

## $P_{450}$ Arom y microambiente estrogénico en endometrios eutópicos de mujeres con endometriosis

M Cecilia Johnson P<sup>a</sup>, Claudio Pinto O<sup>b</sup>,  
Alessandra Alves L<sup>c</sup>, Alberto Palomino A,  
Ariel Fuentes G, M Angélica Boric S<sup>a</sup>, Margarita Vega B<sup>a</sup>.

### $P_{450}$ Arom and estrogenic microenvironment of eutopic endometria in endometriosis

**Background:** Endometriosis, a common gynecologic disorder characterized by endometrial glands and stroma outside the uterus, is diagnosed by direct visualization of peritoneal and ovarian implants during laparoscopy. **Aim:** To study the estrogenic microenvironment in eutopic endometria of women with and without endometriosis. **Patients and methods:** Eutopic endometria, obtained during laparoscopy from 23 women with endometriosis and 20 fertile cyclic women undergoing tubal sterilization, was studied.  $P_{450}$ Arom mRNA expression (RT-PCR) was measured. Also,  $P_{450}$ Arom activity was assessed measuring testosterone conversion to estradiol and the concentration of this last hormone in cultured endometrial explants. **Results:** Age and body mass index was similar in both groups studied. Seventy nine percent of endometria from women with endometriosis and in 29.4% from control group expressed  $P_{450}$ Arom mRNA ( $p < 0.01$ ). The intensity of the band was higher in secretory endometria from women with endometriosis when compared to controls ( $p < 0.01$ ), but it was similar during the proliferative phase. Estradiol secretion to the culture media by proliferative endometria explants from women with endometriosis was 3-fold higher than secretory endometria ( $p < 0.01$ ) and endometria from control women in both phases.  $P_{450}$ Arom activity, in the presence of testosterone, was 7-fold higher in endometrial cultures from women with endometriosis, when compare with the basal culture ( $p < 0.01$ ). However, in endometrial explant cultures from control women, this activity was not statistical different. **Conclusions:** These results indicate that in women with endometriosis, the microenvironment in the endometria is estrogenic as a consequence of an increased expression and activity of the  $P_{450}$ Arom (Rev Méd Chile 2004; 132: 1475-82).

**(Key Words:** Aromatase; Cytochrome  $P_{450}$ ; Endometriosis; Genital neoplasms, female;  $P_{450}$  AROM)

Recibido el 8 de abril, 2004. Aceptado en versión corregida el 29 de septiembre, 2004.  
Trabajo financiado por proyecto DID ENL 03/05 Universidad de Chile y parcialmente FONDECYT #1040412.

Instituto de Investigaciones Materno-Infantil, Hospital Clínico San Borja Arriarán, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

<sup>a</sup>Bioquímica; <sup>b</sup>Tesista, Facultad de Medicina, Universidad de Chile; <sup>c</sup>Tesista, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Santiago de Chile.

Correspondencia a: M Cecilia Johnson P. IDIMI, Santa Rosa  
1234. Fax: 4247240. E mail: cjohnson@med.uchile.cl

La endometriosis es un desorden ginecológico invasivo benigno caracterizado por la presencia de tejido endometrial viable (glándulas y estroma) fuera de la cavidad uterina. Su etiología, pobremente entendida y aún en estudio, está asociada con la compleja fisiología reproductiva de las especies que menstrúan. Esta patología, asociada con infertilidad, requiere de terapia quirúrgica o farmacológica y constituye un problema de salud mayor para la mujer en edad reproductiva<sup>1-4</sup>.

Es conocido que la endometriosis es una patología heterogénea que se desarrolla en mujeres en edad reproductiva e involuciona espontáneamente después de la menopausia. La supresión medicamentosa de los niveles de estradiol, mediante inhibidores de la enzima aromataza o de agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), produce una regresión de la patología<sup>5-7</sup>. Sin embargo, una vez reestablecidos los niveles de estrógenos, la enfermedad puede recidivar sugiriendo una dependencia de éstos.

