

# ESTRÓGENOS Y PÉPTIDO NEUROTENSINA EN NEOPLASIAS DE MIOMETRIO

---

**Yurena Rodríguez<sup>1</sup>, Francisco Valladares<sup>2</sup>, Francisco Montesdeoca<sup>4</sup>, Idaira Dorta<sup>1</sup>, Ricardo Reyes<sup>1</sup>, Candelaria García<sup>2</sup>, Mariano Hernández<sup>5</sup>, Teresa A. Almeida<sup>5</sup>, Delia Báez<sup>3</sup> y Aixa R. Bello<sup>1</sup>.**

1: Área de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de La Laguna.

2: Departamento de Anatomía, Anatomía Patológica e Histología, Universidad de La Laguna.

3: Departamento de Obstetricia y Ginecología Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna.

4: Hospital La Colina (USP).

5: Laboratorio de Genética, Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales de Canarias, Universidad de La Laguna. Tenerife

---

## ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN
  2. ESTRÓGENOS EN LAS NEOPLASIAS DE MIOMETRIO
  3. ESTRÓGENOS Y NEUROTENSINA EN LAS NEOPLASIAS DE MIOMETRIO
  4. REFERENCIAS
-

## **1. INTRODUCCIÓN**

En el miometrio, las células de músculo liso son el origen de diversas de estas neoplasias. Entre ellas, los leiomiomas (LM) son los tumores benignos del miometrio, dependientes de estrógenos y progesterona, más frecuentes (Walker y Stewart, 2005; Evans y Brunsell, 2007) y la neoplasia más común del tracto genital femenino. A pesar de que son usados varios términos para caracterizar estos tumores, miofibroma, fibromioma, leiomiofibroma, leiomioma, fibroma o mioma, leiomioma es el término que define exactamente esta neoplasia y se refiere a cualquier tumor benigno con origen en las células musculares lisas (Blake, 2007). Dentro de un útero normal, pueden crecer enteramente dentro del compartimento miometrial, leiomiomas intramurales, sobresalir por la superficie serosa del útero en la cavidad peritoneal (leiomioma pedunculado y subseroso) o proyectar en la cavidad uterina (leiomioma submucoso).

Los leiomiomas son tumores monoclonales de células de músculo liso rodeadas por una abundante matriz extracelular. Según Sankaran y Manyonda, 2008, los LMs son sintomáticos en un 50% de los casos, lo que hace que, aunque sean tumores benignos, tengan un fuerte impacto en la salud de la mujer y su calidad de vida. Los síntomas más frecuentes son las metrorragias, hemorragias anemizantes y dolor abdominal, además de afectar a la infertilidad, abortos y reducción de la eficacia de los tratamientos de reproducción asistida (Stowall y cols., 1998; Hart y cols., 2001), según su localización y tamaño. A pesar de su impacto en la salud femenina han recibido poca atención, hasta los últimos años, en cuanto al estudio de sus causas y patogénesis, considerando su poco clara e infrecuente malignización. Sin embargo, el hecho de que los leiomiomas existentes en el útero progresen hacia leiomiosarcoma (LMS), tumor maligno de miometrio, es una posibilidad (Indraccolo y cols., 2008).

En la literatura parece aceptado el papel determinante de los esteroides gonadales en el desarrollo de leiomiomas uterinos. Así, a los estrógenos se les considera factores de riesgo y promotores de su desarrollo así como factores de proliferación o posibles estimuladores de otros factores, (Flake y cols. 2003), aunque en los estudios moleculares y celulares no haya exactamente consenso por el momento.

Además de las hormonas, otros factores como la raza, componentes genéticos hereditarios y factores ambientales han sido también asociados a la aparición de leiomiomas uterinos considerándolos factores de riesgo para su desarrollo (Baird y Dunson, 2003; Parker, 2007). Debido a que la exposición de las mujeres a estrógenos y progesterona está influenciada por su historia reproductiva y uso de contraceptivos o tratamientos de fertilización, estas características pueden estar implicadas en el desarrollo de leiomiomas uterinos. Por otro lado es necesario considerar otras fuentes endógenas de estrógenos debido 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). Canarias constituyen una de las regiones españolas con mayor índice de obesidad (INE). La obesidad conlleva una hipertrofia del tejido adiposo, cuyas células expresan la enzima aromatasa necesaria para la conversión de andrógenos en estrógenos, síntesis de estrógenos contribuyendo así a crear un ambiente hiperestrogénico. Una de las moléculas más importantes sintetizada por las células adiposas es la leptina, hormona que regula el apetito y el balance energético, la cual se ha demostrado que induce la expresión de aromatasa en tejido leiomiomatoso pero no en miometrio sano (Markowska y cols., 2005; Markowska y cols., 2006).

