

Los niveles de receptores de progesterona se encuentran disminuidos en las zonas invasivas de los nódulos recto-vaginales de endometriosis

Daniel Patiño-García^{1,a}, Omar Silva^{2,c}, Angélica Rojas^{3,d}, Camila Meza^{4,d}, Cristián Pomés⁵, Claudia Celle⁵, Manuel E. Cortés^{6,a}, Verónica Torres-Estay^{7,b}, Renán Orellana^{1,8,a*}.

The Levels of Progesterone Receptors are Decreased in the Invasive Areas of the Recto-Vaginal Nodules of Endometriosis

RESUMEN

La endometriosis es una enfermedad crónica caracterizada por el crecimiento de endometrio fuera de la cavidad uterina. Este tejido, en respuesta al estradiol, comienza a proliferar y crecer formando lesiones y nódulos, las que pueden invadir los tejidos generando dolor pélvico e infertilidad. Su tratamiento farmacológico más utilizado es la progesterona, la cual logra reducir los síntomas, pero aproximadamente un tercio de las pacientes desarrolla resistencia al tratamiento.

Objetivo: Determinar los niveles de expresión de los receptores de progesterona (RP) en biopsias de nódulos recto-vaginales, considerando regiones centrales e invasivas de las lesiones. **Materiales y métodos:** Se utilizaron biopsias de 16 pacientes diagnosticadas con endometriosis profunda, se seleccionaron fragmentos del centro del nódulo y de la zona invasiva. Se prepararon cortes histológicos y tinción inmunohistoquímica para RP, KI67 y E-Cadherina (ECad), los cuales fueron cuantificados por análisis de imágenes. **Resultados:** Las glándulas del centro (zona menos invasiva) en comparación con el frente (zona invasiva) poseen significativamente menor nivel de mitosis (KI67 $0,486 \pm 0,014$ vs. $0,026$ núcleos+/núcleos totales), mayor grosor ($13,430 \pm 0,169$ vs. $6,160 \pm 0,166$ μm), mayor nivel de expresión de ECad ($0,525 \pm 0,048$ vs. $0,338 \pm 0,063$), y mayor expresión de RP (estroma $0,382 \pm 0,267$ vs. $0,165 \pm 0,191$ y epitelio $0,728 \pm 0,043$ vs. $0,386 \pm 0,063$). **Conclusión:** Las glándulas poseen características moleculares y morfológicas distintas según la zona de la lesión. Las zonas invasivas son más proliferativas y expresan menos RP. Sin embargo,

¹Departamento de Ciencias Químicas y Biológicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Bernardo O'Higgins. Santiago, Chile.

²Facultad de Medicina Veterinaria y Agronomía Universidad de las Américas. Santiago, Chile.

³Escuela de Obstetricia y Puericultura, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Bernardo O'Higgins. Santiago, Chile.

⁴Escuela de Obstetricia y Puericultura, Universidad de los Andes. Santiago, Chile.

⁵División de Ginecología, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

⁶Departamento de Ciencias Humanas, Universidad Bernardo O'Higgins. Santiago, Chile.

⁷Escuela Química y Farmacia, Facultad de Medicina y Ciencia, Universidad San Sebastián. Santiago, Chile.

⁸Facultad de Ciencias de la Salud, Centro Integrativo de Biología y Química Aplicada, Universidad Bernardo O'Higgins. Santiago, Chile.

^aBiólogo, PhD.

^bBioquímica, PhD.

^cBiólogo, MSc.

^dMatrona.

*Correspondencia: Renán Orellana / rorellanaw@gmail.com
General Gana 1702. Santiago, Chile.

Financiamiento: Trabajo financiado por el Fondo Nacional para el Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT), proyectos N° 11170603 a R.O y N° 3200591 a D.P.-G.

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Recibido: 09 de abril de 2024.

Aceptado: 05 de septiembre de 2024.

nuevos estudios se requieren para determinar si estas diferencias se traducen en la capacidad de responder al tratamiento de P4.

Palabras clave: Endometriosis; Estradiol; Receptores de Progesterona.

