



Universidad
de La Laguna

Departamento de Bioquímica,
Microbiología, Biología Celular y
Genética



Facultad de Ciencias
Sección de BIOLOGÍA

Detección inmunohistoquímica de la
colocalización de receptores de hormonas
esteroideas.

Immunohistochemical detection of steroid
hormone receptors colocalization.

Trabajo Fin de Grado

CLAUDIA REYES GOYA

Septiembre, 2015

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2014/2015	ENTRADA Fecha: Núm:
--	--------------------------------------

Datos Personales

Nº DNI o pasaporte: 43380652F	Nombre y Apellidos: Claudia Reyes Goya
Teléfono: 653897927	Dirección de correo electrónico: claudia.crg.93@hotmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Detección inmunohistoquímica de la colocación de receptores de hormonas esteroideas.
--

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. Aixa Celina Rodríguez Bello	
Profesor/a del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética- Área de Biología Celular	
y D./Dña. Ana María Lancha Bernal	
Profesor/a del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética- Área de Biología Celular	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
Fdo.:  Aixa C. Reyes Bello	Fdo.:  Ana María Lancha Bernal

La Laguna, a 2 de Septiembre de 2015

Firma del interesado/a



**SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE
BIOLOGÍA**

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY

1. INTRODUCCIÓN	1
<i>MIOMETRIO Y LEIOMIOMAS</i>	1
<i>LEIOMIOMAS</i>	2
<i>RECEPTORES DE ESTRÓGENOS</i>	5
<i>RECEPTORES DE ESTRÓGENOS EN LEIOMIOMAS</i>	6
<i>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</i>	8
2. MATERIAL Y MÉTODOS	8
MATERIAL	8
MÉTODOS	9
<i>PROCESADO DE LAS MUESTRAS</i>	9
<i>TÉCNICAS HISTOLÓGICAS</i>	10
<i>INMUNOHISTOQUÍMICA PARA MICROSCOPIA ÓPTICA</i>	10
<i>DOBLE MARCAJE</i>	11
<i>MÉTODO DE ELUCIÓN-RETRATAMIENTO</i>	12
<i>COLORACIÓN NUCLEAR CON DAPI</i>	12
<i>OBTENCIÓN Y ESTUDIO DE LAS IMÁGENES</i>	12
3. RESULTADOS	13
<i>PRESENCIA Y LOCALIZACIÓN CELULAR DE LOS RECEPTORES ESTRÓGENICOS EN MIOMETRIO Y TEJIDO LEIOMIOMATOSO</i>	13
<i>PRESENCIA Y LOCALIZACIÓN CELULAR DE LOS RECEPTORES ESTRÓGENICOS (α, β y GPR30) EN TEJIDO LEIOMIOMATOSO DE CRECIMIENTO RÁPIDO Y MITÓTICAMENTE ACTIVO</i>	16
<i>COLOCALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS (α, β y GPR30) EN MIOMETRIO Y TEJIDO LEIOMIOMATOSO TÍPICO, DE CRECIMIENTO RÁPIDO Y MITÓTICAMENTE ACTIVO</i>	18
<i>ELUCIÓN DEL RECEPTOR β Y POSTERIOR COMPARACIÓN CON RECEPTOR α</i>	23
4. DISCUSIÓN	24
5. CONCLUSIONES	26
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

RESUMEN

Los estrógenos regulan un gran número de procesos fisiológicos y patológicos afectando a numerosos tejidos tanto en hombres como mujeres. Los tejidos del aparato reproductor femenino son particularmente sensibles a estrógenos, siendo estos responsables de la proliferación celular descontrolada en algunos de ellos, dando lugar a la formación de tumores como los leiomiomas originados a partir de células musculares del miometrio. Los estrógenos actúan por medio de tres tipos de receptores, los receptores de estrógenos (REs) clásicos, RE α y RE β , y el receptor de membrana recientemente descubierto, GPR30. En este estudio, hemos analizado mediante inmunohistoquímica la presencia de estos REs, su colocalización celular y subcelular, en tejidos de miometrio y leiomiomatoso. La colocalización celular de los REs clásicos se encontró de forma ocasional en algunas células musculares del miometrio. Esta colocalización fue mayor en tejido leiomiomatoso de leiomioma típico y muy escasa en células musculares de leiomioma de crecimiento rápido. La colocalización celular del RE β -GPR30, fue mayoritaria en todos los tejidos.

Palabras clave: colocalización, estrógeno, leiomioma, receptor de estrógenos.

SUMMARY

Estrogens regulates many physiological and pathological processes that affect many tissues in both men and women. The tissues of the female reproductive system are particularly sensitive to estrogen, being responsible for uncontrolled cell proliferation in some of them, leading to the formation of tumors such as leiomyomas that originate from muscle cells of the myometrium. Estrogens act through three types of receptors, classic estrogen receptors (ERs), RE α and RE β , and the recently discovered membrane receptor, GPR30. In this study, we analyzed by immunohistochemistry the presence of these ERs, its cellular and subcellular localization in tissues of the myometrium and leiomyomatous. Colocalization of the classic ERs was occasionally found in some muscle cells of the myometrium. This colocalization was higher in leiomyomatous leiomyoma typical tissue than in muscle cells rapidly growing leiomyoma. The colocalization of RE β -GPR30 was predominant in all tissues.

Keywords: colocalization, estrogen, estrogen receptor, leiomyoma.

1. INTRODUCCIÓN

Miometrio y leiomiomas

El útero (Fig. 1) es un órgano del aparato reproductor femenino, constituido por varios estratos celulares: 1) el **endometrio**, epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado que rodea la cavidad uterina y está sostenido por un estroma celular de tejido conectivo laxo el cual aloja numerosas glándulas tubulares simples. En conjunto forman el revestimiento interno del útero. 2) el **miometrio**, que está constituido por haces de fibras musculares lisas separadas por una cantidad variable de tejido conectivo, y 3) una membrana **serosa** que recubre parcialmente el órgano.

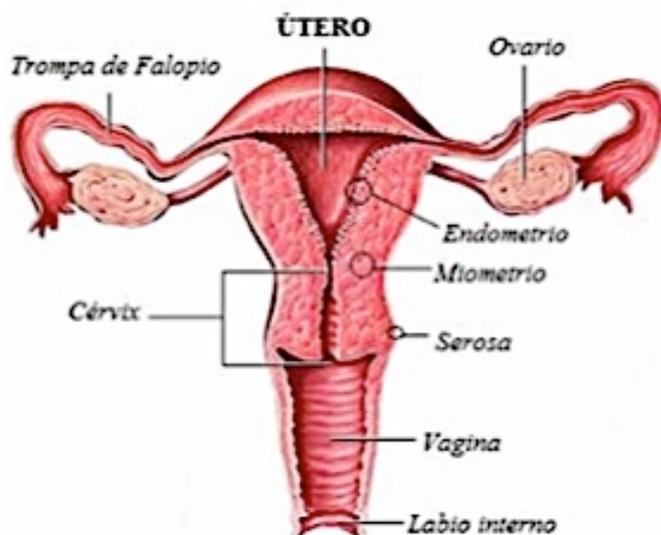


Figura 1. Representación esquemática del útero. Imagen tomada de clinicadam.com

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 tanto de la fisiología normal de los mismos como de sus patologías. Así, el desequilibrio en la regulación de estas hormonas puede tener efecto sobre la promoción y desarrollo de transformaciones tumorales en todos ellos.

Las neoplasias uterinas más abundantes, tienen su origen en las células musculares lisas del miometrio. Dentro de estas neoplasias, los leiomiomas (LM) son formaciones tumorales benignas con una frecuencia muy elevada entre la población femenina, afectando al 30-50% de las mujeres en edad fértil (Okolo, 2008). Los leiomiomas más frecuentes o leiomiomas típicos, presentan un bajo índice de proliferación y características histológicas

similares al miometrio con células bien diferenciadas. Menos de un 1% de las neoplasias uterinas corresponde a leiomiomas (LMS) o tumores malignos de miometrio (Walker y Stewart, 2005; Evans y Brunsell, 2007; Yanai et al., 2010).

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 et al., 1994; Wilkinson y Rollanson, 2001).

Otros estudios más recientes (Sung et al., 2009), han mostrado el potencial de malignización que presentan los leiomiomas atípicos (LMA), (también conocidos como “bizarros”), y celulares (leiomiomas con hiper celularidad) por su posible evolución a LMS. Los LMS poseen una alta capacidad metastásica y elevada proporción de recurrencia aunque su origen sigue siendo desconocido. Por el momento las pruebas genéticas recientes se han sumado a las histopatológicas (Bell et al. 1994) e inmunohistoquímicas (Rodríguez et al., 2011), reafirmando un posible origen a partir de los LMA (Zhang et al., 2014).

Leiomiomas

El término *leiomioma* hace referencia a cualquier tumor benigno con origen en las células musculares lisas (Blake, 2007).

Macroscópicamente, los leiomiomas uterinos son masas redondeadas bien circunscritas y pseudoencapsuladas, de 1 mm a 30 cm (Blake, 2007). Estos 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. 2).

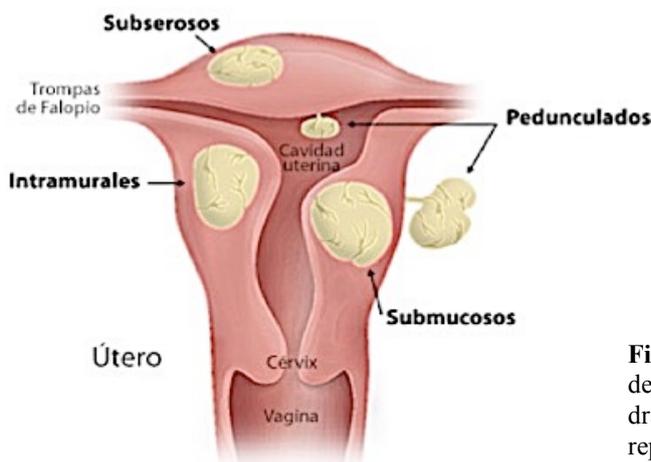


Figura 2. Clasificación de los leiomiomas en función de su localización anatómica. Imagen tomada de dracisneros.com www.cirh.com (centro integral de reproducción humana)

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. 3). Además, estos tumores son hormono-dependientes, considerándose que su crecimiento está modulado por las hormonas ováricas, estrógenos y progesterona.

