



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 983 444**

⑮ Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/12 (2015.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2015 E 22150013 (5)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2024 EP 4012023**

⑮ Título: **Tratamiento de células madre en patologías endometriales**

⑯ Prioridad:

17.06.2014 US 201462013121 P

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2024

⑯ Titular/es:

ASHERMAN THERAPY, S.L. (100.0%)
Ronda Narciso Monturiol y Estarriol, 11 C
46980 Paterna, Valencia, ES

⑯ Inventor/es:

SIMON, CARLOS;
SANTAMARÍA, JAVIER;
PELICER, ANTONIO y
CERVELLO, IRENE

⑯ Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 983 444 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de células madre en patologías endometriales

5

Campo de la invención

La presente invención en general se refiere al uso de células madre de médula ósea (BMDSC) CD133⁺ autólogas para inducir regeneración endometrial y tratar patologías endometriales como el síndrome de Asherman y la atrofia de endometrio.

Antecedentes de la invención

En una mujer en edad de procrear, pueden distinguirse dos capas de endometrio: (i) la capa funcional adyacente a la cavidad uterina, y (ii) la capa basal, adyacente al miometrio y por debajo de la capa funcional. La capa funcional se acumula después del final de la menstruación durante la primera parte del ciclo menstrual previo. La proliferación se induce por estrógenos (fase folicular del ciclo menstrual), y después se producen cambios en esta capa mediante la progesterona desde el cuerpo lúteo (fase luteína). Está adaptada para proporcionar un entorno óptimo para la implantación y crecimiento del embrión. Esta capa se desprende completamente durante la menstruación. Por el contrario, la capa basal no se desprende en ningún momento durante el ciclo menstrual. La regeneración del endometrio humano según los cambios sistémicos de los esteroides ováricos en cada ciclo menstrual es esencial para la preparación de este órgano para su función principal, es decir, el desarrollo del intervalo endometrial de implantación para hospedar el blastocisto de implantación, lo que permite que se produzca el embarazo. Por tanto, la reposición de todos los compartimentos celulares de la capa funcional endometrial con cada ciclo menstrual es esencial para la función reproductora normal.

El síndrome de Asherman (AS) es una afección en la que hay una destrucción del endometrio causada por legrados repetidos o agresivos y/o endometritis. Produce una obstrucción de la cavidad uterina con adhesiones intrauterinas y ausencia de endometrio funcional en muchas zonas. Las mujeres con esta enfermedad, así como con endometrio atrofico (< 4 mm) a menudo tienen problemas de infertilidad, irregularidades menstruales incluyendo amenorrea, hipomenorrea y abortos recurrentes. Actualmente no existe tratamiento específico para estas patologías endometriales. Por tanto, sigue existiendo una necesidad de desarrollar tratamientos seguros y eficaces para tratar estas patologías.

35 Nagori Chaitanya Bet al., Journal of Human Reproductive Science. 2011, vol. 4 (1): 43-48 describe la regeneración endometrial usando células madre autólogas adultas seguido por concepción por fecundación in vitro en un paciente con síndrome de Asherman severo.

40 Gargett Caroline E et al., Journal of Human Reproductive Science. 2011, vol. 4 (1): 49-52 describe la generación de endometrio receptivo en síndrome de Asherman.

Feryal Alawadhi et al., PLOS ONE. 2014, Vol. 9 (5): e96662 describe que el trasplante de células madre derivadas de la médula ósea (BMDSC) mejora la fertilidad en un modelo murino de síndrome de Asherman.

45 MaN et al., Cardiovascular Research, Oxford University Press. 2006, vol. 71 (1): 158-169 analiza el potencial de las células CD133⁺ derivadas de la médula ósea y del cordón umbilical en un modelo de criolesión.

Compendio de la invención

50 La presente divulgación se refiere, al menos en parte, al descubrimiento de que las células madre derivadas de médula ósea (BMDSC) CD133⁺ autólogas pueden regenerar la vascularización que da lugar a la creación de endometrio funcional autólogo *de novo*. Por consiguiente, la divulgación proporciona métodos para inducir regeneración endometrial. El método puede comprender la administración de una cantidad eficaz de células madre derivadas de médula ósea (BMDSC) CD133⁺ autólogas en arterias uterinas de un sujeto que lo necesita para inducir regeneración endometrial.

