

# Condicionamiento de la receptividad endometrial en pacientes con fallas recurrentes de implantación en fertilización *in vitro*

Conditioning of endometrial receptivity in patients with recurrent in vitro fertilization failure

M Irigoyen<sup>1</sup>; L Fernández<sup>2</sup>; E Soczewski<sup>2</sup>; MS Gori<sup>2</sup>; L Castagnola<sup>2</sup>; A Schafir<sup>2</sup>; G Martínez<sup>1</sup>; C Pérez Leirós<sup>2</sup>; E Grasso<sup>2</sup>; R Ramhorst<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> FERTILIS Medicina Reproductiva. San Isidro, Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> 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.

## RESUMEN

**Pregunta de estudio:** ¿La receptividad endometrial en pacientes con fallas recurrentes de implantación (RIF) en tratamientos de fertilización *in vitro* está condicionada por alteraciones en el programa de decidualización?

**Lo que se sabe:** La decidualización de las células estromales endometriales involucra un espectro de cambios de los cuales dependerá la receptividad endometrial.

**Respuesta resumida:** Las pacientes con RIF presentan alteraciones en el programa de decidualización, en la respuesta inflamatoria asociada y en la adhesión del blastocisto.

**Diseño del estudio:** cuasi experimental controlado.

**Materiales y Métodos:** El análisis bioinformático integrado incluyó información de bases de datos públicas (Reactome, Gene Ontology, WikiPathways, KEGG, GEO) y el Software Gephi para el armado de las redes de genes asociados al proceso de decidualización. Como modelo *in vitro* de

## ABSTRACT

**Study question:** *Is the endometrial receptivity in patients with recurrent implantation failures (RIF) conditioned by an alteration in the decidual program?*

**What is known:** *Decidualization of endometrial stromal cells involves a spectrum of changes from which endometrial receptivity arose.*

**Summary answer:** *Patients with RIF present alterations: in the decidualization program, in the associated inflammatory response and in the adhesion of the blastocyst.*

**Study design:** *exploratory, prospective case-control type.*

**Materials and Methods:** *The integrated bioinformatic analysis included information from public databases (Reactome, Gene Ontology, WikiPathways, KEGG, GEO) and used Gephi Software for the assembly of the networks. The HESC (Human endometrial stromal cells) cell line was used as an *in vitro* model of decidualization, and *ex vivo*,*

decidualización se usó la línea celular HESC (Human Endometrial Stromal Cells) y ex vivo, biopsias de endometrio de mujeres con RIF y fértiles. Los genes IFGBP1, Prolactina, NLRP3 e ITGA8 fueron cuantificados por RT-qPCR; IL-1 $\beta$  por marcación intracitoplasmática y citometría de flujo.

**Resultados:** El análisis in silico de los procesos de decidualización, inflamación y regulación genética permitió identificar una red de genes que los conectan. En las células HESC decidualizadas se confirmó el aumento de la respuesta inflamatoria (activación del inflammasoma NLRP3 y de la producción de IL-1 $\beta$  activa). En otro análisis bioinformático se encontró la expresión diferencial de genes a partir de arrays de pacientes con RIF y de pacientes fértiles. La validación en biopsias de endometrio de pacientes con RIF, mostró una expresión disminuida significativamente de IFGBP1 y prolactina, NLRP3 e ITGA8 (integrina involucrada en la adhesión del blastocisto) comparado con la expresión de estos genes de pacientes fértiles.

**Limitaciones del estudio:** Si bien los resultados fueron validados en muestras de endometrio se necesitan más estudios para dilucidar si estos mecanismos operan de manera similar in vivo.

**Implicancias de los hallazgos:** El entendimiento de alteraciones en el programa de decidualización aportaría a esclarecer la “memoria del endometrio”, un campo muy poco explorado aún.

**Palabras clave:** decidualización, inflamación, fallas recurrentes en las fertilizaciones in vitro.

*endometrial biopsies from women with RIF and fertile. The IFGBP1, Prolactin, NLRP3 and ITGA8 genes were quantified by RT-qPCR; IL-1 $\beta$  by intracytoplasmic labeling and flow cytometry.*

**Results:** *The in-silico analysis of the processes of decidualization, inflammation and genetic regulation allowed us to identify a network of genes that connect them. In decidualized HESC cells, we confirmed the increase in the inflammatory response (activation of the NLRP3 inflammasome and the production of active IL-1 $\beta$ ). In another bioinformatic analysis we studied the differential expression of genes from arrays of patients with RIF. Validation in endometrial biopsies from patients with RIF showed significantly decreased expression of IFGBP1 and prolactin, NLRP3 and ITGA8 (integrin involved in blastocyst adhesion).*

**Study limitations:** *Although the results were validated in endometrial samples, further studies are needed to elucidate whether these mechanisms operate similarly in vivo.*

**Implications of the findings:** *The understanding of alterations in the decidualization program would contribute to clarify the “memory of the endometrium”, a field that has not yet been explored.*

**Keywords:** *decidualization, inflammation, recurrent implantation failures.*

## INTRODUCCIÓN

La decidualización es un proceso celular esencial para la implantación del embrión y posterior establecimiento del embarazo<sup>(1)</sup>. Este proceso involucra un espectro de cambios biomecánicos y transiciones bioquímicas de las células estromales que dependerán del contexto de señalización, dado tanto por las hormonas como por mediadores locales, para establecer un ambiente uterino receptivo<sup>(2)</sup>. La decidualización también se caracteriza por el crecimiento de las arterias espiraladas uterinas y la infiltración del estroma por leucocitos maternos que junto con la producción de inmunomoduladores, regularán la invasión del trofoblasto y la formación de una interfase materno-fetal<sup>(3)</sup>.

De lo expuesto se desprende que un inadecuado fenotipo decidual, inevitablemente generará complicaciones en la gestación, que dependiendo del grado de severidad, puede reflejarse en fallas reiteradas de implantación en las fertilizaciones *in vitro* (RIF del inglés: recurrent implantation failures), pérdidas recurrentes del embarazo o complicaciones asociadas con una placentación inadecuada como la preeclampsia<sup>(4,5)</sup>. Sin embargo, los mecanismos que llevan a las alteraciones de este proceso aún se desconocen.

