



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PAPEL DEL ESTRADIOL, MEDROXIPROGESTERONA Y AMPC EN LA REGULACIÓN DE
LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA DECIDUALIZACIÓN EN UN MODELO DE
CÉLULAS ESTROMALES ENDOMETRIALES INMORTALIZADAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

YESENIA CID CRUZ



CDMX

2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** JORGE MANUEL VAZQUEZ RAMOS

VOCAL: **Profesor:** JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

SECRETARIO: **Profesor:** EDGAR RICARDO VAZQUEZ MARTINEZ

1er. SUPLENTE: **Profesor:** EUCLIDES AVILA CHAVEZ

2° SUPLENTE: **Profesor:** TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Unidad de Investigación en Reproducción Humana (UIRH), Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” (INPer) – Facultad de Química (UNAM).

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez

SUPERVISOR TÉCNICO:

SUSTENTANTE:

Yesenia Cid Cruz

Agradecimientos

Agradezco el apoyo otorgado por el Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” de la Facultad de Química de la UNAM; también agradezco al CONAHCyT por la beca otorgada a través del proyecto “Impacto de la organización tridimensional del genoma en la patogénesis de la endometriosis” con clave de registro A1-S-26749.

El presente trabajo forma parte del proyecto “Impacto de la organización tridimensional del genoma en la patogénesis de la endometriosis” con número de registro (571) 3000-20109-01-571-17 el cual fue aprobado por los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del Instituto Nacional de Perinatología y apoyado por dicha Institución. Agradecemos al apoyo del “FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN PARA LA EDUCACIÓN” de CONAHCyT por el financiamiento otorgado a dicho proyecto con clave A1-S-26749. Además, agradecemos a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM por el apoyo brindado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-PAPIIT; número de subvención IA209520).

Índice

Índice de figuras.....	i
Índice de tablas.....	i
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1. Aparato reproductor femenino.....	2
2.2. Endometrio.....	3
2.3. Ciclo menstrual.....	4
2.3.1. Papel de las hormonas esteroideas en el útero.....	7
2.4. Decidualización.....	7
2.4.1. Modelos de decidualización <i>in vitro</i>.....	9
2.4.2. Regulación transcripcional durante la decidualización.....	11
2.5. Estrógenos.....	12
2.6. Progesterona.....	15
2.7. AMPc en la decidualización.....	18
2.8. Antagonistas de hormonas esteroideas.....	18
2.8.1. Antagonistas de los receptores de estrógenos.....	19
2.8.2. Antagonista del PR.....	20
2.9. Inhibidor de PKA.....	21
3. Planteamiento del problema.....	21
4. Hipótesis.....	22
5. Objetivos.....	22
5.1. Objetivo general.....	22
5.2. Objetivos particulares:.....	22
6. Metodología.....	23
7. Resultados.....	25
7.1. Cultivos celulares de células del estroma endometrial humano (HESC).....	25
7.2. Expresión de los marcadores de la decidualización.....	26
7.3. Expresión de genes relacionados con la decidualización.....	26
7.4. Efecto de antagonistas de receptores hormonales en la expresión de genes marcadores de la decidualización.....	27
7.5. Efecto de antagonistas de receptores hormonales en la expresión de genes relacionados con la decidualización.....	29
7.6. Expresión de genes relacionados con la decidualización en presencia de H-89, un inhibidor de PKA.....	32
8. Discusión.....	34

8.1. Tratamiento para inducir la decidualización	35
8.2. Regulación de los genes marcadores de la decidualización	36
8.3. Genes relacionados con la decidualización en presencia de antagonistas de receptores hormonales.....	37
8.4. FOXO1 y DKK1	38
8.5. El AMPc es clave para la decidualización.....	40
9. Conclusiones	41
10. Perspectivas	41
11. Referencias.....	42

Índice de figuras

Figura 1. Aparato reproductor femenino.....	2
Figura 2. Representación del endometrio a lo largo del ciclo menstrual.....	3
Figura 3. Efecto de los cambios hormonales durante el ciclo menstrual y ovárico en el endometrio.....	6
Figura 4. Comparación morfológica entre HESC y HDESC.....	8
Figura 5. Representación de la decidualización de HESC <i>in vitro</i>.....	10
Figura 6. Vías de señalización de los estrógenos a través de sus receptores.....	14
Figura 7. Dominios estructurales y modificaciones postraduccionales de los receptores de progesterona: PR-A y PR-B.....	15
Figura 8. Mecanismo de acción de P4 a través de sus receptores.....	17
Figura 9. Decidualización <i>in vitro</i> de T-HESC.....	26
Figura 10. Efecto del tratamiento de decidualización a las 24 h en genes marcadores de este proceso en la línea celular T-HESC.....	26
Figura 11. Efecto del tratamiento de decidualización a las 24 h en genes relacionados con la decidualización en la línea celular T-HESC.....	27
Figura 12. Efecto de antagonistas de receptores hormonales en la expresión de <i>IGFBP-1</i> y <i>PRL</i> en la línea celular T-HESC.....	28
Figura 13. Efecto de antagonistas de receptores hormonales en la expresión de <i>PR-B</i> y de <i>PR-AB</i> en la línea celular T-HESC.....	30
Figura 14. Efecto de antagonistas de receptores hormonales en la expresión de <i>FOXO1</i> y de <i>DKK1</i> en la línea celular T-HESC.....	31
Figura 15. Efecto del inhibidor H-89 del PKA en la expresión de genes relacionados con la decidualización en la línea celular T-HESC.....	33

Índice de tablas

Tabla 1. Secuencias de oligos utilizadas para los experimentos de RT-qPCR.....	2
---	----------

1. Resumen

La decidualización de las células del estroma endometrial (HESC, por sus siglas en inglés) es un proceso imprescindible para la implantación del embrión en el embarazo. Este proceso se caracteriza por una serie de cambios drásticos en la función celular y en su transcriptoma en respuesta a esteroides ováricos: 17β -estradiol (E2) y progesterona (P4), y segundos mensajeros como adenosín monofosfato cíclico (AMPC). Diferentes grupos de investigación han propuesto a alguno de estos compuestos (o en su combinación) como principal inductor de la decidualización; no obstante, el mecanismo por el cual cada una de estas moléculas actúa en dicho proceso no está completamente dilucidado.

El método más empleado para abordar el estudio de este proceso es mediante ensayos *in vitro* donde se someten cultivos celulares primarios o de líneas celulares, como la T-HESC, a tratamientos con medroxiprogesterona (una progestina), E2 y 8-bromo adenosín monofosfato cíclico (8-bromo-AMPC); posteriormente se evalúa la expresión de genes marcadores como *IGFBP1* (gen que codifica para la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1) y *PRL* (gen que codifica para la prolactina) como referencia del efecto de alguno de estos (u otros) compuestos en la decidualización. En el presente estudio se siguió esta metodología sumando el análisis de cuatro genes más relacionados con la decidualización: *PR-B*, *PR-AB* (genes que codifican para los receptores de progesterona), *FOXO1* y *DKK1* (genes expresados a la alta durante el proceso de decidualización), esto con el fin de tener un panorama más amplio respecto al comportamiento de la regulación transcripcional durante la decidualización; además, se añadió al tratamiento antagonistas a receptores de progesterona y estrógenos (RU486, MPP, PHTPP y ICI 182,780) y un inhibidor de PKA — una de las vías de señalización del AMPC— (H-89). El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de estos compuestos en la expresión de los genes relacionados con la decidualización y, de esta manera, relacionar el comportamiento de los compuestos inductores de este proceso fisiológico (E2, P4 y AMPC).

En este trabajo se demostró que el tratamiento convencional de inducción de la decidualización *in vitro* (MPA, E2 y AMPC) aumentaba la expresión de todos los genes analizados a las 24 h iniciado el tratamiento, después se añadieron los antagonistas e inhibidor obteniéndose resultados contrastables con lo reportado en la literatura. Se encontró que el inhibidor H-89 disminuyó notoriamente la expresión de todos los genes analizados con respecto al aumento que ocasionaba el tratamiento convencional de decidualización y que,

de los antagonistas a receptores hormonales, el que tuvo un mayor efecto fue RU486, un antagonista de PR. Con base en estos resultados se puede concluir que la decidualización *in vitro* es un proceso regulado principalmente por P4 y por la vía AMPc/PKA.

2. Introducción

2.1. Aparato reproductor femenino

El aparato reproductor femenino es un conjunto de órganos constituido por genitales internos y externos. Los internos, situados en la pelvis menor, corresponden a: los ovarios, que producen ovocitos; las trompas uterinas, encargadas del transporte de gametos; el útero, donde se desarrolla el óvulo fecundado; y la vagina (García-Porrero, 2020).

Los genitales externos en conjunto constituyen a la vulva que, a su vez, está conformada por los labios mayores e inferiores, el monte del pubis, los vestíbulos de la vagina, los bulbos del vestíbulo vaginal, las glándulas vulvovaginales y el clítoris (García-Porrero, 2020).

Dentro de los órganos internos se encuentra el útero, un órgano muscular hueco cuya función es permitir la implantación y desarrollo del cigoto, así como la expulsión del feto al término del embarazo (ya que se considera el elemento motor del parto). Ubicado en el centro de la cavidad pélvica, presenta una forma semejante a un cono truncado y es de tamaño variable (Figura 1) (García-Porrero, 2020). Está constituido por tres capas: 1) el perimetrio, la capa exterior delgada compuesta de células epiteliales; 2) el miometrio, la capa muscular compuesta por células musculares lisas y 3) el endometrio, la capa de revestimiento interno que se subdivide en una capa funcional y otra basal (Makieva *et al.*, 2018).

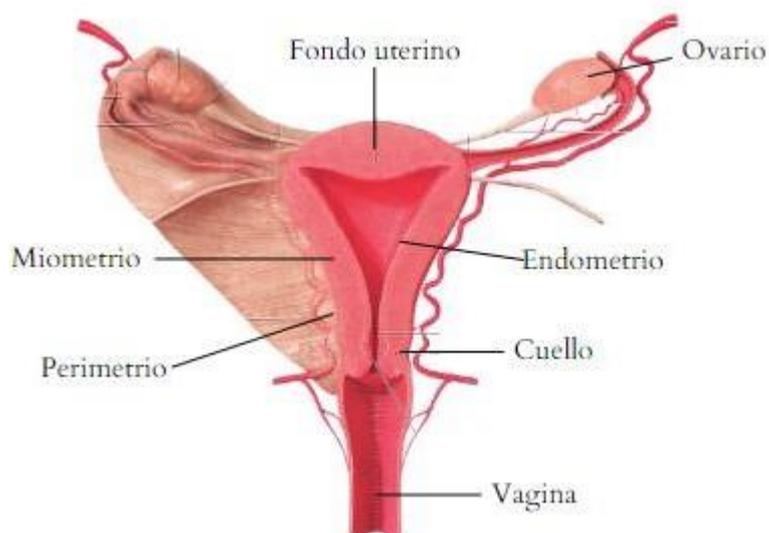


Figura 1. Aparato reproductor femenino. Esquema representativo de algunos de los órganos del aparato reproductor femenino. Se señalan las capas que forman al útero (Tomada y modificada de García-Porrero, 2020).

El óvulo fertilizado pasa a través de las trompas uterinas y se implanta en el útero, específicamente en la capa endometrial, ahí recibe nutrientes de los vasos sanguíneos previamente desarrollados para este propósito. Conforme el embrión crece y madura, el útero se expande para acomodar al ahora feto hasta el trabajo de parto, es en ese momento cuando el útero se contrae a medida que se dilata el cuello uterino dando como resultado el nacimiento del feto (Makieva *et al.*, 2018).

2.2. Endometrio

Como ya se mencionó, el endometrio forma parte del útero y es considerado como una capa mucosa cuyos componentes celulares experimentan un ciclo de proliferación, diferenciación, eliminación y regeneración hasta 400 veces en la vida de una mujer sana (Makieva *et al.*, 2018). El endometrio está estratificado en dos capas:

- Capa funcional: esta capa se encuentra adyacente a la cavidad uterina, se considera transitoria debido a que se desprende y se regenera a lo largo del ciclo menstrual (Figura 2); consta de un epitelio luminal, estroma y glándulas superficiales. Esta capa determina el grosor del endometrio ya que cambia su morfología bajo los efectos de las hormonas sexuales (Makieva *et al.*, 2018).
- Capa basal: esta capa se encuentra adyacente al miometrio y permanece presente a lo largo del ciclo menstrual, ya que no se desprende ni se regenera como sucede con la capa funcional (Evans *et al.*, 2016).

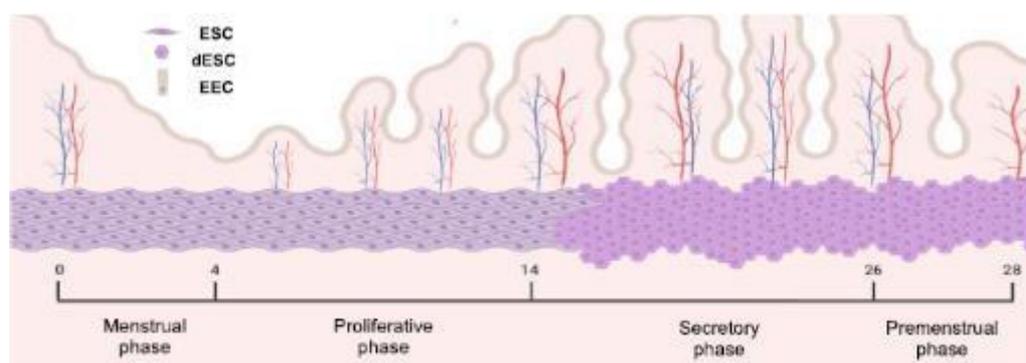


Figura 2. Representación del endometrio a lo largo del ciclo menstrual. Esquema representativo de los cambios morfológicos que presenta el endometrio a lo largo del ciclo menstrual. ESC: células estromales endometriales, dESC: células estromales endometriales decidualizadas, EEC: células epiteliales endometriales. (Tomada y modificada de Retis-Resendiz *et al.*, 2021).

El endometrio es un tejido muy dinámico compuesto principalmente por células epiteliales, estromales, endoteliales y del sistema inmune. Sus componentes celulares experimentan una proliferación y diferenciación cíclica regulada por hormonas esteroideas ováricas conocidas como estradiol (E2) y progesterona de origen ovárico (P4); particularmente, las células que constituyen al estroma, es decir, las células del estroma endometrial (ESC) experimentan un proceso cíclico denominado decidualización, el cual está íntimamente relacionado con estos estímulos hormonales (Suthaporn *et al.*, 2021).

El E2 y la P4 se unen a sus receptores (ER y PR, respectivamente) cuya actividad está altamente regulada por modificaciones postraduccionales e interacciones con corre reguladores de células y tejidos. Específicamente, la unión de ER y PR con su respectiva hormona conduce a su translocación nuclear, formando a su vez complejos con elementos de respuesta nuclear, ocasionando la remodelación de la cromatina mediante el reclutamiento de co-reguladores y la alteración de la maquinaria transcripcional (Houshdaran *et al.*, 2020). En el endometrio, los niveles de E2 y P4, al igual que otras moléculas, impulsan la funcionalidad fisiológicamente típica del tejido y pueden regular la transcripción y la función celular. Alteraciones en dichas hormonas y/o sus receptores da como resultado una alteración tisular (Kim *et al.*, 2017), que puede llevar a hiperplasia, cáncer endometrial, infertilidad basada en el endometrio, endometriosis y complicaciones en el embarazo (Houshdaran *et al.*, 2020).

2.3. Ciclo menstrual

El término menstruación es utilizado para indicar el desprendimiento periódico del estrato funcional del endometrio; debido a que, en los humanos, los simios y en primates no humanos se repite este proceso en intervalos de tiempo de aproximadamente un mes, se le denomina ciclo menstrual (*menstru*, mensual) (Fox, 2011). Este ciclo se encuentra regulado por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HPO) y por las hormonas esteroideas de origen ovárico: E2 y P4 (Fox, 2011).

Las fases del ciclo menstrual se establecen con base en fenómenos que ocurren durante el ciclo ovárico, como la fase folicular (día 0 al día 13), la ovulación (día 14) y la fase lútea (día 15 al día 28). Considerando los sucesos ocurridos en el ciclo endometrial, estas fases se denominan: menstruación (día 0 al día 5), fase proliferativa (día 6 al día 13) y fase secretora (día 15 al día 28) (Makieva *et al.*, 2018).

Al final de la menstruación y hasta el final de la fase folicular (día 6 al día 13 del ciclo), la rápida construcción de la capa funcional del endometrio se rige por la proliferación de células endometriales que crecen bajo la influencia estrogénica (Zhu *et al.*, 2014). Durante esta fase de altos niveles de E2, el tejido repara el daño ocasionado por la menstruación, se presenta la supresión de la inmunidad innata y la proliferación celular consecuencia de estímulos por parte de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante α (TGF- α), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Makieva *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2014).