60 En un aspecto, la invención proporciona células madre autólogas CD 133⁺ derivadas de médula ósea aisladas (BMDSC) para su uso en la inducción de la regeneración endometrial en un sujeto que lo necesite, en el que las BMDSC CD133⁺ aisladas se administran en las arterias uterinas del sujeto y en el que el sujeto tiene atrofia endometrial resistente al tratamiento hormonal.

65 En otro aspecto, la invención proporciona células madre autólogas CD 133⁺ aisladas derivadas de médula ósea (BMDSC) para su uso en el tratamiento del síndrome de Asherman o de la atrofia endometrial en un sujeto que las necesita, en el que las BMDSC CD133⁺ aisladas se administran en las arterias uterinas del sujeto y en el que el sujeto tiene atrofia endometrial resistente al tratamiento hormonal.

Se sabe que el sujeto padece el síndrome de Asherman o atrofia endometrial. El sujeto tiene atrofia endometrial resistente al tratamiento hormonal. En algunas realizaciones, el sujeto ha tenido uno o más fracasos previos de implantación embrionaria. En algunas realizaciones, las CMDMO CD 133+ autólogas se preparan administrando al sujeto un agente para movilizar las CMDMO de la médula ósea a la sangre periférica del sujeto; y aislando las CMDMO CD 133+ de la sangre periférica del sujeto. En algunas realizaciones, el agente para movilizar BMDSC es el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). En algunas realizaciones, las BMDSC CD 133+ autólogas se han aislado de la circulación periférica del sujeto mediante aféresis utilizando un anticuerpo anti-CD 133. En algunas realizaciones, las CMDMO CD 133+ se administran en las arterias uterinas a través de un catéter. En algunas realizaciones, las CMDMO CD 133+ se administran en las arteriolas espirales uterinas del sujeto.

10

Algunos aspectos de la divulgación proporcionan un método para inducir regeneración endometrial, el método comprende aislar células madre derivadas de médula ósea (BMDSC) CD133+ autólogas de un sujeto que lo necesita; y administrar una cantidad eficaz de las BMDSC CD133+ aisladas a las arterias uterinas del sujeto para inducir regeneración endometrial.

15

En algunas realizaciones, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) se administra al sujeto antes de aislar las BMDSC autólogas. En algunas realizaciones las BMDSC CD133+ autólogas se aíslan de la circulación periférica del sujeto por aféresis usando un anticuerpo anti-CD133. En algunas realizaciones las BMDSC CD133+ se administran a las arterias uterinas a través de un catéter. En algunas realizaciones las BMDSC CD133+ se administran a las arteriolas espirales uterinas del sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto ha tenido uno o más fracasos previos en la implantación del embrión.

20

Cada una de las limitaciones de la invención puede abarcar diversas realizaciones de la invención. Se prevé, por lo tanto, que cada una de las limitaciones de la invención que implique un elemento cualquiera o combinaciones de elementos puede incluirse en cada aspecto de la invención. Esta invención no se limita en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. La invención tiene capacidad para otras realizaciones y de ponerse en práctica o realizarse de diversas maneras. Además, la fraseología y terminología usadas en este documento es con fines de descripción y no deben considerarse limitantes. El uso de "incluir", "comprender" o "tener", "contener", "implicar" y variaciones de las mismas en este documento, se entiende que abarca los artículos enumerados después de ellas y equivalentes de los mismos, así como artículos adicionales.

Breve descripción de los dibujos

35

La figura 1 es un esquema que muestra el diseño del estudio (A) y la línea temporal (B) de los sucesos representados en la figura 1A.

40

La figura 2 es una angiografía que demuestra la trayectoria de la sonda desde las arterias uterinas a través de las arteriolas espirales donde se sitúan las células CD133+ a través de radiología no invasiva.

