

Nuevos abordajes *in vitro* para el estudio del eje embrio-endometrial

New in vitro approaches to study embryo-endometrial dialogue

Laura Fernández¹, Elizabeth Soczewski¹, María Soledad Gori¹, Lucila Gallino¹, Gustavo Martínez², Marcela Irigoyen², Claudia Pérez Leirós¹, Rosanna Ramhorst¹ y Esteban Grasso¹.

¹ Laboratorio de Inmunología Reproductiva y de la Fertilidad

CONICET, Universidad de Buenos Aires. Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN). Buenos Aires, Argentina.

² FERTILIS Medicina Reproductiva. San Isidro, Buenos Aires, Argentina.

Resumen

El establecimiento del embarazo requiere un diálogo entre un embrión competente y un endometrio receptivo. Recientemente se ha propuesto que la decidua tiene la capacidad de sensor la calidad embrionaria limitando la invasión de blastocistos inviábiles. Los mecanismos involucrados no están completamente elucidados, lo cual se debe parcialmente a la falta de modelos *in vivo* adecuados.

El objetivo de este trabajo es estudiar el sentido de la calidad embrionaria por parte de las células decidualizadas utilizando distintos modelos *in vitro*: 1) de **decidualización**, usando la línea celular HESC; 2) de **interacción embrio-endometrial**, utilizando células HESC decidualizadas y medios condicionados de blastocistos (MCB); y 3) de **invasión trofoblástica**, mediante el co-cultivo de células HESC con esferoides de células trofoblásticas (línea celular Swan 71). La decidualización *in vitro* indujo la expresión de marcadores característicos (IGFBP1, PRL, KLF13) así como la expresión de quimioquinas (SDF-1, MCP-1 e IL-8). Al evaluar el efecto de los MCB sobre las células decidualizadas, observamos

un incremento de SDF-1 con los MCB provenientes de blastocistos de desarrollo competente (DC), mientras que los de desarrollo detenido (DD) indujeron MCP-1 y la actividad de MMP-9, ambos asociados a la remodelación endometrial y al inicio de la menstruación. Finalmente, el modelo de invasión *in vitro* mostró que las células decidualizadas permiten una mayor invasión (vs no diferenciadas), lo cual se sostiene en el tratamiento con MCB de DC, mientras que se restringe con MCB de DD. Estos resultados sugieren que los MCB de DC favorecen la homeostasis inmune, mientras que los MCB de DD inducirían un microambiente hostil asociado a la menstruación.

Palabras clave: implantación, calidad embrionaria, decidualización, modelos *in vitro*

Summary

Early pregnancy establishment requires a successful interaction between a competent embryo and a receptive endometrium. Particularly, it has been recently proposed that the decidua is able to sense embryo quality allowing the implantation of competent embryos while limiting the invasion of impaired development ones. The mechanisms involved in this process are not completely elucidated, which is partially due to the lack of suitable *in vivo* models.

Here we will study the endometrial selection of human embryos using the following *in vitro* models: 1) a **decidualization model** using the HESC cell line, 2) an **embryo endometrial interaction model** using decidualized HESC cells and blastocyst conditioned media (BCM); and 3) a **trophoblast invasion model**, where HESC cells are co cultured with trophoblastic cells spheroids from Swan 71 cell line. We found that *in vitro* decidualization process induces the expression of specific markers (IGBP1, PRL and KLF13) and

chemokines (SDF-1, MCP-1 and IL-8). When BCM effect on decidualized cells was evaluated, we observed increased levels of SDF-1 on normal development (ND) BCM stimulation, while impaired development (ID) BCM induced MCP-1 expression and MMP-9 activity, which are both associated to endometrial remodeling and menstruation induction. Finally, the invasion model showed that decidualized cells allow a higher invasion index compared to not decidualized ones. Invasion index remained elevated with ND BCM, while ID BMC reduced it. These results suggest that ND BCM promotes the immune homeostasis, while ID BCM would induce a hostile microenvironment associated to menstruation.

Key words: implantation, embryo quality, decidualization, *in vitro* models

Introducción

La reproducción humana es un proceso altamente complejo que presenta una eficiencia relativamente baja en comparación con otras especies (1). Para que el embarazo se produzca, debe ocurrir una serie de eventos temporalmente coordinados: la ovulación, la copulación, la fecundación y, finalmente, la implantación e invasión trofoblástica. Para esto último, no solo se requiere de un embrión competente y de un endometrio receptivo, sino también de un “diálogo embrio-endometrial” exitoso. Dicho diálogo está mediado por factores producidos localmente que inducen circuitos tanto autócrinos como parácrinos (2).

Durante la fase secretoria del ciclo menstrual las células endometriales se decidualizan, volviéndose receptivas a la implantación embrionaria. Desde una perspectiva fisiológica, la decidua presenta características y funciones esenciales para la implantación y placentación: la capacidad de regular la invasión trofoblástica, de controlar la calidad del embrión y de modular la respuesta inmune local (3). Estos cambios se producen gracias a la

modulación de la expresión de distintos genes, tales como citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, factores de crecimiento, quimioquinas y sus receptores, entre otros (4).

En los últimos años se ha propuesto que entre los 2 a 4 días posteriores a la implantación embrionaria existe un periodo denominado “ventana de selección natural de embriones”. En esta etapa, las células decidualizadas actúan como biosensores de la calidad embrionaria, permitiendo únicamente la continuidad de la invasión de embriones viables. En este sentido, ensayos *in vitro* demuestran que las células decidualizadas responden a los embriones con desarrollo detenido inhibiendo la secreción de distintos inmunomoduladores y factores pro-implantatorios (4,5). No obstante, aún se desconocen cuáles son los mediadores secretados por el blastocisto que modulan la respuesta de las células deciduales, así como los mecanismos involucrados.

