

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA MÉDICA

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DA RESIDÊNCIA**

**Expressão da proteína 6 do linfoma de células B (BCL-6) no miométrio e  
endométrio de mulheres com adenomiose e miomatose  
-Projeto AdenoB6-**

Residente: Camila Hartmann Blank  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Francalacci Savaris

Colaboradores:  
Bruna Mielczarski  
João Sabino Lahogue da Cunha Filho  
Raquel Camara Rivero

Trabalho de Conclusão de Residência apresentado ao Programa de Residência Médica de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre como requisito parcial para a obtenção do título de especialista em Obstetrícia e Ginecologia

Porto Alegre  
2023

# SUMÁRIO

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMO</b>                       | <b>2</b>  |
| Palavras chave                      | 2         |
| <b>INTRODUÇÃO</b>                   | <b>3</b>  |
| <b>OBJETIVO</b>                     | <b>5</b>  |
| <b>METODOLOGIA</b>                  | <b>5</b>  |
| DELINEAMENTO                        | 5         |
| APROVAÇÃO ÉTICA                     | 5         |
| CRITÉRIOS DE INCLUSÃO               | 5         |
| CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO               | 6         |
| VARIÁVEIS                           | 6         |
| TAMANHO DA AMOSTRA                  | 6         |
| IMUNO-HISTOQUÍMICA                  | 6         |
| LEITURA DAS LÂMINAS                 | 7         |
| ANÁLISE DAS LÂMINAS COM FIJI-IMAGEJ | 7         |
| DESFECHO                            | 10        |
| ANÁLISE ESTATÍSTICA                 | 11        |
| <b>RESULTADOS</b>                   | <b>11</b> |
| PARTICIPANTES                       | 11        |
| ANÁLISE DESCRITIVA                  | 12        |
| ÁREA ANALISADA                      | 12        |
| EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BCL6          | 12        |
| <b>DISCUSSÃO</b>                    | <b>14</b> |
| <b>CONCLUSÃO</b>                    | <b>14</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | <b>15</b> |

## **RESUMO**

O presente estudo-caso controle verificará a expressão da proteína BCL6 (linfoma de células B 6) na adenomiose e nos miomas. O BCL-6 é um proto-oncogene humano que está associado ao aumento da proliferação celular através da repressão de genes como p53 e com a presença de endometriose. A sua expressão na adenomiose e nos miomas ainda não foi determinada. A expressão do BCL6 será verificada por imuno-histoquímica em amostras de tecido miometrial normal, com miomatose e com adenomiose. A análise das imagens utilizará técnica do Digital HSCORE. Com isto, será compreendido a fisiopatologia da adenomiose e miomatose.

### **Palavras chave**

BCL6, adenomiose, imuno-histoquímica

## INTRODUÇÃO

A miomatose é uma condição benigna caracterizada por uma proliferação anormal das células miometriais, alcançando uma prevalência de cerca de 40% das mulheres em idade reprodutiva (VS Baranov et al, 2019). Os principais sintomas associados a essa condição são dor pélvica crônica, dismenorreia, dispareunia e sangramento uterino aumentado (Palheta et al, 2023).

Macroscopicamente, essa patologia se apresenta por nódulos fibróticos. Já microscopicamente, são identificadas áreas de crescimento anormal de tecido muscular liso, com bordas definidas e raras mitoses (Croce et al, 2014).

A adenomiose, assim como a miomatose, é uma afecção uterina benigna, caracterizada, porém, pela presença patológica de glândulas e estroma endometriais no miométrio. (Bird et al. 1972). A adenomiose uterina acomete mulheres entre 16 e 60 anos, sendo que a sua prevalência está ao redor de 0,8%(Yu et al. 2020), mas pode acometer 10% a 80% das mulheres pré-menopáusicas com infertilidade e dor pélvica crônica.(Antero et al. 2020) Esta condição pode ser a causa de dor pélvica crônica, dismenorreia, dispareunia, infertilidade e desfechos obstétricos adversos.(Bruun et al. 2018; Harada et al. 2019)

Macroscopicamente, o útero pode se apresentar difusamente aumentado ao exame físico. Microscopicamente, a adenomiose exhibe glândulas e estroma endometriais ectópicos circundado por miométrio hipertrófico.(Benagiano and Brosens 2006; Ferenczy 1998) Considera-se que a adenomiose resulta em uma invaginação do endométrio a partir da quebra da zona juncional entre o endométrio basal e o miométrio. (Stratopoulou et al. 2021; García-Solares et al. 2018)(Bulun et al. 2021)