Se ha comunicado que la histología de endometrios de ubicación normotópica de mujeres con endometriosis no es diferente a la del endometrio normal; por el contrario, su fisiología estaría alterada, afectando la expresión de numerosos factores, entre otros la biosíntesis y el metabolismo esterooidal local, principalmente estradiol<sup>8-10</sup>. Como es sabido, la conversión de androstenediona y testosterona a estrona y estradiol, respectivamente, es catalizada por el complejo enzimático aromataza, constituido por el citocromo P<sub>450</sub> conocido como P<sub>450</sub>Arom, además de flavoproteína y el citocromo P<sub>450</sub>NADPH reductasa<sup>6</sup>. La P<sub>450</sub>Arom se expresa normalmente en las células de granulosa ovárica, cuerpo lúteo, placenta, tejido adiposo, fibroblastos de piel y cerebro, no siendo detectada en el endometrio normal<sup>11-13</sup>.

En la actualidad, el diagnóstico de endometriosis es establecido por laparoscopia o laparotomía. La biopsia endometrial y la detección del ARN mensajero (mRNA) de la enzima P<sub>450</sub>Arom, podría ser una herramienta importante en la detección de esta patología en forma menos invasiva, y contribuiría, además, a reducir el número de laparoscopias, aportando una base racional para iniciar el tratamiento médico.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el microambiente estrogénico en endometrios provenien-

tes de mujeres con endometriosis y compararlos con el de mujeres fértiles sanas. Para ello, se determinará la expresión y actividad de la enzima P<sub>450</sub>Arom en explantes endometriales *ex vivo* y en cultivo.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

*Sujetos.* El tejido endometrial eutópico fue obtenido de 23 mujeres sometidas a laparoscopia diagnóstica de endometriosis asociada con dolor pélvico crónico, dismenorrea severa e infertilidad primaria, y de 20 mujeres eumenorreicas reproductivamente normales (paridad: 3 a 6 hijos) sometidas a esterilización tubaria por laparoscopia. Todas las mujeres estaban en edad reproductiva. Dado que el número de pacientes es reducido para una clasificación más exhaustiva de la endometriosis, ésta se dividió en endometriosis leve (11 pacientes) y severa (12 pacientes) según los criterios de Acosta<sup>14</sup>. Ninguna paciente había recibido terapia endocrina, que incluye análogos de GnRH, danazol o anticonceptivos orales en al menos los 6 meses previos a la biopsia endometrial.

Este estudio ha sido aprobado por los Comités de Ética de la Universidad de Chile y del Hospital Clínico San Borja Arriarán y las pacientes firmaron un consentimiento escrito e informado.

Las muestras endometriales obtenidas con una cánula Pipelle de Cornier desde el cuerpo del útero fueron lavadas varias veces con buffer fosfato-salino frío (PBS) para remover los glóbulos rojos. Posteriormente, fueron cortados en trozos; uno de ellos se incluyó en parafina para el estudio histológico, otros se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para estudiar la expresión del mRNA de P<sub>450</sub>Arom o se incubaron por 18 h para estudiar la actividad enzimática.

Las muestras fueron fechadas por un histopatólogo experimentado según el criterio establecido por Noyes<sup>15</sup>, y clasificadas en endometrios de: fase proliferativa (días 5-14, n=10) o secretora (días 15-26, n=33).

*Cultivo de explantes endometriales.* Explantes de tejido endometrial (20 mg) lavados en PBS fueron incubados como se describe previamente con algunas modificaciones<sup>16</sup>. Brevemente, los explantes de tejido se incubaron con medio Hanks'

(GibcoBRL Life Technology, Bethesda, MD) suplementado con 2 mmol/L glutamax-I (Invitrogen, Carlsbad, CA), solución de insulina-transferrina-selenium (ITS, Invitrogen), 0,1% (p/v) de albúmina sérica de bovino (BSA; Sigma Co., St Louis, MO), 26 mmol/L de NaHCO<sub>3</sub>, 25 mmol/L de HEPES, aminoácidos, 100 IU/mL de penicilina y 5 mg/mL de estreptomina (Sigma) por 18 h a 37°C en ausencia (basal) o presencia de testosterona (Sigma). Después de la incubación, el medio de cultivo fue recogido y guardado a -20°C para la determinación de estradiol.