El estudio de la implantación embrionaria y la formación de la interfase materno-fetal plantean un gran desafío desde el punto de vista ético y práctico debido, por un lado, a la falta de modelos *in vivo* que representen adecuadamente estos procesos en el ser humano y, por el otro, a que la posibilidad de utilizar blastocistos para investigación depende de la legislación de cada país. Particularmente, en Argentina existen limitaciones legales para la obtención y el uso de muestras humanas, tales como blastocistos o placentas de primer trimestre de embarazos normales. Asimismo, existen diferencias importantes entre la gestación en humanos y otras especies, lo cual limita el uso de animales como modelos *in vivo*. Por ejemplo, en el ser humano la decidualización es cíclica e independiente de la fecundación del embrión, mientras que en murinos sólo ocurre en presencia del blastocisto. Si bien el modelo animal más representativo lo constituyen los primates, el uso de los mismos es dificultoso e incluso cuestionado desde el punto de vista ético (6,7). Estas limitaciones han llevado al desarrollo de múltiples modelos *in vitro* que, aunque no sean capaces de simular totalmente los procesos de implantación y placentación, permiten estudiar ciertos aspectos de los mismos

(8,9). En este sentido, en nuestro laboratorio estudiamos la interfase materno-placentaria utilizando líneas celulares humanas de trofoblasto, tanto de primer como de tercer trimestre, y de estroma endometrial. Además, utilizamos un modelo *in vitro* de decidualización que nos permite evaluar los mecanismos celulares involucrados en este proceso. A su vez, estudiamos el diálogo embrio-endometrial estimulando a las células decidualizadas con medios condicionados de blastocistos humanos obtenidos de tratamientos de fertilización *in vitro* (FIV/ICSI). Este modelo nos permite estudiar la respuesta de las células decidualizadas a los factores solubles secretados por el embrión. Por último, utilizamos un modelo *in vitro* de implantación embrionaria que simula la unión y la invasión del blastocisto a la decidua (9).

En el presente trabajo nos propusimos evaluar el eje embrio-endometrial enfocándonos particularmente en la capacidad de las células decidualizadas de sensar la calidad embrionaria y de contribuir a la adhesión e invasión de aquellos blastocistos con desarrollo competente. Para ello utilizamos distintos abordajes experimentales como aproximación a los procesos que ocurren fisiológicamente en humanos. Particularmente, utilizamos modelos *in vitro* de decidualización, de interacción embrio-endometrial y de implantación embrionaria. De este modo evaluaremos la expresión y la cinética de distintos marcadores característicos de decidualización, la capacidad de las células deciduales de responder diferencialmente a los medios condicionados de blastocistos de acuerdo a la calidad de los mismos y de modular la adhesión e invasión de células trofoblásticas.

Materiales y métodos

Líneas celulares

Se utilizaron líneas celulares de citotrofoblasto humano de primer trimestre (Swan 71) y de estroma endometrial humano (HESC). Las células fueron cultivadas en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10% suero fetal bovino, penicilina (50 U/ml),

estreptomina (50 µg/ml) y glutamina (2 mM). Para los distintos ensayos, las células HESC fueron cultivadas en placas de 24 pocillos hasta alcanzar un 70% de confluencia, momento en que se inician los distintos tratamientos. Las mencionadas líneas celulares fueron cedidas gentilmente por el Dr. Gil Mor (Universidad de Yale, Estados Unidos).

Modelo in vitro de decidualización

Las células HESC fueron cultivadas en placas de 24 pocillos en medio completo en presencia de medroxiprogesterona (MPA) 10^{-7} M y dibutilil AMPc $2,5 \cdot 10^{-3}$ M durante 8 días, renovando el estímulo cada 48h. El último día de tratamiento, los estímulos de decidualización fueron removidos (Figura 1).

Modelo in vitro de diálogo embrio-endometrial

Las células HESC decidualizadas fueron estimuladas durante 24h con 30µl de medios condicionados de blastocistos (MCB) humanos en un volumen final de 300µl. Finalmente, se recuperaron las células o su sobrenadante para posteriores análisis (Figura 1). Como control, las células decidualizadas no tratadas con MCB fueron estimuladas con el medio comercial en el cual se cultivan los blastocistos (G2 plus, Vitrolife).

Los MCB humanos fueron donados por FERTILIS Medicina Reproductiva (San Isidro, Buenos Aires). Los oocitos fecundados se obtuvieron de pacientes que se realizaron fecundaciones *in vitro* como tratamiento terapéutico. Dichos oocitos fecundados se cultivaron individualmente durante 5 días en medio comercial (G2 plus, Vitrolife).

Una vez constatada la fecundación, los oocitos con dos pronúcleos fueron cultivados hasta el Día 3 en grupos de 5 en gotas de 50 µl de medio G1 plus (Vitrolife) bajo aceite Ovoil (Vitrolife), para luego pasarlos a cultivo individual en gotas de 35µl de medios G2 plus

(Vitrolife) hasta el Día 5. Las condiciones de cultivo fueron: 5% O₂, 6% CO₂, sin humidificación y a 37°C.