La figura 3 muestra la histeroscopia de la cavidad uterina de una paciente con endometrio atrófico antes, 3-6 y 9 meses después del tratamiento con BMSC autólogas.

45

La figura 4 demuestra el grosor endometrial en 6 pacientes con endometrio atrófico/síndrome de Asherman incluidas en este estudio, antes y 3 meses después de tratamiento con BMSC autólogas.

50

La figura 5 muestra la media + DE del grosor endometrial antes y 3 meses después del tratamiento con BMSC autólogas.

55

La figura 6 muestra imágenes de ecografía 3D que demuestran la mejora del volumen endometrial obtenido 3 meses después del tratamiento con BMSC autólogas en comparación con el estado basal antes del tratamiento.

Las figuras 7A-7B muestran imágenes histeroscópicas preoperatorias y posoperatorias. Hallazgos histeroscópicos en pacientes con síndrome de Asherman (figura 7A) o atrofia endometrial (figura 7B) antes del tratamiento con células madre (1.^a imagen), y 2-3 meses (2.^a imagen) y 4-6 meses (3.^a imagen) después de tratamiento con células madre. La gravedad de las adhesiones endometrial se clasificó según la clasificación de la American Fertility Society.

60

Las figuras 8A-8I muestran análisis tisulares. Resultados inmunohistoquímicos para la detección de vasos sanguíneos maduros en el endometrio de la paciente 7 antes (figura 8A), 3 meses (figura 8B) y 6 meses (figura 8C) después del tratamiento con células autólogas. Las células a-sma+, CD31+ positivas identifican vasos sanguíneos maduros (20x).

La figura 8D muestra miometrio humano usado como control positivo para tinción a-sma, y se usó amígdala humana como control positivo para CD31 (figura 8E). La figura 8F muestra el control negativo resultante de la ausencia de anticuerpo primario. La figura 8G presenta una vista detallada del vaso identificado en la figura 8C (40x). En la figura 8H, se presenta la dinámica del número total de vasos sanguíneos maduros de 8 pacientes antes, y 3 y 6 meses

después del tratamiento celular, que indica un efecto neoangiogénico sensible al tiempo. La figura 8I muestra el análisis estadístico de la media + EEM de los vasos sanguíneos maduros totales antes y 3 y 6 meses después del tratamiento.

5 La figura 9 muestra el diseño del estudio. La reconfirmación histeroscópica y la clasificación de AS o EA fue realizada por un cirujano en la fase proliferativa. La movilización de BMDSC se indujo por inyección de G-CSF, y cinco días después, las células CD133⁺ se aislaron de la sangre periférica a través de aféresis y se instilaron inmediatamente en las arterias espirales por radiología intervencionista. Se realizó una segunda y tercera imagen por histeroscopia para evaluar la cavidad uterina después del tratamiento con células madre. Entonces se animó a las pacientes a que intentaran concebir.

10 Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de una nueva estrategia terapéutica para inducir regeneración endometrial usando tratamiento con células madre autólogas. En particular, la presente invención se basa en el hallazgo de que células madre derivadas de médula ósea (BMDSC) CD133⁺ autólogas pueden regenerar la vascularización que da lugar a la creación de endometrio funcional autólogo *de novo*. Aunque las BMDSC se conocían como una fuente de células no hematopoyéticas en los diferentes compartimentos celulares endometriales (estroma, epitelio glandular y epitelio luminal), no se conocían la o las subpoblaciones de BMDSC que promueve(n) la reparación del endometrio. La presente invención proporciona tratamientos celulares seguros y eficaces para inducir la regeneración endometrial y tratar patologías asociadas con degeneración endometrial como el síndrome de Asherman y la atrofia endometrial.