*Actividad de la P<sub>450</sub>Arom y concentración de estradiol.* La actividad de P<sub>450</sub>Arom fue determinada estudiando la conversión de testosterona a estradiol como se describió previamente<sup>17</sup>. Brevemente, los explantes endometriales fueron incubados por 18 h en ausencia (basal) o en presencia de testosterona (1 μmol/L). Posteriormente, el medio se recogió y guardó a -20°C hasta la determinación de la concentración de estradiol.

El estradiol secretado al medio por los explantes endometriales después de 18 h de cultivo fue extraído con etanol:eter (1:1, v/v), evaporada la fase orgánica y resuspendido en buffer de reacción; la recuperación del esteroide fue >90%. El estradiol fue medido por el radioinmunoensayo (RIA) Diagnostic System Lab. (Webster, Texas), presentando una sensibilidad de 5,0 pg/ml y CV intra-ensayo de 4,1% e inter-ensayo de 6,7%.

*Preparación de ARN, síntesis de ADN complementario (cDNA), reacción de polimerización en cadena con transcripción reversa (RT-PCR).* El RNA total fue preparado de endometrios proliferativos y secretores congelados como se describió previamente<sup>18</sup>. Brevemente, el RNA total fue aislado de explantes de tejido endometrial con TRIzol-glicógeno (Invitrogen); luego, el precipitado purificado fue resuspendido en agua tratada con dietilpirocarbonato. El cDNA fue sintetizado a partir de 2 μg de RNA total previamente digerido con ADNsa I (Fermentas, Vilnius, Lituania) usando partidores al azar (Invitrogen) y 200 U de transcriptasa reversa ReverAid H Minus M-MuLV (Fermentas) según indicaciones del proveedor.

Dos μL de cDNA fueron utilizados para amplificar el gen de P<sub>450</sub>Arom ajustados a un volumen de 25 μL agregando buffer PCR que contenía Taq

ADN Polymerasa (0,63 U; Invitrogen), dNTP (0,25 mmol/L), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mmol/L) y partidores específicos (0,4 μmol/L) (sentido (exon 8): 5'-TGCC-TACCCAGTGAAAAGG-3' y antisentido (exon 9): 5'-TCAAAGCACATTTGGTGAA-3'; 652 pb)<sup>19</sup>. La PCR consistió en 35 ciclos de: denaturación (94°C, 1 min), alineamiento de los partidores (50°C, 1 min) y extensión (72°C, 1 min) en Thermocycler PT-100 (MJ Research Inc. Watertown, MA). Como control interno se amplificó ARN ribosomal (rRNA) 18S. La semicuantificación de los productos de PCR se realizó utilizando el Sistema de Análisis y Documentación de Electroforesis Kodak (EDAS 290) y el programa Kodak 1D Image Analysis (Rochester, NY).

*Estadística.* Los resultados de estradiol fueron normalizados por mg de tejido húmedo. Los datos de las pacientes como edad e índice de masa corporal (IMC) y los resultados en variables continuas se expresaron como la media ± error estándar de la media. Al comparar proporciones se utilizó chi cuadrado. Dada la distribución no gaussiana de los datos de acuerdo al test de Kolmogorov, los resultados fueron analizados por los test no paramétricos Mann-Whitney U o Kruskal-Wallis. Se consideró estadísticamente significativo a p <0,05.

## RESULTADOS

Las biopsias de endometrio se obtuvieron de un universo de 43 mujeres durante la laparoscopia diagnóstica de endometriosis (23 pacientes) o de esterilización tubaria (20 controles). La edad de ambos grupos fue 32,6 ± 5,8 años (rango: 23-41) y 36,2 ± 4,8 años (rango, 25-43), respectivamente y no hubo diferencia estadísticamente significativa. El IMC del grupo de mujeres con endometriosis no fue estadísticamente diferente del grupo control (IMC= 24,8 ± 4,3 y 28,2 ± 6,1 kg/m<sup>2</sup>, respectivamente).