Cuando el blastocisto entra en contacto con el epitelio uterino comienza un diálogo embrio-endometrial que mediará la implantación embrionaria<sup>(6)</sup>. Particularmente, la adhesión estable es el resultado de los cambios moleculares tanto en la superficie del trofoblasto como en la del endometrio. Esta adhesión entre células de orígenes distintos está mediada por la inducción de moléculas de adhesión en la superficie celular uterina durante la ventana de implantación, especialmente por las

integrinas, responsables de mediar uniones estables. Seguidamente, la capa más externa, el trofoblasto, comenzará un camino invasivo en la decidua permitiendo su inclusión en el endometrio<sup>(6)</sup>.

La generación de un microambiente inflamatorio durante la implantación embrionaria es crucial y por ello fisiológicamente se incrementan la expresión de la mayoría de las citoquinas inflamatorias<sup>(7)</sup>. Entre ellos, la familia de IL-1 y particularmente sus miembros IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  que se expresan tanto en el endometrio como en el blastocisto<sup>(8)</sup>. En cuanto a la relevancia de la IL-1 $\beta$ , la expresión de esta citoquina está altamente preservada en primates y ha sido propuesta como uno de los mediadores en la viviparidad placentaria que aumenta la receptividad del endometrio<sup>(9,10)</sup>. Actualmente, la evidencia señala que la IL-1 $\beta$  contribuye a la decidualización por varios mecanismos tales como: la inducción de integrinas; la producción del factor inhibidor de leucemia (LIF) y de leptina<sup>(4)</sup> y la disociación de actina filamentosa en células estromales humanas<sup>(11)</sup>.

En el presente trabajo nos propusimos realizar un análisis bioinformático integrado exploratorio utilizando bases de datos públicas para estudiar aquellos genes que interconectan el proceso de decidualización, con la respuesta inflamatoria estéril, implantación y placentación. A través de la validación de los resultados en un modelo *in vitro* de decidualización y *ex vivo*, utilizando biopsias de endometrio de pacientes con RIF y de mujeres fértiles. De este modo, se pretende aportar al conocimiento de los mecanismos involucrados en el condicionamiento de la receptividad endometrial así como sus alteraciones en pacientes con RIF.

## **Materiales y Métodos**

### **Diseño del estudio: experimental controlado *in vitro*.**

#### ***Análisis bioinformático integrado***

Se realizó una búsqueda en de las posibles vías de señalización o *pathways* involucrados en los procesos de decidualización, placentación, angiogénesis, inflamación y regulación inmune en bases de datos públicas (Reactome, Gene Ontology, Wikipathways y KEGG). De esta búsqueda se obtuvieron 32 *pathways*, los cuales fueron asociados a cada uno de los procesos anteriormente indicados. Posteriormente, se extrajeron los genes que forman parte de los *pathways*, manteniendo su asociación con cada proceso y eliminando duplicados. A partir de estos datos, se generaron las tablas de nodos (996 genes + 5 procesos) y aristas (1154) y se construyó la red usando Gephi. La forma de la red se obtuvo por el algoritmo ForcedAtlas2 a partir de una distribución aleatoria hasta autoestabilizarse. El tamaño de los nodos es proporcional al número de aristas recibidas.

En una segunda etapa, se buscaron *arrays* públicos en la base de datos GEO del NCBI. Se seleccionaron *arrays* de células endometriales con estímulos inflamatorios o de mujeres con RIF (GSE58144, GSE92324, GSE103465, GSE111974, GSE174689). Se extrajeron los genes que se modulaban significativamente ( $p < 0.05$ ;  $FDR < 0.25$ ) utilizando la plataforma *genePattern*, y se aplicó este resultado sobre los genes de la red indicando con color su modulación.

#### ***Cultivo celular***

Las células HESC, línea celular de estroma endometrial humano, fueron cultivadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en 3ml de medio DMEM F12 *high glucose* (Invitrogen)

suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB, Natocord), antibióticos (PenStrepto, Invitrogen) y glutamina (Invitrogen) 20mM (medio completo). Las células crecieron en monocapa en botellas de 25 cm<sup>2</sup> (Botellas T25) y se reemplazó el medio cada 48 h en cabina de seguridad biológica de clase II hasta alcanzar un 80% de confluencia, momento en el cual se expandieron. Para ello, las células fueron tratadas con TrypLE® (GIBCO) por 2 a 5 minutos a 37°C para lograr despegarlas de la placa. A continuación, se suspendieron en medio completo y se sembró el 20% de las células en una placa nueva.

#### ***Protocolo de decidualización de células HESC***

Las células HESC, cultivadas como se indicó previamente, fueron sembradas en placa de 24 pocillos (20.000 células/pocillo) y se estimularon con 2,5mM de dibutirilAMPc (dbAMPc, SIGMA) y 0,1uM de medroxiprogesterona (MPA, SIGMA). El tratamiento se realizó por 8 días renovando el 50% del medio y los estímulos cada 48 h. Pasados los 8 días de diferenciación las células fueron lavadas con medio completo y utilizadas para los diferentes ensayos. Las células no diferenciadas (control negativo) se mantuvieron con medio completo durante la misma cantidad de días.

#### ***Reclutamiento de pacientes y obtención de Biopsias de endometrio***

##### ***Pacientes con fallas reiteradas en las fertilizaciones *in vitro****

Las pacientes fueron invitadas a participar en el presente protocolo de investigación y seleccionadas según los siguientes criterios de inclusión:

- Mujeres entre 25 y 42 años.
- Firma del consentimiento informado.

- Dos o más FIV previas fallidas con al menos 1 embrión en estadio de blastocisto de buena calidad transferidos en cada intento (Consenso Estambul), de tratamientos con óvulos propios o donados.
- Cavidad uterina normal, evaluada por histerosalpingografía, histeroscopia y/o ecografía transvaginal.
- FSH de fase folicular menor a 10UI y/o HAM > a 1 ng/ml .
- Conteo folículos antrales basal  $\geq 10$  (en uno o en los dos ovarios).
- TSH menor a 2,5 UI.
- Medicación concomitante permitida: metformina, ácido fólico, levotiroxina, sulfato ferroso, antioxidantes, vitamina E.  
Criterios de exclusión:
- Pacientes con hidrosalpinx uni o bilateral
- Útero con adenomiosis.