Generalmente, se cree que las variantes de leiomiomas tienen el mismo comportamiento benigno que los leiomiomas típicos (Wilkinson y Rollason, 2001; Giuntoli y cols. 2007). Sin embargo, dos de estas variantes, denominados en la literatura como "bizarros o leiomiomas atípicos" (LA) y leiomiomas celulares (LC), con células pleomórficas, bajo índice mitótico y necrosis no coagulativa los primeros o hiper celularidad los segundos, aunque considerados tumores clínicamente benignos, se tienen evidencias de su potencial malignidad (Sung y cols., 2009; Giuntoli y cols., 2007), presentando algunas características, típicamente asociadas a LMS (Taran y cols., 2010). Los LMS son tumores escasos, 1% de los tumores uterinos, pero altamente agresivos con alta capacidad metastásica y proporción de recurrencia, aún con un diagnóstico en las fases iniciales. No se conoce si los LMS uterinos pueden desarrollarse desde un leiomioma preexistente (Singh y cols. 2006) o de novo a partir de la malignización de las células musculares del miometrio, y su crecimiento debe estar controlado posiblemente por esteroides gonadales (Hyder y Stancel, 1999).

Aunque parece evidente el papel de los esteroides en el desarrollo de estas diferentes neoplasias que afectan al miometrio, sus mecanismos de acción en la etiología y/o desarrollo de las mismas siguen siendo desconocidos. En el caso más estudiado, los LMs, se sabe presentan una sensibilidad a la estimulación con estrógenos, aumentada respecto al útero sano (Okolo, 2008). La progesterona parece favorecer la actividad mitogénica de las células de leiomioma en cultivo (Xu Q y cols. 2005) y también promover la supervivencia de las células de leiomioma regulando la expresión de la proteína Bcl-2 (Yin y cols. 2007).

## **2. ESTRÓGENOS EN LAS NEOPLASIAS DE MIOMETRIO**

En general, los efectos biológicos de los estrógenos, son mediados por sus receptores (RE)  $\alpha$  y  $\beta$ .

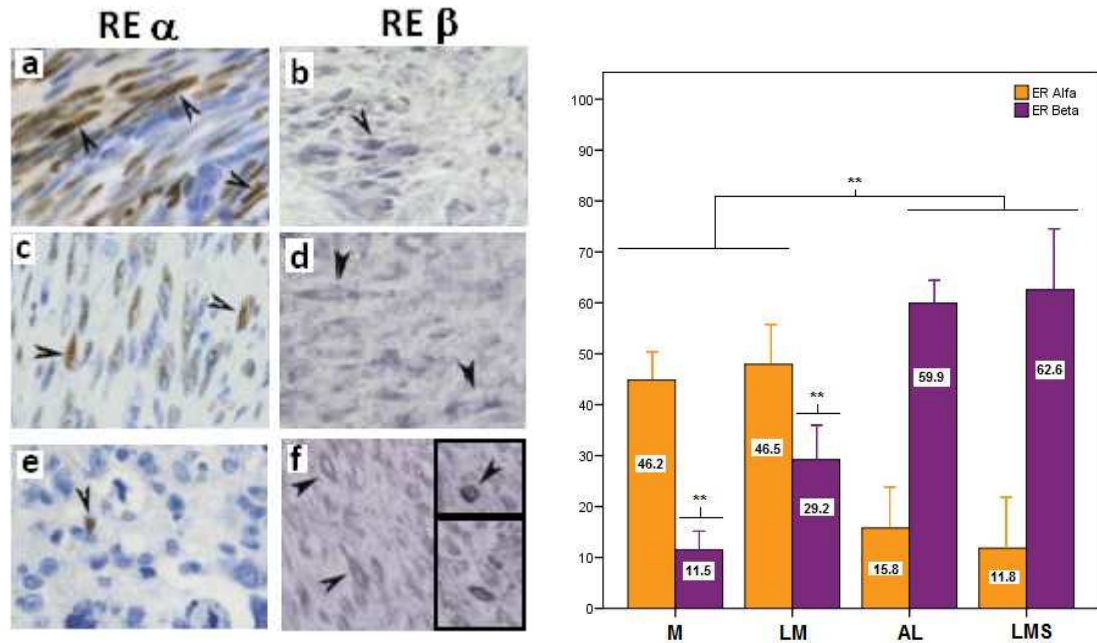
Algunas de las acciones mediadas por estos receptores suponen una acción sobre la expresión génica, (acción genómica), pero también se cree que ejercen acciones no genómicas por medio de receptores asociados a la membrana celular (Björnström y Sjöberg, 2005).