A origem tecidual da adenomiose a partir do endométrio eutópico recebeu validação molecular no estudo de Inoue et al.; a identificação de mutações somáticas usando sequenciamento de nova geração forneceu evidências inequívocas acerca deste assunto. (Inoue et al. 2019) As mesmas mutações somáticas na mutação no gene KRAS podem ser detectadas tanto

na adenomiose, quanto no endométrio eutópico correspondente, sugerindo que ambos, o endométrio ectópico e eutópico, são clonalmente relacionados.(Antero et al. 2020)

Apesar de não haver dados definitivos, há a possibilidade de que a adenomiose e a endometriose representem fenótipos diferentes de uma mesma doença.(Maruyama et al. 2020). Uma vez que ambas as condições estão associadas a mutações somáticas no gene KRAS.

O gene KRAS fornece instruções para a produção de uma proteína chamada K-Ras que faz parte de uma via de sinalização conhecida como via RAS/MAPK. A proteína retransmite sinais de fora da célula para o núcleo da célula. Esses sinais são responsáveis pela proliferação e diferenciação celular.

Mutações que ativam o KRAS estimulam vias específicas para aumentar a sobrevivência e proliferação celular e estão associadas à resistência à progesterona na adenomiose e endometriose.(Grechukhina et al. 2012) Juntos, esses achados sugerem que populações celulares distintas no tecido endometrial eutópico desempenham papéis-chave na etiologia da adenomiose. As evidências sugerem que as mutações do KRAS podem ser responsáveis, em parte, por fenômenos observados anteriormente, como sobrevivência celular prolongada e resistência à progesterona na adenomiose.(Bulun et al. 2021) Por sua vez, a ativação do KRAS em células com receptores positivos para progesterona, estimula a expressão da proteína BCL6, a qual participa na patogênese da endometriose.(Yoo et al. 2017)

BCL6 (linfoma de células B 6) é um repressor de gene transcricional e é necessário para o desenvolvimento de células B e oncogênese(Basso and Dalla-Favera 2012). O BCL6 é um dos proto-oncogenes humanos e está associado ao aumento da proliferação celular através da repressão de genes como p53.(Phan and Dalla-Favera 2004). Foi relatado que BCL6 é altamente superexpresso no endométrio de mulheres com endometriose durante a fase secretora do ciclo menstrual em comparação com mulheres sem endometriose.(Evans-Hoeker et al. 2016)

Considerando que a endometriose e a adenomiose possam ser entidades semelhantes, e que a proliferação está presente nos miomas, cria-se a hipótese de que a proteína BCL-6 também esteja aumentada nos casos de adenomiose e miomatose. Sabe-se que o BCL-2 está aumentado em miomas,

mas não existem dados sobre a expressão da proteína BCL6 na adenomiose e nos miomas. Este estudo tentará aumentar o conhecimento nesta área

## **OBJETIVO**

Comparar a expressão imuno-histoquímica da proteína BCL6 entre o tecido endometrial normal, com adenomiose e áreas de tecido com miomatose.

## **METODOLOGIA**

### **DELINEAMENTO**

Estudo caso-controle conforme descrito na literatura (Grimes and Schulz 2002)

### **APROVAÇÃO ÉTICA**

Os blocos de parafina ficaram sob os cuidados do serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e a utilização desses cortes foi aprovada pelo comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 2022-0177

### **CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Foram incluídas mulheres de 16 a 50 anos que foram submetidas a histerectomia por condições benignas entre os anos de 2009 e 2017.

Serão incluídos apenas blocos com laudos disponíveis no sistema do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, cujo diagnóstico da patologia evidencie a presença de adenomiose e de miomatose, os quais serão considerados como casos. Peças cirúrgicas do útero que estiverem dentro da normalidade, de acordo com o laudo patológico, serão consideradas como controles.

## CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Serão excluídos casos com câncer, infecção, e do ciclo puerperal.

## VARIÁVEIS

As variáveis categóricas são os grupos controle (normal), mioma e adenomiose. As variáveis contínuas são as médias do DAB verificadas pelo D-HSCORE (escala de 0 a 255 unidades); área em mm<sup>2</sup>.