### **Mujeres Fértiles (Grupo control)**

Criterios de inclusión:

- Mujeres entre 25 y 42 años.
- Firma del consentimiento informado.
- Cavidad uterina normal, evaluada por ecografía transvaginal.
- TSH menor a 2,5 UI.
- Medicación concomitante permitida: metformina, ácido fólico, levotiroxina, sulfato ferroso, antioxidantes, vitamina E.  
Criterios de exclusión:
- Que hayan tenido alguna pérdida de embarazo.
- Pacientes con hidrosalpinx uni o bilateral.
- Adenomiosis.

Se les ofreció participar en el grupo control de mujeres fértiles, a aquellas que hubieren optado como método anticonceptivo la utilización de Dispositivo Intrauterino (DIU). Se realizó la biopsia endometrial el mismo día y previo a la colocación del DIU.

### **Obtención de las muestras de endometrio**

Las muestras de biopsias de endometrio fueron obtenidas en ambos grupos, en la fase secretoria del ciclo menstrual. Fueron realizadas al día + 6 del pico endógeno de LH, el cual fue medido por tiras reactivas de ovulación en orina (One Step MedNet GmbH, sensibilidad a la LH > a 20 mIU/ml) o por LH sérica era > a 15 mUI/ml. Para confirmar que las mujeres se encontraban en la fase secretoria del ciclo, se midieron además los niveles de progesterona en sangre periférica al momento de la toma de muestra. (Valor de Progesterona > 3 ng/ml)

Las biopsias fueron realizadas en consultorio, con la paciente en posición ginecológica y previa antisepsia del introito vaginal e intravaginal y colocación de espéculo. Se utilizó cureta de Novak o Pipelle de Cornier o cánula Endomete para realizar el procedimiento.

Las muestras endometriales obtenidas se colocaron en Trizol (Life Technologies) para su transporte y fueron remitidas al laboratorio donde se procesaron para la obtención de cDNA (ver RT-qPCR a continuación).

Las mismas fueron codificadas con 4 caracteres con 2 letras correspondientes a las iniciales de paciente y 2 números comenzando desde 01 hasta el 20 y siguiendo en forma consecutiva. La identidad de la paciente fue mantenida en confidencialidad durante el desarrollo del proyecto.

### **RT-qPCR**

Las células recuperadas luego de los distintos tratamientos fueron resuspendidas en 500  $\mu$ l de Trizol (Life Technologies) y se procedió a realizar la extracción de ARN total siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se agregan 100  $\mu$ l de cloroformo, se incuban por 5

minutos y se centrifuga por 15 minutos a 12.000 g a 4°C. El ARN, disuelto en la fase acuosa, se transfiere a un tubo nuevo y se precipita agregando 250 µl de isopropanol e incubando 10 min. Luego se centrifugó 10 min a 12.000 g a 4°C. Se lava el pellet con 500 µl de etanol 75% y se resuspende en 30 µl de agua libre de RNAsas. El ARN se cuantificó por espectrometría (Nano-Drop) midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

Para realizar el pasaje a DNA copia (ADNc) se utilizó 1 µg de ARN previamente incubado 10 min a 60°C y la mezcla de reacción (dNTPs 25 mM (Embiotech), oligodT 5 ng/µl (Biodynamics), RT M-MLV 100 U, RNAsin 15 U y Buffer RT M-MLV 1X (Promega) hasta un volumen final de 20 µl. La reacción se llevó a cabo a 42°C durante 1 h y se detuvo incubando durante 10 min a 90°C. El ADNc obtenido se conservó a -20°C hasta su uso. La qPCR se realizó mezclando 2 µl de ADNc de cada muestra con los *primers* correspondientes (0,20 µM) y MasterMix (Roche) hasta un volumen final de 20 µl. La qPCR se realizó en un termociclador BioRad MyiQ2. Se utilizó un paso previo de desnaturalización por 5 min a 94°C antes del programa, un paso de lectura luego de cada paso de extensión y un paso de extensión final de 10 min a 72°C al final del programa. Los *primers* utilizados para amplificar las

distintas secuencias se describen en la Tabla 1. Se utilizaron los genes GAPDH y YWHAZ como genes *housekeeping*.

### Inmunofluorescencia y análisis por Citometría de flujo

Las células cultivadas fueron recuperadas por tratamiento con TrypLE® y centrifugadas 1500 rpm por 5 minutos. Los pellets celulares obtenidos se resuspendieron y se realizó la marcación intracelular de IL-1β. Para ello las células se fijaron con Cytofix/Cytoperm durante 20 min a 4°C y posteriormente se permeabilizaron por lavado con solución Perm/Wash (ambos de BD Biosciences). El Ac anti IL-1β (PE BD Biosciences 340516) se incubó junto con el buffer de permeabilización durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se removió el anticuerpo no pegado lavando en presencia de ese mismo buffer. El procedimiento se repitió para el Ac. secundario. Finalmente, las células se resuspendieron nuevamente en solución fijadora/permeabilizadora hasta su análisis por citometría de flujo. En forma paralela se realizó la marcación con el correspondiente control de isotipo. Finalmente, las muestras se analizaron en un Citómetro de Flujo FACS Aria II (BD) y se adquirieron entre 10.000 y 50.000 eventos. Los resultados se interpretaron utilizando el programa FlowJo® versión 7.6.2.