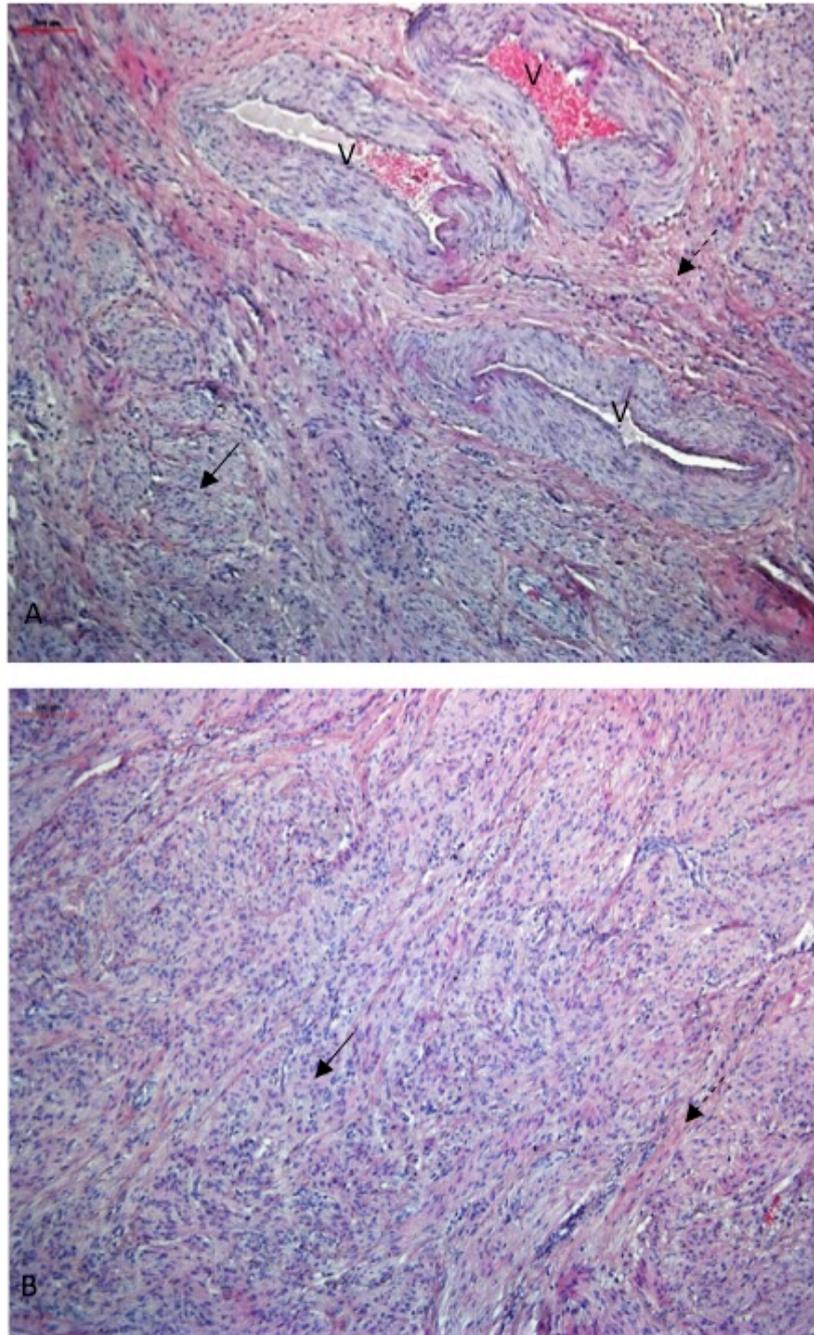


Figura 3. Estructura histológica de miometrio y leiomioma. (A) Miometrio. Se observa tejido muscular (flecha continua) y tejido conectivo (flecha discontinua). Asimismo se aprecian numerosos vasos sanguíneos: V. (B) Células musculares lisas con disposición arremolinada en un leiomioma (flecha continua), se observa escaso tejido conectivo (flecha discontinua). **Hematoxilina-eritrosina.** Barra: 100µm.

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 (Stovall et al., 1998; Hart et al., 2001). Igualmente, los leiomiomas uterinos pueden metastatizar en distintos destinos como por ejemplo en el tejido pulmonar (Walker y Stewart, 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 su impacto, la patobiología de los leiomiomas no está clara. Esto lleva a una incapacidad de desarrollar tratamientos médicos satisfactorios (Borahay et al., 2015).

Si bien los LMs típicos se caracterizan por un crecimiento lento con índices de proliferación muy bajos, en algunos casos se observan LMs con un comportamiento diferente en cuanto a su crecimiento, LMs de crecimiento rápido, siendo caracterizados en muchos casos como leiomiomas mitóticamente activos (LMMT) al determinarse histopatológicamente la presencia de 10-15 mitosis por campo microscópico analizado. Las características de las células musculares diferenciadas se mantienen en estos tumores y por otro lado el estudio de Zhang et al. (2014), los clasifica genéticamente próximos a los LMs y los leiomiomas celulares (LMCs).

Las observaciones clínicas han permitido dilucidar que los leiomiomas no están presentes antes de la pubertad, desaparecen o se reducen en la menopausia y con el uso de antagonistas de estrógenos. Por otro lado, 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). Respecto al 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 anticonceptivos orales o probables tratamientos de fertilización. También es necesario considerar otras fuentes endógenas de esteroides como la obesidad, cuya asociación con la presencia de leiomiomas e incremento de la incidencia parece algo aceptado en los distintos estudios (Parker, 2007; Rodríguez, 2013). 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 et al., 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 et al., 1994; Markowska et al., 2005), contribuyendo a crear un ambiente hiperestrogénico en el tumor.

Receptores de estrógenos

Los efectos biológicos de los estrógenos, están mediados por su unión a receptores específicos (REs). El primer receptor de estrógenos descubierto fue el RE α siendo el más ampliamente investigado. El RE β fue identificado casi cuatro décadas más tarde (Kuiper, 1996), atribuyéndosele en 2001 distintas funciones a las del RE α (Nilsson, 2001).

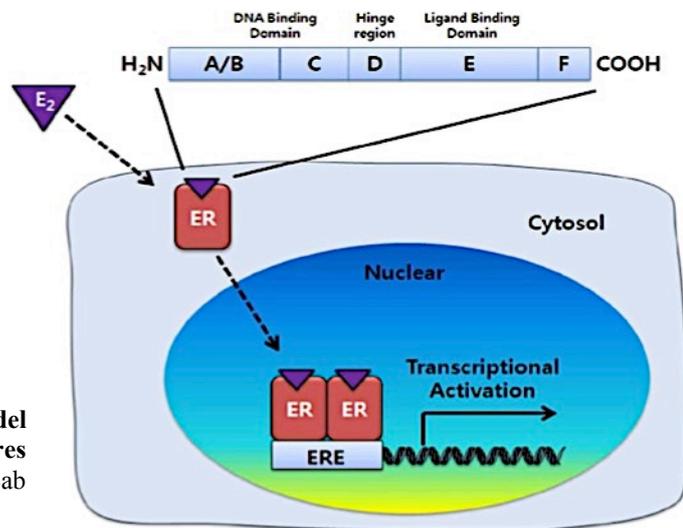


Figura 4. Representación esquemática del mecanismo de acción de REs como factores de transcripción. Imagen tomada de Lab Anim Res. 2012; 28(2):71-76.

RE α y RE β , REs clásicos o de respuesta lenta, pertenecen a la familia de factores de transcripción regulada por ligando (Fig. 4) y son transcritos desde genes distintos, localizados en cromosomas diferentes. Estos REs, RE α y RE β , son coexpresados en distintos órganos del aparato reproductor durante el desarrollo. En el útero del organismo adulto, la expresión de RE β disminuye respecto a la de RE α . 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, 2010). Para cada uno de ellos se ha determinado un número de isoformas, encontrándose que la isoforma RE α 36, también actúa como un receptor de membrana (Fig. 5).

GPR1 es un receptor de membrana acoplado a proteína G, conocido como GPR30, en un principio de ligando desconocido (Vrtačnik et al., 2014) Desde hace una década se ha asociado el receptor de estrógeno acoplado a proteína G, GPR30, con la señalización estrogénica (Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005). Este nuevo RE no está relacionado

ni genética ni estructuralmente con RE α y RE β , se expresa independientemente de ellos, y es responsable de las respuestas rápidas a estrógenos o no genómicas. Dependiendo del tipo celular, las respuestas rápidas a estrógenos incluyen, movilización de varios segundos mensajeros, AMPc, Ca²⁺; interacción con receptores de membrana como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o activación de vías intracelulares (Kolkova, 2010) (Fig.5).

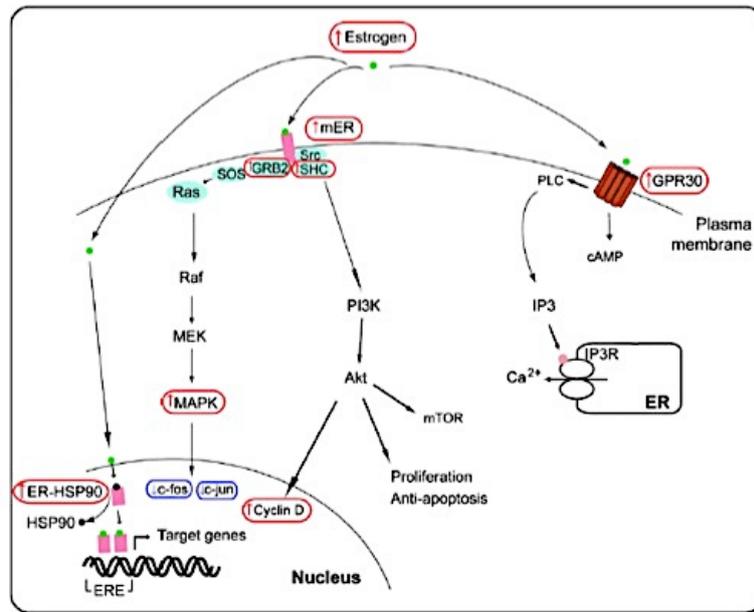


Figura 5. Representación esquemática de las vías de señalización de estrógenos en leiomioma uterino. ↑ y ↓ denota aumento (rojo) o disminución (azul) de nivel y/ o función, respectivamente. ER: receptor de estrógeno; mER: receptor de estrógeno unido a la membrana; Proteína de choque térmico 90: HSP90, ERE: elemento de respuesta a estrógenos; GPR30: receptor de estrógenos acoplado a proteína G; PLC: fosfolipasa C; IP3: trifosfato de inositol; IP3R: trifosfato de inositol receptor; ER: retículo endoplasmático. Imagen tomada de Borahay et al., 2015.

Receptores de estrógenos en leiomiomas

Los leiomiomas son tumores monoclonales de células de músculo liso, proliferación de una sola célula muscular, (Pandis, 1991) y dependientes de estrógenos, se piensa que, para su formación, son necesarias complejas alteraciones en su señalización estrogénica (Rein, 2000).

En las células leiomiomatosas, por otro lado, se han mostrado evidencias de la presencia de distintas vías descritas para la acción estrogénica (Borahay et al., 2015). Sin embargo, todavía existen controversias en cuanto a la detección de los receptores estrogénicos en las células de estos tumores.

A pesar de la controversia que muestran los trabajos sobre la expresión de REs, α y β , en LMs, (Wang et al., 2001; Kovács et al., 2001; Roan et al., 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 et al., 1993) y el segundo tipo de REs, RE β , parece expresarse a niveles de ARNm de forma preferente en leiomiomas respecto del miometrio (Benassayag et al., 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 et al., 2002; Jakimiuk et al., 2004). Valladares et al. 2006, utilizando técnicas inmunohistoquímicas, mostraron una localización diferencial de los REs en tejido leiomiomatoso; además, la presencia de células RE α -inmunorreactivas (RE α -ir) no parece cambiar en leiomioma respecto al miometrio. En 2011, Rodríguez et al. mostraron que la ratio, células RE α -ir/RE β -ir, era alta en miometrio disminuyendo gradualmente desde leiomioma hasta LMS, lo que indica un papel importante de este factor en la malignización del miometrio. Otros autores han mostrado que la alteración de la expresión de los REs α y β , también está implicada en la progresión del cáncer en tejidos hormono-dependientes (Taylor et al., 2010).

Recientemente, se ha demostrado la presencia de GPR30 en miometrio y una sobreexpresión del mismo en núcleos de células musculares leiomiomatosas (Tian et al., 2013), siendo el único dato sobre la presencia de GPR30 hasta el momento. Por otro lado, los estrógenos parecen aumentar la sobreexpresión de dicho receptor.

Haciendo una síntesis, los leiomiomas son tumores dependientes de hormonas esteroideas, fundamentalmente sensibles a estrógenos. Las células tumorales presentan todos los tipos descritos de receptores de estrógenos, α , β y GPR30, aunque no están delucidados sus mecanismos de acción ni las posibles interacciones entre ellos.

Los estudios en distintos tumores han determinado la importancia de la ratio RE α /RE β en la tumorigénesis y/o malignización de las células del órgano sano. En el miometrio, hay un mayor número de células inmunoreactivas para RE α que para RE β . En los leiomiomas este valor de ratio disminuye, por un aumento del número de células RE β positivas (Rodríguez, 2011), aunque para otros autores no hay cambios de expresión de estos receptores, entre miometrio y leiomioma (Grings, 2012). Teniendo en cuenta los datos aportados hasta ahora queda claro que el efecto de los estrógenos sobre el desarrollo de los leiomiomas es complejo y está lejos de ser completamente comprendido. En cuanto al RE GPR30, su expresión en

miometrio y leiomioma, ha sido puesta de manifiesto recientemente (Tian et al., 2013) siendo su papel en estos tejidos completamente desconocido. Un dato de interés para acercarnos al conocimiento de la acción de los estrógenos en leiomiomas, sería conocer la interrelación celular de sus receptores, saber si están los tres siempre presentes en las células del tumor en relación al miometrio y si se encuentran en las mismas células.

Hipótesis y objetivos

La **hipótesis** de este trabajo ha sido:

Los tres tipos de receptores de estrógenos están presentes en las células de miometrio y leiomioma uterino. La presencia de más de un REs en las mismas células y su localización subcelular está en relación a las condiciones fisiológicas, microambiente estrogénico y tipo de crecimiento del tejido.

