



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Estudio de las interacciones del promotor del receptor a progesterona con regiones distales en células estromales de endometrio humano tratadas con estradiol.”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Ixchel Nayeli González García

Tutor Principal

Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Facultad de Química

Miembros del Comité Tutor

Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez
Facultad de Química

Dra. Mayra Furlan Magaril
Instituto de Fisiología Celular

Ciudad de México. Junio 2021



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.

González García Ixchel Nayeli
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día **22 de marzo** del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestra en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Estudio de las interacciones del promotor del receptor a progesterona con regiones distales en células estromales de endometrio humano tratadas con estradiol**", dirigida por el/la Dr(a). **Camacho Arroyo Ignacio**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Lorena Aguilar Arnal
VOCAL	Rodrigo González Barrios de la Parra
VOCAL	Mauricio Rodríguez Dorantes
VOCAL	Lidya Sumiko Morimoto Martínez
SECRETARIO	Ernesto Soto Reyes Solís

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a **22 de marzo de 2021**
COORDINADORA



Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

Agradecimientos

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

A la asesoría por parte del comité tutorial formado por el Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez, de la Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química y a la Dra. Mayra Furlan Magaril del Departamento de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Al Consejo Nacional de Nacional de Ciencia (CONACyT) por el apoyo otorgado a través de la beca para estudiantes de posgrado (CVU: 967333).

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM por brindar el apoyo académico-administrativo para realizar este trabajo.

Esta investigación fue realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT con número IA209520, al CONACyT (número de proyecto A1-S-26749) y al Instituto Nacional de Perinatología 'Isidro Espinosa de los Reyes', proyectos: 571, 3000-20109-01-571-17 y 2019-1-26. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida

Índice

1. Abreviaturas	1
2. Resumen	3
3. Introducción	4
4. Antecedentes	5
4.1. Características generales del endometrio	5
4.1.1. Decidualización	7
4.1.2. Estudios de la decidualización en células estromales inmortalizadas.	9
4.2. Generalidades de la progesterona	10
4.2.1. Receptor intracelular a progesterona (PR).....	11
4.2.1.1. Mecanismo de acción.....	12
4.2.2. Importancia del PR en el endometrio	13
4.2.3. Regulación transcripcional del receptor intracelular de progesterona (<i>PGR</i>)	14
4.2.4 La regulación epigenética del <i>PGR</i>	16
4.2.5 La regulación del <i>PGR</i> por RNAs no codificantes	17
4.3. Organización nuclear del genoma	18
4.3.1. Interacciones de la cromatina entre promotores y secuencias potenciadoras.....	22
4.3.2. El papel de los receptores a hormonas esteroides en la organización 3D del genoma	23
5. Planteamiento del problema	26
6. Hipótesis	27
7. Objetivos	27
8. Metodología	28
9. Resultados	40
10. Discusión	45
11. Perspectivas	49
12. Conclusiones	49
13. Referencias	50
Anexo I. Figuras complementarias	58
Anexo II Artículo de Revisión publicado “The role of epigenetic mechanisms in the regulation of gene expression in the cyclical endometrium”	59

1. Abreviaturas

3C- Captura conformacional del cromosoma

AF (inglés)- Función activadora

AMPc -Adenosín monofosfato cíclico

DNA (inglés)- Ácido desoxirribonucleico

E2- Estradiol

ER α - Receptor intracelular a estradiol alfa

ERE- Elementos de respuesta a estrógenos

GEO (inglés)- Gene Express Omnibus

H3K4me1- Monometilación de la lisina 4 de la histona 3

H3K4me3- Trimetilación de la lisina 4 de la histona 3

H3K27ac- Acetilación de la lisina 27 de la histona 3

H3K27me3- Trimetilación de la lisina 27 histona 3

IGFBP1- Proteína 1 de unión al factor de crecimiento similar a insulina

MPA- Medroxiprogesterona.

ncRNA (inglés)- RNA no codificantes

P4- Progesterona

pb- pares de bases

PCR -Reacción en cadena de la polimerasa

PGR- Gen del receptor a progesterona

PR (inglés)- Receptor intracelular a progesterona

PR-A- Isoforma A del receptor intracelular a progesterona

PR-B- Isoforma B del receptor intracelular a progesterona

PRL- Prolactina

PTM (inglés)-Modificaciones postraduccionales

SR (inglés)- Receptores de las hormonas esteroides

TADs (inglés)-Dominios topológicamente asociados.

THESC (inglés)- línea celular inmortalizada de células estromales endometriales.

TSS (inglés)- Sitio de inicio de la transcripción.

2. Resumen

El endometrio es un tejido que se encuentra en la capa interna del útero y su función es regulada por las hormonas sexuales, estradiol (E2) y progesterona (P4). El E2 induce la proliferación de las células estromales y epiteliales del endometrio durante la fase proliferativa del ciclo menstrual. Por otro lado, la P4 es el principal factor que desencadena la deciduización de las células estromales, que consiste en un cambio morfológico y bioquímico necesario para la implantación del blastocisto en caso de haber fecundación del óvulo.

Para llevar a cabo estos cambios, la P4 actúa principalmente a través de su receptor intracelular (PR), aumentando la transcripción de los genes necesarios en la deciduización. Se ha postulado que la transcripción del gen que codifica para el PR, es decir el *PGR*, es regulada principalmente por estrógenos al unirse a su receptor intracelular alfa ($ER\alpha$). Sin embargo, no se ha encontrado asociación de $ER\alpha$ en el promotor del *PGR*, por lo que $ER\alpha$ podría encontrarse en otras regiones regulando la transcripción del *PGR*. La organización tridimensional del genoma dentro del núcleo es relevante para la expresión génica, ya que, dependiendo del tipo y ambiente celular se producen rearrreglos en la cromatina. Una de las modificaciones en la disposición del genoma que puede presentarse es aquella que se da entre secuencias potenciadoras de la transcripción y los promotores. Por ello, en el presente trabajo se buscaron posibles secuencias potenciadoras del genoma que pueden estar en contacto con el promotor del *PGR* y en las que podría estar asociado $ER\alpha$.

En este trabajo se observó la expresión del *PGR* en un modelo *in vitro* de células estromales endometriales (THESC) en presencia del estímulo de la deciduización: E2, medroxiprogesterona y AMPc a las 24 h. A través de un análisis *in silico* de diferentes bases de datos se encontraron 8 posibles regiones distales al promotor que pueden regular la transcripción del *PGR* por acción de $ER\alpha$. Estas regiones explicarían la activación de la transcripción del gen por acción hormonal, aún cuando $ER\alpha$ no se encuentra en el promotor.

3. Introducción

El útero, uno de los órganos que integran el aparato reproductor femenino, está dividido en tres capas: el perimetrio, miometrio y endometrio (Marieb, 2008). El endometrio está compuesto principalmente por células epiteliales y estromales, y su función está regulada por las hormonas sexuales progesterona (P4) y estradiol (E2) (Simón, 2009; Bieber, 2010). Durante el ciclo menstrual, el endometrio atraviesa por tres fases: la primera es la menstrual, seguida de la fase proliferativa y finalmente, después de la ovulación, la secretora. En la fase menstrual se presenta la descamación del endometrio dando lugar a la menstruación, en la fase proliferativa hay una regeneración del endometrio promovida principalmente por E2. Finalmente, en la fase secretora hay cambios morfológicos y bioquímicos en las células estromales conocidos como decidualización, regulados principalmente por P4. Estos cambios favorecen la receptividad del endometrio hacia el blastocisto en caso de haber ocurrido la fecundación del óvulo (Su y Fazleabas, 2015). Estudios *in vitro* han demostrado que las células estromales pueden decidualizarse con el uso de un análogo de la P4, medroxiprogesterona (MPA), E2 y adenosín monofosfato cíclico (AMPC), siendo MPA el factor principal que induce la decidualización, tal como ocurre *in vivo* (Logan *et al.*, 2010; Logan *et al.*, 2013; Szwarc *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2019).

La P4 actúa principalmente a través de su receptor intracelular específico (PR) que es un factor de transcripción regulado por ligando, y está codificado por el gen *PGR*, el cual se encuentra en el locus 11q22-23. La expresión del *PGR* está regulada por diversos factores de transcripción que actúan como represores o activadores de la transcripción. Además de la regulación clásica a través de factores de transcripción, los mecanismos epigenéticos desempeñan un papel importante en la regulación de la transcripción del *PGR* (Young, 2013; Camacho-Arroyo *et al.*, 2017; Andersson y Sandelin, 2020). Dentro de los mecanismos de regulación epigenética se ha postulado como factor fundamental a la organización nuclear del genoma para la activación o represión de los genes dependiendo del contexto celular (Dixon *et al.*, 2012; Cavalli y Misteli, 2013; Le Dily y Beato, 2018). Hasta el momento se

desconoce el papel que tiene la topología del genoma durante los cambios de decidualización que se presentan en el endometrio.

4. Antecedentes

4.1. Características generales del endometrio

Los órganos internos que componen al aparato reproductor femenino son: ovarios, trompas de Falopio, útero y vagina. El útero se encuentra dividido en tres capas: 1) el perimetrio, la capa más externa, 2) el miometrio, formado principalmente por músculo liso y 3) el endometrio, capa interna, donde se lleva a cabo la implantación del óvulo fecundado (Marieb, 2008). El endometrio es un tejido altamente vascularizado y está constituido por células epiteliales luminares y glandulares, células estromales, células del sistema inmune como linfocitos y macrófagos, células endoteliales, células de musculo liso y recientemente se ha caracterizado un tipo de células epiteliales ciliadas (Wang *et al.*, 2020) . La funcionalidad, proliferación y diferenciación de las células epiteliales y estromales es regulada por las hormonas P4 y E2, que inducen cambios cíclicos que favorecen la receptividad del endometrio para la implantación embrionaria y que contribuyen al desarrollo de la gestación (Bieber, 2010). Durante el ciclo menstrual, el cual tiene una duración de aproximadamente 28 días, el endometrio atraviesa por tres fases diferentes. La primer fase o fase menstrual comienza en el día 1 del ciclo hasta alrededor del día 4 y se caracteriza por una descamación del endometrio y su posterior salida por el tracto vaginal. La fase proliferativa se presenta después del sangrado menstrual, hasta aproximadamente el día 13 del ciclo. En esta etapa el endometrio responde a los estímulos de estrógenos, principalmente de E2, el cual promueve la proliferación de células estromales, glándulas y células endoteliales de los vasos sanguíneos. Después de la ovulación, alrededor del día 14, el endometrio comienza a ser receptivo a P4 y tiene una transición de la fase proliferativa a la fase secretora. En los primeros días de la fase secretora, se producen principalmente cambios morfológicos glandulares, mientras que en la fase secretora media y avanzada los cambios predominantes se observan en las células estromales, en un proceso conocido como decidualización. La decidualización es un proceso de cambios bioquímicos y morfológicos característico de las células estromales del endometrio

durante la fase secretora del ciclo menstrual. Si la concepción no ha ocurrido, alrededor del día 27, el endometrio entra en fase premenstrual para posteriormente entrar a la fase menstrual y dar inicio a un nuevo ciclo (Esponera Sanz, 1997; Mazor y Kurman 2007; Filicori, 2015)

En caso de que ocurra la fecundación, las células estromales decidualizadas favorecerán la implantación del blastocisto al proveer soporte y nutrientes para su desarrollo. Posteriormente las interacciones entre los trofoblastos y las células decidualizadas formarán la decidua, compartimiento en el cual ocurre la interacción materno-fetal (Su y Fazleabas 2015).

Los cambios por los que atraviesa el endometrio durante el ciclo menstrual son producto de la expresión diferencial y cíclica de distintos genes. Se ha demostrado que existen grupos de genes cuya expresión es específica en una fase del ciclo menstrual o durante la transición de éstas, generando sub fases dependiendo de los genes activos (Wang *et al.*, 2020). Los mayores cambios de expresión en el ciclo menstrual se presentan durante la fase secretora en el tejido endometrial; esta fase está dirigida por P4 y dentro de este periodo se encuentra la ventana de implantación del blastocisto. En la fase de la menstruación, se expresan genes inductores y reguladores de apoptosis, así como genes proinflamatorios (Ponnampalam *et al.*, 2004) **(Fig 1)**.

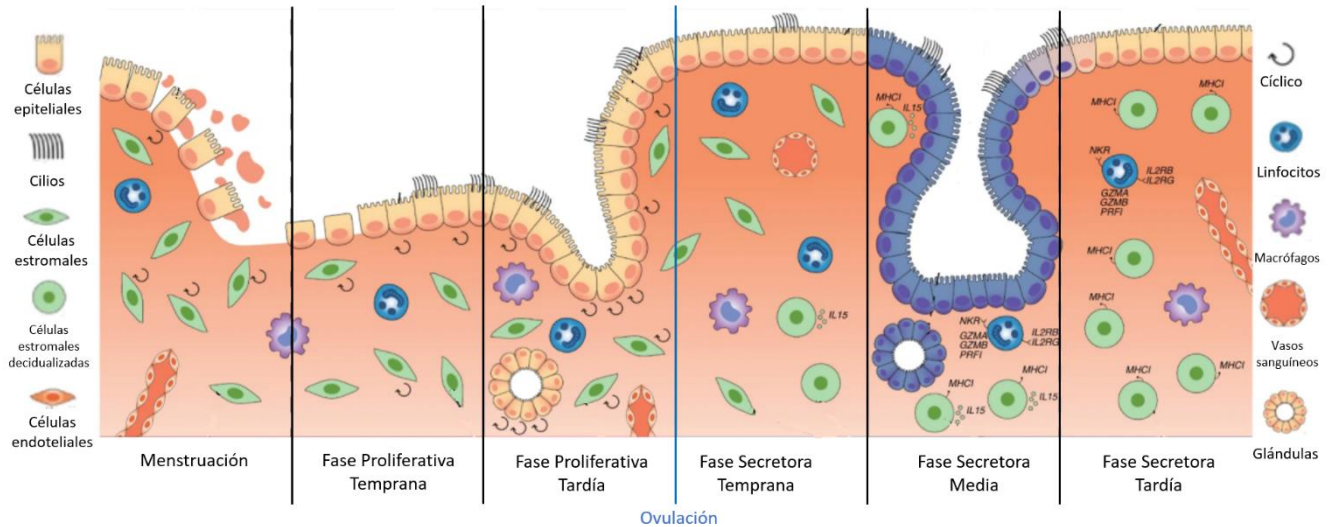


Fig. 1 Composición celular del endometrio y sus fases durante el ciclo menstrual. El endometrio está compuesto de células epiteliales luminares, glandulares y ciliares, células estromales, células del sistema inmune como linfocitos y macrófagos y células endoteliales. Las células estromales tienen un cambio en su morfología y a nivel bioquímico, al entrar en la fase secretora. Durante esta fase, se presentan los mayores cambios transcripcionales en los diversos tipos celulares. Hay una mayor expresión de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I) e interleucina 15 (IL15) en células estromales decidualizadas. Por otro lado, los linfocitos presentan mayor expresión de los genes: *GZMA*, *GZMB*, *PRFI*, *IL2RB*, *IL2RG* y de receptores de natural killer (NKR). Las células epiteliales tienen un cambio abrupto en la expresión de genes como: *GPX3* y *PAEP*, en el periodo de la ventana de implantación, durante la fase secretora media. *Modificado de Wang et.al.2020*

4.1.1. Decidualización

La decidualización comienza aproximadamente 6 días después de la ovulación y comprende cambios morfológicos y bioquímicos de las células estromales y glándulas epiteliales, hay una afluencia de células natural killer uterinas (uNK) especializadas y una remodelación de los vasos sanguíneos. En la decidualización, las células estromales pasan de una morfología elongada de tipo fibroblastoide a una forma circular de tipo epitelial (Okada et al. 2018). Este proceso ocurre en respuesta a P4 y E2, siendo la P4 el principal agente decidualizante (Gúrpide, E., 1997).

Proteínas como la prolactina (PRL) y la proteína 1 de unión a factor de crecimiento similar a insulina (IGFBP1) son utilizados como biomarcadores de la decidualización, ya que son expresados por células estromales durante este proceso (Ramathal et al., 2010) (**Fig 2**). Se ha sugerido que estas proteínas están

implicadas en la regulación de la invasión de los trofoblastos al endometrio, en la prevención del rechazo del embrión por parte del sistema inmunológico materno, en la regulación de las células uNK y fomentan la angiogénesis (Okada et al. 2018). Estos factores son importantes para la invasión eficaz del blastocisto y para el desarrollo óptimo del embarazo.

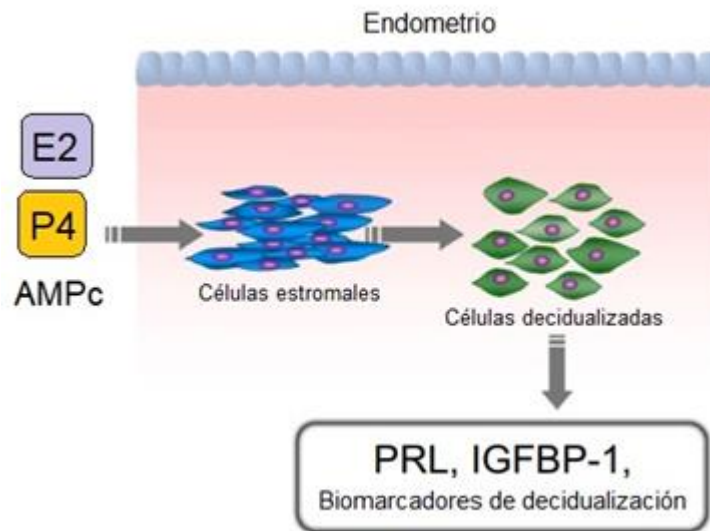


Fig. 2 Proceso de decidualización en células estromales endometriales. Las hormonas sexuales, estradiol (E2) y progesterona (P4) junto con el AMPc inducen la decidualización. La P4 promueve la expresión de diversos genes como *IGFBP1* y *PRL* necesarios para el cambio morfológico y bioquímico de células estromales durante la decidualización. *Modificado de Okada et al. 2018.*

En estudios *in vitro*, se ha demostrado que la decidualización puede inducirse en presencia de AMPc en células estromales de endometrio (Aghajanova et al. 2009; Klemmt et al. 2006). La decidualización inducida por AMPc se debe a la activación de la vía de señalización de la proteína cinasa A, sin embargo, la decidualización *in vitro* se alcanza de forma más rápida al añadir AMPc, P4 y E2 al cultivo de las células estromales (Gúrpide, E. 1997). No obstante, existen diversos genes en las células estromales endometriales que se encuentran regulados específicamente por

P4 y no por AMPc (Okada et al. 2018), esto sugiere diferentes acciones por parte de ambas moléculas para desencadenar la deciduación adecuadamente.

La deciduación es un cambio regulado por hormonas, principalmente P4, fundamental para el funcionamiento del endometrio. Por ello, además de proporcionar información sobre los mecanismos necesarios para la implantación del blastocisto, la inducción de la deciduación en células estromales ha sido utilizada para un mejor entendimiento, a nivel molecular, de enfermedades que afectan al endometrio (Klemmt *et al.*, 2006; Aghajanova *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2018). Las principales patologías que afectan al endometrio son: cáncer de endometrio, endometriosis y miomas uterinos (Patel *et al.*, 2015). La desregulación hormonal o una expresión inadecuada de los receptores hormonales son factores de riesgo para el desarrollo de dichas enfermedades. Los estudios *in vitro* son un primer acercamiento para conocer la importancia de las hormonas y sus receptores nucleares en el funcionamiento normal del endometrio y su relevancia en el desarrollo de las patologías.

4.1.2. Estudios de la deciduación en células estromales inmortalizadas.

La línea celular de células estromales de endometrio humano inmortalizadas (THESC, CRL-4003) se ha utilizado como modelo para estudiar las diversas funciones que ocurren en el endometrio. El principal mecanismo estudiado en esta línea celular es la deciduación, ya que, este proceso es vital para la implantación y desarrollo del blastocisto (Okada *et al.*, 2018). La inducción a la deciduación en THESC se han llevado a cabo utilizando E2, MPA (un análogo sintético de la P4), y AMPc o en su defecto únicamente MPA y AMPc (Jiang *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2018; Haller *et al.*, 2019; Szwarc *et al.*, 2019).

La inducción de la deciduación en un modelo *in vitro* ha permitido encontrar diversos genes involucrados en este proceso, así como, moduladores del mismo (Haller *et al.*, 2019). Por otro lado, utilizando el modelo de las células THESC se han identificado factores de transcripción necesarios en este proceso como es el caso de la proteína de respuesta de crecimiento temprano (EGR1), la cual es necesaria para el cambio morfológico de las células estromales a células de tipo epitelial

(Szwarc *et al.*, 2019). Otro factor de transcripción que se ha estudiado en células THESC es FoxM1 cuyo papel es la regulación de la expresión de ciclina b1 y STAT3 necesarios para la proliferación celular y decidualización, respectivamente (Jiang *et al.*, 2015). Al realizar tratamientos hormonales para inducir la decidualización, se ha demostrado que se requiere una concentración específica de P4 (1 µg), ya que, a concentraciones altas (4 y 20 µg) la expresión de los marcadores de decidualización disminuye, lo que puede indicar una alteración en este proceso (Liang *et al.*, 2018). Respecto a las vías de señalización involucradas, la activación anormal de la vía Notch-1 está asociada con una disminución en la expresión del PR y con ello los efectos de la P4 en el endometrio (Brown *et al.*, 2018). El co-cultivo de células epiteliales y células THESC es otro modelo *in vitro* que se ha propuesto para estudiar patologías del endometrio y conocer la dinámica que tienen ambos tipos celulares en condiciones patológicas (Schutte *et al.*, 2015).

Aunque se han estudiado diversos mecanismos involucrados en la decidualización en el modelo *in vitro* de células estromales endometriales, la regulación de la expresión de los genes que desencadenan este fenómeno, como el *PGR*, no ha sido abordada. Por ello, es necesario estudiar los posibles mecanismos de regulación de la expresión del *PGR* para comprender los inicios de la decidualización y las posibles causas que podrían originar patologías del endometrio por una desregulación de la acción hormonal.

4.2. Generalidades de la progesterona

La P4 es una hormona derivada del colesterol, está compuesta por 21 carbonos y es sintetizada principalmente en gónadas, placenta, glándulas adrenales y el sistema nervioso central (Camacho-Arroyo *et al.*, 2017). La P4 es esencial para las funciones del aparato reproductor femenino, en especial después de la ovulación donde se produce un incremento en los niveles de P4. Este aumento genera los cambios en el endometrio que favorecerán la implantación del blastocisto (Filicori, 2015). Las acciones más notorias de la P4 en el endometrio ocurren principalmente en las células estromales durante la fase secretora, en la cual dichas células presentan un cambio fenotípico, pasando de una morfología de tipo fibroblasto a

una más redonda de tipo epitelial en un proceso conocido como deciduación (Okada *et al.*, 2018). En ausencia de fecundación el principal productor de P4 es el cuerpo lúteo, sin embargo, si la concepción llega a ocurrir los trofoblastos incrementarán la producción de P4, convirtiéndose en la principal fuente de producción de la hormona (Taraborrelli, 2015).

La P4 actúa, principalmente mediante el PR, el cual funciona como factor de transcripción formando un complejo de transcripción que a su vez recluta diversos remodeladores de la cromatina para activar o reprimir la transcripción de los genes blanco. En años recientes se han descrito diversos mecanismos rápidos de acción para P4 a través de vías de señalización, cascadas de segundos mensajeros o receptores de membrana (Camacho-Arroyo *et al.*, 2017). En el aparato reproductor femenino los efectos de la P4 se encuentran regulados en su mayoría por el PR (Patel *et al.*, 2015), mientras que, las posibles acciones mediante mecanismos rápidos de acción aún se encuentran en estudio.

4.2.1. Receptor intracelular a progesterona (PR)

El PR pertenece a la familia de receptores nucleares que al interaccionar con su ligando (P4) actúa como factor de transcripción y regula la expresión de sus genes blanco (Camacho-Arroyo *et al.*, 2017). El PR está codificado por el gen *PGR*, el cual se encuentra ubicado en el cromosoma 11q22.1. El *PGR* codifica para tres isoformas: PR-A, PR-B y PR-C; sin embargo, las acciones de P4 están atribuidas principalmente a PR-A (94kDa) y PR-B (116kDa) (Hirata *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2015).

Ambas isoformas del PR están compuestas por una región amino terminal donde se encuentra las funciones activadoras (AF1) e inhibidoras, un dominio conservado de unión a DNA y una región tipo bisagra. En la región carboxilo terminal se localizan los dominios de unión al ligando y una función activadora dependiente de ligando (AF2). El PR-B contiene un dominio adicional de 164 aminoácidos en la región amino terminal respecto a PR-A, conocido como el segmento B, el cual le confiere una región activadora adicional (AF3) que interactúa con AF1 y AF2, dando lugar a efectos alostéricos en la conformación de la proteína (Young 2013; Camacho-

Arroyo *et al.*, 2017). El patrón de expresión, la función y la regulación de PR-A y PR-B es diferente en cada tejido en el que se encuentran expresados, y el efecto de la P4 depende de la tasa de expresión de ambas isoformas (Patel *et al.*, 2015).

Ambas isoformas del PR son esenciales el funcionamiento adecuado endometrio. Una vez activados por la P4, el PR actúa como factor de transcripción para activar la expresión de los genes necesarios durante la deciduización (Rosario *et al.*, 2003).

4.2.1.1. Mecanismo de acción

Para llevar a cabo sus funciones, a través del PR, la P4 primero debe internalizarse en la célula donde se unirá al PR, el cual se encuentra en el citoplasma unido a la proteína chaperona de choque térmico 90 (Hsp90) y a otras co-chaperonas. La interacción entre P4 y PR genera un cambio conformacional que promueve la fosforilación del PR, su posterior disociación del complejo de chaperonas, la dimerización del receptor y, por último, su translocación al núcleo (Camacho-Arroyo *et al.*, 2017). El receptor activo se une a los elementos de respuesta a progesterona localizados en las regiones reguladoras de los genes blanco o en su defecto puede asociarse con otros factores de transcripción como Sp1, CREB, p300 o AP-1 (Goldhar *et al.*, 2011; Khader *et al.*, 2021). La transcripción de dichos genes es iniciada a través del reclutamiento de otros correguladores y complejos remodeladores de la cromatina que favorecen o impiden la asociación de la maquinaria transcripcional al DNA. Una vez que el receptor se disocia del DNA, es marcado para su degradación (Camacho-Arroyo *et al.*, 2017) **(Fig 3)**.

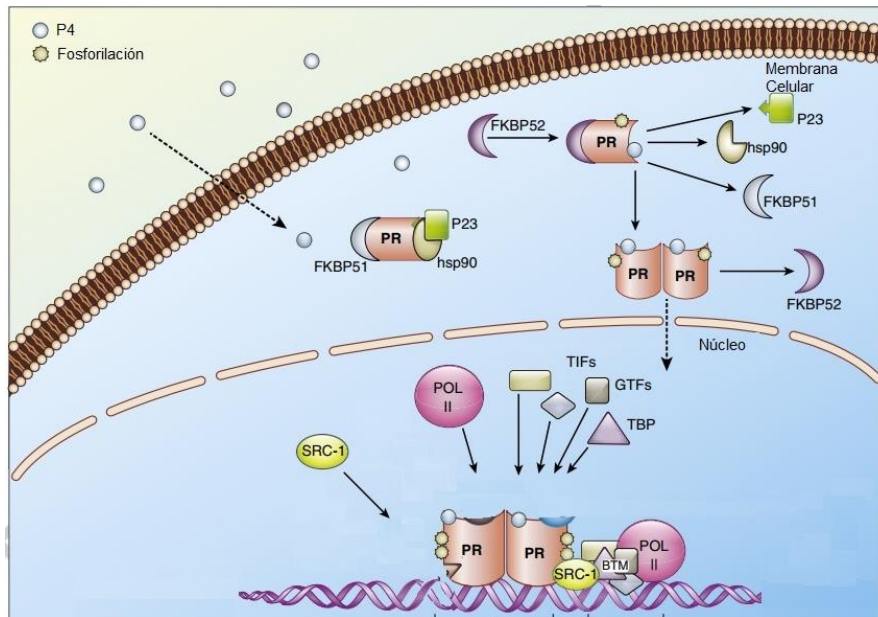


Fig. 3 Mecanismo de acción clásico de la progesterona. El mecanismo clásico comprende la acción del receptor nuclear (PR) que en ausencia de la hormona interactúa con la chaperona Hsp90 y las co-chaperonas FKBP51 y p23. Una vez que la hormona se internaliza en la célula e interactúa con su receptor, se produce un cambio conformacional que induce la fosforilación del receptor. El receptor se disocia de las chaperonas y co-chaperonas para dimerizarse y translocarse al núcleo. El receptor activo se une a secuencias específicas de progesterona (PRE) en los genes blanco para favorecer la transcripción de dichos genes a través de diferentes mecanismos, por ejemplo, el reclutamiento del co-activador SRC-1. TIF, transcription initiation factor; GTF, general transcription factor; TBP, TATA binding protein; Pol, RNA polimerasa II; BTM, basal transcription machinery. *Modificado de Camacho-Arroyo et al. 2017*

4.2.2. Importancia del PR en el endometrio

La P4 tiene un papel importante en el endometrio al ser el principal componente que regula la decidualización de las células estromales, favorece la implantación del blastocisto, y se encarga del mantenimiento del embarazo (Taraborrelli, 2015; Okada *et al.*, 2018).

La P4 actúa a través del PR para favorecer la expresión de genes inductores de decidualización y a su vez contrarrestar los efectos proliferativos de E2, al silenciar los genes de proliferación activados por estrógenos (Rosario *et al.*, 2003). Cuando los efectos proliferativos de E2 no son contrarrestados por la P4 se pueden presentar patologías como cáncer de endometrio o endometriosis (Patel *et al.*, 2015).

La expresión del PR es inducida principalmente por estrógenos, los cuales actúan a través de su receptor intracelular (ER). En el endometrio, los distintos tipos celulares tienen respuestas diferenciales al estímulo de P4 (Rosario *et al.*, 2003). Las diferentes isoformas del PR pueden cumplir funciones diferentes en el endometrio, sin embargo, existe controversia sobre su actividad en este tejido. Se han asociado funciones inhibitorias de PR-A hacia ER y PR-B, por otro lado, en ratones knock-out de PR-A, se observa una inhibición de la decidualización respecto a ratones control (Conneely *et al.*, 2002). En la decidualización, PR-B y PR-A regulan diferentes genes. PR-B es mayormente expresado y regula a la baja genes relacionados con la proliferación celular, por otro lado, genes relacionados con angiogénesis están sobreexpresados por acción de esta isoforma. En endometrio, PR-B favorece la expresión de PR-A y ésta modula los efectos de PR-B (Kaya *et al.*, 2015). La ausencia de expresión del PR-B se ha asociado a pérdida del embarazo, por una incorrecta adhesión del blastocisto o endometriosis (Patel *et al.*, 2015). Estos resultados indican que las isoformas del PR no poseen funciones redundantes y pueden regular la expresión de diferentes genes, necesarios para generar el ambiente adecuado en el útero en caso de haber fecundación.

4.2.3. Regulación transcripcional del receptor intracelular de progesterona (PGR)

La transcripción de las diferentes isoformas del PR a partir de un mismo gen está atribuida a diversos mecanismos. En el caso del *PGR*, la transcripción de las principales isoformas, PR-A y PR-B, se debe a la existencia de dos promotores distintos, localizados en las regiones -711 a +31 pb para PR-B y +464 a +1105 para PR-A respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS) (Kastner *et al.*, 1990).

El *PGR*, en modelos de cáncer de mama, está regulado principalmente por el E2 a través del receptor de estrógenos α (ER α) (Xu *et al.*, 2004). El ER α actúa como factor de transcripción al unirse a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) presentes en el genoma, los cuales corresponden a secuencias palíndromes GGTCAnnnTGACC (Nilsson *et al.*, 2001). La región promotora de PR-A contiene la mitad de la secuencia consenso tipo ERE (conocida como $\frac{1}{2}$ ERE) que está

relacionada con la activación de la transcripción de dicha isoforma. En cambio, el promotor de PR-B no contiene sitios ERE, pero se han descrito dos sitios de unión a Sp1 que pueden mediar el reclutamiento de ER α y favorecer la transcripción de PR-B (Kastner *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 2004). En estos sitios Sp1 también puede encontrarse unido el PR, el cual en asociación con ER α puede favorecer la transcripción del *PGR*. Este mecanismo es mediado por la activación de la vía MAPK/ERK la cual puede favorecer la formación del dímero ER α /PR, de esta forma puede haber expresión del *PGR* aun en ausencia de estrógenos (Diep *et al.*, 2016).

Otro elemento de importancia en la regulación de la expresión del *PGR* lo constituyen los sitios de unión para la proteína activadora 1 (AP-1). En la región 5'-UTR del PR existe un sitio AP-1 en la posición +90, en el cual las proteínas Fos y Jun, componentes de AP-1, reclutan al ER α unido a E2. El complejo de ER α , Fos y Jun se une a la región +90 AP-1 y a un sitio ½ ERE imperfecto adyacente, el cual funciona como elemento potenciador en respuesta a E2, favoreciendo la transcripción de la isoforma PR-B (Petz *et al.*, 2002) (**Fig. 4**).