Después de la ovulación y durante la fase secretora (del día 14 al día 28), las hormonas hipofisarias, el E2 y la P4 ovárica conducen a una diferenciación del endometrio: se engrosa, se vasculariza y adquiere un aspecto esponjoso (Figura 2) (Bhurke *et al.*, 2016; Fox 2011). En este punto, el endometrio decidualizado se encuentra listo para proporcionar el ambiente óptimo para la implantación del blastocisto (día 20 al día 25) y el crecimiento temprano del embrión (Ashary *et al.*, 2018). Durante este período, una serie de cascadas de señalización provenientes tanto del blastocisto (en caso de haber fecundación) como del endometrio cooperan para facilitar la aposición, unión e invasión del blastocisto (Kim *et al.*, 2017).

Cuando no ocurre la implantación, el cuerpo lúteo se degenera, es decir, experimenta una regresión consecuencia de la acción de luteolisinas secretadas por el útero (como la prostaglandina F2 α en un proceso denominado "luteólisis" o regresión lútea); al degradarse el cuerpo lúteo se detiene la liberación de P4 (Figura 3) (Fox, 2011). En respuesta al decaimiento de P4, las arterias que suministraban sangre a la capa funcional del endometrio se contraen produciendo isquemia y muerte en las células que conforman esa capa. Esto conduce a un rompimiento de la capa funcional y posterior desprendimiento que inicia la fase de menstruación (día 28 al día 5), la cual se caracteriza por la activación de vías de destrucción y daño tisular, vasoconstricción, isquemia y gran abundancia de radicales libres y células inmunitarias (Maybin *et al.*, 2015; Berbic *et al.*, 2013).

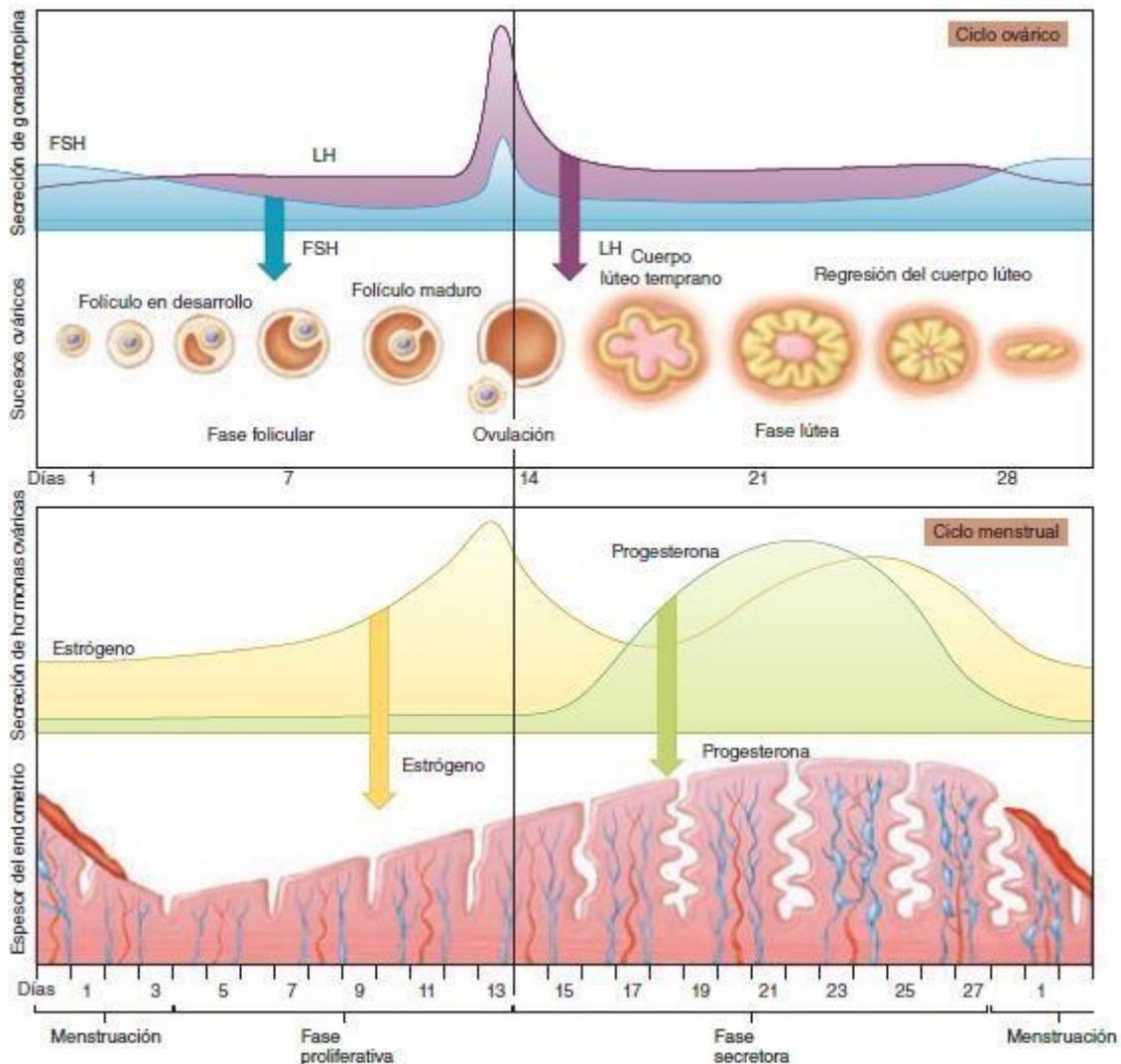


Figura 3. Efecto de los cambios hormonales durante el ciclo menstrual y ovárico en el endometrio. Efecto de las hormonas hipofisarias (FSH, LH) y esteroideas ováricas (E2 y P4) en el endometrio durante el ciclo ovárico y menstrual en función del tiempo (días); en la parte superior se ilustra al ciclo ovárico y en la inferior al ciclo menstrual, las flechas hacia abajo indican el efecto de las hormonas: azul, FSH (hormona estimuladora de foliculo); morado, LH (hormona luteinizante); amarillo, estrógeno y verde, progesterona. (Tomada de Fox, 2011).

En los últimos días de la menstruación, se da una cooperación entre la descomposición y reparación simultáneas para lograr que el endometrio regenere una nueva capa funcional. Este proceso implica una serie de mecanismos de reparación, incluida la transformación celular y la migración para repoblar al epitelio endometrial (Gargett *et al.*, 2012; Greenhill, 2018).

2.3.1. Papel de las hormonas esteroideas en el útero

Como ya se mencionó, las hormonas esteroideas de origen ovárico P4 y E2 interactúan de manera estrecha con el eje HPO para regular el ciclo menstrual y endometrial en el útero; estas hormonas actúan a través de sus receptores intracelulares (PR y ER, respectivamente): al ser de naturaleza esteroidea, estas hormonas pueden difundir a través de la membrana lipofílica, una vez que entran en la célula, las hormonas se unen a su respectivo receptor en el citoplasma, estos se translocan al núcleo para unirse a elementos de respuesta en el genoma, lo que conduce a una remodelación de la cromatina mediante el reclutamiento de co-reguladores (Vicent *et al.*, 2011), y por lo tanto, una alteración de la maquinaria transcripcional en el endometrio (Houshdaran *et al.*, 2020) que se traduce en la alteración de la expresión de diversos genes.

2.4. Decidualización

El término decidua proviene del latín “decidirre”, que significa morir, caerse o desprenderse (Gellersen y Brosens, 2014). La decidualización es el proceso mediante el cual la P4 induce la diferenciación de las células del estroma endometrial (HESC) en células deciduales (HDESC) para formar un nuevo tejido denominado decidua. La decidua proporciona una fuente de factores de crecimiento y citocinas que regulan la invasión y desarrollo embrionario, modulan las respuestas inmunitarias y apoyan la angiogénesis (Makieva *et al.*, 2018).

Este proceso se lleva a cabo principalmente en respuesta a hormonas pituitarias (FSH, LH) y a esteroides ováricos, particularmente, el estradiol-17 β (E2) y la progesterona que desencadenan vías de señalización de segundos mensajeros como el AMPc (Kakita-Kobayashi *et al.*, 2020). La decidualización se caracteriza por una serie de cambios transcripcionales, metabólicos, morfológicos, bioquímicos, vasculares e inmunológicos ocurridos en el estroma endometrial (Ticconi *et al.*, 2021). Las HESC se diferencian de células mesenquimales alargadas similares a fibroblastos en células redondas con morfología epitelial durante este proceso que, al ser dependiente de progesterona, se puede inducir artificialmente mediante un suplemento de esta. Anormalidades durante la decidualización son asociadas con infertilidad, abortos espontáneos y desórdenes uteroplacentarios como la preeclampsia (Suthaporn *et al.*, 2021; Okada *et al.*, 2018).

Es durante la fase secretora que ocurre este proceso y, el endometrio decidualizado, determina el comienzo de la “ventana de implantación”, el único período en el que puede ocurrir el anclaje del blastocisto (Cuadrado-Torroglosa *et al.*, 2023).

Adentrándose detalladamente en los cambios que sufren las HESC durante el proceso de decidualización, en primer lugar tenemos el notable cambio morfológico que presentan (Figura 4): durante la fase proliferativa, las HESC tienen una apariencia similar a la de un fibroblasto con un retículo endoplasmático rugoso y un aparato de Golgi bien desarrollados, poco citoplasma y núcleos alargados y dentados; la transformación decidual se caracteriza por un redondeo del núcleo, un mayor número de nucléolos, dilatación del retículo endoplasmático rugoso y del aparato de Golgi, y acumulación de glucógeno y lípidos en el citoplasma en expansión (Gellersen y Brosens, 2014).

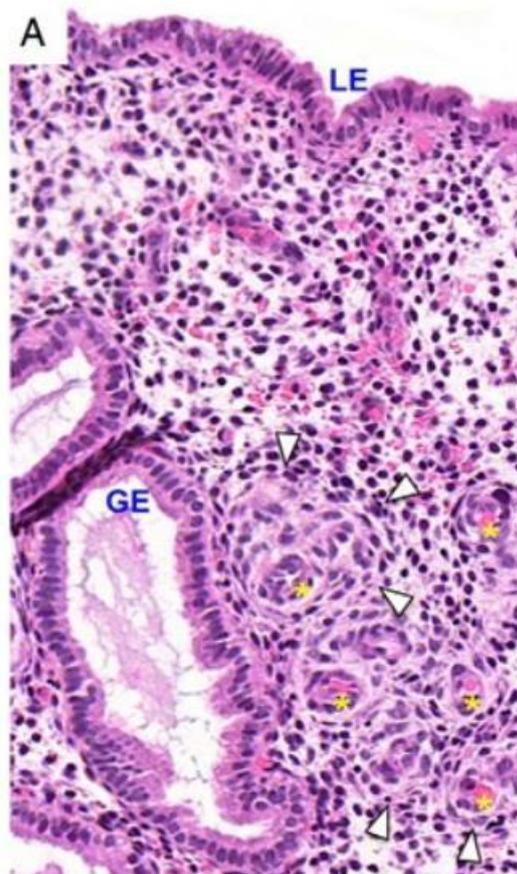


Figura 4. Comparación morfológica entre HESC y HDESC. Comparación entre células HESC y HDESC teñidas con hematoxilina y eosina en un corte histológico de una mujer sana en el día 24 del ciclo menstrual, donde se puede observar la forma redondeada y de mayor citoplasma de las células deciduales (indicadas con asteriscos amarillos y flechas blancas) en comparación con las que poseen una morfología mesenquimal (HESC). HESC: células del estroma endometrial humano, HDESC: células del estroma endometrial humano

decidualizadas, LE: epitelio luminal, GE: epitelio glandular (Tomada de Gellersen y Brosens, 2014).

Además, debe existir una comunicación intracelular estrecha entre las HDESC para el establecimiento de una interfaz fetomaterna funcional; por lo que las HDESC cuentan con altos niveles de proteínas de adhesión como la cadherina-11, un miembro mesenquimatoso de la familia de proteínas del complejo de adhesión de cadherinas (Chen *et al.*, 1999). Otra proteína relevante en la comunicación celular durante la decidualización es la proteína de unión gap conexina 43 (CX43), cuya inhibición o eliminación se asocia con una decidualización defectuosa y pacientes con pérdidas tempranas recurrentes del embarazo (Yu *et al.*, 2011; Nair *et al.*, 2011).

La decidualización se caracteriza además por grandes cambios en la composición de la matriz extracelular (MEC); por ejemplo: el aumento en el colágeno pericelular IV y la laminina. Las HDESC también son positivas para vimentina y desmina, pero negativas para citoqueratina y, por lo tanto, se pueden distinguir fácilmente de las células epiteliales y trofoblásticas, que exhiben un fenotipo inverso (Gellersen y Brosens, 2014).

Hablando del ambiente inmunológico, se produce una amplia interacción entre las células del estroma uterino y las inmunitarias. Las HDESC recién diferenciadas comienzan a secretar citocinas que, entre otras funciones, activan el reclutamiento y la proliferación de leucocitos. De este modo, el entorno inmunológico uterino se compone principalmente de células asesinas naturales uterinas (uNK), macrófagos y células T (Cuadrado-Torroglosa *et al.*, 2023).

2.4.1. Modelos de decidualización *in vitro*

Cultivos primarios de HESC provenientes de biopsias de tejido, al igual que líneas celulares de endometrio inmortalizadas son utilizadas comúnmente para investigar los mecanismos del proceso de decidualización. Durante la decidualización, se induce o inhibe la expresión de varios genes; entre ellos, se observa la inducción de la expresión de los genes que codifican para la prolactina (*PRL*) y la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1 (*IGFBP-1*), convirtiéndolos en excelentes candidatos para evaluar dicho proceso en estudios basados en cultivos celulares (Figura 5) (Kakita-Kobayashi *et al.*, 2020).

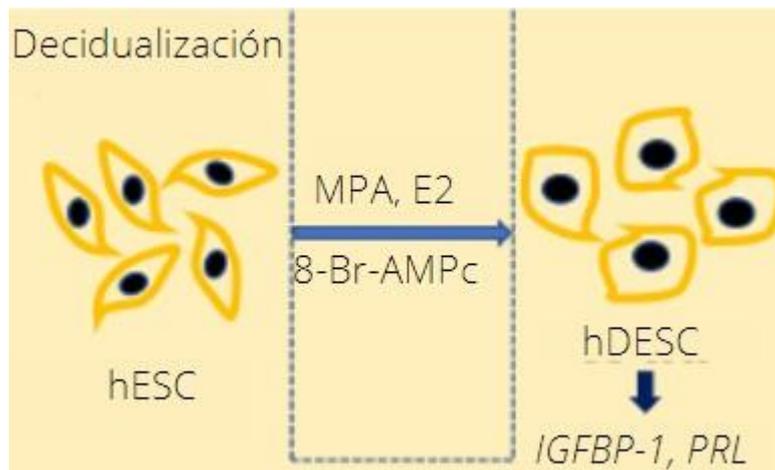


Figura 5. Representación de la decidualización de HESC *in vitro*. Esquematación de los cambios morfológicos de las HESC durante la decidualización *in vitro*. HESC: células del estroma endometrial humano, HDESC: células del estroma endometrial humano decidualizadas, MPA: medroxiprogesterona, E2: estradiol, 8-Br-AMPc (8-bromo adenosín monofosfato cíclico) (Tomada y modificada de Kathun *et al.*, 2021).

La PRL estimula el crecimiento y la invasión del trofoblasto, promueve la angiogénesis, regula la supervivencia de las células NK, previene el rechazo inmunitario y modula el transporte de agua hacia el compartimiento materno (Stefanoska *et al.*, 2013), por lo que es de vital importancia durante el embarazo. La prolactina alcanza su punto máximo entre la semana 18 y 26 del embarazo (Ben-Jonathan *et al.*, 1996). En 1978 se descubrió que la fuente de esta molécula era la decidua, comenzando su producción alrededor del día 22 del ciclo menstrual. En el endometrio de mujeres no embarazadas el receptor de PRL (PRL-R) se expresa mayoritariamente en las células epiteliales de este tejido alcanzando su punto máximo de expresión durante la fase secretora media-tardía (Gellersen y Brosens, 2014).

Otro producto importante de la decidua es la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGFBP-1), anteriormente conocida como proteína placentaria 12 (Rutanen *et al.*, 1985). Los niveles de IGFBP-1 alcanzan su punto máximo alrededor de las 16 semanas de gestación, antes que los niveles de PRL y es producida por las HDESC durante la fase secretora (Gellersen y Brosens, 2014). Esta proteína modula la biodisponibilidad de IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina 1), cuya función se ve modificada por su estado de fosforilación: el IGF-1 ejerce acciones anabólicas agudas sobre el metabolismo de las proteínas y los carbohidratos, también tiene un impacto a largo plazo sobre la proliferación, diferenciación y apoptosis celular; además, es un potente mitógeno para una amplia variedad de células y ejerce su acción mitogénica aumentando la síntesis de ADN (Druckmann y Rohrb, 2002).

Se ha descrito que IGFBP-1 estimula la invasión del trofoblasto (al igual que PRL), además de que alteraciones en el sistema IGF/IGFBP-1 se han asociado con complicaciones en el embarazo como la preeclampsia y la restricción del crecimiento intrauterino (Gellersen y Brosens, 2014).