La expresión de P<sub>450</sub>Arom se realizó en endometrios de 19 mujeres con endometriosis y 17 mujeres controles, encontrándose que 15/19 (78,9%) de los endometrios de endometriosis (4/5 de fase proliferativa y 11/14 de fase secretora) y 5/17 (29,4%) de los endometrios del grupo control (2/3 de fase proliferativa y 3/14 de fase secretora) expresaron el mRNA de esta enzima durante el

ciclo menstrual ( $p=0,0079$ ). Al clasificar a la endometriosis en leve y severa se observó que en el 86% y 73% de los endometrios se detectó el mRNA de  $P_{450}Arom$ , respectivamente. La intensidad de banda de los amplificadores por PCR fue mayor en los endometrios de fase secretora de endometriosis con respecto al grupo control ( $p=0,0033$ ), siendo similar en los de fase proliferativa (Figura 1). Se utilizó cDNA de cuerpo lúteo humano de fase intermedia como control positivo de la expresión de  $P_{450}Arom$ , siendo 7 veces mayor su expresión con respecto al endometrio.

Los explantes endometriales de endometriosis de fase proliferativa secretaron 3,3 veces más estradiol al medio que los obtenidos de fase secretora ( $p=0,030$ ); en tanto, la secreción obtenida en los cultivos endometriales controles de ambas fases fue constante y similar al obtenido de endometrios secretores de las pacientes (Figura 2A). Al clasificar las endometriosis en leve y severa se observó que la secreción de estradiol se triplica a mayor severidad de la endometriosis ( $0,28 \pm 0,07$  y  $1,085 \pm 0,49$  pg/mg de tejido, respectivamente,  $p=0,0596$ ).

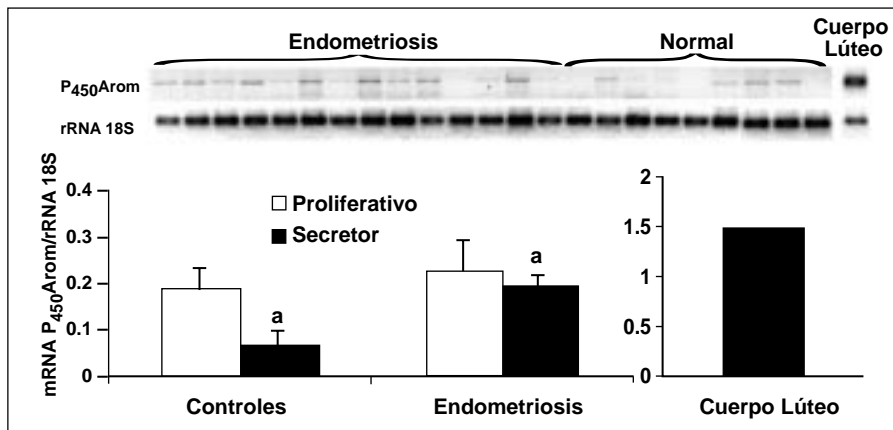


FIGURA 1. Expresión del mRNA de  $P_{450}Arom$  en endometrio humano durante el ciclo menstrual. Los partidores son complementarios a segmentos de los exones 8 y 9 del gen CYP19 (aromatasa) y la reacción se realizó como se indica en Materiales y Métodos. Se muestra un gel representativo con amplificadores de cDNA endometrial de mujeres con endometriosis y controles. Los fragmentos obtenidos corresponden al tamaño esperado. El gráfico ilustra la amplificación relativa a rRNA 18S. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  error estándar de 17 mujeres controles (3 de fase proliferativa y 14 de fase secretora), 19 mujeres con endometriosis (5 de fase proliferativa y 14 de fase secretora) y 1 cuerpo lúteo. <sup>a</sup> $p < 0,05$  respecto a endometrio control de fase secretora.