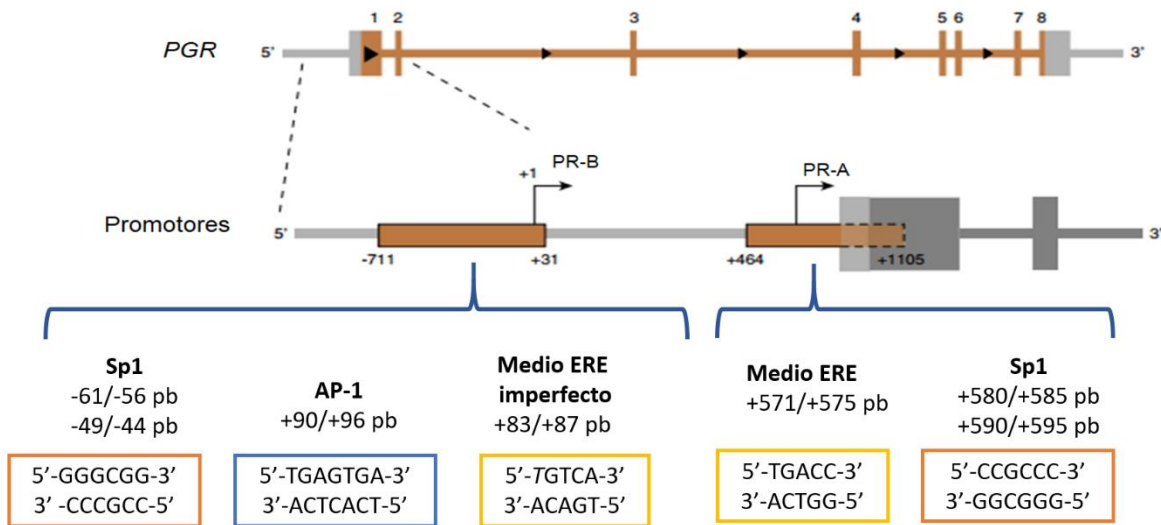


Fig. 4 Regulación transcripcional del *PGR*. El *PGR* posee 8 exones y codifica principalmente para dos isoformas PR-A y PR-B, codificadas por promotores alternos. PR-B tiene su promotor en la región -711 a +31 pb y PR-A +464 a +1150 pb respecto al sitio de inicio de la transcripción. Además de contener elementos de respuesta a estrógenos (ERE) imperfectos o medio sitio ERE, el *PGR* también está regulado por las proteínas Sp1 y AP-1. Estos sitios o proteínas previamente unidas al DNA pueden ser posibles sitios de unión para ER α . *Modificado de Camacho-Arroyo et. al. 2017*

En el endometrio, la expresión del *PGR* es más alta durante la fase secretora del ciclo menstrual. Su expresión está regulada por los estrógenos, sin embargo, en células estromales, el AMPc también contribuye a la expresión del *PGR*, cuyos mecanismos aún se desconocen (Logan *et al.*, 2013). En células estromales decidualizadas se ha encontrado la asociación de PR-B en la región promotora de PR-A, lo que sugiere una regulación de la isoforma PR-A por PR-B (Kaya *et al.*, 2015). Esto sugiere que el *PGR* puede ser regulado a través de diferentes factores dependiendo del tejido en el que ejerza su acción.

Además del mecanismo clásico de regulación de la transcripción, la expresión del *PGR* también depende de diversos factores epigenéticos y post transcripcionales como los RNA no codificantes (ncRNA) los cuales serán desarrollados en los siguientes apartados.

4.2.4 La regulación epigenética del *PGR*

La epigenética se define como los mecanismos que regulan la expresión de los genes sin alterar la secuencia del DNA (Skvortsova *et al.*, 2018; Bošković y Rando, 2018). Los principales mecanismos epigenéticos estudiados son: la metilación del DNA y las modificaciones post traduccionales de histonas (PTM).

La metilación del DNA es la modificación química que se lleva a cabo en la base nitrogenada citosina al transferirse, por acción enzimática, un grupo metilo a su carbono 5 para generar la 5 metilcitosina (5mC) (Greenberg y Bourc'his, 2019). La 5mC se encuentra preferentemente en un contexto de islas CpG. El efecto de esta marca depende de la región genómica en el que se encuentre, ya que, los niveles altos de metilación en promotores han sido asociados con el silenciamiento de los genes mientras que la metilación en el cuerpo de gen activa la expresión del gen (Jones, 2012).

En patologías del endometrio se ha encontrado que la metilación del promotor del *PGR* disminuye su expresión causando una respuesta deficiente a la P4 y por lo tanto a sus efectos en la decidualización e implantación (Wu *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2014; Rocha-Junior *et al.*, 2019).

La cromatina es una estructura formada por proteínas y DNA. Su unidad fundamental es el nucleosoma, el cual está compuesto de un octámero de histonas, integrado por dos copias de H2A, H2B, H3 y H4, al que rodean aproximadamente 147 pb de DNA (Kornberg y Lorch, 2020). Dependiendo de la PTM de las histonas se favorece la apertura de la cromatina para permitir el acoplamiento de la maquinaria transcripcional y comenzar la transcripción, o viceversa, se compacta la cromatina para la represión de la expresión génica. La acetilación de las histonas H3 y H4, que favorecen la apertura de la cromatina, son marcas preestablecidas alrededor del promotor del *PGR*, en un modelo de cáncer de mama. Sin embargo, ante el estímulo de E2, hay un aumento en la acetilación de ambas histonas en la región más cercana al TSS (Xu *et al.*, 2004) . Otra marca que favorece la transcripción es la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3) la cual está asociada a promotores transcripcionalmente activos. La sobreexpresión de desmetilasas de histonas como JARID1A, cuyo blanco es H3K4, suprime la expresión del *PGR* y la reducción de la expresión de dicha enzima potencia la expresión del *PGR* (Stratmann y Haendler, 2011), lo que refleja la estrecha relación entre las proteínas que colocan o remueven las marcas de histonas y la expresión génica. Por otro lado, en cáncer de próstata se ha observado un incremento de la marca represora de la trimetilación de la lisina 27 en la histona 3 (H3K27me3) en el promotor del *PGR*, lo que provoca una disminución en su expresión (Ngollo *et al.*, 2014). Estos factores demuestran la importancia de la regulación epigenética en la activación o silenciamiento del *PGR* en tejidos regulados hormonalmente.

4.2.5 La regulación del *PGR* por RNAs no codificantes

Los RNA no codificantes (ncRNA) son moléculas de RNA que no generan un producto proteico (Wei *et al.*, 2017). Entre ellos se encuentran los microRNAs (miRNA), moléculas de RNA de longitud de 18-22 nucleótidos y los RNA largos no codificantes (lncRNA) de más de 200 nucleótidos. Los lncRNA interactúan con proteínas nucleares, moléculas de DNA y RNA para controlar la expresión de sus genes blanco (Rinn and Chang, 2012). Por otro lado, a nivel post transcripcional, los miRNAs se unen generalmente al extremo 3' de los mRNA induciendo un complejo

de silenciamiento que llevará a la inhibición de la traducción por distintos mecanismos (Gulyaeva and Kushlinskiy, 2016).

En el endometrio, la traducción del *PGR* está regulada por diversos miRNAs como miRNA-96 y miRNA-196a, los cuales se unen al extremo 3'UTR del mRNA para inhibir su expresión (Liu *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2016). Respecto a la regulación del *PGR* por lncRNA, se ha reportado que existe una interacción entre lncRNAs y miRNAs que tiene como resultado la modificación en la expresión del gen. En un modelo de endometrio de primates se estudió la relación entre el miRNA-219-5p y el lncRNA-PGR-3p, este último regula directamente la expresión de PR-A y a su vez es regulado por miRNA-218-5p, por lo tanto la expresión del PR depende de la expresión de ambas moléculas (Liu *et al.*, 2012).

La regulación del *PGR* a través de ncRNA es un campo que permanece abierto a la investigación para conocer la influencia de estos factores en la regulación de la transcripción.

4.3. Organización nuclear del genoma

El genoma posee un alto nivel organizacional dentro del núcleo. La cromatina tiene niveles jerárquicos de compactación iniciando con los nucleosomas hasta estructuras de alto orden jerárquico como asas de cromatina, dominios de cromatina, compartimientos de eucromatina y heterocromatina y finalmente territorios cromosómicos (Cavalli y Misteli 2013; Le Dily y Beato 2018). El uso de sondas fluorescentes en la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH) permitió establecer el posicionamiento organizacional de los cromosomas en interfase, en dichos experimentos se encontró que regiones del cromosoma con pocos genes tienden a localizarse en la periferia del núcleo, mientras que las regiones ricas en genes se agrupan al centro (Postberg *et al.*, 2010) (**Fig 5**). Conocer la posición específica de los cromosomas dentro del núcleo fue el comienzo para especular sobre la influencia de la organización del genoma en el control de la expresión de los genes requeridos para cada tipo celular.

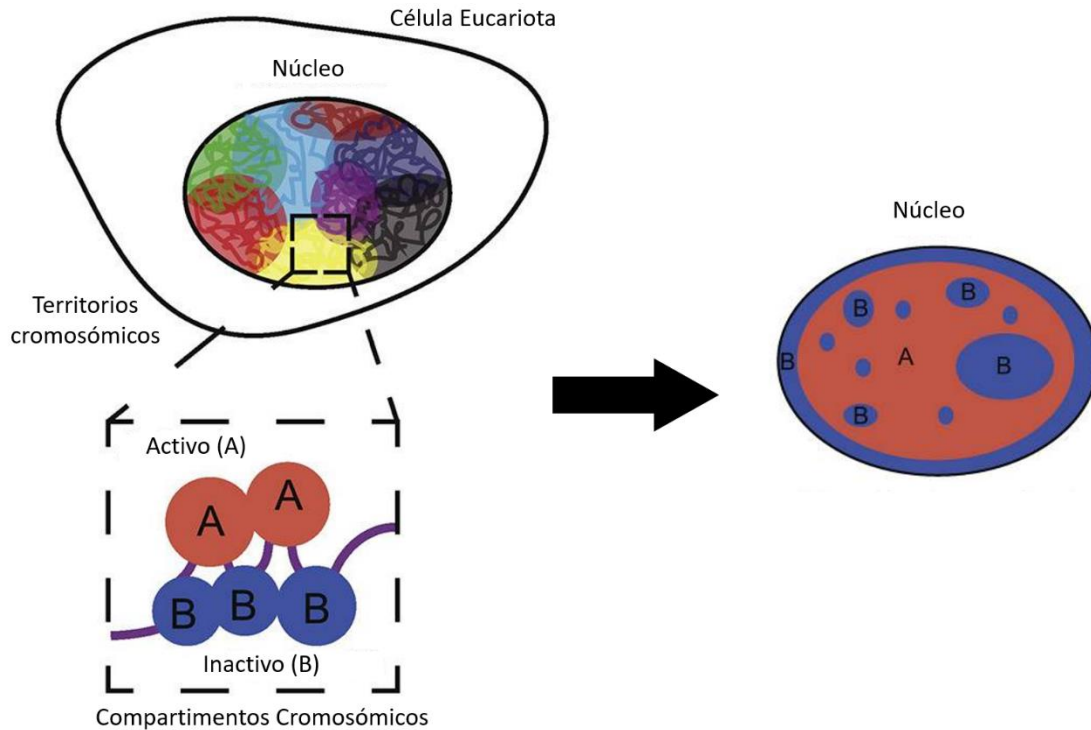


Fig. 5 Compartimentos activos e inactivos. A) En la parte superior se muestran el espacio que ocupa cada cromosoma dentro del núcleo de diferente color, conocidos como territorios cromosómicos. En la parte inferior se señalan los dos compartimentos A y B, de cromatina activa e inactiva, respectivamente. B) La cromatina B, inactiva, se encuentra generalmente en la periferia del núcleo, sin embargo, algunas regiones de cromatina B cuya activación depende de ciertos estímulos puede encontrarse hacia el centro del núcleo. *Modificado de Hildebran y Dekker, 2020.*

Por otra parte, el surgimiento de técnicas moleculares derivadas de la captura conformacional del cromosoma (3C) ha permitido esclarecer con mayor profundidad la organización y compactación del DNA (Han *et al.*, 2018; McCord *et al.*, 2020). Las técnicas derivadas del 3C que han permitido conocer la topología del genoma, su funcionamiento y los posibles mecanismos que establecen y mantienen el arreglo tridimensional son: i) 3C, en el que se evalúan uno a uno los contactos del genoma; ii) 4C, se selecciona un locus de referencia en el genoma y utilizando secuenciación masiva se evalúan sus interacciones con otros loci; iii) 5C, utilizando primers universales, se conocen los contactos de varias regiones del genoma; iv) ChIA-Pet, al combinar la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina y 3C, se conocen los contactos que una proteína puede favorecer en el genoma; v) HiC, a través de

secuenciación masiva todos los posibles contactos del genoma son calculados (de Wit y de Laat, 2012; Han *et.al.*, 2018) .

A partir de estudios de HiC se ha confirmado la existencia de dos tipos de cromatina: activa e inactiva, también conocidas como compartimentos A y B, respectivamente (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009). A su vez, estos compartimentos se encuentran divididos en dominios topológicamente asociados (TADs), delimitados principalmente por proteínas como la proteína de unión a CCCTC (CTCF) y cohesinas, sin embargo, otras proteínas como TOP2A/2B también pueden ser encontradas en estos sitios. (Dixon *et al.*, 2012; Uusküla-Reimand *et al.*, 2016; Zhan *et al.*, 2017; Rowley y Corces, 2018). Los TADs pueden diferir en tamaño y tipo de cromatina, lo que sugiere que pueden dividirse en sub-TADs dependiendo de sus características estructurales y funcionales (Szabo *et. al.* , 2019). Las asas de cromatina son estructuras que permiten el contacto entre diversas regiones del genoma linealmente distales para controlar la transcripción génica. Entre las proteínas involucradas en la formación, estabilidad y longitud de estas estructuras, además de CTCF y cohesinas se encuentran: WIZ, BRD2, YY1 y ZNF143 (Hsu *et al.*, 2017; Weintraub *et al.*, 2017; Rao *et al.*, 2017; Wen *et al.*, 2018; Justice *et al.*, 2020) . Las asas de cromatina podrían ser la unidad mínima de organización del genoma, una de sus funciones principales es el contacto entre secuencias potenciadoras localizadas en sitios distales respecto a sus promotores blanco (Rao *et al.*, 2014) (**Fig 6**).

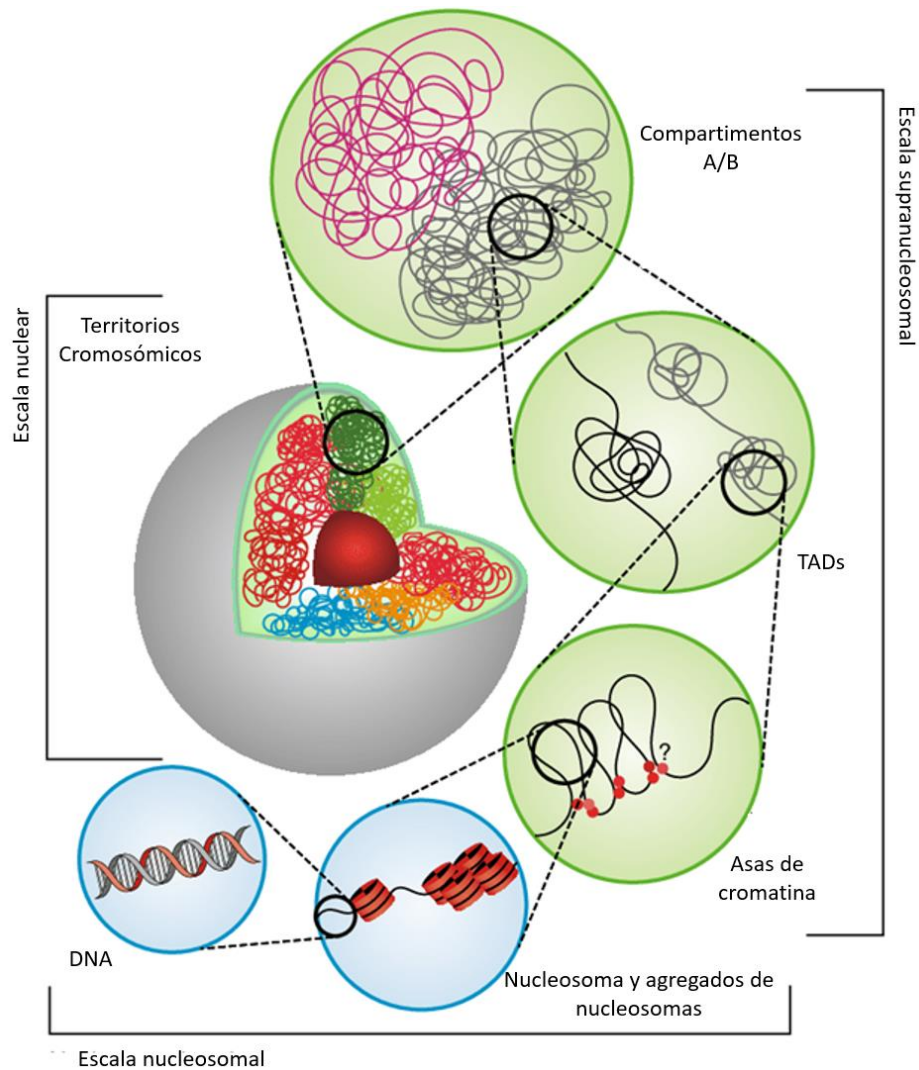


Fig. 6 Organización tridimensional del genoma. Dentro del núcleo los cromosomas ocupan lugares determinados conocidos como territorios cromosómicos. Los territorios cromosómicos son divididos a su vez en compartimentos A (eucromatina) y B (heterocromatina). Ambos compartimentos contienen regiones de mayor contacto entre ellas que con otras regiones del genoma, estos sitios se conocen como dominios topológicamente asociados (TADs). Las asas de cromatina acercan sitios que linealmente no son cercanos para facilitar su expresión o represión. Finalmente, la unidad mínima de compactación de la cromatina son los nucleosomas. *Modificado de Doğan y Liu, 2018.*

La alta organización del genoma dentro del núcleo es relevante para delimitar regiones de cromatina activa e inactiva, así como, regular la replicación y transcripción del DNA. Aunque las estructuras de mayor jerarquía tienden a conservarse entre los diferentes tipos celulares, cada célula requiere de la activación de diferentes genes para llevar a cabo su función. Esta activación, por ejemplo el contacto entre secuencias potenciadoras y promotores, dependen de

estímulos exteriores. El dinamismo del endometrio requiere E2 y P4 para activar los genes necesarios en cada fase del ciclo menstrual.

4.3.1. Interacciones de la cromatina entre promotores y secuencias potenciadoras.

Las secuencias potenciadoras son elementos del DNA cis-reguladores que potencian la expresión de sus genes blanco (Plank y Dean, 2014). La actividad de las secuencias potenciadoras es específica de cada tipo celular y tejido específico, generalmente más de una secuencia potenciadora es necesaria para la activación de un gen (Andersson *et al.*, 2014). Las secuencias potenciadoras poseen características que los diferencian de otros elementos reguladores en el genoma, ya que principalmente son regiones sensibles a DNAsa, es decir, sitios de cromatina abierta y poseen marcas específicas de histonas como H3K4me1 y acetilación de la lisina 27 en la histona 3 (H3K27ac) (Andersson *et al.*, 2014). Recientemente se ha postulado que algunas de las secuencias potenciadoras poseen actividad transcripcional dando lugar a transcritos conocidos como eRNA, creando controversia entre la definición de promotores y las secuencias potenciadoras (Li *et al.*, 2016; Andersson y Sandelin, 2020).

En los sitios potenciadores se pueden encontrar motivos de unión para diferentes factores de transcripción. Los receptores hormonales nucleares como PR y ER, además de unirse a sitios cercanos al promotor de sus genes blanco pueden unirse a sitios distales tipo potenciador y así incrementar la transcripción del gen a través de la formación de asas de cromatina (Fullwood *et al.*, 2009; Le Dily y Beato, 2018). En células MCF7 de cáncer de mama, se ha comprobado que ante el estímulo con E2, ER α aumenta las interacciones entre regiones distales y promotores, estableciendo una dependencia hormonal para el rearreglo de la cromatina (Fullwood *et al.*, 2009).

En el caso del PR, también se ha encontrado mayor interacción entre las secuencias potenciadoras distales y promotores de sus genes blanco en células T47D (Ballaré *et al.*, 2013). Otro escenario propuesto es el caso del receptor a glucocorticoides

(GR), el cual puede encontrarse unido al DNA en condiciones basales y ante un estímulo agonista promueve una mayor apertura de la cromatina y un mayor número de contactos entre potenciadores y sitios distales al inicio de la transcripción (Kuznetsova *et al.*, 2015).

Debido a que el endometrio es un tejido dinámico regulado por las hormonas sexuales, sus receptores nucleares pueden llevar a cabo modificaciones en la estructura de la cromatina que favorezcan la interacción entre potenciadores y promotores de los diferentes genes requeridos en cada fase del ciclo menstrual.

4.3.2. El papel de los receptores a hormonas esteroides en la organización 3D del genoma

Los receptores de las hormonas esteroides (SR) tienen un papel importante en la regulación de la arquitectura del genoma, ya que pueden contribuir a la formación de asas de cromatina y reclutar corre reguladores y remodeladores de la cromatina que favorecen la transcripción de sus genes blanco (Le Dily y Beato 2018). La unión de los SR aumenta la frecuencia del número de contactos con regiones distales del genoma, lo cual sugiere que estos receptores dirigen la formación de asas de cromatina. Dichas estructuras pueden verse involucradas tanto en la activación como en la represión de genes (Fullwood *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2010). Hasta el momento se desconoce si los receptores de hormonas esteroides inducen la formación de las asas de cromatina o contribuyen a la estabilidad del complejo previamente formado, en este último caso el receptor puede unirse a una estructura preestablecida y los contactos establecidos no cambiarán drásticamente. Ambos casos pueden ocurrir y regular la transcripción de los genes blanco, ya que ninguno de los dos eventos es mutuamente excluyente (Le Dily y Beato 2018) (**Fig 7**).

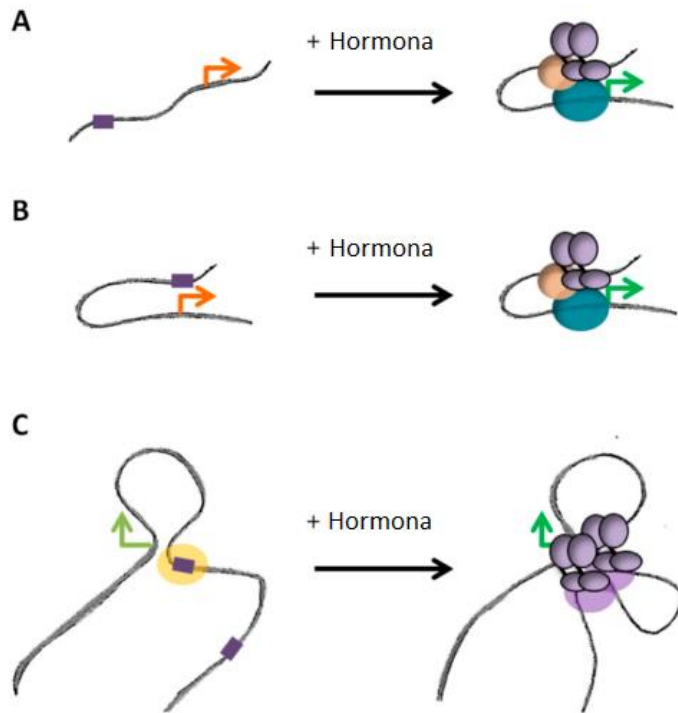


Fig. 7 Dinámica de las asas de cromatina entre potenciadores y promotores. A) La unión de los receptores después de la exposición a la hormona induce a la formación de un asa de cromatina entre una región reguladora, por ejemplo: secuencia potenciadora, y el promotor. B) Si el asa de cromatina se encuentra pre-establecida la unión del receptor activará al potenciador para favorecer la transcripción de su gen blanco. C) Un promotor puede estar regulado por más de una secuencia potenciadora que requieran o no la formación *de novo* de un asa de cromatina. En este escenario pueden suceder los eventos A y B simultáneamente. *Modificado de Le Dily et al. 2018.*

En cuanto a la regulación de la transcripción del *PGR*, se han identificado algunos sitios distales que pueden estar asociados a ER α y a factores remodeladores de la cromatina que favorecen su transcripción en presencia de E2 (Bonéy-Montoya *et al.*, 2010). Por ello, es de importancia el estudio de la regulación del *PGR* y cómo se encuentra regulada su expresión en células cuya función depende de la P4, no solamente a través de los mecanismos clásicos sino tomando en cuenta la topología del genoma. La organización del genoma permite la compactación del genoma y la expresión de regiones génicas específicas dependiendo del tipo y condiciones celulares.

En el caso del endometrio, se desconocen los cambios que la decidualización puede promover en el rearrreglo de la topología del genoma. En cuanto a la expresión del ER y del PR en la línea celular THESC, se sabe que hay una mayor expresión de

ambos receptores al inducir a la decidualización utilizando E2, MPA y AMPc, respecto a cultivos donde sólo se ha utilizado MPA en combinación con E2 o AMPc (Logan *et al.*, 2013). Estos resultados indican que la regulación de la expresión del *PGR*, en células estromales de endometrio, requiere de estímulos adicionales al E2. Un modelo *in vitro* de células estromales utilizando los componentes que regulan la decidualización podría dar una mejor aproximación de los cambios transcripcionales que se producen en el endometrio durante esta etapa.

5. Planteamiento del problema

La función del endometrio está regulada principalmente por E2 y P4, las cuales ejercen sus efectos a través de sus receptores intracelulares y actúan como factores de transcripción y reclutan modificadores de cromatina para favorecer o reprimir la transcripción de los genes. Con el surgimiento de nuevas técnicas para el estudio de la organización del genoma, se sabe que el DNA no tiene una organización azarosa dentro del núcleo y su estructura tridimensional tiene un papel importante en la regulación de la expresión génica. La expresión del *PGR*, gen que codifica para el PR, está regulado principalmente por estrógenos. En el modelo *in vitro* de células estromales la expresión del *PGR* requiere MPA, E2 y AMPc, moléculas necesarias para la decidualización.

Hasta el momento se desconocen las interacciones del promotor del *PGR* con regiones distales del genoma que se inducen ante el estímulo de decidualización en células estromales de endometrio. Las asas de cromatina favorecen el contacto entre regiones distales del genoma para regular la actividad transcripcional ya sea promoviendo el contacto entre secuencias potenciadoras y promotores para incrementar la expresión génica, o manteniendo la compactación del genoma para generar cromatina transcripcionalmente reprimida. Debido a que alteraciones en la expresión del *PGR* puede conllevar a patologías del endometrio, es de interés conocer cómo la arquitectura de la cromatina contribuye a la expresión del *PGR* a través de interacciones con otras regiones del genoma en células estromales de endometrio, bajo el estímulo de decidualización,

6. Hipótesis

El promotor del *PGR* presentará mayor número de interacciones con regiones distales del genoma bajo el estímulo de decidualización con MPA, E2 y AMPc, las cuales estarán asociadas a una mayor transcripción del gen.

7. Objetivos

7.1. Objetivo General

Determinar las interacciones que se generan entre el promotor del *PGR* y regiones distales del genoma por acción del MPA, E2 y AMPc en células de endometrio humano.

7.2. Objetivos Particulares

- Evaluar el nivel de expresión del *PGR* al utilizar E2, MPA y AMPc en cultivos de células estromales de endometrio humano.
- Determinar *in silico* las posibles interacciones del promotor del *PGR* con regiones distales.

8. Metodología

- Cultivo Celular

Se utilizó un modelo *in vitro* de células estromales de endometrio, línea celular THESC-CRL-4003TM (ATCC). Presentan una morfología alargada de tipo fibroblasto similar a las células de cultivos primario de endometrio *in vivo* y han sido inmortalizadas con telomerasa transcriptasa inversa (TERT) (**Fig. 8**).

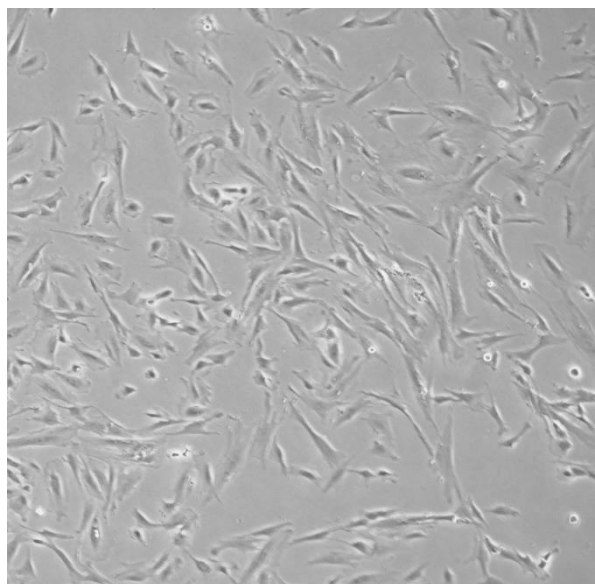


Fig 8. Línea celular THESC de células estromales de endometrio, obtenida a través de microscopía de contraste de fases, observada a 10X.

El cultivo se mantuvo en cajas de 10 cm hasta alcanzar la confluencia por tres pases, en medio DMEM/F-12 sin rojo de fenol (Gibco) suplementando con suero fetal bovino sin hormonas (10%), antibiótico/antimicótico (anfotericina B (125 µg/mL), penicilina (50 000 U/mL) y estreptomycin (50 mg/mL)(Gibco), piruvato de sodio (1X) (Gibco), puromicina (500 ng/mL) (Sigma) e Insulina-Transferrina-Selenio (5 µg/mL) (Corning).

Después del tercer pase, se sembraron 250,000 células en placa de 6 pozos, 3 pozos para el tratamiento de decidualización y 3 pozos con vehículo. Una vez alcanzada la confluencia del 80%, 16 h previas a dicho tratamiento se hizo el cambio de medio a DMEM/F-12 sin rojo de fenol y sin suero fetal bovino con antibiótico/antimicótico. Los tratamientos de decidualización con

medroxiprogesterona (MPA) 1 μ M, 17 β -estradiol (E2) 10 nM y 8-Br-AMPc (AMPc) 0.5 mM, así como, el vehículo (etanol) se mantuvieron por 24 h.

- Cuantificación de la transcripción por RT-qPCR

La extracción del RNA se llevó a cabo de cada pozo utilizando 700 μ L Qiazol (QIAGEN) siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras de RNA total fueron almacenadas en agua libre de RNAsas y cuantificadas por espectrofotometría. Una vez aislado el RNA total, la evaluación de la integridad de las muestras se realizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. En el análisis semicuantitativo de RT-qPCR, se utilizaron de 1-2 μ g de RNA total para generar cDNA utilizando la enzima M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen).

El ensayo de qPCR se llevó a cabo utilizando el sistema de detección SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) en el equipo BioRad CFX-96 (BioRad) siguiendo el siguiente programa: 95°C para la activación de la enzima DNA Polimerasa AmpliTaq Gold y posteriormente durante 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por un 1 minuto. Los resultados fueron analizados mediante el método comparativo de doble delta C_T ($\Delta\Delta C_T$). Se utilizó *GAPDH* como control de expresión para la evaluación de la expresión de las isoformas PR-A/B, PR-B. En la tabla 1 se muestran los primers utilizados.

Tabla 1. Secuencia de primers que se utilizaron en las evaluaciones de qPCR

Gen	Primer Forward	Primer Reverse
PR-AB ¹	5'-GTCGAGCTCACAGCGTTTCT-3'	5'-TGCCCGGGACTGGSTAAATG-3'
PR-B ²	5'-GTACGGAGCCAGCAGAAGTC-3'	5'-TCTCTGGCATCAAACCTCGTG-3'
GAPDH ¹	5'-GACAGTCAGCCGCATCTTCT-3'	5'-GCCCAATACGACCAAATCCGT-3'

¹Diseñados en Primer-Blast, NCBI.

²Tomado de (Xue *et al.*, 2007)

- Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados y graficados utilizando el software GraphPad Prism. Los resultados se muestran como el promedio de expresión relativa \pm el error estándar. La prueba estadística t de student fue utilizada para analizar los

grupos de estudio, considerando un valor de $p < 0.05$ y $p < 0.01$ como estadísticamente significativos.

- Análisis *in silico*.

Se realizó la búsqueda de los posibles sitios distales de contacto respecto al promotor del *PGR*. Los datos fueron cargados al visualizador genómico de la Universidad de California, Santa Cruz (UCSC). Se ingresaron las coordenadas de los sitios representativos de inmunoprecipitación de la cromatina acoplada a PCR (ChIP-PCR) contra ER α y las interacciones representativas del experimento 3C obtenidos por Bonéy-Montoya *et al.* 2010 en un modelo de células MCF7 (cáncer de mama). Asimismo, se utilizaron los datos de cultivos primarios de células decidualizadas en el experimento de captura del promotor HiC (pHiC) obtenidos por Sakabe *et al.* 2020 donde se observan las interacciones del promotor del *PGR* con regiones distales del genoma. En la tabla 3 se muestran los artículos empleados y los números de acceso Gene Express Omnibus (GEO) de las muestras analizadas en endometrio de ChIP-seq contra ER α . Las muestras con número de serie GSE132430 y GSE129803 se utilizaron como referencia de la presencia de ER α en tratamiento hormonal, mientras que, los datos GSE114737 se consideraron como los posibles sitios de unión de ER α preexistentes antes de la estimulación hormonal. Los datos obtenidos de GEO fueron seleccionados por la similitud entre el modelo utilizado, línea celular de endometrio o tejido de cáncer endometrial, y el tratamiento hormonal con E2. Finalmente, se analizaron los datos disponibles de ChIP-seq para ER α en ENCODE y modificaciones de histonas, de los consorcios CEMT y Roadmap, así como los datos de expresión génica por análisis de cap (CAGE) de FANTOM5.

Tabla 3. Datos públicos de ChIP-seq para ER α en endometrio.

