

11204

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

6



INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

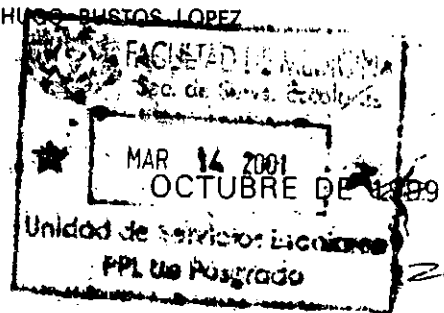
EXPRESION DE LOS ONCOGENES (c-myc-neu) Y EL RECEPTOR DE PROLACTINA (PRLr) EN TEJIDO DE MUJERES CON ENDOMETRIOSIS

290367

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
SUBESPECIALISTA EN:
BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION HUMANA
P R E S E N T A :
DR. JOSE MANUEL ZAMARRIPA LEYVA

TUTORES: DR. EN C. JULIETA IVONE CASTRO ROMERO
DR. HECTOR HUGO BUSTOS LOPEZ

MEXICO, D. F.,



2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por permitirme llegar hasta estos momentos, por la fé y esperanza que en mi ha sembrado, por lo generoso que ha sido conmigo.

A MIS PADRE:

Por enseñarme la perseverancia, por su apoyo, por siempre darme su ejemplo de fortaleza y sobre todo por su amor, gracias.

A TI JULIANA:

Por tu apoyo, por tus desvelos, por tu amor, por tu comprensión y por ser parte de mi corazón, gracias.

JEAN:

Especialmente dedico este humilde esfuerzo a ti, por ser mi ilusión, ser mi propio corazón y el brillo de mis ojos.

DR HUGO BUSTOS:

Por su entusiasmo, por sus enseñanzas y por el estímulo que da a su grupo de trabajo para perseverar.

DRA IVONE CASTRO:

Por su apoyo, paciencia, por su tiempo y sobre todo por enseñarme a comprender las pequeñas cosas que impactan grandemente en el ámbito científico.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
JUSTIFICACION	7
HIPOTESIS	8
OBJETIVO	9
MATERIAL Y METODOS	10
ANALISIS ESTADISTICO	13
RESULTADOS	14
DISCUSION	22
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFIA	27

**EXPRESIÓN DE LOS ONCOGENES (c-myc, neu) Y EL
RECEPTOR DE PROLACTINA (PRLr) EN TEJIDOS DE MUJERES
CON ENDOMETRIOSIS**

Zamarripa M¹, Bermejo L², Bustos H¹ y Castro I²
Departamento de Esterilidad¹ y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular².
Instituto Nacional de Perinatología

RESUMEN

La endometriosis es una enfermedad cuya etiología no se conoce y sobre la cual existen diferentes teorías que hasta la fecha no han sido totalmente demostradas. Está claramente demostrado que algunas de las mujeres que presentan dicha enfermedad cursan con infertilidad y que la recurrencia de aparición de los focos endometriósicos es alto y al parecer no dependientes del estímulo estrogénico. Este fenómeno se ha atribuido a factores de crecimiento y algunos oncogenes los cuales son expresados para contrarrestar la falta del estímulo estrogénico. Sin embargo pocos estudios existen en relación a los oncogenes u otros receptores hormonales por lo que el presente trabajo tuvo por objetivo el evaluar su expresión tanto en tejido eutópico como en ectópico de mujeres con diagnóstico previo de endometriosis. El análisis de la expresión tanto de c-myc, neu y el receptor de prolactina (PRLr) se realizó por la técnica de RT-PCR. Nuestros resultados demuestran que tanto c-myc como el PRLr se expresan de manera distinta entre los diferentes tejidos en tanto que

neu se expresa de la misma manera entre los dos tejidos. Con estos datos concluimos que las células que conforman el foco endometriósico presentan un estado diferencial en relación a la expresión de algunos de sus genes lo cual favorece el desarrollo y mantenimiento de los mismos en un ambiente hormonal diferente al de la cavidad uterina.