**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
<b>YWHAZ</b>	CAGAGAGAAAATTGAGACGGAGC	GTGACTGATCGACAATCCCTTTC
<b>GAPDH</b>	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG	TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT
<b>NLRP3</b>	TCAGACAGAGAAGGCAGACC	GGCATATCACAGTGGGATTTCG
<b>ITGA8</b>	TGGGAGTTTCTACTGGCAAGG	GCAGCAACTGAGTATCCAAGGT
<b>IFGBP1</b>	GAGCCCTGCCAATAGAACT	GATGTCTCACACTGTCTGCTG
<b>Prolactina</b>	TCATCTGGTCACGGAAGTACG	GTTTCAGGATGAACCTGGCTG

### **Análisis estadístico**

En el caso de los ensayos que involucran líneas celulares se utilizó la prueba T de Student. En el caso de los ensayos donde se utilizaron muestras de pacientes, se realizó el test no paramétrico Mann-Whitney U-test. Se utilizó el software GraphPad Prism 9 (GraphPad software Inc) para realizar las pruebas estadísticas, considerando  $p < 0.05$  como diferencia significativa.

### **Resultados**

#### **Análisis bioinformático integrado: interconexión de procesos asociados a la implantación.**

Dada la complejidad de los procesos asociados a la implantación y formación de la interfase materno-placentaria y al gran número de genes asociados a los mismos, en primer lugar, se estudiaron los genes involucrados en integrar estos procesos. Para ello se realizó un análisis bioinformático que integra simultáneamente los procesos de decidualización, angiogénesis, placentación, inflamación y regulación genética. Se analizaron *pathways* estandarizados en bases de datos públicas como describió en Materiales y Métodos.

Posteriormente se obtuvo un listado con todos los genes que forman parte de los *pathways* y su relación con cada proceso. A partir de este listado, se generó la red usando el programa Gephi con los procesos como nodos representados en verdes y los genes como puntos rosados (ver figura 1A). Esta primera red cuenta con 994 genes.

Para restringir la lista de genes a estudiar, se realizó un nuevo análisis *in silico* a partir de bases de datos públicas, pero ahora en base a dos *arrays* en los que se comparaba la expresión de genes entre células estromales sin tratar o tratadas con un estímulo inflamatorio (TNF $\alpha$ ,

IFN $\gamma$ +LPS). Se buscaron cuáles genes se modulaban diferencialmente y sobre la red anterior, se aplicó colores indicando si los genes se modulaban significativamente representados en rosa, o no, representados en celeste (Ver Figura 1B). Finalmente, de este análisis surge una lista de genes que corresponde a aquellos más relevantes que interconectan los procesos de angiogénesis, placentación, decidualización, Inflamación y regulación inmunológica (ver Figura 1C).

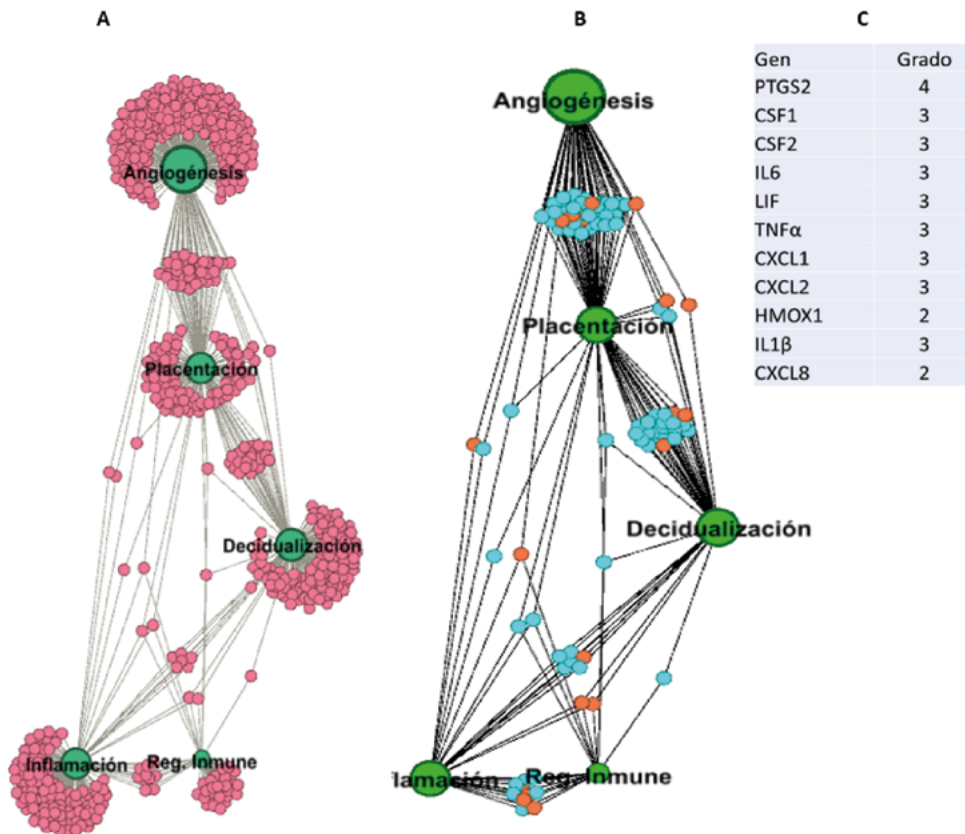
#### **El programa de decidualización *in vitro* induce una respuesta inflamatoria estéril: producción de IL-1 $\beta$ activa.**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos del análisis *in silico* y que la implantación se asocia a una respuesta pro inflamatoria estéril fisiológica, se investigó el mecanismo de activación que lleva a la producción de IL-1 $\beta$  activa. Para ello se utilizó un modelo de decidualización *in vitro* basado en la línea celular HESC (Human Endometrial Stromal cells) previamente desarrollado en nuestro laboratorio y como se describió en la sección de Materiales y Métodos<sup>(12)</sup>.

Es importante aclarar que la producción de IL-1 $\beta$  requiere la activación del inflammasoma para ser liberada en la forma activa. El inflammasoma es un complejo multiprotéico que es activado por un amplio rango de estímulos de diferentes fuentes y esta activación termina con la escisión y secreción de la forma activa de IL-1 $\beta$ <sup>(13)</sup>. La mayoría de los inflammasomas que se han descrito contienen una molécula sensora (la más estudiada es NLRP3), una la proteína adaptadora y la caspasa-1, la cual es responsable de clivar la pro-IL-1 $\beta$  a su forma activa IL-1 $\beta$ .