Número de Acceso (Serie)	Número de Acceso (Muestra)	Tipo de muestra	Tratamiento con E2	Referencia
GSE132430	GSM3863225	Células de Ishikawa	Si	(Blanchard <i>et al.</i> , 2019)
	GSM3863227			
	GSM3863229			
	GSM3863231			
GSE129803	GSM3722307			(Rodriguez <i>et al.</i> , 2020)
GSE114737	GSM3149094	Tejido de tumores de cáncer de endometrio	No	(Singh <i>et al.</i> , 2019)
	GSM3149095			
	GSM3149099			
	GSM3149103			

Acoplado los datos públicos, de los consorcios y considerando los sitios de corte de las enzimas de restricción HindIII y EcoRI se generaron los primers a través de Primer-BLAST, para los sitios distales de estudio en los que podría encontrarse el ER α y que pueden regular la transcripción del *PGR* en la línea celular THESC. En la tabla 6 se muestran los primers diseñados.

Tabla 6. Primers diseñados para el experimento de 3C

Nombre	Primer	Enzima Restricción
Ancla HindIII	5'-GTAGGACAGAGTTAAAGGCTAGACCATC-3'	HindIII
PGR-H-51	5'-GATACATGGTGGATAAAGGTGCATATTCTG-3'	
PGR-H-52	5'-CTTTTCTTTCCAAAGGGACAACACTGTCTG-3'	
PGR-H-53	5'-TCTAGGTATAAGAGCACTAGGCAGAAAATC-3'	
PGR-H-54	5'-CAGTTCTTTATTCTTTCTTTCTCCACAGC-3'	
PGR-H-55	5'-GAAATTATGGGGAAAGAGTGGGAGAAAG-3'	
PGR-H-31	5'-GATGAAGAGTCTAGGAAACAGTATTGCAC-3'	
PGR-H-32	5'-GTTTAACTTACTACCAACACCCCAAATTC-3'	
PGR-H-33	5'-TATTTATACCCTACTTCTCAGACCACTCTC-3'	
Ancla EcoRI	5'-TCATGTTAGGTTACTAGGATTTGGAGTTGG-3'	
PGR-E-51	5'-GAGTGAAGAGTGTTGCATAATAACCACAG-3'	
PGR-E-52	5'-GATACTTGTTTTGTGACCCACTACATGG-3'	
PGR-E-53	5'-CATTGTAAAGTGACTGGTAACAAGAGAGC-3'	
PGR-E-54	5'-CTTTTCCCTCTGTGGATAAAATCCAAGG-3'	
PGR-E-55	5'-GTAATTTAGTTTAATGGAGTCAGCAGCCAC-3'	
PGR-E-31	5'-CCTGTTCAAGGTAGGGAAGTGATTCATTA-3'	
PGR-E-32	5'-GGAAGAGTGATAGGCTCTTTAGAATTTG-3'	
PGR-E-33	5'-CTAAGAAGTACTAAATGGCTGCTGCATAC-3'	

- Captura conformacional del cromosoma (3C)

Se sembraron 6 000 000 de células (Naumova *et al.*, 2012) en cajas Petri de 15 cm. Al alcanzar el 80% de confluencia 16 h previas a la fijación se realizó un cambio de medio a DMEM/F-12 sin rojo de fenol y sin suero fetal bovino con antibiótico/antimicótico. Se fijaron las interacciones entre proteína-proteína y proteína-DNA utilizando formaldehído al 1%, se detuvo el proceso de fijación al añadir glicina a una concentración final de 125 mM. La lisis celular se llevó a cabo utilizando buffer de lisis celular (Tris-HCl, 10 mM pH=8.0; NaCl, 10 mM; IGEPAL, 0.2%; Inhibidor de proteasas (Roche), 1X) durante 1 h a 4°C. La cromatina fijada fue digerida durante 20 h utilizando 400 U de la enzima de restricción HindIII-HF (NEB, R3104M) o Eco-RI-HF (NEB, R3101M) a 37°C, con una incubación adicional de 2 h con 200 U extra de la enzima a 37°C al día siguiente. Posteriormente se utilizaron 2000 U de T4 Ligasa (NEB, M0202M), toda la noche a 16°C para la ligación de los productos. Posteriormente, se eliminó el RNA al incubar el DNA con

RNAsa A (Invitrogen), 20 mg/mL, 15 min a 37°C y se revirtió la fijación incubando con Proteinasa K (Invitrogen), 20 mg/mL, 20 h a 65°C. El DNA fue purificado con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (Sigma) y evaluado a través de qPCR utilizando el mismo sistema de detección y programa que en el análisis de expresión, variando el número de ciclos (50 ciclos).

Al ser la primera vez que se implementó la técnica en el laboratorio, se estandarizaron las condiciones para llevar a cabo la técnica de 3C. Se inició con la evaluación del tiempo óptimo en el que las células THESC debían permanecer con buffer de lisis celular, para conservar únicamente los núcleos y eliminar la mayor cantidad de citoplasma. Al evaluar 3 diferentes tiempos, 30, 45 y 60 minutos, de incubación en buffer de lisis celular, el tiempo en el que se observó menor cantidad de citoplasma en los campos estudiados fue a 60 min (**Fig 9**). Eliminar la mayor cantidad de citoplasma favorece el rendimiento de la digestión, ya que, la enzima de restricción podrá acceder más fácilmente al DNA.

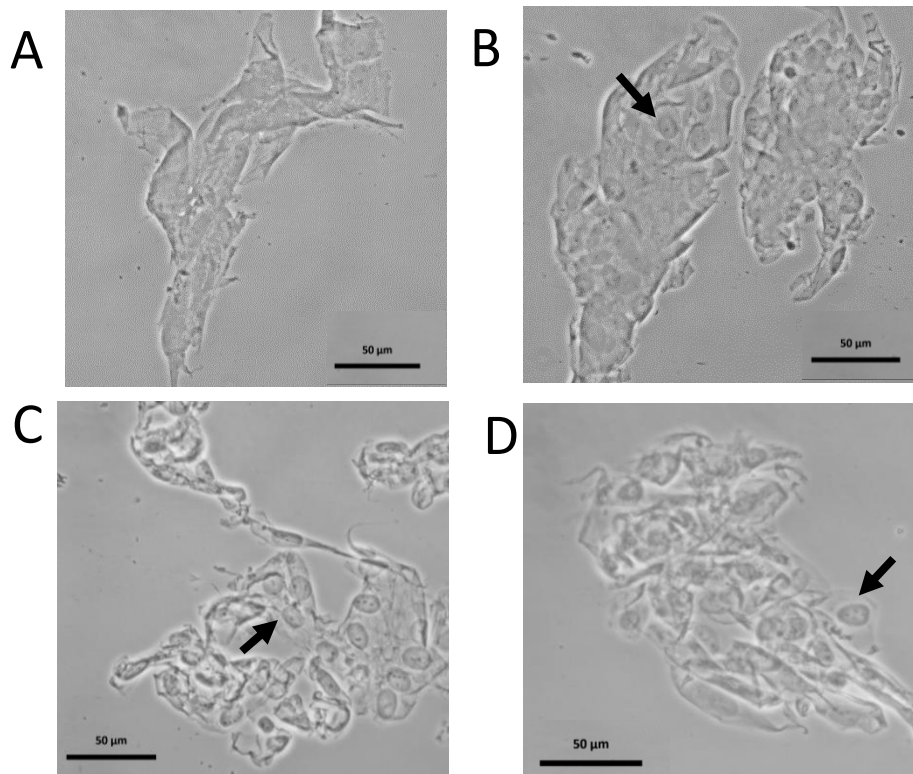


Fig. 9 Estandarización de lisis celular. Las células THESC se incubaron a diferentes tiempos, para eliminar la mayor cantidad de citoplasma y conservar únicamente los núcleos. A) 0 min, B) 30 min, C) 45 min, D) 60 min en buffer de lisis celular. Las flechas negras señalan el núcleo.

Posteriormente se evaluaron los tiempos de digestión enzimática de DNA genómico (DNAg) y ligación del DNA digerido a 16 y 20 h. Tomando DNA en tres puntos diferentes del protocolo de 3C, antes de digerir, ligar y después de la ligación, se realizó un gel de agarosa al 0.8% para observar la calidad del DNA (**Fig. 10**).

En la **Fig. 10A** se muestra el primer tiempo de evaluación de digestión y ligación, 16 h., usando dos cantidades de DNA, 50 y 100 ng, respectivamente. Las diferentes cantidades de DNA se consideraron con el objetivo de apreciar mejor el peso molecular del DNA genómico en los puntos antes de la digestión y después de la ligación y el barrido de DNA digerido. En el carril NL se observa una banda de alto peso molecular lo que indica que el DNAg no fue digerido en su totalidad.

En la **Fig. 10B** se observa el DNA en el segundo tiempo de evaluación, 20 h, al que se le adicionaron 2 h con 200 U de la enzima de restricción extra de digestión al día siguiente. Se utilizaron 50 ng de DNA, ya que fue la cantidad de DNA en la que se observó mayor nitidez de las bandas en el gel de agarosa. En el carril NL se observa una mayor digestión del DNAg y en el carril del 3C hay un mayor enriquecimiento de la banda de DNA de alto peso molecular.

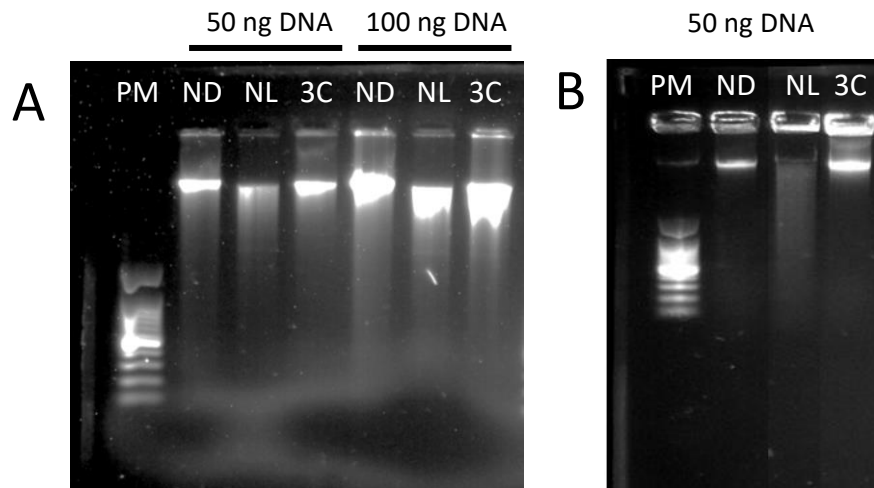


Fig. 10 Estandarización de digestión, ligación y crosslinking reverso. Se evaluó el DNA en tres puntos críticos del protocolo de 3C. A) 16 h de digestión, ligación y crosslinking reverso, B) 20 h de digestión, ligación y crosslinking reverso. PM, Marcador de peso molecular; ND, No digerido; NL, No ligado.

Se realizaron PCR de los productos finales de ligación y del DNA extraído antes de la digestión y de la ligación, utilizando los primers de la tabla 2. Los primers se encuentran en una región carente de genes y donde se han observado interacciones en diferentes líneas celulares (Anexo I) (Naumova *et al.*, 2012) En un gel de agarosa al 0.8% se observa el enriquecimiento de un producto de amplificación en el carril de 3C, en ambas condiciones experimentales (**Fig. 11**). En los carriles de DNA no digerido (ND) y no ligado (NL) se observan varios productos inespecíficos de amplificación, en especial en el experimento 1 (**Fig. 11A**). La presencia de productos inespecíficos puede deberse al apreamiento y extensión de ciertas regiones de los primers con diferentes sitios del genoma. En el experimento 2 (**Fig. 11B**) el número de inespecíficos disminuye en ND y NL, y el amplicón del peso esperado, alrededor de 200 bp, se observa únicamente en el carril del 3C.

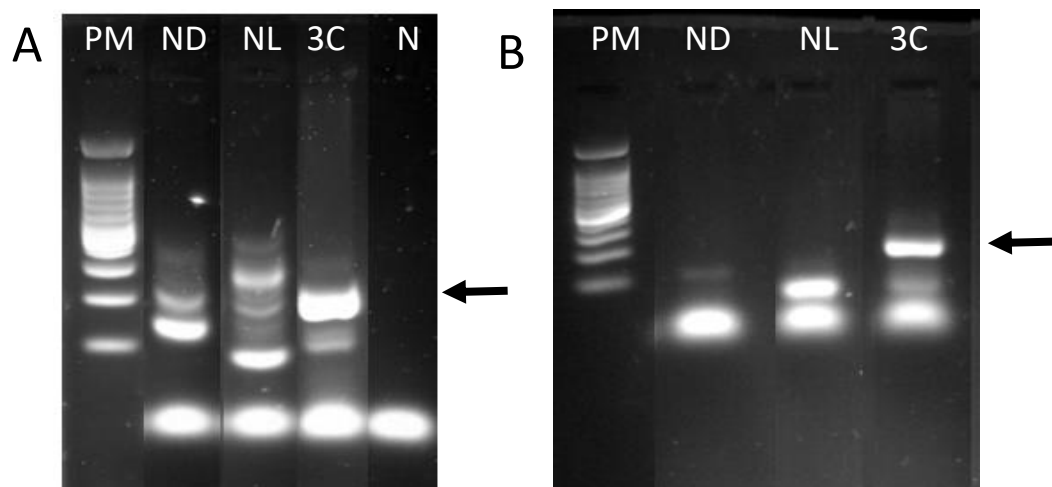


Fig. 11 Estandarización de 3C. Utilizando los primers de la tabla 2 se realizó la PCR para los diferentes puntos de control del protocolo de 3C. A) 16 h y B) 20 h de digestión, ligación y crosslinking reverso. PM, marcador de peso molecular; ND, no digerido; NL, no ligado; N, negativo. Las flechas en negro indican el producto esperado de amplificación.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las Figs 10 y 11 se siguieron las siguientes condiciones experimentales: 1 h de lisis celular, 20 h de digestión, con 200 U extra al día siguiente y 20 h ligación.

Para no sobre estimar o subestimar las posibles interacciones de diversas regiones del genoma respecto a su distancia del ancla, es decir, el promotor del *PGR* se evaluó la cantidad de DNA adecuada para cuantificar interacciones cercanas o vecinas e interacciones distales. Se realizó la valoración por PCR de diversas cantidades de DNA iniciando con 7.5 ng y finalizando con 240 ng. Los primers empleados como punto de referencia fueron GD6 y GD7 para sitios vecinos, ya que no hay un corte de la enzima de restricción entre ellos, mientras que el par GD8 y GD14 se utilizó para analizar sitios distales (Tabla 2).

Tabla 2. Primers utilizados en la estandarización de 3C.

Nombre	Interacción genómica	Secuencia	Coordenadas
Primer 1	Cercana	5'- GCATGCATTAGCCTCTGCTGTTCTCTGAAATC-3'	chr11:116674676-116674707
Primer 2		5'- CTGTCCAAGTACATTCCTGTTCAAAACCC-3'	chr11:116680935-116680964
GD6 ³	Cercana	5'- GTTTAAGACCCTCAGTATACTAGTCATAGAAGG- 3'	chr16:62300941-62300973
GD7 ³		5'-GATGCCATTTCTTATCTTGTCTTGGCAGGTC- 3'	chr16: 62309387-62309417
GD8 ³	Distal	5'-GCAGCAAAGCAAACCAAAAGAACAACAGG- 3'	chr16: 62316246-62316274
GD14 ³		5'-GTCGCCGTTGCCTTTGCAGTTTACAGTG-3'	chr16: 62333515-62333542

³Tomado de (Naumova *et al.*, 2012).

Los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 0.8% (**Fig. 12**). En los geles de agarosa se observa en los tres carriles de la izquierda el amplicón obtenido con los primers vecinos, y en los tres carriles de la derecha el amplicón para los primers distales. Los productos esperados para cada par de primers era de aproximadamente 200 pb. En las cantidades de DNA de 7.5, 30 y 60 ng (**Fig. 12A, C, D**) se observó mayoritariamente un producto enriquecido cercano a 200 pb para

los primers vecinos. En 7.5 y 15 ng (**Fig. 12B**) con los primers vecinos se observó más de una banda en el gel de agarosa, no obstante, la de mayor intensidad se encuentra en 200 pb. Para las cantidades de 120 y 240 ng, se observa un barrido de DNA tanto en los primers vecinos como en los distales (**Fig. 12E y F**).

En algunos carriles de la **Fig. 12** en las cantidades más bajas de DNA se observan productos inespecíficos de amplificación, estos pueden deberse a un alineamiento inespecífico de los primers o a dímeros de primers. A su vez, la intensidad de la banda del producto esperado se pierde conforme se aumenta la cantidad de DNA, ocasionado probablemente por la presencia de diversos compuestos acarreados durante el protocolo de 3C que pueden impedir la amplificación adecuada del DNA.

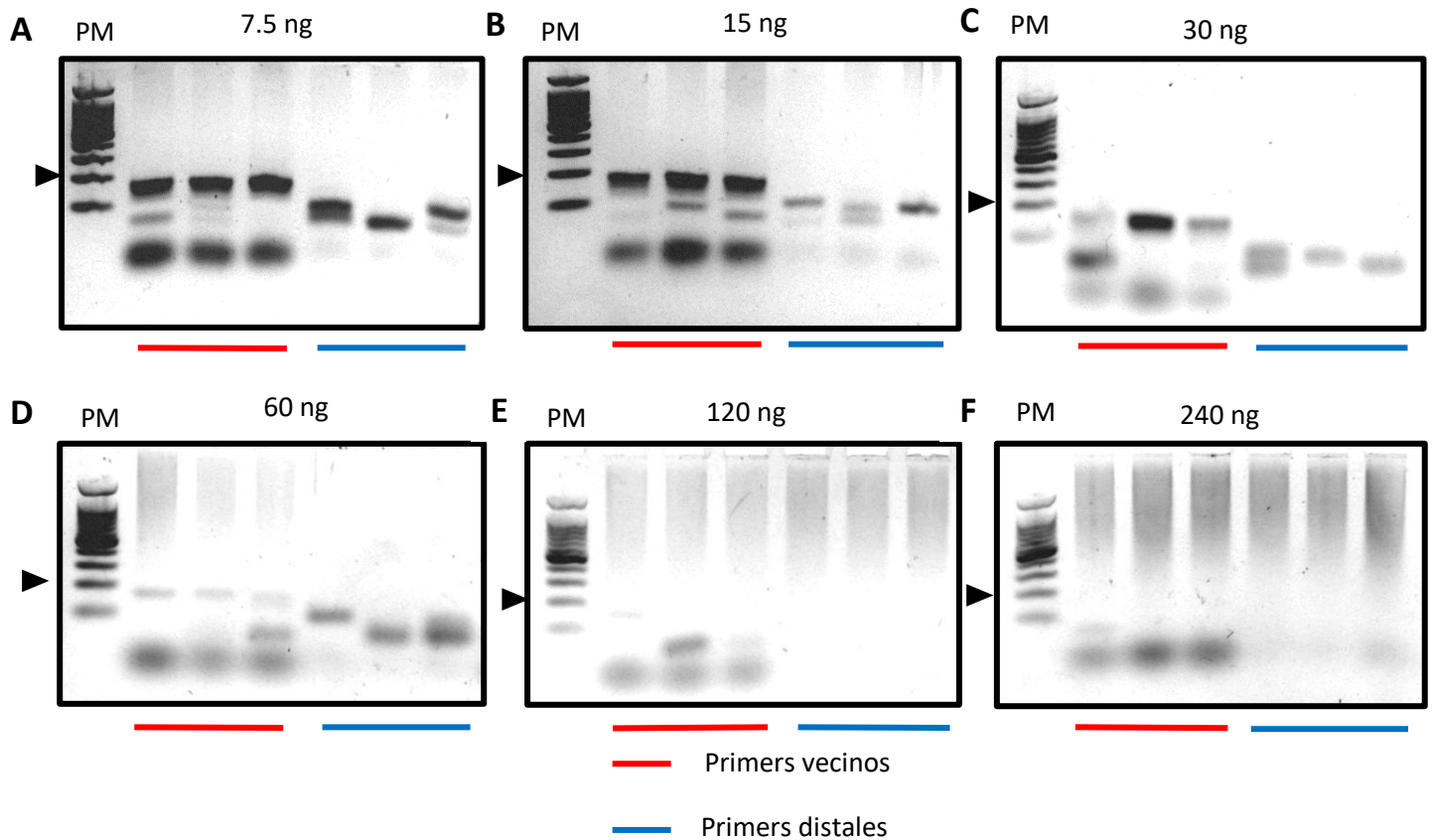


Fig. 12 Evaluación de diferentes cantidades de DNA con primers vecinos y distales. A) 7.5 ng, B) 15 ng, C) 30 ng, D) 60 ng, E) 120 ng, F) 240 ng. Los primeros tres carriles muestran el amplicón con los primers GD6 y GD7 (línea roja), los siguientes tres carriles muestran el amplicón con primers GD8 y GD14 (línea azul). PM, marcador de peso molecular. El triángulo negro indica el peso molecular esperado.

Si bien los primers distales mostraron productos de amplificación con las cantidades más bajas de DNA, ninguno de ellos se encuentra en el peso esperado para el amplicón. Este hallazgo puede deberse a que la interacción entre los primers GD8 y GD14 no se conserve en células estromales de endometrio

Para descartar la posible presencia de inhibidores de la PCR en la evaluación de las cantidades de 120 y 240 ng de DNA (**Fig. 12E y F**) se aumentó el volumen final de reacción de PCR. Los productos finales fueron analizados nuevamente en geles de agarosa al 0.8% (**Fig. 13**). Con ello, se aprecia el amplicón generado por los primers vecinos con un peso de 200 pb, aunque para los primers distales no hay un enriquecimiento del producto esperado. De acuerdo con los resultados obtenidos en la **Fig. 12A**, se utilizaron 7.5 ng de DNA como control positivo para la evaluación de ambos pares de primers.

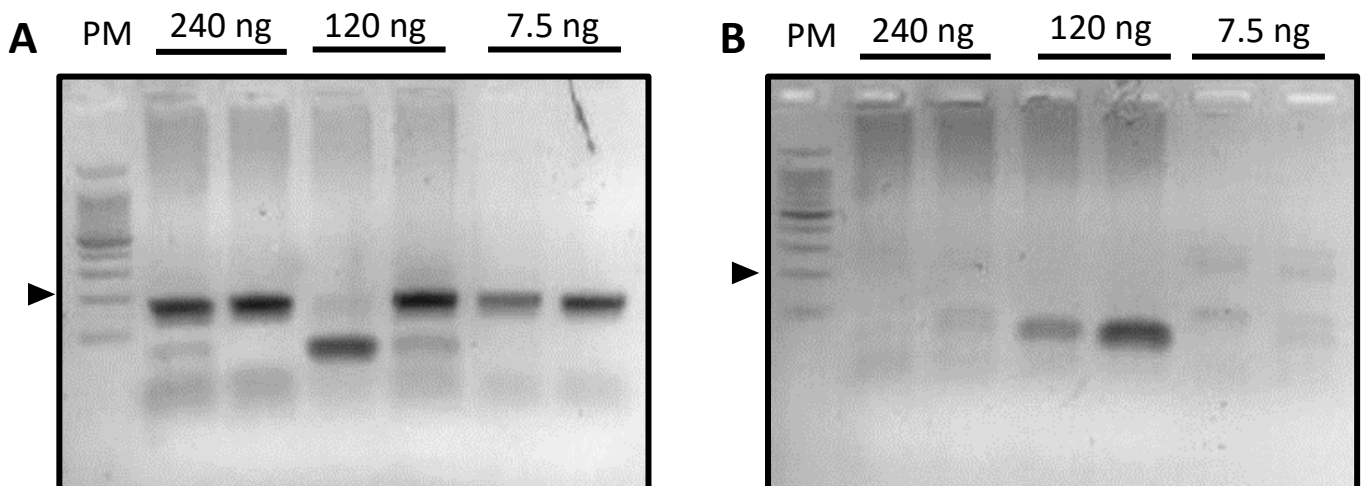


Fig. 13 Evaluación de productos de amplificación de 240, 120 y 7.5 ng DNA. A) Primers vecinos. B) Primers distales. PM, marcador de peso molecular. El triángulo negro indica el peso molecular esperado.

Posteriormente se evaluaron los primers vecinos GD6 y GD7, al ser los únicos que mostraban un amplicón alrededor de 200 pb (**Fig.14**). En todas las cantidades de DNA analizadas, a excepción de 60 ng, existen dos productos de amplificación. La banda superior es el producto de PCR esperado, mientras que, probablemente la banda inferior sea un subproducto de dimerización de primers.

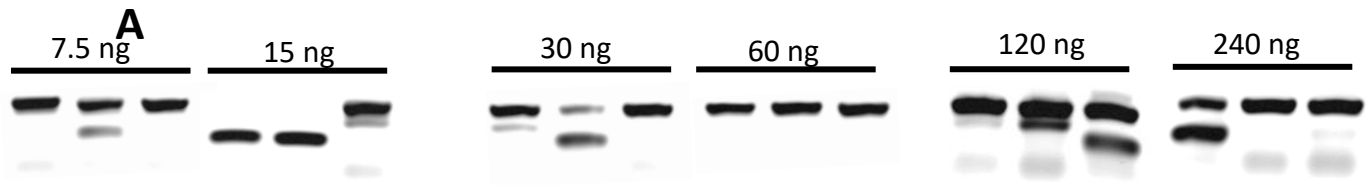


Fig. 11 Productos de amplificación utilizando los primers GD6 y GD7 (primers vecinos).
 Se realizaron 3 réplicas técnicas de la PCR por cada cantidad de DNA evaluada identificadas con una línea horizontal. A) 7.5 ng y 15 ng de DNA. B) 30 ng y 60 ng de DNA. C) 120 y 240 ng de DNA.

9. Resultados

- Expresión relativa del *PGR*.

Para comprobar que la expresión del *PGR* en la línea celular THESC es regulada por hormonas sexuales, se realizó el ensayo de decidualización con MPA, E2 y AMPc (n=3). Después de 24 h de tratamiento hormonal se observó un aumento en la expresión del *PGR* total, es decir PR-AB, y de la isoforma PR-B al compararlas con el vehículo (**Fig. 12**). Se observó un aumento significativo en la expresión de ambas isoformas del *PGR* en respuesta al tratamiento de decidualización.

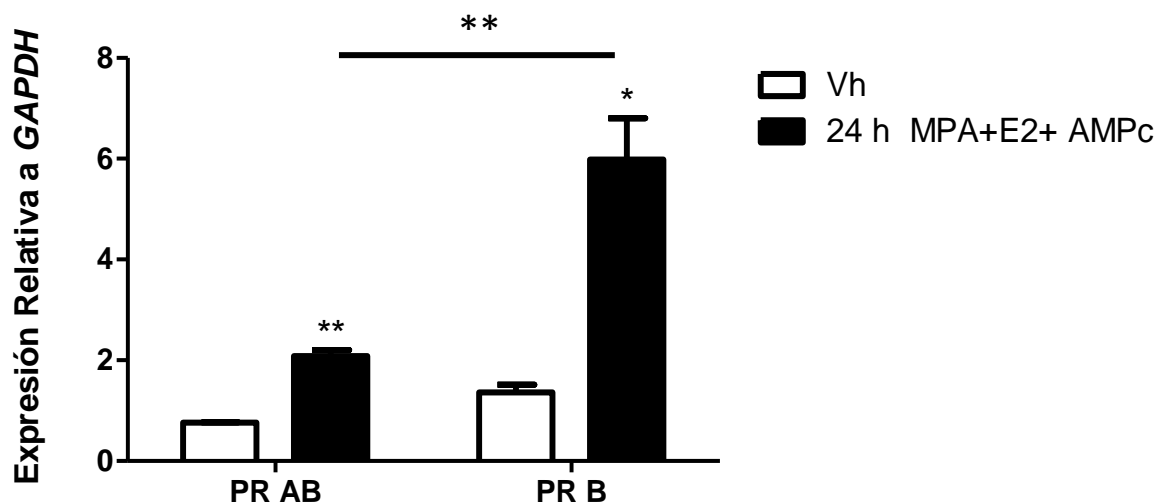


Fig 12. Regulación de la expresión de PR total y PR-B con tratamientos de decidualización en la línea celular THESC. Se muestran los niveles de expresión del *PGR* total (PR AB) y de la isoforma B (PR B) normalizados respecto a la expresión de GAPDH con tratamiento de decidualización (MPA, E2 y AMPc) durante 24 h (n=3). Los resultados se presentan como el promedio \pm error estándar. *P<0.05, **P<0.01

- Evaluación *in silico* de los sitios distales al promotor del *PGR*.

Con el fin de determinar las posibles regiones distales que podrían controlar la expresión del *PGR*, se realizó un análisis *in silico* de datos públicos de topología del genoma, así como de ChIP contra ERA, en una región 650 kb (kilobase) río arriba del promotor y 130 kb río abajo del promotor. En la **Fig 13**, se muestran sombreadas en gris las ocho regiones seleccionadas como posibles reguladoras de la

transcripción del *PGR* y resaltada en amarillo la región del promotor. En el panel superior de la **Fig. 13** se muestran las regiones río arriba del promotor con las que existe un contacto, evaluadas con la técnica de 3C, en un modelo de células MCF7 estimuladas con E2. Las cinco regiones presentan la asociación de ER α como se observa en el ensayo de ChIP panel inferior. En el panel de en medio, se indican los diez contactos obtenidos, a través de pChIC, entre el promotor del *PGR* y regiones distales en cultivos primarios de células estromales aisladas de la decidua parentalis de placenta, expuestas a un protocolo de decidualización con MPA y AMPc. De los contactos encontrados por este método, únicamente las regiones sombreadas en gris 6,7,8 coinciden con los reportados en células MCF7 a través de 3C. En el panel inferior se encuentran los datos de ChIP-qPCR o ChIP-seq de las muestras de GEO contra ER α . Los dos experimentos de ChIP-seq en células de Ishikawa con tratamiento de E2 muestran una asociación de ER α en siete de las ocho regiones sombreadas en gris. Por el contrario, en las muestras de cáncer de endometrio donde no existe un estímulo previo de E2, solo en las regiones 2, 4, 5, 8 hay una asociación constante de ER α en las cuatro muestras. En la región del promotor únicamente una de las muestras de tejido de cáncer de endometrio mostró una asociación de ER α , mientras que en la línea celular Ishikawa, un modelo más cercano a THESC, dos muestras presentan la unión de ER α .

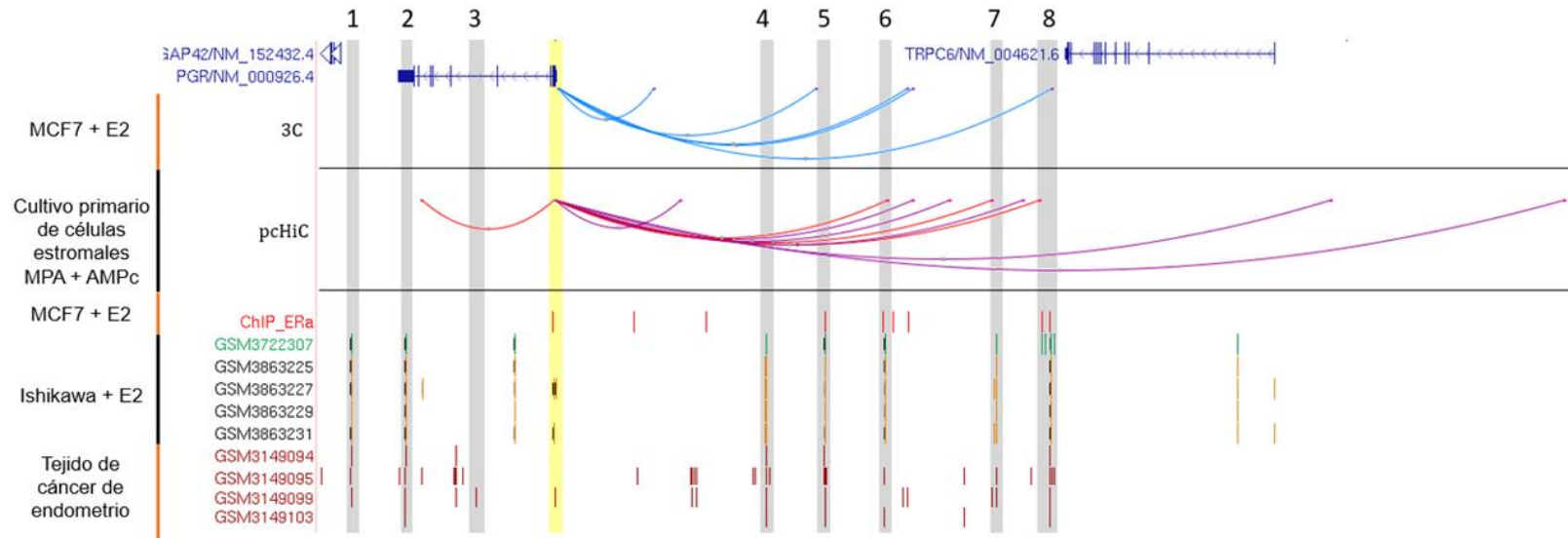


Fig. 13 Visualización de datos públicos de la región chr11:100,850,356-101,643,650 en UCSC Genome Browser. En los primeros dos paneles se muestran las regiones de contacto entre el promotor del *PGR* y regiones distales. En el segundo panel las líneas en rojo son regiones de contacto donde se encuentra asociado ER α en diferentes muestras. El tercer panel muestra los datos de ChIP-seq para ER α . La primera columna del lado izquierdo indica las líneas celulares o tejidos utilizados y los tratamientos correspondientes cuando aplique. La segunda columna indica los números de acceso de GEO (se asignó un color diferente para cada muestra) o los experimentos realizados para la visualización de los datos. Resaltado en amarillo se muestra el promotor del *PGR* y en gris las regiones a estudiar. En la parte superior se muestran las regiones a estudiar numeradas. E2, estradiol; MPA, medroxiprogesterona; AMPc, adenosín monofosfato cíclico.