Los dos tipos de receptor de estrógenos presentan homologías significativas en el dominio de unión al ADN y en la unión al ligando. Sin embargo la especificidad de unión al ligando y la actividad transcripcional de las dos formas de REs son sustancialmente diferentes (Hall y Korach, 2002; Dahlman-Wright y cols., 2006). Estos receptores además se expresan de manera diferencial en los distintos tejidos, pudiendo actuar de forma opuesta sobre ellos (Taylor y cols., 2010). La alteración de la expresión de los REs 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 el estado de ambos receptores dentro del tejido como ha sido reportado en cáncer de mama (Chen y cols. 2008). En efecto, es la ratio RE $\alpha$ -RE $\beta$  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).

En el caso del útero, donde los RE $\alpha$  son mayoría en el tejido sano, la ratio RE $\alpha$ -RE $\beta$  es menor en cáncer de endometrio donde ratios menores de 1 parecen ser un factor predictivo de una más corta supervivencia libre de enfermedad (Jongen y cols., 2009; Mylonas y cols., 2005).

En LMs, los trabajos sobre la expresión de RE  $\alpha$  y  $\beta$ , muestran resultados controvertidos (Wang y cols 2009; Kovács y cols 2001; Roan y cols., 2005). Si bien parece claro que los niveles de REs, sin especificar el tipo, son más altos en leiomiomas que en el útero sano (Brandon y cols., 1993), el segundo tipo de RE, RE $\beta$ , parece expresarse a niveles de ARNm de forma preferente en leiomiomas respecto del miometrio sano (Benassayag y cols 1999; Bakas y cols. 2008). A nivel celular, hay algunos datos contradictorios sobre la localización de ambos receptores en las células leiomiomatosas, dependiendo del tipo de estudio, tumores primarios o cultivo (Gargett y cols., 2002; Jakimiuk y cols. 2004). Ante estos antecedentes, nuestro grupo se planteó estudiar más profundamente estos tumores y para ello comenzamos por la caracterización de los tipos celulares que presentan RE $\alpha$  y RE $\beta$  en células leiomiomatosas respecto del miometrio sano, (Valladares F. y cols.: *Characterization of estrogen receptor alpha and beta immunoreactivity in uterine leiomyomas cells. Fertil. Steril. 2006*). Para este primer trabajo se usó material de archivo de la Unidad de Anatomía Patológica del HUC (Hospital Universitario de Canarias) en el que aplicando métodos inmunoenzimáticos obtuvimos que, el receptor de RE $\alpha$  está sólo presente en células musculares lisas con variaciones en cuanto a la

localización subcelular, pudiendo ser sólo nuclear, sólo citoplasmática o nuclear y citoplasmática en los diferentes leiomiomas estudiados, presentando las mismas variaciones que el miometrio sano. El RE $\beta$  presentó una amplia distribución en células musculares lisas, endoteliales y de tejido conjuntivo con localización nuclear en todos los casos estudiados.



**Figura 1.** Inmunoreacción para el RE $\alpha$  y RE $\beta$  en células de músculo liso de miometrio (M), leiomiomas atípicos (AL) y leiomiomas (LM). Núcleos RE $\alpha$ -ir (puntas de flecha) en M (A), AL (C) y (E). Coloración de contraste correspondiente a la tinción con hematoxilina-eritrosina. Núcleos RE $\beta$ -ir (puntas de flecha) en M (B), AL (D) y LMS (F) sin coloración de contraste. Barra de escala 30  $\mu$ m.