Con el fin de demostrar esta hipótesis, los **objetivos** planteados fueron los siguientes:

1. Determinar mediante inmunohistoquímica la presencia y localización celular de los receptores estrógenicos alfa, beta y GPR30 en tejido pareado de miometrio y leiomioma típico.
2. Estudiar la distribución celular y subcelular de los receptores estrógenicos alfa, beta y GPR30, en tejido leiomiomatoso de leiomiomas de crecimiento rápido y/o mitóticamente activos.
3. Estudiar la colocalización celular de los receptores alfa, beta y GPR30 en tejido de miometrio y leiomioma típico y en tejido leiomiomatoso de crecimiento rápido y mitóticamente activos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

En este trabajo se han utilizado muestras frescas procedentes de biopsias de pacientes sometidas a histerectomía o miomectomía en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de Canarias (HUC).

Todas las muestras utilizadas fueron obtenidas de pacientes previo consentimiento informado. Los datos clínicos y anatomopatológicos complementarios fueron obtenidos de los ginecólogos bajo petición. Todos estos datos son incorporados a una base de datos anónima

en la que a cada paciente se le ha atribuido un código. Los Proyectos de Investigación en que está encuadrado este trabajo han sido valorados por el Comité de ética del HUC.

En total hemos analizado dos muestras pareadas de miometrio y leiomioma normal y dos muestras de leiomioma de crecimiento rápido.

MÉTODOS

Procesado de las muestras

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

<p><i>Fijación</i></p> <p>La fijación tiene por objeto conservar las células, hasta donde sea posible, en el estado en que se encontraban durante la vida. Por lo tanto, es un método destinado a obtener preparados duraderos que conserven la estructura morfológica y química de las células y tejidos in vivo y que posteriormente permite realizar, las técnicas de coloración y/o de inmunohistoquímica.</p>	Formol al 10%	12 horas
	Formol: Alcohol 90% (1:1)	1 hora
<p><i>Deshidratación</i></p> <p>Las piezas al ser retiradas del fijador están hidratadas; impidiendo que sean penetradas por la parafina. Por lo tanto, en primer lugar, debemos deshidratar los tejidos sumergiéndolos en líquidos anhidros que sean miscibles en el agua. Para evitar alteraciones provocadas por una deshidratación brusca, se procede a una deshidratación escalonada utilizando alcohol etílico de graduación creciente.</p>	Alcohol 90% Alcohol 96% Alcohol 100%	2x1 hora 3x1 hora 3x1 hora
	Alcohol 100%: Tolueno (1:1)	45 minutos
<p><i>Impregnación por un disolvente de la parafina (aclarado)</i></p> <p>Las piezas perfectamente deshidratadas se sumergen en el disolvente, en este caso toluol que es miscible tanto en alcohol como en la parafina.</p>	Tolueno	45 minutos
<p><i>Penetración de la parafina</i></p> <p>Se sumergen las piezas en parafina (56-58° de punto de fusión), mantenida líquida en la estufa a no más de 62°C.</p>	Parafina I Parafina II	3 horas 2x12 horas
<i>Realización del bloque</i>		
<p>Para este paso se utilizan moldes de metal y cassettes de plástico. Se coloca el cassette en el molde de metal, encima el tejido a incluir y se cubre todo con parafina líquida. Cuando la parafina se solidifica se puede desmoldar el bloque al que quedará unido el cassette que permitirá unirlo al microtomo.</p>		

Los bloques fueron cortados en un microtomo de parafina (Thermo Shandon Finesse 325) a 3 µm de grosor. Los cortes se montaron en una placa de calor, en portaobjetos con albúmina diluida (0.5 ml solución madre de albúmina/35 ml de agua destilada)

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.

Técnicas histológicas

Coloraciones topográficas con hematoxilina – eritrosina:

Los cortes, tras ser desparafinados y rehidratados, se tiñeron con hematoxilina durante 1 minuto y 20 segundos. 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.

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 siguiente tabla:

Anticuerpo primario	Dilución
Monoclonal rabbit Anti-Human Estrogen receptor. <i>Dako (Glostrup, Denmark)</i>	1:50
Anti-estrogen receptor b1, b2. Policlonal desarrollado en conejo. <i>UsBiological</i>	1:300
Anti-GPR30. Policlonal desarrollado en cabra. <i>LSBio</i>	1:40
Anticuerpo secundario	Disolución
Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab ¹) ₂ Fragment Goat Anti-Rabbit. <i>Jackson Immuno Resear</i>	1:1000
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) <i>Jackson Immuno Resear</i>	
Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab ¹) ₂ Fragment Rabbit Anti-Goat IgG, Fc Fragment Specific. <i>Jackson Immuno Resear</i>	

Los cortes se desparafinaron e hidrataron 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 (RE α y RE β) se procedió a desenmascarar el antígeno mediante un lavado de 3 minutos en tampón citrato sódico (pH=6) a 90°C. Para el caso de los anticuerpos contra receptores de hormonas esteroideas (GPR30) se procedió a desenmascarar el antígeno durante 10 minutos, en las mismas condiciones. 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.

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-T durante una hora, dilución 1:1000, en cámara húmeda. Después de la incubación, se lavó nuevamente y se incubó con estreptavidina conjugada con peroxidasa 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 (Cl-Naf) y 3,3-diaminobenzidina (DAB).

- El revelado con 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 cubreobjetos utilizando glicerina tamponada.
- El revelado con 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 glicerina tamponada.

Doble marcaje

Consiste en utilizar dos anticuerpos primarios diferentes para detectar dos antígenos en la muestra. Para poder diferenciar cada uno de ellos se detecta con distintos cromógenos.

El doble marcaje se realizó por medio de una reacción inmunohistoquímica para detectar uno de los tres tipos de receptores de estrógenos, α , β y GPR30. A continuación, se realizó una segunda reacción en la misma sección del tejido para detectar otro de los tres

receptores del que queremos estudiar su colocalización. El anticuerpo secundario utilizado en la segunda reacción esta marcado con un cromógeno de otro color al empleado en la primera inmunohistoquímica. Estas muestras se observaron con el microscópio óptico.

Método de elución-retratamiento

El método de elución-retratamiento (Tramu et al., 1978) permite detectar dos antígenos presentes en la misma célula, al eliminar completamente el primer anticuerpo y realizar una segunda reacción inmunohistoquímicas sobre la misma sección. Para ello se realizó una primera reacción según el método enzimático indirecto utilizando como revelador el 4-cloro-1-naftol (Cl-Naf) (Sigma) al 0,04%. 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 (KMnO₄) al 2,5% y ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 5% en agua destilada y metabisulfito sódico (Na₂S₂O₅) 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 DAB (Sigma) al 0,05% y peróxido de hidrógeno al 0,01% en tampón acetato a pH 7,6. Después del montaje se fotografió por segunda vez la misma zona para su comparación.

Coloración nuclear con DAPI

Los cortes, tras ser desparafinados y rehidratados, se tiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2'-phenylindole, dihydrochloride) durante 1 minuto. A continuación se lavaron con tampón TBS. Posteriormente, se colocó un cubreobjetos con glicerina tamponada.

Obtención y estudio de las imágenes

El material procesado para las técnicas histológicas, inmunohistoquímicas y 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.

3. RESULTADOS

Presencia y localización celular de los receptores estrógenicos en miometrio y tejido leiomiomatoso:

Receptor de estrógenos α :

En miometrio, se observó que parte de las células musculares lisas eran RE α inmunorreactivas (RE α -ir). La localización subcelular fue en todos los casos nuclear (Fig. 6-A), no se observa presencia de receptor α en las células endoteliales de los vasos (Fig.6-A). En el leiomioma pareado se observó en general una distribución de RE α más amplia en relación al miometrio. La localización subcelular fue fundamentalmente nuclear. (Fig. 6-B y B').

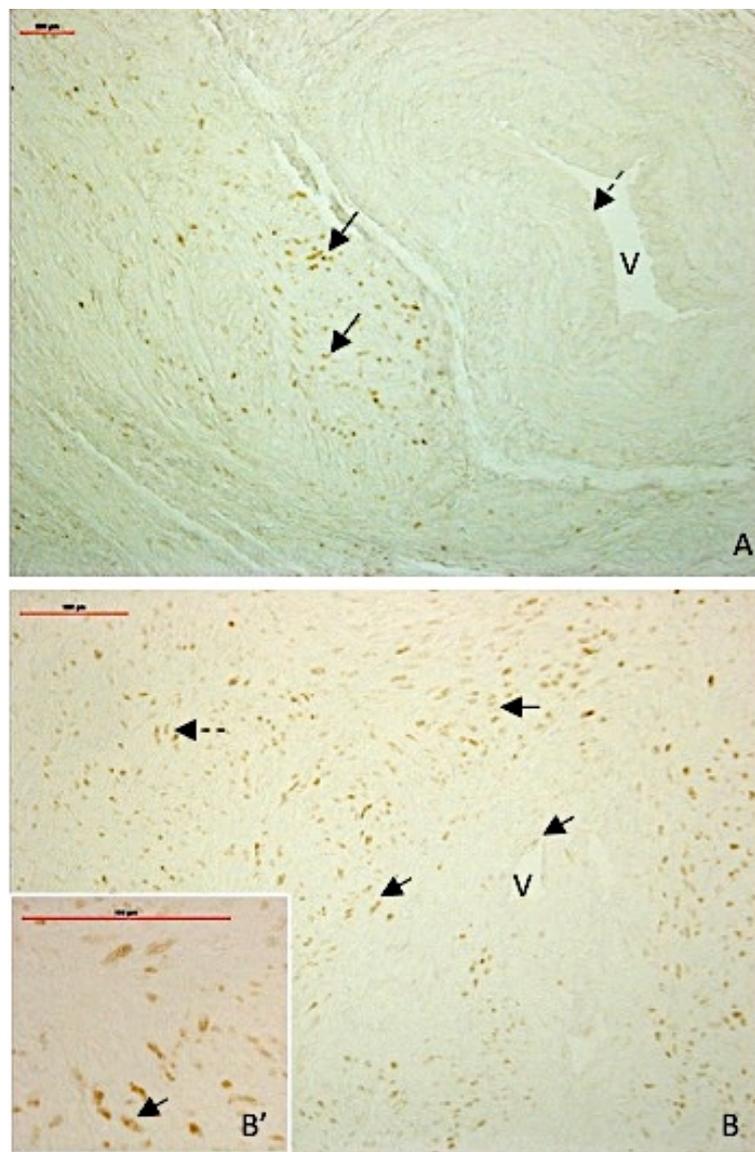


Figura 6. Células RE α -ir en miometrio y tejido leiomiomatoso. (A) Miometrio. Se observa RE α -ir en tejido muscular (flechas continuas). El tejido endotelial no presenta RE α -ir (flecha discontinua). (B) Leiomioma típico. Se observa núcleos RE α -ir en tejido muscular (flecha continua) y tejido conectivo (flecha discontinua). Asimismo en algunas células endoteliales de los vasos. (B') Células RE α -ir en tejido leiomiomatoso. V=vaso. Barra: 100 μ m.

Receptor de estrógenos β :

En miometrio se observaron células musculares RE β -ir con localización nuclear (Fig. 7-B). En tejido leiomiomatoso se observó un predominio de células RE β -ir con respecto a las RE α -ir con localización nuclear y/o citoplásmica. Asimismo se observó una mayor presencia de inmunorreactividad para este receptor en tejido leiomiomatoso respecto del miometrio (Fig. 7-A y C). En tejido leiomiomatoso, además, se observaron núcleos RE β -ir tanto en células del endotelio como en células del conectivo (Fig. 7-C y D).