En la **Fig. 14** se observan los datos obtenidos de ENCODE para ChIP-seq contra ER α , después del estímulo con E2. En las células derivadas de endometrio, Ishikawa y ECC-1, se observa la unión del ER α en las ocho regiones sombreadas de gris. En las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y T47D se ha detectado la presencia de ER α en todas las regiones sombreadas en gris, excepto en la número 4. Las muestras denominadas como “Txn Factor ChIP” y “Txn Factor ChIP E3” indican la señal obtenida de líneas celulares T47D, Ishikawa y ECC-1. De acuerdo a estas muestras las regiones con mayor probabilidad de encontrar a ER α son: 1,2,4,5,6 y 8. En ninguna de las muestras obtenidas por ENCODE existe la señal para ER α en la región del promotor, señalada con amarillo, sin embargo, esta región junto con la región 8, son sensibles a DNAsa lo que indica que son zonas de cromatina abierta para favorecer la transcripción.

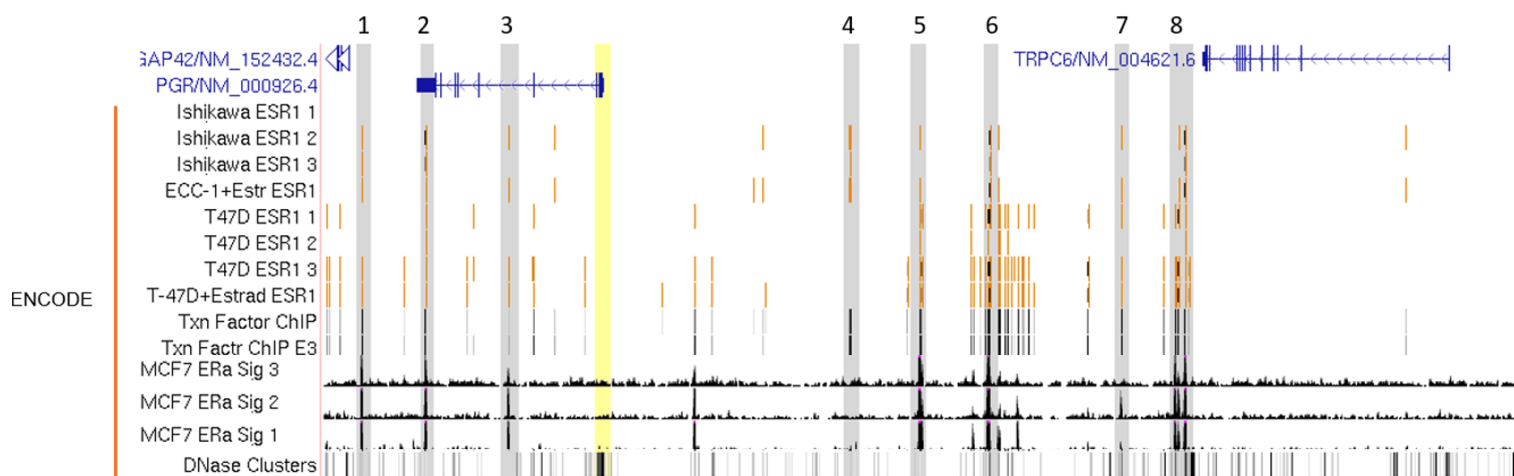


Fig. 14 Visualización de datos de ENCODE para la región chr11:100,850,356-101,489,081 en UCSC Genome Browser. Se muestran los sitios de unión de ER α en las líneas celulares de cáncer de endometrio, Ishikawa y ECC-1, y cáncer de mama T47D y MCF7. En la parte inferior se muestran los sitios sensibles a DNAsa, a mayor intensidad de la banda mayor sensible es la región a la enzima. Resaltado en amarillo se muestra el promotor del *PGR* y en gris las regiones seleccionadas a estudiar. En la parte superior se muestran las regiones a estudiar numeradas.

La **Fig 15**. muestra las marcas epigenéticas para la región de estudio obtenidas de diferentes consorcios. Para CEMT se muestran las modificaciones de histonas H3K27ac, de color azul, en la región del promotor, mientras que la marca H3K4me1, de color naranja, además de estar presente en la región del promotor se encuentra en las regiones de estudio 2,7,8. Por otro lado, FANTOM5 muestra las posibles regiones potenciadoras y los sitios del genoma que interactúan entre sí en diversas líneas celulares. En la zona de estudio, las regiones 3 y 8 están marcadas como posibles secuencias potenciadoras y la región del promotor está interactuando con la región 3. Finalmente, Roadmap, estudia modificaciones epigenéticas en diferentes tejidos, el tejido con mayor similitud al endometrio en Roadmap es el ovario. Únicamente se detecta la marca H3K27ac en la región del promotor del *PGR*. El algoritmo chromHMM, localizado al final de la Fig. 15, permite asignar diferentes anotaciones al genoma dependiendo de las marcas epigenéticas encontradas en el tejido. La región sombreada en amarillo presenta marcas características de promotor. Las regiones de estudio 2 y 8 son posibles secuencias

potenciadoras mientras que en la región 3 se pueden asociar proteínas con dedos de zinc.

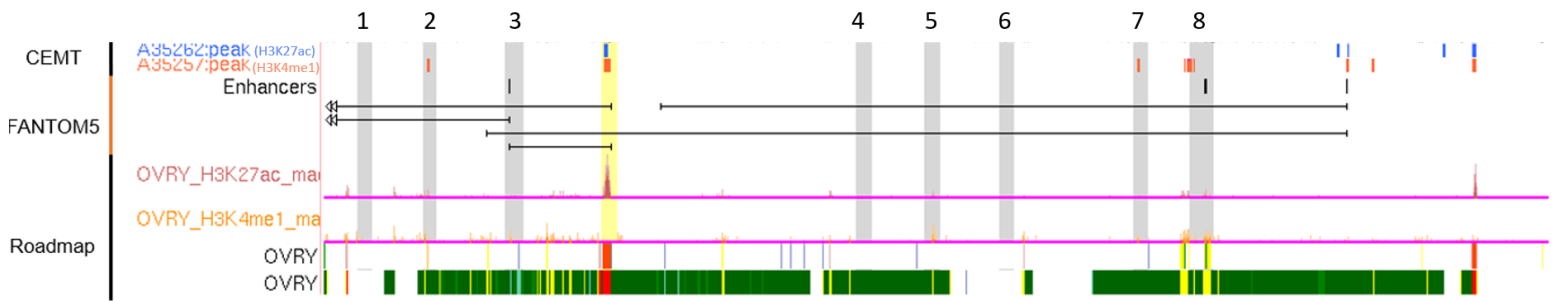


Fig. 15 Modificaciones epigenéticas en la región chr11:100,850,356-101,489,081. Del lado izquierdo se muestran los consorcios utilizados, para determinar posibles regiones potenciadoras se utilizaron los datos de ChIP-seq de CEMT para las marcas de cromatina H3K27ac (azul) y H3K4me1 (naranja). Datos de CAGE del consorcio FANTOM5. En Roadmap se utilizaron datos de ovario para visualizar las marcas H3K27ac (rosa) y H3K4me1 (naranja), así como el algoritmo chromHMM destacando los estados de cromatina: sitios de inicio de transcripción (rojo), secuencias potenciadoras (amarillo), sitios de unión a proteínas con dedos de zinc y repetidos (azul claro), zonas transcripcionalmente activas (verde). Resaltado en amarillo se muestra el promotor del *PGR* y en gris las regiones a estudiar. En la parte superior se muestran las regiones a estudiar numeradas.

Para evaluar las posibles interacciones entre los ocho sitios seleccionados y el promotor del *PGR* se debe llevar a cabo la técnica del 3C. En la **Fig. 16** se muestran los primers diseñados para 3C al utilizar dos diferentes enzimas de restricción EcoRI y HindIII en las regiones de estudio.

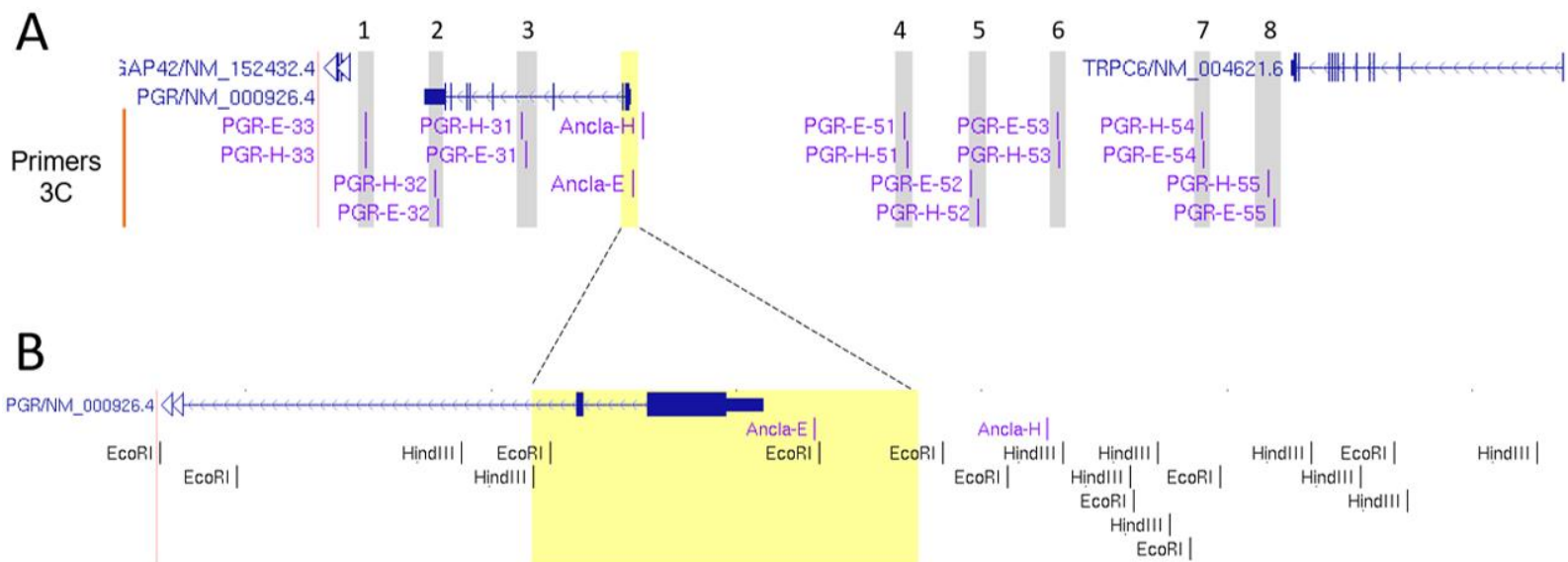


Fig. 14 Diseño de primers para 3C. A) Visualización de la región chr11:100,850,356-101,489,081. Se muestran las regiones para las cuales se diseñaron primers para las enzimas de restricción EcoRI y HindIII. **B)** Un acercamiento en la zona que incluye al promotor del *PGR* (chr11:100,988,244-101,017,014) señala la posición de los primers diseñados (barras moradas) para el sitio de restricción más cercano (barras negras). Resaltado en amarillo se muestra el promotor del *PGR* y en gris las regiones a estudiar. En la parte superior se muestran las regiones a estudiar numeradas.

10. Discusión

El endometrio es la capa que recubre el interior del útero, el E2 regula el crecimiento del tejido, mientras que, la P4 modula su diferenciación. (Marieb, 2008; Simón, 2009; Bieber, 2010). Si se produce la fecundación del óvulo, su función principal es proveer el ambiente adecuado para la adherencia y desarrollo del blastocisto, en caso de no presentarse la fecundación el endometrio se desprende del útero en cada ciclo menstrual, dando lugar a la menstruación (Esponera Sanz, 1997; Mazor y Kurman 2007; Filicori 2015). Para que el endometrio sea receptivo al blastocisto debe presentar cambios morfológicos y bioquímicos conocidos como decidualización en las células estromales (Su y Fazleabas, 2015; Okada *et al.*, 2018). De forma natural, la decidualización se desencadena por acción de la P4 que, al unirse a su receptor, PR, actúa como factor de transcripción para inducir la expresión de sus genes blanco (Young, 2013; Camacho-Arroyo *et al.*, 2017). En modelos *in vitro* además de P4 es necesario utilizar E2 y AMPc para inducir a la decidualización (Jiang *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2018; Haller *et al.*, 2019; Szwarc *et al.*, 2019). La adición del AMPc ejerce acciones de segundo mensajero para activar genes necesarios en la decidualización (Gellersen y Brosens, 2014; Yoshie, *et al.*, 2015). El E2 al unirse a su receptor ER α , es el principal inductor de la transcripción del *PGR*, gen que codifica para el PR (Nilsson *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2004). Sin embargo, en la región del promotor para PR-B únicamente existe medio ERE imperfecto y para PR-A medio ERE, lo que sugiere que ER α debe encontrarse en secuencias potenciadoras distales al promotor para promover la transcripción del gen (Camacho-Arroyo *et al.*, 2017).

La línea celular utilizada fue THESC, la cual presenta células estromales de endometrio sano inmortalizadas. En los ensayos de expresión del *PGR* en THESC ante el estímulo de decidualización, se observa un aumento significativo tanto en la expresión total (PR-AB), como en la isoforma PR-B. No obstante, se observa un mayor incremento en la expresión de PR-B que de PR-AB, a diferencia de lo observado por (Logan *et al.*, 2013) donde la inducción de ambas isoformas, es similar. La diferencia entre ambos estudios podría deberse a la región en la que se localizan los primers de expresión. Los primers de Logan y colaboradores para

detectar ambas isoformas (PR-AB) y para PR-B, se encuentran en el exón 1. PR-A carece de AF3, por ello diseñar ambos primers en esta región impediría la detección indirecta de PR-A. En el presente estudio los primers para PR-AB fueron diseñados en el exón 7 del *PGR*, el cual se comparte entre PR-A y PR-B. Otro aspecto a considerar es la eficiencia de los primers para amplificar cada producto, sin embargo, al evaluar la eficiencia de los primers ambos presentan eficiencias similares (Anexo I). En endometrio la isoforma predominante es la PR-B, se conoce que las diferentes isoformas pueden regular diferentes genes en endometrio durante la deciduación (Kaya *et al.*, 2015). En cultivos primarios de células estromales de endometrio se ha sugerido la regulación de la PR-A a través de PR-B al encontrarse asociado en la zona del promotor de PR-A (Kaya *et al.*, 2015). En el modelo *in vitro* de THESC, PR-B podría regular negativamente la expresión de PR-A durante la deciduación, disminuyendo así los niveles de expresión totales del PR-AB, lo que explicaría la presencia mayoritaria de PR-B en endometrio. Para evaluar la funcionalidad de PR-B durante la deciduación en el modelo THESC, podría llevarse a cabo un knock down de PR-A y llevar a cabo un co-cultivo de las células silenciadas con una línea celular de trofoblastos, además de evaluar los genes más relevantes para la deciduación regulados por cada isoforma.

Aunque se sabe que el *PGR* es regulado principalmente por los estrógenos, a través de ER α ensayos de CHIP no han demostrado la presencia de ER α en el promotor del *PGR*, pero sí en sitios distales al mismo. (Fullwood *et al.*, 2009; Bonéy-Montoya *et al.*, 2010). En diversos modelos celulares se ha comprobado que el ER α activa la transcripción al unirse preferentemente a secuencias potenciadoras en vez de los promotores de sus genes blanco (Fullwood *et al.*, 2009; Carleton *et al.*, 2020; Farcas *et al.*, 2021). Poco se ha investigado de como la topología del genoma influye en la expresión del *PGR*. El grupo de investigación de (Bonéy-Montoya *et al.*, 2010) fueron los primeros en estudiar la regulación del *PGR* a través de regiones distales en las cuales se encontraba asociado ER α , en un modelo de células MCF7, caracterizando 5 regiones de contacto significativas en presencia de E2. En un estudio reciente sobre partos pretérmino (Sakabe *et al.*, 2020) se estudió la interacción de los promotores con regiones distales del genoma a través de la

técnica pHiC después de la inducción a la deciduación con MPA y AMPc. En este último estudio, el promotor del *PGR* presentó diez interacciones con regiones distales, tres de las cuales (región 6, 7,8) coinciden con lo evaluado a través de 3C por el grupo de Bonéy-Montoya. Establecer estos tres sitios como regiones de contacto con el promotor del *PGR*, utilizando técnicas con diferente resolución, sugiere que pueden ser importantes para la transcripción del gen, ya que, en ellas se encuentra ER α aún en ausencia de E2. Aunque la región 5 presenta la unión de ER α en diversos modelos celulares, su contacto con el promotor del *PGR* no es observado en células de endometrio deciduadas a diferencia del modelo MCF7. El contacto entre la región 5 y el promotor del *PGR* puede encontrarse regulada exclusivamente por E2 y por ello ni el MPA o AMPc pueden favorecer esta unión. No obstante, este contacto podría ser exclusivo de cáncer de mama, lo que indicaría una regulación específica del gen en diferentes tejidos.

En otros estudios en líneas celulares de endometrio (Blanchard *et al.*, 2019; Rodríguez *et al.*, 2020) y en tejido endometrial (Singh *et al.*, 2019) se ha encontrado la asociación de ER α en presencia y ausencia de E2. El hallazgo de ER α coincide en todas las regiones, excepto la número 3, entre los datos obtenidos de GEO y los reportados en ENCODE en las líneas celulares Ishikawa y ECC-1. Tomando en cuenta la presencia ER α y la interacción del promotor con las regiones 2, 5, 6, 7 y 8 se puede especular que existen asas de cromatina entre el promotor y las regiones 5 y 2 en ausencia de estrógenos, las cuales podrían conservarse al añadir E2 y nuevas asas se formarían ante el estímulo con las regiones 6, 7 y 8. El ER α inactivo puede ser desplazado por la forma activa del receptor una vez que se ha unido a su ligando y así reclutar remodeladores de la cromatina para favorecer la apertura de la cromatina y el anclaje de la maquinaria transcripcional como sucede con otros SR (Camacho-Arroyo *et al.*, 2017; Le Dily y Beato, 2018). Las probables regiones que intervienen en la expresión del *PGR* y se conservan en otras líneas celulares reguladas por hormonas, como T47D y MCF7, son 2, 5, 6, 7 y 8, ya que, en los datos de ENCODE se ha localizado a ER α en dichas zonas. Estas regiones podrían ser secuencias potenciadoras canónicas del *PGR* independientemente del tejido en el que se exprese, mientras que, las regiones 1 y 4 podrían ser tejido específico de

endometrio, así como la región 3 podría regular su expresión únicamente en cáncer de mama.

En cuanto a las modificaciones epigenéticas en las zonas seleccionadas, la marca H3K4me1 asociada a secuencias potenciadoras se encuentra en las regiones 2, 7 y 8, a su vez la región 8 tiene una alta sensibilidad a DNAsa, por lo que podrían ser probables secuencias potenciadoras del *PGR*. Por cercanía lineal en el genoma, la región 8 podría regular a TRCP6, sin embargo, se ha comprobado que la expresión de TRCP6 es independiente de hormonas y la región 8 tiene mayor probabilidad de regular la transcripción del *PGR* (Bonéy-Montoya *et al.*, 2010). De acuerdo con los datos de FANTOM5, la región 3 posee características de secuencia potenciadora y podría estar en contacto con el promotor del *PGR*, sin embargo, esta región presenta mayor asociación de ER α en las líneas celulares de cáncer de mama. La región 3 es además una zona de repetidos y un sitio de unión para proteínas con dedos de zinc por lo que estas proteínas podrían reclutar otros co-reguladores como remodeladores de la cromatina, lo que podría regular la transcripción del *PGR* por un factor de transcripción diferente a ER α .

La conformación espacial del genoma dentro del núcleo desempeña un papel importante en la regulación de la expresión génica (Cavalli y Misteli, 2013; Le Dily y Beato, 2018). En la línea celular THESC se desconoce la influencia de la topología del genoma en la expresión del *PGR*. Para conocer si estas regiones tienen un contacto previo a la activación hormonal o su contacto es establecido *de novo* es necesario realizar un perfil de 3C para comparar las interacciones en ausencia y presencia del estímulo hormonal. Se inició con la estandarización de la técnica 3C y se diseñaron los primers para dos enzimas de restricción, EcoRI y HindIII, en las 8 regiones de interés en las que podría estar ER α o que de acuerdo con sus características epigenéticas podrían regular la transcripción del *PGR*.

11. Perspectivas

Para esclarecer la regulación del *PGR* por ER α a través del contacto con regiones distales del genoma es necesario llevar a cabo experimentos derivados de la técnica de 3C, así como, ensayos de ChIP contra ER α en presencia y ausencia de hormonas esteroideas. Determinar la influencia de estas zonas, en especial las regiones 6 y 8, donde se encontró a ER α en todas las líneas celulares, en la transcripción del *PGR* podría evaluarse a través de ensayos de mutación por vectores o con ensayos de CRISPR-Cas9. Evaluar la influencia de la región 2 en la transcripción del *PGR* requiere de una mutación más específica, ya que, esta región se encuentra en el cuerpo del gen. El método de CRISPR-Cas9 podría insertar la mutación que impidiera la posible interacción de esta región con su promotor, pero sin interferir con la estructura de la proteína al insertar mutaciones silenciosas que generen los mismos aminoácidos o aminoácidos de naturaleza similar. Así la disminución de la actividad del PR sería por la disminución de su expresión, evitando un mal plegamiento de la proteína.

La regulación del *PGR* a través de la topología tridimensional del genoma es relevante, debido a que la P4 actúa a través del PR para inducir la decidualización del endometrio, transición necesaria para la correcta adhesión del blastocisto al endometrio en las etapas tempranas del embarazo. Además, la organización del genoma dentro del núcleo podría contribuir a establecer la patogénesis de enfermedades reproductivas como: endometriosis, cáncer de endometrio, infertilidad o abortos recurrentes por una transición inadecuada a la decidualización del endometrio.

12. Conclusiones

1. El *PGR* se expresa en células THESC ante un estímulo de decidualización.
2. El análisis *in silico* demostró que existen 8 regiones distales al promotor del *PGR* en las que se encuentra unido el ER α y podrían funcionar como secuencias potenciadoras regulando la transcripción del gen.

13. Referencias

- Aghajanova, L. et al. (2009) 'Steroidogenic Enzyme and Key Decidualization Marker Dysregulation in Endometrial Stromal Cells from Women with Versus Without Endometriosis', *Biology of Reproduction*, 80(1), pp. 105–114. doi: 10.1095/biolreprod.108.070300.
- Andersson, R. et al. (2014) 'An atlas of active enhancers across human cell types and tissues', *Nature*. Nature Publishing Group, 507(7493), pp. 455–461. doi: 10.1038/nature12787.
- Andersson, R. and Sandelin, A. (2020) 'Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements', *Nature Reviews Genetics*. Nature Research, pp. 71–87. doi: 10.1038/s41576-019-0173-8.
- Ballaré, C. et al. (2013) 'Nucleosome-Driven Transcription Factor Binding and Gene Regulation', *Molecular Cell*. 49(1), pp. 67–79. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.019.
- Bieber, E.J. 2010. Fisiología del útero y del cuello uterino. En: Baggish, M.S., Valle, F.R. y Guedj, H. eds, Histeroscopia: Perspectivas visuales sobre anatomía, fisiología e histopatología uterina. Cap. 3. 3a edición. AMOLCA. México; 27-42
- Blanchard, Z. et al. (2019) 'Estrogen-independent molecular actions of mutant estrogen receptor 1 in endometrial cancer', *Genome Research*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 29(9), pp. 1429–1441. doi: 10.1101/gr.244780.118.
- Bonéy-Montoya, J. et al. (2010) 'Long-Range Transcriptional Control of Progesterone Receptor Gene Expression', *Molecular Endocrinology*, 24(2), pp. 346–358. doi: 10.1210/me.2009-0429.
- Bošković, A. and Rando, O. J. (2018). 'Transgenerational Epigenetic Inheritance.' *Annual review of genetics*, 52, 21–41. doi: 10.1146/annurev-genet-120417-031404
- Brown, D. M. et al. (2018) 'Notch-1 Signaling Activation and Progesterone Receptor Expression in Ectopic Lesions of Women With Endometriosis', *Journal of the Endocrine Society*. The Endocrine Society, 2(7), pp. 765–778. doi: 10.1210/js.2018-00007.
- Camacho-Arroyo, I., Hansberg-Pastor, V., Vázquez-Martínez, E.R., Cerbón, M. 2017. Mechanism of Progesterone Action in the Brain. En: Pfaff, D.W y Joëls, M. eds, Hormones, Brain, and Behavior. Cap.3.10. 3a edición, Vol 3. Elsevier Inc.USA; 181–214
- Cavalli, G. and Misteli, T. (2013) 'Functional implications of genome topology', *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(3), pp. 290–299. doi: 10.1038/nsmb.2474.

- Conneely, O. M. et al. (2002) 'Reproductive functions of progesterone receptors', *Recent Progress in Hormone Research*, 57, pp. 339–355. doi: 10.1210/rp.57.1.339.
- Dekker, J. et al. (2002) 'Capturing chromosome conformation', *Science*. Science, 295(5558), pp. 1306–1311. doi: 10.1126/science.1067799.
- Dekker, J. (2006) 'The three "C" s of chromosome conformation capture: Controls, controls, controls', *Nature Methods*. 3(1), pp. 17–21. doi: 10.1038/nmeth823.
- Diep, C. H., Ahrendt, H. and Lange, C. A. (2016) 'Progesterone induces progesterone receptor gene (PGR) expression via rapid activation of protein kinase pathways required for cooperative estrogen receptor alpha (ER) and progesterone receptor (PR) genomic action at ER/PR target genes', *Steroids*. Elsevier Inc., 114, pp. 48–58. doi: 10.1016/j.steroids.2016.09.004.
- Le Dily, F. and Beato, M. (2018) 'Signaling by Steroid Hormones in the 3D Nuclear Space', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), p. 306. doi: 10.3390/ijms19020306.
- Dixon, J. R. et al. (2012) 'Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions', *Nature*, 485(7398), pp. 376–380. doi: 10.1038/nature11082.
- Doğan, E. S. and Liu, C. (2018). 'Three-dimensional chromatin packing and positioning of plant genomes'. *Nature plants*, 4(8), 521–529. doi: 10.1038/s41477-018-0199-5
- Esponera Sanz, J. 1997. Cambios morfológicos durante el ciclo menstrual. En: Botella Llusia, J. ed. El útero: fisiología y patología. Cap. 4. Editorial Díaz de Santos, S.A. Madrid, España; 53-62
- Filicori, M. (2015) 'Clinical roles and applications of progesterone in reproductive medicine: an overview', *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 94, pp. 3–7. doi: 10.1111/aogs.12791.
- Fullwood, M. J. et al. (2009) 'An oestrogen-receptor- α -bound human chromatin interactome', *Nature*, 462(7269), pp. 58–64. doi: 10.1038/nature08497.
- Gellersen, B. and Brosens, J. J. (2014) 'Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure.', *Endocrine reviews*. Endocrine Society, 35(6), pp. 851–905. doi: 10.1210/er.2014-1045.
- Greenberg, M., & Bourc'his, D. (2019). 'The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease'. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(10), 590–607. doi: 10.1038/s41580-019-0159-6
- Goldhar, A. S., Duan, R., Ginsburg, E. and Vonderhaar, B. K. (2011). 'Progesterone induces expression of the prolactin receptor gene through

cooperative action of Sp1 and C/EBP.' *Molecular and cellular endocrinology*, 335(2), 148–157. doi: 10.1016/j.mce.2011.01.004

Gúrpide, E. 1997. Estudios in vitro sobre el endometrio humano: mecanismos de decidualización del estroma endometrial En: Botella Llusia, J. ed. El útero: fisiología y patología. Cap. 9. Editorial Diaz de Santos, S.A. Madrid, España; 133-140

Haller, M., Yin, Y. and Ma, L. (2019) 'Development and utilization of human decidualization reporter cell line uncovers new modulators of female fertility', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 116(39), pp. 19541–19551. doi: 10.1073/pnas.1907652116.

Han, J., Zhang, Z. and Wang, K. (2018) '3C and 3C-based techniques: The powerful tools for spatial genome organization deciphering', *Molecular Cytogenetics*. 11, 21. doi: 10.1186/s13039-018-0368-2.

Hildebrand, E. M. and Dekker, J. (2020). 'Mechanisms and Functions of Chromosome Compartmentalization'. *Trends in biochemical sciences*, 45(5), 385–396. doi: 10.1016/j.tibs.2020.01.002

Hirata, S. et al. (2002) 'Novel isoforms of the mRNA for human female sex steroid hormone receptors', *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 83(1-5), 25–30. doi: 10.1016/S0960-0760(02)00255-8.

Hsu, P.-Y. et al. (2010) 'Estrogen-mediated epigenetic repression of large chromosomal regions through DNA looping', *Genome Research*, 20(6), pp. 733–744. doi: 10.1101/gr.101923.109.

Hsu, S. C. et al. 2017). 'The BET Protein BRD2 Cooperates with CTCF to Enforce Transcriptional and Architectural Boundaries'. *Molecular cell*, 66(1), 102–116.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2017.02.027

Jiang, Y. et al. (2015) 'FoxM1 Directs STAT3 Expression Essential for Human Endometrial Stromal Decidualization', *Scientific Reports*. 5, p. 13735. doi: 10.1038/srep13735.

Justice, M. et al. (2020). A WIZ/Cohesin/CTCF Complex Anchors DNA Loops to Define Gene Expression and Cell Identity. *Cell reports*, 31(2), 107503. doi: 10.1016/j.celrep.2020.03.067

Kastner, P. et al. (1990). 'Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B.' *The EMBO journal*, 9(5), 1603–1614.

Kaya, H. S. et al. (2015) 'Roles of progesterone receptor A and B isoforms during human endometrial decidualization', *Molecular Endocrinology*. 29(6), pp. 882–895. doi: 10.1210/me.2014-1363.

- Khader, N., Shchuka, V. M., Shynlova, O. and Mitchell, J. A. (2021). 'Transcriptional control of parturition: insights from gene regulation studies in the myometrium.' *Molecular human reproduction*, 27(5), gaab024. doi: 10.1093/molehr/gaab024
- Klemmt, P. A. B. et al. (2006) 'Stromal cells from endometriotic lesions and endometrium from women with endometriosis have reduced decidualization capacity', *Fertility and Sterility*, 85(3), pp. 564–572. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.08.046.
- Kornberg, R. D. and Lorch, Y. (2020). 'Primary Role of the Nucleosome'. *Molecular cell*, 79(3), 371–375. doi: 10.1016/j.molcel.2020.07.020
- Kuznetsova, T. et al. (2015) 'Glucocorticoid receptor and nuclear factor kappa-b affect three-dimensional chromatin organization', *Genome Biology*. 16(1). doi: 10.1186/s13059-015-0832-9.
- Li, W., Notani, D. and Rosenfeld, M. G. (2016) 'Enhancers as non-coding RNA transcription units: Recent insights and future perspectives', *Nature Reviews Genetics*. pp. 207–223. doi: 10.1038/nrg.2016.4.
- Liang, Y. X. et al. (2018) 'The high concentration of progesterone is harmful for endometrial receptivity and decidualization', *Scientific Reports*. 8(1), p. 712. doi: 10.1038/s41598-017-18643-w.
- Lieberman-Aiden, E. et al. (2009) 'Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome', *Science*, 326(5950), pp. 289–293. doi: 10.1126/science.1181369.
- Liu, J. L. et al. (2012) 'Combined analysis of microRNome and 3'-UTRome reveals a species-specific regulation of progesterone receptor expression in the endometrium of rhesus monkey', *Journal of Biological Chemistry. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 287(17), pp. 13899–13910. doi: 10.1074/jbc.M111.301275.
- Logan, P. C. et al. (2010). 'The effect of DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine on human endometrial stromal cells'. *Human reproduction* (Oxford, England), 25(11), 2859–2869. doi: 10.1093/humrep/deq238
- Logan, P. C. et al. (2013) 'Effect of cyclic AMP and estrogen/progesterone on the transcription of DNA methyltransferases during the decidualization of human endometrial stromal cells.', *Molecular human reproduction*, 19(5), pp. 302–12. doi: 10.1093/molehr/gas062.
- Marieb, E.N. 2008. Anatomía y fisiología humana. Pearson Education. 9ª Ed. Madrid, España. Cap. 16 El Sistema Reprodutor. pp 544-570

Mazor, M.T., Kurman, J.R. (2007) Diagnóstico de biopsias y legrados endometriales: un enfoque práctico. Ediciones Journal. Buenos Aires, Argentina. Cap. 2 El endometrio normal y el diagnóstico de esterilidad. pp 7-33

McCord, R. P., Kaplan, N. and Giorgetti, L. (2020) 'Chromosome Conformation Capture and Beyond: Toward an Integrative View of Chromosome Structure and Function', *Molecular Cell*. pp. 688–708. doi: 10.1016/j.molcel.2019.12.021.

Meyer, J. L. et al. (2014) 'DNA methylation patterns of steroid receptor genes ESR1, ESR2 and PGR in deep endometriosis compromising the rectum', *International Journal of Molecular Medicine*. 33(4), pp. 897–904. doi: 10.3892/ijmm.2014.1637.

Naumova, N. et al. (2012) 'Analysis of long-range chromatin interactions using Chromosome Conformation Capture', *Methods*. 58(3), pp. 192–203. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.07.022.

Ngollo, M. et al. (2014) 'The association between Histone 3 Lysine 27 Trimethylation (H3K27me3) and prostate cancer: relationship with clinicopathological parameters', *BMC Cancer*. 14(1). doi: 10.1186/1471-2407-14-994.

Nilsson, S. et al. (2001) 'Mechanisms of Estrogen Action', *Physiological Reviews*, 81(4), pp. 1535–1565. doi: 10.1152/physrev.2001.81.4.1535.

Okada, H., Tsuzuki, T. and Murata, H. (2018) 'Decidualization of the human endometrium', *Reproductive Medicine and Biology*, 17(3), pp. 220–227. doi: 10.1002/rmb2.12088.