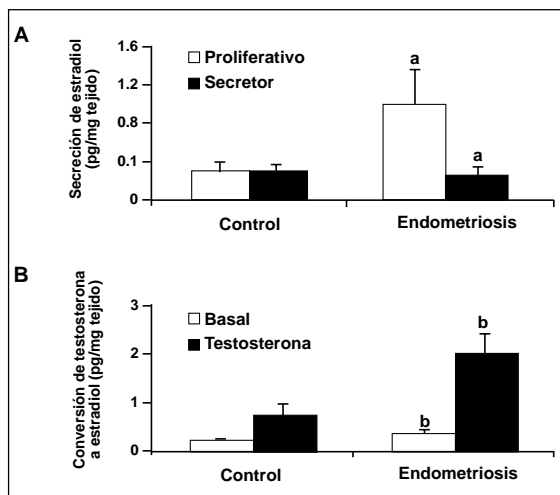


FIGURA 2. Actividad de  $P_{450}Arom$  en cultivos de endometrios humanos. Explantes de endometrios fueron incubados en ausencia (basal) (A) y en presencia de testosterona ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) (B) por 18 h a  $37^\circ\text{C}$ . En el medio de cultivo se determinó la concentración de estradiol. Los resultados están normalizados por mg de tejido húmedo y se expresan como promedio  $\pm$  error estándar y corresponden a endometrios de 11 mujeres con endometriosis (5 de fase proliferativa y 6 de fase secretora) y 8 controles (3 de fase proliferativa y 5 de fase secretora) (A) y a 4 pacientes con endometriosis y a 4 controles (B). <sup>a</sup> $p < 0,05$  respecto a la fase secretora. <sup>b</sup> $p < 0,05$  respecto al basal.

La actividad de P<sub>450</sub>Arom, estudiada por la conversión de testosterona a estradiol y posterior secreción al medio de cultivo, aumentó 6,8 veces el estradiol secretado por los explantes endometriales de endometriosis en presencia de testosterona, respecto al basal ( $p=0,0022$ ). En tanto, el estradiol sintetizado y secretado al medio de cultivo por los endometrios controles en estas condiciones no fue significativamente diferente ( $p=0,1074$ ) (Figura 2B).

## DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación confirman el microambiente estrogénico del endometrio eutópico de pacientes con endometriosis, en los cuales se estudió la expresión y actividad de la enzima P<sub>450</sub>Arom. En forma similar, aunque con menor intensidad, algunos endometrios de mujeres controles fértiles, también presentaron expresión y actividad de esta enzima.

Las primeras publicaciones indicando la expresión del mRNA de P<sub>450</sub>Arom en endometrios provenientes de mujeres con endometriosis sugirieron que esta molécula podría ser un marcador bioquímico de esta patología<sup>8</sup>. Investigaciones posteriores demostraron un fenómeno similar en otras patologías dependiente de estrógenos como leiomiomas, adenomiosis y cancer endometrial, en las cuales la P<sub>450</sub>Arom puede aumentar el estradiol endógeno modificando así, el microambiente endometrial<sup>20-22</sup>.

El hecho que en 20% de los endometrios de mujeres con endometriosis, independientemente de la fase menstrual, no se detectó el mRNA de P<sub>450</sub>Arom, resta validez a esta determinación como herramienta diagnóstica. No podemos descartar que la expresión de su mRNA sea fluctuante y de vida media corta, como tampoco que la RT-PCR sea un ensayo suficientemente sensible para detectarlo en todas las pacientes. Resultados similares han sido reportados por otros autores al estudiar los transcritos (RT-PCR/Southern blot)<sup>19</sup> o la proteína (inmunohistoquímica)<sup>22</sup> de P<sub>450</sub>Arom obteniendo 18% y 8% de falsos negativos, respectivamente.

Aún más, nuestros resultados también muestran que el 29,4% de los endometrios de mujeres sanas fértiles expresaron la P<sub>450</sub>Arom. El reducido número de endometrios de fase proliferativa estu-

diados no nos permite concluir que esta enzima se expresaría mayormente durante este estadio. En forma similar, Dheenadayalu et al<sup>19</sup> han reportado la expresión de esta enzima en 25% de los endometrios normales obtenidos durante el ciclo menstrual, en controversia con otros autores que no detectaron a la enzima P<sub>450</sub>Arom en endometrios obtenidos de histerectomía por prolapso uterino o patología cervical<sup>8,23</sup>. Aunque en el presente trabajo, las mujeres control fueron estrictamente seleccionadas cumpliendo los requisitos de fertilidad probada y menstruaciones espontáneas cíclicas normales y regulares, la presencia de lesiones peritoneales microscópicas podrían no haber sido detectadas durante la salpingoligadura laparoscópica. Por otro lado, endometriosis asintomática ha sido reportada en alrededor de 4% de mujeres sometidas a esterilización tubaria<sup>24,25</sup>.