20 El útero humano consiste principalmente del endometrio y la capa de músculo liso externa llamada miometrio. La capa funcional del endometrio humano es un tejido muy regenerativo que experimenta ciclos mensuales de crecimiento, diferenciación y desprendimiento durante los años reproductivos de la mujer. Los niveles fluctuantes de estrógenos y progesterona en circulación orquestan este remodelado drástico del endometrio humano. La regeneración endometrial también sigue al parto y a la resección endometrial. La regeneración endometrial desde la capa basal contribuye al remplazo de la capa funcional seguido de su desbridamiento durante la menstruación y el parto. Sin embargo, puede que el endometrio no logre responder a los estrógenos y no se regenere en determinadas patologías, por ejemplo, síndrome de Asherman y atrofia del endometrio. Dichos sujetos pueden experimentar proliferación endometrial anómala y llegar a ser infértils.

25 El síndrome de Asherman (AS) (o síndrome de Fritsch) es una afección caracterizada por adhesiones y/o fibrosis del endometrio asociadas muy a menudo con dilatación y legrado de la cavidad intrauterina. Se han usado otros varios términos para describir la afección y afecciones relacionadas, incluyendo: adhesiones intrauterinas (IUA), atresia uterina/cervical, atrofia uterina traumática, endometrio esclerótico, esclerosis endometrial y sinequias intrauterinas. El traumatismo en la capa basal endometrial, por ejemplo, después de una dilatación y legrado (D y L) realizadas después de un aborto natural o parto, o por aborto médico, puede dar lugar al desarrollo de cicatrices intrauterinas que provocan adhesiones que pueden obstruir la cavidad uterina en grados variables. De forma extrema, la cavidad completa puede 30 estar llena de cicatrices y ocluida. Incluso con relativamente pocas cicatrices, puede que el endometrio no logre responder a los estrógenos, y un sujeto puede experimentar irregularidades menstruales derivadas (tales como amenorrea, hipomenorrea u oligomenorrea) y llegar a ser infértil. AS también puede producirse por otras cirugías pélvicas, incluyendo cesáreas, eliminación de tumores fibroides (miomectomía) y por otras causas tales como DIU, 35 radiación pélvica, esquistosomiasis y tuberculosis genital. La endometritis crónica por tuberculosis genital es una causa importante de adhesiones intrauterinas graves (IUA) en el mundo en desarrollo, a menudo provocando obstrucción total de la cavidad uterina, que es difícil de tratar.

40 La histeroscopia es el método de referencia para el diagnóstico de AS. Las imágenes por sonohisterografía o histerosalpingografía revela el grado de formación de cicatrices. Dependiendo del grado de gravedad, AS puede provocar infertilidad, abortos naturales repetidos, dolor por sangre atrapada y complicaciones obstétricas futuras. Si 45 se deja sin tratar, la obstrucción del flujo menstrual como resultado de las adhesiones puede dar lugar a endometriosis en algunos casos.

45 En la atrofia endometrial, el endometrio llega ser demasiado delgado como resultado de bajos niveles de estrógenos. Para considerarse atrófico, el grosor endometrial debe medir menos de 4-5 mm en una exploración ecográfica transvaginal. La relación del cuerpo uterino al cuello uterino también tenderá a disminuir y puede aproximarse a 1:1. Una RM también puede demostrar una disminución en el grosor endometrial similar al observado con ecografía. Los factores que pueden causar atrofia endometrial incluyen anticoncepción oral prolongada, estado hipoestrogénico (disfunción ovárica) y uso de tamoxifeno.

50 Se describe aquí un método para inducir regeneración endometrial. El método comprende administrar una cantidad eficaz de células madre derivadas de médula ósea (BMDSC) CD133⁺ autólogas en las arterias uterinas de un sujeto que lo necesita para inducir regeneración endometrial.

El método puede comprender aislar las células madre derivadas de médula ósea (BMDSC) CD133⁺ autólogas de un sujeto que lo necesita; y administrar una cantidad eficaz de las BMDSC CD133⁺ aisladas a las arterias uterinas del sujeto para inducir regeneración endometrial.