Patel, B. et al. (2015) 'Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology', *Human Reproduction Update*, 21(2), pp. 155–173. doi: 10.1093/humupd/dmu056.

Petz, L. N. et al. (2002) 'Estrogen Receptor α and Activating Protein-1 Mediate Estrogen Responsiveness of the Progesterone Receptor Gene in MCF-7 Breast Cancer Cells', *Endocrinology*, 143(12), pp. 4583–4591. doi: 10.1210/en.2002-220369.

Plank, J. L. and Dean, A. (2014) 'Enhancer function: Mechanistic and genome-wide insights come together', *Molecular Cell*. pp. 5–14. doi: 10.1016/j.molcel.2014.06.015.

Ponnampalam, A. P. et al. (2004) 'Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling', *Molecular Human Reproduction*, 10(12), pp. 879–893. doi: 10.1093/molehr/gah121.

- Postberg, J., Lipps, H. J. and Cremer, T. (2010) 'Evolutionary origin of the cell nucleus and its functional architecture', *Essays In Biochemistry*, 48(1), pp. 1–24. doi: 10.1042/bse0480001.
- Ramathal, C. Y. et al. (2010) 'Endometrial decidualization: of mice and men.', *Seminars in reproductive medicine*, 28(1), pp. 17–26. doi: 10.1055/s-0029-1242989.
- Rao, S. S. P. et al. (2014) 'A 3D Map of the Human Genome at Kilobase Resolution Reveals Principles of Chromatin Looping', *Cell*, 159(7), pp. 1665–1680. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.021.
- Rao, S. S. P. et al. (2017). 'Cohesin Loss Eliminates All Loop Domains'. *Cell*, 171(2), 305–320.e24. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.026
- Rocha-Junior, C. V. et al. (2019) 'Progesterone Receptor B (PGR-B) Is Partially Methylated in Eutopic Endometrium From Infertile Women With Endometriosis', *Reproductive Sciences*. 26(12), pp. 1568–1574. doi: 10.1177/1933719119828078.
- Rodriguez, A. C. et al. (2020) 'ETV4 is necessary for estrogen signaling and growth in endometrial cancer cells', *Cancer Research*. 80(6), pp. 1234–1245. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1382.
- Rosario, G. et al. (2003) 'Role of progesterone in structural and biochemical remodeling of endometrium', *Frontiers in Bioscience*. doi: 10.2741/1173.
- Rowley, M. J. and Corces, V. G. (2018). 'Organizational principles of 3D genome architecture'. *Nature reviews. Genetics*, 19(12), 789–800. doi: 10.1038/s41576-018-0060-8
- Sakabe, N. et al. (2020) (2020). 'Transcriptome and regulatory maps of decidua-derived stromal cells inform gene discovery in preterm birth'. *Science advances*, 6(49), eabc8696. doi: 10.1101/2020.04.06.017079.
- Schutte, S. C. et al. (2015) 'Tissue-engineered endometrial model for the study of cell-cell interactions', *Reproductive Sciences*. 22(3), pp. 308–315. doi: 10.1177/1933719114542008.
- Simón, C. (2009) El endometrio humano. En: Simón, C., Horcajadas, J.A., García-Velasco, J.A., Pellicer, A. eds. *El Endometrio Humano: Desde la investigación a la clínica*. Cap. 1. Editorial Médica Panamericana. España; 2-10
- Singh, A. A. et al. (2019) 'Optimized ChIP-seq method facilitates transcription factor profiling in human tumors', *Life Science Alliance*. 2(1). doi: 10.26508/lsa.201800115.
- Skvortsova, K., Iovino, N. and Bogdanović, O. (2018). 'Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals'. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(12), 774–790. doi: 10.1038/s41580-018-0074-2

- Stratmann, A. and Haendler, B. (2011) 'The histone demethylase JARID1A regulates progesterone receptor expression', *FEBS Journal*. 278(9), pp. 1458–1469. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08058.x.
- Su, R.-W. and Fazleabas, A. T. (2015) 'Implantation and Establishment of Pregnancy in Human and Nonhuman Primates', *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, pp. 189–213. doi: 10.1007/978-3-319-15856-3_10.
- Szabo, Q., Bantignies, F. and Cavalli, G. (2019). 'Principles of genome folding into topologically associating domains'. *Science advances*, 5(4), eaaw1668. doi: 10.1126/sciadv.aaw1668
- Szwarc, M. M. et al. (2019) 'Early growth response 1 transcriptionally primes the human endometrial stromal cell for decidualization', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 189, pp. 283–290. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.01.021.
- Taraborrelli, S. (2015) 'Physiology, production and action of progesterone', *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 94, pp. 8–16. doi: 10.1111/aogs.12771.
- Uusküla-Reimand, L. et al. (2016). 'Topoisomerase II beta interacts with cohesin and CTCF at topological domain borders'. *Genome biology*, 17(1), 182. doi: 10.1186/s13059-016-1043-8
- Wang, W. et al. (2020) 'Single-cell transcriptomic atlas of the human endometrium during the menstrual cycle', *Nature Medicine*. 26(10), pp. 1644–1653. doi: 10.1038/s41591-020-1040-z
- Weintraub, A. S. et al. (2017). 'YY1 Is a Structural Regulator of Enhancer-Promoter Loops.' *Cell*, 171(7), 1573–1588.e28. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.008
- Wen, Z. et al. (2018). 'ZNF143 is a regulator of chromatin loop'. *Cell biology and toxicology*, 34(6), 471–478. doi: 10.1007/s10565-018-9443-z
- de Wit, E. and de Laat, W. (2012). 'A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization'. *Genes & development*, 26(1), 11–24. doi: 10.1101/gad.179804.111
- Wu, Y. et al. (2006) 'Promoter Hypermethylation of Progesterone Receptor Isoform B (PR-B) in Endometriosis', *Epigenetics*, 1(2), pp. 106–111. doi: 10.4161/epi.1.2.2766.
- Xu, X. et al. (2004) 'Transcription factor accessibility and histone acetylation of the progesterone receptor gene differs between parental MCF-7 cells and a subline that has lost progesterone receptor expression', *Gene*, 328, pp. 143–151. doi: 10.1016/j.gene.2003.12.003.

Xue, Q. et al. (2007) 'Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 in human endometrium and endometriosis.', *Biology of reproduction*, 77(4), pp. 681–7. doi: 10.1095/biolreprod.107.061804.

Yoshie, M., Kusama, K. and Tamura, K. (2015) 'Molecular mechanisms of human endometrial decidualization activated by cyclic adenosine monophosphate signaling pathways', *Journal of Mammalian Ova Research*. pp. 95–102. doi: 10.1274/jmor.32.95.

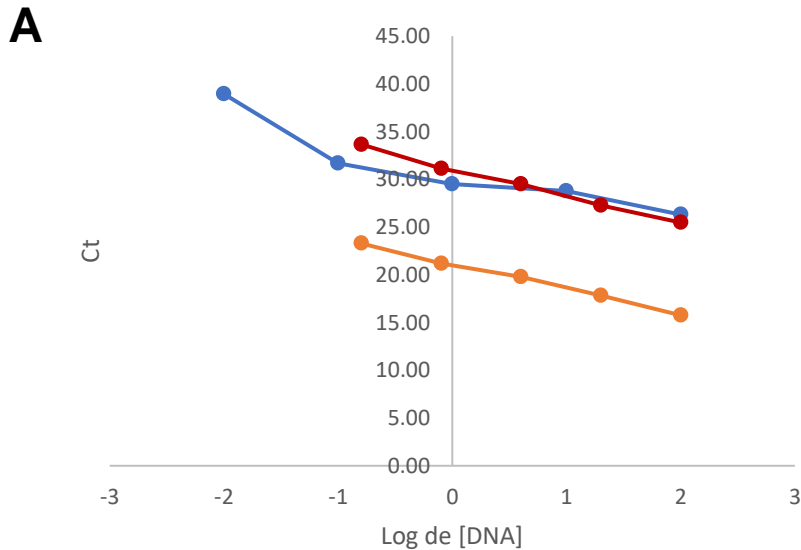
Young, S. L. (2013) 'Oestrogen and progesterone action on endometrium: a translational approach to understanding endometrial receptivity', *Reproductive BioMedicine Online*, 27(5), pp. 497–505. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.06.010.

Yu, J. et al. (2019) 'Interleukin-1 β inhibits estrogen receptor- α , progesterone receptors A and B and biomarkers of human endometrial stromal cell differentiation: Implications for endometriosis', *Molecular Human Reproduction*. 25(10), pp. 625–637. doi: 10.1093/molehr/gaz045

Zhan, Y. et al. (2017) 'Reciprocal insulation analysis of Hi-C data shows that TADs represent a functionally but not structurally privileged scale in the hierarchical folding of chromosomes', *Genome Research*, 27(3), pp. 479–490. doi: 10.1101/gr.212803.116.

Zhou, M. et al. (2016) 'MiR-196a overexpression activates the MEK/ERK signal and represses the progesterone receptor and decidualization in eutopic endometrium from women with endometriosis', *Human Reproduction*. 31(11), pp. 2598–2608. doi: 10.1093/humrep/dew223.

Anexo I. Figuras complementarias



B Eficiencia de primers de expresión

PR-AB 113%

PR-B 110%

GAPDH 120%

Fig. 1. Eficiencia de alineamiento de primers de expresión. A) Gráfica de eficiencia de primers para PR-AB (azul), PR-B (rojo) y GAPDH (naranja) se muestra el Ct de amplificación vs logaritmo de la concentración de DNA. B) Porcentajes de eficiencia obtenidos mediante el método $E = 10^{-1/m}$, donde E es la eficiencia y m la pendiente obtenida en la gráfica de la izquierda. Para obtener el valor en porcentaje se realizó el cálculo $\% = (E * 100)/2$

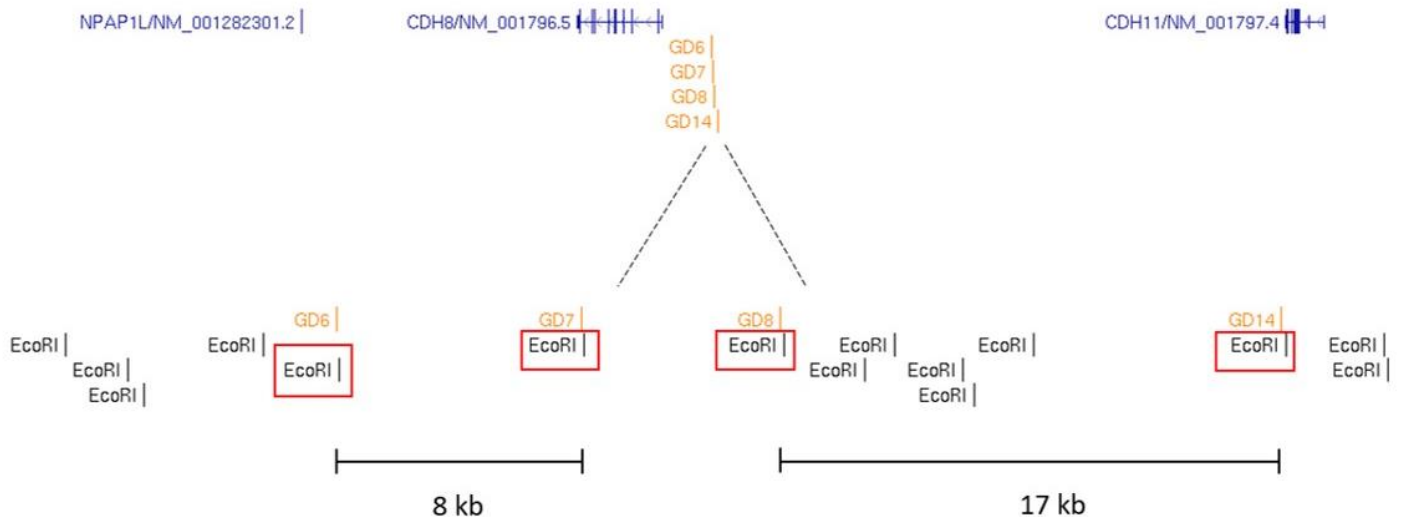


Fig. 2. Localización de los primers para la estandarización 3C. A) Visualización de la región chr16:59,343,705-65,199,412 donde se muestra la localización de los primers utilizados en la estandarización B) Al hacer un acercamiento a la región chr16:62,291,279-62,337,862 se observan los sitios de restricción cercanos a la posición de los primers así como la distancia que existe entre los primers para evaluar sitios cercanos (8 kb) y distales (17 kb)

REVIEW

Open Access



The role of epigenetic mechanisms in the regulation of gene expression in the cyclical endometrium

Alejandra Monserrat Retis-Resendiz^{1†}, Ixchel Nayeli González-García^{1†}, Moisés León-Juárez², Ignacio Camacho-Arroyo¹, Marco Cerbón¹ and Edgar Ricardo Vázquez-Martínez^{1*} 

Abstract

Background: The human endometrium is a highly dynamic tissue whose function is mainly regulated by the ovarian steroid hormones estradiol and progesterone. The serum levels of these and other hormones are associated with three specific phases that compose the endometrial cycle: menstrual, proliferative, and secretory. Throughout this cycle, the endometrium exhibits different transcriptional networks according to the genes expressed in each phase. Epigenetic mechanisms are crucial in the fine-tuning of gene expression to generate such transcriptional networks. The present review aims to provide an overview of current research focused on the epigenetic mechanisms that regulate gene expression in the cyclical endometrium and discuss the technical and clinical perspectives regarding this topic.

Main body: The main epigenetic mechanisms reported are DNA methylation, histone post-translational modifications, and non-coding RNAs. These epigenetic mechanisms induce the expression of genes associated with transcriptional regulation, endometrial epithelial growth, angiogenesis, and stromal cell proliferation during the proliferative phase. During the secretory phase, epigenetic mechanisms promote the expression of genes associated with hormone response, insulin signaling, decidualization, and embryo implantation. Furthermore, the global content of specific epigenetic modifications and the gene expression of non-coding RNAs and epigenetic modifiers vary according to the menstrual cycle phase. In vitro and cell type-specific studies have demonstrated that epithelial and stromal cells undergo particular epigenetic changes that modulate their transcriptional networks to accomplish their function during decidualization and implantation.

Conclusion and perspectives: Epigenetic mechanisms are emerging as key players in regulating transcriptional networks associated with key processes and functions of the cyclical endometrium. Further studies using next-generation sequencing and single-cell technology are warranted to explore the role of other epigenetic mechanisms in each cell type that composes the endometrium throughout the menstrual cycle. The application of this knowledge will

*Correspondence: vamer@comunidad.unam.mx

[†]Alejandra Monserrat Retis-Resendiz and Ixchel Nayeli González-García have contributed equally to this work

¹ Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Montes Urales 800, Lomas Virreyes, Miguel Hidalgo, 11000 Ciudad de México, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

definitively provide essential information to understand the pathological mechanisms of endometrial diseases, such as endometriosis and endometrial cancer, and to identify potential therapeutic targets and improve women's health.

Keywords: Endometrium, Epigenetic, Proliferative phase, Secretory phase, Sex hormones, Endometrial disease

Background

The endometrium is one of the most dynamic tissues in the human body as it undergoes periodic changes of regeneration, cell proliferation, differentiation, and apoptosis every 28 days [1]. This tissue is composed of luminal and glandular epithelial cells, stromal cells, immune cells such as lymphocytes and macrophages, endothelial cells, smooth muscle cells, and a recently uncharacterized type of ciliated epithelial cells [2]. The endometrium is one of the most responsive tissues to ovarian steroid hormones. In consequence, the phases of the endometrial cycle coordinate with phases of the ovulation cycle. The terms endometrial cycle and ovulation cycle refer to the menstrual cycle depending on the tissue/organ being studied. The endometrial cycle can be divided into the menstrual phase, the proliferative phase that corresponds to the follicular phase in the ovulation cycle, and the secretory phase that corresponds to the ovarian luteal phase. In turn, the phases of the endometrial cycle are subdivided into early, mid and late proliferative phases and early, mid, and late secretory phases according to histological evaluation [3]. In each menstrual cycle, the endometrium's functional layer is shed if embryo implantation does not occur and is restored within two weeks [4]. Unless otherwise indicated, from now on we will refer to the menstrual cycle as the endometrial cycle as we will focus on the changes that occur in the endometrium throughout the menstrual cycle.

The average duration of the menstrual cycle is 28 days; nevertheless, it is important to bear in mind that most women experience cycles within a range between 21 and 35 days. The proliferative phase occurs from day 4 to day 14 of the cycle, in which plasma levels of estradiol will increase, reaching their highest levels before ovulation [4]. The increasing amount of estradiol secreted by the ovarian follicles promotes the growth (proliferation) of endometrial glands and stroma; also, there is an increase in the depth of the spiral arteries that supply the endometrium [5]. During this phase, the events that occur include repair of the endometrium surface, proliferation, angiogenesis, vasculogenesis, and extracellular matrix remodeling [4–6].

The secretory phase occurs after ovulation, from day 14 to 28. This phase is characterized by a slight decrease in plasma estradiol levels and a dramatic increase in progesterone levels, leading to a high progesterone to estradiol ratio. During the secretory phase, the endometrium

increases its vascular supply, stimulates more mucous secretion, and stops proliferation [7, 8]. At this phase, the endometrium also undergoes a series of transformations to achieve a receptive state for implantation in a process called decidualization [9]. Decidualization is the progesterone-induced transformation of endometrial stromal cells (ESC) into decidual stromal cells (DSC). During this process, the development of the endometrial glands, energy storage in glycogen, and spiral arteries remodeling are observed [6, 10]. Another important characteristic of this phase is the creation of an appropriate environment for blastocyst implantation [6, 10, 11]. If implantation does not occur, estradiol and progesterone levels decline rapidly at the end of the secretory phase, leading to constriction of the spiral arteries, ischemia, and cell death of the functional layer, which in turn causes the shedding of the endometrium [6–11].

The cellular processes that occur during the endometrial cycle are regulated in part by estrogens and progesterone and are associated with specific transcriptional profiles necessary for the proper function of the endometrium [3]. Importantly, these transcriptional profiles are regulated in part by epigenetic mechanisms [12]. Epigenetics has been classically defined as heritable mitotic and meiotic changes in gene function that cannot be explained by modifications in the DNA sequence [13]. Epigenetic mechanisms regulate gene expression temporally and spatially [14] and are involved in fundamental processes like cellular identity, development, homeostasis, and diseases [15]. Epigenetic processes include DNA methylation, histone post-translational modifications (PTMs), chromatin structure, and non-coding RNAs. Chromatin remodeling is necessary to induce specific transcriptional networks by sex hormones throughout the endometrial cycle [16, 17]. The present review aims to provide an overview of current research focused on the epigenetic mechanisms that regulate the function of the cyclical endometrium and discuss the perspectives regarding this topic. We performed a comprehensive review of the literature available in PubMed written in English up to 2020. We used keywords related to DNA methylation, histone post-translational modifications, long ncRNAs, and micro-RNAs, and their combination with the terms “endometrium” and “menstrual cycle”. The information included in the present study refers to the data obtained from healthy subjects (non-pathological endometrium) unless otherwise indicated.

Transcriptional changes of coding genes in the endometrium during the endometrial cycle

Over the past 20 years, it has been demonstrated that thousands of coding genes change their expression levels in the endometrium throughout the endometrial cycle [2, 18–26]. Although it has been challenging to obtain reproducible results between different studies due to technical and sample limitations, knowledge about the transcriptional networks that mediate functional changes in the endometrium has considerably increased. For example, a recent study has provided fundamental information about the transcription profile of each cell type that composes the endometrium by single-cell transcriptomic analysis throughout the endometrial cycle [2]. This section summarizes the main findings of selected studies that have reported changes in the expression of coding genes related to endometrial function in different phases of the endometrial cycle. For a comprehensive review of transcriptional changes during the endometrial cycle refer to the reviews of [25, 27]. Note that changes in the expression profile of a particular phase are referred to the other phases unless otherwise indicated.

Expression of essential genes for endometrial function

Cellular processes carried out during the proliferative phase are mediated in part by the functional products of *IGF-1* and *ESR1* genes, whose expression reaches the highest levels during the late proliferative phase of the endometrial cycle [28, 29]. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) is secreted by stromal cells and binds to its receptor (IGF1R) in the epithelium to activate the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT pathway and promote proliferation [30–32]. In the breast cancer MCF7 cell line, estrogen receptor alpha (ER α) has been shown to induce proliferation through the ERK/MAPK pathway [33]. Moreover, estrogens induce the expression of progesterone receptor (PGR) through ER α , which binds to the regulatory regions of the progesterone receptor gene (*PGR*) to induce its expression in a mouse embryonic hypothalamic cell line [34]. Cellular proliferation and induction of *PGR* expression are also key processes in the endometrium regulated by ER α [29].

During the secretory phase, endometrial epithelial cells enter a hypersecretory state to provide the necessary nutrition for embryo survival [35]. The major changes in gene expression observed during the secretory phase occur around implantation. The implantation is a complex progesterone-dependent event that involves several biological processes that occur in a coordinated fashion in the endometrium, such as cell adhesion, cell growth, differentiation, and signal transduction [23, 35]. In a recent study, progesterone has been shown to regulate

pathways related to the inflammatory response, xenobiotic metabolism, cell death, epithelial-mesenchymal transition and estrogen response during the window of implantation [36]. The implantation-associated gene clusters include several genes encoding growth factors, such as *TGF α* and *PLGF*. Transforming growth factor alfa (TGF α) mediates various cellular processes, including proliferation, migration, adhesion, and differentiation. Placental growth factor (PLGF) is necessary for the adhesive capacity of the endometrium epithelium and blastocyst growth [23, 37–39]. Lai et al. have revealed that endomucin, an L-selectin ligand, is downregulated in the early secretory endometrium, which may influence endometrial receptivity [40, 41].

In the menstrual phase, the expression of genes encoding inflammatory cytokines, enzymes involved in eicosanoid biosynthesis, and immunomodulators (and their receptors) is increased compared to the proliferative and secretory phases. Genes encoding angiogenic modulators, hypoxia-induced proteins (such haem oxygenase-1, adrenomedullin, vascular endothelial growth factor (VEGF), cysteine-rich angiogenic inducer 61 (CYR61), and hypoxia-induced protein-1, and matrix metalloproteases are also highly expressed in the menstrual phase [25, 29, 42, 43].

Endometrial functions revealed by transcriptome analysis

Microarray analysis has shown that some genes, including *TGF β 2*, *MT2A*, *F2RL2*, *PLIN2*, and *CCL18*, are upregulated during the early proliferative phase. These genes are required for the regeneration of the *functionalis* layer of the endometrium after menstruation [44]. During the mid-proliferative phase, genes involved in cell renewal processes such as cell proliferation, cell survival, and regulation of differentiation (such as *IHH*, *SERP4*, *PGR*, *SNRD14E*, and *GSTM1*) are upregulated [44]. During the late proliferative phase, the upregulation of *AGTR2*, *HMGIC*, *C9orf131*, *SNORA23*, and *CRIM1* genes is associated with cell growth inhibition, extracellular matrix remodeling, and cellular differentiation [45]. Interestingly, Petracco et al. identified low expression levels of genes that are related to natural killer (NK) cells function, such as *KIR2DL3* and *KLRC3*, at the late proliferative phase, suggesting a decreased immune response mediated by NK cells at this phase of the endometrial cycle, which is consistent with the modulation of the immune response to favor embryo implantation [44, 46]. Besides, genes involved in tissue remodeling, such as *MMP26* and *TFF3*, cell differentiation, such as *HOXA10* and *HOXA11*, vasculogenesis, such as *GJB6*, *HOXB7*, and *sFRP*, and angiogenesis, such as *CXCR4*, *CDH5*, *ENG*, and *PECAM1*, are upregulated during the proliferative phase [22, 47, 48].

The expression profiles of coding genes have also been studied by next-generation sequencing in the proliferative endometrium [25]. We have performed a functional enrichment analysis of the data from Sigurgeirsson, et al. by the g:Profiler software [49] and the top ontology terms of the overexpressed genes during the proliferative phase (top differentially expressed genes with a fold change > -2.00 from the original data) are related to extracellular matrix and cell cycle processes. This information is consistent with the above-mentioned studies and the single-cell transcriptomic study in which cell cycling was elevated in unciliated epithelia and stromal fibroblasts [2]. Furthermore, by using single-cell transcriptomic analysis, it has been confirmed that the proliferative phase is divided into two transitional phases and that luminal epithelia and glandular epithelia differ by the enrichment of overexpressed genes during this stage, the former by expressing genes related to the development of anatomic structures and the latter expressing genes related to cell cycle [2].

On the other hand, the coding gene expression profiles of endometrial tissue during the secretory phase have also been studied by next-generation sequencing [19, 25]. By using this approach, genes encoding for solute carrier proteins and genes related to endometrial receptivity, metabolism, negative regulation of cell cycle, among others, were identified as highly expressed genes during the secretory phase. Regarding to the specific changes in the transcriptional profiles of each cell type that conforms the endometrium, it has been demonstrated that there is an abrupt change in the transcriptomic profile in the unciliated epithelia at the window of implantation (overexpressing genes like *PAEP*, *GPX3*, and *CXCL14*). In contrast, stromal cells display a more continuous phase transition (overexpressing genes like *DKK1* and *CRYAB*). Wang, et al. point out that the decidualization process in stromal cells is transcriptionally different when comparing the processes that occur after implantation and without implantation [2].

A comparison between the transcriptional profiles of epithelial and stromal areas microdissected from the human endometrium during the secretory phase has been made by microarray analysis [50, 51]. This analysis demonstrated that 28 genes displayed a differential expression profile between the stromal and epithelial compartments. *WFDC2*, *MMP7*, *MSX2*, *HOXB5*, *HOXB7*, and *PRKCC* [51] genes were highly expressed in the epithelial area; these genes are involved in sperm maturation, immune system regulation, cell–cell adhesion, among other functions that are necessary for the secretory endometrium [51–53]. On the other hand, *DCN*, *DDR2*, *TIMPI*, *RPS3A*, and *TIE1* [51] genes were strongly expressed in the stromal areas; these genes

are involved in mediating cellular responses to the extracellular matrix and regulation of the immune system [51, 54–56].

Accurate determination of the endometrial phase is a crucial factor in the study of gene expression changes in the endometrium. Over time, researchers have developed different methodologies to identify the endometrial cycle phase, including self-reported endometrial cycle [57], determination of serum hormone levels [58], and histological evaluation of endometrial biopsy [3]. However, the inaccurate determination of the specific endometrial phase and other factors (such as genetic heterogeneity and environmental factors) has caused a great variability in the results obtained between different studies. Recent advances in molecular biology have allowed the use of high-throughput microarray technology to classify endometrial samples according to the global transcriptional profile, which is consistent with the histological evaluation [23, 59].

Sample size is another crucial factor that impacts the variability of the results obtained from transcriptional studies. Overall, most published studies have included small sample sizes mainly due to the invasive endometrial biopsy procedure [23, 59]. Larger sample size numbers (along with painless sampling methods) are needed to avoid bias in the results due to individual variability.

Microarray technology has been used for many years to determine the transcriptome at a specific condition. Although this technology allows the analysis of thousands of genes by using specific probes, it is limited in the detection of new transcripts [59]. The use of next-generation sequencing technologies has overcome this limitation as RNA sequencing can detect novel transcripts and provides other relevant information, such as genomic rearrangements and mutations, with higher specificity and sensitivity [23]. However, both microarray and RNA sequencing technologies assume that every cell present in a particular tissue or condition is homogeneous, regardless of the molecular changes of individual cells. To overcome this limitation, transcriptome analysis by single-cell technology coupled with RNA sequencing enables the detection of RNA molecules in individual cells with the advantages of next-generation sequencing [2].

Further studies using single-cell technologies are necessary to compare the transcriptomic data of the different cell types that integrate normal and pathological endometrium, since only data from whole tissue has been analyzed so far [60, 61]. Taking into account the data obtained from differential expression studies, gene silencing in a particular type of endometrial cells (stromal or epithelial) using CRISPR-Cas9 technology could help to elucidate the relevance of specific genes in the pathogenesis of endometrial diseases, such as endometriosis (the

presence of endometrium in an abnormal or ectopic location) and endometrial cancer. CRISPR-Cas9 could also be helpful in clarifying the importance of specific proteins necessary for embryo implantation that are down-regulated in the endometrium of women with recurrent miscarriages [62, 63]. This approach will provide new information about the pathological mechanisms of these diseases and new potential therapeutic targets.

DNA methylation

DNA methylation is the chemical modification of DNA, where a methyl group is transferred to the fifth carbon of the cytosine to generate 5-methylcytosine (5-mC). DNA methylation is catalyzed by a family of DNA methyltransferases (DNMT) [64]. DNMT3a and DNMT3b catalyze de novo DNA methylation, while DNMT1 binds to hemimethylated DNA to maintain the DNA methylation pattern after replication [64, 65]. DNA demethylation is achieved by active enzymatic demethylation or by passive replication-dependent dilution of methylation [65, 66]. In the active enzymatic demethylation, 5-methylcytosine (5mC) undergoes a series of oxidation reactions catalyzed by the methylcytosine dioxygenases Ten Eleven Translocation (TET) enzymes. The oxidative products are excised by thymidine DNA glycosylase and replaced by unmodified cytosines through the base excision repair mechanism [66]. The 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) is the best-studied and first intermediate of active DNA demethylation [67].

High levels of DNA methylation in the promoter region of genes are frequently associated with transcriptional silencing [68]. DNA methylation in these regions could directly hinder transcription factor binding [69] or recruit reader proteins that contain a specialized domain that identifies and interprets DNA methylation, known as methyl-binding proteins (MBPs) [70]. MBPs then recruit different members of the chromatin remodeling complex to cause transcriptional repression [69, 70].

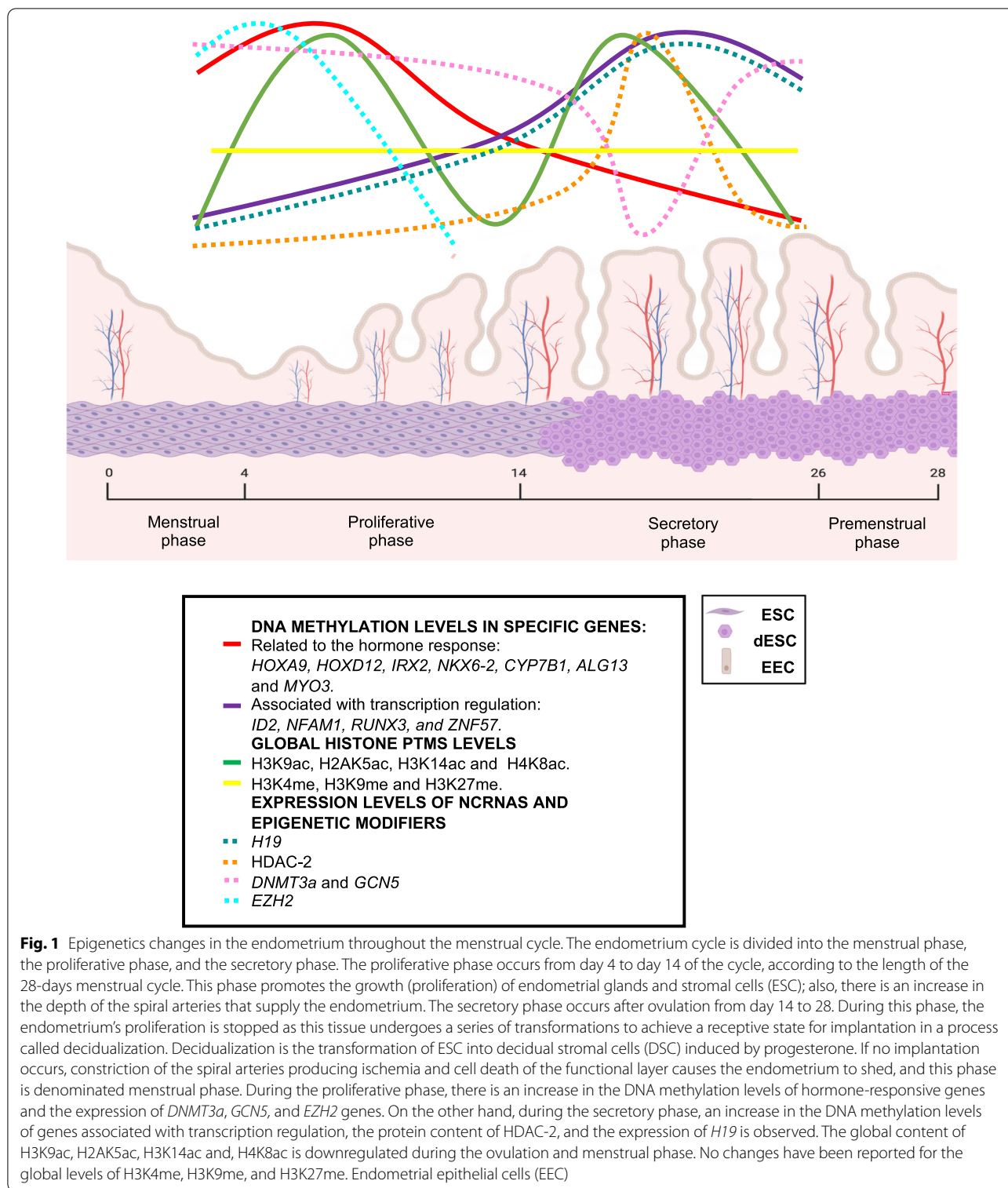
The effect of this epigenetic mark depends on the genomic context and the specific cytosines that are modified. For example, most CpG sites are not methylated when located at promoters of expressed genes, whereas CpG sites located in gene bodies are frequently methylated in a tissue-specific manner [14, 68]. DNA methylation in enhancer regions is associated with tissue-specific gene expression regulation [71, 72]. Interestingly, cell type-specific super-enhancers are hypomethylated to induce the expression of genes associated with cell identity [73, 74]. Abnormal enhancer methylation is associated with alterations in gene expression in multiple diseases, including many types of cancer [75]. Besides being an intermediate in active

DNA demethylation, enrichment of 5hmC in promoter regions is often associated with activation of gene expression [68].