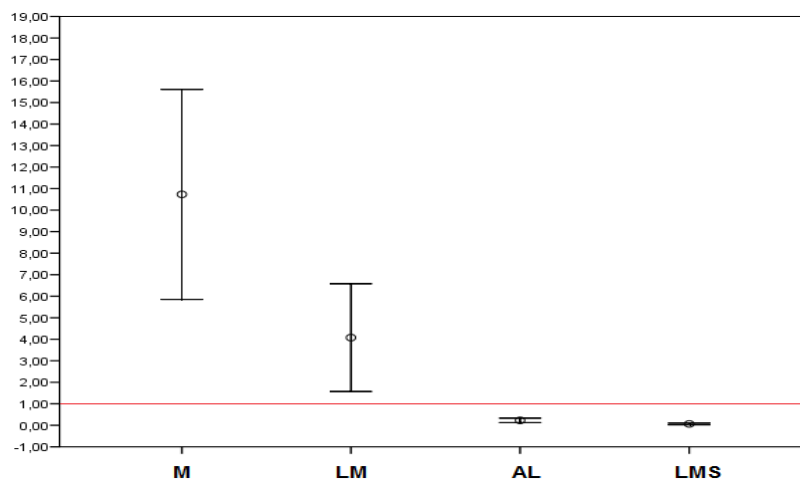
Representación gráfica que muestra el porcentaje de células RE $\alpha$  y RE $\beta$ -ir en miometrio (M), leiomioma (LM), leiomioma atípico (AL) y leiomiomasarcoma (LMS). El histograma representa los valores medios  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0,001$ .

En otras variantes de LMs el estatus de ambos receptores es desconocido y los pocos estudios en LMSs, presentan datos sólo de un tipo de receptor. Aún así, datos 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).

En otros tumores como el cáncer de mama, se ha mostrado ser más importante que la presencia del receptor alfa y beta conjuntamente en el tejido neoplásico, la relación entre ambos. Así, la ratio RE $\alpha$ /RE $\beta$  parece ser un factor crítico en el desarrollo del proceso tumoral, conociéndose en tumores sensibles a estrógenos como, colon, próstata, mama, e ignorándose completamente en el útero donde recientemente se vio que podría haber un aumento de la ratio RE $\beta$ /RE $\alpha$  en cáncer de endometrio. Ante la importancia de que en el útero, la ratio sea

inversa a la observada en cáncer de mama nuestro siguiente objetivo fue determinar dicha ratio,  $RE\alpha/RE\beta$ , en leiomiomas, leiomiomas atípicos, como un tipo de leiomioma con potencial de malignización y leiomiosarcomas respecto del miometrio sano. En el trabajo (Rodríguez Y. y cols.: *Comparative analysis of the  $ER\alpha/ER\beta$  ratio and neurotensin and its high-affinity receptor in myometrium, uterine leiomyoma, atypical leiomyoma, and leiomyosarcoma. Int J Gynecol Pathol. 2011*) encontramos que el  $RE\alpha$  siempre estuvo presente en miometrio y leiomioma. En leiomiomas atípicos y leiomiosarcomas, un número importante de muestras no presentaron inmunorreactividad para el  $RE\alpha$  siendo la localización subcelular del mismo mayoritariamente nuclear. Sin embargo, el  $RE\beta$  se encontró siempre en todas las muestras de cada grupo estudiado. No obstante, mientras que en miometrio y leiomioma, su localización fue principalmente nuclear, en leiomiomas atípicos y leiomiosarcomas, la localización del  $RE\beta$  fue citoplasmática (Fig.1). Estos resultados sugieren que el leiomiosarcoma puede ser un tumor dependiente de estrógeno y por otro lado la malignización implica un cambio en la localización subcelular del  $RE\beta$ .

Por otro lado, en leiomiosarcomas,  $RE\beta$  estuvo siempre presente y el  $RE\alpha$  disminuyó o estuvo ausente. El valor de ratio  $RE\alpha/RE\beta$  es mayor que 1 para miometrio sano y leiomioma, mientras que es menor que 1 para leiomiomas atípicos y leiomiosarcomas. (Fig. 2)



**Figura 2.** Representación gráfica que muestra la ratio  $RE\alpha/RE\beta$  en miometrio (M), leiomioma (LM), leiomioma atípico (AL) y leiomiosarcoma (LMS). La gráfica muestra la ratio  $RE\alpha/RE\beta$  calculada para cada muestra en cada uno de los grupos analizados.