En el momento de la transferencia de los blastocistos, los medios se recolectaron y se congelaron a -20°C. Antes de transferir los blastocistos, se evaluó la calidad de los mismos según el consenso de Estambul (10). Los medios condicionados derivados de blastocitos con posibilidades de implantar (que fueron transferidos o criopreservados para futuras transferencias) fueron clasificados como de desarrollo competente (DC), mientras que los aquellos que se detuvieron en el estadio de embrión temprano se clasificaron como de desarrollo detenido (DD)

Modelo in vitro de implantación embrionaria

Células trofoblásticas humanas de la línea celular Swan71 fueron cultivadas en placas de baja adherencia durante 48h para permitir la formación de estructuras esféricas denominadas esferoides similares a blastocistos (ESB). Los ESB carecen de macizo celular interno, no obstante, su superficie remeda al trofoectodermo del blastocisto, la capa que interacciona con las células epiteliales y deciduales. La viabilidad de los ESB fue evaluada por tinción con azul de Trypan (viabilidad >99%). Tras esto, los ESB fueron seleccionados morfológicamente bajo lupa y marcados con la sonda fluorescente CFSE. Luego, fueron transferidos a un pocillo de células HESC en monocapa (10-15 ESB por pocillo), las cuales a su vez fueron previamente tratadas con distintos estímulos, según se indica en cada caso. Los co-cultivos fueron monitoreados mediante microscopía de fluorescencia (Olympus Lifesciences, USA) durante 48h. Finalmente, se trazó una elipse alrededor de cada ESB con el software ImageJ y se calculó el índice de invasión como “ $1 - (\text{eje menor/eje mayor})$ ” (Figura 2).

PCR en tiempo final y en tiempo real

Las células recuperadas luego de los distintos tratamientos fueron resuspendidas en Trizol (Life Technologies), se extrajo el ARN total y se generó el ADN copia (ADNc) utilizando transcriptasa reversa MMLV, inhibidor de RNAsas y oligo dT (Promega, USA) como se describió previamente (11). La PCR en tiempo real se llevó a cabo en un termociclador BioRad MyiQ2 utilizando MasterMix (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se muestran relativizados a la condición considerada control en cada ensayo (células no decidualizadas o células decidualizadas estimuladas con G2 plus, según el ensayo), y fueron normalizados a la expresión del gen GAPDH. Para determinar la presencia o ausencia de expresión de marcadores de decidualización se utilizó PCR a tiempo final y el resultado se reveló mediante electroforesis en gel de agarosa. Las secuencias de primers se muestran en la Tabla 1.

ELISA

Para la cuantificación de IL-8 en sobrenadantes de cultivo se utilizó la técnica de ELISA sándwich (BD Biosciences, USA) y se procedió de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, el anticuerpo específico anti IL-8 fue adsorbido a la placa y, tras el bloqueo con PBS 2% SFB, se incubaron las muestras y la curva estándar. Posteriormente se incubó con el anticuerpo policlonal anti-IL-8 conjugado con biotina y luego con estreptavidina conjugada a HRP. Finalmente, se agregó el sustrato de reacción (OPD) y luego una solución de H₂SO₄ 4N para detener la reacción. El revelado se llevó a cabo determinando la densidad óptica a 450 nm mediante un lector de placas y los resultados se expresaron en ng/ml.

Zimografía

Para la cuantificación de la actividad de metaloproteinasas se utilizó la técnica de zimografía. Brevemente, se realizó una electroforesis de proteínas sembrando sobrenadantes de células decidualizadas estimuladas con MCB de DC o DD. Se utilizó un gel de poliacrilamida 10% con agregado de gelatina (1 mg/ml) y un gel concentrador de poliacrilamida al 5%. Este procedimiento se realizó por duplicado y en condiciones desnaturalizantes. Luego de la corrida electroforética, ambos geles fueron lavados permitiendo la renaturalización de las MMP, y uno de los geles se incubó con un buffer conteniendo Ca^{2+} para permitir a actividad de metaloproteinasas, mientras que el otro se incubó con un buffer conteniendo EDTA 0,5 M a fin de inhibir dicha actividad. Posteriormente, se tiñeron los geles con una solución de azul de Coomassie 0,5 % y se revelaron por colorimetría utilizando un transiluminador (Amersham Imager 600). La actividad de metaloproteinasas se determinó por la presencia de bandas de degradación de la gelatina contenida en el gel, considerando específicas aquellas bandas presentes en el gel incubado con Ca^{2+} y ausentes en el gel incubado con EDTA. La cuantificación se realizó utilizando el software ImageJ.

Resultados

El programa de decidualización in vitro induce la expresión de marcadores característicos.

El programa de decidualización induce la expresión de múltiples genes, siendo los marcadores característicos la proteína de unión al factor de crecimiento insulínico 1 (IGFBP1), la prolactina (PRL) y el factor de transcripción Kruppel like factor 13 (KLF13). Por lo tanto, para validar el modelo de decidualización *in vitro*, analizamos la expresión de estos genes a lo largo del proceso de decidualización. La cinética de expresión realizada a los 2, 4 y 8 días de tratamiento mostró que ambos marcadores inducen su expresión a los 8 días post tratamiento (Figura 3). Seguidamente evaluamos la expresión de quimoquinas y receptores de quimoquinas asociadas a la decidualización. Particularmente evaluamos

quimioquinas características del reclutamiento de linfocitos T regulatorios (SDF-1 o CXCL12), de neutrófilos (IL-8 o CXCL8) y de monocitos y células dendríticas (MCP-1 o CCL2). La expresión de estos tres genes aumenta en las células decidualizadas respecto a las no diferenciadas (Figura 4). Los presentes resultados nos sugieren que las células estromales, luego de su diferenciación *in vitro*, no solo adquieren la expresión de marcadores característicos de la decidualización sino que también participarían activamente en el reclutamiento selectivo de poblaciones leucocitarias contribuyendo en conjunto a la formación de la interfase materno placentaria.

Las células decidualizadas in vitro modulan la expresión de quimioquinas y metaloproteinasas dependiendo de la calidad del blastocisto

Con el objeto de estudiar la capacidad de las células decidualizadas de sensar la calidad embrionaria, utilizamos un modelo *in vitro* de diálogo embrio-endometrial que consiste en el tratamiento de las células decidualizadas con medios condicionados de blastocistos (MCB). Este modelo permite evaluar la respuesta de las células endometriales a los factores solubles secretados por los blastocistos de acuerdo a la calidad de los mismos.

