITABGI, 2006).

Este efecto proliferativo ha sido observado en diversos tejidos normales tales como colon, páncreas y corteza adrenal (Evers, 2006). De la misma forma, diversas líneas de evidencia sugieren que NTSR1 juega un papel en la regulación del crecimiento tumoral. Así, el ARNm - *NTSR1* está altamente sobreexpresado en una variedad de cánceres primarios, comparados con el tejido normal (Reubi y cols., 1999; Elek y cols., 2000) y líneas celulares de cáncer humano, expresan altos niveles de NTSR1 presentando respuestas de crecimiento celular a concentraciones

subnanomolares de NTS (Sehgal y cols, 1994; Seethalakshmi y cols., 1997; Carraway y Hassan., 2007). Además, las células tumorales pueden secretar NTS y también expresar sus receptores sugiriendo que además de una señalización endocrina y paracrina, la neurotensina puede llevar a cabo una regulación autocrina en células tumorales (Carraway y Hassan, 2007).

La expresión de NTS y/o su receptor de alta afinidad NTSR1 es un hecho demostrado generalmente en tumores endocrinos y originados de tejidos sensibles a hormonas gonadales como mama, colon, pulmón y próstata. Diversos trabajos indican que la NTS interviene en funciones ligadas a la progresión neoplásica, incluyendo proliferación de células de páncreas, próstata, colon y pulmón (Thomas y cols., 2003), protección del cáncer de mama contra la apoptosis (Somai y cols., 2002) e inducción del potencial proinvasivo de células de cáncer de colon (Souazé y cols., 2006). Todos estos procesos son presumiblemente activados por la expresión anormal de NTSR1 durante los primeros estadios de la transformación celular. Hay que considerar que en algunos casos se ha propuesto que la presencia de neurotensina pudiera ser un hecho temprano en la tumorogénesis por los hallazgos encontrados. Así, Gui y cols., en 2008, mostraron como la expression de NTSR1 iba aumentando en la tumorogénesis del colon desde tejido sano, adenoma y adenocarcinoma donde la expresión de NTSR1 es máxima. La presencia de NTS en adenomas hipofisarios de todos los tipos celulares (Reyes y cols., 2007; Giorgi y cols., 2008), también apoya el papel de la NTS en la tumorogénesis induciendo la proliferación.

La interacción de la NTS con hormonas gonadales en cáncer está siendo estudiada ampliamente en la última década, por el grupo de investigación de P. Forgez (INSERM, Paris). Estos investigadores abordan el

estudio de estas interacciones fundamentalmente en el desarrollo y progresión del cáncer de mama y colon, dos tipos de cáncer estrógeno-dependientes.

A pesar de que en el cáncer de mama está muy avanzado, el estudio de este péptido y sus receptores así como su relación con las hormonas gonadales (Souazé y cols., 2006), se desconoce completamente si este péptido está presente en el útero.

La expresion de péptidos y sus receptores en tumores tiene distintas posibilidades de aplicación terapéutica, sobre todo dirigidas a la búsqueda de especificidad de dicha terapia. El receptor de NTS como hemos explicado previamente, es un receptor de la familia de receptores acoplado a proteína G para los cuáles existen numerosas evidencias, mostradas en los últimos 20 años, de que pueden presentar variantes específicas, obtenidas por empalme alternativo (*alternative splicing*), expresadas sólo en células tumorales. Así, la utilización de anticuerpos dirigidos contra productos de empalme específicos de las células tumorales constituye una terapia prometedora, actualmente en experimentación clínica (Venables, 2004). Una apasionante posibilidad sería obtener isoformas del receptor de neurotensina específicas de los leiomiomas. Por otro lado es necesario conocer si los estrógenos pueden inducir la expresión del péptido en células de tumores de músculo liso y éste por medio de su interacción con NTRS1, activar la proliferación celular.

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En la actualidad podemos decir que los leiomiomas constituyen un problema importante de salud en la población femenina de todo el mundo. Sin embargo los estudios sobre esta patología son tan escasos que se desconoce su origen, las causas de su desarrollo, la evolución de los distintos tipos y las posibilidades de malignización en función de estos tipos. Se consideran dependientes de estrógenos y hay trabajos que muestran la expresión de receptores para estas hormonas, pero aún no se han caracterizado los tipos celulares que lo expresan, ni cómo varían estos receptores a lo largo del desarrollo del leiomioma ni de otras neoplasias de miometrio.

Por otro lado, tenemos datos de la población de EEUU, Japón, varios países europeos, pero ¿conocemos datos sobre la población española? Sólo el trabajo de Downes y cols., 2010, hecho en la población de cinco países europeos donde se incluyó España, nos muestra el impacto de estos tumores en la calidad de vida y que España es el país con mayor índice de mujeres no tratadas por este problema, lo que dificulta el saber su incidencia exacta.

Consideramos que a pesar del impacto que supone en la salud de la mujer, el estudio de los leiomiomas y de otras neoplasias relacionadas, no se trata como un tema relevante en la investigación en comparación a otras enfermedades benignas, por lo que hemos querido aportar datos sobre alguna de las muchas incógnitas que rodean a estos tumores dedicando el trabajo de esta Tesis a su estudio.

Teniendo en cuenta la admitida dependencia de estrógenos de los leiomiomas, los **objetivos** que nos hemos planteado están enfocados a

abordar el estudio de los leiomiomas desde distintos puntos de vista, siempre en relación con los estrógenos, para saber un poco más sobre la relación de estos esteroides con dichos tumores. Así para entender mejor el papel de los estrógenos en esta patología los estudiaremos a nivel celular y subcelular. Esta parte del estudio nos dará datos que servirán para prever los efectos que puedan tener sobre estos tejidos, las terapias dirigidas contra otros tumores dependientes de estrógenos como el cáncer de mama. Por otro lado, el estudio de la expresión de péptidos como la neurotensina, en estos tumores y su relación con los estrógenos, permitirá abrir una puerta a nuevos factores diagnósticos y sobre todo a la posibilidad de una herramienta terapéutica como alternativa a la cirugía. Además el estudio estadístico nos permitirá saber el grado de asociación de los distintos factores hormonales a los que están expuestas las mujeres durante la edad fértil con los leiomiomas uterinos.

LO EXPUESTO PREVIAMENTE QUEDA REFLEJADO EN LOS SIGUIENTES **OBJETIVOS GENERALES**:

1. Realizar un estudio de la localización celular y subcelular de los dos principales receptores de estrógenos, α y β, en leiomiomas y otras dos neoplasias de miometrio, con distinto comportamiento clínico: leiomiomas atípicos y leiomiosarcomas. Este estudio tendrá un interés clínico en cuanto a la posibilidad de mejorar el diagnóstico y en el posible tratamiento de leiomiosarcomas, además de permitir conocer un poco más sobre la relación entre estas neoplasias.
2. Realizar un estudio celular y molecular del péptido neurotensina y su receptor de alta afinidad NTSR1 en los tumores de miometrio en estudio, en relación con el estatus de los receptores de estrógenos. Este péptido está presente en todos los tumores dependientes de estrógenos estudiados hasta el momento, siendo muy importante

su relación con los estrógenos en el cáncer de mama, donde el estudio sobre la neurotensina está muy avanzado. Consideramos de particular interés, ya que el útero y la mama son dos órganos fundamentales en la reproducción, conocer su situación en el útero, hasta ahora desconocida.

3. Determinar cuáles son las características principales que presenta la población de mujeres afectadas de miomas en la isla y realizar un estudio caso-control sobre cuáles de dichas características tiene mayor grado de asociación con los leiomiomas.

PARA TODO ELLO NOS PLANTEAMOS LOS SIGUIENTES **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**:

1. Estudiar la distribución y caracterización celular de receptores de estrógeno, α y β, en tumores uterinos de músculo liso de distinto comportamiento clínico: leiomiomas típicos, leiomiomas atípicos y leiomiosarcomas, en relación al miometrio sano,
    a. Caracterizando inmunohistoquímicamente el tipo celular.
    b. Determinando el ratio entre ambos tipos de receptor en cada uno de los tipos de tumor.
2. Determinar la correlación del ratio de receptores de estrógeno con:
    a. La presencia de aromatasa en el tumor
    b. La presencia del indicador de proliferación, Ki 67
3. Detectar inmunohistoquímicamente el péptido neurotensina en las distintas neoplasias de miometrio, en relación al miometrio sano,
    a. Caracterizando el tipo celular
    b. Estudiando su relación con los estrógenos y sus receptores:
        b_1. Colocalización de NTS con los receptores de estrógenos

b_2.Estudio cuantitativo de la presencia del péptido en tumores procedentes de mujeres en condiciones normales y mujeres sometidas a altas dosis de estrógenos

4. Detectar el ARNm de la NTS en células de las neoplasias en estudio
5. Estudiar inmunohistoquímicamente la presencia del receptor de neurotensina de alta afinidad: NTSR1.
6. Estudiar la expresión del ARNm-*NTSR1* en tejido tumoral frente a miometrio sano.
7. Conocer el conjunto de características que presentan las mujeres que son sometidas a cirugía por leiomiomas, en cuanto a factores hormonales endógenos o exógenos, en una muestra de la Isla de Tenerife y realizar con dicha muestra un estudio caso-control para determinar el grado de asociación de cada uno de los factores con la presencia de leiomiomas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material y métodos

1. MATERIAL

Un total de 1221 mujeres han intervenido en este estudio, previo consentimiento informado. Las mujeres eran pacientes del Hospital Universitario de Canarias (HUC) o de la USP Clínica La Colina, ambos de Tenerife, en el periodo 2005-2008. Además, se tuvo en cuenta como criterio de selección que fueran mujeres españolas de origen caucásico, residentes en Canarias.

La muestra fue dividida en tres grupos de **edad**: 14-38 años (52%), 39-53 años (39%) y 54-84 años (9%); y sus características se describen a continuación, (TABLA 1).

La **edad de menarquía**, como marcador de inicio de la exposición a las hormonas endógenas fue de 12±2 años. Respecto a la **paridad**, el 62% eran nulíparas, el 16% habían tenido un hijo y el 22% tenían dos o más hijos. El **índice de masa corporal** (IMC) se clasificó en tres grupos: normopeso (IMC≤24,9 kg/m^2), sobrepeso (25≤IMC≤29,9 kg/m^2) y obesidad (IMC≥30 kg/m^2). El IMC global fue de 23±4 kg/m^2, el cual está en la categoría de peso normal y en la que entró el 80% de la muestra. No obstante, el 14% fueron clasificadas dentro de la categoría de sobrepeso y el 6% restante, en obesidad. Del total de mujeres que habían recibido **tratamiento hormonal**, 22% habían utilizado anticonceptivos orales (ACO) y sólo el 3% había recibido algún ciclo de fertilización in vitro (FIV). Del total de pacientes con tratamiento hormonal (n=733), la distribución fue 3% FIV y 22% ACO. Para la valoración del efecto de los ACOs sólo se tuvo en cuenta aquellas pacientes con un uso ininterrumpido de ACO (n=266), siendo la mediana de 1 mes de uso (1 – 120 meses, TABLA 1).

VARIABLE	*FREC. RELAT. (IC95%)*
Edad (años)	
14-38 años	52(49-55)
39-53 años	39(36-42)
54-84 años	9(7-11)
Menarquía (años de edad)	12±2
Menopáusicas	11(9-12)
Paridad	
Nulíparas	62(59-66)
Primíparas	16(13-18)
Multíparas	22(19-24)
IMC (kg/m^2)	
<24.9 kg/m^2	80(78-82)
25.0-29.9 kg/m^2	14(13-17)
>29.9 kg/m^2	6(5-8)
Tratamiento hormonal	
FIV	3(2-4)
ACO	22(19-24)
Meses de ACO	1(1-120)*

*Mediana (P_5-P_{95})

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA TOTAL (N=1221)

Para la realización del estudio de casos – controles, incluimos 577 mujeres intervenidas de miomectomía o histerectomía motivadas por la presencia de leiomiomas, constituyendo el **grupo casos**.

El **grupo control** lo constituyeron 644 mujeres sanas (libres de leiomiomas, determinado por ecografía). De todas ellas se obtuvieron los siguientes datos: edad; índice de masa corporal, (IMC); toma de anticonceptivos, (ACO); tratamientos de fertilización *in vitro*, (FIV) y número de embarazos llegados a término (paridad).

Los datos que se registraron para el grupo casos fueron el número de leiomiomas, su localización y tamaño (cm), la existencia de un diagnóstico de polimiomatosis, y si los leiomiomas eran de crecimiento rápido (observaciones según protocolo médico estándar). El número de leiomiomas, localización y tamaño se obtuvo de los registros de los Servicios de Anatomía Patológica, y el diagnóstico de polimiomatosis y de leiomioma de crecimiento rápido por declaración del ginecólogo a cargo de la paciente. Los datos se registraron en un cuaderno individual para cada paciente incluida en el estudio y la información dudosa se contrastó con la historia clínica o se confirmó mediante conversación telefónica con la propia paciente. Una vez confirmada la calidad del registro los datos se digitalizaron en formato de archivo SPSS.

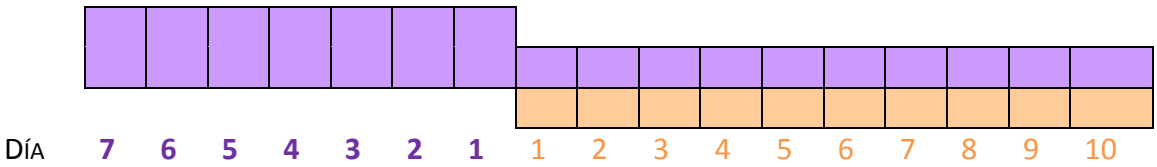
Para la realización del estudio celular se utilizaron muestras de tejido leiomiomatoso y del miometrio adyacente de las mismas pacientes del grupo casos. Además, se contó con un número de muestras de archivo de leiomiomas atípicos y leiomiosarcomas procedente del Hospital Materno-Infantil de Las Palmas de Gran Canaria (TABLA 2). Se utilizaron, en total, 286 muestras de tejido en este trabajo. Todo el material fue analizado anatomopatológicamente según los criterios de clasificación de tumores de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2003).

El tejido tumoral utilizado corresponde a tres tipos de neoplasias de miometrio: leiomiomas (tumores benignos), leiomiomas atípicos (variante de leiomiomas con características atípicas) y leiomiosarcomas (tumores malignos de miometrio, TABLA 2).

TEJIDO		RANGO DE EDAD	n
Miometrio	(M)	39 – 78 años	49
Leiomioma	(LM)	29 – 52 años	209
Leiomioma atípico	(LA)	32 – 64 años	14
Leiomiosarcoma	(LMS)	25 – 64 años	14

TABLA 2. RANGO DE EDADES DE LAS MUJERES DE LAS QUE PROCEDEN CADA UNO DE LOS TEJIDOS ESTUDIADOS Y NUMERO DE MUESTRAS (n) UTILIZADOS.

Los leiomiomas procedentes de mujeres sometidas a procesos de fertilización in vitro constituyeron un grupo independiente. Se utilizó el tejido tumoral y sano adyacente de 15 mujeres operadas tras recibir uno o varios ciclos de inducción de la ovulación mediante protocolo largo. Éste consiste en la inducción de la supresión hipofisaria con acetato de leuprorelina (GRÁFICA 1) como agonista de la GnRH en la mitad de la fase lútea (día 21-22 del ciclo anterior), con una dosis inicial de 0.5-1.0 mg/día, por vía parenteral o intranasal, con disminución de la dosis a la mitad en el momento de la menstruación, iniciando entonces la estimulación con gonadotropinas, FSH o FSH-LH, 200-300 IU diarias durante 11 días más una dosis de HCG 10.000 IU. 24 horas después de extraer el oocito se administra progesterona a 200 IU cada 12h durante 48h y finalmente cada 8 horas durante 18 días.



GRÁFICA 1: representación de la dosis de agonistas y gonadotropinas en el ciclo largo.

2. MÉTODOS

2.1. ESTUDIO DE MUESTRAS.

2.1.1. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

El material se fijó en formol al 10% durante 12 horas. Posteriormente se deshidrató por inmersión en alcohol etílico de graduación creciente para finalmente incluirlo en parafina. Los bloques fueron cortados en un microtomo de parafina (Thermo Shandon Finesse 325) a 3 µm de grosor. Los cortes se montaron en un baño con agua destilada a 40º, en portaobjetos previamente tratados (Dako).

Los cortes fueron desparafinados y rehidratados en una serie decreciente de alcoholes hasta agua destilada. Sobre ellos se realizaron coloraciones topográficas para estudiar las características histológicas y su diagnóstico, y coloraciones histoquímicas, que permiten caracterizar tipos celulares o tejidos por su composición química, para la observación de la matriz extracelular.

COLORACIONES TOPOGRÁFICAS:

Se utilizó la coloración **hematoxilina – eritrosina**:

Los cortes, tras ser desparafinados y rehidratados, se tiñeron con hematoxilina durante 2 minutos. A continuación se lavaron con agua corriente y agua destilada. Posteriormente, se tiñeron con eritrosina acuosa al 1%. Finalmente los cortes se deshidrataron y se colocó un cubreobjetos con Eukitt.

COLORACIONES HISTOQUÍMICAS:

Con el fin de poner de manifiesto la presencia de matriz extracelular del conjuntivo laxo en los distintos tumores se utilizó la coloración tricrómica de Masson.

Tricrómico de Masson

Los cortes, desparafinados y rehidratados, se sumergieron en disolución de Bouin, (ácido pícrico a saturación, formaldehído al 40% y ácido acético glacial al 1%), durante 12 horas. Los cortes se lavaron en agua corriente y en agua destilada. Se tiñeron con hematoxilina férrica de Weigert, (mezcla a partes iguales de hematoxilina alcohólica al 1% y una disolución de ácido clorhídrico al 1% con cloruro férrico al 4%), durante 10 minutos. Se lavaron en agua corriente y agua destilada. Después se tiñeron con una mezcla de Biebrich escarlata al 1%, fucsina ácida al 1 % y ácido acético glacial. El colorante se fijó con una disolución de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolíbdico diluida en agua destilada. Finalmente se tiñó con verde luz al 1%. Tras lavar, los cortes fueron deshidratados y se puso el cubreobjetos utilizando Eukitt. Todos los reactivos son de las casas comerciales Sigma-Aldrich, USA y de Merck & Co., Inc, Whitehouse Station, NJ, USA.

Para la identificación de las células cebadas del tejido conjuntivo laxo se utilizó una coloración metacromática con azul de toluidina.

Tinción metacromática con azul de toluidina:

Tras desparafinar e hidratar los cortes, se tiñeron con azul de toluidina acuosa al 1% durante 10 minutos. Se lavaron con una

mezcla de agua destilada con ácido acético al 0,4%. Después se lavaron con agua destilada y finalmente se procedió a deshidratar y poner los cubreobjetos.

2.1.2. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA MICROSCOPÍA ÓPTICA

Las técnicas de inmunohistoquímica permiten detectar proteínas y péptidos sobre secciones de tejido usando anticuerpos específicos. Las características de los anticuerpos utilizados se resumen en la TABLA 3.

MÉTODO INMUNOENZIMÁTICO INDIRECTO

Para la relización del método inmunohistoquímico, el material se fijó en formol al 10% durante 12 horas. Posteriormente se deshidrató por inmersión en alcohol etílico de graduación creciente para finalmente incluirlo en parafina. Los bloques se cortaron en un microtomo de parafina a 3 µm de grosor. Los cortes se estiraron al baño maría y se montaron en portaobjetos.

Para su utilización, los cortes se desparafinaron en una serie decreciente de alcoholes. El tejido rehidratado se estabilizó con tampón tris-salino (TBS) a pH 7,4. Para evitar uniones inespecíficas, se saturó durante 20 minutos con caseína al 0,5% diluida en el mismo tampón TBS. Para eliminar el exceso de caseína, se dieron dos lavados en TBS de 15 minutos cada uno. En el caso de los anticuerpos contra receptores de hormonas esteroideas (REα y REβ) se procedió a desenmascarar el antígeno mediante un lavado de 3 minutos en tampón citrato sódico (pH=6) a 90°C. Antes de incubar con el antisuero primario se dio un lavado de 10 minutos con TBS con Tritón X-100 al 0,05% (TBS-T) para permeabilizar las membranas y facilitar el paso del anticuerpo.

ANTICUERPO PRIMARIO	ANTÍGENO	ORIGEN	DILUCIÓN
Monoclonal de conejo Anti-REα	Extremo N-terminal del REα Humano	Dako (Glostrup, Denmark)	1:50
Policlonal de cabra Anti-REβ	Extremo N-terminal del REβ Humano	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)	1:50
Policlonal de conejo Anti-REβ	Extremo N-terminal del REβ Humano	United States Biological Inc. (Swampscott, MA, USA)	1:50
Policlonal de conejo Anti-Citocromo P450	Citocromo P450, CYP2C8, CYP2C9 y CYP2C19 Humano	United States Biological Inc. (Swamposcott, MA, USA)	1:100
Policlonal de conejo Anti-NTSR1	Ver descripción[1]	Dr. G. Tramu	1:300
Policlonal de cabra Anti- NTSR1	Extremo N-terminal del NTSR1 Humano	Santa Cruz Biotecnology (Santa Cruz, CA, USA)	1:300
Policlonal de conejo Anti-NTS	Ver descripción[2]	Dr. G. Tramu	1:300
Monoclonal de ratón Anti-Ki67	Fragmento de ADNc 1002 bp Ki-67 Humano	Dako (Glostrup, Denmark)	1:50

TABLA 3. ANTICUERPOS Y DILUCIONES UTILIZADAS EN LAS TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA.

[1]**Anticuerpo policlonal de conejo anti- NTSR1** y dirigido contra la secuencia 375-387 de la proteína del receptor de neurotensina 1 (NTSR1) de rata. El conejo se inmunizó contra la secuencia: NFRQVFLSTLACL (375-387 aminoácidos) acoplada a seroalbúmina humana mediante glutaraldehído. Esta secuencia de aminoácidos es exclusiva del subtipo 1 del NTSR. Proporcionado por el Dr. G. Tramu, Laboratoire de Neurocytochimie Fonctionnelle, Talence, Francia. Dilución 1:300. (Tramu, 1996)

[2]**Anticuerpo policlonal de conejo anti-NTS** hecho en conejo y dirigido contra el péptido neurotensina sintético (Laboratorios Península, Belmunt, CA, USA) conjugado con glutaraldehído-tiroglobulina bovina. Sus características inmunológicas han sido publicadas (Studler y col., 1988). Proporcionado por el Dr. G. Tramu, Bordeaux, Francia. Dilución 1:300.

Se incubó, con el antisuero específico diluido en Tampón TBS-T, durante 12 horas, a temperatura ambiente en cámara húmeda. Tras varios lavados en TBS se incubó con el anti-IgG específico para cada anticuerpo primario conjugado con biotina, diluido en TBS con Tritón X-100 al 0,05% durante una hora, dilución 1:1000, en cámara húmeda. Después de la incubación, se lavó nuevamente y se incubó con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante diluido a 1:1000 en TBS-T al 0,05% durante una hora, también en cámara húmeda. Tras esta incubación, se lavó en tampón TBS varias veces. El último lavado se realizó en tampón tris-clorhídrico, pH 7,6 y 0,5M, quedando los cortes preparados para revelar. Se utilizaron dos cromógenos: 4-cloro-1-naftol y 3,3-diaminobenzidina-3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahidrocloruro.

- ★ **El revelado con 4-cloro-1-naftol (Cl-Naf)(Sigma)** al 0,04% y peróxido de hidrógeno al 0,01% en tampón tris-clorhídrico (Tris-HCl), produce un precipitado de color azul. Se lavó en tampón tris-HCl y se montó con un cubreojetos utilizando glicerina tamponada.
- ★ **El revelado con 3,3' — diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB)(Sigma)** al 0,05% y peróxido de hidrógeno al 0,01 % en tampón Tris-HCl, produce un precipitado de color marrón. Se lavó en tampón Tris-HCl y se deshidrató en serie creciente de alcoholes. Se montó con un cubreobjetos utilizando Eukitt.

MÉTODO DE ELUCIÓN-RETRATAMIENTO

El método de elución-retratamiento (Tramu y cols., 1978) permite detectar dos antígenos presentes en la misma célula, al realizar dos reacciones inmunohistoquímicas consecutivas.

Para ello se realizó una primera reacción según el método enzimático indirecto utilizando como revelador el 4-cloro-1-naftol. Los cortes se montaron con glicerina tamponada y se fotografiaron. Posteriormente se procedió a la elución de los anticuerpos utilizados en la primera inmunorreacción. Tras eliminar el color de la primera reacción con acetona, se eluyó el primer anticuerpo oxidando con una mezcla proporción, 1:1, de permanganato potásico ($KMnO_4$) al 2,5% y ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 5% en agua destilada y metabisulfito sódico ($Na_2S_2O_5$) al 0,5% para decolorar los cortes. A continuación, se lavaron los portaobjetos en agua destilada y se hizo una segunda reacción inmunohistoquímica, utilizando esta vez el revelador 3-amino-9-etilcarbazol al 0,04% y peróxido de hidrógeno al 0,01% en tampón acetato a pH 6. Después del montaje se fotografió por segunda vez la misma zona para su comparación.

Control de especificidad de la reacción inmunohistoquímica

El control de la especificidad de la reacción inmunohistoquímica consistió en la sustitución del antisuero específico por suero bovino normal. En el caso de la elución-retratamiento, el antisuero específico de la segunda reacción se sustituyó por suero bovino .