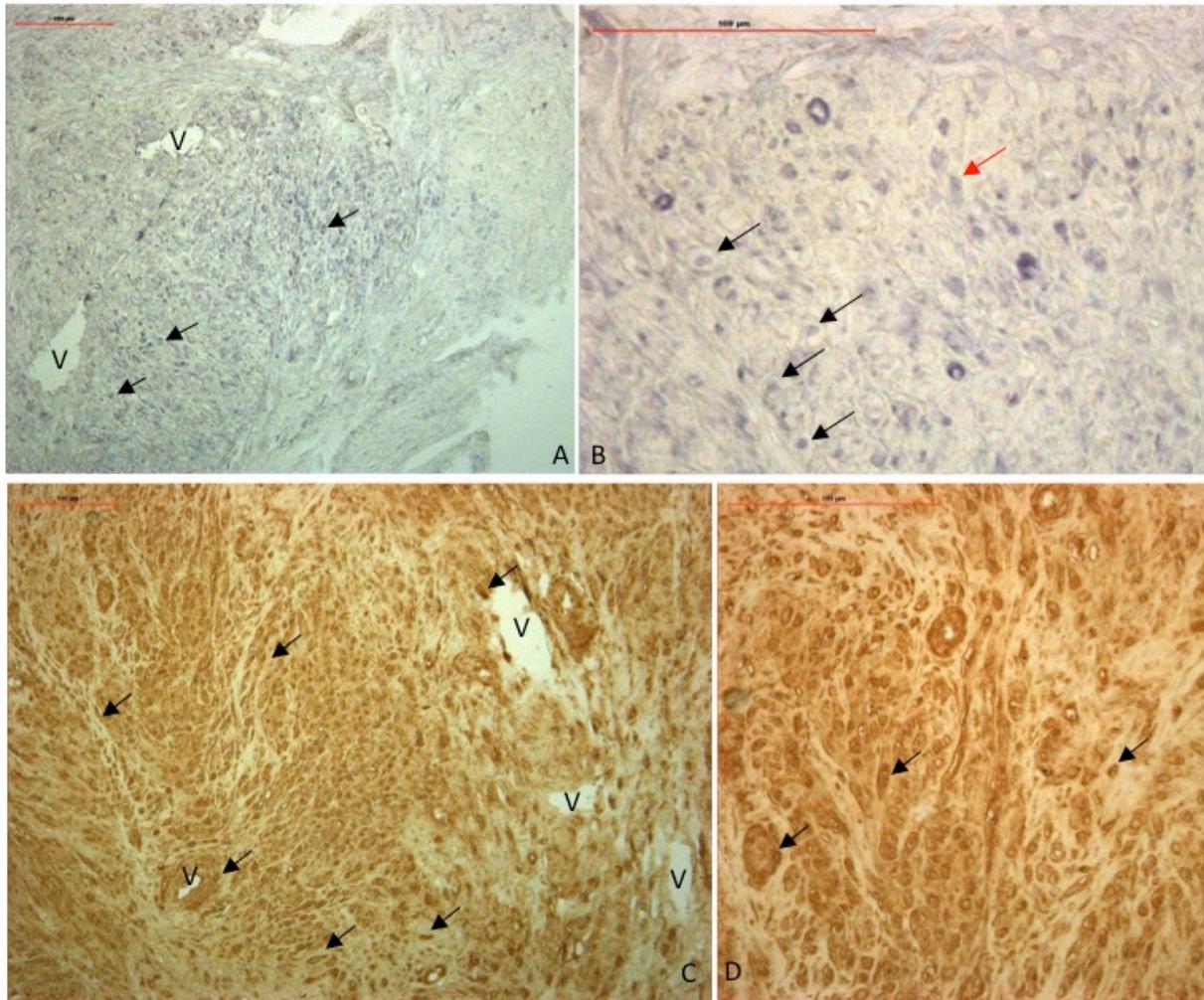


Figura 7. Presencia receptor de estrógenos β en células de miometrio y tejido leiomiomatoso. (A) Miometrio. Se observa RE β -ir en células musculares (flechas continuas). (B) Miometrio. Predominio de RE β -ir en núcleo (flechas negras) sobre citoplasma (flecha roja) de las células musculares. (C y D) Leiomioma típico. (C) Se observan células RE β -ir de tejido muscular y conectivo, y células endoteliales (flechas). (D) A mayor aumento, células RE β -ir de tejido muscular y conectivo, y células endoteliales (flechas). V=vaso. Barra: 100 μ m.

Receptor de estrógenos GPR30:

En miometrio se observaron células GPR30-ir tanto en el tejido conectivo como en el muscular. Su localización subcelular fue fundamentalmente nuclear (Fig. 8-A y B) En tejido leiomiomatoso se observó mayor presencia de inmunoreactividad para el GPR30, fundamentalmente en el tejido muscular, tanto en el núcleo como en el citoplasma. Sin embargo, se observó una reducción de inmunoreactividad en el tejido conectivo en relación con el miometrio (Fig. 8 B y D).

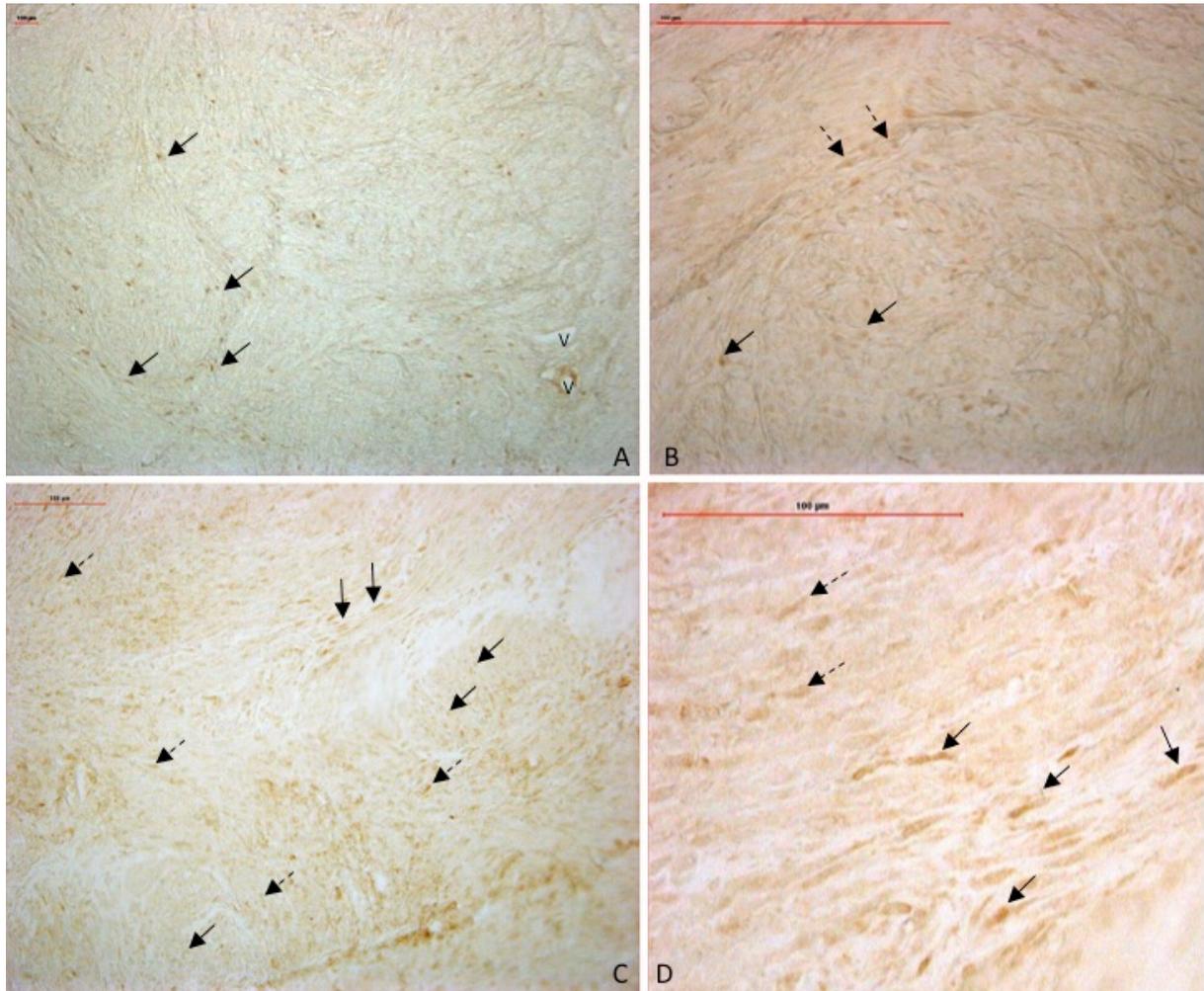


Figura 8. Presencia del receptor de estrógenos GPR30. (A) Miometrio. Se observa GPR30-ir en células de tejido conectivo. (B) Miometrio. Se observa GPR30-ir en células de tejido muscular (flechas continuas) y conectivo (flechas discontinuas). (C) Leiomioma típico. Se observa GPR30-ir en tejido muscular (flechas continuas) y conectivo (flechas discontinuas). (D) Aumento de células musculares y conectivas GPR30-ir. V= vaso. Barra: 100 μ m.

Presencia y localización celular de los receptores estrógenicos (α , β y GPR30) en tejido leiomiomatoso de crecimiento rápido y mitóticamente activo:

En los leiomiomas de crecimiento rápido utilizados se observó, histológicamente, un predominio de células musculares arremolinadas y formando una estructura muy compacta (Fig. 9) con escasa presencia de tejido conectivo respecto a los tejidos de miometrio o leiomioma típico. Por otro lado, la inmunorreactividad para los distintos receptores de estrógenos no se observó distribuida de manera regular, observándose zonas con inmunorreacción casi inexistente. (Fig.10-A*).

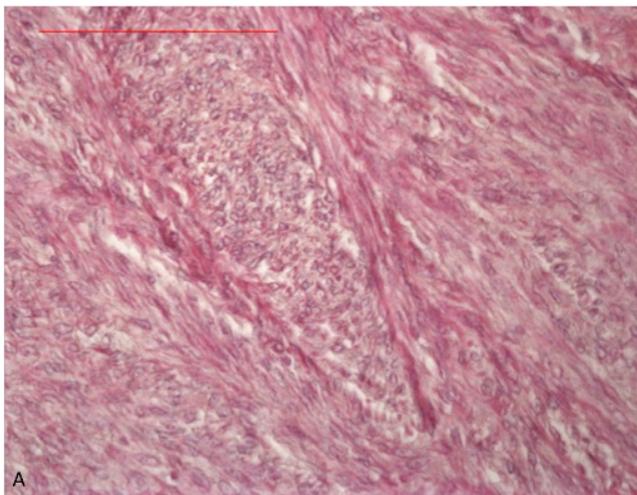


Figura 9. Estructura histológica de miometrio y leiomioma. (A) Leiomioma de crecimiento rápido y mitóticamente activo. Se observa células musculares compactas y escaso tejido conectivo. Hematoxilina-eritrosina. Barra: 100 μ m.

RE α -ir se observó en el núcleo de las células musculares (Fig.10-A y B), en los dos casos de mioma de crecimiento rápido se observaron escasas células RE α -ir y una inmunorreacción débil con respecto a lo observado en el leiomioma típico.

RE β -ir (Fig.10-C y D) se observó en todos los casos más intensamente y con una mayor distribución que lo observado para el RE α . Por otro lado se observó una localización tanto nuclear, generalmente en forma granulada, como citosólica. (Fig. 10-D y F).

El GPR30 se observó en algunos núcleos de las células musculares aunque, a diferencia de los otros receptores, se observó mayoritariamente en el citosol, perinuclearmente, sobre todo en leiomioma mitóticamente activo (Fig. 11-D y D').