En primer lugar evaluamos si los factores secretados por los blastocistos de desarrollo competente (DC) y por blastocistos de desarrollo detenido (DD) modulan la producción de quimioquinas. Los MCB de DC indujeron la expresión de SDF-1, mientras que los MCB de DD incrementaron la expresión de MCP-1, sugiriendo que pueden reclutarse distintas poblaciones leucocitarias de acuerdo a la calidad de los MCB (Figura 5).

Dado que la remodelación endometrial está mediada por proteínas que degradan la matriz extracelular, evaluamos la actividad gelatinolítica de las células decidualizadas luego de ser estimuladas con MCB. Mediante la técnica de zimografía, detectamos un aumento de la actividad de MMP-9 en respuesta a los MCB de DD (Figura 6 A). Por otra parte, cuando evaluamos la expresión de los inhibidores de las MMP, familia TIMP, no se observaron

diferencias en los niveles de TIMP1 y TIMP2 en presencia de los MCB (Figura 6 B,C). Los presentes resultados indican que las células decidualizadas en presencia de MCB DD aumentan la actividad de MMP9, pero no de los inhibidores sugiriendo una potencial remodelación endometrial asociada a la menstruación.

Las células decidualizadas modulan la invasión de células trofoblásticas de acuerdo a la calidad del blastocisto

Con el objeto de profundizar aún más en la interacción física entre las células decidualizadas y las trofoblásticas, utilizamos un modelo *in vitro* de implantación embrionaria. En este modelo, esferoides de células Swan 71 (ESB) son co-cultivados con células HESC en monocapa y se sigue la invasión mediante microscopia de fluorescencia (ver Materiales y Métodos). Como se observa en la Figura 7 A-C, las células decidualizadas permiten una mayor invasión de los ESB que aquellas no diferenciadas. Esta respuesta se sostiene en el tratamiento con MCB de DC, mientras que el estímulo de las células decidualizadas con MCB de DD restringe la capacidad de invasión de los ESB (Figura 7 D). Los resultados obtenidos en este modelo son similares a los eventos que se propone ocurren fisiológicamente en la ventana de selección embrionaria.

Discusión

El proceso de decidualización es crítico para que el endometrio sea receptivo a la invasión del blastocisto y, por lo tanto, para la formación de la interfase materno-placentaria. La formación de esta interfase es un proceso altamente complejo donde intervienen tanto células de origen materno (estroma y epitelio endometriales y células inmunes) como embrionario (citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto). En este trabajo, abordamos el estudio del eje

embrio-endometrial a través del desarrollo y de la utilización de modelos *in vitro*, logrando estudiar distintos aspectos del mismo.

En primer lugar, utilizamos un modelo de decidualización *in vitro*, mediante el cual pudimos observar la expresión de marcadores característicos (IGBP1, PRL y KLF13). En trabajos ya publicados, este modelo nos permitió estudiar la generación de un microambiente proinflamatorio asociado a la implantación embrionaria exitosa (9). En este sentido, se ha propuesto que la generación de un microambiente proinflamatorio controlado es necesario para que las células trofoblásticas sean capaces de invadir la decidua (12). Si bien los mecanismos responsables de iniciar esta respuesta inmune aún no están totalmente dilucidados (12,13), nuestro laboratorio ha reportado, mediante el uso de este modelo, que el estrés del retículo endoplasmático y la respuesta a proteínas mal plegadas contribuyen, al menos parcialmente, a la generación de esta respuesta inflamatoria a través de la producción de IL-1 β (11).

Un paso más en la complejización del modelo de decidualización fue el uso de medios condicionados de blastocisto (MCB) de distinta calidad según su desarrollo. La estimulación de las células decidualizadas con MCB permite simular ciertos aspectos de la interacción embrio-endometrial, a fin de estudiar los mecanismos por los cuales dichas células son capaces de sensar de la calidad embrionaria. Al respecto, se ha propuesto que los factores liberados por blastocistos de baja calidad alteran el transcriptoma de las células deciduales, modificando la expresión de cientos de genes (5,14). En línea con esto, en el presente trabajo observamos que las células HESC decidualizadas son capaces de responder diferencialmente a los factores secretados por los blastocistos según la calidad de los mismos, modulando la expresión de quimioquinas y la producción de metaloproteinasas. Los MCB de desarrollo detenido producen un incremento de MCP-1, una quimioquina que clásicamente recluta monocitos (15), al mismo tiempo que incrementa la actividad de MMP-9. Ambos procesos se

asocian a la remodelación del endometrio y al inicio de la menstruación (16,17). En contraste, los MCB de alta calidad, aumentan la expresión de SDF1, una quimioquina asociada al reclutamiento y retención en mucosa de linfocitos T regulatorios (Tregs), los cuales contribuyen al control de la homeostasis inmune(18–20).

Por último, utilizando la línea celular trofoblástica Swan 71, desarrollamos un modelo *in vitro* que nos permite simular los momentos iniciales de la implantación embrionaria. Específicamente, podemos evaluar las interacciones celulares entre las células trofoblásticas y las deciduales, y cómo distintos tratamientos regulan la capacidad invasiva de las primeras sobre las segundas (11). Este modelo es capaz de responder a situaciones experimentales de forma análoga a lo que sucede fisiológicamente, ya que las células decidualizadas se mostraron más permisivas a la invasión que las no diferenciadas; este comportamiento se revirtió parcialmente al estimular con MCB DD, mientras que se mantuvo en el tratamiento con MCB de DC. Este modelo puede complejizarse aún más con el agregado de Matrigel, permitiendo simular no sólo la interacción entre células trofoblásticas y endometriales sino también con la matriz extracelular (21), lo cual nos abre a futuro la posibilidad de profundizar en el estudio de los mecanismos por los cuales las células deciduales son capaces de sentir la calidad embrionaria.