ABSTRACT

*Endometriosis is a chronic disease characterized by the growth of the endometrium outside the uterine cavity. In response to estradiol, this tissue begins to proliferate and grow, forming lesions and nodules, which can invade the tissues, causing pelvic pain and infertility. The most widely used pharmacological treatment is progesterone, which manages to reduce symptoms, but approximately one-third of patients develop resistance to treatment. **Aim:** To determine the expression levels of progesterone receptors in biopsies of recto-vaginal nodules, considering central and invasive regions of the lesions. **Materials and methods:** Biopsies from 16 patients diagnosed with deep endometriosis were used, and fragments from the center of the nodule and the invasive area were selected. Histological sections and immunohistochemical staining for progesterone receptors, KI67 and E-Cadherin (ECad) were prepared and quantified by image analysis. **Results:** The glands in the center (less invasive area) compared to the front (invasive area) have a significantly lower level of mitosis (KI67 $0,486 \pm 0,014$ vs. $0,719 \pm 0,026$ +nuclei/total nuclei) and greater thickness ($13,430 \pm 0,169$ vs. $6,160 \pm 0,166$ μm), higher level of ECad expression ($0,525 \pm 0,048$ vs. $0,338 \pm 0,063$ times over control), and higher expression of RP (stroma $0,382 \pm 0,267$ vs. $0,165 \pm 0,191$ and epithelium $0,728 \pm 0,043$ and $0,386 \pm 0,063$ times over control). **Conclusion:** The glands have different molecular and morphological characteristics depending on the area of the lesion. Invasive areas are more proliferative and express fewer progesterone receptors. However, further studies are required to determine if these differences translate into the ability to respond to progesterone treatment.*

Keywords: Endometriosis; Estradiol; Receptors, Progesterone.

La endometriosis es una patología ginecológica benigna y crónica¹, que afecta entre un 5 a 10% de las mujeres en edad reproductiva, i.e., desde la menarquía hasta la menopausia^{1,2,3}. Además, está presente entre un 50 a 80% de las mujeres que padecen dolor pélvico y en un 50% de los casos de infertilidad. Clínicamente, se define como la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina^{4,5,6}. Las características histológicas muestran que las lesiones están compuestas por

dos tipos celulares principales: glándulas, conformadas por células epiteliales; y el estroma, que rodea a las glándulas⁷. A la fecha se conocen tres distintas entidades de la patología^{3,4,5}: (i) lesiones superficiales del peritoneo, (ii) lesiones en el ovario (endometriomas) y (iii) lesiones profundas mayores a 5 mm de profundidad (nódulos recto-vaginales). Las lesiones profundas representan la forma más severa de la enfermedad, asociándose al 95% de los casos de dolor pélvico^{8,9}. Se presentan como

masas únicas mayores a 1 cm de diámetro^{10,11}, las cuales pueden ser removidas mediante cirugía de alta complejidad, lo cual puede comprometer otros órganos como el recto y sigmoide^{12,13}.

La endometriosis es considerada como una enfermedad invasiva dado que las células deben ser capaces de infiltrarse activamente dentro de los tejidos^{7,8,9}, para lo cual deben secretar una serie de proteasas capaces de romper las uniones intercelulares de los tejidos, y además migrar de forma activa hacia el interior de los órganos¹⁰. Se ha descrito que las glándulas de endometriosis avanzan mediante la "migración celular colectiva"¹⁴, un mecanismo de avance de estructuras acinares donde las células permanecen unidas y se proyectan por zonas de alta proliferación^{15,16}.

A menudo es descrita como una patología "dependiente de estrógeno" (E2)^{7,8,9}. Esta hormona es la responsable de la inducción de proliferación en las células del endometrio ectópico, las cuales comienzan a crecer, invadir y mantener un estado proinflamatorio que favorece el avance y la generación de dolor. El tratamiento farmacológico que ha mostrado eficacia a largo plazo es la progesterona (P4)^{17,18,19}, la cual logra reducir los síntomas y avance de las lesiones. Sin embargo, entre 20 a 40% de las pacientes dejan de responder al tratamiento y vuelven a generar síntomas. Una de las causas es el desarrollo de resistencia a P4^{20,21,22,23}, una condición en la cual una disminución en los niveles de receptores de progesterona (RP) conlleva a un cese de los efectos de la terapia. Se ha observado que aquellas pacientes con menores niveles de RP responden menos al tratamiento²⁴.