- 5 Según un aspecto, la invención proporciona células madre autólogas CD 133+ derivadas de médula ósea (BMDSC) aisladas para inducir la regeneración endometrial en un sujeto que las necesita, en el que las BMDSC CD 133+ aisladas se administran en las arterias uterinas del sujeto y en las que el atrofia endometrial resistente al tratamiento hormonal.
- 10 Según otro aspecto, la invención proporciona células madre autólogas CD 133+ derivadas de médula ósea (BMDSC) aisladas para el tratamiento de la atrofia endometrial en un sujeto que las necesite, en el que las BMDSC CD 133+ aisladas se administran en las arterias uterinas del sujeto y en el que el sujeto tiene atrofia endometrial resistente al tratamiento hormonal.
- 15 Como se usa en este documento, "un sujeto" incluye todos los mamíferos incluyendo, aunque sin limitación, perros, gatos, caballos, ovejas, cabras, vacas, cerdos, seres humanos y primates no humanos. En algunas realizaciones, el sujeto es una mujer.
- 20 Un sujeto que necesita regeneración endometrial es un sujeto cuyo endometrio no logra regenerarse en respuesta a estrógenos y tiene un revestimiento endometrial delgado. Dichos sujetos a menudo experimentan proliferación endometrial anómala y llegan a ser infériles. El grosor óptimo del revestimiento endometrial es entre 10 y 15 mm, alcanzando su grosor máximo en el momento de la implantación aproximadamente en el día 21 del ciclo menstrual de una mujer. En algunas realizaciones, el sujeto que necesita tratamiento tiene un grosor endometrial en el momento de la implantación que es de menos de 5 mm, menos de 4 mm, menos de 3 mm, menos de 2 mm o menos de 1 mm. En
- 25 algunas realizaciones, el sujeto tiene irregularidades menstruales caracterizadas por una disminución en el flujo y la duración del sangrado (amenorrea, hipomenorrea u oligomenorrea) y/o abortos recurrentes. Se sabe que el sujeto tiene Síndrome de Asherman o atrofia endometrial. El sujeto tiene atrofia endometrial resistente al tratamiento hormonal. En algunas realizaciones, el sujeto ha tenido uno o más fracasos previos en la implantación del embrión. Se ha mostrado que las células madre derivadas de médula ósea (BMDSC) contribuyen como fuente exógena a la
- 30 reparación tisular y la regeneración de diferentes órganos y tejidos. En el endometrio humano y murino, las BMDSC también son una fuente de células no hematopoyéticas en los diferentes compartimentos celulares endometriales (estroma, epitelio glandular y epitelio luminal). Contribuyen principalmente a la formación de células del compartimento estromal endometrial y en un grado mucho menor a los compartimentos glandular endometrial y epitelial luminal.
- 35 Las BMDSC incluyen células madre hematopoyéticas (HSC) y células madre mesenquimatosas (MSC). Sin embargo, se desconocía la o las subpoblaciones de BMDSC que promueve(n) la reparación del endometrio.
- 40 Los inventores de la presente invención han demostrado, por primera vez en seres humanos, la capacidad de células madre derivadas de médula ósea CD133⁺ suministradas a las arterias uterinas mediante sistemas de suministro quirúrgico y por catéter de inducir la regeneración endometrial. Se aislaron BMDSC CD133⁺ en circulación autólogas después de movilización previa de médula ósea y se reimplantaron en las arterias uterinas del útero de la misma paciente. Las BMDSC CD133⁺ regeneran la vascularización, que da lugar a la creación de un endometrio funcional autólogo *de novo*. CD133 es una glucoproteína también conocida en seres humanos y roedores como Prominin 1 (PROM1). Es una proteína de unión a colesterol con cinco dominios transmembrana que se localiza en protuberancias de membrana y a menudo se expresa en células madre adultas, donde se cree que funciona en mantener las propiedades de las células madre suprimiendo la diferenciación.
- 45 Las BMDSC CD133⁺ de la presente invención pueden obtenerse de células madre primarias o pueden obtenerse de una línea de células madre establecida. En algunas realizaciones, las células madre pueden ser células madre embrionarias, células madre adultas, células madre de sangre de cordón umbilical, células madre somáticas, células madre de médula ósea o de médula ósea movilizadas. En realizaciones preferidas, las células madre son células madre adultas.
- 50 En algunas realizaciones, las BMDSC CD133⁺ se preparan administrando al sujeto un agente para movilizar las BMDSC desde la médula ósea a la sangre periférica del sujeto; aislando las BMDSC CD133⁺ de la sangre periférica del sujeto. En algunas realizaciones, el agente de movilización de las células madre se selecciona del grupo que consiste en factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y plerixafor (AMD3100). En algunas realizaciones, el agente de movilización de las células madre es G-CSF.
- 55 En algunas realizaciones, las BMDSC CD133⁺ autólogas se aíslan de la circulación periférica del sujeto mediante un proceso llamado aféresis usando un anticuerpo anti-CD133 (véase, por ejemplo, Sovalat H, Scrofani M, Eidenschenk A, Pasquet S, Rimelen V, Hénon P. Identification and isolation from either adult human bone marrow or G-CSF-mobilized peripheral blood of CD34(+)/CD133(+)/CXCR4(+) Lin(-)CD45(-) cells, featuring morphological, molecular, and phenotypic characteristics of very small embryonic-like (VSEL) stem cells. *Exp Hematol*. abril 2011; 39(4):495-505).