Así, en primer lugar, nos enfocamos la expresión de NLRP3 y, como se observa

**Figura 1. Análisis bioinformática integrado.** **A:** Se analizaron *pathways* estandarizados en bases de datos públicas (Reactome, Gene Ontology, WikiPathways, KEGG, como se describió en Materiales y Métodos) que interconectan los procesos de angiogénesis, placentación, deciduación, inflamación y regulación inmune. Se identificaron los genes que forman parte de los *pathways* y su relación con cada proceso. Con esta base se generó la red usando el programa Gephi con los procesos como nodos verdes y los genes como puntos rosados. La red cuenta con 994 genes y 1154 aristas. **B:** A partir de bases de datos públicas, se analizaron dos *arrays* de expresión comparando la expresión de genes entre células estromales sin tratar basales o tratadas con estímulo inflamatorio (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ +LPS). Los genes que se modulaban significativamente se muestran rosa, y los que no en celeste. Solo se muestran genes de grado 2 o mayor. **C:** Lista de genes relevantes en la red. El grado expresa en cuantos de los procesos (angiogénesis, placentación, deciduación, inflamación y regulación genética) participa este gen.



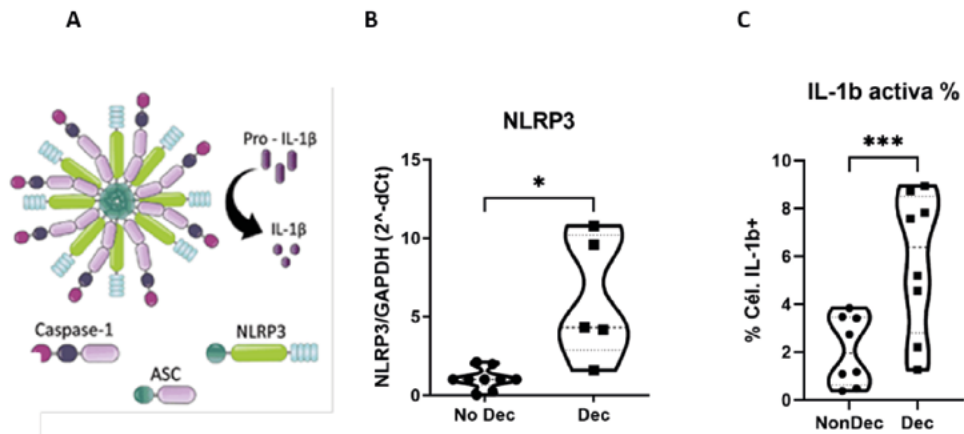
en la figura 2A, las células HESC al deciduarse aumenta significativamente la expresión NLRP3 en comparación con las no deciduadas. A continuación, investigamos la producción de IL 1 $\beta$  antes y después de la deciduación por marcación intracitoplasmática y citometría de flujo. La figura 2B muestra que la producción de IL-1 $\beta$  aumenta significativamente luego de la deciduación en células HESC.

**Receptividad endometrial: análisis de biopsias endometriales de pacientes con RIF y de mujeres fértiles.**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el modelo in vitro de deciduación, realizamos un nuevo análisis bioinformático integrando *arrays* de biopsias endometrio. A partir de bases de datos públicas, se encontraron tres *arrays* en los que se comparaba la expresión de genes



**Figura 2. Activación del inflammasoma NLRP3 y producción de IL-1 $\beta$ .** Dado que la producción de IL-1 $\beta$  requiere la activación del inflammasoma para ser liberada en la forma activa, evaluamos la expresión de NLRP3 y la producción de IL-1 $\beta$ . **A:** Esquema del inflammasoma NLRP3, complejo multiproteico formado por la molécula sensora (NLRP3), una la proteína adaptadora y la caspasa-1 (responsable de clivar a pro-IL-1 $\beta$  a su forma activa IL-1 $\beta$ ). **B y C:** La línea celular HESC (Human Endometrial Stromal cells) fue cultivada hasta alcanzar la confluencia y decidualizadas en presencia de medroxiprogesterona y dibutilil AMPc durante 8 días. Las células no decidualizadas (No Dec) y decidualizadas (Dec) se analizaron para la expresión de NLRP3 por RT-qPCR. La expresión de NLRP3 se muestra normalizada con respecto a GAPDH. La producción de IL-1 $\beta$  activa se cuantificó por marcación intracelular y análisis por citometría de flujo. Los resultados se muestran como porcentaje de células positiva para IL-1 $\beta$ . Las barras corresponden a la media  $\pm$  SEM de al menos 5 ensayos independientes (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  prueba t de Student)



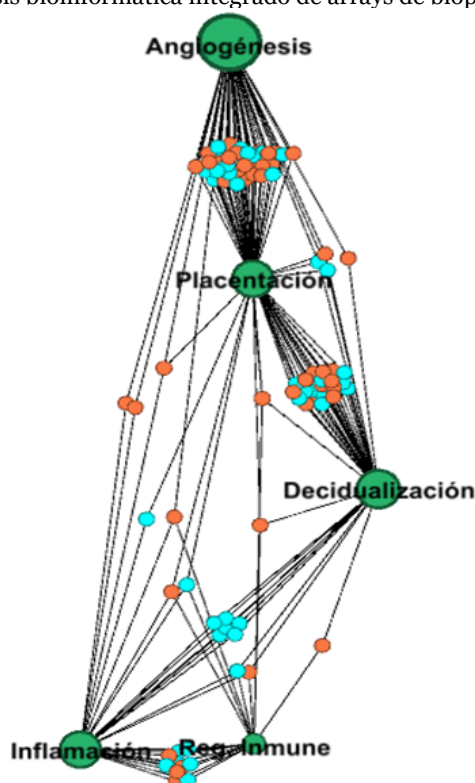
entre biopsias endometriales de mujeres fértiles vs pacientes con RIF.