La reproducibilidad e integridad de un modelo es un factor esencial para su aplicación como herramienta de detección. Un punto importante que contribuye a la reproducibilidad es la utilización de líneas celulares, lo cual permite la estandarización del modelo para comparar diferentes condiciones, algo que no es aplicable usando cultivos primarios frescos obtenidos a partir de biopsias (11,22,23).

El desarrollo de nuevos modelos *in vitro* para el estudio de la generación de la interfase materno-fetal, nos ha permitido ahondar en los procesos tempranos de la implantación que condicionan el futuro desarrollo del embarazo. Esperamos que estos y futuros avances en

modelos de investigación permitan dilucidar los mecanismos moleculares de patologías asociadas a la implantación y placentación, y de este modo, obtener nuevos biomarcadores, así como también desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para patologías de la reproducción.

Agradecimientos

El presente trabajo se desarrolló dentro del marco del proyecto financiado por la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología (PICT 2016-0464 a RR, 2017-2427 a EG, 2014-0657 y 2017-1536 a CPL) y por la Universidad de Buenos Aires (UBACyT 20020090200034 a RR y UBACyT 20020130100040BA a CPL). Las líneas celulares utilizadas fueron gentilmente cedidas por el Dr. Gil Mor (Universidad de Yale, Estados Unidos).

Referencias

1. Evers JLH. Female subfertility. In: Lancet. 2002. p. 151–9.
2. Sharkey AM, Macklon NS. The science of implantation emerges blinking into the light. Vol. 27, Reproductive BioMedicine Online. 2013. p. 453–60.
3. Teklenburg G, Salker M, Heijnen C, Macklon NS, Brosens JJ. The molecular basis of recurrent pregnancy loss: Impaired natural embryo selection. Vol. 16, Molecular Human Reproduction. 2010. p. 886–95.
4. Altmäe S, Reimand J, Hovatta O, Zhang P, Kere J, Laisk T, et al. Research Resource: Interactome of Human Embryo Implantation: Identification of Gene Expression Pathways, Regulation, and Integrated Regulatory Networks. Mol Endocrinol [Internet]. 2012;26(1):203–17. Available from: <https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/me.2011-1196>
5. Teklenburg G, Salker M, Molokhia M, Lavery S, Trew G, Aojanepong T, et al. Natural

- selection of human embryos: Decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation. *PLoS One*. 2010;5(4).
6. Nyachieo A, Chai DC, Deprest J, Mwenda JM, D’Hooghe TM. The baboon as a research model for the study of endometrial biology, uterine receptivity and embryo implantation. In: *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2007.
 7. Teklenburg G, Macklon NS. Review: In Vitro Models for the Study of Early Human Embryo-Endometrium Interactions. *Reproductive Sciences*. 2009.
 8. Weimar CHE, Uiterweer EDP, Teklenburg G, Heijnen CJ, Macklon NS. In-vitro model systems for the study of human embryo–endometrium interactions *TL - 27. Reprod Biomed Online* [Internet]. 2013;27 VN-r(5):461–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.08.002>
 9. Grasso E, Gori S, Papparini D, Soczewski E, Fernández L, Gallino L, et al. VIP induces the decidualization program and conditions the immunoregulation of the implantation process. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.006>
 10. Balaban B, Brison D, Calderón G, Catt J, Conaghan J, Cowan L, et al. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: Proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online*. 2011;
 11. Grasso E, Gori S, Soczewski E, Fernández L, Gallino L, Vota D, et al. Impact of the Reticular Stress and Unfolded Protein Response on the inflammatory response in endometrial stromal cells. 2018;(July):1–12.
 12. Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G. Inflammation and implantation. Vol. 63, *American Journal of Reproductive Immunology*. 2010. p. 17–21.
 13. Ramhorst R, Calo G, Papparini D, Vota D, Hauk V, Gallino L, et al. Control of the inflammatory response during pregnancy: potential role of VIP as a regulatory peptide.

- Ann N Y Acad Sci [Internet]. 2019 Feb;1437(1):15–21. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1111/nyas.13632>
14. Brosens JJ, Salker MS, Teklenburg G, Nautiyal J, Salter S, Lucas ES, et al. Uterine Selection of Human Embryos at Implantation. *Sci Rep* [Internet]. 2015;4(1):3894. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep03894>
 15. Yoshimura T. The production of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2 in tumor microenvironments. *Cytokine*. 2017.
 16. Evans J, Salamonsen LA. Inflammation, leukocytes and menstruation. *Rev Endocr Metab Disord*. 2012;
 17. Salamonsen LA, Woolley DE. Menstruation: Induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. *Journal of Reproductive Immunology*. 1999.
 18. Kotsiou E, Gribben JG, Davies JK. Allospecific Tregs Expanded after Anergization Remain Suppressive in Inflammatory Conditions but Lack Expression of Gut-homing Molecules. *Mol Ther*. 2016;
 19. Nti BK, Markman JL, Bertera S, Styche AJ, Lakomy RJ, Subbotin VM, et al. Treg cells in pancreatic lymph nodes: The possible role in diabetogenesis and β cell regeneration in a T1D model. *Cell Mol Immunol*. 2012;
 20. Fernández L, Soczewski E, Gori MS, Sabbione F, Papparini D, Vota D, et al. Decidualized cells respond differentially contributing to a tolerogenic microenvironment accordingly blastocyst quality. *Med Buenos Aires*. 2018;78.
 21. You Y, Stelzl P, Zhang Y, Porter J, Liu H, Liao A, et al. Novel 3D in vitro models to evaluate trophoblast migration and invasion. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2019 Mar 30;81(3):e13076. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/aji.13076>
 22. Racicot KE, Wünsche V, Auerbach B, Aldo P, Silasi M, Mor G. Human chorionic

gonadotropin enhances trophoblast-epithelial interaction in an in vitro model of human implantation. *Reprod Sci.* 2014;

23. Holmberg JC, Haddad S, Wünsche V, Yang Y, Aldo PB, Gnainsky Y, et al. An in vitro model for the study of human implantation. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2012;67(2):169–78. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3703643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Tablas

Tabla 1. Secuencia de los cebadores utilizados para la detección de ARNm mediante PCR. Se indica la secuencia sentido (S) y antisentido (AS) desde el extremo 5' a 3'.