El modelo *in vitro* ofrece un entorno controlado que permite analizar diversos procesos biológicos de las células sin necesidad de recurrir a modelos animales, como la proliferación, migración, procesos bioquímicos, inmunológicos, la expresión diferencial de genes, entre muchos otros; además, ofrece una consistencia y reproducibilidad en los resultados (Suthaporn *et al.*, 2021). No obstante, no se puede dejar de lado que posee desventajas como el aislamiento de las células de sus demás interacciones, lo que en muchas ocasiones disminuye la extrapolación de los resultados a lo que ocurre en un organismo vivo completo. A pesar de que existen diversos estudios basados en modelos *in vitro* sobre la decidualización y que se conoce el mecanismo de acción de los inductores (MPA, E2 y AMPc), la manera en que cada uno de estos actúa en este proceso sigue sin ser completamente clara, por lo que diferentes grupos de investigación han propuesto a alguno de estos inductores como el principal modulador de la decidualización (Gellersen y Brosens, 2014; Kusama *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2021; Suthaporn *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2021; Houshdaran *et al.*, 2020).

2.4.2. Regulación transcripcional durante la decidualización

Así como los grupos de investigación centrados en estudiar a la decidualización difieren sobre el principal inductor de esta, también se han reportado diferentes genes (además de los genes marcadores) cuya expresión se altera durante el proceso. Entre esta lista de genes, destacan los que su expresión se ve notablemente inducida como los genes que codifican para la proteína forkhead O1 (*FOXO1*) y la proteína 1 relacionada con Dickkopf (*DKK1*) (Wang *et al.*, 2020). Estas proteínas son secretadas por las DECS durante la fase secretora tardía, pero también se expresan en células epiteliales endometriales, mayoritariamente durante la fase proliferativa (Gellersen y Brosens, 2014).

La proteína O1 de caja forkhead (*FOXO1*) es un factor de transcripción importante que promueve la expresión de marcadores de decidualización en las ESC (Takano *et al.*, 2007). Se ha reportado que su expresión es inducida a través de la vía AMPc/PKA y que puede interactuar con el PR para una posible sensibilización del receptor en el endometrio (Kajihara *et al.*, 2013), por lo que es lógico que el gen que codifica para la proteína (*FOXO1*)

se encuentre sobre-expresado durante el proceso de decidualización, como se observa en el estudio de Wang *et al.*, 2020. Además, también se ha reportado que la eliminación de PGRMC1 (componente 1 del receptor membranal de progesterona) induce la expresión de *FOXO1* en cultivos de ESC y promueve la expresión de marcadores de la decidualización (Tsuru *et al.*, 2023), por lo que se podría intuir que la expresión de este gen está regulada tanto por AMPc como por P4.

La proteína 1 relacionada con Dickkopf (*DKK1*) es considerada un inhibidor de la vía de señalización WNT, la cual es una familia de moléculas que desempeñan funciones fundamentales en la proliferación, diferenciación y polaridad celular, la comunicación epitelial-mesenquimatosa y la embriogénesis (Tulac *et al.*, 2006). Entre los estudios que mencionan a estos genes como posibles indicadores de la decidualización destaca el de Tulac y colaboradores, el cual no solo propone a *DKK1* como un marcador de la decidualización, sino que también reporta que la expresión de este gen está principalmente influenciada por P4, algo novedoso ya que en otros estudios se indica que *DKK1* está regulado a la baja por la señalización del ER en el endometrio (Makieva *et al.*, 2018).

2.5. Estrógenos

Al igual que la P4, los estrógenos son hormonas de tipo esteroideo de 18 carbonos secretados principalmente por las células granulosas de los folículos ováricos, el cuerpo lúteo y la placenta (Barrett *et al.*, 2020). Los estrógenos más importantes de síntesis endógena son: la estrona, el estriol y el 17β -estradiol (E2) (Barrett *et al.*, 2020; Vrtacnik *et al.*, 2014).

A lo largo del ciclo menstrual, la concentración de E2 en plasma oscila de manera significativa, teniendo una cantidad de 40 pg/mL al final del ciclo y 250 pg/mL antes de la ovulación (Young y Jaffe, 1976). Los estrógenos pueden ejercer su efecto modificando la expresión génica a través de dos formas: activando a sus receptores intracelulares o contribuyendo a las cascadas de señalización a través de vías no genómicas, —que pueden ser dependientes o independientes del receptor—, (Makieva *et al.*, 2018).

Los estrógenos también actúan mediante su receptor intracelular específico: el receptor de estrógenos (ER), el cual se presenta en dos subtipos principales codificados por diferentes genes: ER α y ER β (Garrán *et al.*, 2005). El subtipo predominante involucrado en la transducción de señales proliferativas en el endometrio es el receptor de estrógenos alfa (ER α) (Hewitt *et al.*, 2003), el cual se expresa en todos los tipos de células endometriales

durante la fase proliferativa y en una cantidad mucho mayor que el receptor de estrógenos beta (ER β) (Mylonas *et al.*, 2004). Durante la fase secretora, la expresión de ER β es mayor debido a que P4 inhibe la expresión de ER α con el fin de lograr la implantación del blastocisto: se ha sugerido que la disminución en la expresión de ER α puede alterar la expresión de genes que codifican para proteínas que regulan la receptividad endometrial, como la integrina beta 3 (Mylonas *et al.*, 2004; Dorostghoal *et al.*, 2018).

Mientras que ER α es conocido por su papel en la proliferación y diferenciación de las HESC, ER β también posee grandes funciones: puede reemplazar parcialmente a ER α cuando este está ausente (Zhu *et al.*, 2014); se ha demostrado en modelos murinos que la ausencia de ER α permite que se lleve a cabo la decidualización de manera adecuada, mientras que la ausencia de ER β ocasiona una decidualización anormal (Vallejo *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, E2 puede pasar a través de la membrana citoplasmática de las HESC debido a su naturaleza liposoluble, una vez en el citoplasma, se une a su receptor intracelular formando el complejo E2-iER y se dimeriza, lo que permite su translocación al núcleo. En forma de dímero actúa como un factor de transcripción al unirse directamente a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) ubicados en (o cerca) de los promotores de los genes regulados por estas hormonas (Vrtacnik *et al.*, 2014). Este mecanismo se considera una vía de señalización genómica directa; no obstante, existen otras dos vías por las cuales los estrógenos pueden actuar:

La vía genómica no directa, presente en genes que no contienen ERE en sus regiones promotoras, —los cuales representan un tercio de los genes regulados por estrógenos—, en este caso el complejo E2-iER no se une directamente al DNA, sino que lo hace a través de interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción en sus respectivos elementos de respuesta, reprimiendo o induciendo la expresión de los genes diana. Algunos ejemplos de factores de transcripción que facilitan este mecanismo son: Sp1, el factor nuclear κ B (NF κ B), la proteína de unión al enhancer CCAAT β (C/EBP β), la proteína de unión GATA1 (GATA1) y el transductor de señal y activador de la transcripción 5 (STAT5) (Björnström y Sjöberg, 2005).

La vía no genómica, —cuya señalización es más rápida que las otras debido a que no involucra la transcripción del gen diana y su consecuente traducción a proteína—, en este caso el E2 se une a un tipo diferente de ER, este tipo de receptor se encuentra anclado a la membrana y al momento de interactuar con E2 activan una serie de cascadas de señalización que involucran a proteínas cinasas y desencadenan respuestas como la fosforilación de factores de transcripción, la movilización del calcio intracelular, la estimulación

de la actividad de la enzima adenilato ciclasa para la producción de AMPc, la activación de la vía de señalización de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), entre otros (Björnström y Sjöberg, 2005). Ejemplos de estos receptores son el receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER) y ciertas variantes de ER α y ER β (Vrtacnik *et al.*, 2014).

Además, los ER también pueden activarse en ausencia de E2 o cualquiera de sus ligandos mediante la fosforilación en sus residuos de serina y tirosina (Figura 6), las proteínas responsables de esta fosforilación son la proteína cinasa A (PKA) y proteína cinasa C (PKC), activadas por señales extracelulares como factores de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1) y factor de crecimiento transformante β (TGF β), citocinas (interleucina 2), neurotransmisores (dopamina) y reguladores del ciclo celular (ciclinas A y D1) (Nilsson *et al.*, 2001).

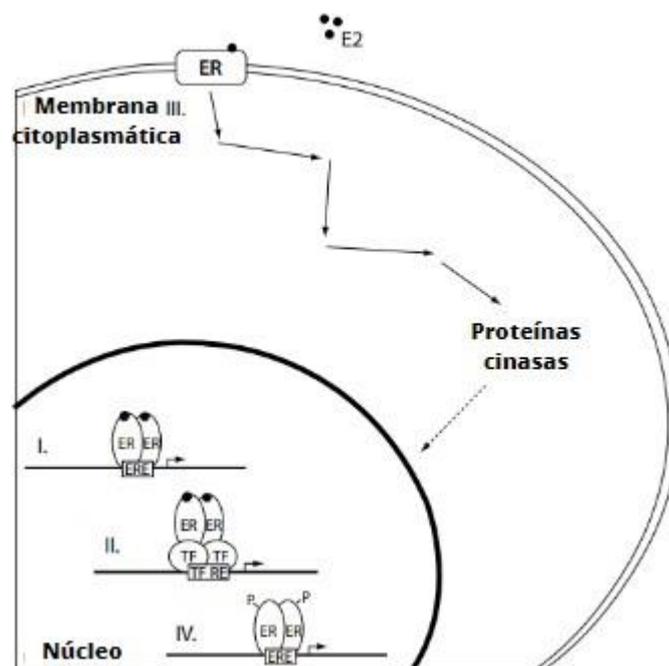


Figura 6. Vías de señalización de los estrógenos a través de sus receptores. Representación de las diferentes vías por las que los estrógenos pueden inducir sus efectos fisiológicos a través de sus receptores: I) Vía genómica directa, al interactuar con sus EREs; II) Vía genómica no directa, interaccionando con otros factores de transcripción y sus respectivos REs; III) Vía no genómica, en la cual participan receptores anclados a membrana y no involucra la transcripción del gen diana y; IV) En ausencia de ligando (E2) en respuesta a fosforilaciones por parte de otras proteínas (Tomada y modificada de Vrtacnik *et al.*, 2014).

2.6. Progesterona

La progesterona (P4), al igual que el E2, es una hormona de tipo esteroideo de 21 carbonos, la cual es secretada por el cuerpo lúteo, la placenta y, en pequeñas cantidades, por el folículo ovárico. De manera fisiológica alrededor del 2% de la hormona circulante se encuentra libre, el 80% se encuentra unida a albúmina y el otro 18% está unida a la globulina de unión a esteroides corticoides (Barret *et al.*, 2020).

Actúa de manera similar al E2 ya que puede ejercer efectos dependientes e independientes de la transcripción en el endometrio. Su receptor intracelular posee dos isoformas: PR-A y PR-B, codificadas en el mismo gen producto de promotores alternativos y, al igual que ER, se dimeriza y puede actuar como factor transcripcional para sus genes diana (Makieva *et al.*, 2018).

Ambas isoformas de PR poseen dominios estructurales que permiten su acción como factores de transcripción: un dominio C-terminal de unión a ligando (LBD), un dominio de unión al DNA (DBD) y un dominio amino-terminal (NTD); una de las grandes diferencias entre una isoforma y otra es que en una de ellas el NTD se encuentra trunco (PR-A), por lo que es de longitud más corta: PR-B posee una longitud de 933 aminoácidos mientras que PR-A de 768 aminoácidos (Grimm *et al.*, 2016). Contienen dominios de activación transcripcional (AF), los cuales propician la interacción con proteínas correguladoras (Hill *et al.*, 2012) (Figura 7).

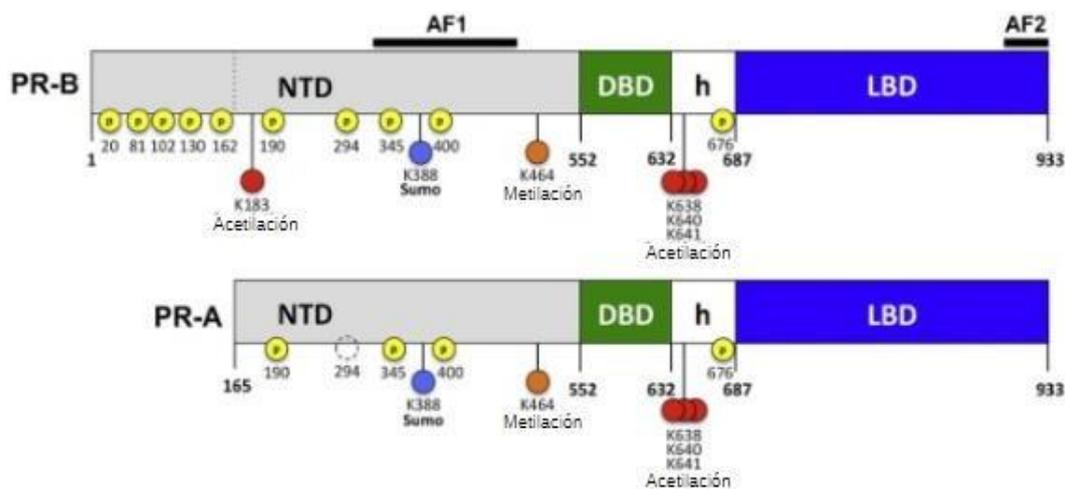


Figura 7. Dominios estructurales y modificaciones postraduccionales de los receptores de progesterona: PR-A y PR-B. Esquematación de los principales dominios estructurales de los receptores de P4: NTD (amino-terminal), DBD (dominio de unión a DNA), LBD (c-terminal) y las modificaciones postraduccionales que presentan: en amarillo fosforilación en residuos de serina; rojo, acetilación: azul, sumoilación: naranja, metilación (Tomada y modificada de Grimm *et al.*, 2016).

El PR sufre modificaciones postraduccionales que incluyen: fosforilación, acetilación, ubiquitinación, SUMOilación y metilación. En el caso de la fosforilación se ha descrito que PR se fosforila en ausencia de ligando; no obstante, contiene algunas fosforilaciones constitutivas. Se han reportado cinasas específicas que fosforilan a PR, entre las cuales destacan: las cinasas dependientes de ciclina 1/2 (CDK1/2), MAPK, PKA, entre otras (Grimm *et al.*, 2016).

A pesar de poseer los mismos DBD y los mismos dominios de unión a ligando, PR-A y PR-B generalmente muestran actividades transcripcionales muy diferentes en un mismo tipo celular, estas diferencias son producto de las diferencias en sus NTD, ya que PR-B contiene un dominio de transactivación adicional que puede interactuar con dímeros de PR-B adyacentes, diferentes factores de transcripción y coactivadores (Conneely *et al.*, 2003). Ambas isoformas se expresan en las HESC y sus niveles cambian a lo largo del ciclo menstrual: en la etapa proliferativa temprana los niveles de PR-A son relativamente más altos que los de PR-B; durante el periodo periovulatorio existe un aumento en la expresión de PR-B logrando que llegue a niveles comparables con PR-A y en la fase secretora tardía los niveles de ambas isoformas disminuyen y vuelven a aumentar durante la fase proliferativa temprana (Kaya *et al.*, 2015).

Como se describió anteriormente, su mecanismo de acción es semejante al del E2: una vez unida a su receptor se transloca al núcleo y se asocia con los elementos de respuesta a la progesterona (PRE) en la región promotora de los genes diana o con otros factores de transcripción y coactivadores (Makieva *et al.*, 2018).

En el endometrio y otros tejidos dependientes de hormonas, la P4 también puede unirse y activar receptores no clásicos transmembranales (mPR) que medían una acción rápida (Figura 8). La mayoría de los estudios sobre estos receptores en el endometrio se centran en PGRMC1, una proteína transmembranal pequeña a la cual se le han atribuido diversas funciones como: la regulación del citocromo P450, la señalización de P4, el tráfico de vesículas, la esteroidogénesis, la regulación del ciclo celular, la activación de la señalización del EGFR, el crecimiento invasivo, la angiogénesis, etc. (Salsano *et al.*, 2021). En el contexto endometrial, su sobreexpresión se ha asociado con una inhibición en el proceso de decidualización; además, se observa un cambio en su localización celular cuando las ESC están decidualizadas, localizándose preferentemente en el núcleo o regiones perinucleares, sugiriendo una posible función de PGRMC1 en la regulación de la expresión de un conjunto

específico de genes distintos de los genes diana del PR clásico (intracelular) durante la decidualización (Salsano *et al.*, 2017).

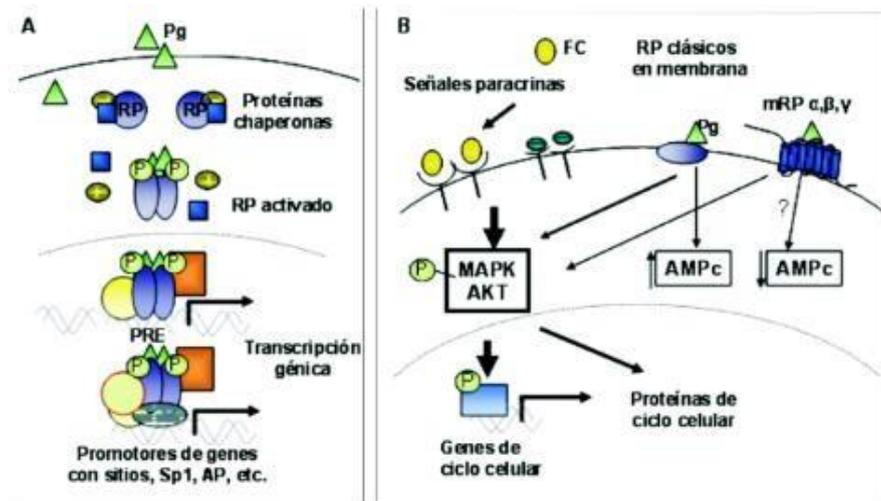


Figura 8. Mecanismo de acción de P4 a través de sus receptores. A) Mecanismo de acción de la progesterona a través de sus receptores intracelulares (PR) y B) a través de sus receptores membranales (Tomada de Bottino y Lanari, 2010).