Se buscaron cuáles genes se modulaban diferencialmente (en al menos un *array*) y sobre la red creada previamente (Figura 1B) que integraba los procesos, se aplicó colores indicando si los genes se modulaban significativamente (rosa) o no (celeste), (ver Figura 3). Es importante destacar que el 52% de los genes con grado 2 o más, es decir aquellos que intervienen en al menos dos procesos, están significativamente modulados, lo que denota la relevancia de estos genes para el estudio de las pacientes RIF.

A partir de bases de datos públicas, se encontraron tres *arrays* en los que se comparaba la expresión de genes entre biopsias endometriales de mujeres fértiles vs pacientes con fallas reiteradas en las

fertilizaciones *in vitro* (RIF). Se obtuvieron los genes modulados diferencialmente en al menos un *array* y sobre la red anterior, se identificó con colores indicando si los genes se modulaban significativamente (rosa) o no (celeste). En la red solo se muestran genes que estén involucrados en 2 o más procesos. El 52% de los genes mostrados presenta modulación.

A continuación, se validó la expresión de algunos de estos genes en biopsias de endometrio obtenidas de pacientes con RIF y se las comparó con la obtenida a partir de biopsias endometriales de mujeres fértiles. Las muestras de endometrio fueron obtenidas durante la fase secretoria del ciclo menstrual según los criterios detallados en Materiales y Métodos. En la tabla 2 se muestran las características de ambos grupos de mujeres.

**Figura 3.** Análisis bioinformática integrado de arrays de biopsias endometrio.**Tabla 2.** Datos clínicos de las pacientes con RIF y de mujeres fértiles. Los valores se muestran como mediana y rango.

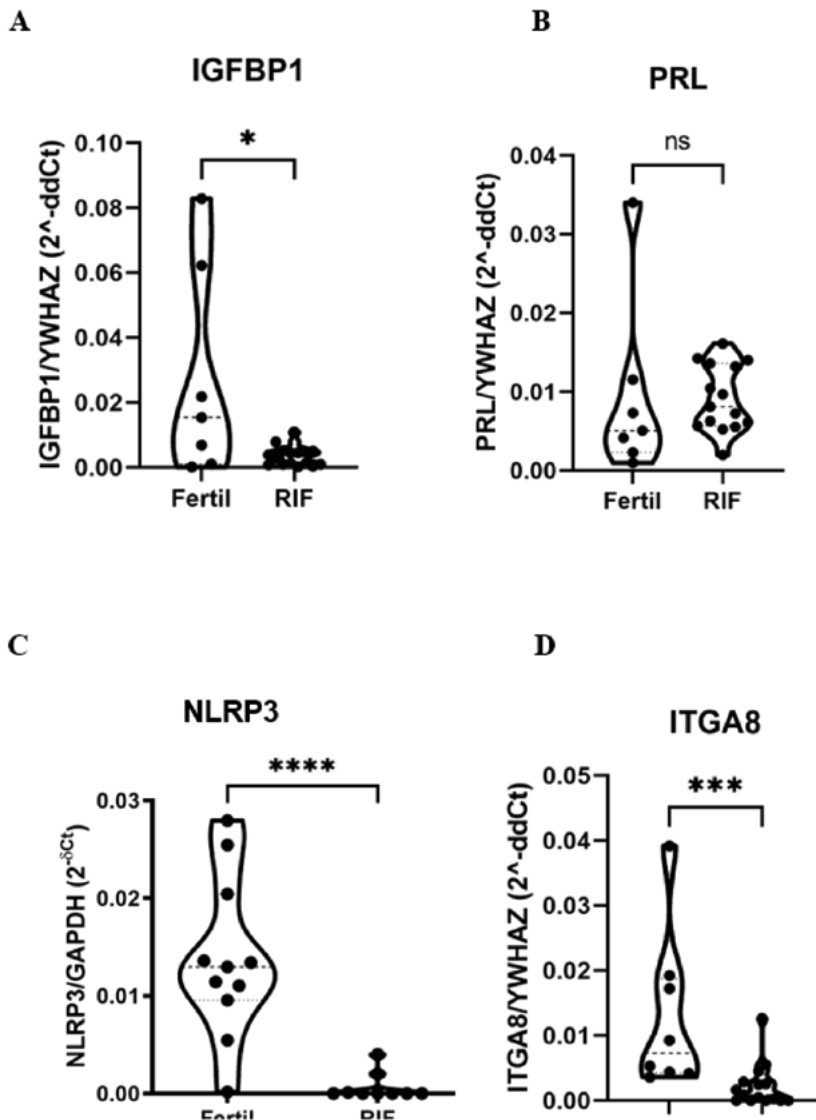
Características	Fértiles	RIF
<b>N</b>	17	14
<b>Edad</b>	38 (31-42)	35 (33-39)
<b>Nacimientos</b>	2 (1-5)	0
<b>Fallas recurrentes en implantación</b>	0	5 (2-9)

A partir de las biopsias obtenidas de ambos grupos de pacientes se obtuvo el correspondiente cDNA y se analizó la expresión génica por RT-qPCR. Como muestran las Figuras 4A y B, los endometrios obtenidos de pacientes con RIF presentaron disminuidos significativamente la expresión de los marcadores característicos de decidualización IFGB1 y prolactina en comparación con la observada en muestras de mujeres fértiles.

Dado que el programa de decidualización regula la respuesta inflamatoria y la

expresión de la familia de integrinas responsables de mediar la adhesión estable del blastocisto, se investigó la expresión de NLRP3 y de la integrina ITGA8<sup>(14,15)</sup> en ambos grupos de pacientes. Como se observa en las Figuras 4C y D, la expresión de NLRP3 fue significativamente menor en las biopsias de pacientes con RIF en comparación con la observada en los endometrios de las mujeres fértiles; acompañado por una marcada reducción en la expresión de la integrina ITGA8.