A la fecha no existe una cura para la endometriosis, y la cirugía sigue siendo el mejor tratamiento contra su sintomatología. Se sabe que el proceso invasivo es parte de la patogénesis de la enfermedad, se desconoce de qué forma esto se vincula con la pérdida paulatina de RP. Los objetivos del presente trabajo consistieron en identificar las regiones invasivas y centrales de biopsias de nódulos recto-vaginales; y cuantificar los niveles proteicos de receptores de progesterona en dichas regiones.

Materiales y métodos

Para este estudio se utilizaron las biopsias de nódulos endometriósicos de 16 pacientes (Tabla 1), sometidas a su primera cirugía de endometriosis en el Hospital UC CHRISTUS (Santiago, Chile), previa firma de un documento de Consentimiento Informado. Todos los procedimientos respetaron normas éticas concordantes con la Declaración de Helsinki y contaron con la aprobación del Comité Ético Científico de la Pontificia Universidad Católica de Chile (N°170529004), y los procedimientos fueron realizados según las pautas y normas vigentes de trabajo científico.

Las biopsias fueron recolectadas durante la cirugía, donde el nódulo se extrajo mediante laparoscopia; esto permite conocer la orientación de la muestra una vez extraída. Inmediatamente se colocó sobre una placa de Petri con PBS estéril, se orientó y utilizando un bisturí se realizó un corte sagital dividiendo la muestra en dos mitades. Se identificó la zona del "Centro" como aquella región más cercana a la superficie del peritoneo, y la zona llamada "Frente" orientada hacia el recto. Se extrajeron fragmentos (0,5 – 1 cm) de tejido de ambas zonas (Figura 1) dejando un espacio entre ambos extremos.

Inmunohistoquímica

Las muestras de biopsia se fijaron durante 24 horas en 4% de formaldehído (metanal), y luego fueron derivadas al Departamento de Anatomía Patológica de la Pontificia Universidad Católica (PUC), donde se procedió con el proceso de inclusión en parafina y confirmación histológica de endometriosis (presencia de glándulas y estroma) por parte de un médico patólogo. Se colocaron de 2 a 4 cortes por lámina (según el tamaño) y se tiñó con hematoxilina-eosina cada 6 láminas para identificar la zona con presencia de glándulas endometriales y estroma.

Luego, los cortes fueron seleccionados a partir de la búsqueda de glándulas en las láminas teñidas con hematoxilina-eosina. Posteriormente, las láminas seleccionadas fueron llevadas al Departamento de Anatomía Patológica de la PUC para tinción por inmunohistoquímica de RP (API 424 AA), ECad (API 3012 AA) y KI67 (API 3156

Tabla 1. Variables clínicas y antropométricas de las pacientes.

Variable	Valor/categoría/rango			
Motivo consulta	Dismenorrea 31%	Hipermenorrea 21 %	Dispareunia 27%	
Edad (años)	35 ± 5,8			
Masa (kg)	67,2 ± 9,6			
Talla (m)	1,6 (3,6)			
IMC (kg/cm ²)	26,4 ± 3,2			
Estado Nutricional	Normopeso 25%	Sobrepeso 63%	Obesidad 12%	
N° patologías previas	2 ± 0,8			
Endometriosis previa	No 38%	Sí 62%		
Cirugías previas	1 ± 1,6			
Método Anticonceptivo	Solo progestágeno 12,5%	Solo estrógeno 0%	Sin método anticonceptivo 75%	Combinado (estrógeno + progestágeno) 12,5%
Paridad	Múltipara 38%		Nulípara 62%	
Tipo endometriosis	Profunda 100%		Endometrioma 6%	
Etapa Endometriosis	III 19%		IV 81%	

IMC: índice de masa corporal, n= 16.

AA) (Biocare Medical, CA, USA). Los lavados y tiempos de incubación se efectuaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit. El revelado se realizó incubando en disolución DAB.

En cada lámina se añadió un corte de una biopsia de cáncer de mama como control interno de la técnica utilizada por el Departamento de Anatomía Patológica de la PUC. Este tejido posee zonas de alta expresión que sirven como

control positivo para la marca, y adicionalmente las regiones no cancerosas asociadas a los ductos mamarios son utilizadas como control negativo. Todas las biopsias fueron analizadas por un médico patólogo quien confirmó la presencia de endometriosis, y ausencia de células malignas.

Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio Motic AE31 y la cámara ProgRes Speed XT Core 5. A partir de éstas se procedió a realizar un

análisis digital utilizando el software Image J para determinar: número de glándulas, medición del espesor glandular y cuantificación de la marca de Inmunohistoquímica para RP.

Para el análisis de la inmunohistoquímica se procedió a realizar un paso de deconvolución de cada imagen quedando en formato RGB. Luego de seleccionar el canal, se procedió a ajustar el umbral de saturación mediante el comando "Threshold" ajustado manualmente mediante el control positivo. Finalmente, los valores de saturación se utilizaron para proceder a evaluar los valores de intensidad de marca en las muestras. Para los análisis de ECad, y RP se utilizó la siguiente fórmula en base a los pixeles/área obtenidos: Niveles de expresión = (Área pixeles deconvolución - Control Negativo) / Control Interno positivo.

Para la marca de KI67 se consideró la proporción de núcleos positivos respecto a núcleos totales. Y finalmente, la medición del grosor de la glándula fue efectuada directamente con la herramienta de medición de software ImageJ.

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados utilizando el software Graphpad PRISM 8.0.1. Se evaluó la normalidad de datos utilizando la prueba

Shapiro-Wilk, se realizaron análisis descriptivos y se reportó la media \pm desviación estándar para los datos de distribución normal; y como mediana (RIC) para datos de libre distribución. Luego se realizaron comparaciones de las lesiones histológicas, entre los grupos "Centro" y "Frente" mediante el test U de Mann Whitney^{25,26}. El nivel de significancia estadística se consideró con $p < 0,05$.

Resultados

Distinción de zonas

Según ha publicado el grupo de Donnez, et al.¹⁶ los nódulos en tabiques recto-vaginales de pacientes diagnosticadas con endometriosis presentan glándulas con características distintas según la zona en la que se encuentren. Ellos distinguen las zonas de "Centro" y "Frente" (Figura 1A) fijando un límite de forma radial. La zona "Centro" se considera como el inicio de la lesión donde se encontrará la mayor cantidad de endometrio ectópico, a menudo al centro del nódulo extraído. Por otro lado, el "Frente", hace referencia a la zona de invasión donde el tejido se proyecta hacia otros órganos, como en este caso el recto (Figura 1A). En el presente trabajo los nódulos fueron tratados mediante un corte sagital separando una porción para análisis patológico según el procedimiento clínico. La otra porción

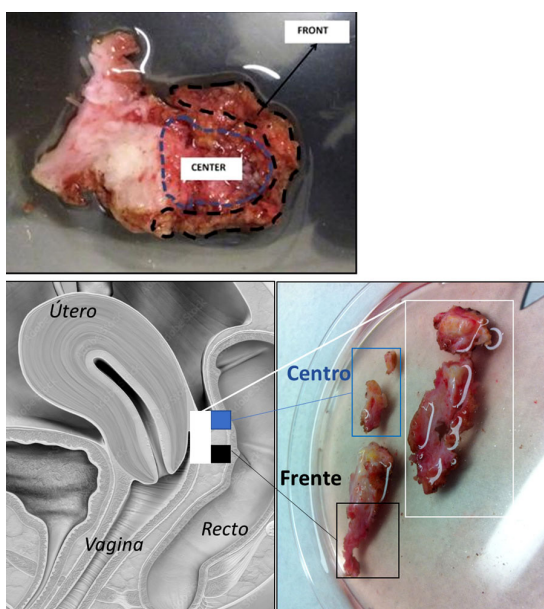


Figura 1: Esquema de sectorización de las biopsias. Distinción radial entre el centro y el frente invasivo de la lesión (arriba), tomado de García-Solares y cols.²⁷. Esquema de separación de centro y frente en lesiones humanas (abajo).

se seccionó separando la cara peritoneal (parte azul, Figura 1B) llamada "Centro" de la sección más profunda hacia el recto (parte negra, Figura 1B) que llamamos "Frente". La interfaz entre ambos extremos no es considerada en el análisis.