Além disso, foram avaliadas as variáveis idade (anos), etnia (branca ou preta), peso (Kg) e a paridade para caracterização demográfica da amostra.

## TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho da amostra foi calculado considerando um erro alfa de 0,05 e poder (1-beta) de 0,95. Como o desvio padrão não estava disponível na literatura, foi realizado um estudo piloto com 30 unidades arbitrárias de DAB nos controles e 40 unidades arbitrárias de DAB nos casos, obtendo um desvio padrão de 6. A partir disso, se concluiu que um n de, no mínimo, 10 casos em cada grupo é adequado.

## IMUNO-HISTOQUÍMICA

Cortes de 3 µm de espessura serão submetidos à técnica de imuno-histoquímica padrão para o BCL6 que é feita por mecanismo automatizado, BenchMark ULTRA IHC/ISH system (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland), usando o anticorpo para BCL6 (G1191E.A8) Cell Marque. Amostras de câncer de pulmão humano foram usadas como controle positivo externo.

## LEITURA DAS LÂMINAS

A leitura das lâminas será realizada através de microscópio óptico com câmera acoplada para a obtenção de imagens de todo o corte histológico. O microscópio óptico (microscópio Olympus BX51; Olympus Optical Co., Tóquio, Japão) conectado a uma câmera digital colorida (Olympus DP73, OM Digital Solutions Co., Tóquio, Japão) será usado para capturar imagens das áreas de toda amostra. As imagens serão obtidas com uma objetiva seca U Plan Fluorite de 20x (abertura numérica 0,65 mm; Olympus), no tamanho de 4800 x 3600 pixels (resolução: 0,5 mm = 4150 pixels), sob condições padrão para análise Fiji-ImageJ.

Serão definidas como áreas de interesse as seções de tecido miometrial e endometrial, com endométrio ectópico (casos de adenomiose) e sem adenomiose presentes nas fotografias. Os casos de mioma serão selecionadas as regiões do mioma.

## ANÁLISE COM FIJI - IMAGEJ

As fotomicrografias serão codificadas e analisadas às cegas. A análise de imagem será realizada usando ImageJ (ImageJ - v1.43j; National Institutes of Health, Bethesda, MD, disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) usando um "plugin de deconvolução de cores" integrado para hematoxilina e Vetor embutido DAB (Ruifrok and Johnston 2001), conforme descrito anteriormente usando Digital HSCORE (D-HSCORE).(Fuhrich et al. 2013) Resumidamente, após selecionar as regiões de interesse (ROI), as imagens serão submetidas à análise de "deconvolução de cores". A imagem com coloração DAB será usada para análise. Os valores obtidos do DAB serão subtraídos de 255. As regiões de interesse (ROI) foram determinadas da seguinte forma: nos controles e nos casos de adenomiose, as glândulas foram marcadas, enquanto que no mioma, uma área padronizada sobre o tecido do mioma foi selecionada.

A análise foi automatizada utilizando o script em VBA para Fiji ImageJ.



Para transformar as imagens em DAB, foi utilizado o seguinte código de programação:

Da barra de menu do Fiji → File → New → Script e colocado este código de programação:

```
1 // This macro processes .tif images into H-DAB in a folder. A 21334 MB and 8 threads for this macro
2 //were used.
3
4 extension = ".tif";
5 dir1 = getDirectory("Choose Source Directory ");
6 setBatchMode(true);
7 n = 0;
8 processFolder(dir1);
9
10 function processFolder(dir1) {
11     list = getFileList(dir1);
12     for (i=0; i<list.length; i++) {
13         if (endsWith(list[i], ".tif"))
14             processFolder(dir1+list[i]);
15         else if (endsWith(list[i], extension))
16             processImage(dir1, list[i]);
17     }
18 }
19
20 function processImage(dir1, name) {
21     open(dir1+name);
22     print(n++, name);
23     run("Colour Deconvolution2", "vectors=[H DAB] output=8bit_Transmittance simulated cross hide");
24     title = getTitle();
25     name = substring(name, 0, lengthOf(name) - 4) + ".tif";
26     // Get the index of the second image generated by the PlugIn, if you want to net the number the part after "+" indicates which image
27     image_index = getImageID() + 1;
28     selectImage(image_index);
29
30     // add code here to analyze or process the image
31     saveAs("Tiff", "/Users/RicardoSavaris/Desktop/DABGRFOX01/" + name);
32     close("#");
33 }
```

Importante mencionar que todas as imagens deveriam estar em **.tif** e não em **.tiff**.