**Figura 4. Receptividad endometrial: análisis de biopsias endometriales.** Se obtuvieron biopsias endometriales durante la fase secretora del ciclo menstrual de pacientes con RIF y de mujeres fértiles. Las muestras se procesaron mecánicamente, se aisló el ARN y se generó ADNc. Se estudió la expresión de **A:** IGFBP1, **B:** Prolactina, **C:** NLRP3 y **D:** ITGA8 por RT-qPCR. En las pacientes RIF, el proceso de decidualización fue acompañado de una menor expresión de los marcadores de decidualización IGFBP1 y PRL, así como de la subunidad NLRP3 del inflamasoma y de la integrina ITGA8. Los resultados se expresaron como  $2^{-\Delta Ct}$  normalizando a los genes house-keeping GAPDH o YWHAZ. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,005$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , Mann-Whitney U-test



Estos resultados sugieren que el endometrio de las pacientes con RIF presenta alteraciones en el programa de decidualización que llevarían a una inadecuada

expresión de marcadores característicos, así como a alteraciones en la respuesta inflamatoria y en el mecanismo de adhesión del blastocisto.

## Discusión

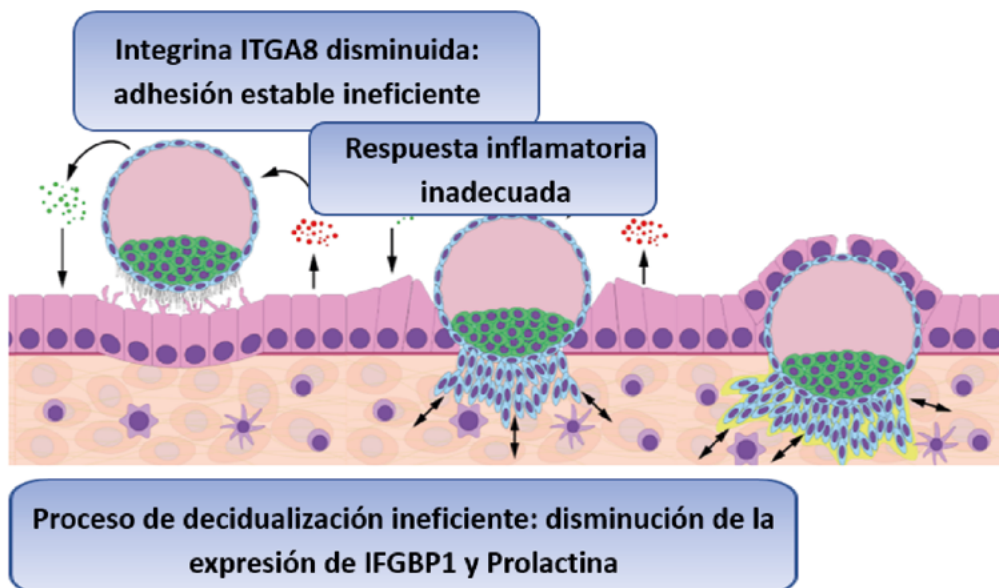
En este trabajo, nos enfocamos en algunos genes que resultan críticos para integrar procesos que acompañan la decidualización e implantación embrionaria; y cómo ciertas alteraciones en los mismos podrían pre condicionar el endometrio de pacientes con RIF.

En primer lugar, realizamos un análisis *in silico* integrado los procesos de angiogénesis, placentación, decidualización, inflamación y regulación inmune que nos permitió identificar una red de genes que los conectan. Luego utilizamos un modelo de decidualización *in vitro*, basado en la línea celular HESC, mediante el cual pudimos confirmar la decidualización se acompaña de la producción de IL-1 $\beta$  activa. A su vez, en otro análisis integrado bioinformático abordamos la expresión

diferencial de genes a partir de arrays de pacientes con RIF, encontrando que más de la mitad de los genes que unen los distintos procesos están alterados en pacientes con RIF. Finalmente, validamos algunos de los genes identificados en muestras de pacientes con RIF y fértiles lo que nos permitió concluir que el endometrio de las pacientes con RIF presenta alteraciones en el programa de decidualización, en la respuesta inflamatoria y en consecuencia en el mecanismo de adhesión (*attachment*) del blastocisto (Figura 5).

En trabajos ya publicados, el modelo *in vitro* de decidualización permitió estudiar la generación de un microambiente proinflamatorio asociado a la implantación embrionaria exitosa<sup>(12,17)</sup>. Con respecto a la producción de IL-1 $\beta$ , esta citoquina resulta clave en la regulación de la

**Figura 5. Condicionamiento de la receptividad endometrial en pacientes con fallas recurrentes en las fertilizaciones *in vitro*: resumen gráfico del trabajo.** El endometrio de las pacientes con RIF presenta alteraciones en el programa de decidualización asociado a una inadecuada expresión de marcadores característicos; llevando a alteraciones en la respuesta inflamatoria fisiológica y en consecuencia disminuiría la adhesión estable (*attachment*) del blastocisto al epitelio uterino.



respuesta inflamatoria en el período peri-implantacional<sup>(3,18)</sup>. Particularmente, un nivel moderado de IL-1 $\beta$  tiene función proimplantatoria, modulando la expresión de proteínas de remodelación de matriz extracelular e incrementado la expresión de integrinas en el endometrio, que luego mediarán la adhesión estable del blastocisto<sup>(14,15,19)</sup>. Las integrinas son las glicoproteínas dominantes en la adhesión debido a su capacidad para unirse a los ligandos de la matriz extra celular para mediar la adhesión y de reorganizar citoesqueleto para estabilizar la adhesión del blastocisto. La contribución de las integrinas a la adhesión del blastocisto al epitelio luminal ha sido muy bien caracterizado en distintos modelos animales y específicamente la ITGA8 en el modelo bovino<sup>(15)</sup>.

Cuando estudiamos las biopsias de pacientes con RIF, encontramos una disminución en los marcadores IFGBP1 y prolactina, ambos marcadores del programa de decidualización. Este programa cíclico en humanos contribuye al “precondicionamiento” del endometrio y de él depende la receptividad endometrial<sup>(20,21)</sup>.

Más aún, las pacientes con RIF también presentaron disminuida significativamente la expresión NLRP3, una subunidad del inflammasoma, lo que indica una respuesta inflamatoria inadecuada. A su vez, la respuesta inflamatoria también es responsable de inducir la activación de las integrinas, en consecuencia, se afectaría la adhesión

estable del blastocisto. En ese sentido, evidenciamos una marcada disminución de la expresión de la integrina ITGA8, que nos sugiere que la adhesión estable del blastocisto estaría disminuida en este grupo de pacientes.