Caracterización de las glándulas

Las zonas identificadas como "Centro" mostraron una expresión intensa de la ECad (Figura 2) ($0,525 \pm 0,048$ respecto a control), la marca se sitúa en la membrana plasmática de las células epiteliales que conforman sus glándulas. No se observó marca en regiones estromales. Por el contrario, las glándulas del "Frente" mostraron menores niveles de ECad ($0,338 \pm 0,063$ respecto a control) (Figura 2). Luego, cuando se cuantificó la expresión de KI67 en las lesiones, la marca aparece exclusivamente en el núcleo de las células epiteliales y en algunos casos, en el estroma circundante. Las glándulas del "Centro" mostraron menores niveles respecto a las observadas en los

fragmentos del "Frente" ($0,486 \pm 0,014$ núcleos y $0,719 \pm 0,026$ núcleos, respectivamente) (Figura 2). El último aspecto a evaluar correspondió al grosor de la glándula, desde la zona basal hacia apical, las glándulas del "Centro" son significativamente más gruesas que las del "Frente" ($13,43 \pm 0,169 \mu\text{m}$ y $6,16 \pm 0,166 \mu\text{m}$, respectivamente).

Cuantificación de los niveles de RP

La marca observada para RP se apreció principalmente en el núcleo de las células, y más débil en el citoplasma. Tanto las células epiteliales, como las estromales mostraron presencia del receptor (Figura 3). Se analizaron por separado ambos tipos celulares, observándose que para el estroma la marca era más intensa en el "Centro" que en el "Frente" ($0,382 \pm 0,267$ y $0,165 \pm 0,191$, respectivamente). Respecto a la marca observada en el epitelio de las glándulas, se observó que en el centro la intensidad de la marca es mayor que en el frente ($0,728 \pm 0,043$ y $0,386 \pm 0,063$, respectivamente) (Figura 3).

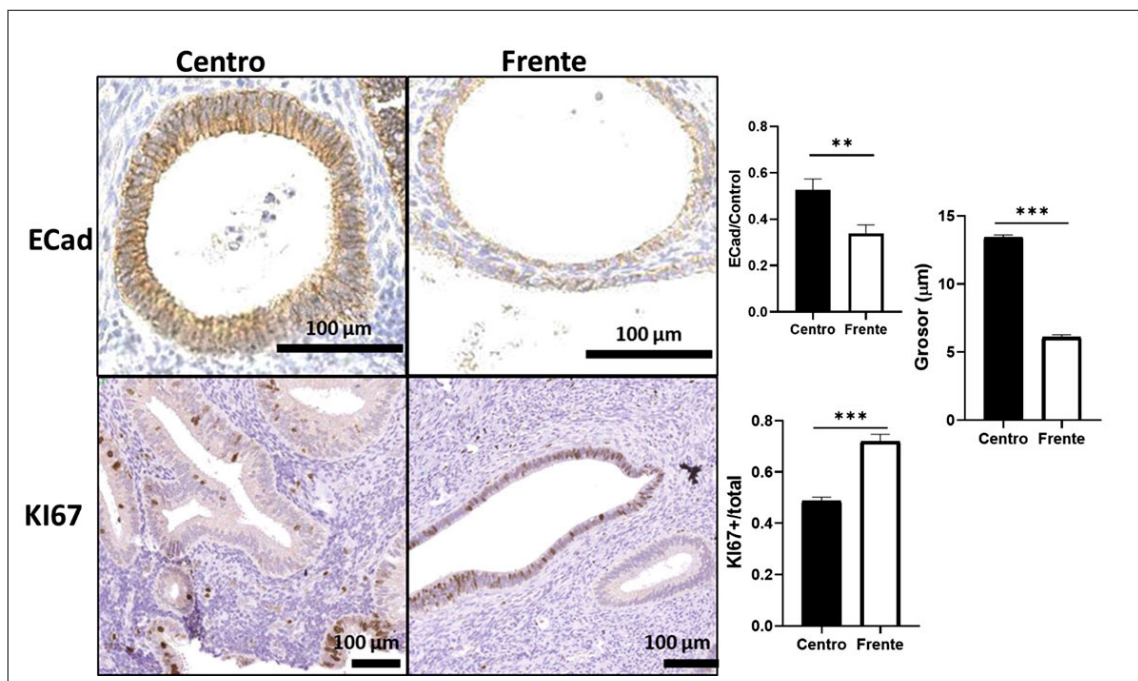


Figura 2: Inmunohistoquímica para E-Cadherina (ECad) y KI67. La media \pm el error estandarizado de la media es mostrado. $n = 16$, Test de Mann Whitney. ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$.