Para fazer a análise das imagens em DAB, de acordo com as regiões de interesse (ROI), ambos arquivos foram colocados numa mesma pasta e o processo foi automatizado utilizando outro código de programação:

```

1  /*
2  * Macro template to process multiple images in a folder. Analyzing DAB images from ROI
3  */
4
5  #@ File (label = "Input directory", style = "directory") input
6  #@ File (label = "Output directory", style = "directory") output
7  #@ String (label = "File suffix", value = ".tif") suffix
8
9  // See also Process_Folder.py for a version of this code
10 // in the Python scripting language.
11
12 //-- Setup analysis parameters
13 setBatchMode(true);
14 run("Set Measurements...", "area mean display redirect=None decimal=3");
15 //-- clear any existing results tables
16 close("Results");
17
18 processFolder(input);
19
20 //-- File list has been completed, save out results table
21 selectWindow("Results");
22 saveAs("Results", output + File.separator + "Results.csv");
23
24 // function to scan folders/subfolders/files to find files with correct suffix
25 function processFolder(input) {
26     list = getFileList(input);
27     list = Array.sort(list);
28     for (i = 0; i < list.length; i++) {
29         if (File.isDirectory(input + File.separator + list[i]))
30             processFolder(input + File.separator + list[i]);
31         if (endsWith(list[i], suffix))
32             processFile(input, output, list[i]);
33     }
34 }
35
36 function processFile(input, output, file) {
37     // Check file extension before processing
38     if (!endsWith(file, ".tif"))
39         return;
40
41     // Do the processing here by adding your own code.
42     // Leave the print statements until things work, then remove them.
43     print("Processing: " + input + File.separator + file);
44
45     //-- Clear the ROI manager
46     roiManager("reset");
47
48     //-- Open the first tiff file
49     open(input + File.separator + file);
50
51     //-- Open the ROI with matching name into the ROI manager then select
52     roiManager("Open", input + File.separator + replace(file, ".tif", ".roi"));
53     roiManager("Select", 0);
54
55     //-- Measure specified parameters
56     run("Measure");
57
58     //-- Tidy up by closing images
59     close("*");
60     roiManager("reset");
61 }

```

O processo da análise automatizada pode ser visualizado neste [vídeo](#).

## DESFECHO

Média da expressão de BCL6 nos cortes histológicos dos casos (adeniose e miomatose) e controles nos compartimentos do miométrio.

Média da expressão de BCL6 nos cortes histológicos dos três grupos: adenomiose, miomas e controles.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade da distribuição foi verificada utilizando o teste D'Agostino & Pearson. Conforme a normalidade da distribuição: utilizados a análise de variância (ANOVA) ou o teste de Kruskal-Wallis para comparar as médias D-HSCORE dos três grupos. Na presença de uma diferença significativa entre os três grupos; aplicado o teste pos-hoc de Tukey ou o teste de Dunn. O software utilizado para a análise estatística foi o GraphPad Prism versão 8.3.1 para Windows.

## RESULTADOS

### PARTICIPANTES

Um total de 39 blocos de parafina de pacientes submetidas a histerectomia no HCPA entre o 2009 e 2017 foram avaliados. Destes 39 blocos, 14 obtiveram laudo patológico dentro da normalidade, sendo classificados como controles (N); 12 obtiveram laudo patológico compatível com adenomiose, sendo classificados como casos (A); e, por último, 13 obtiveram laudo patológico compatível com miomatose, sendo classificados como casos (M).

### ANÁLISE DESCRITIVA

As características das pacientes estudadas estão descritas na tabela 1. Não há diferença estatisticamente significativa em relação ao perfil demográfico na comparação entre o grupo de pacientes com adenomiose, miomatose e endométrio normal.