INTRODUCCIÓN

La endometriosis es una enfermedad que clásicamente se define como la presencia de glándulas y estroma proveniente del endometrio fuera de la cavidad uterina la cual esta altamente relacionada con esterilidad en la mujer que la padece. El origen de esta patología se puede resumir en cuatro teorías: La del reflujo mecánico de células del endometrio hacia los ovarios^(9,10) y el peritoneo en cada ciclo menstrual , la teoría inmunológica^(11,12) que señala que las mujeres predispuestas a desarrollar endometriosis presentan un estado inmunológico optimo para que las células se desarrollen en un ambiente diferente al útero. Además, existe la teoría de metaplasia célomica⁽¹³⁾ y la vía hemato-linfática, que explican el desarrollo de implantes distantes al área del útero. Sin embargo hasta la fecha ninguna de estas teorías han sido del todo demostradas y aún falta mucho por estudiar.

Por otro lado es bien aceptado que la presencia de estradiol circulante es un factor muy importante para el desarrollo de los focos endometriósicos, así como para su mantenimiento ya que la disminución de éste por medio de medicamentos ó mediante la castración trae como consecuencia la desaparición de los mismos⁽⁶⁾; sin embargo el porcentaje de recurrencia de la

enfermedad es cercano al 40%. (Waller K, 1993) Esto implica que no sólo el estradiol regula la proliferación de estas células, sino que tal vez existen otros mecanismos moleculares responsables de la proliferación y mantenimiento de estos focos endometriósicos. Con relación a este punto se ha venido proponiendo al “factor de crecimiento epidérmico” (EGF) y algunos oncogenes dependientes de estrógenos como el c-myc, c-jun, c-fos (Weiz A, 1988; 1990) como factores inductores de la proliferación de las células cuya expresión pudiera darse aún en ausencia de estradiol^(4,5). Se ha visto por ejemplo que existen diferencias entre la expresión de EGF y su receptor (EGFr) en tejido normal y endometriósico^(2,3), demostrándose una alta expresión principalmente en el tejido endometriósico en el cual las concentraciones de receptores de estrógenos son bajas ó nulas (Prentice A, 1992; Mellor, 1994). Recientes estudios han demostrado que una gran cantidad de células de vertebrados cuentan con numerosos genes que codifican para proteínas que son involucradas en la regulación celular y diferenciación. Estos genes son llamados protooncogenes por la gran similitud a los oncogenes virales que se presentan en el genoma de muchas células tumorales e inducen un crecimiento celular no controlado. Algunos de ellos se han sugerido como participantes activos en el crecimiento y diferenciación tanto

del tejido endometrial normal como el endometriósico. En el caso del oncogene c-myc se han realizado pocos estudios y aún no existe un consenso general de si este oncogene es realmente relevante para el desarrollo de la endometriosis, ya que algunos autores señalan diferencias entre el tejido sano y el endometriósico y otros no han encontrado diferencias significativas (Shenken RS, 1991). Por otro lado no existe información en la literatura relacionada con el papel de la prolactina y su receptor en la génesis y mantenimiento de la endometriosis y únicamente existen reportes en animales con adenomiosis en donde se ha encontrado por medio de técnicas de hibridación in situ y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que la expresión del receptor de prolactina es mayor en el tejido con adenomiosis uterina^(7,8), lo cual implica que posiblemente este receptor este involucrado en el desarrollo de este tipo de patologías (Yamasita, 1997; 1999).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe una gran controversia en la literatura con respecto a la etiología de la endometriosis donde desafortunadamente no ha sido posible cumplir las expectativas con respecto a las diferentes regiones donde se puede presentar esta entidad. A pesar de la existencia de datos que apoyan la influencia de esteroides en el proceso de mantenimiento de focos endometriósicos, existe poca información relacionada a los mecanismos moleculares involucrados en la acción de los esteroides en esta patología. Sin embargo estudios realizados en primates y mamíferos expuestos a niveles elevados de estrógenos han confirmado la importancia de estos en la genesis de la endometriosis. En los últimos años se ha descrito que existe un umbral mínimo de inducción del tejido ectópico, lo que hecho que una gran cantidad de manejos médicos consistentes en estados hipoestrogénicos hayan surgido.