DNA methylation and the cyclical endometrium

One of the epigenetic mechanisms that control the endometrium's cyclical changes is DNA methylation [68, 76, 77]. DNA methylation profile has been correlated with its biological age, and changes in this profile have been associated with abnormal function of the endometrium [78]. The variation in DNA methylation content across the menstrual cycle is tissue-specific as the methylation state of endometrial tissue changes according to the endometrial phase; in contrast, this is not observed in blood samples [79]. This suggests that DNA methylation regulates gene expression in a tissue-specific manner during the endometrial cycle.

The content of DNA methylation in the human endometrium varies across the endometrial cycle [76, 80, 81]. Differential methylation states between the proliferative and secretory phases are found in genes associated with transcriptional regulation, cell proliferation, and regulation of RNA metabolic processes, regardless of whether they contain CpG islands (CGI) [76]. For example, genes that do not have CGI, like *ADORA1*, *C21orf128*, and *TRPV3*, are more methylated in the proliferative phase than in the secretory phase [76]. Genes related to the hormone response like *HOXA9*, *HOXD12*, *IRX2*, *NKX6-2*, *CYP7B1*, *ALG13*, *MYO3A*, and *FZD2* are less methylated in the secretory phase than in the proliferative phase; meanwhile, genes associated with transcription regulation, e.g., *ID2*, *NFAM1*, *RUNX3*, and *ZNF57* are more methylated in the secretory phase [82] (Fig. 1). In addition, genes associated with embryo implantation like *MAPK14*, *ZMIZ1*, and *PLXNA4* are less methylated during the receptive phase than the pre-receptive phase of the endometrial cycle [83]. Interestingly, the DNA methylation status of several differentially methylated genes correlated with their expression levels as reported in other tissues [76, 84, 85]. This suggests that the dynamics of DNA methylation in the endometrium are regulated in part by the hormone milieu, which can influence the function of this tissue by modulating its transcriptome. Recent studies have identified several endometrial phase-dependent changes in the DNA methylation content of genes regulated by estrogens or progesterone throughout the endometrial cycle [79, 86]. Moreover, estradiol, progesterone, or the combination of both modifies the DNA methylome of primary cultures of stromal cells in a hormone-specific manner, with estradiol inducing the most extensive changes [86].



DNA methylation machinery in the cyclical endometrium

The expression of DNMTs in the human endometrium is differentially regulated across the endometrial cycle and by in vitro hormonal treatments. *DNMT3a* expression

is downregulated during the secretory phase and under estrogens and progesterone treatments in endometrial explant cultures (Fig. 1), whereas *DNMT1* and *DNMT3b* expression is downregulated only by one of

the hormones, progesterone and estrogens, respectively [87] (Fig. 2). Besides estradiol and progesterone, cAMP induces the decidualization process. In an immortalized endometrial stromal cell line, the expression of DNMT3b is downregulated by the action of estradiol, medroxyprogesterone (MPA), and cAMP, whereas DNMT1 and DNMT3a are transiently downregulated [88] (Fig. 2). It has been recently reported that estradiol induces the expression of DNMT1 and DNMT3b in cell cultures of immortalized stromal and epithelial endometrial cells, respectively, while estradiol and progesterone decrease the expression of DNMT1 in the stromal cells [89].

The relationship between steroid hormones and DNA methylation in the endometrium remains unclear, whether the hormone stimuli is sufficient to activate DNMTs and induce specific methylation patterns in the genome that, in consequence, would lead to a particular gene expression profile, or DNA methylation is the mechanism that controls the action of these hormones. In other models such as the brain [90], breast cancer [91], and CD4+ cells [92], steroid hormones have been shown to regulate DNMTs activity, DNA methylation, and gene expression [92]. Regarding the female reproductive system of other mammals, estrogens and progesterone

inhibit *dnmt3a* and *dnmt3b* expression in Siberian hamsters' uterus [93]. The relation between sex hormones and DNMTs can be speculated; nevertheless, further investigation is warranted to elucidate the crosstalk among steroid hormones, progesterone and estradiol, and DNA methylation in the cyclical human endometrium.

Another important component of the DNA methylation machinery are the MBD protein family (readers) and TET enzymes (erasers). The MBD protein family includes several members, namely MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, and MBD4 [94]. The expression of *MBD2* is higher in the secretory phase compared to the proliferative and menstrual phases and under estradiol and progesterone treatments in endometrial explant cultures, whereas MBD1 and MeCP2 expression is not modified throughout the endometrial cycle nor by hormonal treatments [95]. On the other hand, the expression of *TET1* and *TET3* is higher in the mid-secretory phase than in the other phases of the endometrial cycle. In vitro treatments with progesterone induce *TET1*, *TET2*, and *TET3* expression in endometrial epithelial cells and estradiol plus progesterone treatments increase the expression of *TET3* in the same cell type, while estradiol induces the expression of *TET1* in stromal cells. Interestingly, all three TET

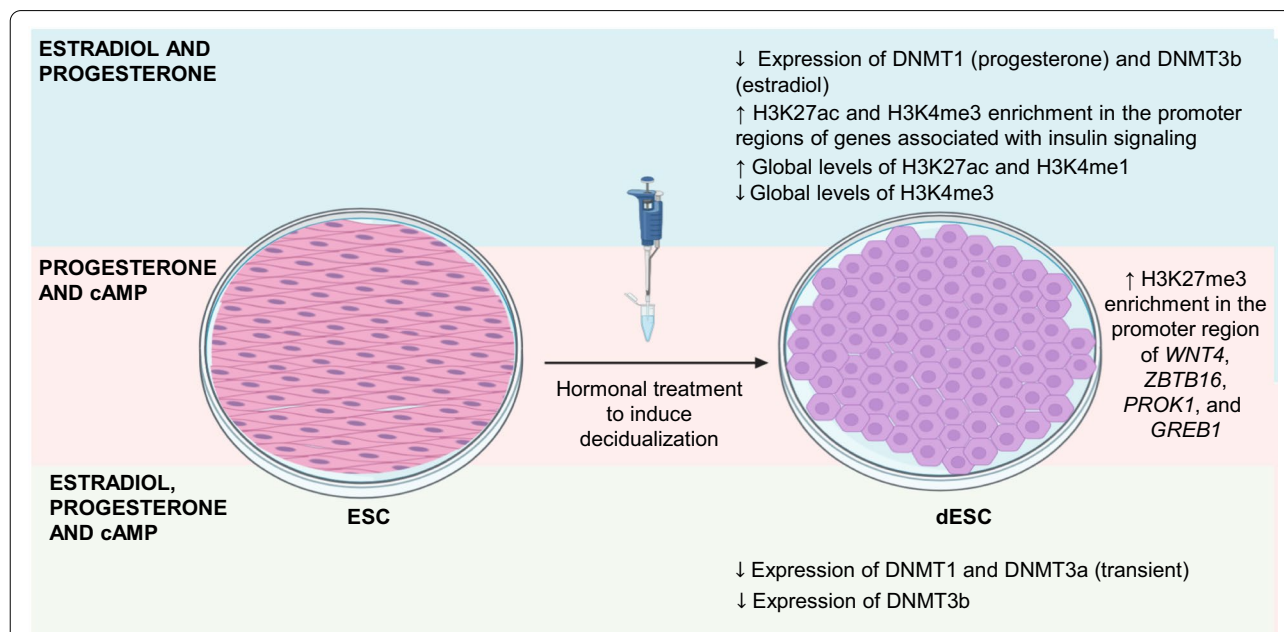


Fig. 2 In vitro decidualization and the regulation of epigenetic processes. On the left side of the figure are shown the different methodologies used to induce in vitro decidualization. On the right side of the figure are shown the effects of in vitro decidualization on the content of epigenetic processes and components. Estradiol and progesterone downregulate the expression of DNMT1 (mainly by progesterone) and DNMT3b (mainly by estradiol), increase the enrichment H3K27ac and H3K4me3 in the promoter regions of genes associated with insulin signaling, increase the global content of H3K27ac and H3K4me1, and decrease the global content of H3K4me3. Progesterone and cAMP increase the enrichment of H3K27me3 in the promoter region of *WNT4*, *ZBTB16*, *PROK1*, and *GREB1* genes. Estradiol, progesterone, and cAMP downregulate the expression of DNMT3b and transiently decrease the expression of DNMT1 and DNMT3a

proteins were detected in both epithelium and stroma throughout the endometrial cycle [89]. These studies suggest that sex hormones regulate the expression of *MBD2* and *TET* genes in a dynamic and cell-specific manner in the human endometrium. The role of the DNA methylation readers and erasers in the endometrium has not been elucidated, and further studies are required to establish their participation in the regulation of gene expression throughout the endometrial cycle.

DNA methylation in the window of implantation

In the secretory phase, the endometrium undergoes multiple changes that makes it more receptive to the blastocyst in case of implantation [10]. Several changes in DNA methylation content are observed during the implantation window as precise regulation of gene expression is required for the implantation and establishment of the blastocyst. It has been proposed that any alteration in the DNA methylation profile of the receptive endometrium would lead to aberrations in gene expression, which in turn would impede the decidualization process and embryo implantation [96, 97]. In fact, alterations in the DNA methylation content have been associated with defective receptivity. Particularly, 448 differentially methylated CpGs have been found between women who have recurrent pregnancy failure and healthy women, which was associated with a possibly altered immune response and G protein activity due to their involvement in endometrial receptivity [98].

HOXA genes are essential for embryo implantation. Increased DNA methylation levels have been found in the promoter region of *HOXA10* and *HOXA11* genes in the endometrium of women with repeated implantation failure compared to control women [99]. Interestingly, hypermethylation of *HOXA* genes is reversed by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA) in Ishikawa endometrial cancer cells, which in turn increased the expression of *HOXA10* and its target genes, *ITGB3* and *IGFBP1*, which play an important role in endometrial receptivity [100].

High progesterone levels at the time of ovulation have been proposed to modulate the methylation status of genes necessary for implantation [1]. Particularly, high progesterone levels induced by human chorionic gonadotropin (hCG) administration increase the global content of DNA methylation and DNMT3B expression in endometrial epithelial cells [101, 102]. This increase in DNA methylation was associated with hypermethylation of the promoter regions of *CDH1* and *CNTN1* genes and the consequent decrease in gene expression [102]. These genes encode the adhesion molecules required in the implantation process, suggesting a possible explanation of IVF treatment's failure, at least in part, by DNA

methylation. Superovulation induced by gonadotropins administration is another condition that creates an altered hormonal milieu, in which changes in DNA methylation has been associated with an increase in the expression of genes related to endometrial remodeling such as *PLAT*, *MMP2*, and *TIMP1* and the downregulation of *HSPE2* that could alter trophoblast migration and impair endovascular invasion [103]. These studies set a precedent about the effects of exogenous hormone administration on the content of DNA methylation in the endometrium, especially at the time of ovulation, in women who undergo an IVF procedure as these molecules could modify certain epigenetic marks needed for implantation in different endometrial cell types. Moreover, it is imperative to consider the impact of exogenous hormone treatments in the studies assessing the role of epigenetic modifications in endometrial function as these treatments may induce several molecular and cellular effects, including the regulation of DNA methylation.

The studies described above indicate that DNA methylation is influenced by the hormone milieu at the window of implantation, especially by progesterone, and alterations in the hormone levels could lead to a different DNA methylation pattern that could disturb the implantation process. These findings highlight the importance of studying differentially methylated genes and the specific methylation site in all the cell types present in the endometrium and different hormonal contexts, probably by single-cell DNA methylation profiling.

Most studies have focused on identifying changes DNA methylation levels in the promoter region of genes; however, as mentioned previously, DNA methylation in enhancer regions has an important role in regulating gene expression associated with cell identity [71, 72]. Therefore, future research is required to focus on studying DNA methylation in these regulatory regions as well.

The lack of evidence of the direct effect of DNA methylation on gene expression is an important limitation of these studies as the methylation status of a particular CpG site could affect the expression and function of several other DNA elements in addition to the promoter of the closest gene [14]. The next step in this research field would be a gene-specific modification of the DNA methylation status with a CRISPR/Cas9 related system to validate its effect on gene expression [104, 105]. Furthermore, modulation of DNA methylation at specific CpG sites or a single-base mutation within a CpG (associated with a methylation quantitative trait loci) could be performed using this technology to assess the effects on gene expression.

DNA methylation in endometrial pathologies

DNA methylation changes in the female reproductive system are linked to disease [84]. Particularly, DNA methylation is altered in specific genomic regions in endometrial pathologies, and differences in the content of this epigenetic modification are influenced by the particular phase of the endometrial cycle [82, 85]. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are changes in DNA sequence that occur in a single nucleotide and are present in at least 1% of the population. SNPs located within a CpG may impact DNA methylation, challenging the classical definition of epigenetics [106–109].

In a study conducted by Mortlock et al. [79], a methylation quantitative trait loci (mQTL) analysis was performed to identify the relationship between SNPs associated with pathologies of the endometrium (e.g., endometriosis) and DNA methylation. In this study, an association between specific SNPs and DNA methylation was found in blood samples and endometrium, suggesting mQTLs as potential biomarkers for endometrial pathologies. This study established a paradigm where although blood and endometrium have a different cellular composition, an association between SNPs and DNA methylation was found in both samples. This finding suggests that blood samples are a less invasive alternative to studying the DNA methylation changes in healthy and pathological endometrium. However, more studies are needed to confirm this association as differences in the content of DNA methylation between proliferative and secretory phases were found in the endometrium but not in blood. This study also highlights the difficulty to determine whether the differences in DNA methylation observed in blood and endometrial tissue are associated with the diverse cellular population of both samples, the local concentration of hormones, or both. These limitations should be addressed by single-cell technologies to obtain the DNA methylation profile of specific cell types in a particular phase of the endometrial cycle.

Differences in the methylation status of specific genes have been found between the early and late development stages of endometrial cancer, especially in genes encoding transcription factors [110]. TETs and MBD proteins, such as MECP2, have been implicated in endometrial cancer and endometriosis [95, 111–113]. More research is warranted to assess the relationship between DNA methylation, DNA methylation machinery, hormonal status, and endometrial diseases such as endometriosis and endometrial cancer, which would allow the discovery of more precise biomarkers and new potential therapeutic targets.

Histone post-translational modifications

The eukaryotic gene expression would be senseless without considering the landscape in which it occurs, the chromatin. The chromatin is formed by the nucleosome consisting of 146–147 bp of DNA wrapped around a histone octamer, which is made by two copies of each inner histone, namely H2A, H2B, H3, and H4 [114]. The amino acids in histone N-terminal tails interact with the DNA and are also a target of PTMs. These PTMs are acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination, SUMOylation, citrullination, and ribosylation, among others [115]. These modifications constitute the histone code. The histone code is a hypothesis that assumes that different PTMs act together in a coordinated manner to influence chromatin conformation [116]. Such modifications are reversible and catalyzed by enzymes that deposit them (writers) and remove them (erasers).

These modifications regulate gene expression through two mechanisms. The first mechanism is based on electrostatic interactions, since DNA is negatively charged and histone N-terminal tails are positively charged. For example, acetylation of a lysine residue will change the positive charge to a negative one. The negative charge will generate a more relaxed chromatin state; if this occurs in the promoter region, transcription factors and RNA polymerase II (Pol II) have more room to bind DNA and activate transcription [108]. Histone acetylation is catalyzed by histone acetyltransferases (HATs) and is removed by histone deacetylases (HDACs) [117–119]. The second mechanism by which PTMs regulate gene expression requires specific proteins, called readers, that interpret the modification. This type of PTM creates a binding site for transcription factors, chromatin remodeler complexes such as chromatin remodelers of the switch/sucrose-non-fermenting (SWI/SNF), imitation switch (ISWI), chromodomain-helicase-DNA binding (CHD), and inositol requiring 80 (INO80) families, and adaptor proteins that, in turn, regulate transcription [120, 121].

Chromatin immunoprecipitation assays followed by microarrays (ChIP-chip) and next-generation sequencing (ChIP-seq) have provided fundamental information about the role of a variety of histone modifications and their localization in the genome [121, 122]. Promoters of transcriptionally active genes are enriched with histone H3 lysine 4 trimethylation (H3K4me3) and histone H3 and H4 lysine acetylation, while in gene bodies, they tend to have higher levels of trimethylation of histone H3 lysine 36 (H3K36me3) and trimethylation of histone H3 lysine 79 (H3K79me3) [123]. After transcription initiation, histone H3 lysine 9 acetylation (H3K9ac) is necessary to induce the release of Pol II pausing by directly recruiting the super elongation complex (SEC)

to chromatin [124]. The enrichment of H3K9ac in the genome is highly correlated with that of histone H3 lysine 14 acetylation (H3K14ac), and the enrichment levels of both are also correlated with other histone marks (such as H3K4me3), suggesting a coordinated enrichment of active histone marks. Acetylation of histone H4 at lysine 8 (H4K8ac) is among the most dynamic histone PTMs preferentially occupying the 5' intergenic regions (5'IGRs) and 5' termini of the open reading frames (ORFs) of several genes [125]. Enrichment of histone H3 lysine 16 acetylation (H3K16ac) and Pol II occupancy are observed in actively expressed regions in the genome [126].

On the other hand, histone H3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and histone H3 lysine 9 trimethylation (H3K9me3) are known for their relationship with transcriptionally repressed chromatin in metazoan genomes. Several protein complexes catalyze these modifications, including the Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2), which is the catalytic subunit of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) and several H3K9 methyltransferases [127].

Histone post-translational modifications and the cyclical endometrium

Another of the epigenetic mechanisms that control the transcriptional changes throughout the endometrial cycle is the histone PTMs (Fig. 1). Global acetylation of H3 and H4K8 is modulated by ovarian steroid hormones, estradiol and progesterone, in ESC [128]. Ligand-activated hormone receptors, such as PR and ER α , act by binding to the proximal promoters and distal regulatory elements of target genes to recruit components of the basal transcription machinery and cofactors, such as HATs and HMTs, that induce the histone PTMs and alter the chromatin structure [17, 129, 130].

The global levels of histone acetylation in the endometrium vary during the endometrial cycle. Particularly, global levels of H3K9ac, H2A lysine 5 acetylation (H2AK5ac), H3K14ac, and H4K8ac are increased in the early proliferative phase, subsequently declining in the late proliferative phase [12]. This increase in the global acetylation of histones could be associated with the activation of many genes and pathways necessary for the regeneration of the endometrium's functional layer, such as endometrial epithelial growth, angiogenesis, and proliferation pathways [131–133]. However, more studies are required to prove this statement. An increase in the global acetylation levels is also observed after ovulation, which could be involved in the progesterone-dependent transcriptional activation of secretory associated pathways required to differentiate endometrial glands and stroma [12]. The

tight regulation of gene expression during the secretory phase is critical to induce a specific network for ESC decidualization, which is a prerequisite for successful implantation [134]. During the late secretory phase, the global levels of these histone PTMs decline, suggesting that the decrease in hormone levels (estradiol and progesterone) resulting from the regression of the corpus luteum could be involved in the loss of global acetylation [12]. In contrast to these findings, Monteiro et al. did not observe significant differences among the H3K9ac and H3K16ac throughout the endometrial cycle, probably because Munro et al. evaluated the levels of PTMs in the subphases of the cycle, while Monteiro et al. only study the changes in PTMs at proliferative versus secretory endometrium [12, 135] (Fig. 1).

Class I HDACs and HATs are differentially expressed in the human endometrium during the endometrial cycle, which may explain the differences in the content of acetylated histones [136]. Particularly, the content of HDAC-2 protein increases in the secretory phase in parallel with reduced levels of GCN5, which is a HAT (Fig. 1). These findings suggest a shift in the balance between histone deacetylation and acetylation towards deacetylation, which may explain the changes in the global level of this PTM during the late secretory phase [136]. Interestingly, Uchida et al. reported that histone deacetylase inhibitors (HDACI) could induce changes in morphology, gene expression, differentiation, and function in endometrial epithelial and stromal cells [137]. Further studies are warranted to establish the role of several HATs and HDACs in each subphase of the endometrial cycle and their associated transcriptional programs.

On the other hand, it has been reported that global levels of histone methylation of H3K4, H3K9, and H3K27 do not change across the endometrial cycle [135] (Fig. 1), perhaps because these study only looked at proliferative versus secretory endometrium and did not consider the same subphases of the cycle as analyzed by Munro et al. [12, 135]. However, specific changes in the content of these histone PTMs have been found in particular genes. For example, it has been reported that the enrichment of H3K27me3 on the *HOXA10* promoter is higher in the proliferative phase in comparison with the secretory phase [138] (Fig. 3a). *HOXA10* is a homeodomain transcription factor essential for normal uterine embryogenesis and endometrial cycle regulation. The enrichment of H3K27me3 in *HOXA10* promoter is consistent with previous studies showing that *HOXA10* is dynamically expressed in the endometrium, which is downregulated during the proliferative phase and highly expressed in the secretory phase [138, 139] (Fig. 3b).

(See figure on next page.)

Fig. 3 Epigenetics changes during the proliferative and secretory phases in endometrial cells. a. During the proliferative phase, the enrichment of H3K27me3 on the *HOXA10*, *PRL*, and *IGFBP-1* promoters in endometrial stromal cells (ESC) is reported, which is consistent with the lack of expression of these genes. Also, an increase in the expression of *EZH2*, which catalyzes the H3K27me3 modification, is observed. b. A decrease in the enrichment of H3K27me3 in the *HOXA10*, *PRL*, and *IGFBP-1* promoters in decidual stromal cells (DSC) during the secretory phase is reported; consequently, an increase in the expression of these genes is observed. Furthermore, a decrease in the expression of *EZH2* during decidualization is observed in DSC. During the secretory phase, some miRNAs, lncRNAs, and the proteins involved in their biogenesis increase their expression compared to the proliferative phase, such as miRNA-222, miR-543, and DICER in DSC, and miR-29c, DROSHA, *H19*, and *PTENP1* in endometrial epithelial cells (EEC)

Impact of in vitro decidualization in the enrichment of histone post-translational modifications

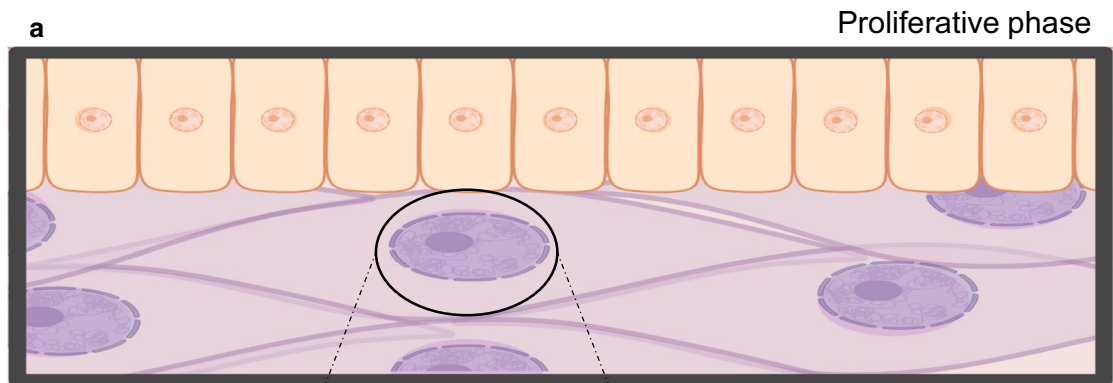
The expression of *EZH2*, which catalyzes H3K27 trimethylation, is decreased during in vitro decidualization and the transition of proliferative to secretory phase. The downregulation of *EZH2* activity in the endometrium during decidualization is correlated with the loss of H3K27me3 enrichment in *PRL* and *IGFBP-1* genes (key decidual marker genes induced by progesterone), suggesting that H3K27me3 is an integral part of the chromatin remodeling process that enables the transition from a proliferative to a decidual phenotype in response to different signals such as progesterone and cAMP [140] (Fig. 3). Furthermore, the subsets of up- and downregulated genes upon decidualization are associated with reciprocal changes in the enrichment of histone H3 lysine 27 acetylation (H3K27ac) and H3K27me3 modifications, respectively, at their promoter region. Essential genes for the decidualization of ESC such as *WNT4*, *ZBTB16*, *PROK1*, and *GREB1* contain high levels of H3K27ac in their promoter after the treatment with 8-Bromo-cAMP and progesterone, confirming the dynamic properties of chromatin in response to decidualization [16, 140] (Fig. 2). Interestingly, cAMP alone cannot induce an increase in the enrichment of H3K27ac in the regulatory regions of *PRL* and *IGFBP-1* genes in ESC, suggesting that these epigenetic changes are stimulus and gene-specific [141].

Tamura et al. found several genomic regions enriched with H3K27ac after ESC decidualization. Interestingly, 80% of these regions were located in distal gene regions, which may function as enhancer elements to induce the expression of decidualization associated genes. Pathway analysis revealed that upregulated genes enriched with H3K27ac or H3K4me3 modifications were associated with the insulin signaling pathway, which may be involved in glucose uptake necessary for decidualization [142] (Fig. 2). It has been demonstrated that decidualization induces the enrichment of H3K27ac in the distal upstream region (-4701 to -7501 bp) of the *IGFBP-1* promoter [143]. Furthermore, the transcriptional regulators CCAAT enhancer-binding protein β (C/EBP β), FOXO1,

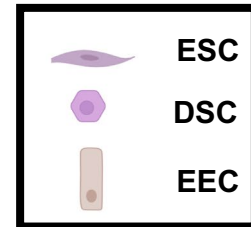
and p300 binds to this potential enhancer to induce *IGFBP-1* expression [143].

Recently, the transcriptional and chromatin landscapes of cultured ESC collected from human placental membranes, and the corresponding DSC (induced by MPA and cAMP treatments) have been characterized. A total of 1,135 differentially expressed genes were identified after decidualization, of which upregulated genes were associated with insulin-related terms and glucose metabolism, while downregulated genes were associated with cell cycle [142, 144, 145]. Interestingly, the enrichment of H3K27ac and H3K4 monomethylation (H3K4me1) was higher in DSC than ESC in several genomic regions, and the opposite pattern was observed for H3K4me3, which was more enriched in ESC than DSC (Fig. 2). These findings indicate that the epigenetic changes underlying gene expression alterations during decidualization predominantly occur in potential enhancers [145]. Additionally, the evaluation of the accessible chromatin regions by ATAC-seq revealed tens of thousands of differentially accessible regions between ESC and DSC. Genomic regulatory regions with more accessible chromatin overlap with the enrichment of H3K27ac and H3K4me1 enhancer marks in upregulated genes. Conversely, the potential enhancer regions of downregulated genes became less accessible after decidualization [145].

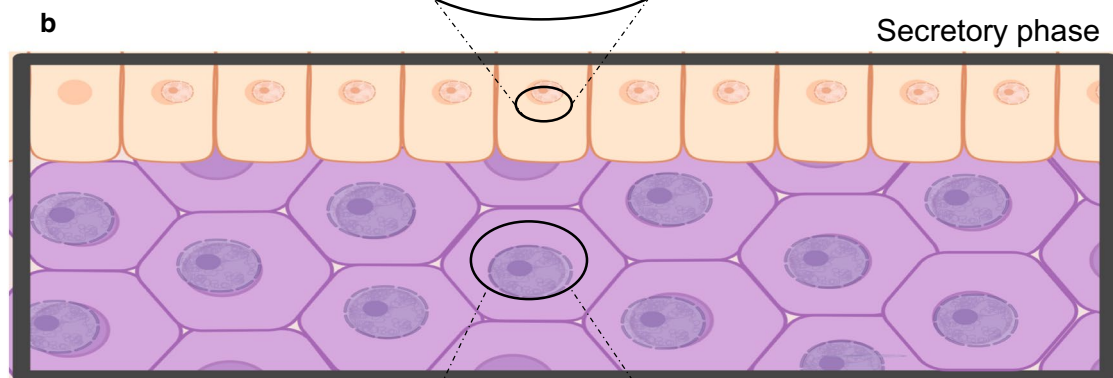
Taken together, all these findings indicate that histone PTMs are important players in gene expression regulation in the endometrium during the endometrial cycle. However, the specific role of ovarian steroid hormones on the regulation of histone modifiers activity throughout the endometrial cycle remains to be elucidated. More studies using next-generation sequencing are necessary to establish the distribution of several histone PTMs in the endometrium during the different subphases of the endometrial cycle and in specific endometrial cell types by single-cell approaches [146]. Applying these technologies in in vitro models of decidualization will help to identify the role of chromatin structure generated in response to steroid hormones. In addition, global and locus-specific changes in the content of particular histone PTMs have been reported in endometriosis and endometrial cancer [135, 138, 140, 147–151]. However,



Promoter enrichment	Gene expression
↑ H3K27me3	↓ <i>HOXA10</i>
↑ H3K27me3	↓ <i>PRL</i>
↑ H3K27me3	↓ <i>IGFBP-1</i>
	↑ <i>EZH2</i>



↑ *H19* and *PTENP1*
 ↑ miR-29c and *DROSHA*



Promoter enrichment	Gene expression
↓ H3K27me3	↑ <i>HOXA10</i>
↓ H3K27me3	↑ <i>PRL</i>
↓ H3K27me3	↑ <i>IGFBP-1</i>
	↓ <i>EZH2</i>
↑ miRNA-222, miR-543 and <i>DICER</i>	

more studies are required to establish the biological function of each histone PTM in these diseases, which will help in the discovery of new potential therapeutic targets as in other types of cancer or diseases.

Non-coding RNAs

Non-coding RNAs (ncRNAs) are defined as functional RNA molecules without protein-coding ability and are divided into small RNAs (containing less than 200 nucleotides) that include small interfering RNAs (siRNAs), microRNAs (miRNAs), and PIWI-interacting RNAs (piRNAs), and long ncRNAs (lncRNAs) that contain more than 200 nucleotides [152]. NcRNAs interact with nuclear proteins such as histone-remodeling complexes or DNMTs to regulate gene expression. In addition, lncRNAs and miRNAs regulate gene expression by directly interacting with other RNA molecules such as mRNAs [153]. In this section, we are focus on lncRNAs and miRNAs. LncRNAs can function as a) decoys that titrate away DNA and RNA-binding proteins; b) scaffolds to bring proteins into complex or spatial proximity; c) a guide to recruiting proteins to the DNA; and d) an enhancer (eRNA), to create loops that bring DNA regions together through a scaffolding complex [154, 155]. On the other hand, miRNAs are small molecules of 18–22 nucleotides that post-transcriptionally regulate gene expression by the binding to the 3'-end of the target mRNA, and more rarely to the 5'-end, via the RNA-induced silencing complex, leading to the inhibition of mRNA translation by different mechanisms [156].

Recent studies have shown that enhancers function as transcriptional units and are transcribed to produce eRNAs, which are also involved in the regulation of gene transcription [157, 158]. Despite the growing evidence supporting eRNAs as functional biomolecules [159–161], the mechanism by which eRNAs promote gene transcription remains unknown. However, eRNAs can bind to transcription factors, influence RNA Pol II elongation, and mediate enhancer-promoter interactions [162].

Circular RNAs (circRNA) are endogenous ncRNAs that range in size from 100 nucleotides to more than 4 kilobases. These molecules are produced by back-splicing, wherein a downstream 5' splice site (splice donor) is joined to an upstream 3' splice site (splice acceptor) [163]. CircRNAs act as protein sponges, interact with RNA-binding proteins (RBPs), enhance protein function, and recruit proteins to specific locations [164–168].

Non-coding RNAs and the cyclical endometrium

It has been recently demonstrated that RNA molecules have an interplay with each other creating the competitive endogenous RNA (ceRNA) network, in which several RNA molecules regulate gene expression and several

biological functions; this intricate interplay typically involves lncRNA-miRNA and mRNA molecules [169, 170]. In the endometrium, ceRNA networks have been shown to regulate the implantation process, the dynamics between trophoblast and endometrium during pregnancy, and have also been used as biomarkers for disease prognosis in endometrial cancer and to identify which pathways are regulated by lncRNA-miRNA competition [171–176]. During the implantation window, the regulation of mRNA levels by lncRNA-miRNA molecules in the endometrium is critical. This is the case for *H19*/let-7a-5p/*ITGB3* where *H19* acts as a sponge for let-7a-5b to prevent the degradation of *ITGB3* transcript that is translated into a protein necessary for implantation [174, 177]. This association between lncRNAs with other RNAs to create ceRNA networks could be involved in many functions needed to prepare the endometrium for embryo implantation, such as immune system activity, angiogenesis, apoptosis, and steroid biosynthesis [178].

lncRNAs

The transformation of the endometrium throughout the endometrial cycle is mainly driven by the steroid hormones, progesterone and estradiol, which can influence the expression profile of ncRNAs [179]. However, the expression of ncRNAs in the normal cyclical endometrium has not been studied in-depth as most studies focus on endometrial pathologies and implantation failure, which are discussed below.

One of the most studied lncRNAs is the product of the *H19* imprinted gene, whose expression in normal endometrium fluctuates during the endometrial cycle and has only been detected in the endometrial stroma. *H19* reaches its highest expression during the late secretory phase when progesterone is the dominant hormone, suggesting that this gene could be regulated by sex hormones [180, 181] (Fig. 1). *H19* is reciprocally imprinted with respect to *IGF2*, regulating *IGF2* imprinting and expression [182]. Interestingly, *IGF2* is upregulated during the decidualization process [183]; however, the relation between *H19* and *IGF2* during decidualization remains to be explored. *H19* is also expressed in endometrial cancer tissues [184]. The knockdown of this lncRNA in endometrial cancer is associated with reduced migration, invasiveness, and tumor growth [184, 185]. In the endometrium of women with endometriosis, decreased *H19* expression is associated with decreased endometrial stromal cell proliferation as this lncRNA reduces the availability of miRNA let-7, which inhibits *IGF1R* expression that is necessary for cell proliferation and proper endometrial function [174]. In addition, the expression of *H19* is downregulated in the secretory endometrium of patients with repetitive implantation failure

(RIF) compared to the control group. This differential expression could lead to the downregulation of integrin β -3 necessary for trophoblast adhesion [174, 177, 186]. Furthermore, the differential expression of lncRNAs in patients with RIF has been associated with a dysregulation of pathways necessary for a proper implantation process, such as cell adhesion, tumor necrosis factor signaling, Toll-like receptor signaling, and NK- κ B signaling [187, 188]. These studies also suggest that progesterone, the main regulator of the decidualization process, could be regulating the expression of *H19* and *IGF2* to accomplish implantation [180–182].