El E2 a través de su receptor ER α modula la expresión del gen que codifica para PR en diferentes tipos celulares como las HESC, por lo que se ha determinado que se requiere de E2 para la respuesta de P4 durante la fase lútea del ciclo ovárico (Prange-Kiel *et al.*, 2001). Por el contrario, la expresión del gen que codifica para ER α es inhibida por P4 a través de su vía intracelular (PR), lo que demuestra que existe una retroalimentación por parte de ambas hormonas (Sigurgeirsson *et al.*, 2017).

Las células epiteliales endometriales presentan en mayor medida a la isoforma PR-B, lo que sugiere que PR-B pueda estar involucrado en el control de la secreción glandular, mientras que PR-A es la isoforma predominante en las ESC y la disminución de sus niveles se ha asociado con una decidualización alterada (Mote *et al.*, 2000). PR-B activa eventos de señalización citoplasmática rápida a través de la interacción con el dominio Src-homology 3 (SH3) de la tirosina cinasa Src (SRC) en la membrana plasmática, lo que desencadena la vía Ras/Raf1/MAPK crítica para la decidualización (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2001); mientras que PR-A es considerado un inductor transcripcional de diferenciación y decidualización (Makieva *et al.*, 2018).

2.7. AMPc en la decidualización

Al final de la ovulación, el endometrio está expuesto a niveles elevados de hormonas y otros factores endocrinos como la FSH, la relaxina (RLX), la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la LH, la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y, en caso de embarazo, la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) (Maruyama y Yoshimura, 2008). Todas estas moléculas se unen a sus respectivos receptores acoplados a proteínas G (GPCR) en la membrana celular del estroma endometrial y estimulan la producción de AMPc (Gellerersen y Brosens, 2014). Otro mecanismo por el cual el AMPc aumenta sus niveles durante el proceso de decidualización es mediante la P4, que activa y coordina diferentes vías de señalización que desencadenan en diversos efectos, entre los cuales se encuentra el aumento de AMPc (Figura 8) (Xu *et al.*, 2021). Se ha reportado que los dos efectores río abajo del AMPc son las proteínas de intercambio activadas por AMPc 1/2 (EPAC1/2) y la proteína cinasa A (PKA), los cuales se han identificado como críticos para la decidualización de ESC (Kusama *et al.*, 2014).

La activación de la vía de PKA implica la fosforilación por parte de esta molécula en el modulador del elemento de respuesta al AMPc (CREB) en su sitio S133 (Johannessen *et al.*, 2004) y, su posterior unión a los elementos de respuesta al AMPc (CRE). Esto desencadena la regulación de la transcripción de genes cuyos productos son capaces de interactuar con el PR como las proteínas FOXO1, STAT5, STAT3 y C/EBP β (Maruyama *et al.*, 2008). De esta manera, el AMPc de acción rápida sensibiliza a las ESC a la P4 que actúa generalmente mediante un mecanismo de acción lento a través del PR intracelular, para inhibir la proliferación de células epiteliales e inducir la decidualización de las células del estroma (Makieva *et al.*, 2018). Se han reportado algunos estudios donde se analiza a esta vía de activación del AMPc y otras como la de EPAC1/2 durante el proceso de decidualización *in vitro* en HESC, obteniéndose que inhibir estas vías ocasiona una disminución en la expresión de genes asociados a la decidualización como *IGFBP-1*, *DKK1* y *CD55* (gen que codifica para el factor de destrucción acelerada del complemento), por lo que se puede decir que el AMPc juega un papel crucial para una correcta decidualización (Tulac *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2022).

2.8. Antagonistas de hormonas esteroideas

Una metodología generalmente empleada para estudiar la actividad y efecto de algún compuesto en modelos *in vitro*, es el uso de antagonistas de sus receptores. Algunos grupos

de investigación han estudiado el efecto de antagonistas de ER y PR en células epiteliales de endometrio y líneas celulares de cáncer de endometrio a diferentes concentraciones (Du *et al.*, 2019; Ogo *et al.*, 2014).

Debido a que la decidualización es un proceso dependiente de progesterona y en la mayoría de los protocolos para analizarla, —incluido el de nuestro grupo de trabajo—, incluyen al E2, sería conveniente observar el efecto de antagonizar a los receptores de estas hormonas para de esta manera determinar el papel que juega cada una de ellas en el proceso de decidualización en HESC.

2.8.1. Antagonistas de los receptores de estrógenos

Como se mencionó anteriormente, el E2 puede unirse a ambos subtipos de su receptor (ER α y ER β), por lo tanto, modular la actividad de este receptor es imprescindible para conocer, de manera indirecta, la participación de E2 en el proceso que se estudie, en este caso, la decidualización de HESC.

Existe un grupo de compuestos denominados SERM (modificador selectivo del receptor de estrógenos), los cuales son ligandos para ER que muestran actividad agonista y antagonista que varía dependiendo del tipo de tejido (Grese y Dodge, 1998). Dentro de este grupo se han descrito diversos antagonistas para este receptor en el tejido uterino, entre los cuales destacan: ralofixeno, U-23469 y MPP (metil piperidinopirazol) (Ragab *et al.*, 2022).

ER α y ER β están codificados por dos genes distintos; no obstante, sus dominios de unión al ADN están altamente conservados en contraste con sus dominios de unión a ligando que poseen una homología relativamente baja entre ellos (Ogo *et al.*, 2014). Por esta razón, resulta útil emplear antagonistas selectivos para cada tipo de receptor, además de que regulan la expresión de diferentes genes diana.

Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo se seleccionaron los antagonistas selectivos para cada tipo de receptor de ER: MPP para ER α , PHTPP (2-fenil-3-(4-hidroxifenil)-5,7-bis(trifluorometil)-pirazolo[1,5-a]pirimidina) para ER β (Bano *et al.*, 2023). También se seleccionó un antagonista de ER que puede unirse tanto a ER α como a ER β denominado ICI 182,780 (7 α ,17 β -[9-[(4,4,5,5,5-pentafluoropentil)sulfinil]nonil]estra-1,3,5(10)-trieno-3,17-diol) cuyo mecanismo de acción consiste en una reducción en la dimerización del receptor (crucial para su actividad) lo que provoca una rápida degradación del receptor; además, irrumpe en el transporte hacia el núcleo del ER al interactuar con él, de esta manera el antagonista bloquea la señalización de ER y, por consiguiente, la regulación transcripcional que ejerce sobre sus genes diana (Talukdar *et al.*, 2022).

Anteriormente se ha analizado la selectividad de los antagonistas MPP y PHTPP *in vitro*, Ogo y colaboradores desarrollaron un estudio donde evaluaron la selectividad de estos dos antagonistas en una línea celular de adenocarcinoma de endometrio humano (HEC-1-A) mediante ensayos con luciferasa, concluyendo que MPP antagoniza de manera selectiva a ER α , mientras que PHTPP lo hace con ER β (Ogo *et al.*, 2014). En este mismo estudio se encontró que la concentración a la que se tiene el mayor efecto antagónico para ambos antagonistas es 10⁻⁶ M. Como estas concentraciones fueron evaluadas en células de endometrio humano, se decidió tomar la concentración de 10⁻⁶ M para los tratamientos con los antagonistas empleados en este trabajo.

2.8.2. Antagonista del PR

Otra hormona vital para el proceso de deciduación es la P4, por lo que también es de suma importancia evaluar su comportamiento a través de antagonistas a su receptor. El RU486 o mifepristona, es un antagonista competitivo del receptor de progesterona. Se une al PR provocando un cambio conformacional que lo vuelve inactivo, ya que pierde afinidad por la P4 imposibilitando que pueda regular a sus genes diana; numerosos grupos de investigación han evaluado el efecto de RU486 como antagonista de PR, como por ejemplo Talukdar y colaboradores, que observaron una deciduación comprometida en ratones al administrarles este compuesto (Talukdar *et al.*, 2022),

Al contrario que con los antagonistas del ER, este antagonista ha sido estudiado de manera más profunda en modelos de HESC, encontrándose también que a una concentración de 10⁻⁶ M se puede observar una disminución en la expresión de genes marcadores como *IGFBP-1* y *PRL* durante la deciduación de ESC (Young *et al.*, 2021; Catalano *et al.*, 2003; Tulac *et al.*, 2006).

El papel antagónico de RU486 se ha observado tanto en líneas celulares como en cultivos primarios de mujeres sanas, en ambos casos este compuesto ha demostrado alterar a la deciduación disminuyendo la expresión de genes esenciales para que esta se lleve a cabo, como lo es el caso de *DKK1*: Tulac y colaboradores analizaron la regulación transcripcional de este gen en cultivos de endometrio provenientes de mujeres sanas frente a la presencia de RU486, encontrando que RU486 disminuye la expresión de *DKK1* ocasionando una deciduación comprometida (Tulac *et al.*, 2006).

2.9. Inhibidor de PKA

Como se mencionó anteriormente, el AMPc es un segundo mensajero involucrado en diferentes vías de señalización importantes para la proliferación y diferenciación celular y que juega un papel crucial para la decidualización de las HESC (Maruyama *et al.*, 2008; Kusama *et al.*, 2013). Esta molécula posee dos receptores intracelulares mediante los cuales ejerce sus diversos efectos, la proteína cinasa A (PKA) y la proteína de intercambio EPAC 1/2. Dependiendo de su relativa abundancia, distribución y localización, así como de los entornos celulares específicos, EPAC y PKA pueden actuar de forma independiente, converger sinérgicamente u oponerse entre sí para regular una función celular específica (Cheng *et al.*, 2008). Por lo tanto, es importante establecer a través de cuál de estas moléculas el AMPc interactúa para establecer su función en la decidualización.

Se han reportado algunos estudios donde se analiza a ambas vías de activación del AMPc y durante el proceso de decidualización *in vitro* en HESC, obteniéndose que inhibir estas vías desencadena en una disminución de la expresión de genes asociados a la decidualización como *IGFBP-1*, *DKK1* y *CD55* (gen que codifica para el factor de destrucción acelerada del complemento) (Tulac *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2022).

H-89 (N-[2-[[3-(4-Bromofenil)-2-propenil]amino]etil]-5-isoquinolinesulfonamida diclorhidrato) es un inhibidor de la proteína cinasa A. Tang y colaboradores estudiaron el efecto de este compuesto en cultivos celulares primarios y líneas celulares de HESC durante la decidualización, determinando que, en presencia de este inhibidor, el gen *CD55* disminuye su expresión, y que cuando se disminuye la expresión de este gen, los genes marcadores de la decidualización (*IGFBP-1* y *PRL*) también disminuyen (Tang *et al.*, 2022). Esto podría ser un indicio de que el AMPc está actuando a través de PKA durante la decidualización de HESC; no obstante, se debe analizar el efecto directo que posee este inhibidor (H-89) en los genes marcadores.

3. Planteamiento del problema

El proceso de decidualización es imprescindible para la implantación del blastocisto durante el embarazo; aunque se conoce en gran parte cómo se regula este proceso, aún es incierta la participación de manera específica de cada uno de los componentes que lo inducen: P4, E2 y AMPc. Por lo tanto, comprender el mecanismo de acción del AMPc,

medroxiprogesterona y E2 durante el proceso de decidualización, permitirá elucidar el papel de las hormonas esteroides y segundos mensajeros en la fisiología del endometrio. Entender su funcionamiento y las condiciones que pueden alterarlo podría aportar información relevante en la investigación ginecológica y de la reproducción, así como una posible aplicación interdisciplinaria.

4. Hipótesis

El principal regulador de la expresión de genes asociados a la decidualización de HESC será la progesterona, mostrando una disminución en la expresión de los genes marcadores en los cultivos celulares de HESC tratados con RU486.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Determinar la participación de los receptores de estrógenos y progesterona, y de PKA en la regulación de la expresión de genes involucrados en el proceso de decidualización de células del estroma endometrial humano inmortalizadas (T-HESC).

5.2. Objetivos particulares:

- Evaluar el efecto del E2, medroxiprogesterona y AMPc en la expresión de diferentes genes involucrados en el proceso de decidualización (*IGFBP1*, *PRL*, *PR-AB*, *PR-B*, *FOXO-1* y *DKK1*) en la línea celular T-HESC.
- Evaluar el efecto de antagonistas del receptor de progesterona y receptor de estrógenos en la regulación de la expresión de los genes *IGFBP1*, *PRL*, *PR-AB*, *PR-B*, *FOXO-1* y *DKK1* en la línea celular T-HESC.
- Determinar el efecto del inhibidor H-89 de la vía AMPc/PKA mediante la evaluación de la expresión de los genes *IGFBP1*, *PRL*, *PR-AB*, *PR-B*, *FOXO-1* y *DKK1* en la línea celular T-HESC.

6. Metodología

Cultivo celular

Se realizaron cultivos celulares de la línea T-HESC (ATCC CRL-4003, EUA), una línea celular de células del estroma endometrial humano inmortalizadas. Esta línea celular proviene de células estromales del endometrio de una mujer adulta con miomas no malignos. En particular, se obtuvieron cultivos primarios de células estromales a los cuales se les indujo la expresión endógena de la subunidad catalítica de la telomerasa empleando al vector pA317-hTERT. hTERT le confiere la inmortalización a la línea celular ya que los telómeros no se acortan en cada ciclo celular. La línea celular es positiva a vimentina y FSP (proteína de superficie de fibroblastos) y marcadores de fibroblastos (ATCC, 2023).

Las células se sembraron en cajas de 10 cm (Corning, EUA) para su proliferación y propagación empleando el medio DMEM-F12 sin rojo de fenol (Gibco, UK) + 15mM HEPES (Gibco, UK) + SFB libre de hormonas al 10% (ThermoFisher Scientific, EUA) + antibiótico/antimicótico 1x (Gibco, UK) + 1.0 mM piruvato de sodio (Gibco, USA) + 0.5% insulina-transferrina-selenio (ITS; Corning, EUA) a 37 °C, 95% de aire y 5% CO₂. Posteriormente se sembraron aproximadamente 270 mil células en cajas de 3 cm (Corning, EUA) para su respectivo tratamiento una vez alcanzada una confluencia $\geq 80\%$.

Tratamiento de deciduización

Posterior a las 48 horas el medio fue cambiado por un medio libre de suero durante 18 h para iniciar con los tratamientos.

Se emplearon las siguientes concentraciones de los compuestos inductores de la deciduización en cultivos celulares de T-HESC con medio DMEM-F12 sin SFB: 10 nM E2 (Sigma Aldrich, EUA), 1 μ M MPA (Sigma Aldrich, EUA) y 0.5 mM AMPc (Sigma Aldrich, EUA) a 37°C y 5% CO₂ durante 24 h. Las muestras control se trataron solamente con vehículo (<0.8 % etanol). Se realizaron de 3 a 5 ensayos independientes evaluando la respuesta celular mediante la expresión de los marcadores de la deciduización: *PRL* e *IGFBP-1*, los genes asociados a la actividad de PR: *PR-B* y *PR-AB*, y los genes *DKK1* y *FOXO1*.

Tratamientos con antagonistas de receptores hormonales e inhibidor de PKA

Se siguió la misma metodología que con el tratamiento de decidualización hasta la adición de las hormonas y el AMPc, en este caso se emplearon cultivos celulares de T-HESC con medio DMEM-F12 sin SFB y se les dio un tratamiento de 1 μ M durante 1 h de cada antagonista por separado: RU486 (Sigma Aldrich, EUA), ICI 182,780 (Tocris, Reino Unido), MPP (Tocris, Reino Unido) y PHTPP (Tocris, Reino Unido), y del inhibidor de la vía AMPc/PKA H-89 (10 μ M; Cell Signaling, EUA); posteriormente, se expusieron al tratamiento de decidualización completo (10 nM E2, 1 μ M MPA y 0.5 mM AMPc) a 37°C y 5% CO₂ durante 24 h en medio DMEM-F12 sin SFB. Se realizaron de 3 a 5 ensayos por cada antagonista, evaluando la respuesta celular mediante la expresión de los marcadores de la decidualización: *PRL* e *IGFBP-1*, los genes asociados a la actividad de PR: *PR-B* y *PR-AB*, y los genes *DKK1* y *FOXO1*.

Extracción de RNA total y RT-qPCR

La extracción de RNA fue llevada a cabo empleando el reactivo QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, EUA) siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez obtenido el RNA total, fue resuspendido en agua libre de nucleasas y cuantificado por espectrofotometría para la síntesis del cDNA. Su integridad fue evaluada mediante la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Para generar el cDNA se empleó 1 μ g de RNA total mediante una reverso transcripción utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, EUA) y 10 mM de cada uno de los desoxinucleótidos (Invitrogen, EUA), siguiendo el protocolo del fabricante.