Tabela 1. Caracterização da população estudada. Valores estão em média, desvio padrão (DP), exceto onde estiver determinada outra medida

| Características           | Control<br>(n=14) | Adenomiose<br>(n=12) | Miomatose<br>(n=13) | p valor           |
|---------------------------|-------------------|----------------------|---------------------|-------------------|
| Idade - anos - média (DP) | 57 (17,5)         | 45,1 (3,5)           | 48,3 (14,8)         | 0,3 <sup>a</sup>  |
| Etnia n (%)               |                   |                      |                     |                   |
| branca                    | 12 (85,7)         | 11 (91,7)            | 12 (92,3)           | >0,9 <sup>b</sup> |
| preta                     | 2(8,3)            | 1 (8,3)              | 1 (7,6)             |                   |
| Peso - Kg - média (DP)    | 76,7 (18,4)       | 72,1 (11,7)          | 72,6 (9,5)          | 0,4 <sup>a</sup>  |
| Paridade - média (DP)     | 3,2 (1,7)         | 8,9 (17,8)           | 2,4 (1,5)           | 0,4 <sup>a</sup>  |

a: Teste de Kruskal Wallis

b: Teste exato de Fischer

#### ÁREA ANALISADA

A comparação das medianas entre os grupos não foi significativa (p=0,09 - Kruskal-Wallis), o que é importante, já que a porcentagem da área analisada, junto com a intensidade da coloração, influencia no valor do D-HSCORE.

#### EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BCL6:

A comparação das médias entre os grupos foi significativa (p<0,0001 - Kruskal-Wallis). Na comparação entre os grupos, houve uma diferença significativa entre o grupo mioma x adenomiose e o grupo mioma x controle; a diferença entre as médias do grupo adenomiose x controle não foi significativa (Dunn's teste para comparações múltiplas), conforme demonstrado na Figura 1.