*2.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARNm-*NTS *MEDIANTE HIBRIDACIÓN IN SITU NO RADIACTIVA*

La técnica de hibridación in situ permite detectar el ARNm en cortes de tejido. En este trabajo se empleó para la detección del ARNm del péptido neurotensina (NTS) en células de tumores uterinos de músculo liso. Para ello se utilizaron cortes de muestras incluidas en parafina, tal

como se ha descrito previamente. Los cortes fueron desparafinados e hidratados en agua destilada estéril.

Prehibridación

Los cortes se lavaron en tampón de prehibridación, al que se añadió proteinasa K a una concentración de 10 mg/ml, durante 30 minutos a 37 ^{o} C; y se deshidrataron en tres lavados consecutivos de alcohol absoluto.

Hibridación

Los cortes se hibridaron con un volumen de 35 µl de solución de hibridación (tampón de hibridación más sonda marcada) durante toda la noche en una cámara húmeda a 42° C.

Marcaje de la sonda con Biotina 16 ddUTP

La sonda utilizada fue un oligonucleótido sintético de 48 nucleótidos complementaria a una región de la secuencia del ARNm del gen neurotensina/neuromedina N, iniciado en el nucleótido 595 y finalizado en el 547, en dirección 5' → 3'.

5'→

GGCCC GGCTG CGGCA GATCT TCTGG AGTTG GAATA CGGTC AGCAG CGC

→3'

El marcaje se llevó a cabo en el extremo 3' del oligonucleótido usando el método de la transferasa terminal. La cantidad de sonda utilizada para la reacción de marcaje fue de 50 ng (2.5 μl), incubada en agua estéril hasta completar un volumen total de 11.5 μl y se dejó durante 5 minutos a 65° C para romper las estructuras secundarias. Se pasó rápidamente a hielo y se añadió de forma secuencial: 4 μl de tampón de la enzima transferasa terminal, 2.5 μl de biotina 16ddUTP (nmol/μl) y 2 μl de transferasa terminal (Gibco BRL) (15 μg/μl). Posteriormente, se mezcló en un agitador vórtex, se dio un pulso de centrífuga y se incubó durante dos horas a 37 ° C. Concluida la incubación se paró la reacción añadiendo 1 μl de EDTA 0.5M, pH 8 y 1 μl de ARNt de levadura. A continuación se precipitó la sonda añadiendo 1/10 vol. de NaCl 4M y 2.5 vol. de etanol 100°. Se dejó precipitando durante toda la noche a -20° C. Al día siguiente se centrifugó durante 1 hora a 4 ° C, se decantó, se lavó el exceso de sales y se resuspendió la sonda en 50 μl Tris-EDTA. A continuación se guardaron a -20 °C hasta el momento de utilizarla.

La cantidad de sonda marcada que se pone a cada porta es de 4 ng estimándose previamente mediante el procedimiento de Dot Blot utilizando una serie de diluciones hechas a partir de una solución stock de concentración conocida.

Posthibridación

Los portaobjetos se lavaron en una disolución SSC 4X (0,6 M de NaCl y 0,06 M de citrato sódico) a 4° C hasta que los cubreobjetos se cayeron por sí solos. A continuación se lavaron durante 1 hora con una solución SSC 1X a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo fueron sometidos a lavados con SSC 1X a 40 ^{o} C (1 hora), SSC 0,1X a 40 ºC (1 hora), con tampón STMT a pH 7,5 (5 minutos). Posteriormente se saturaron con caseína al 1% en tampón STMT y se incubaron con estreptavidina conjugada con la enzima fosfatasa alcalina (1:100) durante 30'. Tras la incubación, se lavaron en STMT, en STM a pH 9,5 durante 20' y en STM 0,1 M a pH 9,5 durante 5'. Finalmente, se revelaron con una mezcla de dos sustratos, BCIP (5-Bromo-4Cloro-3-indolil-fosfato) y NBT (nitroblue tetrazolium) diluidos en tampón STM 0,1M y se para la reacción en un baño de STMT, a continuación se lavan los cortes en agua destilada durante 1 hora y finalmente, se montan con glicerina tamponada.

Controles de especificidad de la reacción

Los controles de especificidad que se realizaron fueron: control mediante la omisión de la sonda, control con exceso de sonda no marcada y control previo tratamiento con una disolución de ARNasa A.

2.3. OBTENCIÓN Y ESTUDIO DE LAS IMÁGENES

El material procesado para las técnicas histológicas, inmunohistoquímicas y de hibridación *in situ* fue observado con un microscopio óptico Leica DM4000B (Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL, USA). Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital de la misma casa comercial, modelo DFC300FX. Las imágenes capturadas se analizaron mediante el software Leica Q-Win v3.2.

2.3.1. ANÁLISIS CUANTITATIVO

Las muestras utilizadas para cuantificación, se tiñeron con una coloración de fondo que permitió visualizar los núcleos de las células, tanto las inmunorreactivas, con inmunorreacción citosólica, como los núcleos no inmunorreactivos. Para ello se utilizó un colorante de color diferente al del cromógeno utilizado durante el revelado de la reacción inmunohistoquímica:

- **Tinción de fondo con hematoxilina:** Una vez finalizado el revelado de la reacción con DAB, se tiñó 30’’con hematoxilina.
- **Tinción de fondo con rojo neutro:** Una vez finalizado el revelado de la reacción con Cl-Naftol (color azul), se lavaron los portaobjetos en agua destilada, y después se tiñeron con rojo neutro al 1% en agua destilada durante 2 minutos. Finalizado el

tiempo se lavaron con agua destilada y después con tampón tris-salino. Tras este paso, se montaron los cortes con cubreobjetos utilizando glicerina tamponada.

Se contaron dos cortes por muestra. En cada corte se contaron entre 10 y 14 campos al azar. Con estos valores se calculó la media aritmética para REα, REβ, Ki-67 y NTS. Se cuantificó el número de células musculares inmunorreactivas en miometrio sano y en tejidos uterinos neoplásicos. Las células musculares lisas son fusiformes y debido a ello el número de células observado por cada campo varía sensiblemente en función de si la fibra muscular se ha cortado longitudinal o transversalmente. Para evitar errores derivados de esta característica se tomaron las siguientes precauciones:

1. **Se fotografiaron** campos dónde la mayor parte de fibras musculares estuviesen seccionadas longitudinalmente.
2. **Se evitó** la presencia de tejido conjuntivo en las imágenes; en las ocasiones en que no fue posible, se utilizaron las herramientas del software Leica Q-Win para excluir dicho tejido del recuento.

Se calculó el porcentaje de células inmunorreactivas (C) por unidad de área. Para ello, se cuantificó el número de células inmunorreactivas (C_i) y se dividió entre el número de células totales (C_t). La unidad de área utilizada fue el marco de medida del programa Leica Q-Win (350 µm x 250 µm =87500 μm^2).

$$C = \frac{C_i\,\mu m^2}{C_t\,\mu m^2} \cdot 100$$

En los análisis estadísticos los datos cuantitativos se expresaron como media aritmética ± error estándar. Los datos se analizaron utilizando el programa SPSS v17.0.3. Los grupos de medias con distribución normal fueron analizados mediante el test de la T-Student o el test de ANOVA de una vía, utilizando pruebas Post-Hoc para comparación entre grupos, según los casos. La significación estadística se indicó para valores de $p < 0,05$.

2.3.2. ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO

Para el cálculo del ratio entre receptores REα y REβ se utilizó la siguiente estimación (D'Angelo, 2009): se multiplicó el valor obtenido del análisis cuantitativo, (porcentaje de células inmunorreactivas), por el factor de intensidad. Dicho factor toma valores de 0, 1, 2 ó 3, correspondiéndose con ausencia de reacción, intensidad leve, intensidad moderada e intensidad fuerte, respectivamente.

*2.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARNm-*RNT1 *POR RT-PCR*

La reacción en cadena de la polimerasa, PCR, es una técnica que permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ácido nucleico particular, partiendo de un molde. La variante RT-PCR permite obtener el ADNc a partir de un ARNm molde. Se utilizó para el análisis molecular del NTSR1.

2.4.1. EXTRACCIÓN DE ARNm

Las muestras se conservaron en RNA later (Sigma Aldrich Co., Madrid, España) a -20 ^{o} C. Se homogenizó 20 mg de tejido utilizando tubos Lysing Matriz A (MP Biomedicals, Illkirch, Francia), en 1 ml de tampón de lisis RA1 (GeHealthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden), según indicaciones del fabricante.

El ADN genómico residual fue eliminado mediante incubación de las muestras de RNA con DNaseI y RNasain libre de RNasa (Promega, Madison, USA). La efectividad del tratamiento con DNasa se confirmó mediante control negativo de RT-PCR. El primer stran cDNA se sintetizó de 2 µg de RNA, utilizando la transcriptasa inversa del virus de leucemia murina Molones (M-MLV), RNasa H Minus, Point Mutant (Promega, Madison, USA) y hexámeros aleatorios como indican las instrucciones del fabricante.

Nombre del cebador	Región 5'	Región 3'	Secuencia
1-2F	Exón 1	Exón 2	AGGTCGTCATACAG***GTCAAC***
1-3F	Exón 1	Exón 3	AGGTCGTCATACAG***GTGCAG***
1-4F	Exón 1	Exón 4	AGGTCGTCATACAG***GTTCCT***
4-3R	Exón 4	Exón 3	GGTAGAAGTCATAGAGGAA***CGGACT***
4-Int3r	Exón 4	Intrón 3	TGGTAGAAGTCATAGAGGAA***CTTGTC***
4R	Exón 4	Exón 4	GGTTGTACAGGATGGGGTTG
4-AR	Exón 4	Exón 4	CAGGCTCCTCCTGGACAC
PPP1CB-F			AACCATGAGTGTGCTAGCATCA
PPP1CB-R			CACCAGCATTATCAAACTCGCC
ECA-1F			CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT
ECA-1R			GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT

TABLA 4: SECUENCIA DE LOS CEBADORES FORWARD (F) Y REVERSE (R) UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR EL ARNM DE LAS ISOFORMAS DEL NTSR1. LAS SECUENCIAS DE LOS CEBADORES DEL GEN HOUSEKEEPING PPP1CB TAMBIÉN SE INCLUYE.

*Publicado: Peptides. 2010 Feb;31(2):242-7. Epub 2009 Dec 14

La mezcla para PCR contiene 0,2 μM primers, 0,2 μl Phire Hot Stara DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finlandia), 1,5 mM MgCl2, 200 μM dNTPs y una dilución 1/10 de cDNA para un volumen final de 20 μl. La PCR incluye una desnaturalización inicial a 98° C durante 30s y 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: 10s a 98° C, 10s a 60° C y 15s a 72° C. La isoforma de la proteina (phosphatase-1 housekeeping gene), PPP1CB, sirvió como control para las reacciones RT-PCR con 25 rondas de amplificación.

2.4.2. DETECCIÓN Y ANÁLISIS DE PRODUCTOS PCR

El producto de la PCR se analizó mediante electroforesis. Para ello, 5 μl del producto de PCR se corrieron en gel de agarosa al 1,7% en tampón EDTA-tris-borato. Se detectó mediante tinción con bromuro de etidio. El tamaño de los productos fue verificado por la comparación con marcadores de masa y la identificación de cada producto PCR fue establecida por anális de secuencia en La Universidad de La Laguna. Para ello, se utilizó el kit DYEnamic ET Dye Terminador Cycle Sequencing Kit (GeHealthcare Bio-Sciences, AB, Uppsala, Sweden). Las reacciones de secuenciación se realizaron en un MegaBACE 1000 DNA Análisis Systma (GeHealthcare Bio-Sciences, AB, Uppsala, Sweden). Los electroferogramas se visualizaron con el software Chromas (Technelysium Pty. Ltd).

2.5. PROCESAMIENTO DE DATOS PARA EL ESTUDIO CASOS – CONTROLES DE FACTORES ASOCIADOS A LAS HORMONAS ESTEROIDEAS EN RELACIÓN A LOS LEIOMIOMAS

El perfil de la mujer a la que sería aplicable los resultados del estudio se describe resumiendo las características de la muestra con las frecuencias relativas de sus categorías e intervalos de confianza al 95% para las variables nominales, mediana (P_5-P_{95}) para las ordinales y media±1,96SD para las de escala normal.

Las comparaciones de variables entre mujeres con leiomiomas y controles se realizaron con la prueba χ^2 de Pearson para las variables nominales y de escala convertidas en categorías y con la U de Mann-Whitney para las de escala no normal.

Con ayuda de modelos de regresión logística binaria empleando esa condición como variable dependiente, se estiman los odds ratio del IMC (sobrepeso y obesidad respecto a normopeso), la actividad ovárica (no haber alcanzado la menopausia) y la edad, como proxys de las condiciones hormonales internas, y de los tratamientos hormonales (FIV y duración de tratamiento con ACO), como condiciones hormonales externas, con sus intervalos de confianza al 95%. Estos factores se consideran como potenciales predictores en el modelo, independientemente de la significación de su diferencia simple entre casos y controles para considerar posibles interacciones. Los modelos se ajustan empleando la estrategia backward y criterio de Wald. Con la ecuación de regresión logística obtenida se estimó el índice de asociación de cada variable con la

presencia de leiomiomas. Todas las pruebas se realizaron a un nivel de significancia bilateral de 0,05 y los cálculos se ejecutaron con el paquete estadístico SPSS v17.0.3.

El presente estudio forma parte del Proyecto de Investigación "Estrógenos y medio ambiente en la salud femenina", aprobado por el Comité Ético del HUC y subvencionado por FUNCIS (Fundación Canaria de Investigación Sanitaria) e ICIC (Instituto Canario de Investigación del Cáncer)

RESULTADOS

Resultados

1. DISTRIBUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN CELULAR DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS α Y β EN TUMORES UTERINOS DE MIOMETRIO EN RELACIÓN AL MIOMETRIO SANO.

En este primer punto se estudió la distribución celular y subcelular de los dos tipos clásicos de receptor de estrógeno: REα y REβ, en leiomiomas, leiomiomas atípicos y leiomiosarcomas en relación al miometrio sano. La distribución en miometrio y leiomioma se estudió tanto en muestras de mujeres en edad fértil como en menopausia.

En el miometrio, si bien existe una cantidad variable de tejido conjuntivo con sus respectivos componentes celulares como fibroblastos y células cebadas o células endoteliales de los vasos sanguíneos, las células musculares lisas son el principal componente funcional. Estas células son las que proliferan fisiológica o patológicamente, siendo el origen de los tumores uterinos de miometrio. Por esta razón fueron el objeto principal de este estudio.

Tanto el miometrio sano como el tejido correspondiente a las neoplasias estudiadas, LM, LA y LMS, presentaron células inmunorreactivas para los receptores de estrógenos si bien su distribución, frecuencia y localización subcelular fue diferente para cada tipo de receptor y variable dependiendo del tipo de tumor. La localización subcelular se consideró nuclear o citosólica cuando la inmunorreacción estuvo presente en más del 90% de las células.

1.1. RECEPTOR DE ESTRÓGENO ALFA

TEJIDO SANO

El miometrio sano presentó inmunorreactividad para el receptor de estrógeno alfa (REα-ir) en el (46%) de las células de músculo liso. La distribución subcelular del receptor fue variable según los casos. En la mayoría de las muestras, la localización fue nuclear (FIG. 8A). En algunos casos, la REα-ir se localizó en el citoplasma y en un escaso número de muestras se observó REα-ir tanto en el núcleo como en el citoplasma. Estas variaciones se observaron en muestras procedentes de mujeres en edad fértil. En muestras de mujeres menopáusicas, la localización subcelular fue sólo nuclear (FIG. 8B).

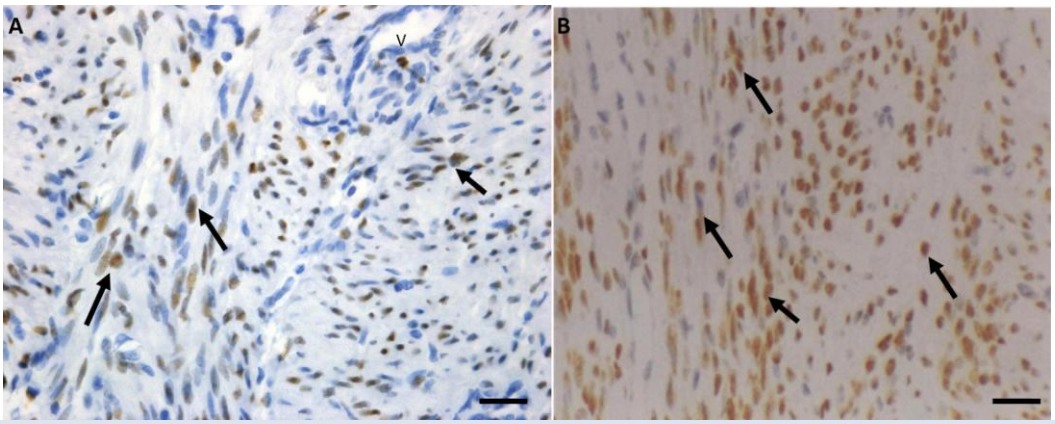


FIGURA 8. INMUNORREACTIVIDAD PARA REα EN CÉLULAS MUSCULARES DE MIOMETRIO. (A) Miometrio de mujer en edad fértil. Las flechas señalan células musculares REα-ir (inmunorreactividad de color marrón), (v) vaso sanguíneo. (B) Miometrio de mujer menopáusica. Las flechas señalan núcleos de células musculares REα-ir (color marrón). (A, B) Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina que tiñe de azul los núcleos no inmunorreactivos. Barra: 250µm.

TEJIDO TUMORAL

En los **leiomiomas**, la inmunorreacción para REα no presentó diferencias significativas con respecto al miometrio, ni en el número de células, (47%), ni en su localización subcelular (FIG. 9A). Como ocurría en el miometrio, la inmunorreacción se observó principalmente en el núcleo, pero también se observó en el citoplasma solo o en ambos (FIG. 9B, C). En las muestras procedentes de mujeres menopáusicas, en general hubo una inmunorreacción más intensa que en las de edad fértil (FIG. 9D). En los leiomiomas de crecimiento rápido (LM_{CR}) se observaron células musculares REα-ir muy escasas (0,2%) o, en la mayoría de los casos, estuvo ausente (FIG. 9E)

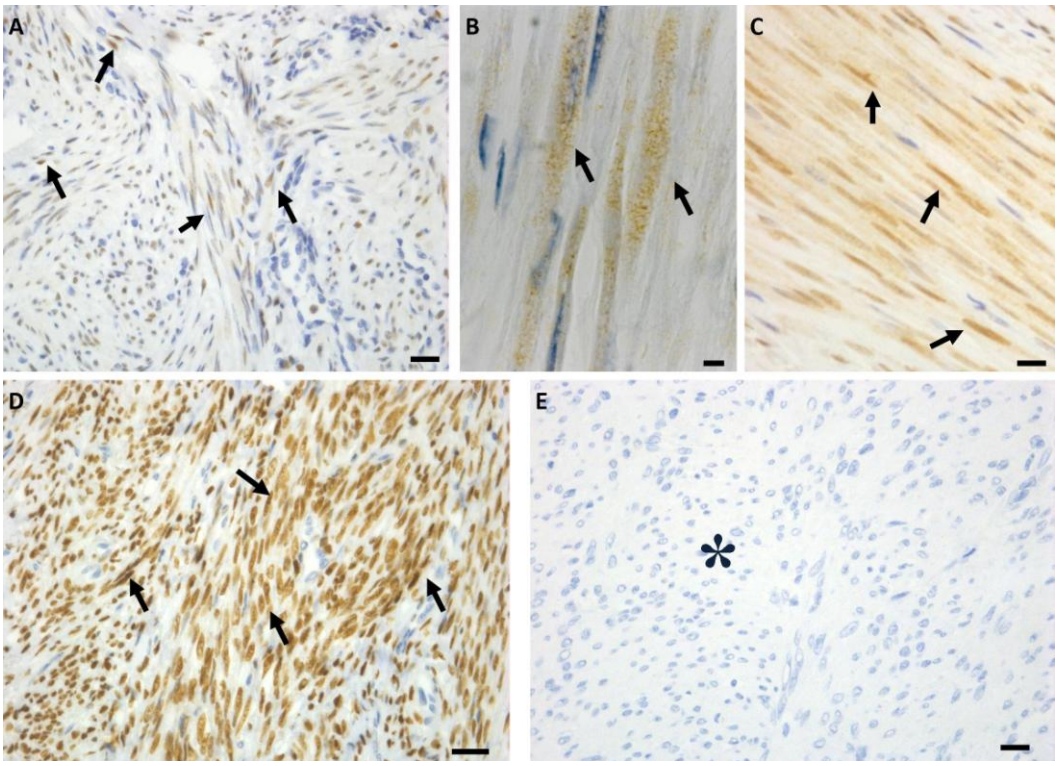


FIGURA 9. PRESENCIA DE REα-IR EN LEIOMIOMAS DE MUJERES EN EDAD FÉRTIL Y EN MENOPAUSIA. (A, B, C) Leiomioma de mujeres en edad fértil. Las flechas indican las células REα-ir. (B) Las flechas señalan células REα-ir con inmunorreacción citoplásmica. (C) Células REα-ir con inmunorreacción nuclear y citoplásmica. (D) Leiomioma de mujer menopáusica. Numerosas células con núcleos REα-ir(Flechas). (E) Ausencia de células REα-ir (*) en tejido leiomiomatoso de crecimiento rápico. Núcleos azules teñidos con Hematoxilina. Barra: (A, D) 200 µm; (B) 50 µm; (C, E) 100 µm.

En los **leiomiomas atípicos,** se observaron células de músculo liso REα-ir (FIG. 10). El número de células inmunorreactivas en estos tumores, fue menor, 16%, comparado con los LM, 47%. La inmunorreactividad fue mayoritariamente nuclear (FIG. 10A) aunque se observaron algunas células musculares con reacción citoplásmica.

En los **leiomiosarcomas,** se observó una reducción importante del número de células REα-ir, aunque no fue la misma en todos los casos (FIG. 10B, 10C). En algunas muestras la presencia de inmunorreacción para el REα fue detectado débilmente en un 12% de las células (FIG. 10B), mientras que en otros, prácticamente no se encontraron células inmunorreactivas (FIG. 10C). En todos los casos en que hubo células REα-ir, la localización fue mayoritariamente nuclear.

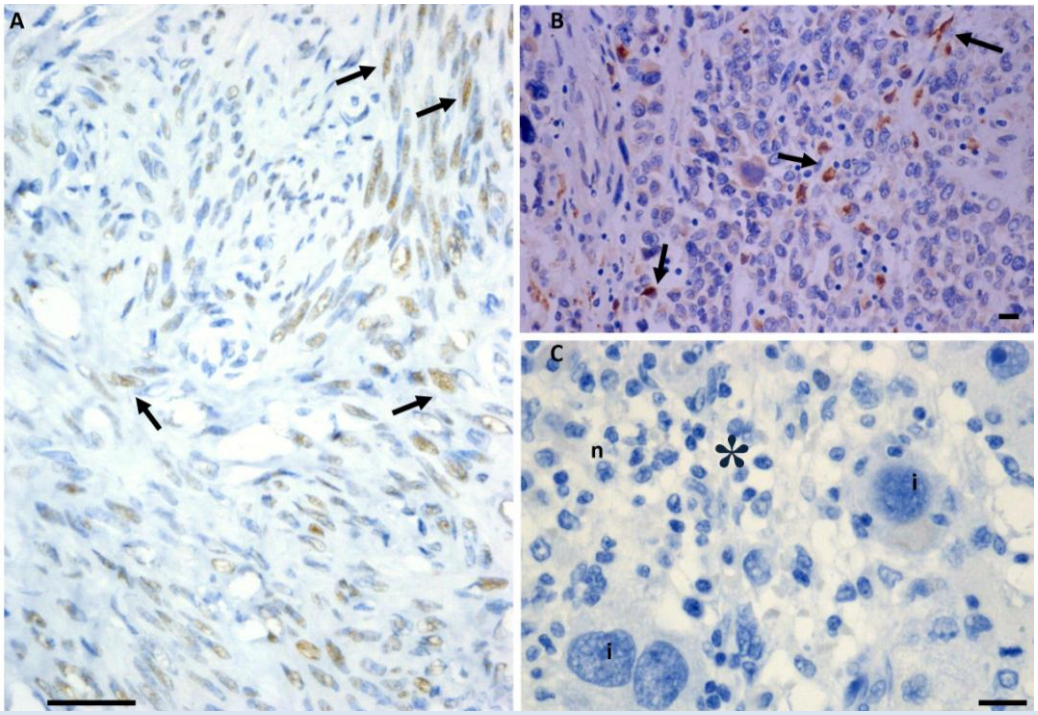


FIGURA 10. PRESENCIA DE REα-IR EN CÉLULAS MUSCULARES DE LEIOMIOMAS ATÍPICOS Y LEIOMIOSARCOMAS. (A) Las flechas indican núcleos REα-ir en células musculares de leiomioma atípico. (B) REα-ir en leiomiosarcoma. Las flechas indican núcleos inmunorreactivos. (C) Leiomiosarcoma con ausencia de inmunorreacción para el receptor de estrógeno alfa (n) células necróticas, (i) células indiferenciadas. Núcleos teñidos con hematoxilina. Barra: (A) 250 µm; (B, C) 50 µm.

1.2. RECEPTOR DE ESTRÓGENO BETA

TEJIDO SANO

Las células del tejido muscular del miometrio presentaron inmunorreacción para el REβ. El número de células REβ-ir fue un 12% del total, con una localización subcelular mayoritariamente nuclear en todos los casos (FIG. 11).