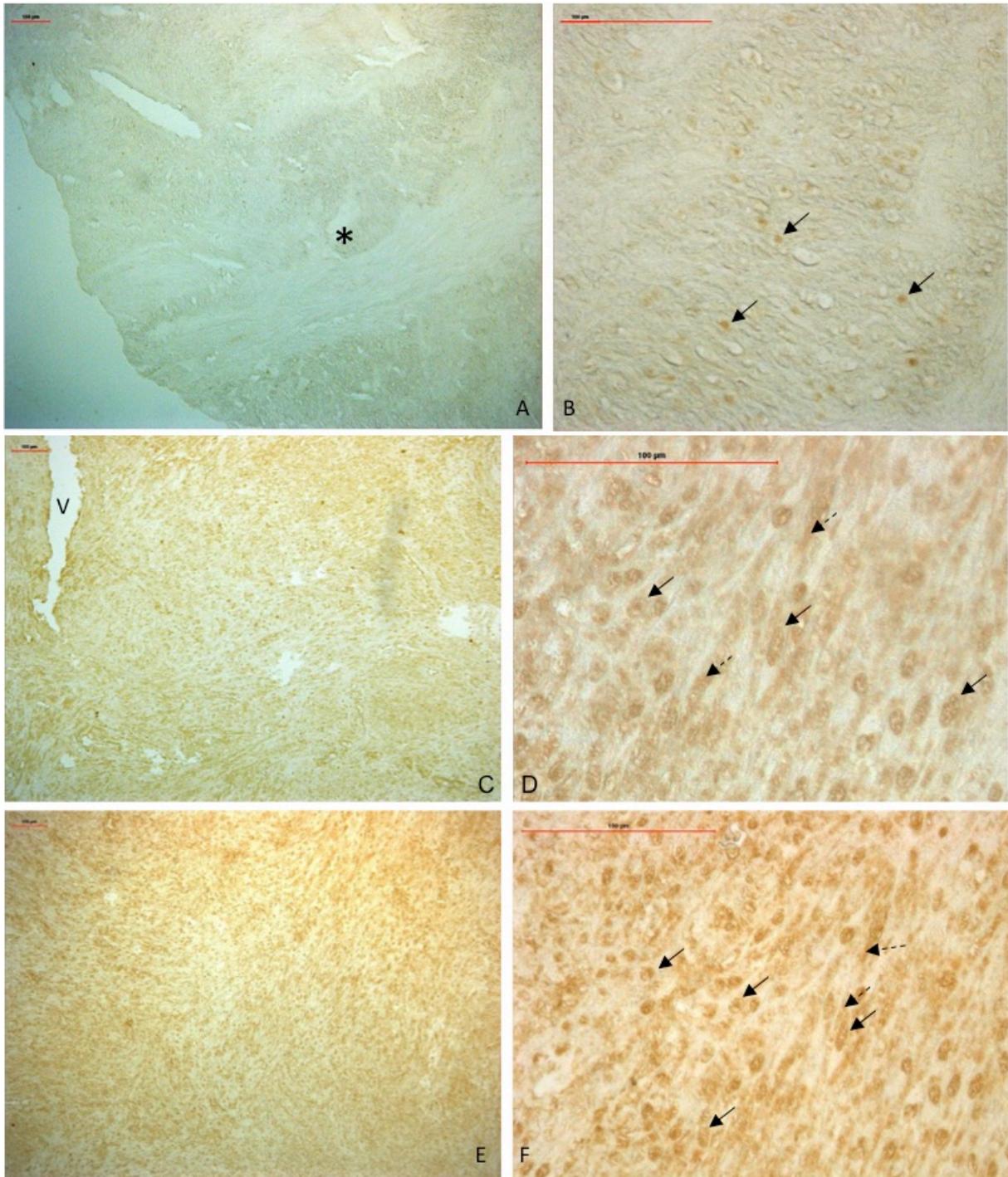


Figura 10. Presencia receptor de estrógenos α y β en leiomioma de crecimiento rápido. (A) Leiomioma de crecimiento rápido. No se observa RE α -ir en algunas zonas (*). (B) Detalle leiomioma de crecimiento rápido. Se observa RE α -ir en núcleos de células musculares. (C y E) Leiomioma de crecimiento rápido y mitóticamente activo, respectivamente. Se observa RE β -ir en células musculares (escaso tejido conectivo). (E y F) Detalle de leiomioma de crecimiento rápido y mitóticamente activo, respectivamente. Se observa RE β -ir en núcleos de células musculares en forma de granulado (flechas continuas) y en el citosol (flechas discontinuas). V=vaso. Barra: 100 μ m.

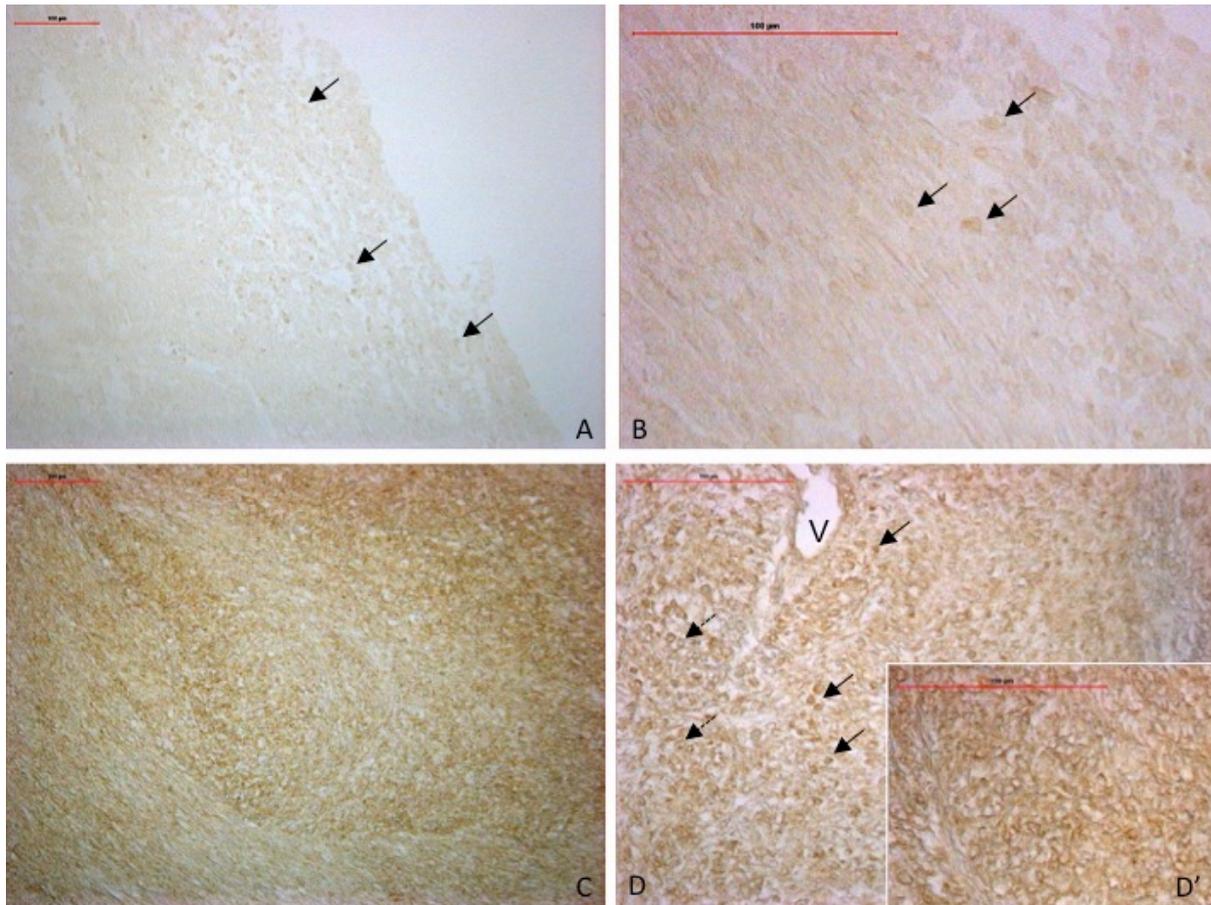


Figura 11. Presencia receptor de estrógenos GPR30 en leiomioma de crecimiento rápido. (A) Leiomioma de crecimiento rápido. Se observa GPR30-ir en células periféricas. (B) Leiomioma de crecimiento rápido. Se observa GPR30-ir en el núcleo de las células musculares (flechas negras). (C) Leiomioma mitóticamente activo. Se observa la abundancia de tejido muscular y el escaso tejido conectivo GPR30-ir. (D) Leiomioma mitóticamente activo. Se observan núcleos de células musculares GPR30-ir (flechas continuas) y en la zona perinuclear (flechas discontinuas). (D') Aumento de zona perinuclear del leiomioma mitóticamente activo. V=vaso. Barra: 100μm.

Colocalización de los receptores de estrógenos (α , β y GPR30) en miometrio y tejido leiomiomatoso típico, de crecimiento rápido y mitóticamente activo:

RE α -RE β :

En el miometrio de los casos estudiados, los REs clásicos, (α y β), estuvieron siempre presentes en células musculares. Se observaron con mayor frecuencia células inmunorreactivas para uno u otro de ambos receptores de forma independiente que colocalizando en la misma célula. La colocalización de RE α -ir/RE β -ir se observó ocasionalmente en algunas células (Fig. 12-A y B).

En tejido leiomiomatoso típico, como se describió previamente, se observaron células inmunorreactivas para ambos tipos de receptores. La colocalización en las mismas células, por otro lado, resultó estar presente en mayor proporción que en el miometrio (Fig.12-A y C) observándose células musculares cuyos núcleos fueron RE α -ir y también RE β -ir. En otros casos, se observaron células con núcleos RE α -RE β -ir y citoplasma RE β -ir o bien células con núcleos que presentan parcialmente inmunorreacción de forma granular (Fig.12-D).

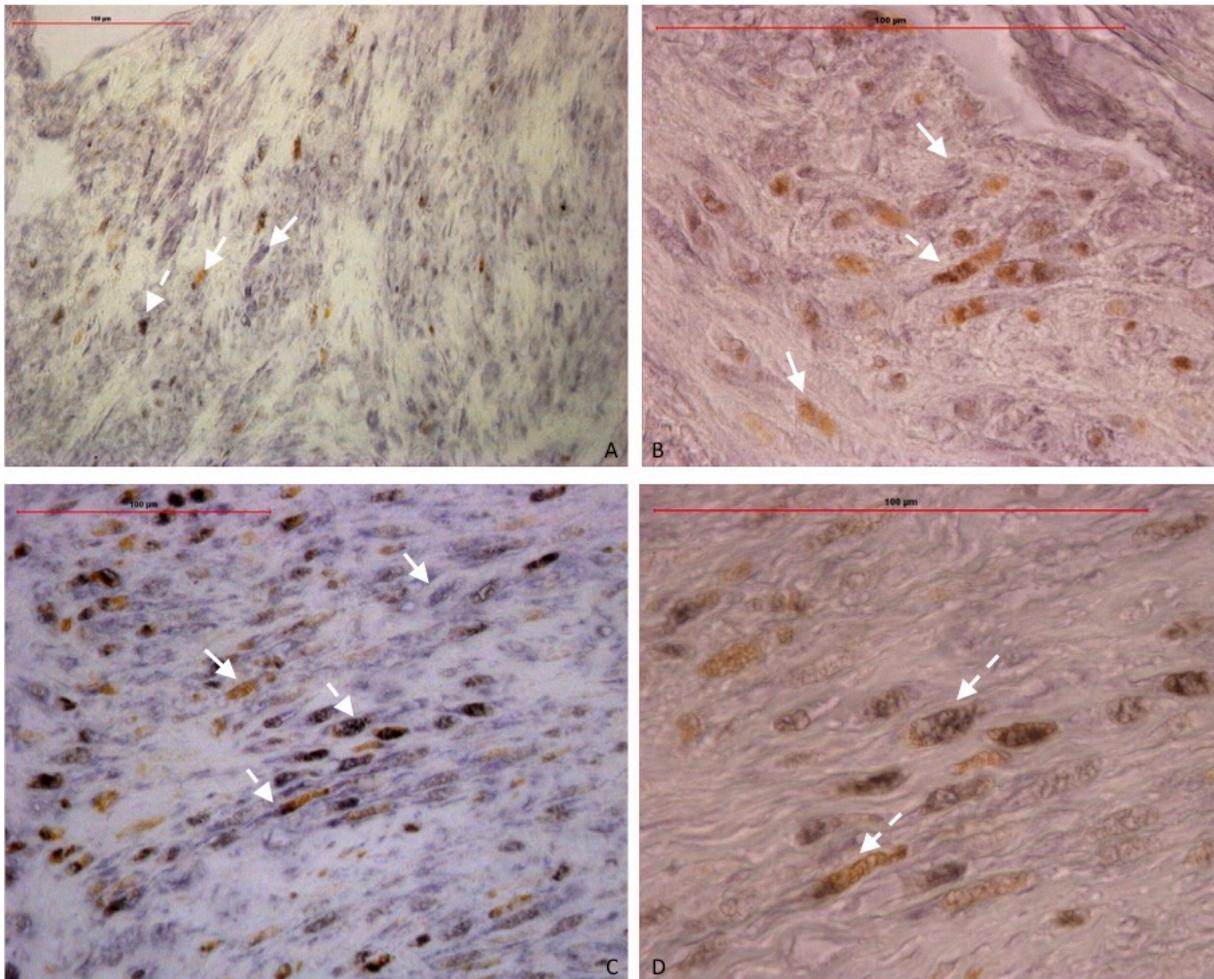


Figura 12. Colocalización RE α -RE β en miometrio y tejido leiomiomatoso típico. (A) Miometrio. Se observan células RE α -ir (color marrón claro) y RE β -ir (color azul) ambos señalados con flecha continua y RE α -RE β -ir (color pardo oscuro), señalado con flecha discontinua. (B) Miometrio Se observan los núcleos de las células RE α -ir y RE β -ir señaladas con flechas continuas, y RE α -RE β -ir señalado con flecha discontinua. (C) Leiomioma típico. Se observa RE α -ir/RE β -ir señaladas con flechas continuas, y RE α -RE β -ir señalado con flecha discontinua, en este caso la colocalización es parcial. (D) Leiomioma típico. Se observa la morfología granular que adopta el núcleo. Barra: 100 μ m.