Gen	Secuencia S	Secuencia AS
GAPDH	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG	TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT
IGFBP1	GAGCACGGAGATAACTGAGGAG	TTGGCTAAACTCTCTACGACTCTG
IL-8	CCAACACAGAAATTATTGTAAAGC	CACTGGCATCTTCACTGATTC
KLF13	TTCGGTGGTTCCTTGGTGACTGG	TGGACCCTTGGATTCTGCCTTGG
MCP-1	CAGCAGCAAGTGTCCCAAAG	GAGTGAGTGTTCAAGTCTTCGG
PRL	CCACTACATCCATAACCTCTCCTC	GGCTTGCTCCTTGTCTTCGG
SDF1	TGCCCTTCAGATTGTAGC	CGTCTTTGCCCTTTCATC
TIMP1	CTGCGGATACTTCCACCGGT	GCAGGATTCAGGCTATCTGG
TIMP2	GATGCACATCACCTCTGTG	TCCAGGAAGGGATGTCAGAG

Figuras

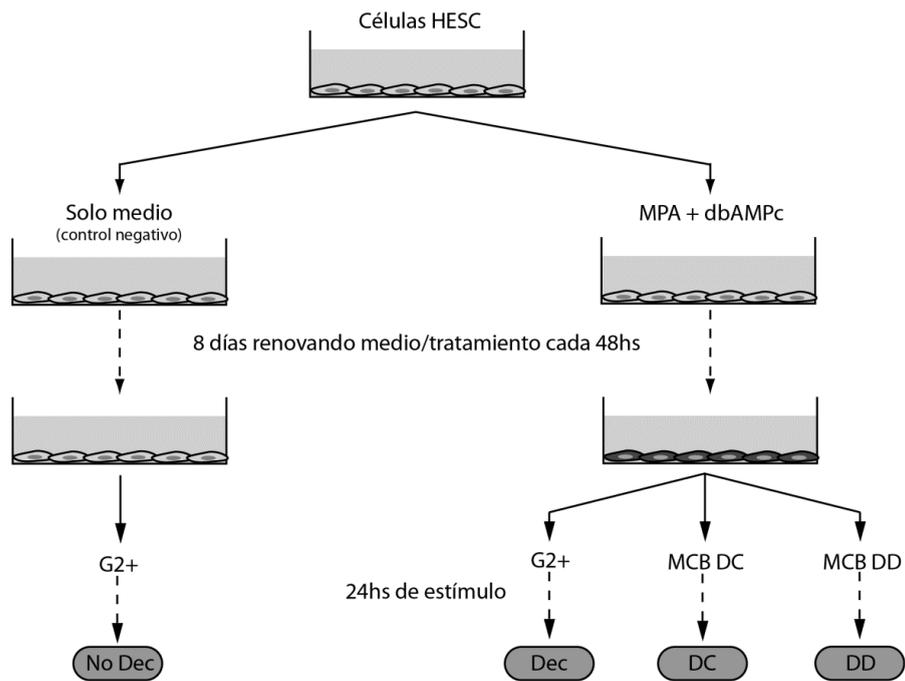


Figura 1. Esquema del protocolo para el modelo de interacción embrio-endometrial.

HESC: Human endometrial stromal cells; Dec: células decidualizadas; No Dec: sin decidualizar; DC: MCB con desarrollo competente; DD: MCB con desarrollo detenido.

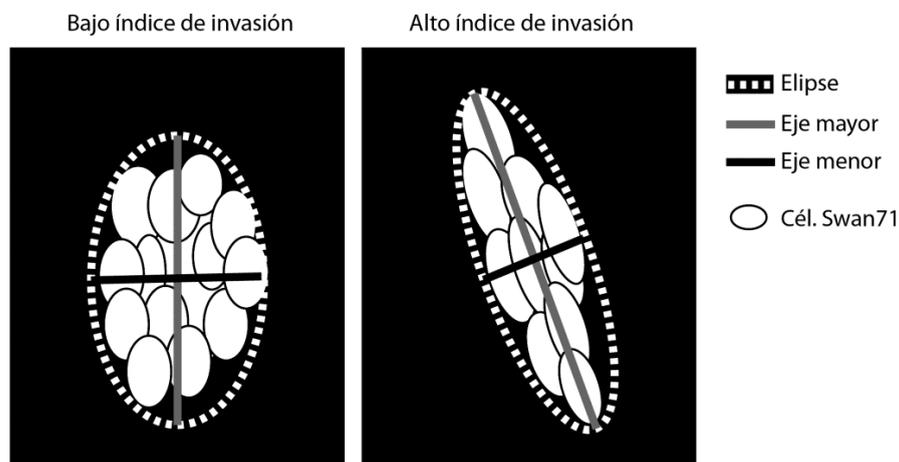


Figura 2. Esquema para la determinación del índice de invasión de un ESB.

Se traza una elipse sobre la imagen de cada esferoide, se determinan los ejes mayor y menor y se calcula el cociente entre ambos. Finalmente, se obtiene el índice de invasión como “1-(eje mayor / eje menor)”.