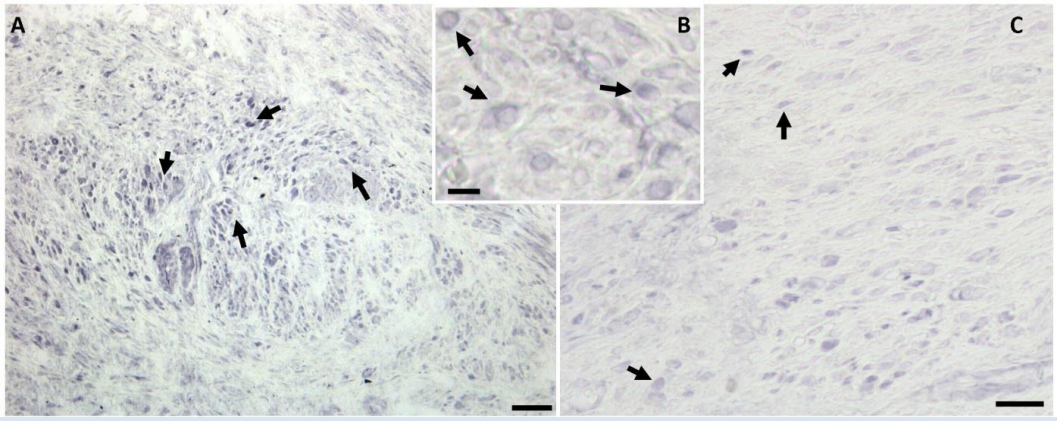


FIGURA 11. PRESENCIA DE REβ-IR EN CÉLULAS DE MIOMETRIO DE MUJER EN EDAD FÉRTIL Y EN MENOPAUSIA. (A) Miometrio de mujer en edad fértil; la localización subcelular del REβ fue nuclear (flechas); barra 400 µm. (B) Detalle de células REβ con reacción nuclear (flechas) en miometrio en edad fértil, barra 50 µm. (C) Presencia de REβ en miometrio de mujer menopáusica; las flechas señalan células musculares con reacción en el núcleo, barra 150 µm.

TEJIDO TUMORAL

En los **LMs**, la inmunorreactividad para el REβ estuvo ampliamente distribuida ya que se detectó en las células endoteliales, en algunas células del tejido conjuntivo y en las células de músculo liso (FIG. 12A, B, C). Tanto en el endotelio como en células de tejido conjuntivo, la localización subcelular de la inmunorreactividad para REβ, fue nuclear con la excepción de las células cebadas, dónde se localizó en gránulos de secreción citoplásmicos (FIG. 12D, E). En el tejido muscular, la reacción fue nuclear (FIG. 12D). No obstante su presencia en las células musculares lisas fue muy variable, con un promedio de 31% de células inmunorreactivas, 2,5 veces más alto que en el M. Como en el caso del REα, se apreció mayor intensidad de reacción en las pacientes menopáusicas. En los leiomiomas diagnosticados como de

crecimiento rápido, células REβ-ir fueron muy escasas (0,9%), o estuvieron ausentes (FIG. 5F).

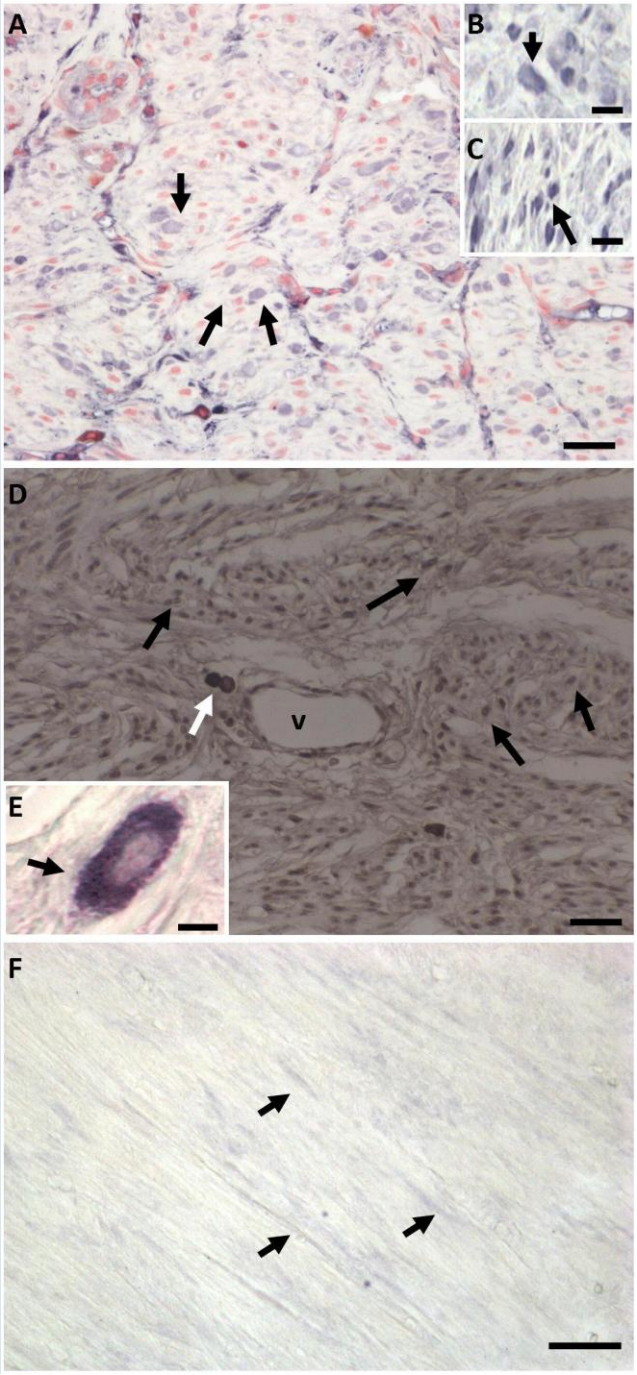
FIGURA 12. PRESENCIA DE REβ-IR EN LEIOMIOMAS DE MUJERES EN EDAD FÉRTIL Y EN MENOPAUSIA.

(A) Leiomioma de mujer en edad fértil, las flechas indi-can núcleos celulares REβ-ir; barra 250 µm. (B, C) Detalle de reacción nuclear. Barra 50 µm.

(D) Leiomioma de mujer me-nopáusica. Las flechas señalan células inmu-norreactivas, con la reacción localizada en el núcleo. Célula cebada REβ-ir (flecha blanca). Barra 250 µm.

(E) Detalle de célula cebada (flecha) en un leiomioma con gránulos REβ-ir. Barra 50 µm.

(F) REβ-ir en leiomioma de crecimiento rápido. Las flechas indican células REβ-ir con localización citoplasmática. Barra 250 µm.



Characterization of estrogen receptors alpha and beta in uterine leiomyoma cells. **Fertil Steril.** 2006 Dec;86(6):1736-43. Epub 2006 Sep 29.

LM_{CR}	EDAD	REα	REβ
1	29	—	—
2	37	+	+
3	37	—	—
4	40	—	—
5	43	—	+
RECUENTOS		REα	REβ
LM		46±23	28±15
LM_{CR}		**0,2±0,4**	**0,9±1,4**

TABLA 5: COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS INMUNORREACTIVAS DE LEIOMIOMAS (LM) Y LEIOMIOMAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO (LM_{CR}).

REα (p=0,002)
REβ (p=0,004)

En los **leiomiomas atípicos** aumentó el número de células musculares REβ-ir, 59%, respecto de los leiomiomas. El número de células REβ-ir fue 5,2 veces superior al del M y 2 veces el encontrado en LMs. La localización de la reacción fue principalmente nuclear, aunque aumentó la cantidad de células que presentaron inmunorreactividad para el REβ en el citoplasma (FIG. 13).

En los **leiomiosarcomas,** el número de células REβ-ir, 63%, mostró una mayor variabilidad respecto al de los leiomiomas atípicos, si bien la localización subcelular fue exclusivamente citoplasmática (FIG. 14). El número de células REβ-ir en los LMSs fue 5,4 veces superior al miometrio y 2,4 veces respecto del leiomioma. Además, el 100% de los casos estudiados presentaron células REβ-ir, tanto las que conservaban su diferenciación (FIG. 14A), como las completamente indiferenciadas (FIG. 14B).

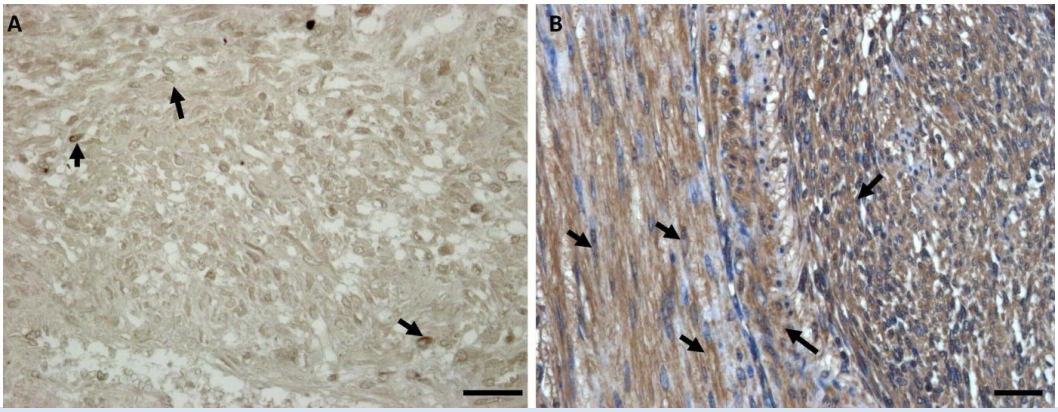


FIGURA 13. PRESENCIA DE REβ-IR EN LEIOMIOMAS ATÍPICOS. (A) REβ-ir en células de músculo liso de LA con localización nuclear (flechas). Barra 250 µm. (B). Citoplasmas REβ-ir en células musculares de leiomioma atípico. El color azul corresponde a una tinción de fondo con hematoxilina. Barra: 250 µm.

Comparative analysis of the ERα/ERβ ratio and neurotensin and its high-affinity receptor in myometrium, uterine leiomyoma, atypical leiomyoma, and leiomyosarcoma. Int J Gynecol Pathol. 2011 Jul;30(4):354-63.

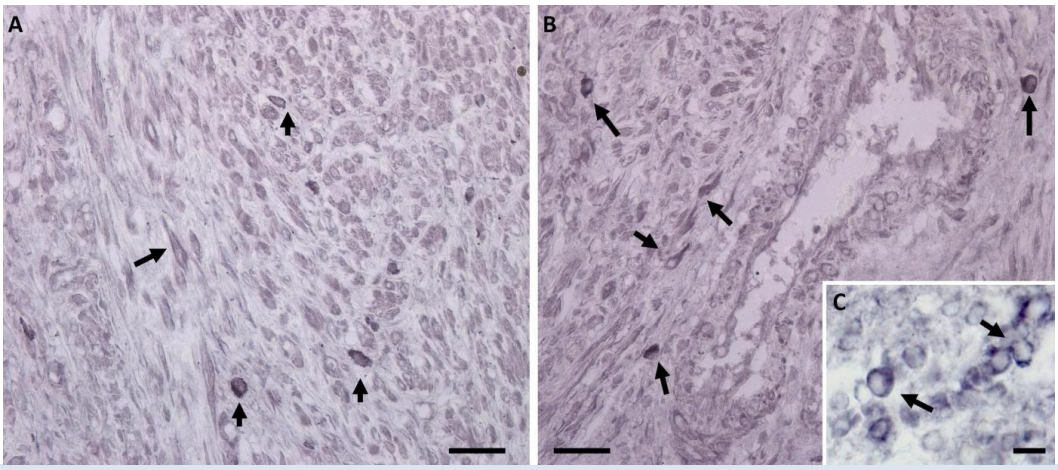


FIGURA 14. PRESENCIA DE REβ-IR EN LEIOMIOSARCOMAS. (A, B) REβ inmunorreactividad en el citoplasma de células musculares de leiomiosarcoma (flechas). Barra 250 µm. (C) Detalle de esta reacción citoplasmática en células indiferenciadas. Barra 50 µm.

1.3. ESTUDIO CUANTITATIVO. RATIO REα/REβ en M, LM, LA y LMS

En primer lugar, se compararon los valores medios obtenidos respecto al número de células musculares inmunorreactivas, para ambos receptores, REα y REβ, en los cuatro grupos de estudio (TABLA 6), resultando las diferencias entre ellos estadísticamente significativas (FIG. 15A, $p<0,001$). La comparación entre los valores medios para ambos receptores dentro de cada grupo también mostró diferencias estadísticamente significativas (FIG. 15A $p<0,005$). La comparación entre grupos del REα no mostró diferencias entre el miometrio y el leiomioma pero sí hubo una diferencia muy significativa cuando se comparó el M con LA y LMS (FIG. 15A, $p<0,000$). En el caso del REβ encontramos diferencias significativas no sólo cuando comparamos el miometrio con el leiomiosarcoma y el leiomioma atípico, sino también con el leiomioma (FIG. 15A, $p<0,000$). Las diferencias entre los valores medios de células REα-ir y REβ-ir, no fueron significativas cuando se comparó LA y LMS.

Con estos datos se calculó la estimación (ver material y métodos, pág. 17) para REα y REβ, en cada muestra y luego el valor medio de dicha estimación para cada grupo (TABLA 6). Basándonos en esta estimación se calculó el valor del ratio REα/REβ, para cada muestra y el valor medio para cada grupo. Los valores del ratio REα/REβ variaron desde 10,73 en el miometrio hasta 0,06 en el leiomiosarcoma (FIG. 15B). Este valor fue inferior a 1 en LA y en LMS, mientras que para LM y M siempre fue superior a 1(FIG. 15B).

	REα (+)	REβ (+)	Puntuación REα	Puntuación REβ	Ratio REα/ REβ
Tejido	n/N	n/N	Media	Media	REα/ REβ
M	17/17	17/17	83,45	16,66	10,73
LM	20/20	20/20	81,39	54,56	4,08
LA	8/10	10/10	22,71	104,99	0,23
LMS	4/11	11/11	12,28	146,24	0,06

n/N: número de muestras positivas/número de muestras totales.

TABLA 6: ESTIMACIÓN PARA CADA RECEPTOR, ASÍ COMO EL VALOR DEL RATIO ENTRE AMBOS RECEPTORES PARA CADA GRUPO ESTUDIADO.

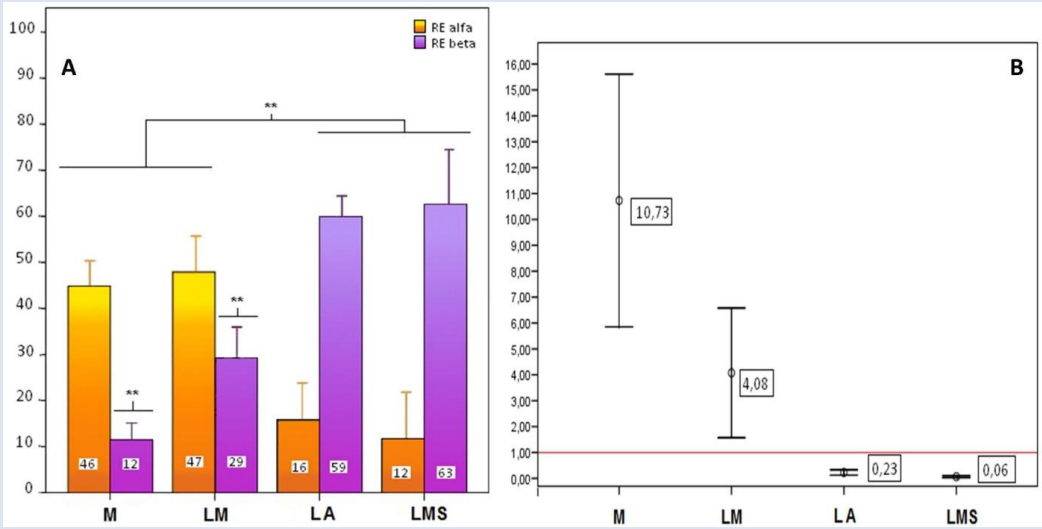


FIGURA 15. A PORCENTAJES DE CÉLULAS REα Y REβ INMUNORREACTIVAS, Y REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL RATIO REα/REβ EN MIOMETRIO (M), LEIOMIOMA (LM), LEIOMIOMA ATÍPICO (LA) Y LEIOMIOSARCOMA (LMS). (A) El histograma muestra la media (± desviación típica) del número de células REα-ir (naranja) y REβ-ir (violeta) en los grupos estudiados. La diferencia entre grupos fue estadísticamente significativa (p<0,001), indicada por el doble asterisco **. (B) Representación del valor medio del ratio (± desviación típica) para cada grupo.

Comparative analysis of the ERα/ERβ ratio and neurotensin and its high-affinity receptor in myometrium, uterine leiomyoma, atypical leiomyoma, and leiomyosarcoma. Int J Gynecol Pathol. 2011 Jul;30(4):354-63.

2. DETECCIÓN DE INMUNORREACTIVIDAD PARA LA ENZIMA AROMATASA Y EL FACTOR DE PROLIFERACIÓN Ki-67. CORRELACIÓN CON EL RATIO REα/REβ

2.1. ENZIMA AROMATASA

La aromatasa (ARO) pertenece a la superfamilia citocromo P450 de enzimas cuya función es transformar la testosterona en estradiol, lo que la convierte en una enzima clave en la producción de estrógenos en aquellas células donde se expresa. En este apartado comparamos la presencia de aromatasa en células de tejidos de los distintos grupos de tumor estudiados en relación con el miometrio sano y con el valor del ratio REα/REβ.

MIOMETRIO SANO

La presencia de aromatasa se observó sólo en células de tejido conjuntivo en el miometrio sano de muestras pertenecientes a mujeres en edad fértil (FIG. 16A). En muestras de mujeres menopáusicas se observaron además, algunas células musculares ARO-ir en el miometrio (Fig. 16B).

TEJIDO TUMORAL

En todos los tumores estudiados observamos células musculares ARO-ir (FIG. 16). La reacción se localizó en el citoplasma y mostró variabilidad entre diferentes casos del mismo tipo tumoral. Pese a ello, podemos decir que el número de células y la intensidad de la reacción fue superior en LA y LMS en comparación a lo observado en LM (FIG. 16C-F).

En el leiomioma, de igual forma que en el tejido sano, se encontraron células ARO-ir tanto en el tejido conjuntivo que rodea los vasos sanguíneos como en el que rodea los paquetes musculares. Dentro de las células presentes en el tejido conjuntivo, pudimos caracterizar a las células cebadas como ARO-ir (FIG. 16D). En el leiomiosarcoma, las células tumorales indiferenciadas también fueron ARO-ir (FIG. 15F). La presencia de células ARO-ir en cualquiera de los tejidos tumorales mostró una relación inversa al valor de ratio REα/REβ.

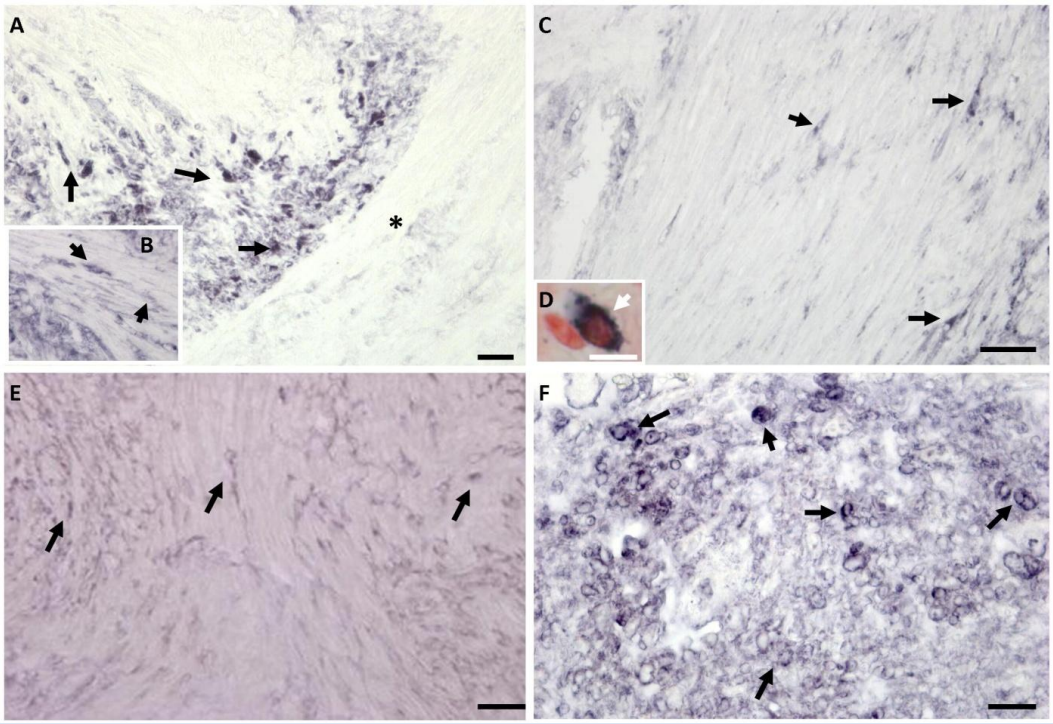


FIGURA 16. PRESENCIA DE CÉLULAS AROMATASA-IR EN MIOMETRIO, LEIOMIOMA, LEIOMIOMA ATÍPICO Y LEIOMIOSARCOMA. (A) Miometrio. Células del tejido conjuntivo ARO-ir (flechas). El tejido muscular no presentó reacción (*). Barra 500 µm. (B) Miometrio de mujer menopáusica con células musculares ARO-ir (flechas). (C) Leiomioma. Células musculares ARO-ir (flechas). Barra 500 µm. (D) Célula cebadas ARO-ir en leiomioma (flecha blanca). Barra 50 µm. Células ARO-ir (flechas) en leiomioma atípico (E) y leiomiosarcoma (F). Barra E, F, 200 µm.

2.2. FACTOR DE PROLIFERACIÓN Ki-67.

La proteína Ki-67 es un antígeno que se expresa durante el proceso de mitosis, en la parte final de la fase G2 y en la fase M. Se utiliza como marcador de la proliferación celular. En este trabajo se utilizó Ki-67 para comprobar el índice de proliferación de cada tumor y correlacionarlo con el ratio REα/REβ de cada uno de ellos.

El miometrio, el leiomioma y el leiomioma atípico mostraron una reducida cantidad de células Ki67-ir 0,42% 0,37% y 0,07% respectivamente (TABLA 7. FIG. 17, A, B Y D). El leiomioma de crecimiento rápido mostró un porcentaje significativamente mayor de células inmunorreactivas, 1,94%, y en el leiomiosarcoma se encontró la mayor cantidad, 8,27%, para el factor de proliferación Ki67 (TABLA 7. FIG. 17, D, E)

Tejido	Ki67	
M	0,42	
LM	0,37	(p=0,002)
LM_{CR}	1,94	
LA	0,07	
LMS	8,27	

***TABLA* 7: PORCENTAJE DE CÉLULAS** Ki67-ir**.** El porcentaje de células es el mismo para miometrio M y leiomioma LM, pero difiere significativamente con el leiomioma de crecimiento rápido LM_{CR}, el leiomioma atípico LA y el leiomiosarcoma LMS, (p=0,001).

Resultó de gran interés la observación de que el ratio REα/REβ disminuye significativamente en relación a un mayor índice de proliferación, determinado por la presencia de Ki-67, en LMSs, y sin embargo en LM_{CR}, que presentan un índice de proliferación mayor que en LM, la inmunorreacción para los dos tipos de receptores de estrógeno estuvo ausente.

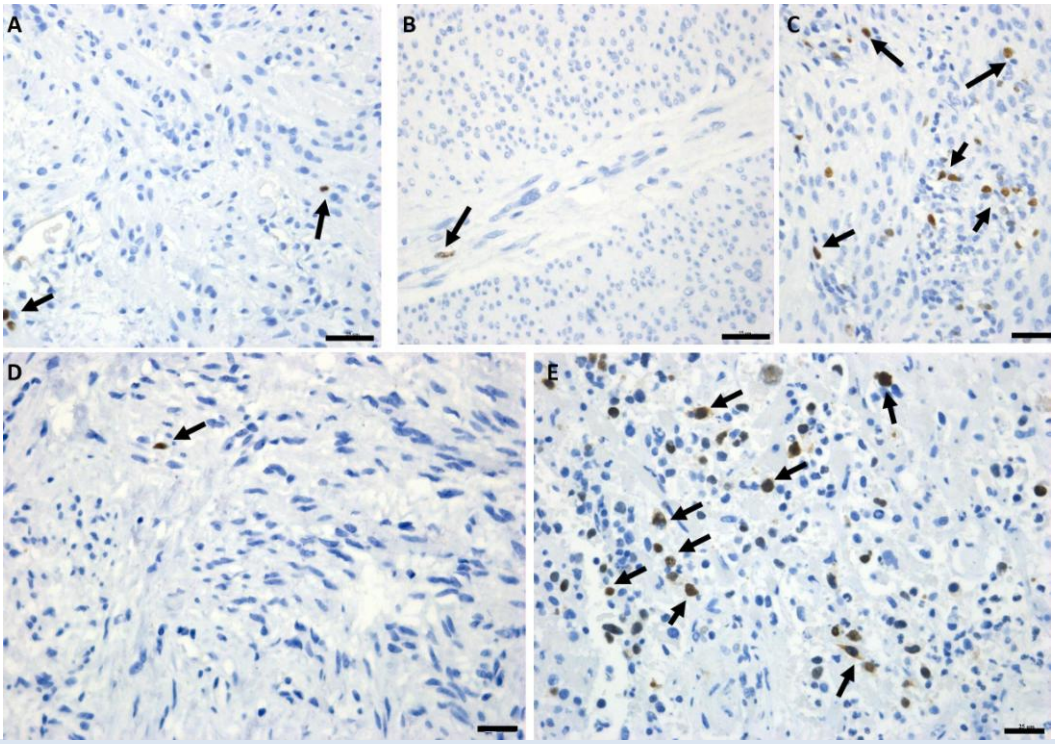


FIGURA 17. DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE KI-67. (A) Miometrio. (B) Leiomioma típico. (C) Leiomioma crecimiento rápido. (D) Leiomioma atípico. (E) Leiomiosarcoma. Flechas: Células Ki-67-ir. Barra: A, C, D, E 200 µm; B 250 µm.

3. DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL PÉPTIDO NEUROTENSINA EN LM, LA Y LMS EN RELACIÓN AL MIOMETRIO SANO.

Nuestros resultados ponen de manifiesto por una parte, que en el tejido miometrial se expresa el péptido neurotensina y por otra, que existe una diferencia clara en el patrón de expresión del péptido entre el tejido sano y las diferentes neoplasias estudiadas (FIG. 18).

3.1 PÉPTIDO NTS

NTS-ir EN TEJIDO SANO

En miometrio sano, células inmunorreactivas para NTS (NTS-ir) fueron observadas sólo en el tejido conjuntivo. Las células musculares no fueron NTS-ir (FIG. 18A).

NTS-ir EN TEJIDO TUMORAL

En los **leiomiomas**, además de las células del tejido conjuntivo, un número variable de células musculares fueron NTS-ir (FIG. 18B, C). La inmunorreacción para este péptido se localizó en el citoplasma de las células musculares siendo variable la intensidad entre los diferentes casos. La media de células musculares NTS-ir en los leiomiomas fue del 14%, independientemente de la localización del tumor. El número de células NTS-ir en los **LA** fue variable pero con una media de 69%, lo que supone casi 5 veces mayor, comparado con los leiomiomas (FIG. 18E). En los LA, la localización subcelular también fue citoplasmática, aunque en este caso la intensidad de reacción fue

similar en todas las muestras y comparativamente superior a la observada en el LM. En los **leiomiosarcomas**, casi todas las células tumorales (>90%) fueron NTS-ir. Al igual que en los casos anteriores, la inmunorreacción estuvo localizada en el citoplasma de las células tumorales indiferenciadas (FIG. 18F).

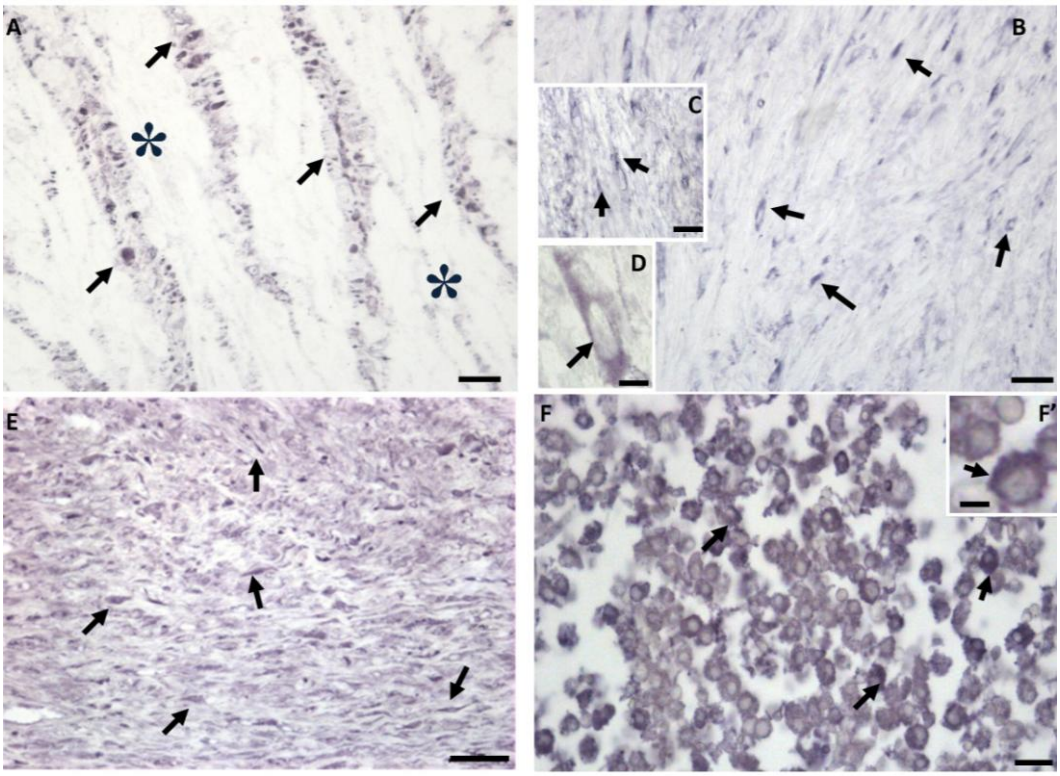


FIGURA 18. PRESENCIA DEL PÉPTIDO NEUROTENSINA EN MIOMETRIO, LEIOMIOMA, LEIOMIOMA ATÍPICO Y LEIOMIOSARCOMA. (A) Miometrio. Las flechas señalan células de tejido conjuntivo NTS-ir. El péptido está ausente en el tejido muscular (*). Barra 500 µm. (B) Leiomioma. Las flechas indican células musculares. Barra 250 µm. (C) Células musculares NTS-ir en leiomioma de crecimiento rápido. Barra 250 µm. (D) Detalle de célula muscular de leiomioma. La reacción es citoplasmática. Barra 50 µm. (E) Leiomioma atípico. Células musculares NTS-ir (flechas). Barra 250 µm. (F) Leiomiosarcoma. Las flechas indican células tumorales indiferenciadas NTS-ir. Barra 250 µm. (F') Detalle de reacción en el citoplasma de LMS (flecha). Barra 50 µm.

3.2. COLOCALIZACIÓN DEL PÉPTIDO NTS CON LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS EN LM, LA Y LMS

Mediante el método de elución-retratamiento estudiamos la colocalización del péptido neurotensina con receptores de estrógeno en las células musculares de los diferentes tipos de tumores. En los **leiomiomas**, las células musculares que fueron NTS-ir, fueron también REα-ir o REβ-ir (FIG. 19A, B). Teniendo en cuenta que las células musculares de leiomioma que son REβ-ir, mayoritariamente también son REα-ir, como demostramos por medio del método de doble marcaje, podemos decir que en estos tumores la neurotensina colocaliza con ambos receptores en las mismas células o con REα solo. En los **leiomiomas atípicos,** habíamos descrito una disminución de células REα-ir y un incremento de células REβ-ir al tiempo que un incremento de células NTS-ir. Consecuentemente, en estos tumores hay un gran número de células que sólo expresan el receptor de estrógenos beta, las cuales además, también son NTS-ir (FIG. 19C, D). Esta asociación entre la NTS y el REβ se hace más patente en el **leiomiosarcoma**, donde las células REα-ir son escasas o están totalmente ausentes. Por otro lado, el número de células REβ-ir incrementa simultáneamente a las NTS-ir, tratándose de las mismas células (FIG. 19D). De esta forma, encontramos que la proporción de células NTS-ir en las neoplasias de miometrio presenta una relación inversa con el ratio REα/REβ, aumentando a medida que el ratio disminuye.

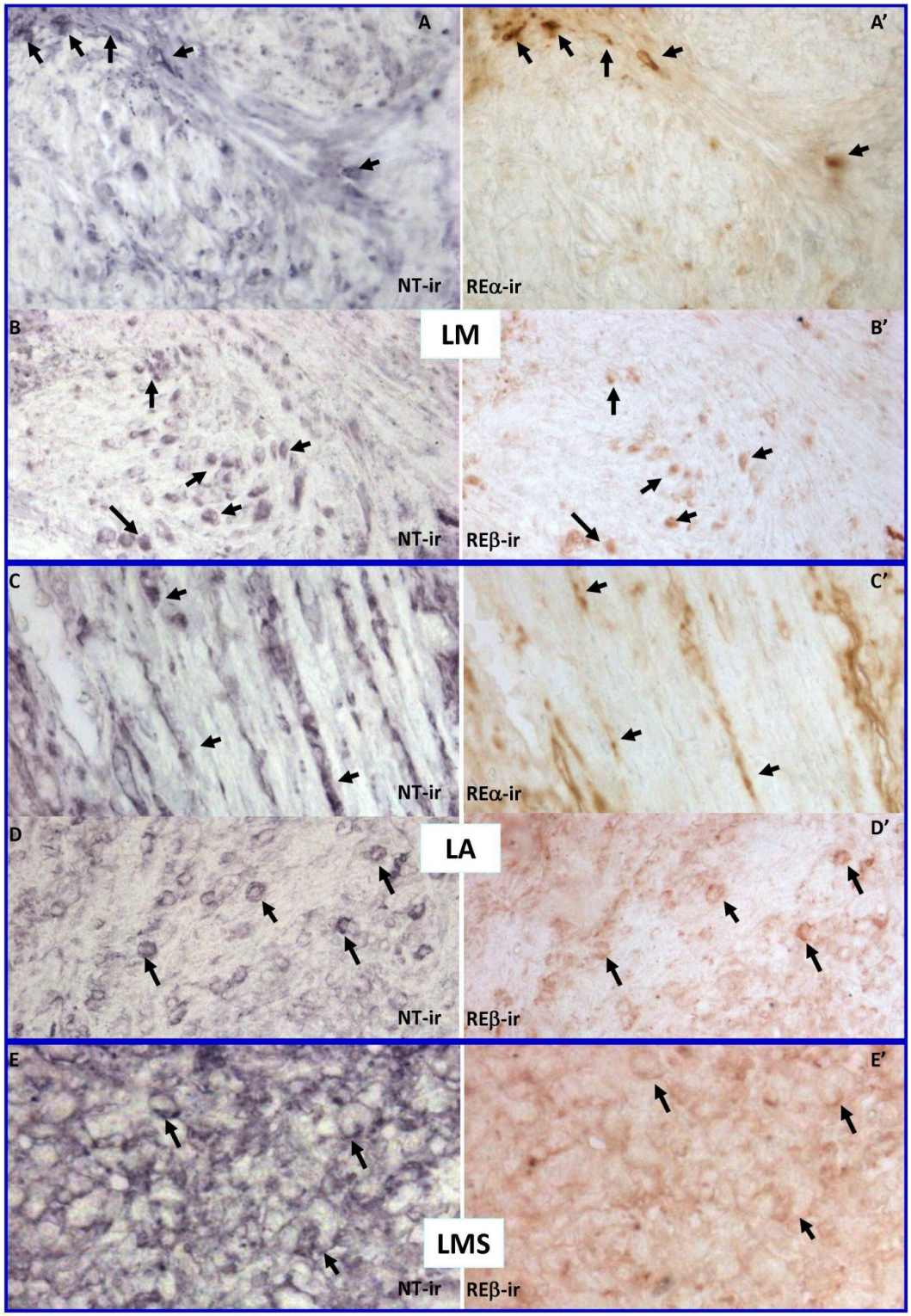

A
A'
NT-ir
REα-ir
LM
B
B'
NT-ir
REβ-ir
C
C'
NT-ir
REα-ir
LA
D
D'
NT-ir
REβ-ir
E
E'
LMS
NT-ir
REβ-ir

FIGURA 19. COLOCALIZACIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO ALFA Y BETA Y EL PÉPTIDO NEUROTENSINA EN CÉLULAS DE LEIOMIOMA, LEIOMIOMA ATÍPICO Y LEIOMIOSARCOMA.

[LM] Colocalización en leiomioma. Las flechas indican células NTS-ir (A) también REα-ir (A'). Células (flechas) NTS-ir (B) y REβ-ir (B').

[LA] Colocalización en leiomioma atípico. Las flechas señalan células NTS-ir (C) y REα-ir (C'). Células inmunorreactivas (flechas) para el péptido NTS (D) y REβ (D').

[LMS] Colocalización en leiomiosarcoma. Las flechas señalan células NTS-ir (E) y REβ-ir (E'). Barra [LM, LA, LMS] 200 µm.

Comparative analysis of the ERα/ERβ ratio and neurotensin and its high-affinity receptor in myometrium, uterine leiomyoma, atypical leiomyoma, and leiomyosarcoma. Int J Gynecol Pathol. 2011 Jul;30(4):354-63.

3.3. ESTUDIO CUANTITATIVO COMPARADO DE LAS CÉLULAS INMUNORREACTIVAS PARA NTS EN LMs PROCEDENTES DE MUJERES EN CONDICIONES HORMONALES NORMALES Y EN LMs PROCEDENTES DE MUJERES SOMETIDAS A PROCESOS DE FERTILIZACIÓN IN VITRO

Los procesos de fertilización exponen a las pacientes a dosis no fisiológicas de hormonas. Utilizamos un grupo de muestras procedentes de usuarias del Servicio de Reproducción Humana del HUC que habían sido sometidas a tratamientos de fertilización in vitro (FIV) como modelo para estudiar la acción de estas hormonas sobre la expresión de neurotensina en los tumores uterinos de músculo liso. Como describimos previamente, el número medio de células NTS-ir (Fig. 20B) en leiomiomas fue del 14%,(Fig. 20 D) independientemente de la localización del tumor. Sin embargo en los LMs de las pacientes sometidas a ciclos de FIV, el número de células

NTS-ir (Fig. 20 C) fue más de dos veces superior, siendo la media del 34% (FIG. 20D).

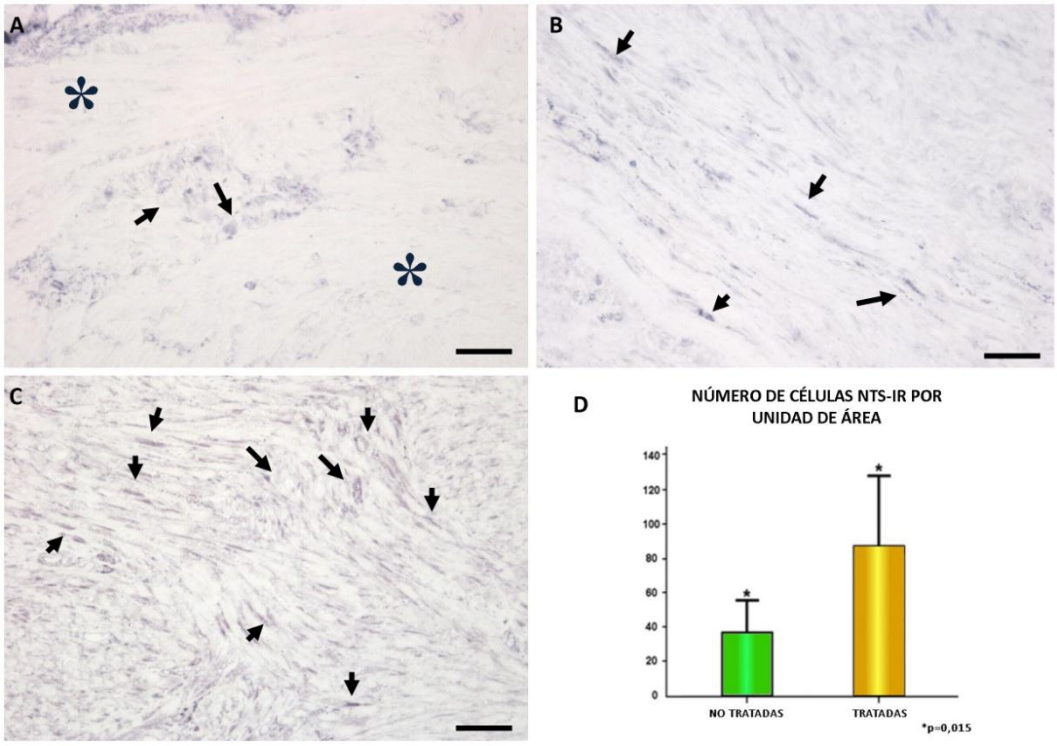


FIGURA 20 INMUNORREACTIVIDAD DEL PÉPTIDO NEUROTENSINA EN LEIOMIOMAS DE MUJERES SIN TRATAMIENTO HORMONAL Y DESPUÉS DE TRATAMIENTO DE FIV. (A) NTS en miometrio sano. Las células musculares no presentan inmunorreacción (*).Tejido conjuntivo NTS-ir (Flechas). (B) Leiomioma de mujer sin tratamiento hormonal. Células musculares NTS-ir (flechas). (C) Leiomioma de mujer después de tratamiento de FIV. Barras 250 µm. (D) Diagrama de barras que representa la media ± desviación típica de las células NTS-ir en mujeres con y sin tratamiento de FIV. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p<0,015$).

*4. DETECCIÓN DEL ARNm-*NT

Para determinar si el péptido neurotensina es sintetizado por las mismas células en las que fue detectado tanto en el tejido sano como tumoral, se estudió mediante hibridación *in situ* la expresión de

ARNm-*NTS*. Esta técnica confirmó la expresión de ARNm-*NTS* tanto en las células de tejido conjuntivo del miometrio (FIG. 21A), como en las células tumorales musculares del leiomioma (FIG.21B). En las células musculares tumorales del LA (FIG. 21C) y del LMS (FIG. 21D) también se detectó ARNm-*NTS*.

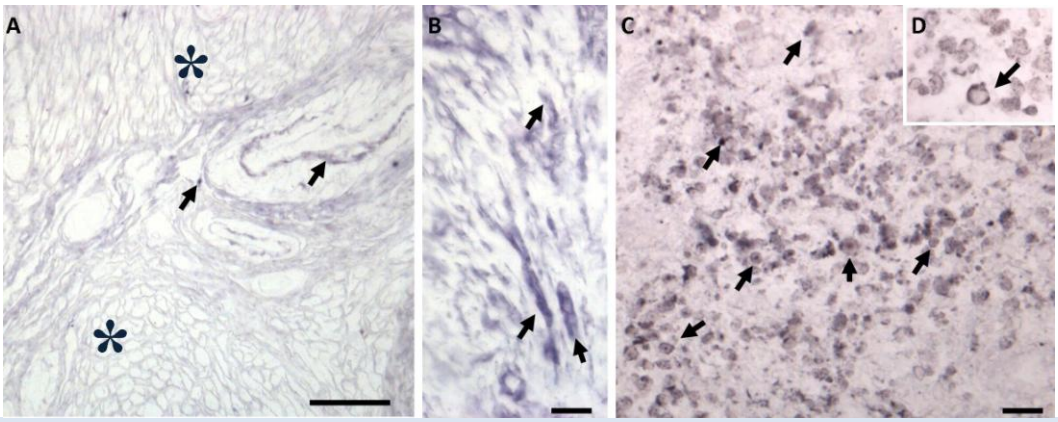


FIGURA 21. EXPRESIÓN DE ARNM-*NTS* EN TEJIDO SANO Y TUMORAL. (A) Miometrio. Células de tejido conjuntivo ARNm-NT (flechas); (v) vaso sanguíneo; barra 500 µm. (B) ARNm-*NTS* en células musculares de leiomioma. (flechas); barra 150 µm. (C) ARNm-*NTS* en células musculares de Leiomioma atípico. (flechas); barra 75 µm. (D). Células tumorales indiferenciadas de leiomiosarcoma con ARNm-*NTS* (flechas); barra 250 µm. (D') Detalle de ARNm-*NTS* en una célula de leiomiosarcoma (flechas); barra 50 µm.

5. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE NEUROTENSINA DE ALTA AFINIDAD NTSR1

5.1 DETECCIÓN DE NTSR1-IR.

TEJIDO SANO

En el tejido sano, la inmunorreacción se observó mayoritariamente en las células del tejido conjuntivo, en algunas células musculares de los vasos sanguíneos y ocasional y débilmente, en las células musculares del miometrio (FIG. 22A).

TEJIDO NEOPLÁSICO

En general, en el tejido neoplásico se observó un claro incremento de células musculares NTRS1-ir. En los **leiomiomas** y leiomiomas de crecimiento rápido se observó NTSR1-ir de forma variable tanto en células musculares como en células de conjuntivo (FIG. 22B, C). Al igual que lo observado para la presencia de NTS-ir, en los leiomiomas procedentes de mujeres que habían recibido tratamiento de fertilización in vitro hubo un incremento notable de NTSR1-ir (FIG. 22C). En los **leiomiomas atípicos** aumentó la intensidad y el número de células musculares NTSR1-ir (FIG. 22D). En leiomiosarcomas el receptor de neurotensina estuvo presente en el citoplasma de casi la totalidad de las células tumorales indiferenciadas (FIG. 22E).

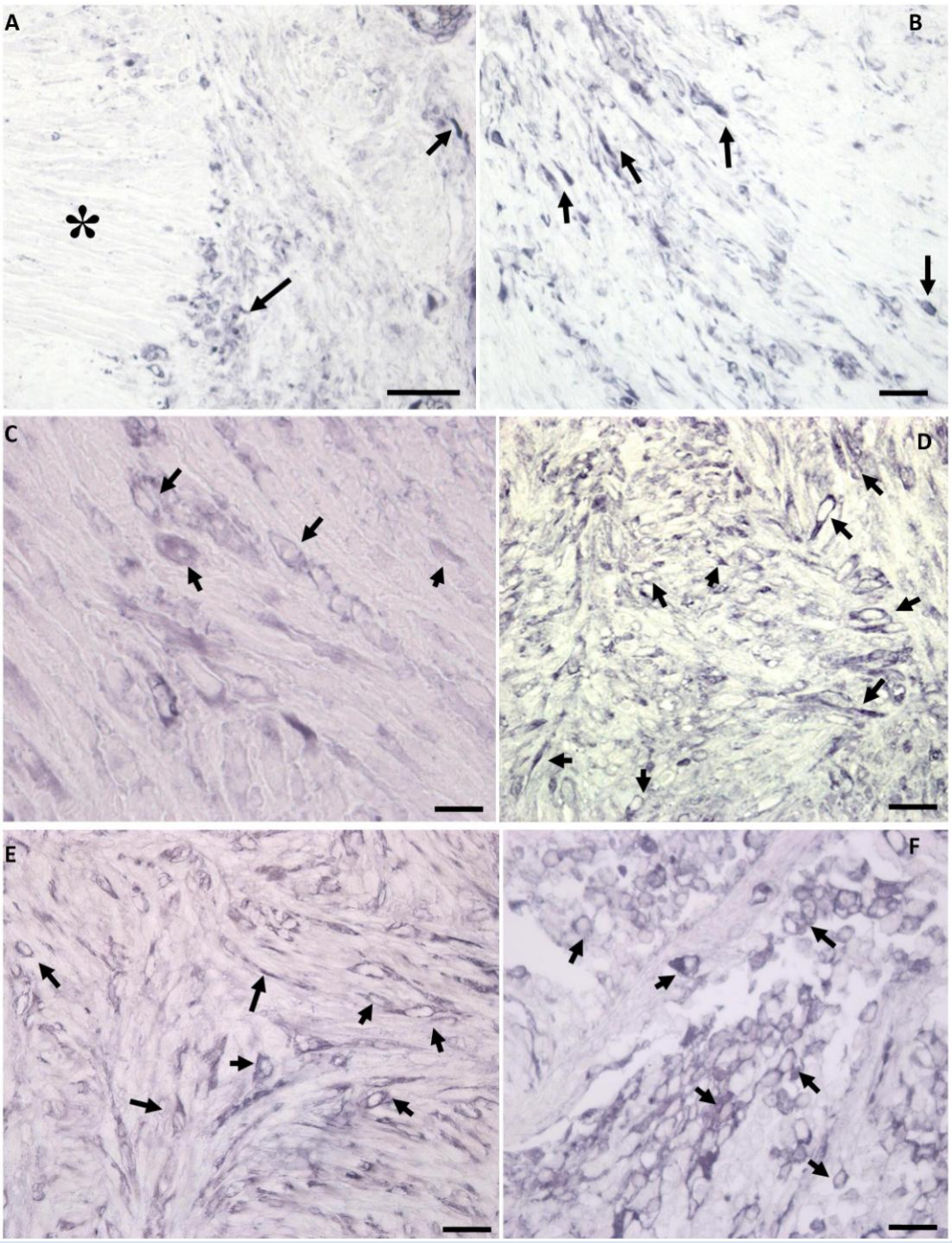


FIGURA 22. DETECCIÓN DE CÉLULAS NTSR1-IR EN MIOMETRIO, LEIOMIOMA, LEIOMIOMA ATÍPICO Y LEIOMIOSARCOMA. (A) Miometrio. Las flechas señalan células de tejido conjuntivo NTSR1-ir. Ausencia de reacción (*) en células musculares. Barra 500 µm. (B) Leiomioma. Células musculares inmunorreactivas para el NTSR1. Barra 500 µm. (C) Leiomioma de crecimiento rápido. (D) Leiomioma de paciente con tratamiento hormonal. (E) Leiomioma atípico. Las flechas indican células NTSR1-ir. Barra 250 µm. (F) Leiomiosarcoma. Células NTSR1-ir (flechas). Barra 200 µm.