The expression of many lncRNAs is upregulated during decidualization, such as *NEAT1*, *RP11-627G23.1*, and *PSORSIC3*, but their function in this process remains to be elucidated [25]. These lncRNAs may regulate the expression of genes associated with cell proliferation, differentiation, migration, and angiogenesis during decidualization, as proposed in mice uteri [189]. *PTENP1*, a lncRNA that is highly expressed in the luminal epithelium during the mid-secretory phase, regulates the expression of several miRNAs to promote the implantation process [173] (Fig. 3b). It has been suggested lncRNA *H2KPI1*, along with its associated gene *HK2*, is necessary for endometrial decidualization as it inhibits cell proliferation [190]. Interestingly, specific pathways regulate the expression of lncRNAs required for decidualization, such as the cAMP-PKA pathway that regulates *LINC00473* expression, whose specific function in the decidualization process is still unknown [191].

Another lncRNA, *ENST00000433673*, is expressed in epithelial and stromal endometrial cells to enhance the synthesis of ITGAL and ICAM1, two proteins required for the adhesion of the trophoblast to the endometrium [192]. lncRNAs have also been proposed as biomarkers of endometrial receptivity, such as *LINC01060* and *LINC01104*, whose specific functions remain to be elucidated [193].

miRNAs

The expression of miRNAs during the endometrial cycle has been evaluated in endometrial and serum samples. Even though there is evidence that miRNAs levels in serum do not change throughout the menstrual cycle and an endometrial biopsy is recommended to determine the endometrial phase in terms of expression profiles, there is one study that suggests the use of miRNAs as serum biomarkers to determine the receptivity of the endometrium during the secretory phase [194, 195]. Throughout the endometrial cycle, progesterone and estradiol regulate the expression of different miRNAs in the endometrium, and these miRNAs regulate several genes involved in extracellular matrix remodeling, cell proliferation, and

the response to steroid hormones [196, 197]. In addition, the administration of progesterone and estradiol in assisted reproduction cycles modulates miRNA profiles that may regulate endometrial receptivity [196].

The secretory phase shows more changes in the gene expression profiles of the endometrium compared to the menstrual and proliferative phases. These changes in gene expression are partly mediated by miRNAs that target cell cycle related-genes to suppress cell proliferation [18]. The different cell types that compose the endometrium express different miRNAs related to endometrial receptivity during the secretory phase. In stromal cells, miR-543 expression increases during the secretory phase and has been suggested to be involved in signaling pathways associated with endometrial receptivity [198] (Fig. 3b). During decidualization, increased expression of miRNA-222 is associated with a decrease in the number of stromal cells in the S phase of the cell cycle, while high levels of miR-29c expression in epithelial cells are associated with the proper attachment of the blastocyst to the endometrium [199, 200] (Fig. 3b). These studies highlight the importance of miRNAs function in the different cell types that are part of the endometrium.

Another aspect that should be considered in the study of the cyclical endometrium is the regulation of miRNA biogenesis. Particularly, the highest expression of DROSHA (responsible for the initiation of miRNAs processing) is observed in the epithelium during the early and mid-secretory phases, whereas DICER (responsible for the processing of miRNA precursors into mature miRNAs) is preferentially localized and highly expressed in the stroma during the late secretory phase (Fig. 3b). The content of these proteins is lower in the endometrium of infertile women than the endometrium of fertile women during the same phase of the endometrial cycle, which could indicate that these proteins are important for endometrial function [201]. The specific role of these ribonucleases in the cyclical endometrium should be explored in future studies.

Specific miRNA families, such as the miRNA-30 family, or single miRNAs, modulate the expression of genes involved in the regulation of implantation [202, 203]. Particularly, several miRNAs have been associated with implantation failure, for example, miR-29c and miR-661 that reduce the content of collagen type IV alpha 1 (COL4A1) and the E3 Ubiquitin Protein Ligase (MDM2), respectively; both proteins are necessary for the adhesion of the trophoblast to the endometrial epithelial cells [200, 204, 205]. During the first weeks of pregnancy, the decidualized endometrium shows a specific miRNA expression profile. Particularly, miRNA-146b-5p, miRNA-181b-5p, miRNA-424, miRNA-532, and miRNA-199a-3p are downregulated, while miR-423, miR-22-3p, let-7i-5p, and

miR-1 are upregulated in the decidualized endometrium from early pregnancy compared to proliferative endometrium; these miRNAs are associated with genes that are necessary for the maintenance of pregnancy [206]. miRNAs have also been proposed as potential biomarkers for assessing endometrial receptivity because of their relationship with coding-gene expression, which may help to identify the appropriate time for embryo implantation [207–209]. For example, miR-22 downregulates Tiam1/Rac1 protein levels required for embryo implantation in mice. Interestingly, the expression of these molecules is regulated by estradiol and progesterone, and it is proposed that they are involved in RIF [210].

eRNAs

Little is known about the role of eRNAs in the cyclical endometrium. It has been reported that the expression of the eRNA long noncoding-CES1-1 (*lnc-CES1-1*) is upregulated in decidual tissue from patients with unexplained recurrent pregnancy loss (URPL) compared to controls. The transcription factor signal transduction and activation of transcription 4 (STAT4) induces the expression of *lnc-CES1-1* in decidual associated cell lines. In turn, this associated eRNA binds to the fused in sarcoma (FUS) transcription factor to induce *PPAR γ* expression, inhibit cell migration and increase the inflammatory response, which may explain its association with URPL [211].

In the Ishikawa endometrial adenocarcinoma cell line, estradiol induces the expression of an eRNA transcribed from an enhancer that induces the expression of *GREB1* [212]. Interestingly, *GREB1* is highly expressed in the endometrium, and its expression levels fluctuate in accordance with estrogen levels throughout the endometrial cycle in healthy women [213]. However, the role of eRNAs in the regulation of *GREB1* expression in the cyclical endometrium remains to be elucidated.

circRNAs

To the best of our knowledge, only one study has explored the expression profile of circRNAs in the endometrium, in which a total of 21,340 circRNAs were differentially expressed between endometrial cancer and healthy endometrium [214]. Nevertheless, the expression and function of circRNAs in the cyclical endometrium are unknown.

More transcriptomic studies are needed to investigate the expression profiles of lncRNAs, miRNAs, eRNAs, and circRNAs in the endometrium during the proliferative, secretory and menstrual phases, as well as those regulated by sex hormones, which in turn could be responsible for the regulation of expression of coding genes in each endometrial phase. In addition, little is known about how these RNA molecules could interact with each other

during the implantation process and how the hormone milieu could influence the expression of the ncRNA molecules to support the endometrium for implantation.

The differential expression of lncRNAs and miRNAs has been associated with diverse pathologies, and their study has helped to elucidate the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of different diseases. In some cases, ncRNAs have also been used as prognosis biomarkers for disease [215–219]. In pathologies of the endometrium, e.g., endometrial cancer and endometriosis, the study of ncRNAs has not been the exception as the study of these molecules has contributed to clarifying the molecular mechanisms that rule these diseases [217, 220, 221]. Considering that the best method for diagnosing these diseases is laparoscopy surgery, it is of great interest to find more informative biomarkers that can be identified in plasma or serum samples to avoid invasive procedures and improve the life quality of patients [217, 222, 223]. Moreover, a complete understanding of the role of these molecules in endometrial diseases may lead to the discovery of potential therapeutic targets. Further studies are required to establish the action mechanisms of lncRNAs, since they can mediate long-range DNA interactions to regulate gene expression of several genes involved in endometrial cancer pathogenesis [224]. In addition, the participation of other ncRNAs, such as eRNAs and circRNAs, during the different phases of the endometrial cycle and endometrium disease should be explored.

Conclusion and perspectives

Epigenetic mechanisms are emerging as key players in regulating transcriptional networks associated with fundamental processes and functions of the cyclical endometrium. Particularly, DNA methylation, histone PTMs, and ncRNAs regulate the expression of genes associated with endometrial epithelial growth, angiogenesis, and stromal cell proliferation during the proliferative phase. During the secretory phase, these epigenetic mechanisms promote the expression of genes associated with hormone response, insulin signaling, decidualization, and embryo implantation. Further studies using next-generation sequencing are warranted to explore the role of other covalent modifications of nucleic acids and histones, such as DNA hydroxymethylation, RNA methylation, and novel histones PTMs, as well as other non-coding RNAs that are being recognized as fundamental factors in regulating gene expression such as eRNAs or circRNAs. It is clear now that single-cell studies will elucidate the role of the epigenetic mechanisms in each cell type that composes the endometrium, as recently demonstrated by the

single-cell transcriptomic atlas reported by Wang *et al.* [2].

The human genome has a complex and hierarchical structure, called the tridimensional organization of the genome, which plays a fundamental role in regulating gene expression [225, 226]. The genome folds into different levels of organization, including chromosomal territories, open (named A) and closed (named B) chromatin compartments, autonomously folded substructures called topologically associated domains (TADs), and interactions between two specific genomic regions that create chromatin loops [227]. In this regard, a recent study identified a total of 53,211 interactions between promoters and distal regions with accessible chromatin in decidua-derived ESCs decidualized with MPA and cAMP during 48 h [145]. These findings suggested that these interactions should have a regulatory role in the decidualization process. However, more studies are required to explore the functional role of these interactions and the role of the tridimensional organization of the genome to create functional TADs in the nucleus of endometrial cells throughout the endometrial cycle.

Finally, aberrant epigenetic changes may contribute to the pathogenesis of reproductive diseases such as endometrial cancer or endometriosis. Epigenetic mechanisms are probably also dysregulated in women with RIF, thus preventing the correct transition of proliferative endometrium to a decidualized environment necessary in case of fertilization. The application of this knowledge will definitively provide essential information to understand the pathological mechanism of endometrial diseases, such as endometriosis, RIF, and endometrial cancer, and to identify potential therapeutic targets.

Declarations

Abbreviations

5-mC: 5-Methylcytosine; 5'IGRs: 5' Intergenic regions; 5hmc: 5-Hydroxymethylation; ATAC-seq: Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high throughput sequencing; bp: Base pair; cAMP: 3',5'-Cyclic adenosine monophosphate; circRNA: Circular RNAs; ceRNA: Competitive endogenous RNA; CGI: CpG islands; ChIP-chip: Chromatin immunoprecipitation assay followed by microarrays; ChIP-seq: Chromatin immunoprecipitation assay followed by next-generation sequencing; CRISPR/Cas9: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-Cas9; CYR61: Cysteine-rich angiogenic inducer 61; DNA: Deoxyribonucleic acid; DNMT: DNA methyltransferases; DSC: Decidual stromal cells; EEC: Endometrial epithelial cells; eQTL: Expression quantitative trait loci; ERα: Estrogen receptor alpha; eRNAs: Enhancer RNAs; ESC: Endometrial stromal cells; EZH2: Enhancer of Zeste Homolog 2; H2AK5ac: Acetylation on histone H2A lysine 5; H3K14ac: Acetylation on histone H3 lysine 14; H3K16ac: Acetylation on histone H3 lysine 16; H3K27ac: Acetylation on histone H3 lysine 27; H3K27me3: Trimethylation on histone H3 lysine 27; H3K36me3: Trimethylation on histone H3 lysine 36; H3K4me1: Monomethylation on histone H3 lysine 4; H3K4me3: Trimethylation on histone H3 lysine 4; H3K79me3: Trimethylation on histone H3 lysine 79; H3K9ac: Acetylation on histone H3 lysine 9; H3K9me3: Trimethylation on histone H3 lysine 9;

H4K8ac: Acetylation on histone H4 lysine 8; HATs: Histone acetyltransferases; hCG: Human chorionic gonadotropin; HDACi: Histone deacetylase inhibitors; HDACs: Histone deacetylases; IVF: In vitro fertilization; lncRNAs: Long ncRNAs; miRNAs: MicroRNAs; MPA: Medroxyprogesterone; mQTLs: Methylation quantitative trait loci; mRNA: Messenger RNA; ncRNAs: Non-coding RNAs; ORFs: 5' Termini of the open reading frames; piRNAs: PIWI-interacting RNAs; Pol II: RNA polymerase II; PR: Progesterone receptor; PRC2: Polycomb Repressive Complex 2; PTMs: Post-translational modifications; RNA: Ribonucleic acid; SEC: Super elongation complex; siRNAs: Small interfering RNAs; SNPs: Single nucleotide polymorphisms; TADs: Topologically associated domains; TNFα: Transforming growth factor alpha; TSSs: Transcription start sites; VEGF: Vascular endothelial growth factor; URPL: Unexplained recurrent pregnancy loss.

Acknowledgements

We acknowledge the support of Ashley Estefanía Castellanos-Villegas (Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México) and Jorge Daniel Hernández-García (Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México; supported by a scholarship from the CONACyT Number 29892 and the UNAM-PAPIIT Grant Number IA209520) for their assistance in the search for scientific articles.

Authors' contributions

AMRR, INGG, and ERVM conceived the idea for the article and performed data analysis. AMRR, INGG, and ERVM performed the literature search and drafted the work. MLJ, ICA, MC and ERVM critically revised the work. All authors commented on previous versions of the manuscript, read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the Fondo Sectorial de Investigación para la Educación from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; Grant Number A1-S-26749), the Instituto Nacional de Perinatología 'Isidro Espinosa de los Reyes' (INPer; Grant Number 571, 3000-20109-01-571-17) and the Universidad Nacional Autónoma de México-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-PAPIIT; Grant Number IA209520). AMRR and INGG were supported by a master's scholarship from the CONACyT (Scholarship Numbers 956173 and 967333, respectively). We declare that the funder had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

Availability of data and material

All the information is included in this manuscript.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

All authors gave their consent for publication.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Montes Urales 800, Lomas Virreyes, Miguel Hidalgo, 11000 Ciudad de México, Mexico. ²Departamento de Inmunobiología, Instituto Nacional de Perinatología, Ciudad de México, Mexico.

Received: 7 March 2021 Accepted: 13 May 2021

Published online: 25 May 2021

References

- Caplakova V, Babusikova E, Blahovcova E, Balharek T, Zelieskova M, Hatok J. DNA methylation machinery in the endometrium and endometrial cancer. *Anticancer Res*. 2016;36(9):4407–20. <https://doi.org/10.21873/anticancer.10984>.
- Wang W, Vilella F, Alama P, Moreno I, Mignardi M, Isakova A, Pan W, Simon C, Quake SR. Single-cell transcriptomic atlas of the human endometrium during the menstrual cycle. *Nat Med*. 2020;26(10):1644–53. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1040-z>.
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol*. 1975;122(2):262–3. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(16\)33500-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(16)33500-1).
- Hawkins SM, Matzuk MM. The menstrual cycle: basic biology. *Ann NY Acad Sci*. 2008;1135:10–8. <https://doi.org/10.1196/annals.1429.018>.
- Ferencyz A, Bertrand G, Gelfand MM. Proliferation kinetics of human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol*. 1979;133(8):859–67. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(79\)90302-8](https://doi.org/10.1016/0002-9378(79)90302-8).
- Thiyagarajan DK, Basit H, Jeanmonod R. Physiology, menstrual cycle (2020). In: *StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*
- Navot D, Anderson TL, Drosch K, Scott RT, Kreiner D, Rosenwaks Z. Hormonal manipulation of endometrial maturation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;68(4):801–7. <https://doi.org/10.1210/jcem-68-4-801>.
- Gipson IK, Ho SB, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Zhan Q, Torlakovic E, Pudney J, Anderson DJ, Toribara NW, Hill JA 3rd. Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biol Reprod*. 1997;56(4):999–1011. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.4.999>.
- Riesewijk A, Martín J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, Mosseman S, Simón C. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod*. 2003;9(5):253–64. <https://doi.org/10.1093/molehr/gag037>.
- Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev*. 2014;35(6):851–905. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1045>.
- Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*. 1997;18(4):502–19. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.4.0308>.
- Munro SK, Farquhar CM, Mitchell MD, Ponnampalam AP. Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*. 2010;16(5):297–310. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq010>.
- Holliday R. Epigenetics: an overview. *Dev Genet*. 1994;15(6):453–7. <https://doi.org/10.1002/dvg.1020150602>.
- Blakey CA, Litt MD. Epigenetic gene expression—an introduction. In: Huang S, Blakey CA, Litt MD, editors. *Epigenetic gene expression and regulation*. New York: Elsevier; 2015. p. 1–19.
- Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*. 2006;174(3):341–8. <https://doi.org/10.1503/cmaj.050774>.
- Katoh N, Kuroda K, Tomikawa J, Ogata-Kawata H, Ozaki R, Ochiai A, Kitade M, Takeda S, Nakabayashi K, Hata K. Reciprocal changes of H3K27ac and H3K27me3 at the promoter regions of the critical genes for endometrial decidualization. *Epigenomics*. 2018;10(9):1243–57. <https://doi.org/10.2217/epi-2018-0006>.
- Le Dily F, Beato M. Signaling by steroid hormones in the 3D nuclear space. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):306. <https://doi.org/10.3390/ijms19020306>.
- Kuokkanen S, Chen B, Ojalvo L, Benard L, Santoro N, Pollard JW. Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biol Reprod*. 2010;82(4):791–801. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.081059>.
- Hu S, Yao G, Wang Y, Xu H, Ji X, He Y, Zhu Q, Chen Z, Sun Y. Transcriptomic changes during the pre-receptive to receptive transition in human endometrium detected by RNA-Seq. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(12):E2744–53. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2155>.
- Carson DD, Lagow E, Thatiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, Yuan L, Fritz MA, Lessey B. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod*. 2002;8(9):871–9. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.9.871>.
- Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA, Giudice LC. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*. 2002;143(6):2119–38. <https://doi.org/10.1210/endo.143.6.8885>.
- Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, Hull ML, Teirney R, Phillips SC, Smith SK. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod*. 2003;9(1):19–33. <https://doi.org/10.1093/molehr/gag004>.
- Ponnampalam AP, Weston GC, Trajstman AC, Susil B, Rogers PA. Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Mol Hum Reprod*. 2004;10(12):879–93. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah121>.
- Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA, Nayak NR, Giudice LC. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology*. 2006;147(3):1097–121. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1076>.
- Sigurgeirsson B, Åmark H, Jemt A, Ujvari D, Westgren M, Lundeberg J, Gidlöf S. Comprehensive RNA sequencing of healthy human endometrium at two time points of the menstrual cycle. *Biol Reprod*. 2017;96(1):24–33. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.142547>.
- Burmenskaya OV, Bozhenko VK, Smolnikova VY, Kalinina EA, Korneeva IE, Donnikov AE, Beyk EP, Naumov VA, Aleksandrova NV, Borovikov PI, Trofimov DY. Transcription profile analysis of the endometrium revealed molecular markers of the personalized “window of implantation” during in vitro fertilization. *Gynecol Endocrinol*. 2017;33(sup1):22–7. <https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1404236>.
- Makieva S, Giacomini E, Ottolina J, Sanchez AM, Papaleo E, Viganò P. Inside the endometrial cell signaling subway: mind the gap(s). *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):2477. <https://doi.org/10.3390/ijms19092477>.
- Giudice LC, Mark SP, Irwin JC. Paracrine actions of insulin-like growth factors and IGF binding protein-1 in non-pregnant human endometrium and at the decidual-trophoblast interface. *J Reprod Immunol*. 1998;39(1–2):133–48. [https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(98\)00018-7](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(98)00018-7).
- Snijders MP, de Goeij AF, Debets-Te Baerts MJ, Rousch MJ, Koudstaal J, Bosman FT. Immunocytochemical analysis of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human uterus throughout the menstrual cycle and after the menopause. *J Reprod Fertil*. 1992;94(2):363–71. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0940363>.
- Zhu L, Pollard JW. Estradiol-17beta regulates mouse uterine epithelial cell proliferation through insulin-like growth factor 1 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(40):15847–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705749104>.
- Klotz DM, Hewitt SC, Ciana P, Raviscioni M, Lindzey JK, Foley J, Maggi A, DiAugustine RP, Korach KS. Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk. *J Biol Chem*. 2002;277(10):8531–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109592200>.
- Richards RG, Walker MP, Sebastian J, Di Augustine RP. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor-insulin receptor substrate complexes in the uterus. Altered signaling response to estradiol in the IGF-1(m/m) mouse. *J Biol Chem*. 1998;273(19):11962–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.19.11962>.
- Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO*. 1996;15(6):1292–300. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00471.x>.
- Vázquez-Martínez ER, Camacho-Arroyo I, Zarain-Herzberg A, Rodríguez MC, Mendoza-Garcés L, Ostrosky-Wegman P, Corbón M. Estradiol differentially induces progesterone receptor isoforms expression through alternative promoter regulation in a mouse embryonic hypothalamic cell line. *Endocrine*. 2016;52(3):618–31. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0825-1>.
- Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G. Comparative aspects of implantation. *Reproduction*. 2009;138(2):195–209. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0158>.
- Chi RA, Wang T, Adams N, et al. Human endometrial transcriptome and progesterone receptor cistrome reveal important pathways and epithelial regulators. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(4):e1419–39. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgiz117>.

37. Li XF, Charnock-Jones DS, Zhang E, Hiby S, Malik S, Day K, Licence D, Bowen JM, Gardner L, King A, Loke YW, Smith SK. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(4):1823–34. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.4.7418>.
38. Suzumori N, Sugiura-Ogasawara M, Katano K, Suzumori K. Women with endometriosis have increased levels of placental growth factor in the peritoneal fluid compared with women with cystadenomas. *Hum Reprod*. 2003;18(12):2595–8. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg491>.
39. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. Signaling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*. 2001;37(Suppl 4):S3–8. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(01\)00230-1](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(01)00230-1).
40. Lai TH, Chang FW, Lin JJ, Ling QD. Gene expression of human endometrial L-selectin ligand in relation to the phases of the natural menstrual cycle. *Sci Rep*. 2018;8(1):1443. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19911-z>.
41. Foulk RA, Zdravkovic T, Genbacev O, Prakobphol A. Expression of L-selectin ligand MECA-79 as a predictive marker of human uterine receptivity. *J Assist Reprod Genet*. 2007;24(7):316–21. <https://doi.org/10.1007/s10815-007-9151-8>.
42. Graubert MD, Ortega MA, Kessel B, Mortola JF, Iruela-Arispe ML. Vascular repair after menstruation involves regulation of vascular endothelial growth factor-receptor phosphorylation by sFLT-1. *Am J Pathol*. 2001;158(4):1399–410. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64091-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64091-6).
43. Braundmeier AG, Fazleabas AT, Nowak RA. Extracellular matrix metalloproteinase inducer expression in the baboon endometrium: menstrual cycle and endometriosis. *Reproduction*. 2010;140(6):911–20. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0481>.
44. Petracco RG, Kong A, Grechukhina O, Krikun G, Taylor HS. Global gene expression profiling of proliferative phase endometrium reveals distinct functional subdivisions. *Reprod Sci*. 2012;19(10):1138–45. <https://doi.org/10.1177/1933719112443877>.
45. Li XF, Ahmed A. Dual role of angiotensin II in the human endometrium. *Hum Reprod*. 1996;11(Suppl 2):95–108. https://doi.org/10.1093/humrep/11.suppl_2.95.
46. Keskin DB, Allan DS, Rybalov B, Andzelm MM, Stern JN, Kopcow HD, Koopman LA, Strominger JL. TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(9):3378–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611098104>.
47. Punyadeera C, Dassen H, Klomp J, Dunselman G, Kamps R, Dijcks F, Ederveen A, de Goeij A, Groothuis P. Oestrogen-modulated gene expression in the human endometrium. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(2):239–50. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4435-y>.
48. Print C, Valtola R, Evans A, Lessan K, Malik S, Smith S. Soluble factors from human endometrium promote angiogenesis and regulate the endothelial cell transcriptome. *Hum Reprod*. 2004;19(10):2356–66. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh411>.
49. Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P, Peterson H, Vilo J. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res*. 2019;47(W1):W191–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz369>.
50. Catalano RD, Yanaihara A, Evans AL, Rocha D, Prentice A, Saidi S, Print CG, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Smith SK. The effect of RU486 on the gene expression profile in an endometrial explant model. *Mol Hum Reprod*. 2003;9(8):465–73. <https://doi.org/10.1093/molehr/gag060>.
51. Yanaihara A, Otsuka Y, Iwasaki S, Koide K, Aida T, Okai T. Comparison in gene expression of secretory human endometrium using laser microdissection. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:66. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-66>.
52. Friedmann Y, Daniel CW. Regulated expression of homeobox genes *Msx-1* and *Msx-2* in mouse mammary gland development suggests a role in hormone action and epithelial-stromal interactions. *Dev Biol*. 1996;177(1):347–55. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0168>.
53. Quaranta MT, Petrini M, Tritarelli E, Samoggia P, Carè A, Bottero L, Testa U, Peschle C. HOXB cluster genes in activated natural killer lymphocytes: expression from 3'→5' cluster side and proliferative function. *J Immunol*. 1996;157(6):2462–9.
54. San Martin S, Soto-Suazo M, De Oliveira SF, Aplin JD, Abrahamsohn P, Zorn TM. Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) in uterine tissues during pregnancy in mice. *Reproduction*. 2003;125(4):585–95. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250585>.
55. Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell*. 1997;1(1):13–23. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80003-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80003-9).
56. Cordeiro-Da-Silva A, Borges MC, Guilvard E, Ouaiissi A. Dual role of the Leishmania major ribosomal protein S3a homologue in regulation of T- and B-cell activation. *Infect Immun*. 2001;69(11):6588–96. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.11.6588-6596.2001>.
57. Wideman L, Montgomery MM, Levine BJ, Beynon BD, Shultz SJ. Accuracy of calendar-based methods for assigning menstrual cycle phase in women. *Sports Health*. 2013;5(2):143–9. <https://doi.org/10.1177/1941738112469930>.
58. Tamaya T, Murakami T, Yamada T, Wada K, Fujimoto J, Okada H. Serum hormone and steroid hormone receptor levels during luteal-phase and long-term treatment with danazol. *Fertil Steril*. 1983;40(5):585–9. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)47413-3](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)47413-3).
59. Saare M, Laisk T, Teder H, et al. A molecular tool for menstrual cycle phase dating of endometrial samples in endometriosis transcriptome studies. *Biol Reprod*. 2019;101(1):1–3. <https://doi.org/10.1093/biolre/iz072>.
60. Fung JN, Mortlock S, Girling JE, et al. (2018) Genetic regulation of disease risk and endometrial gene expression highlights potential target genes for endometriosis and polycystic ovarian syndrome. *Sci Rep*. 2018;8(1):11424. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29462-y>.
61. Mortlock S, Kendarsari RI, Fung JN, et al. Tissue specific regulation of transcription in endometrium and association with disease. *Hum Reprod*. 2020;35(2):377–93. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez279>.
62. Hanna RE, Doench JG. Design and analysis of CRISPR-Cas experiments. *Nat Biotechnol*. 2020;38(7):813–23. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0490-7>.
63. Knott GJ, Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*. 2018;361(6405):866–9. <https://doi.org/10.1126/science.aat5011>.
64. Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Maekawa R, Taniguchi K, Taketani T, Matsuoka A, Tamura H, Sugino N. DNA methyltransferase expression in the human endometrium: down-regulation by progesterone and estrogen. *Hum Reprod*. 2009;24(5):1126–32. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep015>.
65. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropharmacology*. 2013;38(1):23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>.
66. Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet*. 2017;18(9):517–34. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>.
67. Hahn MA, Szabó PE, Pfeifer GP. 5-Hydroxymethylcytosine: a stable or transient DNA modification? *Genomics*. 2014;104(5):314–23. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.08.015>.
68. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012;13(7):484–92. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>.
69. Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*. 1993;3(2):226–31. [https://doi.org/10.1016/0959-437x\(93\)90027-m](https://doi.org/10.1016/0959-437x(93)90027-m).
70. Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature*. 2015;517(7534):321–6. <https://doi.org/10.1038/nature14192>.
71. Angeloni A, Bogdanovic O. Enhancer DNA methylation: implications for gene regulation. *Essays Biochem*. 2019;63(6):707–15. <https://doi.org/10.1042/EBC20190030>.
72. Song Y, van den Berg PR, Markoulaki S, Soldner F, Dall'Agnese A, Henninger JE, Drotar J, Rosenau N, Cohen MA, Young RA, Semrau S, Stelzer Y, Jaenisch R. Dynamic enhancer DNA methylation as basis for transcriptional and cellular heterogeneity of ESCs. *Mol Cell*. 2019;75(5):905–20. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.045>.
73. Huang G, Zhao X, Wang L, Elf S, Xu H, Zhao X, Sashida G, Zhang Y, Liu Y, Lee J, Menendez S, Yang Y, Yan X, Zhang P, Tenen DG, Osato M, Hsieh JJ, Nimer SD. The ability of MLL to bind RUNX1 and methylate H3K4 at PU.1 regulatory regions is impaired by MDS/AML-associated RUNX1/AML1 mutations. *Blood*. 2011;118(25):6544–52. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-317909>.