El ensayo de qPCR fue llevado a cabo utilizando el sistema de detección SYBR Green (Bio-Rad, EUA) en el termociclador CFX96 Touch (Bio-Rad, EUA), siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante.

Los resultados fueron analizados mediante el método comparativo de doble delta C_T ($\Delta\Delta C_T$) empleando al gen *ACT-B* como gen constitutivo de referencia para la evaluación de los genes *PRL*, *IGFBP-1*, *PR-B*, *PR-AB*, *DKK-1* y *FOXO-1*. En la Tabla 1 se muestran los oligos empleados.

Tabla 1. Secuencias de oligos utilizadas para los experimentos de RT-qPCR

Gen	Oligo Forward 5'-3'	Oligo Reverse 5'-3'
<i>ACT-B^a</i>	5'-CTTCCTGGGCATGGAGTC-3'	5'-CGTACAGGTCTTTGCGGATG-3'
<i>PRL^b</i>	5'-CATATTGCGATCCTGGAATGAGC-3'	5'-TCCTCAATCTCTACAGCTTTGGA-3'
<i>IGFBP-1^b</i>	5'-TCCTTTGGGACGCCATCAGTAC-3'	5'-GATGTCTCCTGTGCCTTGGCTA-3'
<i>PR-B^c</i>	5'-GTACGGAGCCAGCAGAAGTC-3'	5'-TCTCTGGCATCAAACCTCGTG-3'
<i>PR-AB^c</i>	5'-GTCGAGCTCACAGCGTTTCT-3'	5'-TGCCCGGGACTGGATAAATG-3'
<i>DKK-1^d</i>	5'-TGACAACCTACCAGCCGTACC-3'	5'-CAGGCGAGACAGATTTGCAC-3'
<i>FOXO-1^d</i>	5'-AGGGTTAGTGAGCAGGTTACAC-3'	5'-TGGACTGCTTCTCTCAGTTCC-3'

- Tomado de Gómez-Viais, 2019.
- Tomado de Jividen *et al.*, 2014.
- Tomado de González-García, 2019.
- Diseñados para este trabajo por el autor.

7. Resultados

7.1. Cultivos celulares de células del estroma endometrial humano (HESC)

Se realizaron cultivos celulares de la línea celular T-HESC hasta obtener una monocapa de células con una morfología de tipo fibroblasto y una confluencia alrededor del 80% para su posterior tratamiento con vehículo (Figura 9A), decidualización (Figura 9B) + antagonista o inhibidor respectivamente

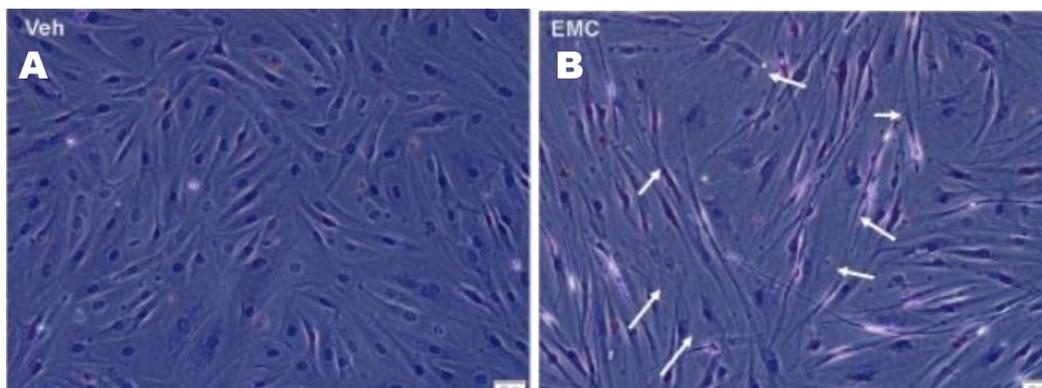


Figura 9. Decidualización *in vitro* de T-HESC. Micrografía que muestra la A) morfología tipo fibroblasto de las T-HESC tratadas con vehículo (Veh, Etanol) y B) la morfología epitelial de las T-HESC decidualizadas mediante el tratamiento con MPA, E2 y AMPc (EMC) durante seis días. (Tomada de Retis-Reséndiz *et al.*, 2024).

7.2. Expresión de los marcadores de la decidualización

A partir de los cultivos celulares de HESC obtenidos se evaluó la expresión de los genes marcadores canónicos de la decidualización: *IGFBP-1* y *PRL*, a nivel de mRNA; se realizaron de 3 a 5 réplicas independientes comparando el tratamiento de decidualización a las 24 h (MPA, E2 y AMPc) contra el control (vehículo). Los resultados mostraron que ambos marcadores aumentaron significativamente su expresión como resultado del tratamiento, este efecto se ve más marcado en el caso de *IGFBP-1* en comparación con *PRL* (Figura 10).

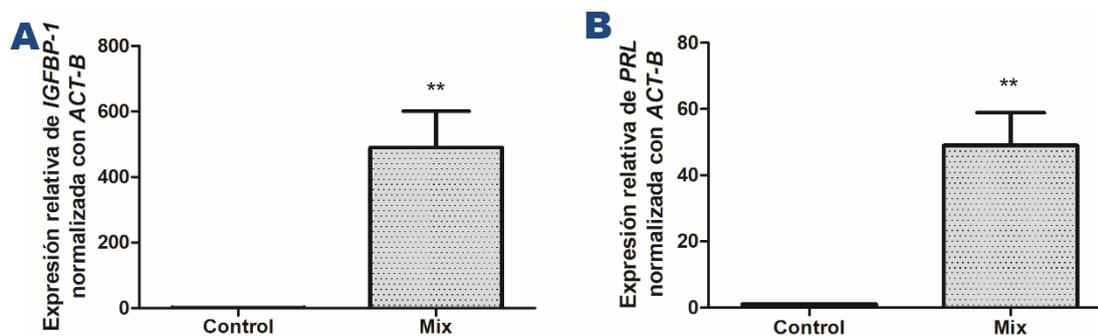


Figura 10. Efecto del tratamiento de decidualización a las 24 h en genes marcadores de este proceso en la línea celular T-HESC. Expresión relativa de *IGFBP-1* (A) y *PRL* (B) normalizada con *ACT-B* analizada mediante RT-qPCR, utilizando el método del $\Delta\Delta CT$. Los tratamientos de decidualización (Mix) se realizaron con MPA (1 μ M), E2 (10 nM) y AMPc (0.5 mM) durante 24 h en la línea celular T-hESC. Los valores mostrados son promedios \pm EEM. ** $P < 0.005$. Prueba t de student.

7.3. Expresión de genes relacionados con la decidualización

El proceso de decidualización se ha considerado como un evento dependiente de progesterona, por lo tanto, también se evaluó el efecto del tratamiento anteriormente descrito en la expresión de los genes que codifican para las isoformas del receptor de progesterona: *PR-B* y *PR-AB*. En el último caso se denomina *PR-AB* ya que como se describió en la introducción, la isoforma *PR-A* no cuenta con una parte del extremo N-terminal, por lo que el

diseño de los cebadores para su evaluación mediante qPCR incluyen al extremo N-terminal de la isoforma PR-B.

Al igual que con los marcadores, ambos genes aumentaron significativamente su expresión después de 24 h con el tratamiento, en este caso el gen de la isoforma *PR-B* fue el que mostró un aumento mayor (Figura 10A-B).

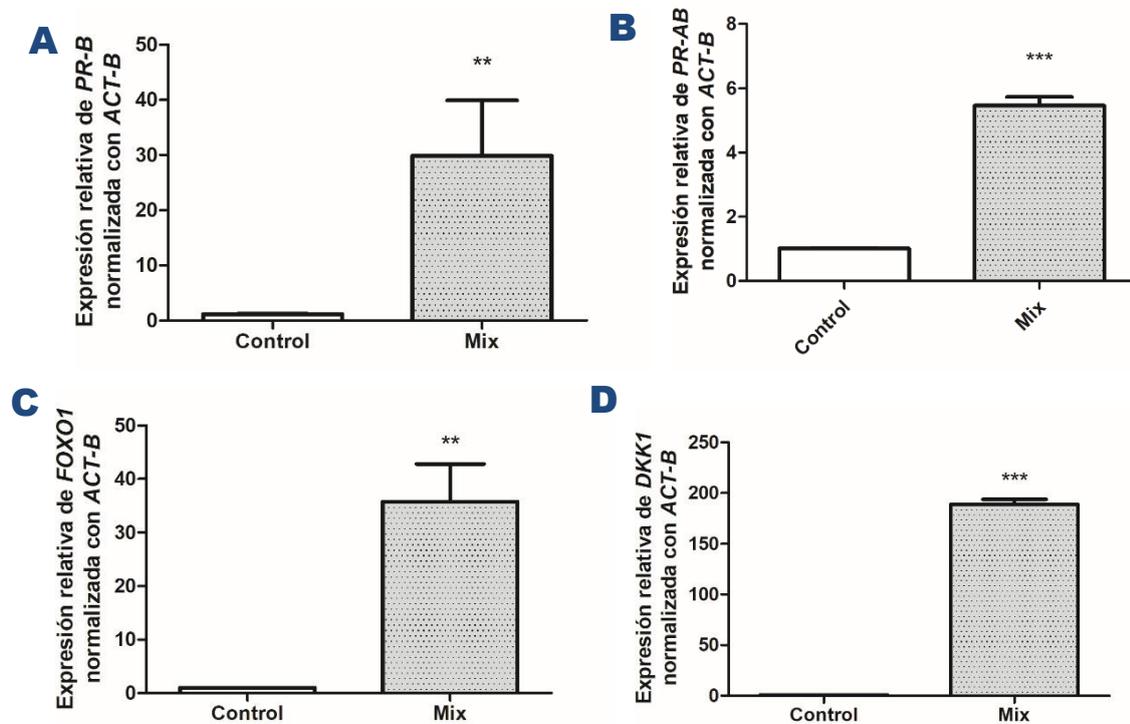


Figura 11. Efecto del tratamiento de deciduación a las 24 h en genes relacionados con la deciduación en la línea celular T-HESC. Expresión relativa de *PR-B* (A), *PR-AB* (B), *FOXO-1* (C) y *DKK1* (D) normalizada con *ACT-B* analizada mediante RT-qPCR, utilizando el método del $\Delta\Delta$ CT. Los tratamientos de deciduación (Mix) se realizaron con MPA (1 μ M), E2 (10 nM) y AMPc (0.5 mM) durante 24 h en la línea celular T-hESC. Los valores mostrados son promedios \pm EEM. * $P < 0.05$. Prueba t de student.

En el caso de los otros genes analizados relacionados con la deciduación: *FOXO-1* y *DKK1*, se observó que el tratamiento de deciduación también indujo su expresión de manera significativa con respecto al control, mostrando una mayor inducción en *DKK1* (Figura 9D). Con esto se demostró que el mix de deciduación: E2, MPA y AMPc, inducía la expresión de todos los genes analizados en este estudio.

7.4. Efecto de antagonistas de receptores hormonales en la expresión de genes marcadores de la deciduación

Una vez comprobado que la mezcla de compuestos que inducen la decidualización, promovían la expresión de los genes analizados (*IGFBP-1*, *PRL*, *PR-B*, *PR-AB*, *FOXO-1* y *DKK1*) de manera significativa (Figura 10 y 11), se quería dilucidar cuál de estas moléculas estaba promoviendo en mayor medida la inducción de los genes. Por lo cual se decidió emplear antagonistas de receptores hormonales: RU486 (o mifepristona) para PR y MPP (selectivo de ER α), PHTPP (selectivo de ER β) e ICI 182,780 para ambos ER. Para ello se sometieron a los cultivos a una incubación de 1 h con el antagonista y posteriormente se añadió el tratamiento convencional para inducir la decidualización. Se realizaron de 3 a 6 réplicas y se analizaron los resultados a las 24 h después del tratamiento hormonal (Figura 12).

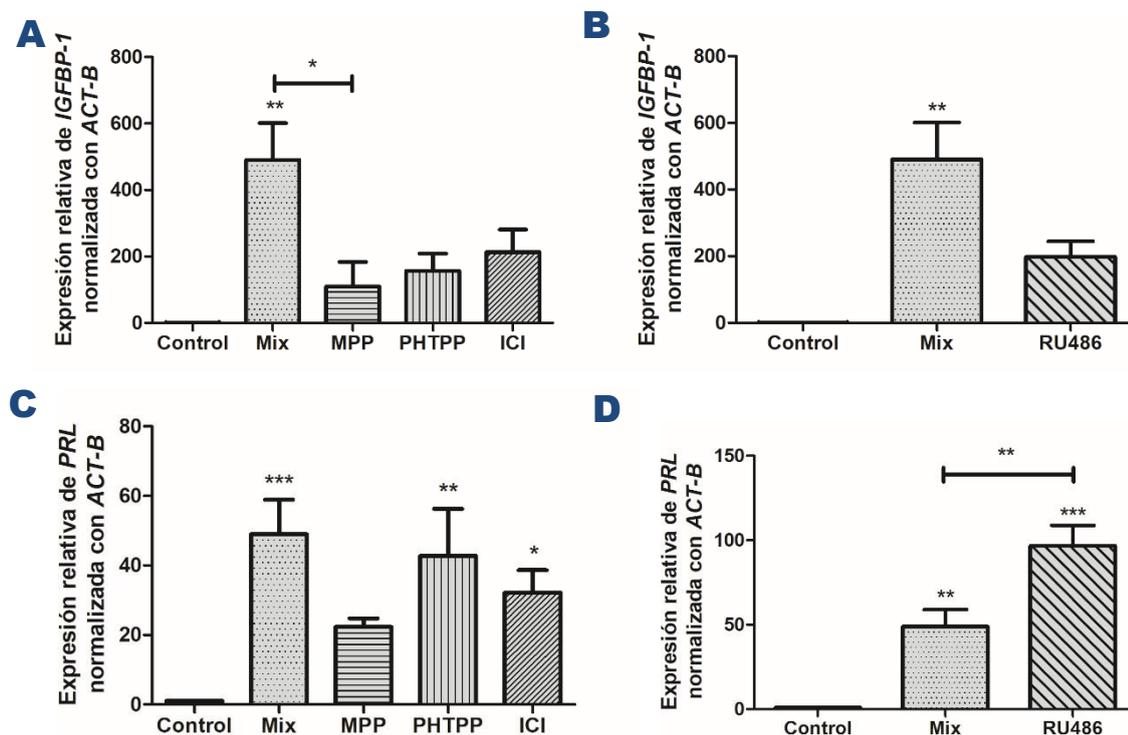


Figura 12. Efecto de antagonistas de receptores hormonales en la expresión de *IGFBP-1* y *PRL* en la línea celular T-HESC. Expresión relativa de *IGFBP-1* bajo la exposición de antagonistas al receptor de estrógenos (A) y de progesterona (B) y expresión relativa de *PRL* bajo la exposición de antagonistas al receptor de estrógenos (C) y de progesterona (D) normalizadas con *ACT-B* analizadas mediante RT-qPCR, utilizando el método del $\Delta\Delta CT$. Los tratamientos de decidualización (Mix) se realizaron con MPA (1 μM), E2 (10 nM) y AMPc (0.5 mM) durante 24 h en la línea celular T-hESC, los antagonistas (MPP, PHTPP, ICI y RU486) se añadieron por separado a una concentración de 10^{-6} M una hora antes del tratamiento de decidualización. Los valores mostrados son promedios \pm EEM. *** $P < 0.0001$, ** $P < 0.005$, * $P < 0.05$. Prueba ANOVA de una vía; prueba Post hoc de Tukey.

En el caso de *IGFBP-1*, se observa que todos los antagonistas disminuyen su expresión en comparación con el tratamiento de decidualización (Figura 12A-B). A pesar de que solo se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre este tratamiento y el tratamiento con el antagonista MPP (antagonista selectivo de ER α), con todos los antagonistas se tiene la misma tendencia de abatimiento en la expresión inducida por el tratamiento inicial; esto nos da indicios de que el gen *IGFBP-1* podría estar regulado de manera positiva tanto por la vía del ER como por la vía del PR.

En el caso del gen *PRL* se observa un comportamiento diferente, ya que se tiene que en presencia de todos los antagonistas se sigue induciendo de manera significativa la expresión del gen en comparación con el control, a excepción del tratamiento con MPP (Figura 12C). Aquí destaca el efecto del antagonista RU486 (Figura 12D), ya que parece aumentar la expresión de *PRL* incluso más que el propio tratamiento de decidualización, lo que podría indicar que hay una regulación inhibitoria de este gen por parte del PR.

7.5. Efecto de antagonistas de receptores hormonales en la expresión de genes relacionados con la decidualización

También se evaluó la expresión de los genes que codifican para las isoformas del receptor de progesterona: *PR-B* y *PR-AB* sometiendo a los cultivos celulares a las mismas condiciones de tratamientos: 1 h de acondicionamiento al antagonista y 24 h de exposición al Mix de inducción de decidualización: MPA, E2 y AMPc. En el caso del transcrito *PR-B*, no se observa un efecto con los antagonistas ICI y RU486 respecto al tratamiento de decidualización (Figura 13A-B). En el caso de los otros dos antagonistas (MPP y PHTPP) se observa una tendencia a disminuir la expresión de *PR-B*, aunque no se obtuvo una diferencia significativa. Estos resultados sugieren que ni la vía de ER ni la de PR están teniendo un efecto significativo sobre la expresión de este gen durante la decidualización.