El interés de investigar factores diferentes (oncogenes y receptor de prolactina) al estado estrogénico como el proceso que perpetúa la endometriosis ha surgido a propósito de las diferentes respuestas terapéuticas observadas por medio de laparoscopia en pacientes sometidas a estados hipoestrogenicos.

JUSTIFICACION

La endometriosis es una entidad clínica frecuente en pacientes infértiles que puede encontrarse hasta en un 33% de dichas pacientes y que frecuentemente origina un estado inflamatorio cicatrizal que conlleva a alteraciones anatómicas y funcionales. La importancia del proyecto radica en poder ofrecer un mejor pronóstico a las pacientes que solicitan ayuda médica. Dado que poco se sabe sobre la evolución que tendrá esta patología nosotros pretendemos conocer su comportamiento biológico y de ser posible contar con un marcador pronóstico (protooncogenes y receptor de prolactina).

HIPOTESIS

Hipótesis alterna

Hay una diferente expresión en los diferentes estadios de endometriosis de los oncogenes c-myc,neu y receptor de prolactina.

Hipótesis nula

Son igualmente expresados los oncogenes c-myc,neu y receptor de prolactina independientemente del grado de endometriosis.

OBJETIVO

Demostrar si existen diferencias en la expresión cualitativa de los protooncogenes neu y myc y el receptor de prolactina, dependiendo del grado de endometriosis, el sitio de localización del foco endometriósico, así como entre el tejido endometriósico y el aparentemente normal desde el punto de vista macroscópico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio se incluyeron 20 mujeres a las cuales técnicamente fue posible tomarles una muestra de tejido endometriósico previo consentimiento de las mismas. A cada una de las pacientes se les aplicó un cuestionario que incluía información general, antecedentes, motivo de consulta, duración del padecimiento, diagnóstico previo de endometriosis , tratamiento previo para endometriosis. Además se anotaron los hallazgos encontrados en la histerosalpingografía y en el tiempo postoperatorio.

Todas las muestras de tejido fueron colectadas durante la laparoscopia ó laparotomía y clasificados de acuerdo a los criterios de la American Fertility Association (AFA). Los especímenes fueron congelados inmediatamente después de la toma de la muestra. Sólo en algunos casos fue posible tomar tejido aparentemente sano de la misma paciente. El diagnóstico macroscópico de estas muestras fue hecho por el cirujano que realizó la toma del tejido.

Una vez obtenidas todas las muestras se procedió a clasificarlas por grupos de acuerdo al sitio de la toma de la biopsia (ver tabla I).

Tabla I. Clasificación de la muestra total por grupos.

GRUPO	SITIO DE LA TOMA DE TEJIDO
(Casos)	
I	Ovario derecho ó izquierdo
II	Fondo de saco anterior ó posterior, cuerpo, uterosacro
(Controles)	
III	Ovario, Fondo de saco anterior y posterior, cuerpo
IV	Ovario

Todas las muestras fueron descongeladas en hielo y se procedió a realizar la extracción del RNA total por medio de la técnica de extracción con tiocianato de guanidina utilizando para ella el reactivo comercial Tripure (Laboratorios LakeSide). Posteriormente se procedió a la realización del RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para los oncogenes c-myc, neu y para el receptor de prolactina humano. La secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la figura 1.

Fig. 1 Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para el RT-PCR

c- myc	Up	5' GCA ACC CTT GCC GCA TCC ACG AAAC 3'
	Down	5' CTG TGG CCT CCA GCA GAA GGT GATC 3'
neu	Up	5' TGG CTC GGC TGC TGG ACA TTG AC 3'
	Down	5' GAA GCC CTG CTG GGG TAC CAG ATA C 3'
*PRLr	Up	5' GTC TGG GCA GTG GTC TTG AAG GGC 3'
	Down	5' CAC TTG CTT GAT GTT GCA GTG AAG TTG 3'