Finalmente, el uso de herramientas bioinformáticas que combinan múltiples vías de señalización junto con el análisis de expresión de genes en *arrays* públicos, presenta una gran oportunidad para explorar posibles genes clave en la regulación de los procesos asociados a la reproducción. En el presente trabajo utilizando herramientas bioinformáticas muy novedosas, exploramos los potenciales genes más relevantes y sentamos las bases para profundizar en los mecanismos asociados a la decidualización y a la implantación embrionaria. Además, exploramos los cambios en la expresión génica tanto en un modelo *in vitro* de decidualización, como en endometrios de mujeres fértiles y mujeres con RIF, evidenciando en este último grupo (RIF) una respuesta inflamatoria inadecuada que a su vez condiciona la adhesión del blastocisto, aportando así al entendimiento que subyacen a las fallas reiteradas en las implantaciones *in vitro*.

Identificar los mecanismos alterados en la receptividad endometrial aportaría desde la investigación básica al diseño de nuevas estrategias terapéuticas impactando a futuro en el éxito de los tratamientos de fertilización asistida y especialmente en pacientes con RIF.

## REFERENCIAS

1. Loke YW, King A, Burrows TD. Decidua in human implantation. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1995;10 Suppl 2:14-21.
2. Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJC, Lentjes EG, Fauser BCJM, Heijnen CJ, et al. Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF. *Hum Reprod Oxf Engl.* junio de 2009;24(6):1427-35.
3. Soczewski E, Grasso E, Gallino L, Hauk V, Fernández L, Gori S, et al. Immunoregulation of the decidualization program: focus on the endoplasmic reticulum stress. *Reproduction.* abril de 2020;159(4):R203-11.
4. Dimitriadis E, White C a, Jones RL, Salamonsen L a. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update.* 2005;11(6):613-30.
5. Dimitriadis E, Nie G, Hannan NJ, Paiva P, Salamonsen LA. Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface. *Int J Dev Biol.* enero de 2010;54(2-3):313-22.
6. Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat Rev Immunol.* agosto de 2017;17(8):469-82.
7. 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 Baltim Md.* enero de 2012;26(1):203-17.
8. Dinarello CA. The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* octubre de 2019;15(10):612-32.
9. Paulesu L, Bigliardi E, Paccagnini E, Ietta F, Cateni C, Guillaume CP, et al. Cytokines in the oviparity/viviparity transition: evidence of the interleukin-1 system in a species with reproductive bimodality, the lizard *Lacerta vivipara*. *Evol Dev.* 7(4):282-8.
10. Geisert R, Fazleabas A, Lucy M, Mathew D. Interaction of the conceptus and endometrium to establish pregnancy in mammals: role of interleukin 1 $\beta$ . *Cell Tissue Res.* septiembre de 2012;349(3):825-38.
11. Strakova Z, Srisuparp S, Fazleabas AT. Interleukin-1 $\beta$  Induces the Expression of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1 during Decidualization in the Primate 1. *Endocrinology.* diciembre de 2000;141(12):4664-70.
12. 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 B Aires.* 2018;78.
13. Lerner AG, Upton JP, Praveen PVK, Ghosh R, Nakagawa Y, Igarria A, et al. IRE1 $\alpha$  induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metab.* agosto de 2012;16(2):250-64.
14. Kumar V, Soni UK, Maurya VK, Singh K, Jha RK. Integrin beta8 (ITGB8) activates VAV-RAC1 signaling via FAK in the acquisition of endometrial epithelial cell receptivity for blastocyst implantation. *Sci Rep.* diciembre de 2017;7(1):1885.
15. Yamakoshi S, Bai R, Chaen T, Ideta A, Aoyagi Y, Sakurai T, et al. Expression of mesenchymal-related genes by the bovine trophectoderm following conceptus attachment to the endometrial epithelium. *REPRODUCTION.* marzo de 2012;143(3):377-87.
16. Grasso E, Gori S, Soczewski E, Fernández L, Gallino L, Vota D, Martínez G, Irigoyen M, Ruhlmann C, Lobo TF, Salamone G, Mattar R, Daher S, Leirós CP, Ramhorst R. Impact of the Reticular Stress and Unfolded Protein Response on the inflammatory response in endometrial stromal cells. *Sci Rep.* 2018; 16;8(1):12274.
17. Racicot K, Kwon JY, Aldo P, Silasi M, Mor G. Understanding the Complexity of the

- Immune System during Pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* agosto de 2014;72(2):107-16.
18. Ramhorst R, Grasso E, Papparini D, Hauk V, Gallino L, Calo G, et al. Decoding the chemokine network that links leukocytes with decidual cells and the trophoblast during early implantation. *Cell Adhes Migr.* marzo de 2016;10(1-2):197-207.
  19. Ihnatovych I, Hu W, Martin JL, Fazleabas AT, de Lanerolle P, Strakova Z. Increased Phosphorylation of Myosin Light Chain Prevents *In Vitro* Decidualization. *Endocrinology.* 1 de julio de 2007;148(7):3176-84.
  20. Brosens JJ, Parker MG, McIndoe A, Pijnenborg R, Brosens IA. A role for menstruation in preconditioning the uterus for successful pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* junio de 2009;200(6):615.e1-6.
  21. Brosens JJ, Salker MS, Teklenburg G, Nautiyal J, Salter S, Lucas ES, et al. Uterine selection of human embryos at implantation. *Sci Rep.* febrero de 2014;4(1):3894.
  22. Garrido-Gomez T, Dominguez F, Quiñonero A, Diaz-Gimeno P, Kapidzic M, Gormley M, et al. Defective decidualization during and after severe preeclampsia reveals a possible maternal contribution to the etiology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(40):E8468-77.
  23. ER Stress and Angiogenesis. Binet F, Sapiha P. *Cell Metab.* 2015 6;22(4):560-75.