En tejido leiomiomatoso de crecimiento rápido y mitóticamente activo hay colocalización subcelular de RE α -ir-RE β -ir en el núcleo de parte de las células musculares inmunorreactivas (Fig.13-B y D). Las células musculares que son RE α -ir y también RE β -ir son escasas en relación a lo observado en el leiomioma típico teniendo en cuenta la escasa inmunorreacción para RE α .

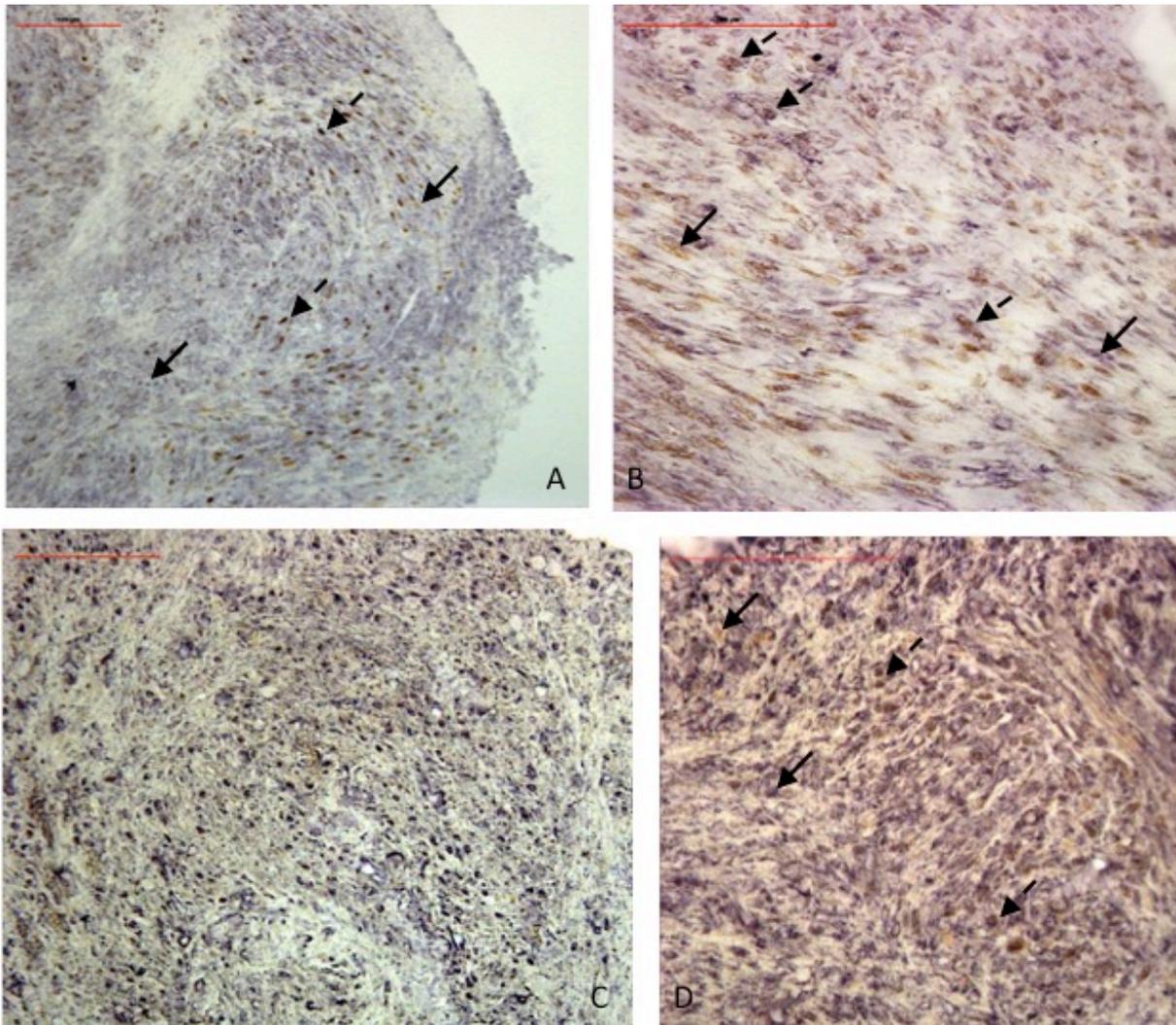


Figura 13. Colocalización RE α -RE β en leiomioma de crecimiento rápido y mitóticamente activo. (A y B) Leiomioma de crecimiento rápido. Se observa células RE α -ir (color marrón claro) y RE β -ir (color azul) ambos señalados con flecha continua y RE α -RE β -ir (color pardo oscuro), señalado con flecha discontinua. (C y D) Leiomioma mitóticamente activo. Se observa células RE α -ir (color marrón claro) y RE β -ir (color azul) ambos señalados con flecha continua y RE α -RE β -ir (color pardo oscuro), señalado con flecha discontinua. Barra: 100 μ m.

RE β -GPR30:

El receptor de estrógenos GPR30, presentó fundamentalmente una colocalización con el RE β en las células musculares del miometrio, siendo escasas las células que presentan sólo uno de estos receptores. La localización puede ser también a nivel subcelular en el núcleo y/o en el citoplasma (Fig. 14-A).

Este predominio de colocalización de los receptores GPR30 y RE β se mantuvo en el tejido leiomiomatoso, aunque resultó ser más abundantes las células GPR30-ir (Fig. 14-B). La colocalización, fue a nivel nuclear y/o citosólica. En algunas ocasiones (Fig. 14-B'), la

inmunorreacción para ambos receptores se observó localizada en diferentes regiones del núcleo lo que confirmamos mediante la coloración con DAPI (Fig.14-C).

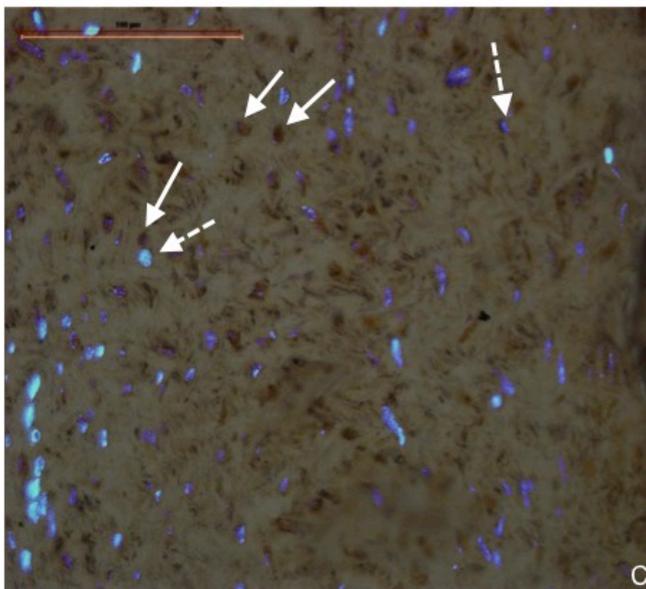
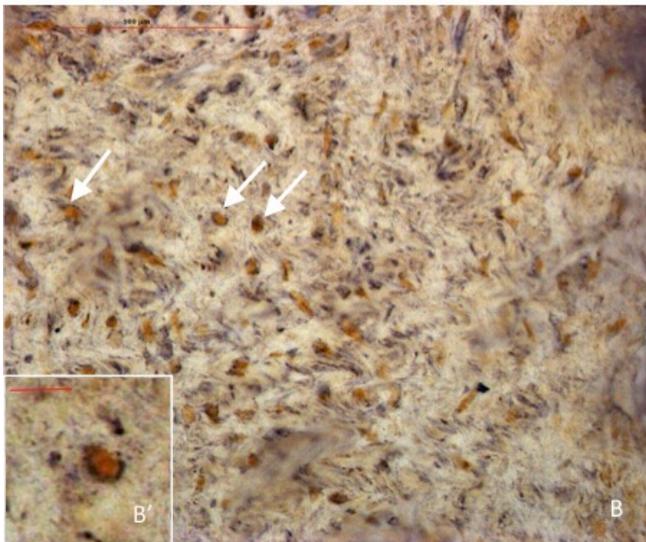
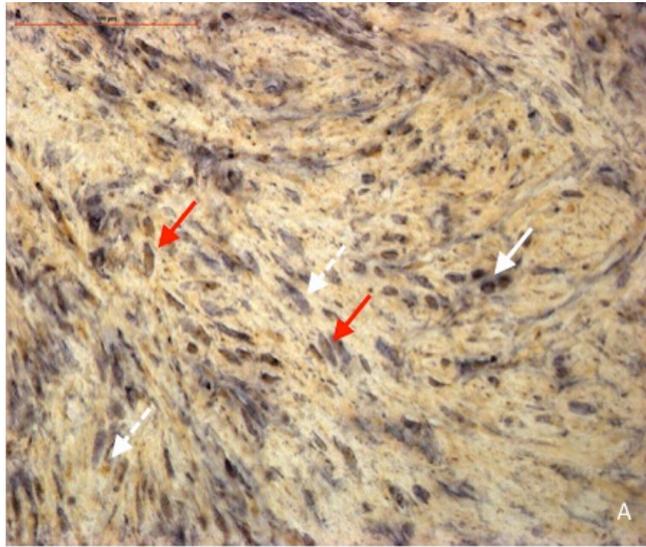


Figura 14. Colocalización GPR30-RE β en miometrio y leiomioma típico. (A) Miometrio.

Se observan células GPR30-RE β -ir (flechas rojas), núcleos GPR30-ir (color marrón claro) y RE β -ir (color azul) ambos señalados con flecha blanca discontinua y núcleos GPR30-RE β -ir (color pardo oscuro, flecha blanca continua). (B) Leiomioma típico. Se observan núcleos REGPR30-RE β -ir (flechas continuas) (B') Detalle de célula muscular GPR30-RE β -ir del núcleo y la zona perinuclear. Barra: 25 μ m. (C) Leiomioma típico. Sobreposición de imágenes de inmunohistoquímica y coloración nuclear con DAPI. Se observan núcleos de las células musculares GPR30-RE β -ir (flechas continuas) y núcleos con reacción positiva para el DAPI (flechas discontinuas). Barras: 100 μ m.

En tejido leiomiomatoso de crecimiento rápido y mitóticamente activo hay colocalización de la inmunoreactividad para REs (β y GPR30) en células de tejido muscular, no habiendo predominio de ninguno de ellos. Se observó colocalización subcelular en núcleo y en el citosol, zona perinuclear (Fig.15). La coloración nuclear con DAPI nos permitió confirmar la localización citosólica de la inmunorreacción. Cuando la reacción fue totalmente nuclear no se observó coloración con DAPI. Esto fue confirmado mediante la observación de núcleos inmunoreactivos que presentaban sólo su periferia coloreada con DAPI (Fig. 15-C').