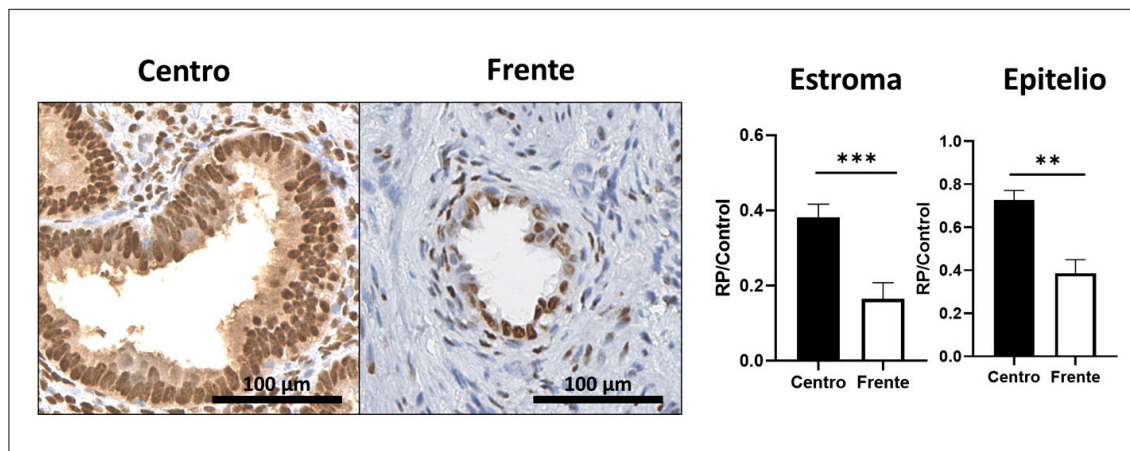


Figura 3: Inmunohistoquímica para RP. La media \pm el error estandarizado de la media es mostrado. $n = 16$, Test de Mann Whitney, ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0001$.

Discusión

En el presente trabajo demostramos que los nódulos de endometriosis recto-vaginal analizados, poseen diferencias en patrones morfológicos y moleculares en sus glándulas y estroma. Al observar la porción más cercana al peritoneo (Centro), demostramos que sus glándulas expresan mayores niveles de ECad y de RP. También poseen un grosor mayor (Figuras 2 y 3) en comparación con la zona más cercana al recto (Frente), la cual muestra mayor número de núcleos positivos para KI67. Nuestros resultados guardan relación con otros autores^{16,27} que han analizado lesiones de endometriosis considerando áreas más invasivas. La primera vez que se propuso el análisis sectorizado de estas lesiones fue al procesar biopsias inducidas en un modelo de babuinos^{15,16}. En este caso los autores injertaron un fragmento de endometrio dentro de una fisura hecha en el peritoneo, por un período de 6 meses o un año para luego extraer las biopsias. Durante el análisis se identifica la zona del injerto como "Centro" de la lesión; y toda la zona periférica el "Frente" invasivo^{15,16}. La presencia de tejido endometrial fuera de la zona de injerto implica que dichas glándulas y estroma fueron capaces de invadir el tejido aledaño. Al igual que en nuestro trabajo, las glándulas del centro presentaron mayores niveles

de ECad y grosor epitelial; además, la proliferación mediada por KI67 fue mayor en el frente. Posteriormente²⁷ analizaron lesiones humanas, donde la diversidad de la patología y heterogeneidad de las lesiones dificulta la identificación de un frente de invasión. Esta aproximación asume una proyección radial, en todos los ángulos hacia los órganos (vagina, recto, sigmoide, entre otros), no obstante, implica el análisis completo de la lesión. En nuestro protocolo, parte importante de la biopsia tiene uso exclusivo del patólogo para el diagnóstico. Adicionalmente, utilizamos los extremos de la muestra, excluyendo la interfase que podría mostrar estadios intermedios de los distintos caracteres estudiados de las glándulas. No obstante, los resultados mostrados coinciden con el modelo de babuinos y el análisis de lesiones humanas.