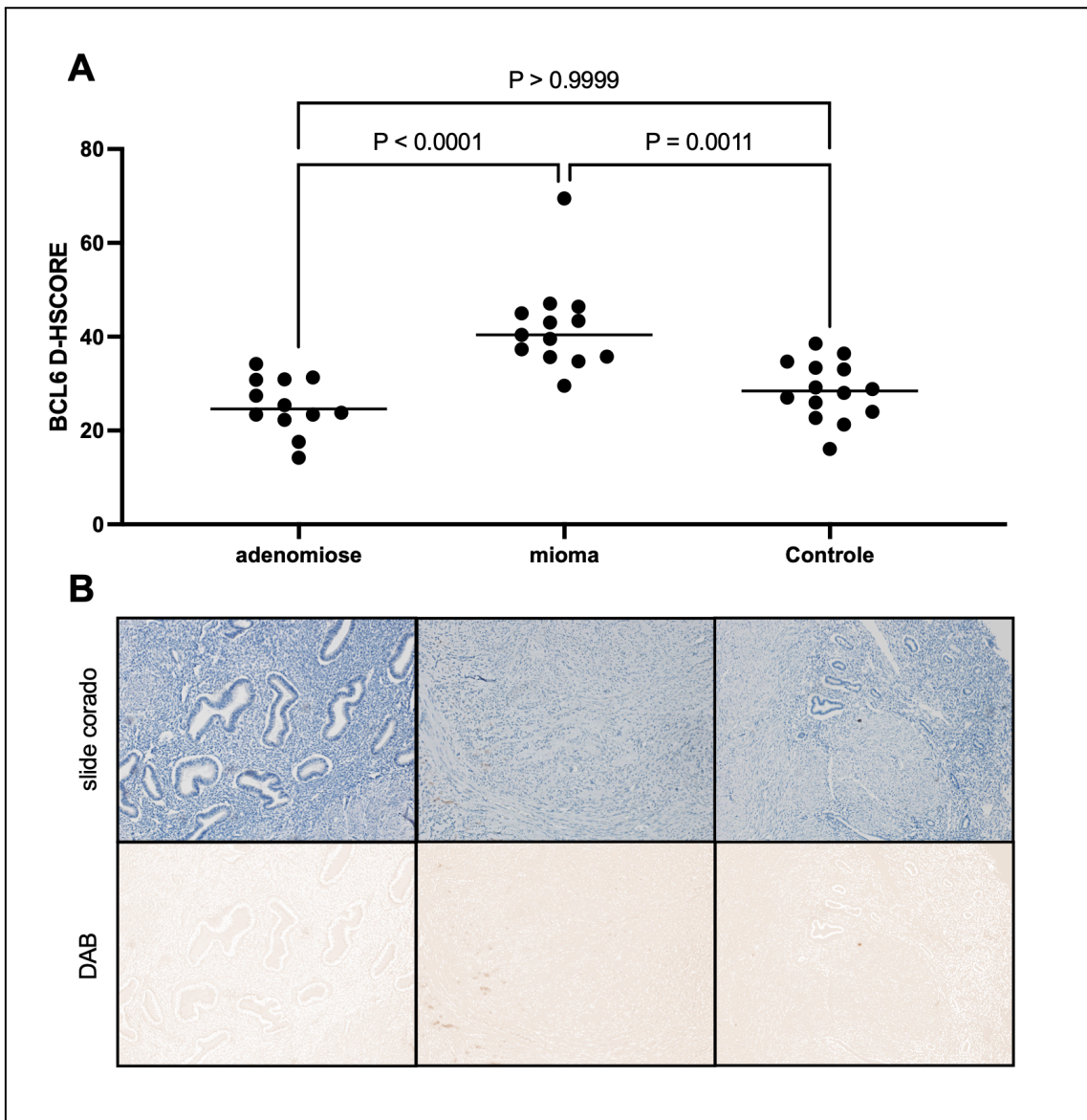


Figura 1. A) Gráfico do tipo dot-plot demonstrando a expressão de BCL6 de acordo com o D-HSCORE. As barras representam a mediana. As comparações entre os grupos é pelo teste de Dunn. B) Fotomicrografias representativas dos grupos estudados. Repare a fraca expressão do BCL6 com o 3,3'-diaminobenzidina tetrahydroclorato (DAB) no slide corado. Após a deconvolução das cores, identifica-se a coloração do DAB em toda a área do slide (Linha DAB); contudo as áreas com glândulas têm uma expressão muito reduzida.

## **DISCUSSÃO:**

Neste estudo não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a expressão de BCL6 nas glândulas dos casos com adenomiose e nos controles. No entanto, este achado tem baixo poder (25,6%), afinal o ideal seria um n de 174 (87 em cada grupo) para se ter um poder de 90%, com uma diferença de 5 pontos).

Além disso, este estudo evidenciou que a expressão do BCL6 no tecido miomatoso é diferente do tecido glandular analisado nos grupos adenomiose e controle, provavelmente pelo processo proliferativo associado ao BCL-6., o que está de acordo com BCL-2 (Hiroya Matsuo et al, 1997). Entretanto, importante ressaltar que o tecido analisado no grupo mioma é diferente do tecido glandular da adenomiose e da glândula, o que pode ter contribuído para o achado destas diferenças.

Outro contraponto importante é o fato de não ter sido realizada a confirmação dos resultados, seja com técnica de RT-PCR ou mecanística. Porém, ao mesmo tempo, foi utilizada técnica padronizada para análise das lâminas com sistema Roche automatizado, além de metodologia com baixo viés para análise (D-HSCORE) o que diminui a chance de viés relacionado ao observador.

Diante disso, Imagens com DAB+Hematoxilina e as somente com DAB poderiam ser analisados por aprendizado de máquinas com redes neurais convolucionais.

## **CONCLUSÃO:**

Mais estudos são necessários para elucidar o papel da expressão do BCL6 na patogênese da adenomiose e miomatose. Novos estudos com tamanho amostral mais adequado e com análise da expressão dessa proteína em amostra do mesmo tecido (estroma) tanto das pacientes com adenomiose

quanto miomatose podem ser úteis para minimizar eventuais viéses de amostragem e de aferição que podem ter interferido no resultado deste estudo.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Baranov VS, Osinovskaya NS, Yarmolinskaya MI. Pathogenomics of Uterine Fibroids Development. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 6;20(24):6151

Palheta MS, Medeiros FC, Severiano ARG. Reporting of uterine fibroids on ultrasound examinations: an illustrated report template focused on surgical planning. *Radiol Bras.* 2023 Mar/Abr;56(2):86–94

Travaglino A, Raffone A, Santoro A, Raimondo D, Improda FP, Cariati F, De Marco M, Casadio P, Seracchioli R, Zullo F, Insabato L, Zannoni GF. Risk of Recurrence in Uterine Leiomyoma with Bizarre Nuclei: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2021 Nov 4;81(11):1217-1223.