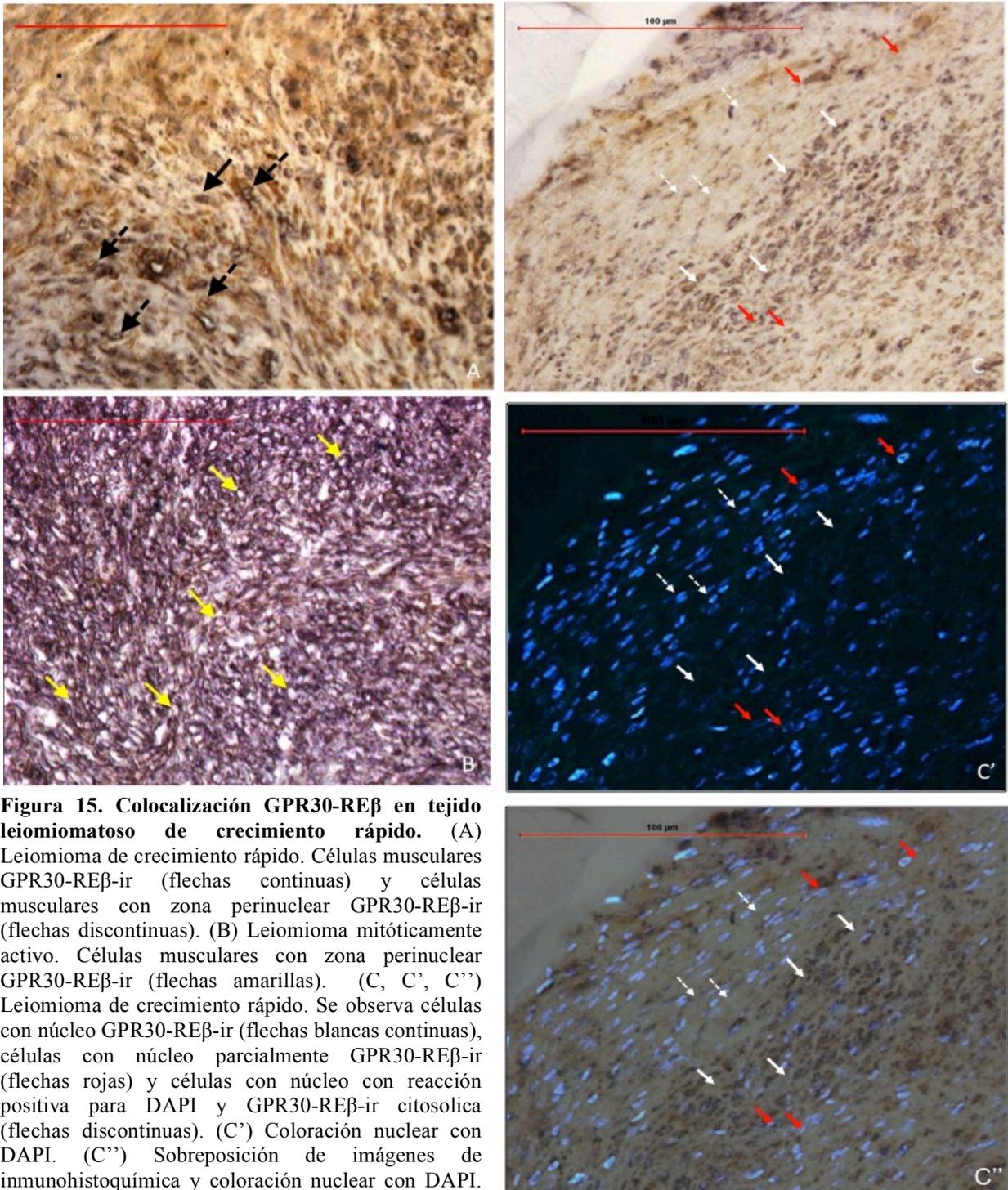


Figura 15. Colocalización GPR30-RE β en tejido leiomiomatoso de crecimiento rápido. (A) Leiomioma de crecimiento rápido. Células musculares GPR30-RE β -ir (flechas continuas) y células musculares con zona perinuclear GPR30-RE β -ir (flechas discontinuas). (B) Leiomioma mitóticamente activo. Células musculares con zona perinuclear GPR30-RE β -ir (flechas amarillas). (C, C', C'') Leiomioma de crecimiento rápido. Se observa células con núcleo GPR30-RE β -ir (flechas blancas continuas), células con núcleo parcialmente GPR30-RE β -ir (flechas rojas) y células con núcleo con reacción positiva para DAPI y GPR30-RE β -ir citosólica (flechas discontinuas). (C') Coloración nuclear con DAPI. (C'') Sobreposición de imágenes de inmunohistoquímica y coloración nuclear con DAPI. Barra: 100 μ m.

Elución del receptor β y posterior comparación con receptor α :

Para confirmar los resultados obtenidos con dobles marcajes y determinar que no se han producido reacciones cruzadas entre los distintos anticuerpos, en ocasiones se determinó la colocalización por medio del método de elución-retratamiento (Fig. 16).

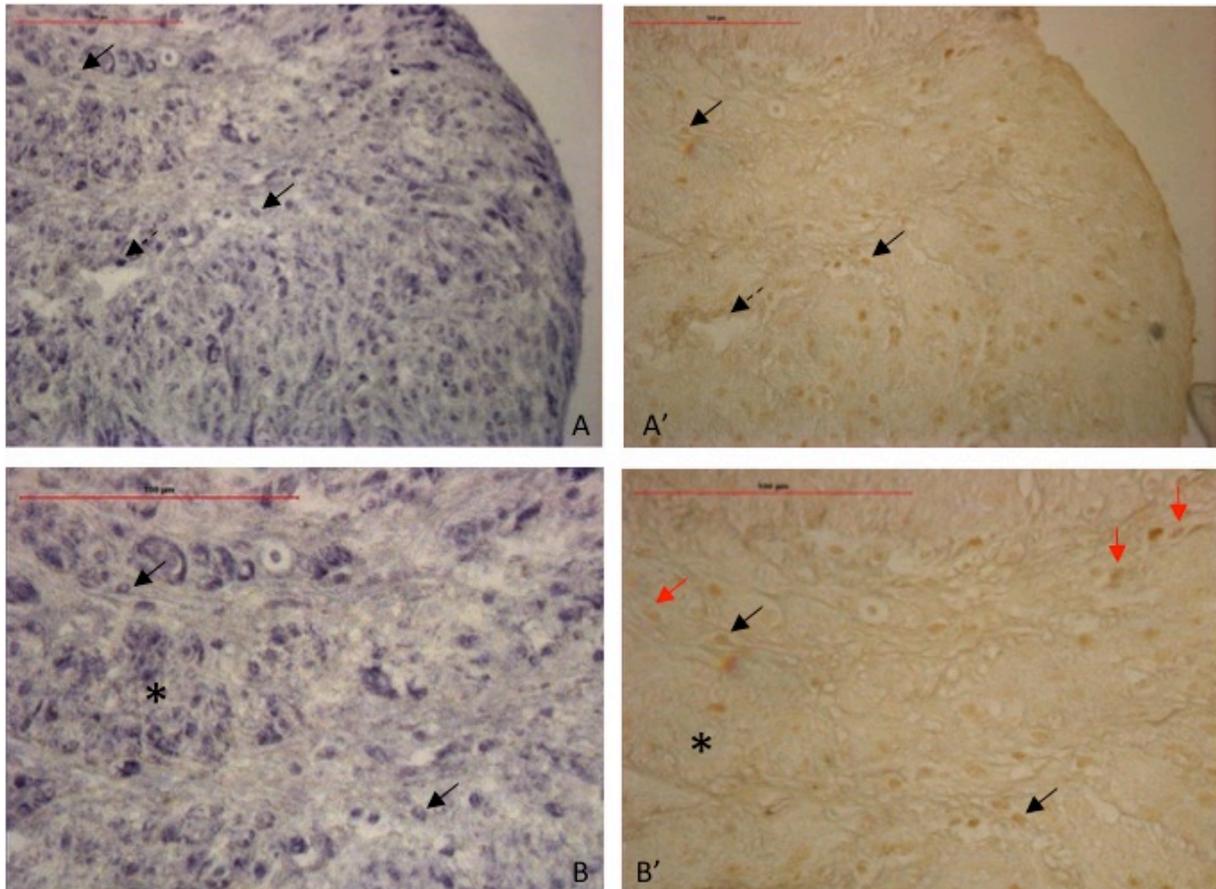


Figura 16. Elución de RE β y posterior inmunohistoquímica para la detección de RE α en leiomioma típico. (A) Leiomioma típico. Se observa células RE β -ir (flechas continuas), así como RE β -ir que no son RE α -ir (flecha discontinua). (A') Leiomioma típico. Se observa células RE α -ir (flechas continuas), así como RE β -ir que no son RE α -ir, señalada con flecha discontinua. (B) Células RE β -ir de leiomioma típico, señaladas con flechas. Se observa grupo de células RE β -ir (*) que no son RE α -ir. (B') Células RE α -ir de leiomioma típico (flechas negras). Se observan células RE α -ir que no son RE β -ir (flechas rojas). También Se observa grupo de células RE β -ir (*) que no son RE α -ir. Barra: 100 μ m.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos obtenido datos cualitativos sobre la colocalización celular y subcelular de los distintos receptores de estrógenos, RE α , RE β y GPR30, en miometrio y tejido leiomiomatoso mediante métodos inmunohistoquímicos.

Hemos usado dobles marcajes, cuando los anticuerpos primarios procedían de distinto animal, que hemos corroborado en algunos casos, con los datos obtenidos por medio de la técnica de elución-retratamiento y utilizando coloración nuclear fluorescente (DAPI).

Nuestros resultados muestran en primer lugar que todas las muestras utilizadas presentaron células inmunorreactivas para los tres tipos de receptores de estrógenos, predominando claramente las células RE β -ir, sobre todo en los leiomiomas. En los leiomiomas la distribución de este receptor varía celular y subcelularmente en relación al tipo de crecimiento del tumor y al ambiente estrogénico de cada caso. Así mismo se observaron diferencias de distribución y localización subcelular para el receptor GPR30.

Hasta aquí se han hecho numerosos estudios comparando la presencia y expresión de REs clásicos en leiomioma en relación con el miometrio resultando datos contradictorios en muchos de ellos. Estas diferencias se han debido fundamentalmente a las diferentes técnicas utilizadas (Gargett et al., 2002; Wang et al., 2001; Kovács et al., 2001). Valladares et al. 2006, fueron los primeros autores en caracterizar los tipos celulares que sintetizan las proteínas correspondientes a dichos receptores en tejido de miometrio y leiomioma. Ya estos autores propusieron un papel importante en el desarrollo de leiomiomas para el RE β , debido a su localización específica en células de tejido conectivo y células endoteliales. Más tarde, Rodríguez et al. 2011, observaron que en los leiomiomas aumentaba el número de células inmunorreactivas para el RE β en relación al miometrio. Además, estos autores mostraron como la ratio RE α /RE β disminuía en relación con la malignización del tejido al tiempo que la localización subcelular de este receptor pasaba de nuclear a citosólica.

A pesar de las diferencias celulares observadas en los leiomiomas respecto del miometrio, Grings et al. 2012, concluyen que no hay sobreexpresión de RE α y/o RE β , en leiomiomas comparado con el miometrio adyacente por lo que no se puede considerar dicha sobreexpresión causa del crecimiento del tumor. Una de las razones de no encontrar diferencias en la expresión contrariamente a las observaciones de Rodríguez et al. 2011, puede deberse a que para estos últimos, las diferencias estuvieron en el RE β de las células musculares, dato que no se considera al estudiar la expresión. Por otra parte, los estrógenos

debido a su localización específica en el conectivo, pueden actuar por medio de su receptor beta induciendo la expresión de factores de crecimiento por las células de este tejido.

Recientemente, Borahay et al. 2015, concluyen que existen suficientes evidencias para pensar que una señalización atípica de los estrógenos contribuye al desarrollo y crecimiento de los leiomiomas. Además estos autores tienen en cuenta las posibles interacciones con el nuevo RE, GPR30; receptor de membrana que, sin embargo, ha sido descrito en otras localizaciones celulares, distintas a la membrana plasmática: membrana del retículo (Revankar et al. 2005; Otto et al. 2008), y otras localizaciones intracelulares tanto en células cultivadas como en tejidos (Revankar et al., 2005; Filardo, 2012). En 2010, Madeo y Maggiolini demostraron en fibroblastos, que la estimulación por estrógenos inducía la inmunoprecipitación de GPR30, junto con FGFR, en la fracción proteica nuclear. El único trabajo sobre la presencia de este receptor en miometrio y leiomiomas, Tian et al. 2013, describe en células musculares en cultivo, la presencia de GPR30-ir sólo en los núcleos mientras que en miometrio concluyen que se expresa en el citoplasma exclusivamente.