74. Luo Z, Lin C. Enhancer, epigenetics, and human disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2016;23(6):27–33. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.03.012>.
75. Bell RE, Golan T, Sheinboim D, Malcov H, Amar D, Salamon A, Liron T, Gelfman S, Gabet Y, Shamir R, Levy C. Enhancer methylation dynamics contribute to cancer plasticity and patient mortality. *Genome Res*. 2016;26(5):601–11. <https://doi.org/10.1101/gr.197194.115>.
76. Houshdaran S, Zelenko Z, Irwin JC, Giudice LC. Human endometrial DNA methylome is cycle-dependent and is associated with gene expression regulation. *Mol Endocrinol*. 2014;28(7):1118–35. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1340>.
77. Shukla A, Sehgal M, Singh TR. Hydroxymethylation and its potential implication in DNA repair system: a review and future perspectives. *Gene*. 2015;564(2):109–18. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.03.075>.
78. Olesen MS, Starnawska A, Bybjerg-Grauholm J, Bielfeld AP, Agerholm I, Forman A, Overgaard MT, Nyegaard M. Biological age of the endometrium using DNA methylation. *Reproduction*. 2018;155(2):167–72. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0601>.
79. Mortlock S, Restuadi R, Levien R, Girling JE, Holdsworth-Carson SJ, Healey M, Zhu Z, Qi T, Wu Y, Lukowski SW, Rogers PAW, Yang J, McRae AF, Fung JN, Montgomery GW. Genetic regulation of methylation in human endometrium and blood and gene targets for reproductive diseases. *Clin Epigenet*. 2019;11(1):49. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0648-7>.
80. Postawski K, Galecka-Josse M, Baranowski W. Is global DNA methylation in sporadic uterine adenocarcinomas in women a result of histological and clinical tumor advancement? *Ginekol Pol*. 2009;80(11):824–7.
81. Ghabreau L, Roux JP, Niveleau A, et al. Correlation between the DNA global methylation status and progesterone receptor expression in normal endometrium, endometrioid adenocarcinoma and precursors. *Virchows Arch*. 2004;445(2):129–34. <https://doi.org/10.1007/s00428-004-1059-4>.
82. Saare M, Modhukur V, Suhorutshenko M, Rajashekar B, Rekker K, Söritsa D, Karro H, Soplepmann P, Söritsa A, Lindgren CM, Rahmioglu N, Drong A, Becker CM, Zondervan KT, Salumets A, Peters M. The influence of menstrual cycle and endometriosis on endometrial methylome. *Clin Epigenetics*. 2016;8(2). <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0168-z>.
83. Kuskushkina V, Modhukur V, Suhorutshenko M, Peters M, Mägi R, Rahmioglu N, Velthut-Meikas A, Altmäe S, Esteban FJ, Vilo J, Zondervan K, Salumets A, Laisk-Podar T. DNA methylation changes in endometrium and correlation with gene expression during the transition from pre-receptive to receptive phase. *Sci Rep*. 2017;7(1):3916. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03682-0>.
84. Vázquez-Martínez ER, Gómez-Viás YI, García-Gómez E, Reyes-Mayoral C, Reyes-Muñoz E, Camacho-Arroyo I, Cerbón M. DNA methylation in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *Reproduction*. 2019;158(1):R27–40. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0449>.
85. Houshdaran S, Nezhat CR, Vo KC, Zelenko Z, Irwin JC, Giudice LC. Aberrant endometrial DNA methylome and associated gene expression in women with endometriosis. *Biol Reprod*. 2016;95(5):93. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.140434>.
86. Houshdaran S, Oke AB, Fung JC, Vo KC, Nezhat C, Giudice LC. Steroid hormones regulate genome-wide epigenetic programming and gene transcription in human endometrial cells with marked aberrancies in endometriosis. *PLoS Genet*. 2020;16(6):e1008601. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008601>.
87. Vincent ZL, Farquhar CM, Mitchell MD, Ponnampalam AP. Expression and regulation of DNA methyltransferases in human endometrium. *Fertil Steril*. 2011;95(4):1522–5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.09.030>.
88. Logan PC, Ponnampalam AP, Steiner M, Mitchell MD. Effect of cyclic AMP and estrogen/progesterone on the transcription of DNA methyltransferases during the decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod*. 2013;19(5):302–12. <https://doi.org/10.1093/molehr/gas062>.
89. Mahajan V, Osavlyuk D, Logan PC, Amirapu S, Ponnampalam AP. Expression and steroid hormone regulation of TETs and DNMTs in human endometrium. *Reproduction*. 2020;160(2):247–57. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0562>.
90. Nugent BM, Wright CL, Shetty AC, Hodes GE, Lenz KM, Mahurkar A, Russo SJ, Devine SE, McCarthy MM. Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nat Neurosci*. 2015;18(5):690–7. <https://doi.org/10.1038/nn.3988>.
91. Marques M, Laflamme L, Gaudreau L. Estrogen receptor α can selectively repress dioxin receptor-mediated gene expression by targeting DNA methylation. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(17):8094–106. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt595>.
92. Wu Z, Sun Y, Mei X, Zhang C, Pan W, Shi W. 17 β -oestradiol enhances global DNA hypomethylation in CD4-positive T cells from female patients with lupus, through overexpression of oestrogen receptor- α -mediated downregulation of DNMT1. *Clin Exp Dermatol*. 2014;39(4):525–32. <https://doi.org/10.1111/ced.12346>.
93. Lynch EW, Coyle CS, Lorgen M, Campbell EM, Bowman AS, Stevenson TJ. Cyclical DNA methyltransferase 3a expression is a seasonal and estrus timer in reproductive tissues. *Endocrinology*. 2016;157(6):2469–78. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1988>.
94. Du Q, Luu PL, Stirzaker C, Clark SJ. Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics*. 2015;7(6):1051–73. <https://doi.org/10.2217/epi.15.39>.
95. van Kaam KJ, Delvoux B, Romano A, D'Hooghe T, Dunselman GA, Groothuis PG. Deoxyribonucleic acid methyltransferases and methyl-CpG-binding domain proteins in human endometrium and endometriosis. *Fertil Steril*. 2011;95(4):1421–7. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.01.031>.
96. Gao F, Ma X, Rusie A, Hemingway J, Ostmann AB, Chung D, Das SK. Epigenetic changes through DNA methylation contribute to uterine stromal cell decidualization. *Endocrinology*. 2012;153(12):6078–90. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1457>.
97. Woods L, Morgan N, Zhao X, Dean W, Perez-Garcia V, Hemberger M. Epigenetic changes occur at decidualisation genes as a function of reproductive ageing in mice. *Development*. 2020;147(6):dev185629. <https://doi.org/10.1242/dev.185629>.
98. Pathare ADS, Hinduja I. Aberrant DNA methylation profiling affecting the endometrial receptivity in recurrent implantation failure patients undergoing in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol*. 2020;83(1):e13196. <https://doi.org/10.1111/aji.13196>.
99. Nazarenko TA, Kalinina EA, Knyazeva EA, Kiselev VI, Smolnikova VY, Sukhikh GT. The role of abnormal hypermethylation of the HOXA10 and HOXA11 promoters in implantation failures in IVF programs. *Gynecol Endocrinol*. 2019;35(sup1):31–4. <https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1632087>.
100. Wang L, Tan YJ, Wang M, Chen YF, Li XY. DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine modulates endometrial receptivity through upregulating HOXA10 expression. *Reprod Sci*. 2019;26(6):839–46. <https://doi.org/10.1177/1933719118815575>.
101. Xiong Y, Wang J, Liu L, Chen X, Xu H, Li TC, Wang CC, Zhang S. Effects of high progesterone level on the day of human chorionic gonadotrophin administration in in vitro fertilization cycles on epigenetic modification of endometrium in the peri-implantation period. *Fertil Steril*. 2017;108(2):269–276.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.004>.
102. Xiong Y, Hu L, Zhang T, Wang M, Xu H, Li TC, Sun Y, Wang CC. Effects of high progesterone in in-vitro fertilization cycle on DNA methylation and gene expression of adhesion molecules on endometrium during implantation window. *J Assist Reprod Genet*. 2020;37(1):33–43. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01623-6>.
103. Senapati S, Wang F, Ord T, Coutifaris C, Feng R, Mainigi M. Superovulation alters the expression of endometrial genes critical to tissue remodeling and placentation. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(10):1799–808. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1244-z>.
104. Bae T, Kim H, Kim JH, et al. Specificity assessment of CRISPR genome editing of oncogenic EGFR point mutation with single-base differences. *Molecules*. 2019;25(1):52. <https://doi.org/10.3390/molecules25010052>.
105. Kang JG, Park JS, Ko JH, Kim YS. Regulation of gene expression by altered promoter methylation using a CRISPR/Cas9-mediated epigenetic editing system. *Sci Rep*. 2019;9(1):11960. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48130-3>.
106. Ciuculete DM, Boström AE, Voisin S, et al. A methylome-wide mQTL analysis reveals associations of methylation sites with GAD1 and HDAC3 SNPs and a general psychiatric risk score. *Transl Psychiatry*. 2017;7(1):e1002. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.275>.
107. Ciuculete DM, Voisin S, Kular L, et al. meQTL and ncRNA functional analyses of 102 GWAS-SNPs associated with depression implicate

- HACE1 and SHANK2 genes. *Clin Epigenet.* 2020;12(1):99. <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00884-8>.
108. Wu Y, Zeng J, Zhang F, et al. Integrative analysis of omics summary data reveals putative mechanisms underlying complex traits. *Nat Commun.* 2018;9(1):918. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03371-0>.
 109. McRae AF, Marioni RE, Shah S, et al. Identification of 55,000 Replicated DNA Methylation QTL. *Sci Rep.* 2018;8(1):17605. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35871-w>.
 110. Makabe T, Arai E, Hirano T, Ito N, Fukamachi Y, Takahashi Y, Hirasawa A, Yamagami W, Susumu N, Aoki D, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profile of early-onset endometrial cancer: its correlation with genetic aberrations and comparison with late-onset endometrial cancer. *Carcinogenesis.* 2019;40(5):611–23. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgz046>.
 111. Pan ZX, Zhang XY, Chen SR, Li CZ. Upregulated exosomal miR-221/222 promotes cervical cancer via repressing methyl-CpG-binding domain protein 2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23(9):3645–53. https://doi.org/10.26355/eurrev_201905_17788.
 112. Roca FJ, Loomans HA, Wittman AT, Creighton CJ, Hawkins SM. Ten-eleven translocation genes are downregulated in endometriosis. *Curr Mol Med.* 2016;16(3):288–98. <https://doi.org/10.2174/1566524016666160225153844>.
 113. Ciesielski P, Józwiak P, Wójcik-Krowiranda K, Forma E, Cwonda Ł, Szczepaniec S, Biernkiewicz A, Bryś M, Krześlak A. Differential expression of ten-eleven translocation genes in endometrial cancers. *Tumour Biol.* 2017;39(3):1010428317695017. <https://doi.org/10.1177/1010428317695017>.
 114. Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, Moudrianakis EN. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(22):10148–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.22.10148>.
 115. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell.* 2007;128(4):669–81. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.033>.
 116. Turner BM. Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays.* 2000;22(9):836–45. [https://doi.org/10.1002/1521-1878\(200009\)22:9%3c836::AID-BIES9%3e3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1521-1878(200009)22:9%3c836::AID-BIES9%3e3.0.CO;2-X).
 117. Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:75–100. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052705.162114>.
 118. Berndsen CE, Denu JM. Catalysis and substrate selection by histone/protein lysine acetyltransferases. *Curr Opin Struct Biol.* 2008;18(6):682–9. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.11.004>.
 119. Marks PA, Miller T, Richon VM. Histone deacetylases. *Curr Opin Pharmacol.* 2003;3(4):344–51. [https://doi.org/10.1016/s1471-4892\(03\)00084-5](https://doi.org/10.1016/s1471-4892(03)00084-5).
 120. Tyagi M, Imam N, Verma K, Patel AK. Chromatin remodelers: we are the drivers!! *Nucleus.* 2016;7(4):388–404. <https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1211217>.
 121. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011;21(3):381–95. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>.
 122. Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE, Ren B. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet.* 2007;39(3):311–8. <https://doi.org/10.1038/ng1966>.
 123. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell.* 2007;129(4):823–37. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>.
 124. Gates LA, Shi J, Rohira AD, Feng Q, Zhu B, Bedford MT, Sagum CA, Jung SY, Qin J, Tsai MJ, Tsai SY, Li W, Foulds CE, O'Malley BW. Acetylation on histone H3 lysine 9 mediates a switch from transcription initiation to elongation. *J Biol Chem.* 2017;292(35):14456–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.802074>.
 125. Gupta AP, Chin WH, Zhu L, Mok S, Luah YH, Lim EH, Bozdech Z. Dynamic epigenetic regulation of gene expression during the life cycle of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog.* 2013;9(2):e1003170. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003170>.
 126. Dang W, Steffen KK, Perry R, Dorsey JA, Johnson FB, Shilatidaf A, Kaeberlein M, Kennedy BK, Berger SL. Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan. *Nature.* 2009;459(7248):802–7. <https://doi.org/10.1038/nature08085>.
 127. Zhang T, Cooper S, Brockdorff N. The interplay of histone modifications: writers that read. *EMBO Rep.* 2015;16(11):1467–81. <https://doi.org/10.15252/embr.201540945>.
 128. Sakai N, Maruyama T, Sakurai R, Masuda H, Yamamoto Y, Shimizu A, Kishi I, Asada H, Yamagoe S, Yoshimura Y. Involvement of histone acetylation in ovarian steroid-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *J Biol Chem.* 2003;278(19):16675–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M21171520>.
 129. Beato M, Vicent GP. (2012) Impact of chromatin structure and dynamics on PR signaling. The initial steps in hormonal gene regulation. *Mol Cell Endocrinol*;357(1–2):37–42. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.004>
 130. Métivier R, Penot G, Hübner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F. Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell.* 2003;115(6):751–63. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00934-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00934-6).
 131. Maruyama T, Yoshimura Y. Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. *Endocr J.* 2008;55(5):795–810. <https://doi.org/10.1507/endocrj.k08e-067>.
 132. Lessey BA, Young SL. Structure, function, and evaluation of the female reproductive tract. In: Yen & Jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management (ed) Elsevier Inc., pp. 206–47, 2019.
 133. Chan RW, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod.* 2004;70(6):1738–50. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024109>.
 134. Okada H, Tsuzuki T, Murata H. Decidualization of the human endometrium. *Reprod Med Biol.* 2018;17(3):220–227. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12088>
 135. Monteiro JB, Colón-Díaz M, García M, Gutierrez S, Colón M, Seto E, Laboy J, Flores I. Endometriosis is characterized by a distinct pattern of histone 3 and histone 4 lysine modifications. *Reprod Sci.* 2014;21(3):305–18. <https://doi.org/10.1177/1933719113497267>.
 136. Krusche CA, Vloet AJ, Classen-Linke I, von Rango U, Beier HM, Alfer J. Class I histone deacetylase expression in the human cyclic endometrium and endometrial adenocarcinomas. *Hum Reprod.* 2007;22(11):2956–66. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem241>.
 137. Uchida H, Maruyama T, Nagashima T, Ono M, Masuda H, Arase T, Sugiyama I, Onouchi M, Kajitani T, Asada H, Yoshimura Y. Human endometrial cytodifferentiation by histone deacetylase inhibitors. *Hum Cell.* 2006;19(1):38–42. <https://doi.org/10.1111/j.1749-0774.2005.00006.x>.
 138. Samadieh Y, Favaedi R, Ramezani F, Afsharian P, Aflatoonian R, Shahhosseini M. Epigenetic dynamics of HOXA10 gene in infertile women with endometriosis. *Reprod Sci.* 2019;26(1):88–96. <https://doi.org/10.1177/1933719118766255>.
 139. Taylor HS, Arici A, Olive D, Igarashi P. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Investig.* 1998;101(7):1379–84. <https://doi.org/10.1172/JCI1057>.
 140. Grimaldi G, Christian M, Steel JH, Henriët P, Poutanen M, Brosens JJ. Down-regulation of the histone methyltransferase EZH2 contributes to the epigenetic programming of decidualizing human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol.* 2011;25(11):1892–903. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1139>.
 141. Tamura I, Asada H, Maekawa R, Tanabe M, Lee L, Taketani T, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N. Induction of IGFBP-1 expression by cAMP is associated with histone acetylation status of the promoter region in human endometrial stromal cells. *Endocrinology.* 2012;153(11):5612–21. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1420>.
 142. Tamura I, Ohkawa Y, Sato T, Suyama M, Jozaki K, Okada M, Lee L, Maekawa R, Asada H, Sato S, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N. Genome-wide analysis of histone modifications in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol.* 2014;28(10):1656–69. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1117>.
 143. Tamura I, Jozaki K, Sato S, Shirafuta Y, Shinagawa M, Maekawa R, Taketani T, Asada H, Tamura H, Sugino N. The distal upstream region of insulin-like growth factor-binding protein-1 enhances its expression in endometrial stromal cells during decidualization. *J Biol Chem.* 2018;293(14):5270–80. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000234>.
 144. Kaya HS, Hantak AM, Stubbs LJ, Taylor RN, Bagchi IC, Bagchi MK. Roles of progesterone receptor A and B isoforms during human endometrial decidualization. *Mol Endocrinol.* 2015;29(6):882–95. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1363>.

145. Sakabe NJ, Aneas I, Knoblauch N, Sobreira DR, Clark N, Paz C, Horth C, Ziffra R, Kaur H, Liu X, Anderson R, Morrison J, Cheung VC, Grotegut C, Reddy TE, Jacobsson B, Hallman M, Teramo K, Murtha A, Kessler J, Grobman W, Zhang G, Muglia LJ, Rana S, Lynch VJ, Crawford GE, Ober C, He X, Nóbrega MA. Transcriptome and regulatory maps of decidua-derived stromal cells inform gene discovery in preterm birth. *Sci Adv*. 2020;6(49):eabc8696. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc8696>.
146. Ku WL, Nakamura K, Gao W, Cui K, Hu G, Tang Q, Ni B, Zhao K. Single-cell chromatin immunocleavage sequencing (scChIC-seq) to profile histone modification. *Nat Methods*. 2019;16(4):323–5. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0361-7>.
147. Xiaomeng X, Ming Z, Jiezhong M, Xiaoling F. Aberrant histone acetylation and methylation levels in women with endometriosis. *Arch Gynecol Obstet*. 2013;287(3):487–94. <https://doi.org/10.1007/s00404-012-2591-0>.
148. Colón-Caraballo M, Torres-Reverón A, Soto-Vargas JL, Young SL, Lessey B, Mendoza A, Urrutia R, Flores I. Effects of histone methyltransferase inhibition in endometriosis. *Biol Reprod*. 2018;99(2):293–307. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox030>.
149. Chu Y, Wang Y, Zhang G, Chen H, Dowdy SC, Xiong Y, Liu F, Zhang R, Li J, Jiang SW. Chromatin composition alterations and the critical role of MeCP2 for epigenetic silencing of progesterone receptor-B gene in endometrial cancers. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(17):3393–408. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1580-9>.
150. Tang Z, Chen WY, Shimada M, Nguyen UT, Kim J, Sun XJ, Sengoku T, McGinty RK, Fernandez JP, Muir TW, Roeder RG. SET1 and p300 act synergistically, through coupled histone modifications, in transcriptional activation by p53. *Cell*. 2013;154(2):297–310. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.027>.
151. Li Q, Jia N, Tao X, Hua K, Feng W. The expression and significance of histone lysine methylation in endometrial cancer. *Oncol Lett*. 2017;14(5):6210–6. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6979>.
152. Wei Z, Batagov AO, Schinelli S, Wang J, Wang Y, El Fatimy R, Rabinovsky R, Balaj L, Chen CC, Hochberg F, Carter B, Breakefield XO, Krichevsky AM. Coding and noncoding landscape of extracellular RNA released by human glioma stem cells. *Nat Commun*. 2017;8(1):1145. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01196-x>.
153. Peschansky VJ, Wahlestedt C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics*. 2014;9(11):3–12. <https://doi.org/10.4161/epi.27473>.
154. Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:145–66. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051410-092902>.
155. Sun S, Del Rosario BC, Szanto A, Ogawa Y, Jeon Y, Lee JT. Jpx RNA activates Xist by evicting CTCF. *Cell*. 2013;153(7):1537–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.028>.
156. Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J Transl Med*. 2016;14(1):143. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0893-x>.
157. De Santa F, Barozzi I, Miettton F, Ghisletti S, Polletti S, Tusi BK, Muller H, Ragoussis J, Wei CL, Natoli G. A large fraction of extragenic RNA pol II transcription sites overlap enhancers. *PLoS Biol*. 2010;8(5):e1000384. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000384>.
158. Kim TK, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, Harmin DA, Laptewicz M, Barbara-Haley K, Kuersten S, Markenscoff-Papadimitriou E, Kuhl D, Bito H, Worley PF, Kreiman G, Greenberg ME. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature*. 2010;465(7295):182–7. <https://doi.org/10.1038/nature09033>.
159. Arnold PR, Wells AD, Li XC. Diversity and emerging roles of enhancer RNA in regulation of gene expression and cell fate. *Front Cell Dev Biol*. 2020;14(7):377. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00377>.
160. Cheng JH, Pan DZ, Tsai ZT, Tsai HK. Genome-wide analysis of enhancer RNA in gene regulation across 12 mouse tissues. *Sci Rep*. 2015;2015(5):12648. <https://doi.org/10.1038/srep12648>.
161. Li W, Notani D, Rosenfeld MG. Enhancers as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives. *Nat Rev Genet*. 2016;17(4):207–23. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.4>.
162. Lewis MW, Li S, Franco HL. Transcriptional control by enhancers and enhancer RNAs. *Transcription*. 2019;10(4–5):171–86. <https://doi.org/10.1080/21541264.2019.1695492>.
163. Lasda E, Parker R. Circular RNAs: diversity of form and function. *RNA*. 2014;20(12):1829–42. <https://doi.org/10.1261/rna.047126.114>.
164. Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, Kocks C, Le Noble F, Rajewsky N. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*. 2013;495(7441):333–8. <https://doi.org/10.1038/nature11928>.
165. Li Z, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang X, Zhong G, Yu B, Hu W, Dai L, Zhu P, Chang Z, Wu Q, Zhao Y, Jia Y, Xu P, Liu H, Shan G. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol*. 2015;22(3):256–64. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2959>.
166. Abdelmohsen K, Panda AC, Munk R, Grammatikakis I, Dudekula DB, De S, Kim J, Noh JH, Kim KM, Martindale JL, Gorospe M. Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by CircPABPN1. *RNA Biol*. 2017;14(3):361–9. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1279788>.
167. Chen N, Zhao G, Yan X, Lv Z, Yin H, Zhang S, Song W, Li X, Li L, Du Z, Jia L, Zhou L, Li W, Hoffman AR, Hu JF, Cui J. A novel FLI1 exonic circular RNA promotes metastasis in breast cancer by coordinately regulating TET1 and DNMT1. *Genome Biol*. 2018;19(1):218. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1594-y>.
168. Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, Ebbesen KK, Hansen TB, Kjems J. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nat Rev Genet*. 2019;20(11):675–91. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0158-7>.
169. Salmela L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell*. 2011;146(3):353–8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.014>.
170. Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA cross-talk and competition. *Nature*. 2014;505(7483):344–52. <https://doi.org/10.1038/nature12986>.
171. Wang P, Zeng Z, Shen X, Tian X, Ye Q. Identification of a multi-RNA-type-based signature for recurrence-free survival prediction in patients with uterine corpus endometrial carcinoma. *DNA Cell Biol*. 2020;39(4):615–30. <https://doi.org/10.1089/dna.2019.5148>.
172. Zhang M, Li J, Duan S, Fang Z, Tian J, Yin H, Zhai Q, Wang X, Zhang L. Comprehensive characterization of endometrial competing endogenous RNA network in infertile women of childbearing age. *Aging*. 2020;12(5):4204–21. <https://doi.org/10.18632/aging.102874>.
173. Takamura M, Zhou W, Rombauts L, Dimitriadis E. The long noncoding RNA PTENP1 regulates human endometrial epithelial adhesive capacity in vitro: implications in infertility. *Biol Reprod*. 2020;102(1):53–62. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox173>.
174. He D, Zeng H, Chen J, Xiao L, Zhao Y, Liu N. H19 regulates trophoblastic spheroid adhesion by competitively binding to let-7. *Reproduction*. 2019;157(5):423–30. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0339>.
175. Xu H, Zhou M, Cao Y, Zhang D, Han M, Gao X, Xu B, Zhang A. Genome-wide analysis of long noncoding RNAs, microRNAs, and mRNAs forming a competing endogenous RNA network in repeated implantation failure. *Gene*. 2019;15(720):144056. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144056>.
176. Liu S, Qiu J, Tang X, Cui H, Zhang Q, Yang Q. LncRNA-H19 regulates cell proliferation and invasion of ectopic endometrium by targeting ITGB3 via modulating miR-124-3p. *Exp Cell Res*. 2019;381(2):215–22. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.05.010>.
177. Zeng H, Fan X, Liu N. Expression of H19 imprinted gene in patients with repeated implantation failure during the window of implantation. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;296(4):835–9. <https://doi.org/10.1007/s00404-017-4482-x>.
178. Feng C, Shen JM, Lv PP, Jin M, Wang LQ, Rao JP, Feng L. Construction of implantation failure related lncRNA-mRNA network and identification of lncRNA biomarkers for predicting endometrial receptivity. *Int J Biol Sci*. 2018;14(10):1361–77. <https://doi.org/10.7150/ijbs.25081>.
179. Hull ML, Nisenblat V. Tissue and circulating microRNA influence reproductive function in endometrial disease. *Reprod Biomed Online*. 2013;27(5):515–29. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.07.012>.
180. Ariel I, Weinstein D, Voutilainen R, Schneider T, Lustig-Yariv O, de Groot N, Hochberg A. Genomic imprinting and the endometrial cycle. The expression of the imprinted gene H19 in the human female reproductive organs. *Diagn Mol Pathol*. 1997;6(1):17–25. <https://doi.org/10.1097/00019606-199702000-00004>.

181. Tanos V, Ariel I, Prus D, De-Groot N, Hochberg A. H19 and IGF2 gene expression in human normal, hyperplastic, and malignant endometrium. *Int J Gynecol Cancer*. 2004;14(3):521–5. <https://doi.org/10.1111/j.1048-891x.2004.01431.x>.
182. Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature*. 2000;405(6785):482–5. <https://doi.org/10.1038/35013100>.
183. Ganef C, Chatel G, Munaut C, Franckne F, Foidart JM, Winkler R. The IGF system in in-vitro human decidualization. *Mol Hum Reprod*. 2009;15(1):27–38. <https://doi.org/10.1093/molehr/gan073>.
184. Zhao L, Li Z, Chen W, Zhai W, Pan J, Pang H, Li X. H19 promotes endometrial cancer progression by modulating epithelial-mesenchymal transition. *Oncol Lett*. 2017;13(1):363–9. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5389>.
185. Zhu H, Jin YM, Lyu XM, Fan LM, Wu F. Long noncoding RNA H19 regulates HIF-1 α /AXL signaling through inhibiting miR-20b-5p in endometrial cancer. *Cell Cycle*. 2019;18(19):2454–64. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019>.
186. Liu S, Qiu J, Tang X, Cui H, Zhang Q, Yang Q. LncRNA-H19 regulates cell proliferation and invasion of ectopic endometrium by targeting ITGB3 via modulating miR-124-3p. *Exp Cell Res*. 2019;381(2):215–22. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.05.010>.
187. Chen MY, Liao GD, Zhou B, Kang LN, He YM, Li SW. Genome-wide profiling of long noncoding RNA expression patterns in women with repeated implantation failure by RNA sequencing. *Reprod Sci*. 2019;26(1):18–25. <https://doi.org/10.1177/1933719118756752>.
188. Fan LJ, Han HJ, Guan J, Zhang XW, Cui QH, Shen H, Shi C. Aberrantly expressed long noncoding RNAs in recurrent implantation failure: a microarray related study. *Syst Biol Reprod Med*. 2017;63(4):269–78. <https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1310329>.
189. Jia Y, Cai R, Yu T, Zhang R, Liu S, Guo X, Shang C, Wang A, Jin Y, Lin P. Progesterone-induced RNA Hand2os1 regulates decidualization in mice uteri. *Reproduction*. 2020;159(3):303–14. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0401>.
190. Lv H, Tong J, Yang J, Lv S, Li WP, Zhang C, Chen ZJ. Dysregulated pseudogene HK2P1 may contribute to preeclampsia as a competing endogenous RNA for hexokinase 2 by impairing decidualization. *Hypertension*. 2018;71(4):648–58. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSI.0NAHA.117.10084>.
191. Liang XH, Deng WB, Liu YF, Liang YX, Fan ZM, Gu XW, Liu JL, Sha AG, Diao HL, Yang ZM. Non-coding RNA LINC00473 mediates decidualization of human endometrial stromal cells in response to cAMP signaling. *Sci Rep*. 2016;7(6):22744. <https://doi.org/10.1038/srep22744>.
192. Li D, Jiang W, Jiang Y, Wang S, Fang J, Zhu L, Zhu Y, Yan G, Sun H, Chen L, Zhang N. Preliminary functional inquiry of lncRNA ENST00000433673 in embryo implantation using bioinformatics analysis. *Syst Biol Reprod Med*. 2010;65(2):164–73. <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1563844>.
193. Li L, Wang P, Liu S, Bai X, Zou B, Li Y. Transcriptome sequencing of endometrium revealed alterations in mRNAs and lncRNAs after ovarian stimulation. *J Assist Reprod Genet*. 2020;37(1):21–32. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01616-5>.
194. Kresowik JD, Devor EJ, Van Voorhis BJ, Leslie KK. MicroRNA-31 is significantly elevated in both human endometrium and serum during the window of implantation: a potential biomarker for optimum receptivity. *Biol Reprod*. 2014;91(1):17. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.116590>.
195. Rekker K, Saare M, Roost AM, Salumets A, Peters M. Circulating microRNA profile throughout the menstrual cycle. *PLoS ONE*. 2013;8(11):e81166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081166>.
196. Zhao Y, Zacur H, Cheadle C, Ning N, Fan J, Vlahos NF. Effect of luteal-phase support on endometrial microRNA expression following controlled ovarian stimulation. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012;6(10):72. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-72>.
197. Reed BG, Babayev SN, Chen LX, Carr BR, Word RA, Jimenez PT. Estrogen-regulated miRNA-27b is altered by bisphenol A in human endometrial stromal cells. *Reproduction*. 2018;156(6):559–67. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0041>.
198. Yang P, Wu Z, Ma C, Pan N, Wang Y, Yan L. Endometrial miR-543 is downregulated during the implantation window in women with endometriosis-related infertility. *Reprod Sci*. 2019;26(7):900–8. <https://doi.org/10.1177/1933719118799199>.
199. Qian K, Hu L, Chen H, Li H, Liu N, Li Y, Ai J, Zhu G, Tang Z, Zhang H. Hsa-miR-222 is involved in differentiation of endometrial stromal cells in vitro. *Endocrinology*. 2009;150(10):4734–43. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1629>.
200. Griffiths M, Van Sinderen M, Rainczuk K, Dimitriadis E. miR-29c overexpression and COL4A1 downregulation in infertile human endometrium reduces endometrial epithelial cell adhesive capacity in vitro implying roles in receptivity. *Sci Rep*. 2019;9(1):8644. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45155-6>.
201. Loke H, Rainczuk K, Dimitriadis E. MicroRNA biogenesis machinery is dysregulated in the endometrium of infertile women suggesting a role in receptivity and infertility. *J Histochem Cytochem*. 2019;67(8):589–99. <https://doi.org/10.1369/0022155419854064>.
202. Petracco R, Grechukhina O, Popkhadze S, Massasa E, Zhou Y, Taylor HS. MicroRNA 135 regulates HOXA10 expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(12):E1925–33. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1231>.
203. Grasso A, Navarro R, Balaguer N, Moreno I, Alama P, Jimenez J, Simón C, Vilella F. Endometrial liquid biopsy provides a miRNA roadmap of the secretory phase of the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(3):dgz146. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz146>.
204. Winship A, Ton A, Van Sinderen M, Menkhorst E, Rainczuk K, Griffiths M, Cuman C, Dimitriadis E. Mouse double minute homologue 2 (MDM2) downregulation by miR-661 impairs human endometrial epithelial cell adhesive capacity. *Reprod Fertil Dev*. 2018;30(3):477–86. <https://doi.org/10.1071/RD17095>.
205. Cuman C, Van Sinderen M, Gantier MP, Rainczuk K, Sorby K, Rombauts L, Osianlis T, Dimitriadis E. Human blastocyst secreted microRNA regulate endometrial epithelial cell adhesion. *EBioMedicine*. 2015;2(10):1528–35. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.09.003>.
206. Lv Y, Gao S, Zhang Y, Wang L, Chen X, Wang Y. miRNA and target gene expression in menstrual endometria and early pregnancy decidua. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2015;197:27–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2015.11.003>.
207. Altmäe S, Koel M, Võsa U, Adler P, Suhorutšenko M, Laisk-Podar T, Kukushkina V, Saare M, Velthut-Meikas A, Krjutškov K, Aghajanova L, Lalitkumar PG, Gemzell-Danielsson K, Giudice L, Simón C, Salumets A. Meta-signature of human endometrial receptivity: a meta-analysis and validation study of transcriptomic biomarkers. *Sci Rep*. 2017;7(1):10077. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10098-3>.
208. Liu W, Niu Z, Li Q, Pang RT, Chiu PC, Yeung WS. MicroRNA and Embryo Implantation. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(3):263–71. <https://doi.org/10.1111/aji.12470>.
209. Xu X, Li Z, Liu J, Yu S, Wei Z. MicroRNA expression profiling in endometriosis-associated infertility and its relationship with endometrial receptivity evaluated by ultrasound. *J Xray Sci Technol*. 2017;25(3):523–32. <https://doi.org/10.3233/XST-17286>.
210. Ma HL, Gong F, Tang Y, Li X, Li X, Yang X, Lu G. Inhibition of endometrial Tiam1/Rac1 signals induced by miR-22 up-regulation leads to the failure of embryo implantation during the implantation window in pregnant mice. *Biol Reprod*. 2015;92(6):152. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.128603>.
211. Huang Z, Yu H, Du G, Han L, Huang X, Wu D, Han X, Xia Y, Wang X, Lu C. Enhancer RNA Inc-CES1-1 inhibits decidual cell migration by interacting with RNA-binding protein FUS and activating PPAR γ in URPL. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2021;18(24):104–12. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.02.018>.
212. Tong Z, Liu Y, Yu X, Martinez JD, Xu J. The transcriptional co-activator NCOA6 promotes estrogen-induced GREB1 transcription by recruiting ER α and enhancing enhancer-promoter interactions. *J Biol Chem*. 2019;294(51):19667–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010704>.
213. Fung JN, Holdsworth-Carson SJ, Sapkota Y, Zhao ZZ, Jones L, Girling JE, Paiva P, Healey M, Nyholt DR, Rogers PA, Montgomery GW. Functional evaluation of genetic variants associated with endometriosis near GREB1. *Hum Reprod*. 2015;30(5):1263–75. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev051>.
214. Chen BJ, Byrne FL, Takenaka K, Modesitt SC, Olzomer EM, Mills JD, Farrell R, Hoehn KL, Janitz M. Analysis of the circular RNA transcriptome in

- endometrial cancer. *Oncotarget*. 2017;9(5):5786–96. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23534>.
215. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*. 2011;12(12):861–74. <https://doi.org/10.1038/nrg3074>.
216. Gomez-Verjan JC, Vazquez-Martinez ER, Rivero-Segura NA, Medina-Campos RH. The RNA world of human ageing. *Hum Genet*. 2018;137(11–12):865–79. <https://doi.org/10.1007/s00439-018-1955-3>.
217. Ferlita A, Battaglia R, Andronico F, Caruso S, Cianci A, Purrello M, Pietro CD. Non-coding RNAs in endometrial physiopathology. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):2120. <https://doi.org/10.3390/ijms19072120>.
218. Martínez-Ibarra A, Martínez-Razo LD, Vázquez-Martínez ER, Martínez-Cruz N, Flores-Ramírez R, García-Gómez E, López-López M, Ortega-González C, Camacho-Arroyo I, Cerbón M. Unhealthy levels of phthalates and bisphenol A in Mexican pregnant women with gestational diabetes and its association to altered expression of mirnas involved with metabolic disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13):3343. <https://doi.org/10.3390/ijms20133343>.
219. Monroy-Jaramillo N, Vázquez-Martínez ER. Epigenetics and ageing. *Clinical genetics and genomics of aging*. Cham: Springer; 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-40955-5_8.
220. Liu H, Wan J, Chu J. Long non-coding RNAs and endometrial cancer. *Biomed Pharmacother*. 2019;119:109396. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109396>.
221. Panir K, Schjenken JE, Robertson SA, Hull ML. Non-coding RNAs in endometriosis: a narrative review. *Hum Reprod Update*. 2018;24(4):497–515. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy014>.
222. Marí-Alexandre J, Sánchez-Izquierdo D, Gilabert-Estellés J, Barceló-Molina M, Braza-Boils A, Sandoval J. miRNAs regulation and its role as biomarkers in endometriosis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1):93. <https://doi.org/10.3390/ijms17010093>.
223. Anfossi S, Babayan A, Pantel K, Calin GA. Clinical utility of circulating non-coding RNAs: an update. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(9):541–63. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0035-x>.
224. Wang J, Li Z, Wang X, Ding Y, Li N. The tumor suppressive effect of long non-coding RNA FRMD6-AS2 in uteri corpus endometrial carcinoma. *Life Sci*. 2020;243:117254. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117254>.
225. Szalaj P, Plewczynski D. Three-dimensional organization and dynamics of the genome. *Cell Biol Toxicol*. 2018;34(5):381–404. <https://doi.org/10.1007/s10565-018-9428-y>.
226. van Steensel B, Furlong EEM. The role of transcription in shaping the spatial organization of the genome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(6):327–37. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0114-6>.
227. Kempfer R, Pombo A. Methods for mapping 3D chromosome architecture. *Nat Rev Genet*. 2020;21(4):207–26. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0195-2>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