### 3. ESTRÓGENOS Y NEUROTENSINA EN LAS NEOPLASIAS DE MIOMETRIO

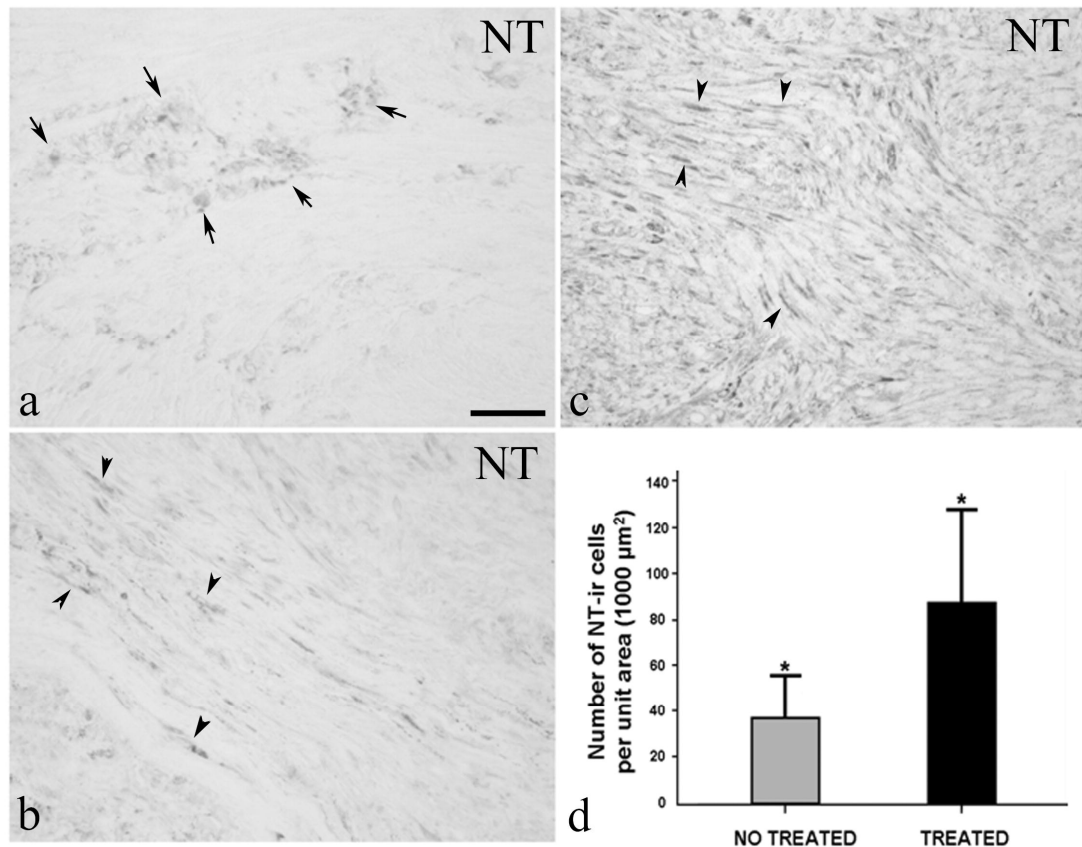
Una de las acciones estrogénicas en los tejidos, es la inducción de expresión de factores de crecimiento peptídicos y de sus receptores (Hyder y Stancel, 1999). Uno de estos factores

tróficos es el péptido neurotensina (NT). La neurotensina es un neurotransmisor y neuromodulador en el sistema nervioso y modulador paracrino o endocrino en tejidos periféricos. Los efectos de este péptido son principalmente mediados por el receptor de alta afinidad, acoplado a proteína G, NTR1, el cual después de unirse a la NT induce una cascada de señalización que incluye la activación de protein-quinasas mitogénicas conduciendo a una estimulación de la proliferación celular.

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 NT juega un papel en la regulación del crecimiento tumoral, el ARNm del NTR1 es altamente sobreexpresado por 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 NTR1 y presentan respuestas de crecimiento celular a concentraciones subnanomolares de NT (Carraway y cols., 2007; Sehgal y cols., 1994; Seethalakshmi y cols 1997). Además, las células tumorales pueden secretar NT y también expresar sus receptores sugiriendo que además de una señalización endocrina y paracrina, es posible una regulación autocrina por la neurotensina en estas células (Carraway cols., 2007).

Diversos trabajos indican que la NT 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). El grupo de Forgez P. INSERM Paris, está especializado en el análisis de la neurotensina y sus interrelaciones con hormonas gonadales, en el desarrollo y progresión del cáncer de mama y colon, dos tipos de cáncer estrógeno-dependientes. Por otro lado, la presencia de neurotensina pudiera ser un hecho temprano en la tumorigénesis como indican los hallazgos recientes de Gui X y cols., 2008, que mostraron como la expresión de NTR1 iba aumentando desde tejido sano, a adenoma con una máxima expresión en adenocarcinoma, en el cáncer de colon. Teniendo en cuenta que las neoplasias uterinas pertenecen a este grupo de tumores sensibles a estrógenos, son unos buenos candidatos a expresar este péptido por lo que nos planteamos su estudio. Nuestro primer trabajo (*Rodríguez y cols.: Neurotensin and neurotensin receptor 1 expression in human myometrium and uterine leiomyomas. Biol Reprod. 2010*) lo realizamos en leiomiomas de pacientes normales comparando con miomas procedentes de mujeres que habían tenido tratamientos de fertilización in vitro, como un modelo de mayor exposición a hormonas gonadales. Mientras que en el tejido sano, sólo hay inmunoreactividad para la NT en el tejido conjuntivo (Fig.3 a) en los leiomiomas, la neurotensina y su receptor colocalizan en las células musculares (Fig. 3b). En las pacientes tratadas con altas dosis de esteroides para