La aféresis, que es un proceso bien conocido en la técnica, se refiere al proceso o procedimiento en que la sangre se extrae de un sujeto donante y se separa en sus componentes, algunos de los cuales se retienen, tales como las poblaciones de células madre, y el resto se devuelve por transfusión al sujeto donante. La aféresis dura más que una donación de sangre completa. Una donación de sangre completa tarda aproximadamente 10-20 minutos para recoger la sangre, mientras que una donación por aféresis puede tardar aproximadamente 1-2 horas. El producto de aféresis se refiere a la población heterogénea de células recogida del proceso de aféresis.

En algunas realizaciones, las BMDSC CD133⁺ se aíslan de las BMDSC aisladas usando un anticuerpo anti-CD133. En algunas realizaciones, las BMDSC CD133⁺ se seleccionan usando un anticuerpo anti-CD133 hasta que las BMDSC CD133⁺ son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,9 % o 100 % puras. En algunas realizaciones, las BMDSC CD133⁺ son al menos un 95 %, 98 %, 99 %, 99,9 % o 100 % puras.

La administración de BMDSC CD133⁺, o composiciones terapéuticas que comprenden dichas células, al sujeto que lo necesita, puede lograrse, por ejemplo, por trasplante, implante (por ejemplo, de las propias células o las células como parte de una combinación de matriz-células), inyección (por ejemplo, directamente a las arterias uterinas), infusión, suministro mediante catéter o cualquier otro medio conocido en la técnica para proporcionar tratamiento celular. En una realización, las células se suministran mediante cateterización intraarterial. El procedimiento de cateterización de la arteria uterina se ha descrito ampliamente y usado en la embolización de miomas uterinos (Ravina JH, Herbreteau D, Ciraru-Vigneron N, et al. Arterial embolisation to treat uterine myomata. Lancet 1995; 346(8976): 671-2, cuyo contenido se incorpora íntegramente al presente documento).

Las BMDSC CD133⁺ se administran a las arterias uterinas del sujeto. Estas arterias aportan sangre al útero. En algunas realizaciones, las BMDSC CD133⁺ se administran a las arteriolas espirales uterinas del sujeto. Las arterias espirales son arterias pequeñas que aportan temporalmente sangre al endometrio del útero durante la fase luteínica del ciclo menstrual. Estas arterias son muy sensibles a los estrógenos y la progesterona, penetran en la capa funcional endometrial, crecen y envían ramificaciones dentro de la misma y muestran patrones muy diferentes y únicos.