Bird CC, McElin TW, Manalo-Estrella P. The elusive adenomyosis of the uterus--revisited. *Am J Obstet Gynecol.* 1972 Mar;112(5):583-93

Yu O, Schulze-Rath R, Grafton J, Hansen K, Scholes D, Reed SD. Adenomyosis incidence, prevalence and treatment: United States population-based study 2006-2015. *Am J Obstet Gynecol.* 2020 Jul;223(1):94.e1-94.e10

Antero MF, Ayhan A, Segars J, Shih IM. Pathology and Pathogenesis of Adenomyosis. *Semin Reprod Med.* 2020 May;38(2-03):108-118

Bruun MR, Arendt LH, Forman A, Ramlau-Hansen CH. Endometriosis and adenomyosis are associated with increased risk of preterm delivery and a



small-for-gestational-age child: a systematic review and meta-analysis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2018;97:1073–1090

Harada T, Taniguchi F, Amano H, Kurozawa Y, Ideno Y, Hayashi K, Harada T; Japan Environment and Children's Study Group. Adverse obstetrical outcomes for women with endometriosis and adenomyosis: A large cohort of the Japan Environment and Children's Study. *PLoS One.* 2019 Aug 2;14(8):e0220256.

Benagiano G, Brosens I. History of adenomyosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2006 Aug;20(4):449-63. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2006.01.007. Epub 2006 Mar 2.

Ferenczy A. Pathophysiology of adenomyosis. *Hum Reprod Update.* 1998 Jul-Aug;4(4):312-22.

Kapoor R, Stratopoulou CA, Dolmans MM. Pathogenesis of Endometriosis: New Insights into Prospective Therapies. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 28;22(21):11700

García-Solares J, Donnez J, Donnez O, Dolmans MM. Pathogenesis of uterine adenomyosis: invagination or metaplasia? *Fertil Steril.* 2018 Mar;109(3):371-379

Bulun SE, Yildiz S, Adli M, Wei JJ. Adenomyosis pathogenesis: insights from next-generation sequencing. *Hum Reprod Update.* 2021 Oct 18;27(6):1086-1097. doi: 10.1093/humupd/dmab017

Inoue S, Hirota Y, Ueno T, Fukui Y, Yoshida E, Hayashi T, Kojima S, Takeyama R, Hashimoto T, Kiyono T, Ikemura M, Taguchi A, Tanaka T, Tanaka Y, Sakata

S, Takeuchi K, Muraoka A, Osuka S, Saito T, Oda K, Osuga Y, Terao Y, Kawazu M, Mano H. Uterine adenomyosis is an oligoclonal disorder associated with KRAS mutations. *Nat Commun.* 2019 Dec 19;10(1):5785

Maruyama S, Imanaka S, Nagayasu M, Kimura M, Kobayashi H. Relationship between adenomyosis and endometriosis; Different phenotypes of a single disease? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2020 Oct;253:191-197

Grechukhina O, Petracco R, Popkhadze S, Massasa E, Paranjape T, Chan E, Flores I, Weidhaas JB, Taylor HS. A polymorphism in a let-7 microRNA binding site of KRAS in women with endometriosis. *EMBO Mol Med.* 2012 Mar;4(3):206-17

Yoo, JY., Kim, T.H., Fazleabas, A.T. et al. KRAS Activation and over-expression of SIRT1/BCL6 Contributes to the Pathogenesis of Endometriosis and Progesterone Resistance. *Sci Rep* 7, 6765 (2017)

Basso K, Dalla-Favera R. Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunol Rev.* 2012 May;247(1):172-83

Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature.* 2004 Dec 2;432(7017):635-9

Evans-Hoeker E, Lessey BA, Jeong JW, Savaris RF, Palomino WA, Yuan L, Schammel DP, Young SL. Endometrial BCL6 Overexpression in Eutopic Endometrium of Women With Endometriosis. *Reprod Sci.* 2016 Sep;23(9):1234-41

Grimes DA, Schulz KF. An overview of clinical research: the lay of the land.

Lancet. 2002 Jan 5;359(9300):57-61.

Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*. 2001 Aug;23(4):291-9

Fuhrich DG, Lessey BA, Savaris RF. Comparison of HSCORE assessment of endometrial beta3 integrin subunit expression with digital HSCORE using computerized image analysis (ImageJ). *Anal Quant Cytopathol Histopathol*. 2013 Aug;35(4):210-6

Hiroya Matsuo, Takeshi Maruo, Takashi Samoto, Increased Expression of Bcl-2 Protein in Human Uterine Leiomyoma and Its Up-Regulation by Progesterone, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 82, Issue 1, 1 January 1997, Pages 293–299