procesos de fertilización in vitro que mostraron crecimiento del tumor, se duplica el número de células musculares que presentan NT inmunorreactiva (Fig. 3c, d)



**Figura 3.** Neurotensina-ir en miometrio y leiomioma. (a) NT-ir en células de tejido conjuntivo (flechas) de miometrio sano. b) NT-ir en células de músculo liso (puntas de flecha) de un leiomioma. c) NT-ir en células de músculo liso (puntas de flecha) en un leiomioma de una paciente después de sometida a tratamiento de fertilización. d) Representación gráfica que muestra el número de células NT-ir en mujeres sin y con tratamiento de fertilización. El histograma representa los valores medios  $\pm$  SD. \*\*  $p < 0,015$ . Barra de escala 50  $\mu$ m.

Otro hecho interesante en relación a los receptores de péptidos en los tumores, es la evidencia mostrada en los últimos 20 años de la presencia de variantes de splicing específicas de receptores acoplados a proteínas G que se expresan sólo en células cancerosas (Venables, 2004). La utilización de anticuerpos dirigidos contra productos de splicing específicos de las células cancerosas constituye una terapia prometedora, estando actualmente en experimentación clínica (Venables, 2004). A pesar de que en el cáncer de mama está muy avanzado el estudio de la neurotensina y sus receptores, así como su relación con las hormonas gonadales, en el útero se desconocía completamente tan siquiera si estaba presente. Para



estudiar la posible presencia de variantes de splicing del NTR1 en los leiomiomas hicimos un trabajo previo en una línea celular de cáncer de próstata PC3, donde el NTR1 se expresa de forma muy abundante. Con este estudio determinamos la presencia de tres variantes, (*Almeida TA y cols. Differential expression of new splice variants of the neurotensin receptor 1 gene in human prostate cancer cell lines. Peptides. 2010*).

Al estudiar estas variantes en leiomioma encontramos que un porcentaje de ellos las expresaban mientras que no hubo ninguna expresión en el miometrio sano.

Estudiamos la presencia de la neurotensina y su receptor de alta afinidad, también en leiomiomas atípicos y leiomiosarcomas (*Rodríguez Y. y cols.: Neurotensin and neurotensin receptor 1 expression in human myometrium and uterine leiomyomas. Biol Reprod. 2010*). El péptido estuvo presente en la mayoría de células tumorales en leiomioma atípico y en todas las células de leiomiosarcoma donde además demostramos su expresión utilizando hibridación *in situ*. Nuestros datos sugieren que la NT es un regulador autocrino de la célula tumoral al estar colocalizados el péptido y su receptor en todas ellas.

Un resultado particularmente interesante de este trabajo fue mostrar que el fenotipo de los leiomiomas atípicos en relación tanto al receptor de estrógeno alfa y beta como la expresión de neurotensina, está más próximo al del leiomiosarcoma que al del leiomioma, lo que apoya un posible potencial de malignización de este tumor.

#### **4. REFERENCIAS**

Baird, D. D. and D. B. Dunson. 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. Epub 2007 Dec 31.

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. Epub 2005 Feb 3.

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

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.

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. Epub 2007 Jan 16.

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

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 58(4):773-81.

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

Evans, P. and S. Brunzell. 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.

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

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 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. 87(9):4341-9.

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.

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. Epub 2008.

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. 16(11):2411-7.

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

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.

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.

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.

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

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.

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

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

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

Reubi JC, Laissie 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.

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.

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

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

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.

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

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

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 ER $\alpha$  $\Delta$ 5 expression in tumour-adjacent hormone-responsive tissue. *Int J Environ Res Public Health*. 2010 Nov;7(11):3871-89.

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.

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

Walker, C. L. and E. A. Stewart. Uterine fibroids: the elephant in the room. *Science* 2005; 308(5728): 1589-92

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. Epub 2009 Dec 30.

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

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.

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.