La actual clasificación de la "American Fertility Society"^{9,10,11}, propone que la endometriosis es una enfermedad progresiva considerando algunos aspectos de su fisiopatología. Sin embargo, no existe reporte de que un tipo de lesión progrese en una versión más agresiva. El objetivo de identificar y caracterizar zonas invasivas en las lesiones es explicar los mecanismos de progresión para luego desarrollar estrategias para frenar su avance; sin embargo, si al momento del diagnóstico los

nódulos no muestran progresión, y su recurrencia tras cirugía es menor a 5%^{12,13}, la intervención quirúrgica seguirá siendo el procedimiento de preferencia. Sin embargo, un mejor conocimiento de los procesos invasivos podría enfocarse en terapias que disminuyan el grado de infiltración evitando la resección sigmoidea (altamente invasiva) o el número de cirugías reiteradas.

Diversos estudios orientan a que la reducción de niveles de RP^{19,20,21} es la causa de la resistencia a la progesterona, por esta razón es un parámetro evaluado al buscar nuevos tratamientos de la patología^{28,29}. Nuestros resultados adquieren sentido dado que aquellas zonas alejadas del centro del nódulo poseen menores niveles de RP; por lo tanto, las que menos responden al tratamiento con P4. Dada su ubicación, las glándulas del Frente son más propensas a ser dejadas dentro de la paciente tras la intervención quirúrgica, considerando que un criterio conservador de cirugía buscará remover el nódulo, pero conservando lo más posible la anatomía original de la paciente¹¹. Resulta de gran interés para estudios futuros, poder determinar si la presencia de este tejido con menores niveles de PR posee características esteroideogénicas, e invasivas que puedan asociarse a la recurrencia de la enfermedad. Adicionalmente, reconocemos que el anticuerpo utilizado no permite distinguir entre las variantes del RP tipo A o tipo B ya que está dirigido contra la región común de ambas proteínas. Es sabido que el RPB^{17,18} es el responsable de los efectos terapéuticos de la P4, por lo tanto, al observar los niveles totales de RP no sabemos si estos representan (y en qué medida lo hacen) los niveles de la variante de interés para el tratamiento. Finalmente, dentro de las pacientes participantes del estudio, 4 se encontraban bajo tratamiento hormonal, sin embargo, sus niveles de KI67, PR, ECad y grosores evaluados no difieren significativamente respecto del grupo de pacientes que no estaban bajo tratamiento. Su exclusión dentro de los análisis tampoco modifica los resultados obtenidos.

Conclusión

En virtud de los resultados, es posible concluir que las glándulas de endometriosis varían mole-

cular y morfológicamente según la zona donde se encuentren. Las regiones cercanas al peritoneo, consideradas menos invasivas, poseen glándulas de gran grosor y elevados niveles de ECad y RP, tanto en su estroma como en epitelio. Las regiones cercanas al recto, más invasivas, poseen mayor actividad mitótica (KI67), son más delgadas y sus niveles de RP y ECad son menores. Se requieren investigaciones posteriores, con un mayor número de pacientes cuyos resultados puedan ser extrapolados a nivel poblacional. Adicionalmente, se debe determinar si estas diferencias en los niveles de receptores se traducen en la capacidad de responder al tratamiento con P4.

Agradecimientos: Los autores agradecen a los equipos de ginecología y anatomía patológica de la PUC por proporcionar las muestras de nódulos endometriósicos y hacer el procesamiento histológico de las muestras para este estudio.

Referencias

1. Taylor HS, Kotlyar AM, Flores VA. Endometriosis is a chronic systemic disease: Clinical challenges and novel innovations. *Lancet*. 2021; 397(10276): 839-852.
2. Rolla E. Endometriosis: advances and controversies in classification, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *F1000Research*. 2019; 8(F100 Faculty Rev): 529.
3. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril*. 1997; 68(4): 585-596.
4. Buttram VC. An expanded classification of endometriosis. *Fertil Steril*. 1978; 30(2): 240-242.
5. Chapron C, Marcellin L, Borghese B, Santulli P. Rethinking mechanisms, diagnosis and management of endometriosis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019; 15(11): 666-682.
6. Falcone T, Flyckt-Rebecca R. Clinical Management of Endometriosis. *Obstet Gynecol*. 2018; 131(3): 557-571.
7. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril*. 2012; 98(3): 511-519.
8. Vercellini P, Viganó P, Somigliana E, Fedele L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2014; 10(5): 261-275.
9. Koninckx PR, Fernandes R, Ussia A, Schindler L, Wattiez A, Al-Suwaidi S, et al. Pathogenesis Based Diagnosis and Treatment of Endometriosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12: 745548.
10. Koninckx PR, Meuleman C, Demeyere S, Lesaffre E, Cornillie FJ. Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain. *Fertil Steril*. 1991; 55(4): 759-765.