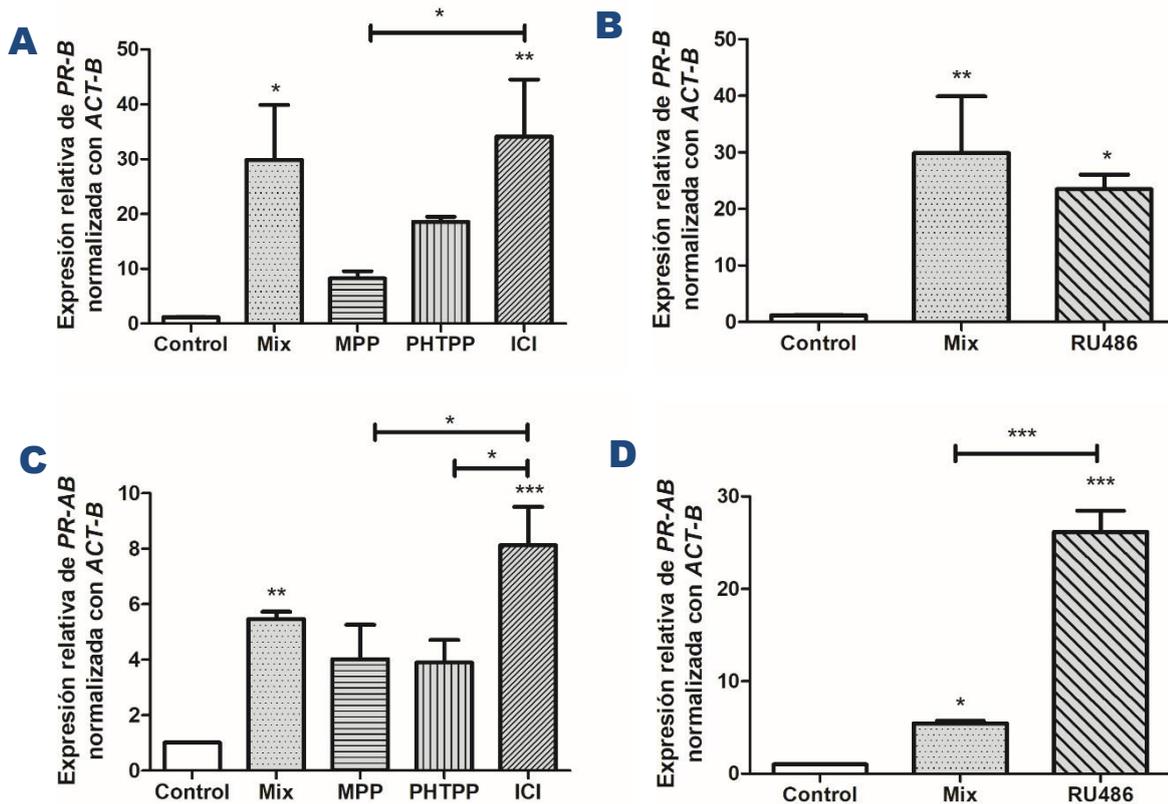


Figura 13. Efecto de antagonistas de receptores hormonales en la expresión de PR-B y de PR-AB en la línea celular T-HESC. Expresión relativa de PR-B bajo la exposición de antagonistas al receptor de estrógenos (A) y de progesterona (B) y expresión relativa de PR-AB bajo la exposición de antagonistas al receptor de estrógenos (C) y de progesterona (D) normalizadas con ACT-B analizada mediante RT-qPCR, utilizando el método del $\Delta\Delta CT$. Los tratamientos de decidualización (Mix) se realizaron con MPA (1 μM), E2 (10 nM) y AMPc (0.5 mM) durante 24 h en la línea celular T-HESC, los antagonistas (MPP, PHTPP, ICI y RU486) se añadieron por separado a una concentración de 10^{-6} M una hora antes del tratamiento de decidualización. Los valores mostrados son promedios \pm EEM. *** $P < 0.0001$, ** $P < 0.005$, * $P < 0.05$. Prueba ANOVA de una vía; prueba Post hoc de Tukey.

Para el gen PR-AB se tiene que solo en los casos de tratamiento con los antagonistas ICI y RU486 se logra observar un aumento significativo en la expresión del gen con respecto al control, y exclusivamente en el caso de RU486 este aumento es diferencialmente significativo en comparación con el tratamiento de decidualización (Figura 13D). Para los antagonistas MPP y PHTPP no se obtiene una diferencia significativa con respecto al control ni al tratamiento de decidualización (Figura 13C); estos resultados en conjunto nos sugieren que bloquear la vía de PR induce la expresión de PR-AB mucho más que el propio tratamiento de decidualización, lo que nos puede estar hablando de una posible retroalimentación negativa en su expresión por parte del mismo receptor y, como esta tendencia no se observa con el

gen *PR-B*, se podría deducir que este efecto se presenta en el transcrito correspondiente a la isoforma *PR-A*.

Al igual que con los genes *PR-B* y *PR-AB*, se analizó la expresión de *FOXO1* y *DKK1* en cultivos celulares de T-HESC sometidos bajo las mismas condiciones anteriormente descritas: exposición al mix de decidualización (MPA, E2 y AMPc) durante 24 h, con 1 h previa de exposición a los antagonistas a receptores hormonales (MPP, PHTPP, ICI y RU486). En el caso del gen *FOXO1* se tiene que debido a la variación en los datos no se puede establecer una conclusión, aunque se puede rescatar que la tendencia de estos es muy similar independientemente del antagonista utilizado (Figura 14A). Es posible que este resultado se deba a la gran variación en los datos para este gen, debido a que en el caso de los genes *FOXO-1* y *DKK1* el número de réplicas analizadas fue menor en comparación con los otros genes. Por otro lado, no se observa un efecto del antagonista RU486 en la expresión del gen respecto al tratamiento de decidualización (Figura 14B), por lo que se puede decir que ninguna de las vías de receptores hormonales está afectando la expresión del gen.

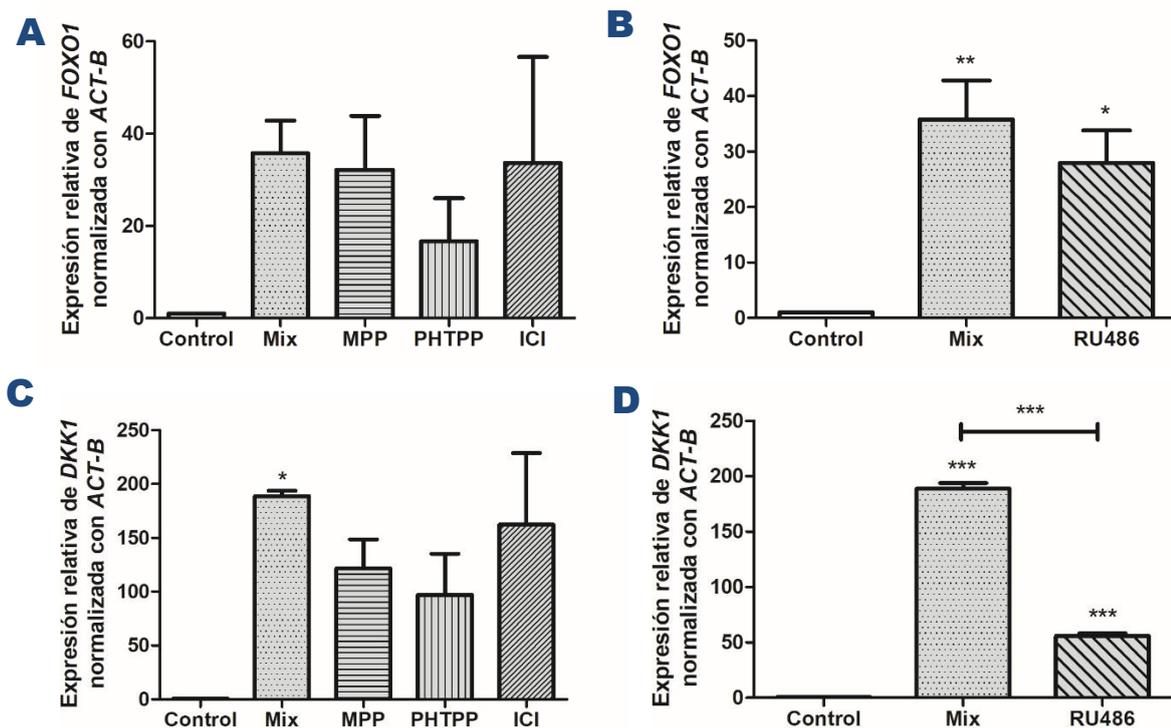


Figura 14. Efecto de antagonistas de receptores hormonales en la expresión de *FOXO1* y de *DKK1* en la línea celular T-HESC. Expresión relativa de *FOXO-1* bajo la exposición de antagonistas al receptor de estrógenos (A) y de progesterona (B) y expresión relativa de *PR-AB* bajo la exposición de antagonistas al receptor de estrógenos (C) y de progesterona (D) normalizadas con *ACT-B* analizada mediante RT-qPCR, utilizando el método del $\Delta\Delta CT$. Los

tratamientos de decidualización (Mix) se realizaron con MPA (1 μ M), E2 (10 nM) y AMPc (0.5 mM) durante 24 h en la línea celular T-HESC, los antagonistas (MPP, PHTPP, ICI y RU486) se añadieron por separado a una concentración de 10^{-6} M una hora antes del tratamiento de decidualización. Los valores mostrados son promedios \pm EEM. ***P<0.0001, **P<0.005, *P<0.05. Prueba ANOVA de una vía; prueba Post hoc de Tukey.

El gen *DKK1* mostró una tendencia similar a *FOXO-1* en su expresión bajo la presencia de los antagonistas de los ER (Figura 14C); sin embargo, se observó un resultado diferente ante el tratamiento con el antagonista RU486, en donde la expresión disminuyó de manera significativa (Figura 14D). Este resultado es resaltable debido a que solo se observa con el gen *DKK1* y no con los demás genes analizados (*IGFBP-1*, *PRL*, *PR-B*, *PR-AB* y *FOXO-1*), por lo que se podría decir que *DKK1* es regulado por PR en nuestras condiciones experimentales.

7.6. Expresión de genes relacionados con la decidualización en presencia de H-89, un inhibidor de PKA

Como el tratamiento de inducción de la decidualización se realizó empleando también al segundo mensajero AMPc, se evaluó el efecto de un inhibidor de una de las vías por las que puede actuar: la vía del PKA. Para esto, se empleó al inhibidor H-89, al igual que con los antagonistas de receptores hormonales, se incubaron los cultivos celulares de T-HESC durante 1 h con H-89 antes de administrar el tratamiento de decidualización completo (MPA, E2 y AMPc). Se evaluó la expresión de todos los genes analizados anteriormente: *IGFBP-1*, *PRL*, *PR-B*, *PR-AB*, *FOXO1* y *DKK1* encontrándose que en casi todos los casos el inhibidor disminuyó la expresión del gen en comparación con la inducción provocada por el tratamiento de decidualización (Figura 15A, B, C y F), con excepción de *PR-AB* y de *FOXO-1* (Figura 13D-E).

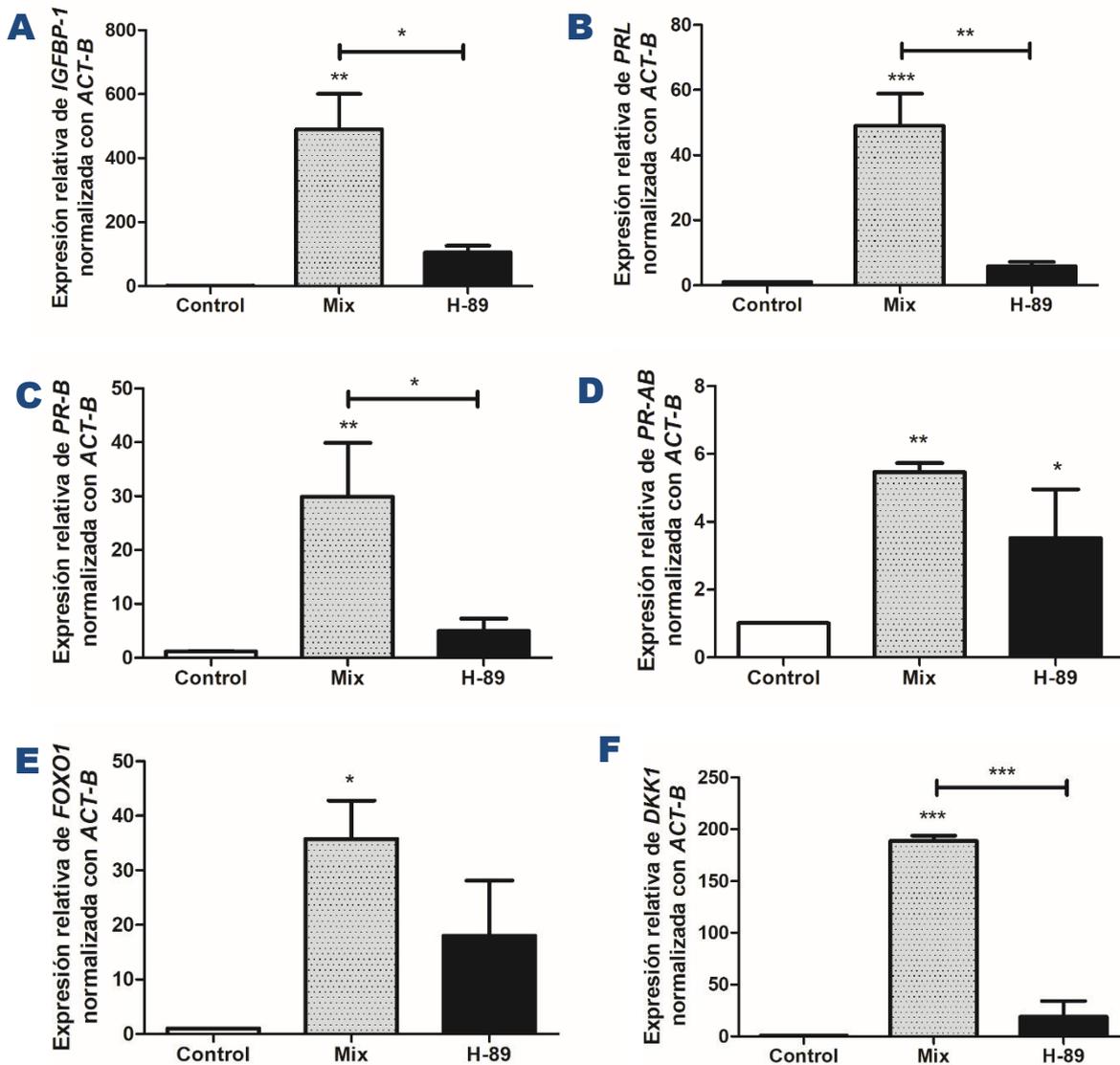


Figura 15. Efecto del inhibidor H-89 del PKA en la expresión de genes relacionados con la decidualización en la línea celular T-HESC. Expresión relativa de *IGFBP-1* (A), *PRL* (B), *PR-B* (C), *PR-AB* (D), *FOXO1* (E) y *DKK1* (F) normalizada con *ACT-B* analizada mediante RT-qPCR, utilizando el método del $\Delta\Delta CT$. Los tratamientos de decidualización (Mix) se realizaron con MPA (1 μ M), E2 (10 nM) y AMPc (0.5 mM) durante 24 h por triplicado en la línea celular T-HESC, el inhibidor (H89) se añadió por separado a una concentración de 10^{-6} M una hora antes del tratamiento de decidualización. Los valores mostrados son promedios \pm EEM. ***P<0.0001, **P<0.005, *P<0.05. Prueba ANOVA de una vía; prueba Post hoc de Tukey.

8. Discusión

La deciduación de las HESC es un proceso de vital importancia para la reproducción ya que es imprescindible para la implantación del blastocisto durante el embarazo (Makieva *et al.*, 2018). Anormalidades durante la deciduación son asociadas con infertilidad, abortos espontáneos y desórdenes uteroplacentarios como la preeclampsia (Suthaporn *et al.*, 2021; Neg *et al.*, 2020; Okada *et al.*, 2018).

A lo largo del tiempo, desde que se cimentaron los primeros estudios *in vitro* para estudiar a la deciduación, las técnicas y protocolos para inducir a dicho proceso han variado, estos cambios van desde el uso de diferentes inductores (como MPA en lugar de P4), hasta el tiempo de exposición a ellos. El artículo de revisión de Gellersen y Brosens reúne la mayoría de estos protocolos y destaca las diferencias entre cada uno, denotando que existe una gran heterogeneidad entre los estudios *in vitro* para analizar a la deciduación (Gellersen y Brosens, 2014). Los protocolos generalmente utilizados para inducir a la deciduación implican el tratamiento de HESC con 1) estradiol más progesterona o una progestina y 2) un factor o un inductor análogo de AMPc, o 3) una combinación entre este último más progesterona o progestina. La duración del tratamiento es otro factor que varía ampliamente entre estudios, el rango abarca desde unas cuantas horas (aproximadamente 6 h) hasta 10 (o más) días (Gellersen y Brosens, 2014).