* Boutin JM, Mol Endocrinol 3:1455, 1989

La síntesis del cDNA se realizó utilizando la SuperScript™ RNase H-Reverse Transcriptase (GibcoBRL, Life Technologies). La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: el RNA se desnaturalizó a 90°C, 5'; posteriormente se dejó en hielo por 5'. La reacción de síntesis se realizó durante 1 hora a 42°C. La RT se inactivo durante 5'a 95°C y se incubó en hielo 5'. La amplificación de los fragmentos obtenidos se hizo mediante PCR utilizando el GeneAmp® PCR reagent Kit con AmpliTaq® DNA polymerase (Perkin Elmer). Los ciclos utilizados para este paso fueron los siguientes:

ONCOGENES.RECEPTOR DE PROLACTINA Y ENDOMETRIOSIS

1 ciclo : 5', 94°C (hot start y adición de la mezcla de reacción)
 2', 94°C
 1', 65°C
 1.5', 72°C

35 ciclos 30'', 94°C
 1', 65°C
 1.5', 72°C

1 ciclo: 30'', 94°C
 1', 65°C
 7', 72 °C
 hielo

Posteriormente los fragmentos se separaron en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio, durante una hora. Las bandas se visualizaron con un transiluminador de UV.

ANALISIS ESTADISTICO

La diferencia en porcentaje de expresión de los oncogenes y el receptor de prolactina entre los diferentes grupos se hizo mediante la prueba de Chi-cuadrada considerando una $\alpha=0.05$

RESULTADOS

El total de pacientes incluidas en el estudio fueron 20, con un rango de edad de 25-45 años, con una media de 32.5. De éstas mujeres se obtuvieron 20 muestras de tejido endometriósico(casos) y 12 aparentemente sano desde el punto de vista laparoscopico (controles). El Grupo I quedó constituido de 11 muestras de endometriosis ovárica con un rango de puntaje de AFA de (150-16) con una media de 86 . El grupo II está formado con las muestras de endometriosis extraovárica (n= 9) cuyo rango de puntaje AFA fue de (6-2) y una media de 3.5. El puntaje asignado a las pacientes de las cuales fue posible tomar muestra aparentemente sanas (n=12) tuvo un rango de (150-2) con una media de 72.4 (grupo III). Cuando únicamente se consideró a los controles de ovario para fines del análisis el rango de este grupo (IV) fue de (130-80) con una media de 99. (Ver Tabla 1).

En la figura 2 se muestra una fotografía representativa de las bandas obtenidas por medio de la técnica de RT-PCR en donde podemos observar que no en todos los casos se pudo visualizar dichas bandas. Así mismo se puede ver que

a pesar de que se utilizó la misma concentración de RNA (1 ug) en todos los ensayos, la expresión no fue siempre la misma entre una muestra y otra, lo cual hace suponer que la expresión de estos oncogenes ó del PRLr varía entre una muestra y otra. El tamaño de las bandas en cada caso se puede ver en el pie de la figura.

Los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de los oncogenes y receptor de prolactina se ilustran en las tablas II,III,IV,V y se encuentran expresados como positivo (presencia de banda) ó negativo (ausencia de la banda). Las diferencias entre porcentajes de expresión positiva entre los grupos I-IV para los oncogenes c-myc, neu y el receptor de prolactina se puede ver en la tabla VI.