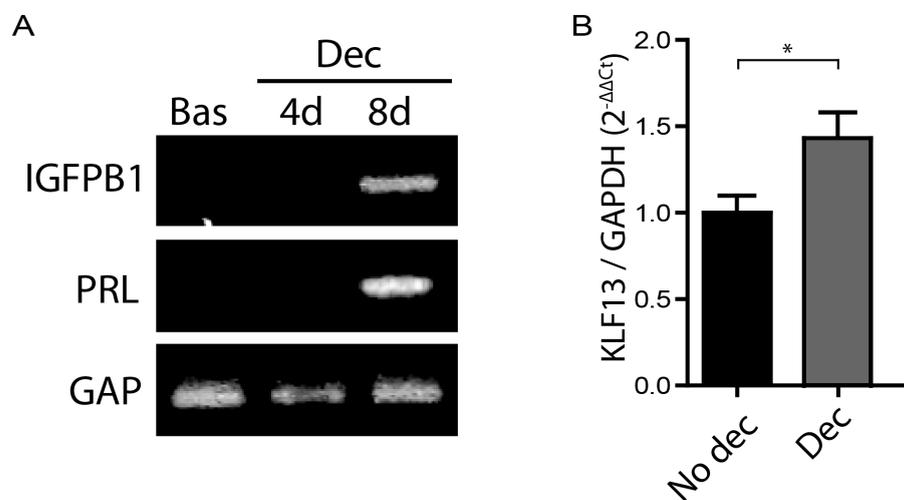


Figura 3. Inducción de la decidualización *in vitro*.

Las células HESC decidualizadas (Dec) expresan IGFBP1, PRL (A) y KLF13 (B) a diferencia de las no decidualizadas (No Dec) luego de 8 días de tratamiento.

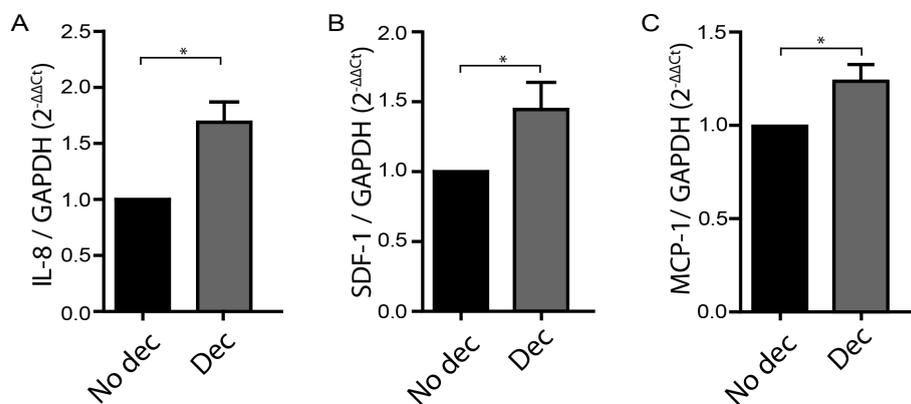


Figura 4. Inducción de quimioquinas en células decidualizadas.

La decidualización aumentó la expresión de las quimioquinas IL-8, SDF-1 y MCP-1 (A-C) en células decidualizadas (Dec) y con comparación con las no decidualizadas (No Dec).

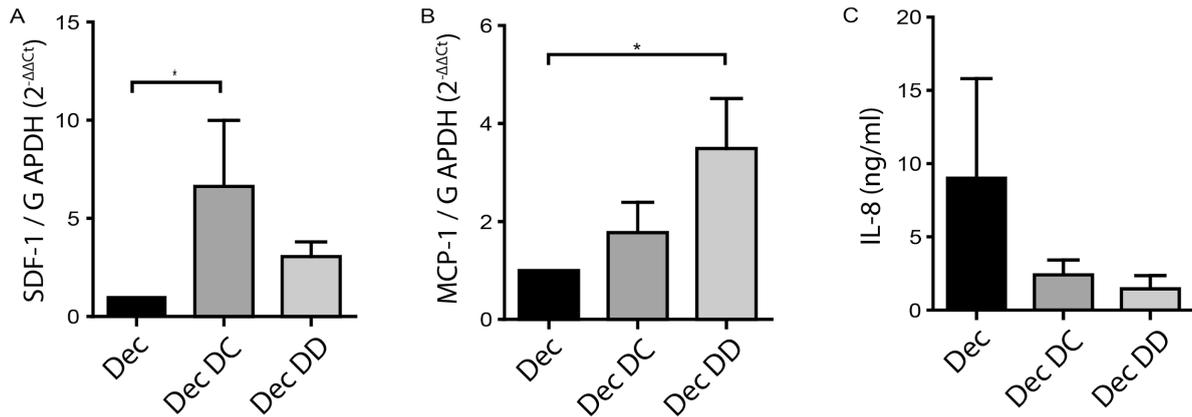


Figura 5: Inducción de quimioquinas en células decidualizadas según la calidad de los MCB. Los MCB con desarrollo competente (DC) incrementan la expresión de SDF-1 (A), mientras que los MCB con desarrollo detenido (DD) inducen un aumento de MCP-1 (B). No se observaron modulaciones para IL-8 bajo estas condiciones (C).