11. Koninckx PR, Ussia A, Adamyan L, Wattiez A, Donnez J. Deep endometriosis: Definition, diagnosis, and treatment. *Fertil Steril*. 2012; 98(3): 564-571.
12. Roman H, Vassilief M, Gourcerol G, Savoye G, Leroi AM, Marpeau L, et al. Surgical management of deep infiltrating endometriosis of the rectum: Pleading for a symptom-guided approach. *Hum Reprod*. 2011; 26(2): 274-281.
13. De Cicco C, Corona R, Schonman R, Mailova K, Ussia A, Koninckx PR. Bowel resection for deep endometriosis: A systematic review. *BJOG*. 2011; 118(3): 285-291.
14. Jain S, Ladoux B, Mège RM. Mechanical plasticity in collective cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 2021; 72: 54-62.
15. Orellana R, García-Solares J, Donnez J, van Kerk O, Dolmans MM, Donnez O. Important role of collective cell migration and nerve fiber density in the development of deep nodular endometriosis. *Fertil Steril*. 2017; 107(4): 987-995.e5.
16. Donnez O, Orellana R, Van Kerk O, Dehoux JP, Donnez J, Dolmans MM. Invasion process of induced deep nodular endometriosis in an experimental baboon model: Similarities with collective cell migration? *Fertil Steril*. 2015; 104(2): 491-497.e2.
17. Maclean JA, Hayashi K. Progesterone Actions and Resistance in Gynecological Disorders. *Cells*. 2022; 11(4): 647.
18. Bulun SE, Yilmaz BD, Sison C, Miyazaki K, Bernardi L, Liu S, et al. Endometriosis. *Endocr Rev*. 2019; 40(4): 1048-1079.
19. Marquardt RM, Kim TH, Shin JH, Jeong JW. Progesterone and Estrogen Signaling in the Endometrium: What Goes Wrong in Endometriosis? *Int J Mol Sci*. 2019; 20(15).
20. Patel BC, Rudnicki M, Yu J, Shu Y, Taylor RN. Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017; 96(6): 623-632.
21. McKinnon B, Mueller M, Montgomery G. Progesterone Resistance in Endometriosis: An Acquired Property? *Trends Endocrinol Metab*. 2018; 29(8): 535-548.
22. Zhang P, Wang C. Progesterone Resistance in Endometriosis: Current Evidence and Putative Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(8).
23. Donnez J, Dolmans MM. Endometriosis and Medical Therapy: From Progestogens to Progesterone Resistance to GnRH Antagonists: A Review. *J Clin Med*. 2021; 10(5): 1-21.
24. Flores VA, Vanhie A, Dang T, Taylor HS. Progesterone Receptor Status Predicts Response to Progestin Therapy in Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018; 103(12): 4561-4568.
25. Yilmaz BD, Bulun SE. Endometriosis and nuclear receptors. *Hum Reprod Update*. 2019; 25(4): 473-485.
26. Campbell RC, Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. *J R Stat Soc Ser A Stat Soc*. 1970; 133(1): 102-102.
27. García-Solares J, Dolmans MM, Squifflet JL, Donnez J, Donnez O. Invasion of human deep nodular endometriotic lesions is associated with collective cell migration and nerve development. *Fertil Steril*. 2018; 110(7): 1318-1327.
28. Al-Sabbagh M, Lam EWF, Brosens JJ. Mechanisms of endometrial progesterone resistance. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 358(2): 208-215.
29. Patiño-García D, Palomino J, Pomés C, Celle C, Torres-Estay V, Orellana R. Estetrol Increases Progesterone Genetic Response without Triggering Common Estrogenic Effects in Endometriotic Cell Lines and Primary Cultures. *Biomedicines*. 2023; 11(4).