Diversos grupos de investigación han reportado resultados diferentes que no han conducido hacia una ruta clara para elucidar el mecanismo por el cual se regulan los genes marcadores de este proceso; la mayoría de los estudios realizados en torno a la deciduación concuerdan en que es un proceso dependiente del receptor de progesterona (Gellersen y Brosens, 2014; Suthaporn *et al.*, 2021), mientras que en otros se observa que el AMPc a través de su efector río abajo, PKA, puede inducir la expresión de los genes relacionados con la deciduación de manera más prominente que la progesterona (Tulac *et al.*, 2006). Además, se sabe que hay una estrecha relación entre los receptores de estrógenos (ER α y ER β) y el PR (Mylonas *et al.*, 2004).

Con el fin de esclarecer la participación de los compuestos generalmente utilizados para inducir la deciduación: MPA, E2 y 8-Br-AMPc, se emplearon antagonistas de receptores hormonales (MPP, PHTPP, ICI y RU486) y un inhibidor de PKA de la vía del AMPc (H-89), y se incluyeron en los tratamientos de deciduación en cultivos celulares de HESC, analizando su efecto sobre la expresión de los genes relacionados con la deciduación (*IGFBP-1*, *PRL*, *PR-B*, *PR-AB*, *FOXO-1* y *DKK1*) para de esta forma correlacionar el efecto de los compuestos inductores sobre la regulación de esta expresión.

8.1. Tratamiento para inducir la decidualización

En primera instancia, se debía comprobar que el protocolo propuesto en este trabajo para inducir a la decidualización efectivamente aumentaba la expresión de los genes marcadores *IGFBP-1* y *PRL*, y de los otros genes relacionados con este proceso: *PR-B*, *PR-AB*, *FOXO1* y *DKK1*, esto con el objetivo de asegurar un parámetro para poder contrastar el efecto de los antagonistas e inhibidores sobre la expresión de dichos genes.

En el presente estudio se empleó una mezcla de MPA (1 μ M), E2 (10 nM) y 8-bromo-AMPC (0.5 mM) durante 24 h para aumentar la expresión de los genes relacionados con la decidualización en la línea celular T-HESC; se emplearon estas concentraciones y tiempo de exposición debido a que previamente había sido demostrado por el equipo de trabajo que este tratamiento inducía la expresión de *IGFBP-1* y *PRL* de manera significativa a las 24 h (González, 2019; Retis-Resendiz, 2020) ya que en la literatura también se ha reportado este resultado (Gellersen y Brosens, 2014). Esta misma tendencia fue observada en los resultados obtenidos para el resto de los genes analizados (Figura 11), por lo que se puede decir que, en conjunto, la MPA, el E2 y el 8-Br-AMPC, inducen la expresión de los genes *IGFBP-1*, *PRL*, *PR-B*, *PR-AB*, *FOXO1* y *DKK1* a las 24 h de exposición en la línea celular T-HESC.

En la mayoría de los protocolos se emplea a la MPA en lugar de la P4 debido a que posee una mayor biodisponibilidad y el tiempo de tratamiento en cultivos celulares de HESC por lo general es menor en comparación con el uso de P4 (Schindler *et al.*, 2003; Suthaporn *et al.*, 2021; Gellersen y Brosens, 2014). La MPA es una progestina con efectos biológicos similares a la P4 (Schindler *et al.*, 2003) que puede interactuar con los receptores de progesterona al igual que la P4 y (Gellersen y Brosens, 2014), por lo tanto, su efecto en las HESC se traduce en el efecto de la P4.

Una vez demostrado el efecto inductor de la mezcla de compuestos proseguía esclarecer si específicamente alguno de los receptores o efectores de estas sustancias químicas regulaba el proceso de decidualización, para ello se emplearon antagonistas de receptores hormonales (MPP, PHTPP, ICI y RU486) y un inhibidor de la proteína cinasa A (PKA) de la vía del AMPC (H-89).

8.2. Regulación de los genes marcadores de la decidualización

Tanto IGFBP-1 como PRL son secretadas por el endometrio durante la fase secretora del ciclo menstrual, —cuando los niveles de progesterona están incrementados—, por lo tanto se ha determinado que la producción de ambas proteínas depende de la progesterona, es decir, la expresión de sus genes (*IGFBP-1* y *PRL*) es inducida y son regulados a través del receptor de progesterona (PR) (Rutanen et al., 1998; Gao et al., 2014; Suthaporn et al., 2021); por lo que se esperaría que en presencia de un antagonista del receptor de progesterona, como lo es RU486, la expresión de ambos marcadores disminuyera.

En este trabajo se obtuvieron resultados contrastantes entre sí: *IGFBP-1* disminuyó su expresión en presencia de todos los antagonistas e inhibidor empleados, mientras que *PRL* solo vio modificada su expresión en presencia de H-89 y RU486 y, en el último caso, en lugar de que ésta fuera disminuida se vio aumentada en presencia de este antagonista (Figura 12D).

Estos resultados nos indican tres puntos importantes sobre la regulación de la expresión de estos genes en la línea celular T-HESC: 1) que *IGFBP-1* parece ser más sensible al efecto de los antagonistas de receptores hormonales que *PRL*, hecho que en primera instancia tiene lógica ya que la inducción de este gen fue mucho mayor en comparación con la inducción observada en el caso de *PRL* (Figura 10); 2) *PRL* no está siendo afectado por el bloqueo de la vía de ER y el antagonismo en PR favorece aún más su expresión; y 3) que dentro de la mezcla de compuestos para inducir a la decidualización, el AMPc mediante la vía del PKA es el principal modulador de la expresión de estos genes, ya que cuando se bloquea esta vía su expresión disminuye drásticamente (Figura 15A-B).

Debido a que se requiere al E2 para inducir la expresión del receptor de progesterona a través de ER α (Makieva et al., 2018), tiene sentido que cuando se inhibe esta vía con MPP (antagonista selectivo de ER α) la expresión en los genes dependientes de P4 disminuya, como se observa con *IGFBP-1*. A pesar de que esto no se aprecia en el caso de *PRL*, como también se obtiene otro resultado inesperado para este gen (que el antagonismo de PR aumentó su expresión) nos orilla a pensar que deben realizarse más réplicas biológicas con menor dispersión en los resultados para comprobar que efectivamente la tendencia en los datos se sigue repitiendo, ya que incluso se ha reportado en otros estudios que el tratamiento con MPA aumenta la expresión de *PRL* en cultivos celulares primarios de HESC provenientes de cáncer de endometrio (Gu et al., 2022), por lo que al bloquear la vía del PR con RU486, la expresión del gen *PRL* debería disminuir como en el caso de *IGFBP-1*.

La explicación biológica para el resultado observado es que exista una retroalimentación negativa por parte de PR en la biosíntesis de *PRL*, o que el AMPc induzca mucho más la expresión de este gen al estar bloqueada la vía de PR; de hecho, hay reportes que indican que la *PRL* se encuentra mayormente regulada por AMPc durante el proceso de deciduización tanto a nivel de transcrito como de proteína en cultivos celulares de HESC (Telgmann y Gellersen, 1998).

En un estudio realizado por un grupo de investigación que quería observar los efectos del tiempo de exposición y concentración de la P4 en cultivos primarios de HESC, se encontró que la expresión de *IGFBP-1* depende directamente de la concentración de P4 a la que se someten los cultivos de HESC (Suthaporn *et al.*, 2021). Este estudio es importante ya que utilizan las mismas condiciones y concentraciones para inducir a la deciduización que en este trabajo y, a pesar de que solo midieron el efecto de la concentración de la P4, sería interesante averiguar lo que sucedería si se cambian las concentraciones de AMPc, ya que como observamos, parece tener un mayor efecto sobre la expresión de los genes marcadores de la deciduización (más adelante se profundizará en esta vía). No obstante, tomando como referencia este trabajo y los resultados obtenidos, podemos concluir que la expresión de *IGFBP-1* depende de la señalización de PR.

8.3. Genes relacionados con la deciduización en presencia de antagonistas de receptores hormonales

8.3.1. Expresión del receptor de progesterona

Para evaluar la regulación del PR en el contexto de la deciduización se analizó la expresión de sus isoformas: *PR-B* y *PR-AB*. Como *PR-A* es la isoforma predominante en las ESC (Makieva *et al.*, 2018), es de vital importancia hacernos una idea de lo que sucede con su expresión a partir del transcrito completo; no obstante, no hay que dejar de lado que algunos estudios denotan a la isoforma *PR-B* como vital para la deciduización (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2001)

De manera general, los transcritos *PR-B* y *PR-AB* siguen la misma tendencia que cuando se bloquea la vía del ER con antagonistas de ER durante la deciduización *in vitro* de las HESC: muestran una ligera disminución en su expresión frente a los antagonistas selectivos por algún subtipo de ER (MPP selectivo para ER α y PHTPP selectivo para ER β) y no sufren una alteración significativa con el antagonista no selectivo de ER (ICI 182,780) (Figura 13A-C). Es cuando se antagoniza a PR donde se observa una variación en el comportamiento de ambos

transcritos; en el caso de *PR-B* pareciera no tener algún efecto, mientras que con *PR-AB* se ve aumentada su expresión a niveles mucho mayores de los que logra la mezcla de compuestos para inducir la decidualización (Figura 13D). Esto podría indicarnos, como en el caso del gen de *PRL*, de una posible autorregulación negativa de este transcrito por su propio receptor; sin embargo, al igual que con *PRL*, es necesario realizar más réplicas biológicas que logren asegurar estos resultados de manera estadísticamente significativa.

A pesar de que no se obtiene un resultado estadísticamente significativo, sí se observa una tendencia de inhibición en la expresión de *PR-B* cuando se tratan a las HESC con MPP, antagonista selectivo de ER α . Esto tiene sentido ya que se ha reportado que el receptor ER α regula la expresión de PR (Prange-Kiel *et al.*, 2001); sin embargo, cuando las HESC son tratadas con ICI (antagonista no selectivo de ER) esta tendencia de disminución en la expresión no se mantiene, lo que nos podría indicar que tal vez el antagonista se está uniendo a otros tipos de receptores de ER dejando libre a ER α y por consiguiente, ocasionando el aumento en la expresión del transcrito de PR, pero para poder asegurar esto último también sería necesario realizar un análisis de la actividad de ICI, para corroborar que efectivamente posee una menor afinidad por ER α .

8.4. *FOXO1* y *DKK1*

FOXO1 y *DKK1* son otros genes cuya expresión se ve aumentada durante el proceso de decidualización (Wang *et al.*, 2020); *FOXO1* se puede unir al PR para modular la transcripción de genes relacionados con la apoptosis y el ciclo celular (Xing *et al.*, 2018), mientras que *DKK1* inhibe la señalización de Wnt, una familia de moléculas que desempeñan funciones fundamentales en la proliferación, diferenciación y polaridad celular, comunicación epitelio-mesénquima y embriogénesis (Makieva *et al.*, 2018; Tulac *et al.*, 2006). En un estudio publicado en el 2020 donde se realizó un análisis de la decidualización a nivel de “single-cell” se encontró que varios genes más, —además de *IGFBP-1* y *PRL*—, se encontraban regulados a la alta durante este proceso, entre ellos dos de los que más destacaban eran *FOXO1* y *DKK1*; por tal motivo se decidió evaluar la expresión de estos genes bajo las mismas condiciones de tratamiento que los otros relacionados con la decidualización, ya que un análisis de otros genes podría revelar mayor información sobre el mecanismo molecular de este proceso.

En este trabajo se corroboró que el tratamiento con E2, MPA y AMPc induce la expresión de estos genes después de 24 h de tratamiento en la línea celular T-HESC, un hecho novedoso ya que la mayoría de otros estudios publicados, al centrarse en *IGFBP-1* y *PRL* como

marcadores de la decidualización, no suelen reportar la expresión de otros genes a tan pocas horas de iniciar el tratamiento (Gellersen y Brosens, 2014).

A pesar de que no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos ni de una tendencia clara debida a la variación entre las réplicas, en el caso de *FOXO1* se ha reportado una inducción en la expresión de este gen por parte de la activación de la vía del AMPc/PKA en las HESC durante la decidualización (Makieva *et al.*, 2018) y que la eliminación de PGRMC1 induce la expresión de *FOXO1* en cultivos de ESC y promueve la expresión de marcadores de decidualización (Tsuru *et al.*, 2023); por lo que se esperaría que exista un efecto de inducción en el gen cuando las HESC son tratadas con el antagonista de PR (RU486) y de represión cuando se emplea al inhibidor de la vía del PKA (H-89), cosa que no se observa claramente (Figura 14B y 15E). Es posible que estos efectos no se observen debido a la variación en los datos como se observa también en el caso de los antagonistas de ER (Figura 14A) o a que haya una retroalimentación por parte de ambas vías que está enmascarando el efecto de la otra, en cuyo caso se podría realizar un tratamiento en conjunto, es decir, tratar a las HESC con RU486 y con H-89 de manera simultánea.

Se puede rescatar un resultado importante en el caso del gen *DKK1*: que el tratamiento con RU486 inhibe su expresión, por lo tanto, su expresión se encuentra regulada por el PR. Este último resultado es de suma importancia debido a que se encuentra respaldado por lo reportado por otro grupo de investigación en el 2006, donde analizan el efecto de RU486 sobre este mismo gen y realizan tratamientos para inducir la decidualización empleando a los inductores de manera individual; en ese estudio, se obtuvo también que el tratamiento con RU486 disminuye la expresión de *DKK1* a las 72 h del tratamiento con P4 y que no se obtiene una regulación del gen ni con E2 ni con AMPc de manera individual (Tulac *et al.*, 2006), en el primer caso concuerda con lo encontrado en este trabajo (Figura 14D) y es en el segundo caso lo que nos permite proponer un panorama más amplio con lo descrito en los resultados (Figura 15F): donde observamos que la inhibición de la señalización del AMPc/PKA sí disminuye de manera significativa la expresión de *DKK1*. Este último resultado nos permite proponer un posible mecanismo de regulación de este gen a través de PR que podría no estar sensibilizado de manera previa por AMPc como en el caso de los otros genes, pero que sí interfiere río abajo de la señalización de PR; no obstante, para aclarar mejor el mecanismo por el cual el AMPc está actuando sería necesario realizar también tratamientos individuales de los inductores de la decidualización como los realizados por Tulac y su grupo de investigación.

8.5. El AMPc es clave para la deciduación

En casi todos los genes analizados, —excepto *PR-AB* y *FOXO1*—, se obtuvo que H-89 (un inhibidor de PKA), disminuyó su expresión comparada con la inducción ocasionada por el tratamiento de deciduación, incluso de manera más marcada que RU486, esto es de suma importancia y aporta un gran avance en la búsqueda por esclarecer el mecanismo por el cual se regulan los genes asociados a la deciduación durante este proceso. Como se sabe, la deciduación es un proceso dependiente de P4 (Makieva *et al.*, 2018); incluso alteraciones en esta vía como la resistencia a la progesterona se asocia con una deciduación defectuosa y el posterior establecimiento de patologías como la endometriosis (Suthaporn *et al.*, 2021; Neg *et al.*, 2020; Okada *et al.*, 2018); sin embargo, también se ha descrito que en los modelos de deciduación *in vitro* la inducción de los genes marcadores es mucho mayor y con un menor tiempo de exposición con AMPc en comparación con P4 o MPA, lo que sugiere una posible sensibilización por parte de este segundo mensajero en las HESC (Tulac *et al.*, 2006).

Los hallazgos encontrados en este trabajo junto con lo establecido por otros grupos de investigación nos indican que el papel del AMPc es crucial para el desarrollo de una óptima deciduación tanto en una previa sensibilización de PR como al integrarse en la vía de señalización de este receptor río abajo. Tomando en cuenta que el AMPc actúa en muchas otras vías de señalización, sería adecuado analizar más inhibidores de sus posibles vías para aclarar de una manera más detallada el mecanismo específico por el que actúa en la deciduación y así poder presentar avances en la investigación de este proceso. Por ejemplo, en un estudio publicado en el 2022 donde analizaron el efecto del H89 y un activador de AKT, encontraron que el AMPc regula la expresión de los genes marcadores de la deciduación mediante estas dos vías, pero también que interfiere en la expresión de *CD55*, un gen que codifica para el factor acelerador de descomposición (DAF), una proteína asociada al complemento y cuya disminución se ha relacionado con abortos espontáneos y endometrio de mujeres infértiles (Tang *et al.*, 2022); esto deja en evidencia el enorme panorama por indagar en la ruta del AMPc.

Si bien, a lo largo de la discusión se han mencionado puntos particulares donde pudieran hacerse mejoras en el protocolo de esta investigación y la adición de más réplicas biológicas para el establecimiento de resultados estadísticamente significativos en algunos casos, cabe señalar que los resultados de este estudio presentan bases y hallazgos importantes que pueden ayudar a entender mejor el proceso de deciduación y por ende, en las patologías asociadas a este proceso fisiológico que afectan la calidad de vida de las mujeres.