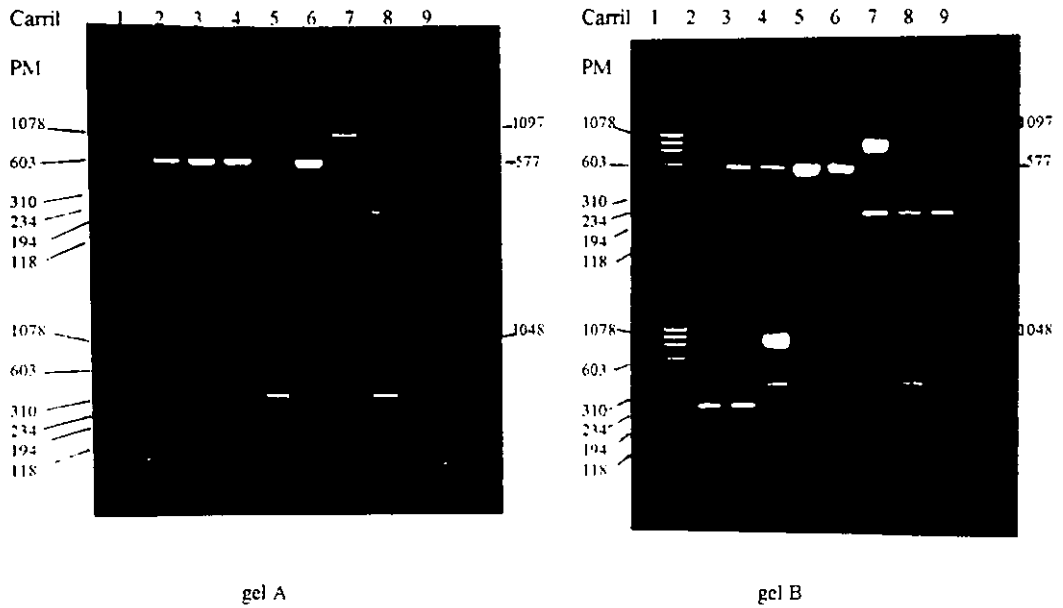


Fig. 2. Geles representavos (agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio), en los que se observa el patron de cornuiento de las bandas amplificadas con la técnica de RT-PCR, de los oncogenes c-Myc (banda de 1097 pb), neu (banda de 577 pb) y PRLr (banda de 1048 pb). Geles A y B parte superior: pesos moleculares (carril 1); neu (carriles 2-6); c-Myc (carriles 7-9). Geles A y B parte inferior: pesos moleculares (carril 1); c-Myc (carriles 2-3); PRLr (carriles 4-8). Cada par de geles representa la amplificación en una misma corrida de los tres genes a partir del RNA de 5 pacientes

Grupo I

No.	AFA	PRLr	neu	myc	Tx
1	150	-	+	-	-
4	88	+	+	-	-
5	80	-	+	-	-
6	114	-	+	+	-
7	80	-	+	+	-
8	120	-	-	-	+
12	62	-	+	-	-
13	130	-	+	-	-
14	16	+	-	-	+
15	85	-	+	-	-
20	21	-	+	-	-

Tabla II. No. asignado a cada paciente, AFS: Puntaje asignado de acuerdo a grado de endometriosis; neu: oncogen expresado como positivo(+) o (-); myc : Oncogen myc asignado como (+) o (-). .PRLr :Receptor de prolactina . recibió tratamiento previo(+) o no (-).

Grupo II

No.	AFA	PRLr	neu	myc	Tx
2	4	-	+	-	-
3	6	+	+	-	-
9	2	+	+	-	-
10	4	-	-	-	-
11	2	-	+	-	+
16	4	-	+	-	+
17	4	-	+	-	+
18	2	-	+	-	-
19	4	-	+	-	-

Tabla III. No. asignado a cada paciente, AFS: Puntaje asignado de acuerdo a grado de endometriosis; neu: oncogen neu expresado como positivo(+) o (-); myc : Oncogen myc asignado como (+) o (-). PRLr :Receptor de prolactina . Tx:recibió tratamiento previo(+) o no (-).

Grupo III

No.	AFA	PRLr	neu	myc
1	150	+	+	-
3	6	+	+	+
4	88	+	+	-
5	80	-	+	-
6	114	-	+	-
7	80	-	+	+
8	120	+	+	+
9	2	+	+	-
11	2	-	-	-
13	130	+	+	-
15	85	+	-	+
17	4	-	+	-

a IV. No. asignado a cada paciente, AFS: Puntaje asignado de acuerdo a grado de endometriosis; neu: gen neu expresado como positivo(+) o (-); myc : Oncogen myc asignado como (+) o (-). .PRLr :Receptor de prolactina . Tx:recibió tratamiento previo(+) o no (-).

ÉSTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Grupo IV

No.	AFS	PRLr	neu	myc	Tx
4	88	+	+	-	-
5	80	-	+	-	-
6	114	-	+	-	-
7	80	-	+	+	-
8	120	+	+	+	+
13	130	+	+	-	-
15	85	+	-	+	-

V. No. asignado a cada paciente, AFS: Puntaje asignado de acuerdo a grado de endometriosis; neu: oncogen expresado como positivo(+) o (-); myc : Oncogen myc asignado como (+) o (-). PRLr :Receptor de prolactina . recibió tratamiento previo(+) o no (-).

Tabla VI. PORCENTAJE DE EXPRESION POSITIVA DE LOS ONCOGENES (c-myc, neu) Y EL RECEPTOR DE PROLACTINA (PRLr)

Grupo	PRLr	neu	c- myc
I	18.8	81.8	18.2
II	22.2	88.8	0.0
III	58.3	83.3	33.3
IV	57.0	85.0	42.0

$\chi^2 = 59.61$ $\chi^2 = 2.2$ $\chi^2 = 56.87$
 $p < 0.0001$ $p > 0.52$ $p < 0.0001$

DISCUSIÓN

Una de las áreas poco comprendidas hasta la actualidad en la ginecología es la endometriosis. Se conoce claramente que esta entidad interfiere con la fertilidad no sólo desde el punto de vista mecánico, sino también bioquímico, hormonal e inmunológico. Hay experimentos clásicos en donde estimula la aparición de endometriosis acentuando la menstruación retrograda, y el estado hiperestrogénico. Estos estudios sugieren que los estrógenos sirven como estímulo primario para la formación del tejido endometriósico, posiblemente mediado por algunos factores protéicos a nivel molecular. Sin embargo la regulación del desarrollo, crecimiento y diferenciación de esta entidad clinico-patológica es pobremente entendida.

Una serie de estudios han mostrado que la respuesta del tejido con endometriosis a los estrógenos se manifiesta de manera heterogénea y raramente hay un ordenamiento morfológico de los implantes de manera cíclica como lo que ocurre en tejido eutópico .

Así mismo se ha demostrado que la expresión del receptor a estrógenos en el tejido endometriósico no se presenta de manera homogénea en todos los

sujetos lo que obliga a pensar que existen otros mecanismos adicionales que influyen en la etiología de esta patología (Agneta E, 1993). Desde hace mucho tiempo se conoce que las células contienen genes que codifican para proteínas necesarias para su regulación proliferativa y de diferenciación. Estos genes son llamados protooncogenes por la gran similitud a los oncogenes virales que se presentan en el genoma de muchas células tumorales e inducen un crecimiento celular en forma no controlada. Algunos de estos oncogenes son altamente dependientes del estímulo estrogénico, el cual induce la activación de los genes que los codifican; tal es el caso de los oncogenes c-myc y neu. En el endometrio esta claramente demostrado la expresión de estos dos oncogenes y su dependencia por los estrógenos;sin embargo en el caso de la endometriosis existe poca ó nula información. En el presente trabajo pudimos demostrar lo siguiente:

a) En relación a los oncogenes neu y myc observamos que el porcentaje de expresión de neu en los diferentes grupos no muestra una diferencia significativa lo que nos sugiere que este oncogene aparentemente no tiene relación con la proliferación y diferenciación de las células; sin embargo no se puede descartar la posibilidad de que la expresión en el tejido aparentemente sano sea igual a la del tejido endometriósico debido a que la manifestación se este dando a nivel bioquímico y no se observe cambios a nivel macroscópico.

Desafortunadamente no se realizó el análisis anatomopatológico que pudiera explicar esta observación. Además no es posible asegurar que estos cambios bioquímicos no preceden aún a los cambios histológicos.

b) En forma contraria la expresión del oncogene myc si parece ser un factor importante en endometriosis manifestada macroscópicamente , ya que como se observó en la tabla VI, el porcentaje de tejidos que expresan el oncogene myc es mayor en el grupo control (III y IV) cuando se compara con grupos I y II (casos). Estos resultados sugieren que las células que conforman el foco endometriósico pierden la capacidad de expresión de este oncogene al momento de desarrollarse en un ambiente hormonal diferente al encontrado en cavidad uterina. Estos resultados son contrarios a lo reportado por Schenken,1991 quien utilizando métodos de localización inmunocitoquímica encontró la expresión de la proteína c myc en las células glandulares y del estroma, tanto en el tejido ectópico como eutópico. Aparte de este autor ,no existen otros datos reportados en la literatura por lo que consideramos que sería importante el profundizar en el estudio de este oncogene.