5.2. COLOCALIZACIÓN NTS-NTSR1

Con el fin de determinar la presencia del sistema NTS/NTSR1 en las neoplasias de miometrio, se determinó la colocalización de NTS y NTSR1 en las células tumorales por medio del método de elución-retratamiento. Se comprobó que las células musculares tumorales NTS-ir también fueron NTSR1-ir (FIG. 23, 24) en todas las neoplasias estudiadas. Además, en el leiomioma, donde el tejido conjuntivo puede ser abundante, sólo se detectó colocalización NTS-ir/NTSR1-ir en células del tejido muscular (FIG. 23A, A'; FIG. 24A, A'). En células del tejido conjuntivo, no se observó, o fue en un número muy escaso de células esta co-localización (FIG. 23B, B'). En las células musculares además, se demostró la colocalización de ARNm-*NTS* y RNT-ir en las mismas células (FIG. 23C)

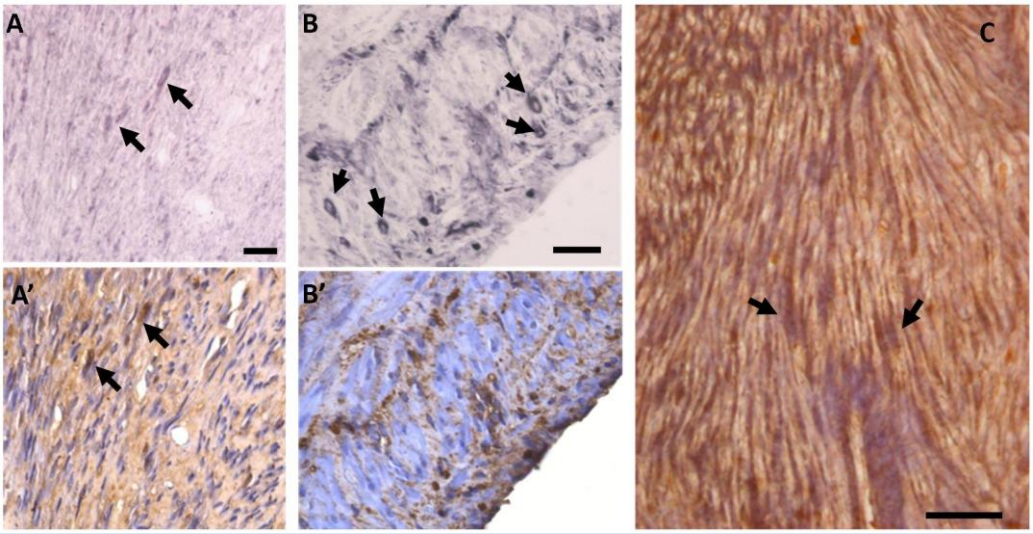


FIGURA 23. COLOCALIZACIÓN NTS-NTSR1-IR EN CÉLULAS DE LEIOMIOMA. (A,A') Colocalización de NTS-ir (A) y NTSR1-ir (A') en células musculares lisas del leiomioma (flechas). **(B, B')** Colocalización de NTS-ir (B) con NTSR1-ir (B') en células del tejido conjuntivo (flechas) del leiomioma. **(C)** Sección del leiomioma mostrando el doble marcaje de ARNm-*NTS* (azul) y NTSR1-ir (marrón) en células musculares (flechas) del leiomioma. Barras 250 µm.

En el **leiomioma atípico** (FIG. 24B, B') y **leiomiosarcoma (**FIG. 24C, C'), las células tumorales NTS-ir/NTSR1-ir fueron progresivamente más abundantes.

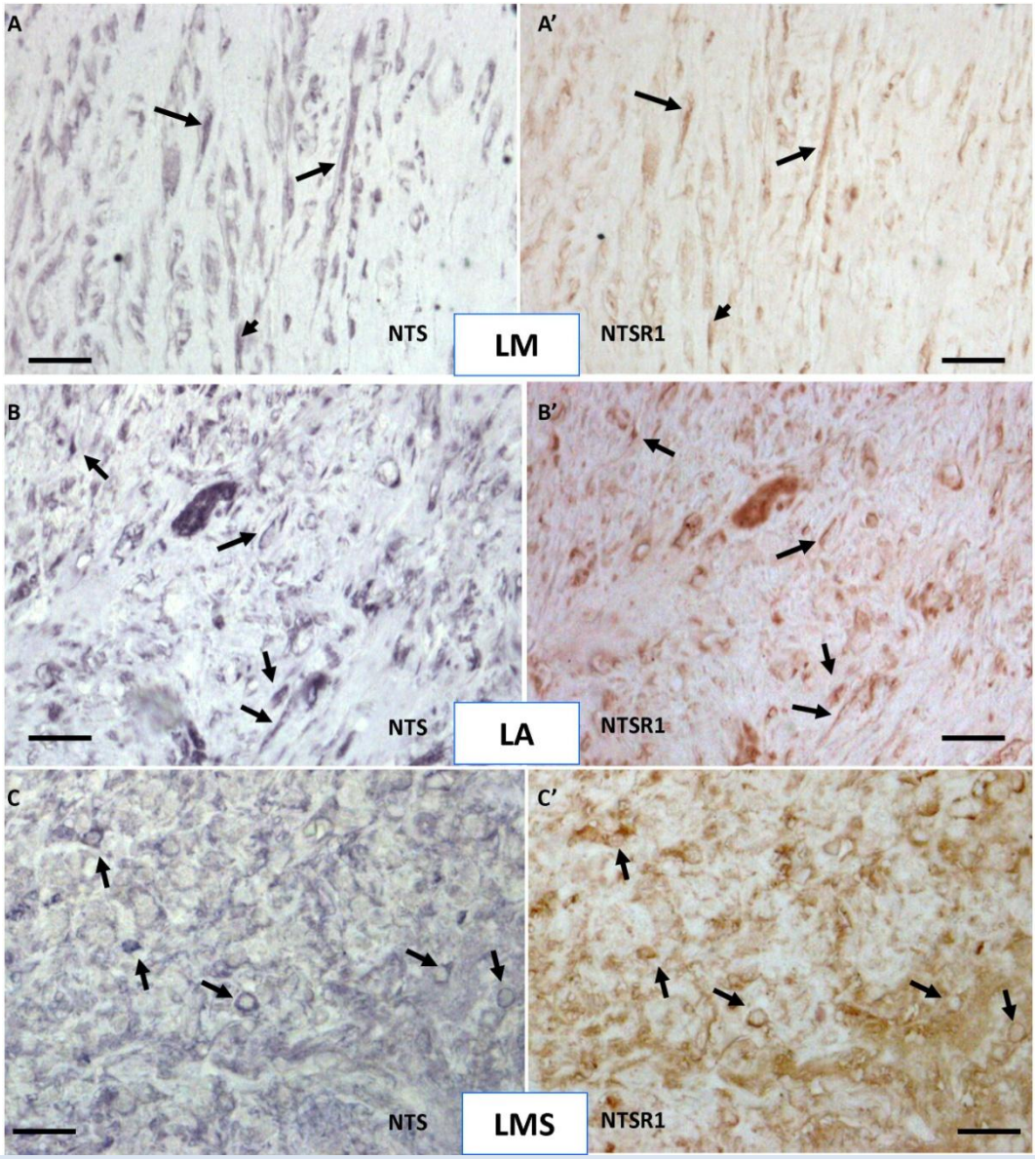


Figura 24. Colocalización de NTS-ir y NTSR1-ir en leiomioma leiomioma atípico y leiomiosarcoma. Las flechas indican células NTS-ir (azul) que también son NTSR1-ir (marrón) en leiomioma (A, A'), leiomioma atípico (B, B') y leiomiosarcoma (C, C'). Barra: 250 µm.

*5.3 EXPRESIÓN DE ARNm*NTSR1 *POR RT-PCR*

Previo al análisis de NTSR1 en leiomiomas, nuestro grupo realizó un estudio de expresión de este receptor usando líneas celulares de cáncer de próstata independientes de andrógenos, PC3 y DU145 de cáncer de próstata y una línea sensible a andrógenos, LNCaP, en comparación con tejido de próstata normal. En todas las líneas y en próstata normal se expresó la forma nativa de NTSR1. En la línea PC3 y DU145 se expresaron además 4 variantes de empalme alternativo que estuvieron ausentes en LNCaP y próstata normal (Almeida AT y cols., 2010).

El análisis de NTSR1 en muestras pareadas de miometrio y leiomioma mostró que el miometrio no presentaba la forma nativa del tránscrito en ninguno de los casos mientras que en leiomiomas, se expresó en el 33% de los casos estudiados. (FIG. 25a). De gran interés fue el hallazgo de que el 25% de los leiomiomas que expresaron la forma nativa del receptor NTSR1, también expresaron la variante de empalme alternativo descrita previamente en células de cáncer de próstata, NTSR1α (FIG. 25b). Parte de estas muestras, expresaron además la isoforma NTSR1β (FIG. 25c). Ninguna de estas isoformas de NTSR1 fue observada en miometrio sano.

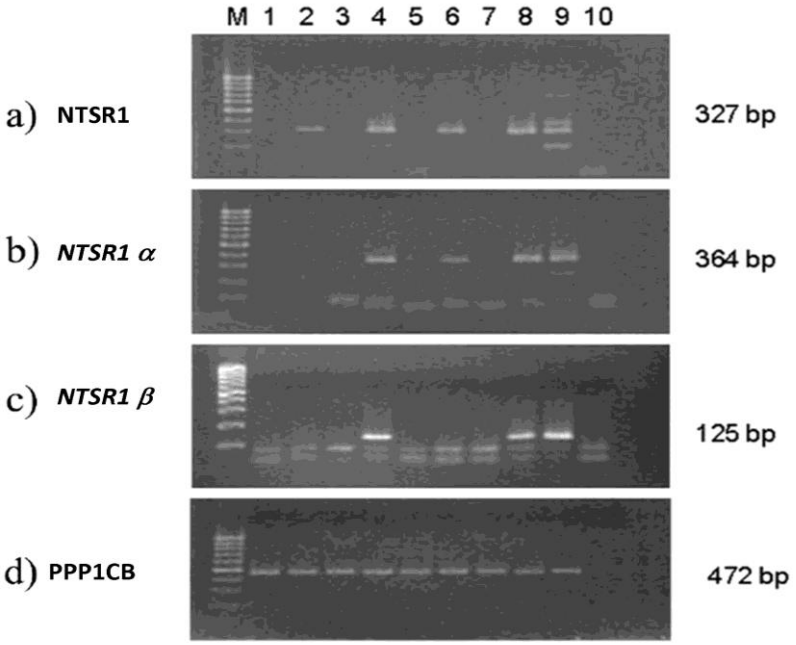


Figura 25. RT-PCR del NTSR1. a) producto de PCR del *NTSR1* completo, b) producto de PCR de una variante *NTSR1*α de un empalme alternativo, c) producto de PCR de la variante de empalme alternativo, *NTSR1*β. Las líneas 1-2, 3-4, 5-6 y 7-8 representan productos de PCR de muestras pareadas de miometrios y leiomioma de 4 pacientes respectivamente. La línea 9 es un control positivo para PCR (línea cellular PC3); La línea 10 es un control negativo para PCR; M, 100 pb 21 peso molecular estandar. d) producto de PCR del gen constitutivo *PP1CB* de cada muestra.

Neurotensin and neurotensin receptor 1 expression in human myometrium and uterine leiomyomas. *Biol Reprod. 2010 Oct;83(4):641-7.*

6. ESTUDIO CASOS-CONTROLES DE ASOCIACIÓN DE FACTORES HORMONALES CON LA PRESENCIA DE LEIOMIOMAS SINTOMÁTICOS.

La población estudiada está descrita en el apartado 1 del Material y Métodos (TABLA 1). Nuestros análisis incluyeron a 577 pacientes intervenidas quirúrgicamente a causa de leiomiomas y a 644 mujeres sanas.

Un factor de riesgo es cualquier característica o circunstancia detectable de un individuo o grupo que se sabe asociada con un aumento en la probabilidad de padecer, desarrollar o estar especialmente expuesto a un proceso mórbido. En este estudio analizamos el índice de asociación de factores considerados posibles factores de riesgo, con la presencia de leiomiomas sintomáticos. Los factores analizados fueron la **edad** de las pacientes, **la paridad** su **índice de masa corporal** y los **tratamientos hormonales** utilizados por las mismas (uso de anticonceptivos orales y tratamientos de fertilización *in vitro)*.

6.1. COMPARACIÓN SIMPLE ENTRE CASOS Y CONTROLES

La tabla 8 recoge los resultados de la comparación de las frecuencias relativas de cada factor entre casos y controles para las categorías analizadas.

En cuanto a la **edad,** la proporción de mujeres en el grupo más joven (14-38) fue 2,3 veces superior en los controles. En contraste, el grupo de edad (39-53) fue tres veces mayor en los casos. El grupo de mayor edad (54-84) presentó la misma distribución en ambos grupos

(TABLA 8, p<0,001). Respecto a la **paridad**, la proporción de mujeres con dos o más hijos fue 1,7 veces mayor en los casos que en los controles, mientras que las nulíparas fueron ligeramente superiores en el grupo de los controles. No se encontraron diferencias entre las primíparas (TABLA 8; p<0,001). En el peso encontramos diferencias importantes para las tres categorías establecidas para el **IMC**. Para normopeso observamos que los controles tienen casi el doble que los casos, y que los casos superan en 3,5 y casi 7 veces a los controles en las categorías de sobrepeso y obesidad, respectivamente (TABLA 8; p<0,001).

En los **tratamientos hormonales**, el número de pacientes sometidas a procesos de FIV fue del 5% en los casos frente al 1% de los controles (TABLA 8; p<0,001). La toma de ACO fue similar en casos y controles, 22% y 21% respectivamente (TABLA 8; p=n/s). No obstante, la duración del tratamiento sí fue significativamente distinta entre ambos grupos. De esta forma, la mediana de la duración del tratamiento en los controles (n=136) fue de 1 mes y en los casos (n=129), de 12 meses, (TABLA 8; p<0,001).

Factor	Frecuencias relativas (IC95%) Casos (n= 577)	Controles(n=644)	Significación estadística[1]
Edad (años)			
14-38	30(26-34)	71(67-74)	
39-52	61(57-65)	20(17-23)	
53-84	9(7-12)	9(7-11)	<0,001
Menarquía (edad, años)	12±2	12±2	n/s
Menopáusicas	11(9-14)	10(8-12)	n/s
Paridad			
Nulíparas	52(44-59)	66(62-69)	
Primíparas	15(10-21)	16(13-19)	
Multíparas	33(26-40)	19(16-22)	<0,001
IMC (kg/m^2)			
<24.9	48(40-55)	88(85-90)	
25.0-29.9	32(25-40)	9(7-11)	
>29.9	20(14-26)	3(2-5)	<0,001
Tratamiento hormonal			
FIV	5(4-7)	1(0-2)	<0,001
ACO	22(19-26)	21(18-24)	n/s
Meses de ACO[2]	12(1-155)	1(1-5)	<0,001

[1] Obtenida con la χ^2 de Pearson.
[2] Mediana (P_5-P_{95}), comparado con el test U de Mann-Whitney. Casos n=129, controles n=136.

Tabla 8. Comparación de potenciales factores predictivos del leiomioma entre casos y controles.

6.2. ANÁLISIS DE REGRESIÓN

La razón de probabilidad u Odds Ratio (OR) es una medida de asociación entre una variable y un suceso determinado. En este estudio el suceso considerado fue la presencia de leiomiomas sintomáticos.

Para cuantificar el OR de cada factor, así como las interacciones entre ellos, se realizó un análisis de regresión logística univariante utilizando todas las variables previamente mencionadas, (TABLA 9). A partir de los valores OR estimados se obtuvo la ecuación de regresión logística, (TABLA 9).

TABLA 9. FACTORES PREDICTIVOS DEL LEIOMIOMA SEGÚN LOS RESULTADOS DEL AJUSTE DEL MODELO DE REGRESIÓN LOGÍSTICA

Por:	OR (IC95%)
Sobrepeso (respecto a normopeso)	6,58 (3,75-11,06)
Obesidad (respecto a normopeso)	10,57 (5,11-18,95)
Con actividad ovárica	6,93 (2,38-14,29)
Cada año más de edad	1,08 (1,04-1,09)
Cada mes más de ACO	1,29 (1,03-3,19)
Recibir tratamiento de reproducción asistida (FIV)	14,28 (8,08-21,60)

$$P_{(riesgo)} = \frac{1}{1 + e^{(-6{,}969 + 1{,}883 \cdot Sp + 2{,}358 \cdot Ob + 1{,}936 \cdot Me + 0{,}076 \cdot Edad + 0{,}257 \cdot mA}}$$

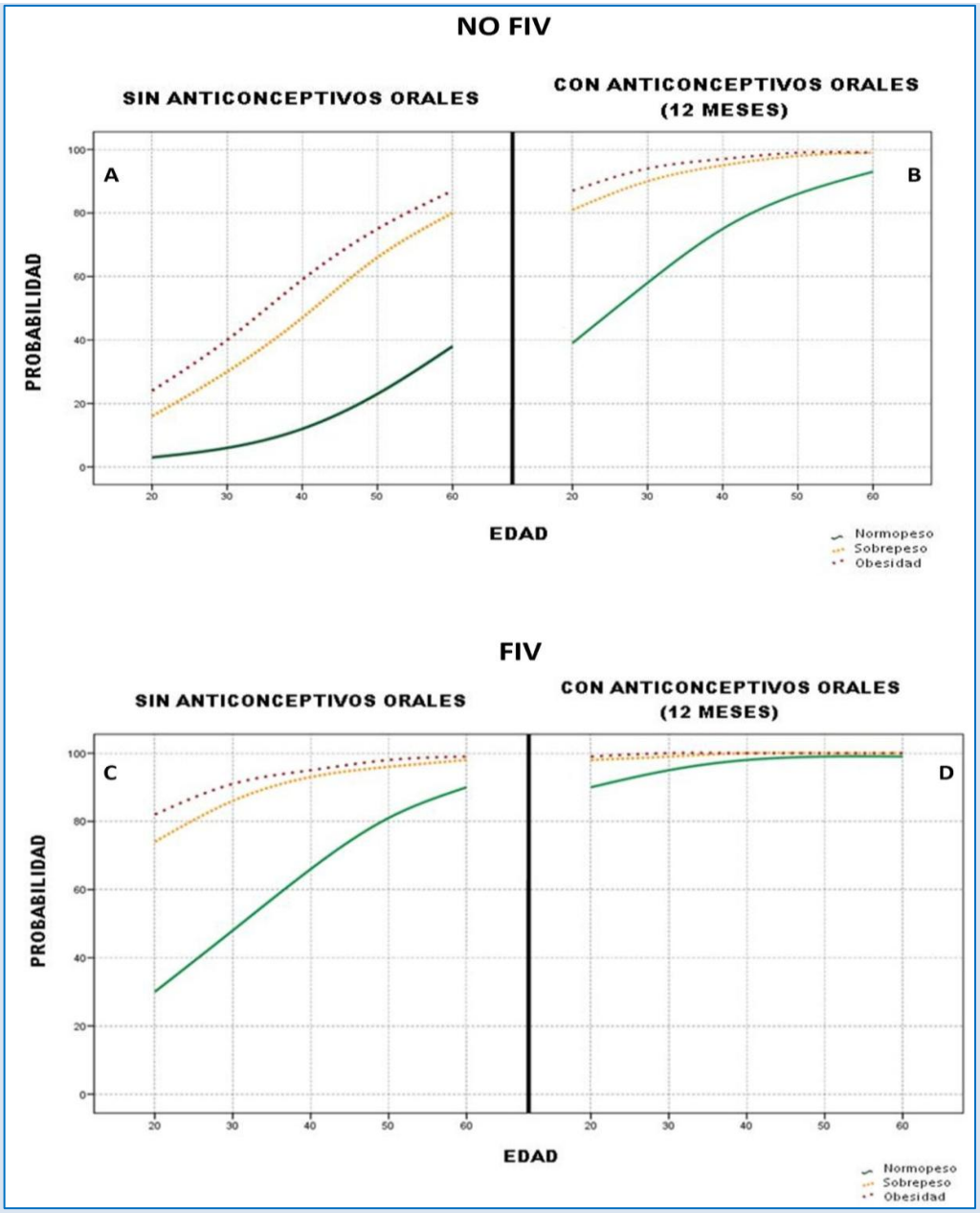
Los diferentes factores pueden estratificarse en tres grados de asociación en función de su valor OR: alto (FIV, obesidad); medio (con

actividad ovárica, sobrepeso); bajo (cada año más de edad, cada mes más de ACO).

Los valores Odds ratio estimados para las variables independientes, mostraron que el tratamiento de FIV incrementa 14 veces el índice de asociación con la presencia de leiomiomas en relación al grupo control. Esto significa que por cada mujer que recibió FIV y no presentaba leiomiomas, hubo 14 mujeres que recibieron FIV y sí los tenían. De forma similar, tanto con el sobrepeso como con la obesidad el índice de asociación incrementa 6 y 10 veces, respectivamente. La duración del tratamiento con ACO también mostró estar asociado a la presencia de leiomiomas 1,29 veces, siendo mayor este índice cada mes más de toma de ACO a partir de 12 meses de toma ininterrumpida. La actividad ovárica estuvo asociada en 6,93 veces respecto a la menopausia. Por último, el modelo muestra que la asociación aumenta ligeramente con la edad (1,08 veces por cada año).

A partir de la fórmula obtenida, (TABLA 9), es posible calcular las probabilidades estimadas ($P_{(RIESGO)}$) en función de presentar uno o varios de los factores estudiados. En la FIGURA 26 se representa la evolución de dichas probabilidades, estratificadas por categoría de peso para las siguientes condiciones: sin tratamiento hormonal, tratamiento hormonal (ACO), tratamiento hormonal (FIV), tratamiento hormonal (ACO y FIV).

La probabilidad estimada aumenta con la edad, de forma que entre los 40 y 50 años de edad, periodo en que las cirugías debidas a leiomiomas son muy frecuentes, la presencia de leiomiomas sintomáticos aumenta casi dos veces, desde 12% hasta 23% para mujeres de peso normal. Este valor aumenta sustancialmente si la mujer presenta sobrepeso u obesidad, pasando a ser 4 veces superior en la década de los 40 y casi 3 a los 50 años (FIG. 26A). Además, si añadimos la toma de 12 meses de ACO en el análisis, la presencia de leiomiomas en la misma década se incrementa progresivamente del 75% hasta el 86%, siendo superior al 99% en el caso de mujeres con sobrepeso u obesidad (FIG. 26B). En el caso de tratamientos de fertilización in vitro (FIG. 26C) obtenemos un patrón similar al obtenido para ACO. El peor escenario fue el de aquellas mujeres que habían tomado ACO y también habían recibido tratamiento para FIV. En este caso, a partir de los 30 años de edad, la asociación se incrementa hasta casi el 100%, independientemente de su peso (FIG. 26D).



.

FIGURA 26. PROGRESIÓN DE LA PROBABILIDADES ESTIMADAS DE PRESENTAR LEIOMIOMAS SINTOMÁTICOS EN FUNCIÓN DE LA EDAD DE LA PACIENTE. Progresión del riesgo en (A) mujeres que no han recibido ningún tratamiento hormonal, (B) mujeres con tratamiento de ACO durante 12 meses, (C) mujeres con tratamiento de FIV, (D) mujeres con tratamiento de FIV y 12 meses de ACO. Línea verde: normopeso; línea ámbar: sobrepeso; línea roja: obesidad

DISCUSIÓN

Discusión

Este trabajo supone un avance en el estudio de los leiomiomas uterinos en distintos aspectos teniendo en cuenta su carácter multidisciplinar. Los hallazgos más relevantes han sido:

1. Caracterizar por primera vez los tipos celulares que son REα y/o REβ inmunorreactivos en el miometrio y tres neoplasias originadas de sus células de músculo liso, leiomiomas típicos, leiomiomas atípicos y leiomiosarcomas, realizando un estudio cualitativo y cuantitativo.
2. Determinar el ratio REα/REβ, en los leiomiomas, leiomiomas atípicos y leiomiosarcomas en relación al miometrio sano, demostrando que los leiomiomas atípicos tienen un patrón más afín al de los leiomiosarcomas que al de los leiomiomas típicos.
3. Mostrar por primera vez la presencia y expresión del péptido neurotensina en un tejido uterino, el miometrio, y en sus neoplasias. Además, demostrar que la expresión del péptido neurotensina está en relación directa con la disminución del ratio REα /REβ.
4. Demostrar la expresión de dos isoformas del receptor de alta afinidad para el péptido neurotensina, NTSR1, en un porcentaje de leiomiomas frente al miometrio sano.
5. Confirmar estadísticamente el grado de asociación con la presencia de leiomiomas uterinos que muestran factores hormonales endógenos y exógenos como la obesidad o los tratamientos de FIV.

1. RECEPTORES DE ESTRÓGENOS EN NEOPLASIAS DE MIOMETRIO: LM, LA Y LMS EN RELACIÓN AL MIOMETRIO SANO

El receptor de estrógenos alfa es el RE expresado mayoritariamente en las células de los tejidos uterinos (Pelletier G., El-Alfy M. 2000). Este receptor fue considerado como el único que mediaba las respuestas estrógenicas en los mismos hasta hace pocos años. Después del descubrimiento del segundo receptor de estrógenos, el REβ (Kuiper G y cols., 1996), se demostró la expresión tanto de REα como de REβ específicamente en epitelio, estroma y músculo uterino (Pelletier G., El-Alfy M. 2000), aunque la expresión de REβ fue considerablemente más débil.