El ambiente estrogénico presente en los endometrios eutópicos de pacientes con endometriosis, principalmente los de fase proliferativa, estaría dado en parte, por la actividad local de P<sub>450</sub>Arom. Esto explicaría la mayor concentración de estradiol secretado por los endometrios de estas pacientes respecto al control. Resultados preliminares en homogeneizados de endometrios ex vivo han mostrado que la concentración de estradiol también es mayor en el grupo de endometriosis, sugiriendo una mayor síntesis de estradiol, más que un aumento de su secreción. A pesar de ello, no podemos descartar contaminación sanguínea como respuesta a la mayor angiogénesis descrita en la endometriosis que sería consecuencia al desbalance producido entre la mayor expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y al regulador negativo de angiogénesis trombospondina-1 (TSP-1)<sup>26,27</sup>.

No obstante, explantes de endometrios de mujeres con endometriosis convierten testosterona a estradiol sugiriendo que la enzima P<sub>450</sub>Arom expresada en este tejido presenta actividad local, indicando que el mRNA se traduciría a una proteína activa capaz de convertir andrógenos en estrógenos y que el estradiol detectado correspondería más a una síntesis de novo que a contaminación sanguínea. Bulun et al<sup>13</sup> demostraron la expresión del mRNA de la P<sub>450</sub>Arom en endometrio eutópico de mujeres con endometriosis, sin embargo, no observaron actividad enzimática. Esta discrepancia con nuestros resultados, posi-

blemente, es debido al uso de células estromales endometriales aisladas; recientemente, ha sido localizada la proteína de la enzima P<sub>450</sub>Arom en el citoplasma de las células del epitelio glandular y muy levemente en el estroma por inmunohistoquímica<sup>22,23</sup>.

Tradicionalmente, los estrógenos actúan por vía endocrina a través de sus receptores nucleares específicos, a diferencia de lo observado en patologías dependientes de estrógenos como cáncer de mama, en donde se han demostrado mecanismos paracrinos<sup>28</sup>. En endometriosis y leiomiomas, el estradiol actuaría vía intracrina, ya que sería sintetizado en el citoplasma de las células y actuaría a través de los receptores presentes en las mismas células<sup>29</sup>.

La endometriosis está fuertemente asociada con infertilidad por mecanismos complejos cuyos factores potenciales pueden ser defectos en la foliculogénesis, implantación embrionaria, y por la acción agresiva de los factores inflamatorios contenidos en el fluido peritoneal, entre otros<sup>30-33</sup>. En la literatura existe controversia en la respuesta de estas pacientes a la fertilización *in vitro* (FIV), encontrándose publicaciones en las cuales el número de ovocitos maduros, tasas de fertilización, implantación y embarazo son similares al compararlos con pacientes con infertilidad

por factor tubario o masculino<sup>34,35</sup>, en tanto en otras, se reporta que la endometriosis tiene efectos adversos que afectan estos parámetros de manera importante<sup>33,36</sup>. En nuestro centro se ha observado que las tasas de embarazos son significativamente menores comparadas con pacientes que acuden al FIV por otras indicaciones<sup>37</sup>. El ambiente microestrogénico, como consecuencia de la mayor actividad de P<sub>450</sub>Arom en estas pacientes en comparación a las normales, podría contribuir o estar relacionada con una alteración en la receptividad uterina afectando a moléculas relacionadas con la implantación embrionaria. Recientemente ha sido publicado que la mayor abundancia de mRNA de P<sub>450</sub>Arom en endometrios de mujeres infértiles estaría asociada con el fracaso del FIV<sup>38</sup>. La expresión cíclica de los receptores de estradiol y progesterona en el endometrio durante el ciclo menstrual y la regulación positiva ejercida por estradiol sobre los receptores de progesterona<sup>39,40</sup>, pudieran estar alteradas ante la exposición a un microambiente estrogénico como el observado en estas pacientes.