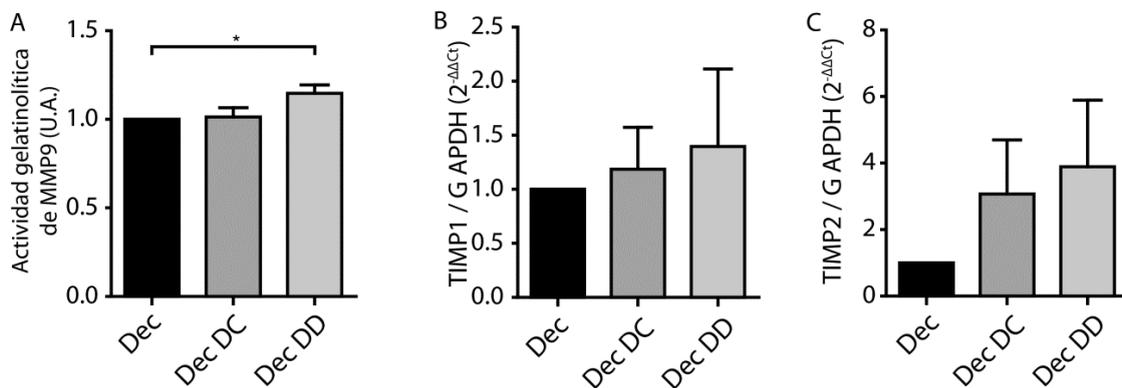


Figura 6: Modulación de metaloproteinasas y sus inhibidores por parte de las células decidualizadas según la calidad de los MCB.

La zimografía reveló un aumento en la actividad de la MMP-9 en el sobrenadante de las células decidualizadas estimuladas con MCB DD (A) mientras que la expresión de los inhibidores de metaloproteinasas TIMP1 y TIMP2 no se modularon (B-C).

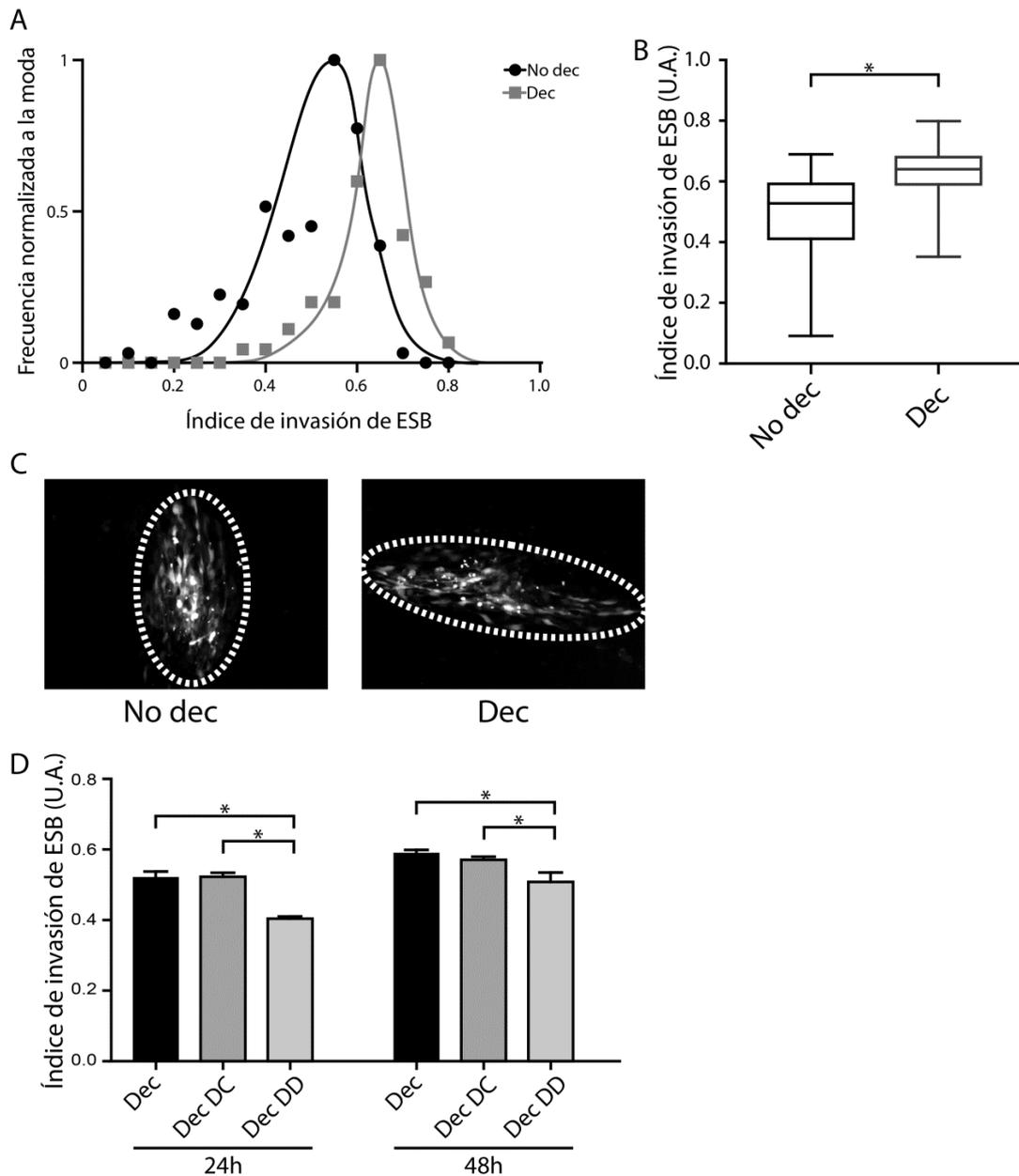


Figura 7: Invasión de ESB sobre las células decidualizadas. El modelo *in vitro* de invasión trofoblástica mostró que los esferoides co-cultivados con células HESC decidualizadas alcanzan mayor invasión que los crecidos sobre HESC no diferenciadas (A-B). En (C) se muestra una ESB representativo de ambos tratamientos tras 48h de co-cultivo. Asimismo, las células HESC decidualizadas estimuladas con MCB DC son más permisivas a la invasión de ESB en comparación con aquellas tratadas con MCB DD.