Estudios utilizando ratones knockout (Couse JF y cols., 1999), han demostrado que cada tipo de RE tiene funciones específicas. Cada uno de ellos presenta un patrón de distribución propio solapándose su expresión en algunos tejidos. En el caso del útero, el REα está expresado mayoritariamente en el epitelio endometrial aunque el REβ es el característico del epitelio glandular (Hiroi H y cols., 1999). El incremento de REα respecto del REβ en el útero y la mama se piensa es la causa de los efectos tróficos del E2 en estos tejidos (Jensen EV 2009), atribuyéndosele al REβ por tanto, un efecto protector.

Para poder determinar si los estrógenos, por medio de sus receptores, tienen un papel relevante en la patología del miometrio,

sería necesario conocer la expresión de estos últimos, tanto en células de músculo liso como en las células de tejidos que también forman parte del miometrio como el tejido conjuntivo o endotelial y cuya acción es fundamental para el correcto funcionamiento de las células musculares. Por otro lado, como los REs son proteínas citosólicas con una actividad clásicamente desarrollada en el núcleo, la caracterización de su localización subcelular en las distintas células, es un dato primordial para esclarecer su función. Nuestros resultados constituyen el primer aporte sobre la distribución celular y subcelular de estos dos REs en neoplasias de miometrio en relación a su distribución en miometrio sano.

A pesar de haber numerosos trabajos previos que demuestran la expresión de los dos tipos de REs en tejido leiomiomatoso y miometrial, ninguno de ellos estudia esta expresión a nivel celular y subcelular encontrándose por otra parte numerosas contradicciones en sus resultados. Esta contradicción es mayor entre los trabajos previamente al aislamiento de la segunda forma de receptor de estrógenos (Vollenhoven y cols., 1994; Brandon y cols., 1995; Andersen y cols., 1995). A partir de 1996 numerosos estudios determinaron la expresión de ambos tipos de receptor de estrógenos en miometrio y leiomiomas mediante el análisis de su ARNm, siendo para unos autores (Bennessayag y cols., 1999) más elevada la expresión de ambos receptores en leiomiomas en relación al miometrio sano. Sin embargo en células en cultivo, (Wu WX y cols., 2000), encontraron niveles más bajos de ARNm REβ, en leiomiomas

respecto del miometrio. Mediante RT-PCR, Jakimiuk AJ y cols., 2004, demostraron que en mujeres premenopáusicas, la expresión de REα y REβ no difería entre leiomiomas y miometrio de la misma paciente. En menor número encontramos estudios dirigidos a comparar la expresión de los REs a nivel de proteína. Kovács K y cols. 2001, fueron los primeros en hacer un estudio in vivo y, mediante análisis por Western blot y el uso de radioligandos, estos autores encontraron que los niveles de REα fueron siempre más altos en leiomiomas, no variando el nivel de expresión en el miometrio ni durante el ciclo ni en la menopausia; por otro lado, estos autores encontraron que los niveles de REβ en leiomiomas eran elevados respecto de los del miometrio, sólo en la fase proliferativa y la menopausia. Sin embargo Wang y cols. 2001, no encontraron diferencias en la expresión de REβ entre leiomiomas y miometrio en la fase proliferativa del ciclo. De manera similar, Jakimiuk AJ y cols. 2004, no observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm-*REβ* entre estos dos tejidos. Teniendo en cuenta que para la acción de los REs puede ser más importante la relación entre ambos tipos en cada célula que la cantidad global, se hace indispensable como hemos dicho previamente, conocer qué tipos celulares expresan cada uno de los tipos de REs tanto en miometrio como en leiomioma. Esta caracterización celular no se había hecho hasta que Gargett C. y cols 2002 demostraron in vitro la expresión de ambos tipos de REs en células endoteliales y musculares; estos autores demostraron que en células cultivadas de miometrio y leiomiomas, las células musculares expresan constitutivamente REα, pero no REβ, mientras que las

células endoteliales expresan constitutivamente REβ, variando la expresión de REα, en distintos casos. Nuestros resultados, ya publicados, fueron el primer aporte in vivo de los tipos celulares que expresan los dos tipos de REs y muestran que efectivamente las células musculares tanto de miometrio como de leiomioma, expresan REα mayoritariamente pero también las células musculares de los dos tipos de tejido, expresan REβ. Por otro lado no sólo las células endoteliales sino también otras células del tejido conjuntivo como las células cebadas, expresan REβ, pero no REα. La diferencia en los resultados respecto de los estudios in vitro podría ser atribuida, según observaciones de Zaitseva M y cols. en 2006, a que el perfil de expresión génica en células de miometrio y leiomiomas se altera significativamente en las condiciones de cultivo. En cualquier caso, nuestros resultados ponen de manifiesto la presencia de ambos receptores en las células musculares, células origen del tumor, y sólo el REβ en endotelios y células de conjuntivo.

Las células que expresan sólo el REβ, son células productoras de diversos factores de crecimiento, factor de crecimiento endotelial (VEGF) o factor de crecimiento fibroblástico (FGF), así como moléculas de la matriz extracelular y factores de señalización local como la histamina, todos ellos de gran importancia en la formación del microambiente tumoral y que están de alguna forma reguladas por esteroides sexuales (Walker y Stewart, 2005). Las interacciones de estos factores con las hormonas esteroideas parecen ser las responsables del crecimiento de los leiomiomas más que los niveles

de hormona circulante (Maruo T y cols., 2004). Recientemente, Islam MS y cols., 2013, explican cómo factores de crecimiento y citoquinas, son considerados como efectores potenciales de las hormonas esteroideas. El hecho de que REβ se exprese en todos los casos, independientemente del tipo de leiomioma o de las características de la paciente en estas células, nos hace sugerir para el mismo, una acción específica, mediando las interacciones que llevan al desarrollo del leiomioma.

Asimismo, la presencia de REα y REβ en células musculares sugiere que podría existir una acción moduladora del REβ sobre la señalización del REα en este tipo celular.

Numerosos datos previos muestran: 1. Que la relación de la expresión de REs en LMs con el momento del ciclo menstrual no es evidente 2. Que los niveles de estrógenos circulantes son similares en mujeres con leiomiomas y mujeres normales (Buttram VC Jr., 1986) y 3. Que puede existir una heterogeneidad en el crecimiento de distintos leiomiomas dentro del mismo útero a pesar de ser idéntica la exposición a estrógenos circulantes (Maruo T y cols., 2004).

Teniendo en cuenta estos datos, nosotros sugerimos: 1: Que los niveles de estrógenos circulantes actúan sobre el miometrio sano en función de las fases del ciclo menstrual pudiéndose observar cambios en la expresión de los REs en las distintas fases de acuerdo con Giné L y cols 2009, por lo que en el caso de someter a las células a niveles suprafisiológicos de estrógenos, estos podrían inducir el inicio de un tumor promoviendo una alteración de la división celular.

2. En el leiomioma sin embargo, donde se observa una elevada expresión de REs en todo momento, (Giné L y cols., 2009), hay ya un ambiente hiperestrogénico provocado por la producción propia de estrógenos, puesto de manifiesto por la presencia de la enzima aromatasa en células musculares, el cual puede inducir la expresión de factores de crecimiento específicos no presentes en el miometrio sano y de esta manera contribuir al mantenimiento del tumor independientemente de los niveles circulantes de estrógenos.

Nuestros resultados cualitativos sobre la distribución de células REs inmunorreactivas, muestran que en miometrio y leiomiomas típicos, las células musculares expresan en su mayoría REα, pero una parte de ellas expresa REβ, solo o coexistiendo con REα. En estas células, es el REα el que presenta cambios de localización subcelular entre el citosol y el núcleo, indicando una acción directamente relacionada con la fisiología de la célula muscular dependiente de los niveles estrogénicos. Sin embargo el REβ en las células musculares se mantiene siempre en localización nuclear además de ser el único receptor de estrógenos presente, también en los núcleos, en las células endoteliales y células del conjuntivo del leiomioma lo que nos hace sugerir un papel importante de este receptor en la formación y mantenimiento del leiomioma. Por otro lado, debemos tener en cuenta que según el estudio cuantitativo, donde nos centramos exclusivamente en la célula muscular por ser la célula tumoral y el único tipo celular que expresa los dos tipos de receptor de estrógenos, si bien la expresión de REα, se mantiene en niveles no significativamente diferentes en

leiomioma respecto del miometrio sano, la expresión de REβ aumenta en un número significativo de células musculares. Es de destacar, la ausencia de ambos tipos de REs en el grupo de leiomiomas de crecimiento rápido; teniendo en cuenta que el crecimiento del leiomiomioma típico es muy lento presentando un índice mitótico bajo y que sus células están reguladas por receptores de estrógenos clásicos, un comportamiento diferente, que sólo afecta al índice de división, debe estar regulado bien por una isoforma de estos receptores clásicos o por otro tipo de receptor que desencadene respuestas rápidas, para lo que es un buen candidato el GPR30 (Carmeci C y cols., 1997; Filardo EJ y Thomas P, 2012; Barton M, 2012).

Sorprendentemente, hemos encontrado que en leiomiomas atípicos el porcentaje de células que expresan REβ, aumenta significativamente respecto de los leiomiomas típicos con un ratio REα/REβ por debajo de uno y además su localización subcelular fue fundamentalmente citosólica. Esta observación fue hecha en el 100% de los leiomiomas atípicos analizados lo cual parece indicar que las células de estos tumores no sólo presentan diferencias fenotípicas sino también diferencias bioquímicas y de regulación que pueden traducirse en un distinto comportamiento clínico. Más interés aún despertó el hecho de observar que en los LMSs estudiados, los índices de expresión de REα, son muy escasos incluso de cero en algunos de ellos, mientras que las células que expresan REβ pueden alcanzar el 70% con un ratio REα/REβ también inferior a la unidad y aún más bajo que el de los leiomiomas atípicos. En este caso la

localización subcelular fue exclusivamente citosólica. Estos hallazgos clarifican dos puntos importantes: 1. El fenotipo molecular de los leiomiomas atípicos está más próximo al LMS que al LM típico; esto hace pensar que los tumores clasificados como LA pueden tener un potencial maligno. Trabajos anteriores ya muestran esta posibilidad. Así, en el estudio realizado por Giuntoli y cols. 2007, quedó clara esta posibilidad al encontrar que 3 mujeres de 18, habían muerto 6 años después de ser diagnosticadas de una variante de leiomioma entre las que se encontraban los leiomiomas atípicos. Teniendo en cuenta la existencia de diversas variantes histológicas de los leiomiomas, en los que ocasionalmente puede observarse alguna característica de alarma, sugerimos que el análisis del ratio REα/REβ podría ser útil como un marcador pronóstico de esta patología.

2. La malignización de las células musculares de miometrio, implica una disminución del ratio REα/REβ, contrariamente a otros tumores de tejidos que expresan mayoritariamente REα en su estado sano como la mama en los que el ratio REα/REβ aumenta (Nadal-Serrano M y cols., 2012), pero sí de la misma forma que lo encontrado en otros tejidos del útero como en el endometrio, donde se ha encontrado un ratio REα/REβ menor que 1, que además parece estar asociado a una menor supervivencia libre de enfermedad (Mandusic V y cols., 2012). La disminución del ratio REα/REβ en tumores de útero tiene gran interés para comprender específicamente en estos tumores el papel de los estrógenos, puesto que no parece ser el mismo que en otros tumores donde lo que se asocia con el carácter maligno, es la pérdida del REβ el cual se considera como protector

ante la proliferación inducida por el aumento de REα. Otro aspecto que ha sido analizado previamente, ha sido el interés pronóstico de la presencia de REs-ir en los LMSs, (Raspollini MR y cols. 2003; Akhan SE y cols. 2005), sin que haya aún un acuerdo entre los distintos autores.

En este estudio, a pesar del escaso número de muestras utilizadas, encontramos que aquellas con bajo REα-ir y presentaron además un elevado número de células REβ-ir, pertenecían a mujeres que sufrieron metástasis y murieron en un periodo menor de 3 años después del diagnóstico. Sin embargo una mayor REα-ir junto con un número menor de células REβ-ir, pertenecieron a mujeres con un mejor pronóstico, ausencia de metástasis y mayor supervivencia. Por todo esto pensamos que un estudio de mayor número de muestras ayudaría a establecer la utilidad de realizar estudios anatomopatológicos de ambos receptores en el caso de LMSs, con el fin de facilitar un mejor pronóstico y utilizar los tratamientos oportunos con una mayor especificidad.

También es de destacar que la disminución del ratio REα/REβ, esté asociada según nuestros resultados, a un aumento de expresión de la enzima aromatasa, indicando un papel de los estrógenos en la progresión del tumor y por otro lado que estos tumores podrían ser tratados con inhibidores de aromatasa al igual que los sarcomas de estroma endometrial donde se han utilizado con éxito (Reich y Regauer 2004, 2007)

Si tenemos en cuenta que según muestran estos autores, el ratio REα/REβ en un tipo de célula dado, es uno de los mayores determinantes de su respuesta a estrógenos, nuestros resultados

aportan la base para conocer mejor y más específicamente, el papel estrogénico en tumores de útero.

Atendiendo a los distintos períodos del ciclo vital, mientras que los LMS ocurren generalmente más próximos a la menopausia, los LMs son tumores propios de la edad fértil, aunque muchos son detectados en la perimenopausia y también están presentes en la menopausia aunque más pequeños y en menor cantidad (Flake GP y cols., 2003). Por otro lado, la extracción quirúrgica de LMs está asociada a la premenopausia y perimenopausia, sin embargo, en ocasiones es necesario este tipo de tratamiento en la menopausia debido a su crecimiento inesperado (observaciones del grupo no publicadas). Si el crecimiento de los leiomiomas es promovido por los estrógenos y este crecimiento se detiene en la menopausia, ¿hay una disminución de REs en este periodo vital? Según nuestras observaciones, los REs clásicos, ambos tipos, son más abundantes en células musculares leiomiomatosas en la menopausia que en el periodo fértil y con una localización siempre nuclear. Los estudios existentes sobre la menopausia aunque escasos, parecen estar de acuerdo en cuanto a que hay un aumento de expresión de REβ fundamentalmente en este periodo de la vida (Strissel PL y cols., 2007). Este aumento de REβ, junto con nuestras observaciones sobre la presencia de células musculares de miometrio aromatasa-ir en mujeres menopáusicas, parece indicar unas condiciones más próximas a lo observado cuando las células musculares se malignizan. Esto nos hace sugerir que el aumento de fuentes estrogénicas o de

sustancias con actividad estrogénica, con especial afinidad por el REβ, no serían aconsejables en este período de la vida de la mujer.

2. EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO NEUROTENSINA Y SU RELACIÓN CON LOS ESTRÓGENOS EN LM, LA Y LMS Vs M

Una de las consecuencias de la activación por estrógenos de las células tumorales puede ser la expresión de genes que codifican péptidos mitogénicos como la neurotensina, y que permanecen silenciados en el tejido sano.

A pesar de que se ha demostrado la implicación del péptido neurotensina y su receptor de alta afinidad, NTSR1, en distintos tumores, benignos y malignos, incluido el cáncer de mama (Ishizuka J y cols., 1993; Wang L y cols., 2000; Somaï S y cols., 2002; Evers BM, 2006) este es el primer estudio que pone de manifiesto su expresión celular y molecular así como su relación con los estrógenos, en tejidos uterinos.

Poco más de diez años abarca la investigación sobre los péptidos en tumores. En el inicio, esta investigación estaba enfocada al posible uso de estas pequeñas moléculas como radiomarcadores utilizados en el diagnóstico y radioterapia (Okarvi SM, 2007). Esta investigación se basó en la evidencia de que los receptores para distintos péptidos estaban sobreexpresados en tumores en relación al tejido sano; en el caso de la neurotensina, fundamentalmente su receptor de alta afinidad, NTSR1. En la actualidad, sin embargo, ha avanzado enormemente la investigación y consecuentemente el

conocimiento sobre la implicación del sistema NTS/NTSR1, en el desarrollo y proliferación de tumores de colon, pulmón, próstata o el cáncer de mama (Souazé F. y cols 2006 a; Gui y cos 2008; Dupouy S. y cols., 2009, 2011 ; Wu Z. y cols., 2012).

Nuestros resultados muestran la presencia de células NTS-ir en el tejido conectivo del miometrio pero no en las células musculares, mientras que en las distintas neoplasias estudiadas el número de células musculares NTS-ir aumenta progresivamente en relación directa con el índice de proliferación, la expresión de aromatasa y la disminución del ratio REα/REβ.

En el miometrio, la presencia en células de conectivo de NTSR1/NTS-ir, sugiere un mecanismo paracrino para la señalización por NTS en este tejido. Este mecanismo de señalización podría estar implicado en la preservación de la función uterina, teniendo en cuenta que en este tejido la señalización paracrina de factores de crecimiento entre diferentes tipos celulares, se sabe que contribuye a la homeostasis del tejido manteniendo su morfología y función normales (Franco OE y cols., 2010).

Por otro lado, el tejido tumoral generalmente presenta en su microambiente de tejido conectivo, infiltraciones locales de células asociadas con altos niveles de mediadores inflamatorios que contribuyen a la progresión del tumor. En el tracto gastrointestinal, se demostró que la NT es un potente modulador de diferentes células inmunes como las células cebadas, macrófagos o neutrófilos (Zhao D

y Pothoulakis C, 2006). Algunas de estas células, las células cebadas, son muy abundantes en los leiomiomas, siendo sus gránulos inmunorreactivos para la NTS y los REβ.

El hecho de no haber detectado expresión de ARNm-*NTSR1* por RT PCR en ninguno de los miometrios estudiados, podemos explicarlo si asumimos la posibilidad de que en este tejido ocurra un mecanismo similar al observado en diferentes sistemas celulares, (Souazé F. y cols., 2006), en los que estos autores demostraron que la neurotensina ejerce una regulación postranscripcional de la expresión de NTSR1 desestabilizando su ARNm. Esto lo observaron después de una exposición prolongada a NTS aún en bajas dosis. Por otro lado, *in vivo,* se ha observado, mediante la administración de un antagonista de la NTS en cerebro y colon, que el péptido ejerce una regulación negativa sobre la expresión de NTSR1, lo que hace posible pensar que la NT puede actuar de una manera similar en el miometrio, limitando la síntesis de sus receptores. En cuanto a la NTSR1-ir, debemos considerarla negativa en las células musculares en tanto en cuanto se observó solamente una débil inmunorreacción en un escaso número de ellas. Sin embargo, esa escasa inmunorreacción podría indicar una acción paracrina de la NTS liberada desde las células del tejido conectivo, sobre las células musculares.

Al comparar la expresión de NTS observada en el tejido sano con el tejido leiomiomatoso, obtuvimos un hallazgo importante: En el leiomioma no sólo hay un notable aumento de células musculares

NTSR1-ir sino que algunas de ellas además también sintetizan el péptido, como lo demuestra la presencia de ARNm-*NT*. Esto prueba que en estas células musculares leiomiomatosas, la neurotensina ejerce una regulación autocrina.

Se han descrito numerosas rutas de señalización implicadas en la proliferación, supervivencia, migración e invasión activadas por NTSR1 (Wu Z y cols., 2012) siendo los mecanismos de señalización que median los efectos del sistema neurotensigénico, dependientes por otro lado, del tipo celular.

En nuestro estudio, demostramos por primera vez, in vivo, que el sistema NTS/ NTSR1 está presente no sólo en leiomiomas típicos de miometrio, sino que está sobreexpresado en tumores malignos, LMSs, y lo que consideramos un hallazgo particularmente relevante, hay una sobreexpresión en los LA, pasando de un 14% de células musculares en el LM a un 60% en LA, más próximos a LMSs donde esta coexpresión se observa en prácticamente el 100% de las células tumorales.

Estas observaciones nos hacen sugerir que en el miometrio podría ocurrir algo similar a lo observado en colon donde la expresión de ARNm-*NT* aumenta progresivamente, partiendo de su ausencia en el tejido sano, expresión en adenomas y sobreexpresión en adenocarcinomas (Souazé y cols. 2006)

Pero ¿Tiene alguna relación la expresión del sistema NTS/NTSR1 en las células musculares leiomiomatosas, con los

estrógenos circulantes? La utilización como modelo *in vivo,* de muestras de miomas procedentes de mujeres sometidas a tratamientos de fertilización *in vitro*, durante los cuales son tratadas con grandes dosis de ambas hormonas gonadales, estrógenos y progesterona, nos condujo al hallazgo de que en todos los casos se duplicó el número de células que expresan NTS-NTSR1-ir, lo que nos confirma la acción de estas hormonas sobre la expresión del péptido como demostraron en células hipofisarias, Bello y cols. 1999, y posteriormente en células epiteliales de mama en humanos (Dupouy S y cols., 2009). Además, la observación clínica de que los leiomiomas aumentan de tamaño durante el tratamiento, apoya el papel de la NTS como factor de crecimiento en estos tumores.

Por otro lado, en este estudio demostramos como, el incremento de expresión de NTS/ NTSR1 está en relación directa con el aumento de células que expresan REβ, mientras que el REα disminuye o está ausente.

En conjunto con estos datos proponemos: Que los niveles de estrógenos circulantes actúan sobre células musculares lisas del miometrio induciendo la expresión de NTS, la cuál junto con la progesterona, lleva a la proliferación celular y a la formación de un leiomioma. Esta afirmación está apoyada por datos no mostrados que obtuvimos durante esta investigación. Dichos datos muestran como en el miometrio adyacente al tumor de una paciente operada por recurrencia de leiomiomas y malignización de uno de ellos, se pudieron observar pequeñas regiones de células de músculo liso

miometriales, que presentaban el mismo patrón de expresión de REs y NTS-ir que las células tumorales.

Una vez comenzada la síntesis de NTS en estas células de músculo liso, la neurotensina a su vez, induce la expresión de NTSR1 con el consiguiente establecimiento del sistema NTS/NTSR1 como mecanismo de señalización autocrina sobre las células. Una vez desarrollado el tumor, la aromatasa expresada en las células tumorales mantendría el nivel estrogénico suficiente para mantener esta situación estable en un leiomioma típico el cual ya muestra un ligero y peligroso incremento de la expresión de REβ. El desequilibrio que se produce en la expresión de ambos receptores de estrógenos, con el consiguiente aumento de REβ, sería clave para la malignización del tumor. Según nuestros resultados y basándonos en nuestra hipótesis, los LAs serían un paso previo del LMS, en los cuáles este desequilibrio ya se ha producido. Además, probablemente las células que proliferan en el leiomioma, lo hacen bajo la acción del REβ. Es decir, que en los tejidos del miometrio, el aumento de expresión de REβ, lejos de tener un papel protector como se ha postulado para otros tejidos como el colon (Konstantinopoulos PA y cols., 2003) o la mama (Chen GG y cols. 2008), puede suponer la malignización de los mismos como ocurre en cáncer de pulmón (Zhang G y cols., 2009) o endometrio (Jongen V y cols. 2009; Mylonas I y cols. 2005).

Así, para el miometrio nosotros postulamos: Por un lado, que el aumento del REβ induce la sobreexpresión de NTS/NTSR1 en las células musculares lisas tumorales y por otro, que REs distintos de

REβ y REα, inducen el aumento de proliferación observado en los leiomiomas de crecimiento rápido, aumentando la expresión de receptores de progesterona y NTS/NTSR1 es decir, que de todo lo expuesto podemos deducir que el sistema NTS/NTSR1 interviene en la proliferación de células tumorales y que dependiendo del tipo de tumor su expresión depende de la activación por los estrógenos de distintas vías de señalización mediadas por receptores distintos.

Una vez establecido que el sistema NTS/NTSR1 promueve la proliferación en tumores de células de músculo liso, el uso de drogas destinado a alterar la expresión de NTSR1, podría bloquear esta vía autocrina de señalización, suprimiendo o reduciendo la proliferación en el tumor.

Por otro lado, el hecho de que en una parte de los leiomiomas estudiados, se expresen coexistiendo con la forma nativa del receptor NTSR1, dos isoformas del mismo, las cuales podrían formar homo o heterodímeros funcionales en las células que los expresan, podría suponer también que estas isoformas sean potenciales dianas terapéuticas específicas para estos tumores.

3. ASOCIACIÓN DE DISTINTAS CONDICIONES ESTROGÉNICAS CON LA PRESENCIA DE MIOMAS

En este estudio hemos comparado las características referentes al estado hormonal de la mujer, en una muestra control carente de leiomiomas, con las características de las mujeres que constituyen la muestra obtenida para la realización de los distintos

estudios llevados a cabo en este trabajo, procedente de mujeres sometidas a miomectomías o histerectomías.

Como factores que pueden afectar al estado hormonal de la mujer, se estudiaron tanto factores endógenos, edad, actividad ovárica, índice de masa corporal y paridad como factores exógenos, uso de anticonceptivos y tratamientos de fertilización in vitro. En nuestros resultados, la edad fue un factor determinante en la muestra de mujeres con leiomiomas, dato que no es sorpresivo puesto que los diversos estudios realizados muestran un acuerdo sobre el aumento de la prevalencia de leiomiomas con la edad, en la mujer premenopausia (Flake GP y cols., 2003; Laughlin SK y cols., 2010)

Diversos estudios también han relacionado el IMC alto con una mayor incidencia de leiomiomas (Shikora SA y cols., 1991; Sato F. y cols. 1998; Parazzini F y cols., 2004) tanto en poblaciones de mujeres americanas, caucásicas o asiáticas. Según el estudio de Shikora SA y cols. 1991, el 51% de las pacientes con leiomiomas operadas de miomectomía o histerectomía tenían sobrepeso, y el 16%, presentaban obesidad severa. En nuestro estudio, el 32% de mujeres operadas de leiomiomas tenían sobrepeso y el 20% fueron obesas. En la Comunidad Canaria, este hallazgo es particularmente importante ya que es la cuarta comunidad de España en sobrepeso con el 37.6% frente al 29.8% de índice nacional (Instituto Nacional de Estadística y Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, diciembre 2009).