Se requieren más estudios para esclarecer los mecanismos moleculares de regulación de la P<sub>450</sub>Arom y explicar así, la baja fertilidad de estas pacientes y los síntomas menstruales asociados a enfermedades benignas dependientes de estradiol.

#### REFERENCIAS

1. WILLIAMS TJ, PRATT JR. Endometriosis in 1000 consecutive celiotomies: incidence and management. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 129: 245-50.
2. MAHMOOD TA, TEMPLETON A. Prevalence and genesis of endometriosis. *Human Reprod* 1991; 6: 544-9.
3. MURPHY AA. Clinical aspects of endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2002; 955: 1-10.
4. PRENTICE A. Endometriosis. *BMJ* 2001; 323: 93-5.
5. VIGNALI M, INFANTINO M, MATRONE R, CHIODO I, SOMIGLIANA E, BUSACCA M ET AL. Endometriosis: novel etiopathogenetic concepts and clinical perspectives. *Fertil Steril* 2002; 78: 665-78.
6. BULUN SE, ZEITOUN KM, TAKAYAMA K, SIMPSON ER, SASANO H. Aromatase as a therapeutic target in endometriosis. *TEM* 2000; 11: 22-7.
7. WOOD AJJ. Treatment of endometriosis. *N Engl J Med* 2001; 345: 266-75.
8. NOBLE LS, SIMPSON E, JOHNS A, BULUN SE. Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 174-9.
9. KITAWAKI J, KOSHIBA H, ISHIHARA H, KUSUKI I, TSUKAMOTO K, HONJO H. Progesterone induction of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 during the secretory phase occurs in the endometrium of estrogen-dependent benign diseases but not in normal endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3292-6.
10. GIUDICE LC, TELLES TL, LOBO S, KAO L. The molecular basis for implantation failure in endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2002; 955: 252-64.
11. SEBASTIAN S, BULUN SE. A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the human genome