c) Este mismo comportamiento se demostró para el receptor de prolactina ya que se observó un porcentaje considerablemente mayor de biopsias con la expresión positiva del receptor en el tejido eutópico que en el endometriósico. Esto hace pensar que tal vez este receptor pudiera estar involucrado en el proceso de diferenciación de las células ,por lo que sería interesante el estudiar el mecanismo molecular de la prolactina y su receptor sobre este tipo de patología. Actualmente no existen estudios en esta área;sin embargo se ha visto que el receptor de prolactina se encuentra incrementado en el útero del ratón con adenomiosis (Yamashita M, 1997) lo cual eleva la posibilidad de que este receptor pudiera jugar un papel importante en la fisiopatología de la endometriosis.

CONCLUSIONES

Con estos resultados podemos concluir que tanto el oncogene myc como el receptor de prolactina se expresan en forma diferente entre el tejido endometriósico y el eutópico; no así el oncogene neu el cual se expresa de manera similar entre ambos. Este hallazgo abre la posibilidad de que esta patología se encuentre regulada por diferentes factores, además del estímulo estrogénico, entre los que se encuentra la prolactina. Por lo cual será de gran importancia el conocer si estos tejidos tienen la capacidad de responder al estímulo con la propia prolactina y si dicha respuesta está relacionada con el incremento ó decremento de la proliferación de las células endometriósicas. Consideramos que el conocimiento actual de estos mecanismos es muy pobre y que será necesario la realización de más estudios para contestar esta pregunta.

BIBLIOGRAFÍA

1.-**Agneta E & Marten F.** Estrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium: comparison according to localization and recurrence. *Fertil Steril* 1993; 60(1):63-68

2.-**Mellor SJ & Thomas EJ.** The action of estradiol and epidermal growth factor in endometrial and endometriotic stroma in vitro. *Fertil Steril* 1994; 62(3):507-13

3.-**Prentice A, Thomas EJ, Weddwill A, Mc Gill A, Randal BJ, Horne CHW.** Epidermal growth factor receptor expression in normal endometrium and endometriosis: an immunohistochemical study. *Br J Obst Gynecol* 1992; 99:395-8

4.-**Schenken RS, Johnson JV, Riehl R.** C-myc protooncogene polypeptide expression in endometriosis. *Am j Obstet Gynecol* 1991; 164:1031-7.

5.-**Weisz A, Bresciani F.** Estrogen induces expression of c-fos and c-myc protooncogenes in rat uterus. *Mol Endocrinol* 1988; 2: 816-24

6.-**Waller KG, Shaw RW.** Gonadotropin-releasing hormone analogues for the treatment of endometriosis: long-term follow-up. *Fertil Steril* 1993; 59:51-15

7.-**Yamashita M, Matsuda M, Mori T .** Increased expression of prolactin receptor mRNA in adenomyotic uterus in mice. *Life Sci* 1997; 60(17): 1437-4

8.-Yamashita M, Matsuda M, Mori T. In situ detection of prolactin receptor mRNA and apoptotic cell death in mouse uterine tissues with adenomyosis. In *Vivo* **1999**; 13(1):57-60

9.-Sampson J.A.Perforating hemorrhagic (chocolate) cyst of the ovary..Arch of Surg **1921**;3:245

10.-Sampson J.A.Peritoneal endometriosis due to dissemination of endometrial tissues into the peritoneal cavity.Am J Obstet Gyencol **1927**;14:422

11.-Dmowski W.P,Steele R.W.,Baker GF.Deficient celular immunity in endometriosis.Am J Obstet Gynecol **1981**;141-317

12.-Steel R.W,Dmowski W.P,Marmer DJ.Immunology aspect of human endometriosis.Am J Reprod inmunol.**1984**;6:33

13.-Meyer R.Metaplasia theory with inflammation as a primary inducing factor.Bergmann.**1930**