En lo que se refiere al uso de anticonceptivos, los datos obtenidos hasta ahora en los numerosos estudios realizados sobre la relación entre su uso y la presencia de leiomiomas siguen siendo inconsistentes, mostrando algunos de ellos una relación directa, otros inversa y algunos, una falta de relación (Flake GP y cols. 2003; Laughlin SK 2010; Faerstein E y cols. 2001; Chiaffarino F y cols 1999). Incluso en el más reciente meta-análisis realizado en China por Qin J. y cols. 2013, a pesar de que concluyeron que la presencia de leiomiomas no debería ser causa de contraindicación para el uso de anticonceptivos, sus resultados tienen que ser tomados una vez más con cautela por su heterogeneidad significativamente elevada. En nuestra muestra, el uso de anticonceptivos tuvo la misma frecuencia entre los casos que los controles, sin embargo la duración del período durante el cual las mujeres usaron ACO de forma continuada fue claramente diferente, con una mediana de 12 meses para los casos y de solo 1 mes para los controles. El análisis de regresión logística muestra que después de 12 meses de uso continuado de anticonceptivos, el índice de asociación con la presencia de leiomiomas fue del 75% y casi del 100% si además eran mujeres con sobrepeso u obesas, el mismo escenario que se presenta para mujeres sometidas a tratamientos de FIV. Estos datos nos confirman lo propuesto previamente en función de los resultados del estudio celular y molecular, es decir, que los niveles suprafisiológicos de hormonas gonadales, internos y/o externos contribuyen significativamente al desarrollo de leiomiomas.

La paridad es un factor que ha sido inversamente asociado con la presencia de leiomiomas tanto en los primeros estudios como en los más recientes (Baird, DD y Dunson DB, 2003; Laughlin SK y cols. 2010; Terry KL 2010). Sin embargo, en nuestro estudio la frecuencia de mujeres con 2 o más hijos fue 1.7 veces mayor en los casos que en la muestra control. A pesar de ello, este factor fue excluido en el análisis de regresión. Estudios más exhaustivos serían necesarios para esclarecer este punto.

Teniendo en cuenta todos los datos, nosotros postulamos que la edad, uso prolongado sin interrupción de anticonceptivos, tratamientos de FIV, sobrepeso y obesidad están altamente asociados con la presencia de leiomiomas en el útero de la mujer. Si tenemos en cuenta lo observado a nivel celular, en los leiomiomas procedentes de mujeres sometidas a tratamientos de FIV o con largos períodos de anticonceptivos, al suponer estas circunstancias una dosis suprafisiológica de hormonas, vemos como en estos tumores hay también un aumento de la expresión de NT/RNT y un consiguiente aumento de tamaño de los leiomiomas. Por otro lado, el hecho de que el grupo de muestras de leiomioma de crecimiento rápido estudiado, pertenezcan a mujeres obesas o con tratamientos de FIV nos hace reafirmar la hipótesis de que los estrógenos pueden actuar tanto sobre las células musculares lisas del miometrio como sobre las leiomiomatosas, activando distintas vías de señalización, que conducen a la proliferación.

CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados expuestos y la discusión de los mismos, hemos obtenido las siguientes conclusiones:

1	En el miometrio al igual que en leiomiomas, hay un número mayor de células de músculo liso que presenta el REα frente al REβ. El REβ por otro lado, es el único presente en células endoteliales y de conjuntivo del tejido leiomiomatoso.
2	El ratio REα/REβ disminuye progresivamente en las células de músculo liso, desde leiomiomas hasta LMS. Este ratio es inferior a 1 en LA y LMS y se mantiene por encima de 1 en M y LM.
3	La localización subcelular de REβ es nuclear en células musculares de M y LM. En LAs, más del 50% de células musculares son REß-ir en una localización citosólica al igual que la totalidad de células tumorales del LMS REβ-ir.
4	La relación REα/REβ, puede ser utilizada como diagnóstico en LAs y como pronóstico en LMS.
5	El incremento de células tumorales REβ-ir en neoplasias de miometrio está en relación directa con la expresión de la enzima aromatasa en las mismas.
6	Las características de expresión del REβ en células musculares de miometrio junto con las de la enzima aromatasa durante la menopausia, hacen desaconsejable en este período de la vida de la mujer, un aumento de fuentes estrogénicas como los tratamientos sustitutorios o la ingesta de sustancias con actividad estrogénica con especial afinidad por el REβ.

7	Los estrógenos actúan en las neoplasias de miometrio activando distintas rutas de señalización mediadas por distinto tipo de receptor según el tumor.
8	El sistema neurotensinérgico, NTS/NTSR1, se expresa en células del miometrio. La expresión ocurre en el conjuntivo del tejido sano y en las células musculares de LM, LA y LMS.
9	Un porcentaje de LMs expresa, junto con la forma nativa de NTSR1, dos isoformas del mismo, *NTSR1-α* y *NTSR1-β*.
10	El ARNm de NTS está presente en células tumorales de LM,LA y LMS, que también son NTSR1-ir .
11	En células de músculo liso leiomiomatosas, las hormonas gonadales inducen la expresión del péptido neurotensina.
12	La expresión de NTS/NTSR1 aumenta en relación al incremento de células REβ-ir en LAs y LMSs.
13	La edad, el uso prolongado de anticonceptivos, los tratamientos de FIV, el sobrepeso y la obesidad, están altamente asociados con la presencia de leiomiomas sintomáticos en el útero de la mujer. Los tratamientos de FIV y el sobrepeso junto con la obesidad, presentan los mayores índices de asociación.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Akhan SE, Yavuz E, Tecer A, Iyibozkurt CA, Topuz S, Tuzlali S, Bengisu E, Berkman S. *The expression of Ki-67, p53, estrogen and progesterone receptors affecting survival in uterine leiomyosarcomas. A clinicopathologic study.* Gynecol Oncol. 2005 Oct;99(1):36-42.

Alexander MJ, Leeman SE. *Estrogen-inducible neurotensin immunoreactivity in the preoptic area of the female rat.* J Comp Neurol. 1994 Jul 22;345(4):496-509.

Almeida TA, Rodriguez Y, Hernández M, Reyes R, Bello AR. *Differential expression of new splice variants of the neurotensin receptor 1 gene in human prostate cancer cell lines.* Peptides. 2010 Feb;31(2):242-7. Epub 2009 Dec 14.

Andersen J, DyReyes VM, Barbieri RL, Coachman DM, Miksicek RJ. *Leiomyoma primary cultures have elevated transcriptional response to estrogen compared with autologous myometrial cultures.* J Soc Gynecol Investig. 1995 May-Jun;2(3):542-51.

Arici A, Sozen I. *Transforming growth factor-beta3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation.* Fertil Steril. 2000 May;73(5):1006-11.

Baird DD, Dunson DB. *Why is parity protective for uterine fibroids?* Epidemiology 2003;14(2): 247-50

Bakas P, Liapis A, Vlahopoulos S, Giner M, Logotheti S, Creatsas G, Meligova AK, Alexis MN, Zoumpourlis V. *Estrogen receptor alpha and beta in uterine fibroids: a basis for altered estrogen responsiveness.* Fertil Steril. 2008 Nov;90(5):1878-85.

Bardin A, Moll F, Margueron R, Delfour C, Chu ML, Maudelonde T, Cavailles V, Pujol P. *Transcriptional and posttranscriptional regulation of fibulin-1 by estrogens leads to differential induction of messenger ribonucleic acid variants in ovarian and breast cancer cells.* Endocrinology. 2005 Feb;146(2):760-8.

Barton M. *Position paper: The membrane estrogen receptor GPER--Clues and questions.* Steroids. 2012 Aug;77(10):935-42.

Bell SW, Kempson RL, Hendrickson MR. *Problematic uterine smooth muscle neoplasms. A clinicopathologic study of 213 cases.* Am J Surg Pathol. 1994 Jun;18(6):535-58.

Bello AR, Hernández G, González M, Reyes R, Negrín I, Marrero A, Sánchez-Criado JE, Tramu G, Alonso R. *Immunoreactive neurotensin in gonadotrophs and thyrotrophs is regulated by sex steroid hormones in the female rat.* J Neuroendocrinol. 1999 Oct;11(10):785-94.

Bello AR, Reyes R, Hernández G, Negrín I, González M, Tramu G, Alonso R. *Developmental expression of neurotensin in thyrotropes and gonadotropes of male and female rats.* Neuroendocrinology. 2004 Feb;79(2):90-9.

Benassayag C, Leroy MJ, Rigourd V, Robert B, Honoré JC, Mignot TM, Vacher-Lavenu MC, Chapron C, Ferré F. *Estrogen receptors (ERalpha/ERbeta) in normal and pathological growth of the human myometrium: pregnancy and leiomyoma.* Am J Physiol. 1999 Jun;276(6 Pt 1):E1112-8

Björnström L, Sjöberg M. *Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes.* Mol Endocrinol. 2005 Apr;19(4):833-42.

Blake, R. E. *Leiomyomata uteri: hormonal and molecular determinants of growth.* J Natl Med Assoc 2007;99(10): 1170-84.

Bodner K, Bodner-Adler B, Kimberger O, Czerwenka K, Leodolter S, Mayerhofer K. *Estrogen and progesterone receptor expression in patients with uterine leiomyosarcoma and correlation with different clinicopathological parameters.* Anticancer Res. 2003 Jan-Feb;23(1B):729-32.

Brandon DD, Bethea CL, Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Harrington MS, Erickson TE, Warner C, Keenan EJ, Clinton GM. *Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein are overexpressed in human uterine leiomyomas.* Am J Obstet Gynecol. 1993 Jul;169(1):78-85.

Brandon DD, Erickson TE, Keenan EJ, Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Warner C, Clinton GM. *Estrogen receptor gene expression in human uterine leiomyomata.* J Clin Endocrinol Metab. 1995 Jun;80(6):1876-81.

Bulun SE, Imir G, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, Tamura M, Lin Z. *Aromatase in endometriosis and uterine leiomyomata.* J Steroid Biochem Mol Biol. 2005 May;95(1-5):57-62

Bulun SE, Simpson ER, Word RA. *Expression of the CYP19 gene and its product aromatase cytochrome P450 in human uterine leiomyoma tissues and cells in culture.* J Clin Endocrinol Metab. 1994;78:736-743.

Buttram VC Jr. *Uterine leiomyomata-aetiology, symptomatology and management.* Prog Clin Biol Res. 1986;225:275-96.

Cáceda R, Binder EB, Kinkead B, Nemeroff CB. *The role of endogenous neurotensin in psychostimulant-induced disruption of prepulse inhibition and locomotion.* Schizophr Res. 2012 Apr;136(1-3):88-95.

Carder PJ, Murphy CE, Dervan P, Kennedy M, McCann A, Saunders PT, Shaaban AM, Foster CS, Witton CJ, Bartlett JM, Walker RA, Speirs V. *A multi-centre investigation towards reaching a consensus on the immunohistochemical*

detection of ERbeta in archival formalin-fixed paraffin embedded human breast tissue. Breast Cancer Res Treat. 2005 Aug;92(3):287-93.

Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. *Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer.* Genomics. 1997 Nov 1;45(3):607-17.

Carraway R, Leeman SE. *The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami.* J Biol Chem. 1973 Oct 10;248(19):6854-61.

Carraway RE, Gui X, Cochrane DE. *Ca2+ channel blockers enhance neurotensin (NT) binding and inhibit NT-induced inositol phosphate formation in prostate cancer PC3 cells.* J Pharmacol Exp Ther. 2003 Nov;307(2):640-50.

Carraway RE, Hassan S. *Neurotensin receptor binding and neurotensin-induced growth signaling in prostate cancer PC3 cells are sensitive to metabolic stress.* Regul Pept. 2007 Jun 7;141(1-3):140-53.

Chen GG, Zeng Q, Tse GM. *Estrogen and its receptors in cancer.* Med Res Rev. 2008 Nov;28(6):954-74

Chiaffarino F, Parazzini F, La Vecchia C, Marsico S, Surace M, Ricci E. *Use of oral contraceptives and uterine fibroids: results from a case-control study.* Br J Obstet Gynaecol. 1999 Aug;106(8):857-60.

Cirillo D, Rachiglio AM, la Montagna R, Giordano A, Normanno N. *Leptin signaling in breast cancer: an overview.* J Cell Biochem. 2008 Nov 1;105(4):956-64.

Cleary MP, Grossmann ME. *Minireview: Obesity and breast cancer: the estrogen connection.* Endocrinology 2009;150(6): 2537-42

Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS. *Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta.* Science. 1999 Dec 17;286(5448):2328-31.

Critchley HO, Kelly RW, Brenner RM, Baird DT. *The endocrinology of menstruation--a role for the immune system.* Clin Endocrinol (Oxf). 2001 Dec;55(6):701-10.

Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA. *International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors.* Pharmacol Rev. 2006 Dec;58(4):773-81.

D'Angelo E, Spagnoli LG, Prat J. *Comparative clinicopathologic and immunohistochemical analysis of uterine sarcomas diagnosed using the World Health Organization classification system.* Hum Pathol 2009;40:1571-85.

DeWaay DJ, Syrop CH, Nygaard IE, Davis WA, Van Voorhis BJ. *Natural history of uterine polyps and leiomyomata.* Obstet Gynecol. 2002 Jul;100(1):3-7.

Downes E, Sikirica V, Gilabert-Estelles J, Bolge SC, Dodd SL, Maroulis C, Subramanian D. *The burden of uterine fibroids in five European countries.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2010 Sep;152(1):96-102.

Dupouy S, Viardot-Foucault V, Alifano M, Souazé F, Plu-Bureau G, Chaouat M, Lavaur A, Hugol D, Gespach C, Gompel A, Forgez P. *The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression.* PLoS One. 2009;4(1):e4223.

Elek J, Pinzon W, Park KH, Narayanan R. *Relevant genomics of neurotensin receptor in cancer.* Anticancer Res. 2000 Jan-Feb;20(1A):53-8.

Evans, P., S. Brunsell. *Uterine fibroid tumors: diagnosis and treatment.* Am Fam Physician 2007; 75(10): 1503-8.

Evers BM. *Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues.* Peptides. 2006 Oct;27(10):2424-33.

Faerstein E, Szklo M, Rosenshein N. *Risk factors for uterine leiomyoma: a practice-based case-control study. I. African-American heritage, reproductive history, body size, and smoking.* Am J Epidemiol 2001;153(1): 1-10

Fernandez H, Farrugia M, Jones SE, Mauskopf JA, Oppelt P, Subramanian D. *Rate, type, and cost of invasive interventions for uterine myomas in Germany, France, and England.* J Minim Invasive Gynecol 2009;16(1): 40-6.

Filardo EJ, Thomas P. *Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology.* Endocrinology. 2012 Jul;153(7):2953-62.

Flake GP, Andersen J, Dixon D. *Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review.* Environ Health Perspect 2003;111(8): 1037-54.

Flynn M, Jamison M, Datta S, Myers E. *Health care resource use for uterine fibroid tumors in the United States.* Am J Obstet Gynecol 2006;195(4): 955-64.

Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. *Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis.* Semin Cell Dev Biol. 2010 Feb;21(1):33-9.

Gao QG, Xie JX, Wong MS, Chen WF. *IGF-I receptor signaling pathway is involved in the neuroprotective effect of genistein in the neuroblastoma SK-N-SH cells.* Eur J Pharmacol. 2012 Feb 29;677(1-3):39-46.

Gargett CE, Bucak K, Zaitseva M, Chu S, Taylor N, Fuller PJ, Rogers PA. *Estrogen receptor-alpha and -beta expression in microvascular endothelial cells and smooth muscle cells of myometrium and leiomyoma.* Mol Hum Reprod. 2002 Aug;8(8):770-5.

Gargett CE, Zaitseva M, Bucak K, Chu S, Fuller PJ, Rogers PA. *17Beta-estradiol up-regulates vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in human myometrial microvascular endothelial cells: role of estrogen receptor-alpha and -beta.* J Clin Endocrinol Metab. 2002 Sep;87(9):4341-9

Giné L, Miralles RM, Balagueró L, Borrás M, Guillermo J. *Evaluation of 203 vaginal hysterectomies.* Acta Obstet Ginecol Hisp Lusit. 1978 Jun;26(6):315-24.

Giorgi RR, Chile T, Bello AR, Reyes R, Fortes MA, Machado MC, Cescato VA, Musolino NR, Bronstein MD, Giannella-Neto D, Corrêa-Giannella ML. *Expression of neurotensin and its receptors in pituitary adenomas.* J Neuroendocrinol. 2008 Sep;20(9):1052-7.

Giuntoli RL 2nd, Gostout BS, DiMarco CS, Metzinger DS, Keeney GL. *Diagnostic criteria for uterine smooth muscle tumors: leiomyoma variants associated with malignant behavior.* J Reprod Med. 2007 Nov;52(11):1001-10.

Gordon P Flake, Janet Andersen, Darlene Dixon. *Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review.* Environ Health Perspect. 2003 June; 111(8): 1037–1054.

Gui X, Guzman G, Dobner PR, Kadkol SS. *Increased neurotensin receptor-1 expression during progression of colonic adenocarcinoma.* Peptides. 2008 Sep;29(9):1609-15.

Gunin AG, Sharov AA. *Role of mast cells in oestradiol effects on the uterus of ovariectomized rats.* J Reprod Fertil. 1998 May;113(1):61-8.

Guntupalli SR, Ramirez PT, Anderson ML, Milam MR, Bodurka DC, Malpica A. *Uterine smooth muscle tumor of uncertain malignant potential: a retrospective analysis.* Gynecol Oncol. 2009 Jun;113(3):324-6.

Hall JM, Korach KS. *Analysis of the molecular mechanisms of human estrogen receptors alpha and beta reveals differential specificity in target promoter regulation by xenoestrogens.* J Biol Chem. 2002 Nov 15;277(46):44455-61.

Hart R, Khalaf Y, Yeong CT, Seed P, Taylor A, Braude P. *A prospective controlled study of the effect of intramural uterine fibroids on the outcome of assisted conception.* Hum Reprod. 2001 Nov;16(11):2411-7

Heinemann K, Thiel C, Möhner S, Lewis MA, Raff T, Kühl-Habich D, Heinemann LA. *Benign gynecological tumors: estimated incidence. Results of the German Cohort Study on Women's Health.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2003 Mar 26;107(1):78-80.

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. *Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets.* Physiol Rev. 2007 Jul;87(3):905-31.

Hiroi H, Tsutsumi O, Momoeda M, Takai Y, Osuga Y, Taketani Y. *Differential interactions of bisphenol A and 17beta-estradiol with estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta.* Endocr J. 1999 Dec;46(6):773-8.

Hodge JC, Morton CC. *Genetic heterogeneity among uterine leiomyomata: insights into malignant progression.* Mol Genet 2007;16 Spec No 1: R7-13.

Huang GS, Gunter MJ, Arend RC, Li M, Arias-Pulido H, Prossnitz ER, Goldberg GL, Smith HO. *Co-expression of GPR30 and ERbeta and their association with disease progression in uterine carcinosarcoma.* Am J Obstet Gynecol. 2010 Sep;203(3):242.e1-5.

Hyder SM, Huang JC, Nawaz Z, Boettger-Tong H, Mäkelä S, Chiappetta C, Stancel GM. *Regulation of vascular endothelial growth factor expression by estrogens and progestins.* Environ Health Perspect. 2000 Oct;108 Suppl 5:785-90.

Hyder SM, Stancel GM. *Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins.* Mol Endocrinol. 1999 Jun;13(6):806-11.

Indraccolo U, Luchetti G, Indraccolo SR. *Malignant transformation of uterine leiomyomata.* Eur J Gynaecol Oncol. 2008;29(5):543-4

Instituto Nacional de Estadística. *Encuesta de morbilidad hospitalaria.* http://www.ine.es

Ioffe YJ, Li AJ, Walsh CS, Karlan BY, Leuchter R, Forscher C, Cass I. *Hormone receptor expression in uterine sarcomas: prognostic and therapeutic roles*. Gynecol Oncol. 2009 Dec;115(3):466-71.

Ip PP, Tse KY, Tam KF. *Uterine smooth muscle tumors other than the ordinary leiomyomas and leiomyosarcomas: a review of selected variants with emphasis on recent advances and unusual morphology that may cause concern for malignancy.* Adv Anat Pathol. 2010 Mar;17(2):91-112.

Ishizuka J, Townsend CM Jr, Thompson JC. *Neurotensin regulates growth of human pancreatic cancer.* Ann Surg. 1993 May;217(5):439-45; discussion 446.

Islam MS, Protic O, Giannubilo SR, Toti P, Tranquilli AL, Petraglia F, Castellucci M, Ciarmela P. *Uterine leiomyoma: available medical treatments and new possible therapeutic options.* J Clin Endocrinol Metab. 2013 Mar;98(3):921-34.

Jakimiuk AJ, Bogusiewicz M, Tarkowski R, Dziduch P, Adamiak A, Wróbel A, Haczyński J, Magoffin DA, Jakowicki JA. *Estrogen receptor alpha and beta expression in uterine leiomyomas from premenopausal women.* Fertil Steril. 2004 Oct;82 Suppl 3:1244-9.

Jensen EV, Jacobson HI, Walf AA, Frye CA. *Estrogen action: a historic perspective on the implications of considering alternative approaches.* Physiol Behav. 2010 Feb 9;99(2):151-62.

Jongen V, Briët J, de Jong R, ten Hoor K, Boezen M, van der Zee A, Nijman H, Hollema H. *Expression of estrogen receptor-alpha and -beta and progesterone receptor-A and -B in a large cohort of patients with endometrioid endometrial cancer.* Gynecol Oncol. 2009 Mar;112(3):537-42.

Kato S, Sasaki H, Suzawa M, Masushige S, Tora L, Chambon P, Gronemeyer H. *Widely spaced, directly repeated PuGGTCA elements act as promiscuousenhancers for different classes of nuclear recptors.* Mol Cell Biol. 1995 November; 15(11):5858-5867.

Kitabgi P. *Functional domains of the subtype 1 neurotensin receptor (NTS1).* Peptides. 2006 Oct;27(10):2461-8.

Kolkova Z, Noskova V, Ehinger A, Hansson S, Casslén B. *G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER, GPR 30) in normal human endometrium and early pregnancy decidua.* Mol Hum Reprod. 2010 Oct;16(10):743-51.

Konstantinopoulos PA, Kominea A, Vandoros G, Sykiotis GP, Andricopoulos P, Varakis I, Sotiropoulou-Bonikou G, Papavassiliou AG. *Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation.* Eur J Cancer. 2003 Jun;39(9):1251-8.

Kovács KA, Oszter A, Göcze PM, Környei JL, Szabó I. *Comparative analysis of cyclin D1 and oestrogen receptor (alpha and beta) levels in human leiomyoma and adjacent myometrium.* Mol Hum Reprod. 2001 Nov;7(11):1085-91.

Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jun 11;93(12):5925-30.

Kulińska-Niedziela I, Paluszak J. *Neurotensin--structure, origin and biological function.* Postepy Hig Med Dosw. 1997;51(3):329-42.

Laughlin SK, Baird DD, Savitz DA, Herring AH, Hartmann KE. *Prevalence of uterine leiomyomas in the first trimester of pregnancy: an ultrasound-screening study.* Obstet Gynecol. 2009 Mar;113(3):630-5.

Laughlin SK, Herring AH, Savitz DA, Olshan AF, Fielding JR, Hartmann KE, Baird DD. *Pregnancy-related fibroid reduction.* Fertil Steril. 2010 Nov;94(6):2421-3.

Lee EJ, Bajracharya P, Lee DM, Cho KH, Kim KJ, Bae YK, Kim MJ, Lee KH, Kim HJ, Song GH, Chun SS, Choi I. *Gene Expression Profiles of Uterine Normal Myometrium and Leiomyoma.* Korean J Pathol. 2010; 44: 272-83.

Levy G, Hill MJ, Beall S, Zarek SM, Segars JH, Catherino WH. *Leiomyoma: genetics, assisted reproduction, pregnancy and therapeutic advances.* J Assist Reprod Genet. 2012 May 15.

Li S, McLachlan JA. *Estrogen-associated genes in uterine leiomyoma.* Ann N Y Acad Sci 2001;948: 112-20

Mandusic V, Dimitrijevic B, Nikolic-Vukosavljevic D, Neskovic-Konstantinovic Z, Kanjer K, Hamann U. *Different associations of estrogen receptor β isoforms, ERβ1 and ERβ2, expression levels with tumor size and survival in early- and late-onset breast cancer.* Cancer Lett. 2012 Aug 1;321(1):73-9.

Marcos P, Corio M, Coveñas R, Tramu G. *Neurotensin and tyrosine hydroxylase in the tuberoinfundibular system of the guinea pig hypothalamus with special emphasis to lactation status.* Peptides. 1996;17(1):139-46.

Marino JL, Eskenazi B, Warner M, Samuels S, Vercellini P, Gavoni N, Olive D. *Uterine leiomyoma and menstrual cycle characteristics in a population-based cohort study.* Hum Reprod. 2004 Oct;19(10):2350-5.