- project. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4600-2.
12. HARADA N, UTSUMI T, TAKAGI Y. Tissue-specific of the human aromatase cytochrome P<sub>450</sub> gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 11312-6.
  13. BULUN SE, MAHENDROO MS, SIMPSON ER. Polymerase chain reaction amplification fails to detect aromatase cytochrome P<sub>450</sub> transcripts in normal human endometrium or decidua. *JCEM* 1993; 76: 1458-63.
  14. ACOSTA AA, BUTTRAM VC, FRANKLIN RR, BESCH PK. A proposed classification of pelvic endometriosis. *Obstet Gynecol* 1973; 42: 19-25.
  15. NOYES RW, HERTIG AT, ROCK J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1950; 1: 3-25.
  16. JOHNSON MC, MALIQUEO M, BORIC MA, VILLAVICENCIO A, VANTMAN D, VEGA M. Differential *in vitro* actions of nitric oxide on human endometrial cell survival. *Fertil Steril* 2004; 81: 176-84.
  17. JOHNSON MC, DÍAZ HA, STOCO C, PALOMINO A, DEVOTO L, VEGA M. Antisteroidogenic action of nitric oxide on human *corpus luteum in vitro*. *Endocrine* 1999; 11: 31-6.
  18. CASTRO A, JOHNSON MC, ANIDO M, CORTÍNEZ A, GABLER F, VEGA M. Role of nitric oxide and Bcl-2 family genes in the regulation of endometrial apoptosis. *Fertil Steril* 2002; 78: 587-95.
  19. DHEENADAYALU K, MAK I, GORDTS S, CAMPO R, HIGHAM J, PUTTEMAMNS P ET AL. Aromatase P<sub>450</sub> messenger RNA expression in eutopic endometrium is not a specific marker for pelvic endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 78: 825-9.
  20. BULUN SE, SIMPSON ER, WORD RA. Expression of the CYP19 gene and its product aromatase cytochrome P<sub>450</sub> in human uterine leiomyoma tissues and cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 736-43.
  21. ISHIHARA H, KITAWAKI J, KADO N, KOSHIBA H, FUSHIKI S, HONJO H. Gonadotropin-releasing hormone agonist and danazol normalize aromatase cytochrome P<sub>450</sub> expression in eutopic endometrium from women with endometriosis, adenomyosis, or leiomyomas. *Fertil Steril* 2003; 79 (Suppl 1): 735-42.
  22. KITAWAKI J, KUSUKI I, KOSHIBA H, TSUKAMOTO K, FUSHIKI S, HONJO H. Detection of aromatase cytochrome P<sub>450</sub> in endometrial biopsy specimens as a diagnostic test for endometriosis. *Fertil Steril* 1999; 72: 1100-6.
  23. KITAWAKI J, NOGUCHI T, AMATSU T, MAEDA K, TSUKAMOTO K, YAMAMOTO T ET AL. Expression of aromatase cytochrome P<sub>450</sub> protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol Reprod* 1997; 57: 514-9.
  24. CRAMER DW, MISSMER SA. The epidemiology of endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2002; 955: 11-22.
  25. MOEN MH, STOKSTAD T. A long-term follow-up study of women with asymptomatic endometriosis diagnosed incidentally at sterilization. *Fertil Steril* 2002; 78: 773-6.
  26. TAN X-J, LANG J-H, LIU D-Y, SHEN K, LENG J-H, ZHU L. Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 78: 148-53.
  27. DONNEZ J, SMOES P, GILLEROT S, CASANAS-ROU F, NISOLLE M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 1998; 13: 1686-90.
  28. BULUN SE, PRICE TM, AITKEN J, MAHENDROO MS, SIMPSON ER. A Link between breast cancer and local estrogen biosynthesis suggested by quantification of breast adipose tissue aromatase cytochrome P<sub>450</sub> transcripts using competitive polymerase chain reaction after reverse transcription. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1622-8.
  29. BULUN SE, YANG S, FANG Z, GURATES B, TAMURA M, SEBASTIAN S. Estrogen production and metabolism in endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2002; 955: 75-85.
  30. GARCÍA-VELASCO JA, ARICI A. Is the endometrium or oocyte/embryo affected in endometriosis? *Human Reprod* 1999; 14 (Suppl 2): 77-89.
  31. LESSEY B. Implantation defects in infertile women with endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2002; 955: 265-80.
  32. MULAYIM N, ARICI A. The relevance of the peritoneal fluid in endometriosis-associated infertility. *Human Reprod* 1999; 14 (Suppl 2): 67-76.
  33. MAHUTTE NG, ARICI A. New advances in the understanding of endometriosis related infertility. *J Reprod Immunol* 2002; 55: 73-83.
  34. OLIVENNES F, FELDBERG D, LIU HC, COHEN J, MOY F, TOSENWAKS Z. Endometriosis: a stage analysis the role of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995; 64: 392-8.
  35. GIBBONS WE. Management of endometriosis in fertility patients. *Fertil Steril* 2004; 81: 1204-5.

36. BARNHART K, DUNSMOOR-SU R, COUTIFARIS C. Effect of endometriosis on *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 2004; 77: 1148-55.
37. HUNEUS A, ALBA JF, DEVOTO L, SOTO E, VANTMAN D, GUNTHER A ET AL. Resultados en tratamientos convencionales de infertilidad. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2000; 65: 255-61.
38. BROSENS J, VERHOEVEN H, CAMPO R, GIANAROLI L, GORDTS S, HAZEKAMP J ET AL. High endometrial aromatase P<sub>450</sub> mRNA expression is associated with poor IVF outcome. *Human Reprod* 2004; 19: 352-6.
39. LESSEY BA, KILLAM AP, METZGER DA, HANEY AF, GREENE GL, McCARTY KS. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 334-9.
40. MESIANO S, CHAN EC, FITTER JT, KWEEK K, YEO G, SMITH R. Progesterone withdrawal and estrogen activation in human parturition are coordinated by progesterone receptor A expression in the myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2924-30.

#### *Agradecimientos*

Los autores agradecen al Dr. Juan Carlos Barros (Hospital Clínico San Borja Arriarán, Servicio de Salud) por su rol de reclutar mujeres del grupo control y en el procedimiento quirúrgico utilizado. También agradecen a las mujeres que donaron tejido para este estudio.