9. Conclusiones

El AMPc juega un papel clave en la regulación de la expresión de genes asociados a la decidualización a través de la vía de PKA y de la sensibilización del receptor de progesterona (PR). La vía estrogénica a través de sus receptores nucleares (nER) no parece tener un efecto significativo sobre la expresión de estos genes, lo que nos sugiere que la decidualización *in vitro* en cultivos celulares de HESC es principalmente regulada por P4 y AMPc; además de que estos resultados podrían ser extrapolables a otros genes regulados a la alta durante la decidualización como *FOXO1* y *DKK1*.

10. Perspectivas

Otro aspecto que no se mencionó anteriormente y que podría sumar a la confiabilidad de los datos es someter a los cultivos celulares de T-HESC a un mayor tiempo de exposición con los antagonistas previo al tratamiento de decidualización. En este trabajo se decidió someter a los cultivos a una sensibilización de 1 h con los antagonistas por cuestiones prácticas y porque en los estudios de referencia variaba el tiempo de exposición entre un grupo de investigación y otro, y porque se encontró un estudio donde también utilizan 1 h de exposición previa al tratamiento de decidualización (Tang *et al.*, 2022), por lo que sería relevante analizar el efecto de diferentes tiempos de exposición a los antagonistas y al inhibidor sobre la expresión de los genes analizados. La concentración de los antagonistas no debería ser una variable importante por considerar, ya que en los artículos analizados ya se ha demostrado que a la concentración utilizada en este trabajo (10^{-6} M) se obtiene el mayor efecto de antagonismo de los compuestos incluidos (Young *et al.*, 2021; Du *et al.*, 2019; Catalano *et al.*, 2003; Ogo *et al.*, 2014; Tulac *et al.*, 2006).

Un compuesto que se consideró incluir en el protocolo del trabajo y que no se incluyó por falta de tiempo, —debido a que su entrega tardó en realizarse—, es ESI 05, un antagonista de la vía EPAC1/2 del AMPc, asociada también al proceso de decidualización (Makieva *et al.*, 2018). Este compuesto podría ayudar a dilucidar a mayor profundidad el mecanismo de acción del AMPc durante la decidualización; esto, aunado a otros experimentos que se están realizando por el grupo de trabajo donde se analiza el comportamiento de los inductores de manera individual (resultados próximos a publicarse), proveerán bases sólidas para establecer novedosos avances en la investigación de este proceso y la realización de un artículo de investigación. Además, como en el laboratorio de trabajo también se cuenta con

la posibilidad de obtener cultivos primarios de HESC de pacientes con o sin patologías, sería también interesante incluir el protocolo realizado en este trabajo en esos cultivos.

11. Referencias

- Ashary, N., Tiwari, A., & Modi, D. (2018). Embryo implantation: war in times of love. *Endocrinology*, *159*(2), 1188-1198.
- Barrett, K. E., Barman, S., Brooks, H., & Yuan, J. (2020). *Ganong Fisiología médica*, México. McGrawHill.
- Berbic, M., & Fraser, I. S. (2013). Immunology of normal and abnormal menstruation. *Women's Health*, *9*(4), 387-395.
- Bhurke, A. S., Bagchi, I. C., & Bagchi, M. K. (2016). Progesterone-regulated endometrial factors controlling implantation. *American journal of reproductive immunology*, *75*(3), 237-245.
- Björnström, L., & Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular endocrinology*, *19*(4), 833-842.
- Bottino, M. C., & Lanari, C. (2010). Extra nuclear localization of steroid receptors and non genomic activation mechanisms. *Medicina*, *70*(2), 173-184.
- Catalano, R. D., Yanaihara, A., Evans, A. L., Rocha, D., Prentice, A., Saidi, S., ... & Smith, S. K. (2003). The effect of RU486 on the gene expression profile in an endometrial explant model. *Molecular human reproduction*, *9*(8), 465-473.
- Chen, G. T., Getsios, S., & MacCalman, C. D. (1999). Cadherin-11 is a hormonally regulated cellular marker of decidualization in human endometrial stromal cells. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, *52*(2), 158-165.
- Cheng, X., Ji, Z., Tsalkova, T., & Mei, F. (2008). Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, *40*(7), 651-662.
- Conneely, O. M., Mulac-Jericevic, B., & Lydon, J. P. (2003). Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids*, *68*(10-13), 771-778.
- Cuadrado-Torroglosa, I., García-Velasco, J. A., & Alecsandru, D. (2023). New insights into decidualization: immunological and genetic factors. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, *35*(3), 193-199.
- Dorostghoal, M., Moramezi, F., & Keikhah, N. (2018). Overexpression of endometrial estrogen receptor-alpha in the window of implantation in women with unexplained infertility. *International journal of fertility & sterility*, *12*(1), 37.

- Druckmann, R., & Rohr, U. D. (2002). IGF-1 in gynaecology and obstetrics: update 2002. *Maturitas*, 41, 65-83.
- Du, Y., Zhang, Z., Xiong, W., Li, N., Liu, H., He, H., ... & Zhang, L. (2019). Estradiol promotes EMT in endometriosis via MALAT1/miR200s sponge function. *Reproduction*, 157(2), 179-188.
- Evans, J., Salamonsen, L. A., Winship, A., Menkhorst, E., Nie, G., Gargett, C. E., & Dimitriadis, E. (2016). Fertile ground: human endometrial programming and lessons in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(11), 654-667.
- Fox, S. (2011). *Fisiología humana*: McGraw-Hill, pp 716-717.
- García-Porrero J., Hurlé J. (2020). *Anatomía humana*: Editorial Médica Panamericana, pp 571-583.
- Garrán, A. D. T., & Dávila, J. T. (2005). New biochemical and molecular aspects of estrogens action. *Ginecología y Obstetricia de México*, 73(08), 436-442.
- Gargett, C. E., Nguyen, H. P., & Ye, L. (2012). Endometrial regeneration and endometrial stem/progenitor cells. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 13, 235-251.
- Gellersen, B., & Brosens, J. J. (2014). Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocrine reviews*, 35(6), 851-905.
- Giacomini, E., Ottolina, J., Sanchez, A. M., Papaleo, E., & Viganò, P. (2018). Inside the endometrial cell signaling subway: mind the gap (s). *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2477.
- Grimm, S. L., Hartig, S. M., & Edwards, D. P. (2016). Progesterone receptor signaling mechanisms. *Journal of molecular biology*, 428(19), 3831-3849.
- Greenhill, C (2018). Reproductive endocrinology: Hypoxia in endometrial repair. *Nat. Rev. Endocrinol*, 14, 130.
- González-García, I. N. (2019). *Efecto de la decidualización in vitro sobre la expresión de los receptores membranales a progesterona en células estromales de tejido con endometriosis* [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México—Facultad de Química]. TESIUNAM.
- Hill, K. K., Roemer, S. C., Churchill, M. E., & Edwards, D. P. (2012). Structural and functional analysis of domains of the progesterone receptor. *Molecular and cellular endocrinology*, 348(2), 418-429.
- Hewitt, S. C., Deroo, B. J., Hansen, K., Collins, J., Grissom, S., Afshari, C. A., & Korach, K. S. (2003). Estrogen receptor-dependent genomic responses in the uterus mirror the biphasic physiological response to estrogen. *Molecular endocrinology*, 17(10), 2070-2083.

- Houshdaran, S., Oke, A. B., Fung, J. C., Vo, K. C., Nezhat, C., & Giudice, L. C. (2020). Steroid hormones regulate genome-wide epigenetic programming and gene transcription in human endometrial cells with marked aberrancies in endometriosis. *PLoS genetics*, *16*(6), e1008601.
- Johannessen, M., Delghandi, M. P., & Moens, U. (2004). What turns CREB on?. *Cellular signalling*, *16*(11), 1211-1227.
- Kakita-Kobayashi, M., Murata, H., Nishigaki, A., Hashimoto, Y., Komiya, S., Tsubokura, H., ... & Okada, H. (2020). Thyroid hormone facilitates in vitro decidualization of human endometrial stromal cells via thyroid hormone receptors. *Endocrinology*, *161*(6), bqaa049.
- Kajihara, T., Brosens, J. J., & Ishihara, O. (2013). The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy. *Medical molecular morphology*, *46*, 61-68.
- Kaya, H. S., Hantak, A. M., Stubbs, L. J., Taylor, R. N., Bagchi, I. C., & Bagchi, M. K. (2015). Roles of progesterone receptor A and B isoforms during human endometrial decidualization. *Molecular endocrinology*, *29*(6), 882-895.
- Kim, S. M., & Kim, J. S. (2017). A review of mechanisms of implantation. *Development & reproduction*, *21*(4), 351.
- Khatun, M., Meltsov, A., Lavogina, D., Loid, M., Kask, K., Arffman, R. K., ... & Piltonen, T. T. (2021). Decidualized endometrial stromal cells present with altered androgen response in PCOS. *Scientific Reports*, *11*(1), 16287.
- Kusama, K., Yoshie, M., Tamura, K., Daikoku, T., Takarada, T., & Tachikawa, E. (2014). Possible roles of the cAMP-mediators EPAC and RAP1 in decidualization of rat uterus. *Reproduction*, *147*(6), 897-906.
- Liang, X. H., Deng, W. B., Liu, Y. F., Liang, Y. X., Fan, Z. M., Gu, X. W., ... & Yang, Z. M. (2016). Non-coding RNA LINC00473 mediates decidualization of human endometrial stromal cells in response to cAMP signaling. *Scientific reports*, *6*(1), 22744.
- Makieva, S., Giacomini, E., Ottolina, J., Sanchez, A. M., Papaleo, E., & Viganò, P. (2018). Inside the endometrial cell signaling subway: mind the gap (s). *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9), 2477.
- Maruyama, T., & Yoshimura, Y. (2008). Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. *Endocrine journal*, *55*(5), 795-810.
- Maybin, J. A., & Critchley, H. O. (2015). Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. *Human reproduction update*, *21*(6), 748-761.
- Mote, P. A., Balleine, R. L., McGowan, E. M., & Clarke, C. L. (2000). Heterogeneity of progesterone receptors A and B expression in human endometrial glands and stroma. *Human Reproduction*, *15*(suppl_3), 48-56.

Mylonas, I., Jeschke, U., Shabani, N., Kuhn, C., Balle, A., Kriegel, S., ... & Friese, K. (2004). Immunohistochemical analysis of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and progesterone receptor in normal human endometrium. *Acta histochemica*, 106(3), 245-252.

Nair, R. R., Jain, M., & Singh, K. (2011). Reduced expression of gap junction gene connexin 43 in recurrent early pregnancy loss patients. *Placenta*, 32(8), 619-621.

Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., ... & Gustafsson, J. Å. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiological reviews*, 81(4), 1535-1565.

Okada, H., Tsuzuki, T., & Murata, H. (2018). Decidualization of the human endometrium. *Reproductive medicine and biology*, 17(3), 220-227.

Ogo, Y., Taniuchi, S., Ojima, F., Hayashi, S., Murakami, I., Saito, Y., ... & Takahashi, S. (2014). IGF-1 gene expression is differentially regulated by estrogen receptors α and β in mouse endometrial stromal cells and ovarian granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development*, 60(3), 216-223.

Prange-Kiel, J., Rune, G. M., Zwirner, M., Wallwiener, D., & Kiesel, L. (2001). Regulation of estrogen receptor α and progesterone receptor (isoform A and B) expression in cultured human endometrial cells. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, 109(04), 231-237.

Ragab, M. A., Elagawany, M., Daabees, H., Ahmed, A. S. F., Awad, E. M., Billon, C., ... & Kassab, S. E. (2022). Structure-based design and synthesis of conformationally constrained derivatives of methyl-piperidinopyrazole (MPP) with estrogen receptor (ER) antagonist activity. *Bioorganic Chemistry*, 119, 105554.

Retis-Resendiz, A. M. (2020). *Efecto de la medroxiprogesterona, estradiol y AMPc en los niveles de la marca de histona H3K4me3 en cultivos primarios de células estromales de pacientes con endometriosis* [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México—Facultad de Química]. TESIUNAM, 29-33.

Retis-Resendiz, A. M., Cid-Cruz, Y., Velázquez-Hernández, D. M., Romero-Reyes, J., León-Juárez, M., García-Gómez, E., ... & Vázquez-Martínez, E. R. (2024). cAMP regulates the progesterone receptor gene expression through the protein kinase A pathway during decidualization in human immortalized endometrial stromal cells. *Steroids*, 203, 109363.

Retis-Resendiz, A. M., González-García, I. N., León-Juárez, M., Camacho-Arroyo, I., Cerbón, M., & Vázquez-Martínez, E. R. (2021). The role of epigenetic mechanisms in the regulation of gene expression in the cyclical endometrium. *Clinical Epigenetics*, 13(1), 116.

Rutanen, E. M., KOISTINEN, R., WAHLSTROM, T., BOHN, H., RANTA, T., & SEPPALA, M. (1985). Synthesis of placental protein 12 by human decidua. *Endocrinology*, 116(4), 1304-1309.

- Salsano, S., González-Martín, R., Quiñonero, A., Pérez-Debén, S., & Domínguez, F. (2021). Deciphering the role of PGRMC1 during human decidualization using an in vitro approach. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 106(8), 2313-2327.
- Salsano, S., Quinonero, A., Pérez, S., Gómez, T. G., Simón, C., & Dominguez, F. (2017). Dynamic expression of PGRMC1 and SERBP1 in human endometrium: an implication in the human decidualization process. *Fertility and Sterility*, 108(5), 832-842.
- Sigurgeirsson, B., Åmark, H., Jemt, A., Ujvari, D., Westgren, M., Lundeberg, J., & Gidlöf, S. (2017). Comprehensive RNA sequencing of healthy human endometrium at two time points of the menstrual cycle. *Biology of reproduction*, 96(1), 24-33.
- Stefanoska, I., Krivokuća, M. J., Vasilijčić, S., Čujić, D., & Vićovac, L. (2013). Prolactin stimulates cell migration and invasion by human trophoblast in vitro. *Placenta*, 34(9), 775-783.
- Suthaporn, S., Jayaprakasan, K., Thornton, J. G., Walker, K. F., Castellanos, M., May, S., ... & Maalouf, W. E. (2021). Evaluating the influence of progesterone concentration and time of exposure on in vitro endometrial decidualisation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 528, 111242.
- Talukdar, K. R., Saikia, P., & Sarma, H. N. (2022). Kruppel-like factor 5 (Klf5) in fetal-maternal tissue during periimplantation and effects of ovarian steroid hormone antagonist on its expression during uterine receptivity of albino mice. *Middle East Fertility Society Journal*, 27(1), 1-17.
- Tang, Z., Wang, L., Huang, Z., Guan, H., Leung, W., Chen, X., ... & Zhang, W. (2022). CD55 is upregulated by cAMP/PKA/AKT and modulates human decidualization via Src and ERK pathway and decidualization-related genes. *Molecular Reproduction and Development*, 89(5-6), 256-268.
- Ticconi, C., Di Simone, N., Campagnolo, L., & Fazleabas, A. (2021). Clinical consequences of defective decidualization. *Tissue and Cell*, 72, 101586.
- Tsuru, A., Yoshie, M., Negishi, R., Mukoyama, T., Yonekawa, R., Kojima, J., ... & Tamura, K. (2023). Regulatory action of PGRMC1 on cyclic AMP-mediated COX2 expression in human endometrial cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 153(4), 188-196.
- Tulac, S., Overgaard, M. T., Hamilton, A. E., Jumbe, N. L., Suchanek, E., & Giudice, L. C. (2006). Dickkopf-1, an inhibitor of Wnt signaling, is regulated by progesterone in human endometrial stromal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(4), 1453-1461.
- Vallejo, G., Ballare, C., Lino Barañao, J., Beato, M., & Saragueta, P. (2005). Progestin activation of nongenomic pathways via cross talk of progesterone receptor with estrogen receptor β induces proliferation of endometrial stromal cells. *Molecular endocrinology*, 19(12), 3023-3037.

Vicent, G. P., Nacht, A. S., Font-Mateu, J., Castellano, G., Gaveglia, L., Ballaré, C., & Beato, M. (2011). Four enzymes cooperate to displace histone H1 during the first minute of hormonal gene activation. *Genes & development*, 25(8), 845-862.

Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., & Marc, J. (2014). The many faces of estrogen signaling. *Biochemia medica*, 24(3), 329-342.

Wang, W., Vilella, F., Alama, P., Moreno, I., Mignardi, M., Isakova, A., ... & Quake, S. R. (2020). Single-cell transcriptomic atlas of the human endometrium during the menstrual cycle. *Nature Medicine*, 26(10), 1644-1653.

Xu, C., Zhao, W., Huang, X., Jiang, Z., Liu, L., Cui, L., ... & Du, M. (2021). TORC2/3-mediated DUSP1 upregulation is essential for human decidualization. *Reproduction*, 161(5), 573-580.

Yu, J., Wu, J., Bagchi, I. C., Bagchi, M. K., Sidell, N., & Taylor, R. N. (2011). Disruption of gap junctions reduces biomarkers of decidualization and angiogenesis and increases inflammatory mediators in human endometrial stromal cell cultures. *Molecular and cellular endocrinology*, 344(1-2), 25-34.

Zhu, H., Hou, C. C., Luo, L. F., Hu, Y. J., & Yang, W. X. (2014). Endometrial stromal cells and decidualized stromal cells: origins, transformation and functions. *Gene*, 551(1), 1-14.