Markowska A, Belloni AS, Rucinski M, Parenti AR, Nardelli GB, Drews K, Nussdorfer GG, Malendowicz LK. *Leptin and leptin receptor expression in the myometrium and uterine myomas: Is leptin involved in tumor development?* Int J Oncol. 2005 Dec;27(6):1505-9.

Markowska A, Rucinski M, Drews K, Malendowicz LK. *Further studies on leptin and leptin receptor expression in myometrium and uterine myomas.* Eur J Gynaecol Oncol. 2005;26(5):517-25.

Markowska A, Rucinski M, Drews K, Malendowicz LK. *Studies on leptin and leptin receptor gene expression in myometrium and uterine myomas of gnRH analogue-treated women.* Eur J Gynaecol Oncol. 2006;27(4):379-84.

Marshall LM, Spiegelman D, Barbieri RL, Goldman MB, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Hunter DJ. *Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race.* Obstet Gynecol. 1997 Dec;90(6):967-73.

Marshall LM, Spiegelman D, Goldman MB, Manson JE, Colditz GA, Barbieri RL, Stampfer MJ, Hunter DJ. *A prospective study of reproductive factors and oral contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyomata.* Fertil Steril. 1998 Sep;70(3):432-9.

Maruo T, Ohara N, Wang J, Matsuo H. *Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis.* Hum Reprod Update 2004;10(3): 207-20.

Mason HR, Nowak RA, Morton CC, Castellot JJ Jr. *Heparin inhibits the motility and proliferation of human myometrial and leiomyoma smooth muscle cells.* Am J Pathol. 2003 Jun;162(6):1895-904.

Matsuzaki S, Fukaya T, Suzuki T, Murakami T, Sasano H, Yajima A. *Oestrogen receptor alpha and beta mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle.* Mol Hum Reprod. 1999 Jun;5(6):559-64.

Matthews J, Gustafsson JA. *Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta.* Mol Interv. 2003 Aug;3(5):281-92.

Miettinen M, Lasota J. *KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation.* Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2005 Sep;13(3):205-20.

Mori A, Nakayama K, Suzuki J, Nikaido T, Isobe M, Fujii S. *Analysis of stem cell factor for mast cell proliferation in the human myometrium.* Mol Hum Reprod. 1997 May;3(5):411-8.

Mori A, Zhai YL, Toki T, Nikaido T, Fujii S. *Distribution and heterogeneity of mast cells in the human uterus.* Hum Reprod. 1997 Feb;12(2):368-72.

Mylonas I, Jeschke U, Shabani N, Kuhn C, Kriegel S, Kupka MS, Friese K. *Normal and malignant human endometrium express immunohistochemically estrogen receptor alpha (ER-alpha), estrogen receptor beta (ER-beta) and progesterone receptor (PR).* Anticancer Res. 2005 May-Jun;25(3A):1679-86.

Mylonas I, Makovitzky J, Jeschke U, Briese V, Friese K, Gerber B. *Expression of Her2/neu, steroid receptors (ER and PR), Ki67 and p53 in invasive mammary ductal carcinoma associated with ductal carcinoma In Situ (DCIS) Versus invasive breast cancer alone.* Anticancer Res. 2005 May-Jun;25(3A):1719-23.

Nadal-Serrano M, Sastre-Serra J, Pons DG, Miró AM, Oliver J, Roca P. *The ERalpha/ERbeta ratio determines oxidative stress in breast cancer cell lines in response to 17beta-estradiol.* J Cell Biochem. 2012 Oct;113(10):3178-85.

Nierth-Simpson EN, Martin MM, Chiang TC, Melnik LI, Rhodes LV, Muir SE, Burow ME, McLachlan JA. *Human uterine smooth muscle and leiomyoma cells differ in their rapid 17beta-estradiol signaling: implications for proliferation.* Endocrinology. 2009 May;150(5):2436-45.

Okarvi SM. *Peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxic conjugates: potential tools against cancer.* Cancer Treat Rev. 2008 Feb;34(1):13-26.

Okolo, S. *Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids.* Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2008; 22(4): 571-88

Owman C, Blay P, Nilsson C, Lolait SJ. *Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues.* Biochem Biophys Res Commun. 1996 Nov 12;228(2):285-92.

Parazzini F, Chiaffarino F, Polverino G, Chiantera V, Surace M, La Vecchia C. *Uterine fibroids risk and history of selected medical conditions linked with female hormones.* Eur J Epidemiol. 2004;19(3):249-53.

Parker, W. H. *Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas.* Fertil Steril 2007;87(4): 725-36.

Pelletier G, Labrie C, Labrie F. *Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs.* J Endocrinol. 2000 May;165(2):359-70.

Qin J, Yang T, Kong F, Zhou Q. *Oral contraceptive use and uterine leiomyoma risk: a meta-analysis based on cohort and case-control studies.* Arch Gynecol Obstet. 2013 Apr 4.

Ramcharan S, Pellegrin FA, Ray RM, Hsu JP. *The Walnut Creek Contraceptive Drug Study. A prospective study of the side effects of oral contraceptives. Volume III, an interim report: A comparison of disease occurrence leading to hospitalization or death in users and nonusers of oral contraceptives.* J Reprod Med. 1980 Dec;25(6 Suppl):345-72.

Raspollini MR, Amunni G, Villanucci A, Boddi V, Simoni A, Taddei A, Taddei GL. *Estrogen and progesterone receptors expression in uterine malignant smooth muscle tumors: correlation with clinical outcome.* J Chemother. 2003 Dec;15(6):596-602.

Regidor PA, Schmidt M, Callies R, Kato K, Schindler AE. *Estrogen and progesterone receptor content of GnRH analogue pretreated and untreated uterine leiomyomata.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1995 Nov;63(1):69-73.

Reich O, Regauer S. *Hormonal therapy of endometrial stromal sarcoma.* Curr Opin Oncol. 2007 Jul;19(4):347-52.

Reich O, Regauer S. *Aromatase expression in low-grade endometrial stromal sarcomas: an immunohistochemical study.* Mod Pathol. 2004 Jan;17(1):104-8.

Reubi JC, Kappeler A, Waser B, Laissue J, Hipkin RW, Schonbrunn A. *Immunohistochemical localization of somatostatin receptors sst2A in human tumors.* Am J Pathol. 1998 Jul;153(1):233-45.

Reubi JC, Laissue JA, Waser B, Steffen DL, Hipkin RW, Schonbrunn A. *Immunohistochemical detection of somatostatin sst2a receptors in the lymphatic, smooth muscular, and peripheral nervous systems of the human gastrointestinal tract: facts and artifacts.* J Clin Endocrinol Metab. 1999 Aug;84(8):2942-50.

Reubi JC. *Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy.* Endocr Rev. 2003 Aug;24(4):389-427.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. *A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling.* Science. 2005 Mar 11;307(5715):1625-30.

Reyes R, Valladares F, Díaz-Flores L, Feria L, Alonso R, Tramu G, Bello AR. *Immunohistochemical localization of hormones and peptides in the human pituitary cells in a case of hypercortisolism by ACTH secreting microadenoma.* Histol Histopathol. 2007 Jul;22(7):709-17.

Roan CJ, Chuang JH, Hsu TY, Tsai HY, Pan LL, Cheng JT. *Estrogen receptor beta is not increasingly expressed in leiomyoma nodules which show no progressive enlargement in premenopausal women.* J Formos Med Assoc. 2005 Dec;104(12):920-6.

Rodríguez Y, Almeida TA, Valladares F, Báez D, Montes de Oca F, García C, Dorta I, Hernández M, Reyes R, Bello AR. *Neurotensin and neurotensin receptor 1 expression in human myometrium and uterine leiomyomas.* Biol Reprod. 2010 Oct;83(4):641-7.

Rodríguez Y, Báez D, Montesdeoca F, García C, Dorta I, Reyes R, Valladares F, Almeida TA, Bello AR. *Comparative analysis of the ERα/ERβ ratio and neurotensin and its high-affinity receptor in myometrium, uterine leiomyoma, atypical leiomyoma, and leiomyosarcoma.* Int J Gynecol Pathol. 2011 Jul;30(4):354-63.

Samadi AR, Lee NC, Flanders WD, Boring JR 3rd, Parris EB. *Risk factors for self-reported uterine fibroids: a case-control study.* Am J Public Health. 1996 Jun;86(6):858-62.

Sankaran S, Manyonda IT. *Medical management of fibroids.* Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2008; 22(4): 655-76.

Sato F, Mori M, Nishi M, Kudo R, Miyake H. *Familial aggregation of uterine myomas in Japanese women.* J Epidemiol. 2002 May;12(3):249-53.

Seethalakshmi L, Mitra SP, Dobner PR, Menon M, Carraway RE. *Neurotensin receptor expression in prostate cancer cell line and growth effect of NT at physiological concentrations.* Prostate. 1997 May 15;31(3):183-92.

Sehgal I, Powers S, Huntley B, Powis G, Pittelkow M, Maihle NJ. *Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen withdrawal in human prostate cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 May 24;91(11):4673-7.

Shaaban AM, Jarvis C, Moore F, West C, Dodson A, Foster CS. *Prognostic significance of estrogen receptor Beta in epithelial hyperplasia of usual type with known outcome.* Am J Surg Pathol. 2005 Dec;29(12):1593-9.

Shaaban AM, Speirs V. *The estrogen receptors alpha, beta, and beta cx.* Clin Cancer Res. 2005 Nov 15;11(22):8222; author reply 8222-3.

Shikora SA, Niloff JM, Bistrian BR, Forse RA, Blackburn GL. *Relationship between obesity and uterine leiomyomata.* Nutrition. 1991 Jul-Aug;7(4):251-5.

Shozu M, Murakami K, Segawa T, Kasai T, Inoue M. *Successful treatment of a symptomatic uterine leiomyoma in a perimenopausal woman with a nonsteroidal aromatase inhibitor.* Fertil Steril. 2003 Mar;79(3):628-31.

Singh AM, Konjengbam R, Devi SS, Devi NP. *Leiomyosarcoma of uterus--a case report.* J Indian Med Assoc. 2006 Mar;104(3):142, 144, 147

Somaï S, Gompel A, Rostène W, Forgez P. *Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells.* Biochem Biophys Res Commun. 2002 Jul 12;295(2):482-8.

Souazé F, Dupouy S, Viardot-Foucault V, Bruyneel E, Attoub S, Gespach C, Gompel A, Forgez P. *Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression.* Cancer Res. 2006 Jun 15;66(12):6243-9.

Speirs V, Carder PJ, Lansdown MR. *Oestrogen receptor beta: how should we measure this?* Br J Cancer. 2002 Sep 9;87(6):687; author reply 688-9.

Spiekermann K, Faber F, Voswinckel R, Hiddemann W. *The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits VEGF-induced endothelial cell sprouting and induces growth arrest and apoptosis by inhibition of c-kit in AML cells.* Exp Hematol. 2002 Jul;30(7):767-73.

Stewart EA, Friedman AJ, Peck K, Nowak RA. *Relative overexpression of collagen type I and collagen type III messenger ribonucleic acids by uterine leiomyomas during the proliferative phase of the menstrual cycle.* J Clin Endocrinol Metab. 1994 Sep;79(3):900-6.

Stovall DW, Van Voorhis BJ, Sparks AE, Adams LM, Syrop CH. *Selective early elimination of luteal support in assisted reproduction cycles using a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian stimulation.* Fertil Steril. 1998;Dec;70(6):1056-62

Strissel PL, Swiatek J, Oppelt P, Renner SP, Beckmann MW, Strick R. *Transcriptional analysis of steroid hormone receptors in smooth muscle uterine leiomyoma tumors of postmenopausal patients.* J Steroid Biochem Mol Biol. 2007 Oct;107(1-2):42-7.

Sumitani H, Shozu M, Segawa T, Murakami K, Yang HJ, Shimada K, Inoue M. *In situ estrogen synthesized by aromatase P450 in uterine leiomyoma cells promotes cell growth probably via an autocrine/intracrine mechanism.* Endocrinology. 2000 Oct;141(10):3852-61.

Sung CO, Ahn G, Song SY, Choi YL, Bae DS. *Atypical leiomyomas of the uterus with long-term follow-up after myomectomy with immunohistochemical analysis for p16INK4A, p53, Ki-67, estrogen receptors, and progesterone receptors.* Int J Gynecol Pathol. 2009 Nov;28(6):529-34

Takeda T, Sakata M, Isobe A, Miyake A, Nishimoto F, Ota Y, Kamiura S, Kimura T. *Relationship between metabolic syndrome and uterine leiomyomas: a case-control study.* Gynecol Obstet Invest 2007;66(1): 14-7.

Taran FA, Weaver AL, Gostout BS, Stewart EA. *Understanding cellular leiomyomas: a case-control study.* Am J Obstet Gynecol. 2010 Aug;203(2):109.e1-6.

Taylor SE, Patel II, Singh PB, Nicholson CM, Stringfellow HF, Gopala Krishna RK, Matanhelia SS, Martin-Hirsch PL, Martin FL. *Elevated oestrogen receptor splice variant ERαΔ5 expression in tumour-adjacent hormone-responsive tissue.* Int J Environ Res Public Health. 2010 Nov;7(11):3871-89.

Terry KL, De Vivo I, Hankinson SE, Missmer SA. *Reproductive characteristics and risk of uterine leiomyomata.* Fertil Steril. 2010 Dec;94(7):2703-7.

Theodorsson-Norheim E, Oberg K, Rosell S, Boström H. *Neurotensinlike immunoreactivity in plasma and tumor tissue from patients with endocrine tumors of the pancreas and gut.* Gastroenterology. 1983 Oct;85(4):881-9.

Thomas RP, Hellmich MR, Townsend CM Jr, Evers BM. *Role of gastrointestinal hormones in the proliferation of normal and neoplastic tissues.* Endocr Rev. 2003 Oct;24(5):571-99.

Tian R, Wang Z, Shi Z, Li D, Wang Y, Zhu Y, Lin W, Gui Y, Zheng XL. *Differential expression of G-protein-coupled estrogen receptor-30 in human myometrial and uterine leiomyoma smooth muscle.* Fertil Steril. 2012 Oct 6. pii: S0015-0282(12)02190-5.

Tramu G, Pillez A, Leonardelli J. *An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous localization of two antigens by immunocytochemistry.* J Histochem Cytochem. 1978 Apr;26(4):322-4.

Valladares F, Frías I, Báez D, García C, López FJ, Fraser JD, Rodríguez Y, Reyes R, Díaz-Flores L, Bello AR. *Characterization of estrogen receptors alpha and beta in uterine leiomyoma cells.* Fertil Steril. 2006 Dec;86(6):1736-43.

Venables JP. *Aberrant and alternative splicing in cancer.* Cancer Res. 2004 Nov 1;64(21):7647-54.

Vollenhoven BJ, Pearce P, Herington AC, Healy DL. *Steroid receptor binding and messenger RNA expression in fibroids from untreated and gonadotrophin-releasing hormone agonist pretreated women.* Clin Endocrinol (Oxf). 1994 Apr;40(4):537-44.

Walker CL, Stewart EA. *Uterine fibroids: the elephant in the room.* Science 2005; 308(5728): 1589-92

Walker, C. L. *Role of hormonal and reproductive factors in the etiology and treatment of uterine leiomyoma.* Recent Prog Horm Res 2002;57: 277-94

Walsh PJ, Teasdale J, Cowen PN. *Ultrastructural localisation of oestrogen receptor in breast cancer cell nuclei.* Histochemistry. 1990;95(2):205-7.

Wang H, Guan B, Shi Q, Ma H, Zhou H, Wang X, Zhou X. *May metaplastic breast carcinomas be actually basal-like carcinoma? Further evidence study with its ultrastructure and survival analysis.* Med Oncol. 2011 Mar;28(1):42-50.

Wang H, Wu X, Englund K, Masironi B, Eriksson H, Sahlin L. *Different expression of estrogen receptors alpha and beta in human myometrium and leiomyoma during the proliferative phase of the menstrual cycle and after GnRHa treatment.* Gynecol Endocrinol. 2001 Dec;15(6):443-52.

Wang L, Friess H, Zhu Z, Graber H, Zimmermann A, Korc M, Reubi JC, Büchler MW. *Neurotensin receptor-1 mRNA analysis in normal pancreas and pancreatic disease.* Clin Cancer Res. 2000 Feb;6(2):566-71.

Wärnmark A, Wikström A, Wright AP, Gustafsson JA, Härd T. *The N-terminal regions of estrogen receptor alpha and beta are unstructured in vitro and show different TBP binding properties.* J Biol Chem. 2001 Dec 7;276(49):45939-44.

Wegienka G. *Are uterine leiomyoma a consequence of a chronically inflammatory immune system?* Med Hypotheses. 2012 Aug;79(2):226-31.

Weihua Z, Saji S, Mäkinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M, Gustafsson JA. *Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 May 23;97(11):5936-41.

Wilkinson N, Rollason TP. *Recent advances in the pathology of smooth muscle tumours of the uterus.* Histopathology. 2001 Oct;39(4):331-41

Wise LA, Palmer JR, Harlow BL, Spiegelman D, Stewart EA, Adams-Campbell LL, Rosenberg L. *Reproductive factors, hormonal contraception, and risk of uterine leiomyomata in African-American women: a prospective study.* Am J Epidemiol 2004; 159(2): 113-23.

Wu WX, Ma XH, Smith GC, Nathanielsz PW. *Differential distribution of ERalpha and ERbeta mRNA in intrauterine tissues of the pregnant rhesus monkey.* Am J Physiol Cell Physiol. 2000 Jan;278(1):C190-8.

Wu Z, Martinez-Fong D, Trédaniel J, Forgez P. *Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy.* Front Endocrinol (Lausanne). 2012;3:184.

Xu Q, Takekida S, Ohara N, Chen W, Sitruk-Ware R, Johansson ED, Maruo T. *Progesterone receptor modulator CDB-2914 down-regulates proliferative cell nuclear antigen and Bcl-2 protein expression and up-regulates caspase-3 and poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase expression in cultured human uterine leiomyoma cells.* J Clin Endocrinol Metab. 2005 Feb;90(2):953-61.

Yanai H, Wani Y, Notohara K, Takada S, Yoshino T. *Uterine leiomyosarcoma arising in leiomyoma: clinicopathological study of four cases and literature review.* Pathol Int. 2010 Jul;60(7):506-9.

Yavuz E, Güllüoğlu MG, Akbaş N, Tuzlali S, Ilhan R, Iplikçi A, Akhan SE. *The values of intratumoral mast cell count and Ki-67 immunoreactivity index in differential diagnosis of uterine smooth muscle neoplasms.* Pathol Int. 2001 Dec;51(12):938-41.

Yin P, Lin Z, Cheng YH, Marsh EE, Utsunomiya H, Ishikawa H, Xue Q, Reierstad S, Innes J, Thung S, Kim JJ, Xu E, Bulun SE. *Progesterone receptor regulates Bcl-2 gene expression through direct binding to its promoter region in uterine leiomyoma cells.* J Clin Endocrinol Metab. 2007 Nov;92(11):4459-66.

Zaitseva M, Vollenhoven BJ, Rogers PA. *In vitro culture significantly alters gene expression profiles and reduces differences between myometrial and fibroid smooth muscle cells.* Mol Hum Reprod. 2006 Mar;12(3):187-207.

Zhang G, Liu X, Farkas AM, Parwani AV, Lathrop KL, Lenzner D, Land SR, Srinivas H. *Estrogen receptor beta functions through nongenomic mechanisms in lung cancer cells.* Mol Endocrinol. 2009 Feb;23(2):146-56.

Zhao D, Pothoulakis C. *Effects of NT on gastrointestinal motility and secretion, and role in intestinal inflammation.* Peptides. 2006 Oct;27(10):2434-44.

Zhu XQ, Shi YF, Zhou CY. *Mast cells in cellular leiomyoma and endometrial stromal sarcoma of the uterus.* Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 2004 Mar;26(3):168-72.

Zimmermann A, Bernuit D, Gerlinger C, Schaefers M, Geppert K. *Prevalence, symptoms and management of uterine fibroids: an international internet-based survey of 21,746 women.* BMC Womens Health. 2012 Mar 26;12:6.

PUBLICACIONES Y CONGRESOS

Publicaciones

La ruta mTOR como Diana terapéutica. Rubén P. Machín, Yurena Rodríguez Díaz y María C. Vega Hernández. Biocáncer. Vol. 3, Enero 2007.

Characterization of estrogen receptors alpha and beta in uterine leiomyoma cells. Valladares F, Frías I, Báez D, García C, López FJ, Fraser JD, Rodríguez Y, Reyes R, Díaz-Flores L, Bello AR. Fertil Steril. 2006 Dec;86(6):1736-43. Epub 2006 Sep 29.

Differential expression of new splice variants of the neurotensin receptor 1 gene in human prostate cancer cell lines. Almeida TA, Rodriguez Y, Hernández M, Reyes R, Bello AR. Peptides. 2010 Feb; 31(2):242-7.

Neurotensin and Neurotensin Receptor 1 Expression in Human Myometrium and Uterine Leiomyomas. Rodríguez Y, Almeida TA, Valladares F, Báez D, Montes de Oca F, García C, Dorta I, Hernández M, Reyes R, Bello AR. Biol Reprod. 2010 Oct; 83(4):641-7

Comparative Analysis of the ERα/ERβ Ratio and Neurotensin and its High-affinity Receptor in Myometrium and Uterine Leiomyoma, Atypical Leiomyoma and Leiomyosarcoma. Rodríguez Y, Báez D, de Oca FM, García C, Dorta I, Reyes R, Valladares F, Almeida TA, Bello AR. Int J Gynecol Pathol. 2011 Jul; 30(4):354-63.

Estrógenos y péptido neurotensina en neoplasias de miometrio. Yurena Rodríguez, Francisco Valladares, Francisco Montesdeoca, Idaira Dorta, Ricardo Reyes, Candelaria García, Mariano Hernández, Teresa A. Almeida, Delia Báez y Aixa R. Bello. Biocáncer. Vol. 5, 2011.

Congresos

Distribución detallada de los receptores de progesterona en los leiomiomas. Yurena Rodríguez Díaz y Emiliano Matos Perdomo. Directores: Ricardo Reyes Rodríguez y Aixa Rodríguez Bello. XVI Congreso de estudiantes de Ciencias de la Salud. Universidad de La Laguna. Santa Cruz de Tenerife. Mayo 2005.

Neurotensin peptide in the healthy and neoplastic tissue of human uterine wall. R.Reyes; Y. Rodríguez; E. Matos; C. García; F. Montesdeoca; F. López; G. Tramu; F. Valladares; A.R Bello. First International Congress of Histology and Tissue Engineering. Universidad de Alcalá. Madrid. Septiembre 2005.

Síntesis endógena de estrógenos en tumores uterinos. Y. Rodríguez; R. Reyes; E. Matos; D. Báez, D. Arias, C. García; R. Gutiérrez; F. Valladares; L. Díaz-Flores; A.R Bello. X Congreso ASEICA. Pamplona. Octubre 2005.

Neurotensina, modulador en células de tumores uterinos. Y. Rodríguez; F. Valladares, R. Reyes; E. Matos; F. Montesdeoca; D. Báez; D. Arias, C. García; G. Tramu; A.R Bello. X Congreso ASEICA. Pamplona. Octubre 2005.

Some aspects of uterine tumor cells. Yurena Rodríguez & José A. Galván. Dir.: A.R. Bello. Second meeting of young cancer research Investigators of the Canary Islands. La Gomera. Diciembre 2005.

Neurotensin and neurotensin receptor localization in uterine leiomyoma cells whith and whithout progesterone treatment. Y. Rodríguez, F. Valladares, D. Báez, F. Montesdeoca, C. García, R. Gutiérrez, L. Días-Flores, A.R. Bello. International Federation of Fertilities Societies 19th World Congress on Fertility & Sterility. Durban, Sudáfrica. Abril 2007.

The neurotensin peptide as a useful tool in diagnosis or in the development of new therapeutic drugs in uterine tumours. Y. Rodríguez, F. Valladares, C. García, D. Báez, F. Montesdeoca, L. Díaz-Flores and A.R. Bello. XI Meeting ASEICA. Las Palmas de Gran Canaria. Mayo 2007.

Relación entre la expresión de receptores de hormonas sexuales, aromatasa, neurotensina y factores de proliferación, Ki-67 y apoptosis, p53 y Bcl-2 en la etiopatogenia de un leiomiosarcoma uterino. Y. Rodríguez, I. Dorta, E. Ramos, F. Valladares, F. Montesdeoca, R. Reyes, AR Bello. IV Conferencia Atlántica de Patología Molecular. Corralero, Fuerteventura. Junio 2008.

Factores hormonales y prevalencia de tumores uterinos. Yurena Rodríguez Díaz, Francisco Montesdeoca Suárez, Francisco Valladares Parrilla, Aixa Rodríguez Bello y Delia Rosa Báez Quintana. SEF. Valencia, España. Mayo 2010.

Implications of cellular ERα/ERβ ratio in uterine smooth-muscle cells carcinogenesis. Yurena Rodríguez, Delia Báez, Fco Montes de Oca, Candelaria García, Idaira Dorta, Fco Valladares, Teresa A. Almeida, Aixa R. Bello. European Association for Cancer Research. Oslo, Noruega. Julio 2010.

Factores hormonales y leiomiomas: incidencia en la probabilidad de cirugía. Yurena Rodríguez, Armando Aguirre, Fco Montes de Oca, Fco Valladares, Aixa R. Bello y Delia Báez. XXII Congreso de la Sociedad de Obstetricia y Ginecología de Canarias. *[MEJOR PÓSTER DE REPRODUCCIÓN HUMANA].*