Teniendo en cuenta los importantes cambios en la composición de la matriz extracelular del conectivo que ocurren en los miomas, resulta de gran interés conocer qué interacciones de distintas moléculas ocurren en sus células. Un paso importante en el conocimiento de los mecanismos que llevan al desarrollo de los leiomiomas así como a que se comporten clínicamente de diferente forma en función del ambiente estrogénico es el conocimiento de su colocalización celular y/o subcelular.

Nuestros resultados muestran que en condiciones normales de niveles de estrógenos y de lento crecimiento de los leiomiomas, ambos tejidos presentan, en todos los casos, células que presentan colocalización de REs tanto en células musculares como del tejido conectivo aunque hay diferencias entre miometrio y leiomioma. En el miometrio, contrariamente a lo posiblemente esperado, la mayoría de las células musculares expresan uno u otro de los REs clásicos, alfa y beta, con un bajo grado de colocalización. Interesantemente, las células del conectivo, que presentan sólo inmunorreacción para el RE β , también son GPR30 inmunorreactivas sugiriendo una colaboración de ambos receptores en el mantenimiento de la fisiología del órgano. Esta sugerencia puede estar apoyada por el hecho de que dicha colocalización disminuye en tejido conectivo leiomiomatoso puesto que en este caso la inmunorreacción de GPR30 en dicho tejido disminuye. Por otro lado, la colocalización de RE β -GPR30 se hace más evidente en células musculares leiomiomatosas. A nivel de

expresión, en tejido uterino, se han encontrado más similitudes entre GPR30 y el RE α que con el RE β (Kolkova, 2010; Tian et al., 2013); sin embargo, en carcinosarcoma de útero, se ha relacionado la coexpresión de GPR30 con RE β , con la progresión del tumor (Huang et al., 2010). En este sentido, nuestros resultados muestran un alto nivel de colocalización celular y subcelular de estos dos receptores en aquellos leiomiomas que presentan un nivel de crecimiento alto así como en los mitóticamente activos. Por otro lado, las muestras utilizadas pertenecientes a pacientes con condiciones hiperestrogénicas, parecen indicar que los estrógenos inducen la presencia de GPR30 y RE β con una localización citosólica y que actuarían conjuntamente en la activación de la proliferación celular. Apoyando esta hipótesis está el hecho de que en estos tumores la presencia de RE α es muy escasa.

5. CONCLUSIONES

1. Los tejidos de miometrio y leiomioma pareado presentan células inmunorreactivas para los tres tipos de receptores de estrógenos, α , β y GPR30.
2. Las células musculares de miometrio y leiomioma presentan inmunoreactividad para los tres tipos de receptores de estrógenos, α , β y GPR30 mientras que las células del tejido conectivo y endoteliales son mayoritariamente RE β y GPR30 inmunorreactivas.
3. La localización subcelular de los receptores de estrógenos α y β en el miometrio, es siempre nuclear. La inmunoreactividad del GPR30 es mayoritariamente nuclear aunque puede observarse en el citoplasma de algunas células. En tejido leiomiomatoso, el RE α , es siempre nuclear mientras que el RE β y GPR30 presentan también localización citosólica.
4. En leiomiomas de crecimiento rápido, células RE α -ir son muy escasas con un predominio respecto al leiomioma típico de RE β y GPR30. La localización subcelular es mayoritariamente citosólica sobre todo en leiomioma de alto índice mitótico.
5. La colocalización de RE α -ir/RE β -ir ocurre de forma ocasional en células musculares del miometrio. Esta colocalización fue mayor en tejido leiomiomatoso típico y muy escasa en células musculares de leiomioma de crecimiento rápido. En el caso de leiomioma típico se observaron células con núcleos RE α -ir/RE β -ir y citoplasma RE β -ir.
6. La colocalización RE β -ir/GPR30-ir se produce fundamentalmente en los núcleos de células musculares tanto de miometrio como leiomioma típico, siendo escasas las células que presentan sólo uno de estos receptores. Igualmente, en leiomiomas de

crecimiento rápido y mitóticamente activo hay colocalización en células de tejido muscular. Esta localización es tanto nuclear como citosólica.

CONCLUSIONS

1. Leiomyoma and myometrial tissues display immunoreactive cells for the three types of estrogen receptors α , β and GPR30.
2. Leiomyoma and myometrial muscle cells exhibit immunoreactivity for the three types of estrogen receptors, α , β and GPR30 whereas endothelial cells and connective tissue are mainly ER β and GPR30 immunoreactive.
3. The subcellular localization of α and β estrogen receptors in the myometrium is always nuclear. GPR30 immunoreactivity is mainly observed in the nucleus although it can be found in the cytoplasm of some cells. In leiomyomatous tissue, ER α shows a nuclear localization in all cases; besides, ER β and GPR30 can also present a cytosolic localization.
4. ER α immunoreactive cells are rare in fast growing leiomyomas showing a prevalence of ER β and GPR30 when compared with typical leiomyoma. The subcellular localization is mainly cytosolic especially in leiomyoma with a high mitotic index.
5. The colocalization of ER α /ER β -immunoreactivity occasionally occurs in myometrial muscle cells. This colocalization is higher in typical leiomyomatous tissue and very small in fast growing leiomyoma muscle cells. In typical leiomyoma cells ER α /ER β -immunoreactivity colocalization was found in the nucleus whereas ER β -immunoreactivity was observed in the cytoplasm.
6. ER β /GPR30 colocalization is mainly found in the nuclei of myometrial and typical leiomyoma muscle cells, only few cells display just one of these receptors. Fast growing and mitotically active leiomyomas cells also display colocalization in muscle tissue, this location is both nuclear and cytosolic.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Bell SW, Kempson RL, Hendrickson MR. Problematic uterine smooth muscle neoplasms. A clinicopathologic study of 213 cases. *The American Journal of Surgical Pathology*. 1994; 18(6):535-58.
- 2) Benassayag C, Leroy MJ, Rigourd V, Robert B, Honoré JC, Mignot TM, Vacher-Lavenu MC, Chapron C, Ferré F. Estrogen receptors (ER α /ER β) in normal and pathological growth of the human myometrium: pregnancy and leiomyoma. *American Journal of Physiology*. 1999; 276(6 Pt 1):E1112-8
- 3) Blake RE. Leiomyomata uteri: hormonal and molecular determinants of growth. *Journal of the National Medical Association* 2007; 99(10): 1170-84.
- 4) Borahay MA, Al-Hendy A, Kilic GS, and Boehning D. Signaling Pathways in Leiomyoma: Understanding Pathobiology and Implications for Therapy. *Molecular Medicine*. 2015; 21(1): 242-256

- 5) 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. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 1993; 169(1):78-85.
- 6) 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. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1994; 78:736-743.
- 7) Carraway RE, Hassan S. Neurotensin receptor binding and neurotensin-induced growth signaling in prostate cancer PC3 cells are sensitive to metabolic stress. *Regulatory Peptides*. 2007; 141(1-3):140-53.
- 8) Evans, P., Brunzell S. Uterine fibroid tumors: diagnosis and treatment. *American Family Physician* 2007; 75(10): 1503-8.
- 9) Evers BM. Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues. *Peptides*. 2006; 27(10):2424-33.
- 10) 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; 153(7):2953-62.
- 11) 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. *Molecular Human Reproduction*. 2002; 8(8):770-5.
- 12) Grings AO, Lora V, Ferreira GD, Brum IS, Corleta Hv, Capp E. Protein expression of estrogen receptors α and β and aromatase in myometrium and uterine leiomyoma. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2012; 73(2):113-7.
- 13) 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. *Human Reproduction*. 2001; 16(11):2411-7.
- 14) 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. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2010; 203(3):242.e1-5.
- 15) 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; 82 Suppl 3:1244-9.
- 16) Kolkova Z, Noskova V, Ehinger A, Hansson S, Casslén B. G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER, GPR30) in normal human endometrium and early pregnancy decidua. *Molecular Human Reproduction*. 2010; 16(10):743-51.
- 17) Kovács KA, Oszter A, Göcze PM, Környei JL, Szabó I. Comparative analysis of cyclin D1 and estrogen receptor (alpha and beta) levels in human leiomyoma and adjacent myometrium. *Molecular Human Reproduction*. 2001; 7(11):1085-91.
- 18) Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996; 93(12):5925-30.
- 19) Levy G, Hill MJ, Beall S, Zarek SM, Segars JH, Catherino WH. Leiomyoma: genetics, assisted reproduction, pregnancy and therapeutic advances. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2012; 29(8):703-12.
- 20) Madeo A. y Maggiolini M. Nuclear alternate estrogen receptor GPR30 mediates 17beta-estradiol-induced gene expression and migration in breast cancer-associated fibroblasts. *Cancer Research*. 2010; 70(14):6036-46.
- 21) 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? *International Journal of Oncology*. 2005; 27(6):1505-9.
- 22) Markowska A, Rucinski M, Drews K, Malendowicz LK. Further studies on leptin and leptin receptor expression in myometrium and uterine myomas. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 2005; 26(5):517-25.
- 23) 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. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 2006; 27(4):379-84.
- 24) Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews*. 2001; 81(4):1535-65.
- 25) Okolo, S. Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2008; 22(4): 571-88

- 26) Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, Fuchs I, Klewer M, Brittain D, Langer G, Bader B, Prella K, Nubbemeyer R, Fritzsche KH. G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology*. 2008; 149(10):4846-56.
- 27) Pandis N, Heim S, Bardi G, Flodérus UM, Willén H, Mandahl N, Mitelman F. Chromosome analysis of 96 uterine leiomyomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 1991; 55(1):11-8.
- 28) Parker WH. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertil Steril* 2007; 87(4): 725-36.
- 29) Rein MS. Advances in uterine leiomyoma research: the progesterone hypothesis. *Environ Health Perspect*. 2000; 108 Suppl 5:791-3.
- 30) Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005; 307(5715):1625-30.
- 31) 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. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2005; 104(12):920-6.
- 32) Rodríguez Y, Báez D, Montesdeoca F, García C, Dorta I, Reyes R, Valladares F, Almeida TA, Bello AR. Comparative analysis of the ER α /ER β ratio and neurotensin and its high-affinity receptor in myometrium, uterine leiomyoma, atypical leiomyoma, and leiomyosarcoma. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2011; 30(4):354-63.
- 33) Rodríguez Y., 2013. Tumores uterinos de músculo liso con distinto comportamiento clínico. Interacciones entre hormonas gonadales y péptidos en su desarrollo y caracterización. Licenciada en Biología. Universidad de La Laguna. España.
- 34) Sankaran S, Manyonda IT. Medical management of fibroids. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2008; 22(4): 655-76.
- 35) 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; 70(6):1056-62.
- 36) 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. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2009; 28(6):529-34.
- 37) 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 ER α Δ 5 expression in tumour-adjacent hormone-responsive tissue. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2010; 7(11):3871-89.
- 38) Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G-protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 2005;146:624-632.
- 39) 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*. 2013; 99(1):256-63.
- 40) Tramu G, Pillez A, Leonardelli J. An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous localization of two antigens by immunocytochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1978; 26(4):322-4.
- 41) 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; 86(6):1736-43.
- 42) Vrtačnik P, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, Marc J. The many faces of estrogen signaling. *Biochimica Medica* 2014; 24(3):329-42.
- 43) Walker CL, Stewart EA. Uterine fibroids: the elephant in the room. *Science* 2005; 308(5728): 1589-92
- 44) 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. *Gynecological Endocrinology*. 2001; 15(6):443-52.
- 45) Wilkinson N, Rollason TP. Recent advances in the pathology of smooth muscle tumours of the uterus. *Histopathology*. 2001; 39(4):331-41.
- 46) Yanai H, Wani Y, Notohara K, Takada S, Yoshino T. Uterine leiomyosarcoma arising in leiomyoma: clinicopathological study of four cases and literature review. *Pathol International*. 2010; 60(7):506-9.
- 47) Zhang Q, Ubago J, Li L, Guo H, Liu Y, Qiang W, Kim JJ, Kong B, Wei JJ. Molecular analyses of 6 different types of uterine smooth muscle tumors: Emphasis in atypical leiomyoma. *Cancer*. 2014;120(20):3165-77.