Las BMDSC CD133⁺ se administran en una cantidad eficaz. Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para provocar la respuesta biológica deseada, es decir, inducir la regeneración endometrial. Una cantidad eficaz incluye esa cantidad necesaria para ralentizar, reducir, inhibir, mejorar o invertir uno o más síntomas asociados con AS o atrofia endometrial. En algunas realizaciones, dichos términos se refieren a:

- Una reanudación de la menstruación después del tratamiento con células madre BMSC CD133⁺;
- Un aumento del grosor endometrial (el grosor endometrial se mide como la longitud desde el límite superior hasta el inferior del miometrio en el fondo de la cavidad endometrial. Por ejemplo, el aumento puede ser un aumento de un 50 % del grosor máximo alguna vez obtenido con hormonoterapia de remplazo (HRT) medido mediante el eje longitudinal con ecografía vaginal en el fondo uterino (vgr de 4 a 6 mm);
- Evidencias histeroscópicas e histológicas de formación de endometrio *de novo*; y/o Funcionalidad del endometrio reconstruido en términos de tasa de recién nacidos vivos, tasas de embarazo e implantación después de colocación de un embrión en estas pacientes.

En algunas realizaciones, se instilan al menos 45 millones de BMDSC CD133⁺ en el sujeto. En algunas realizaciones, se instilan al menos 50, 55, 60, 65 millones de BMDSC CD133⁺ en el sujeto.

Una cantidad eficaz la puede determinar un experto en la materia usando métodos rutinarios. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es una cantidad que produce cualquier mejora en la afección que se está tratando. Un experto en la materia puede determinar las dosis e intervalos apropiados de agentes terapéuticos a usar, por ejemplo, basándose en ensayos *in vitro* y/o *in vivo* y/u otros conocimientos de las dosificaciones de compuestos. Cuando se administra a un sujeto, las cantidades eficaces del agente terapéutico dependerán, por supuesto, de la enfermedad particular que se esté tratando; la gravedad de la enfermedad; los parámetros de la paciente individual incluyendo la edad, estado físico, talla y peso, tratamiento concurrente, frecuencia de tratamiento, y el modo de administración. Estos factores son bien conocidos por los expertos en la materia y pueden abordarse con no más de la experimentación rutinaria. En algunas realizaciones, se usa una dosis máxima, es decir, la dosis segura más elevada según el criterio médico razonable.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse de ninguna manera como limitación adicional.

Ejemplos

60

65

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Diseño

Lo siguiente es un estudio experimental no controlado en 16 pacientes con AS resistente aprobado por el CEI del Hospital Clínico de Valencia, España y financiado por el Ministerio de Sanidad español (Ref EC 11-299). La movilización de BMDSC se realizó usando CSF de granulocitos (G-CSF) (5 mg/kg/12 h sc durante 4 días). Siete días después, se realizó aféresis de sangre periférica con aislamiento de células CD133⁺. Después, se suministraron células CD133⁺ autólogas a las arteriolas espirales mediante intervención radiológica no invasiva a través de la arteria uterina usando un microcatéter de 2,5 F. El estado de la cavidad endometrial se evaluó a través de histeroscopia, ecografía vaginal e histología antes y 3,6, y 9 meses después de la intervención con células madre.

Pacientes y métodos

Criterios de inclusión

Diecisésis pacientes diagnosticadas con síndrome de Asherman resistente previamente tratado con cirugía al menos siete veces o con atrofia endometrial (< 4 mm) resistente a hormonoterapia con fracaso en la implantación recurrente se incluyeron en el estudio. Todas las pacientes fueron remitidas por sus médicos respectivos en todo el mundo para que entraran en el estudio experimental clínico subvencionado por el Ministerio de Sanidad español. Las edades de las pacientes variaban de 20-45 años de edad, y todas tenían función hepática, cardiaca y renal normal. Se confirmó la ausencia de sangrado menstrual en un ciclo natural o después de hormonoterapia de remplazo (HRT). También se confirmó la ausencia de patología siquiatrífica, VIH, hepatitis B o C, y sífilis, así como el deseo de participar en el estudio.

Criterios de exclusión

Las pacientes se excluyeron del estudio si no había acceso a las venas periféricas o si tenían esplenomegalia.

Metodología

1. Movilización de células madre de médula ósea (BMSC)

Para empezar el procedimiento de movilización, se cumplieron las siguientes condiciones:

- Se informó a la paciente acerca del procedimiento y se le dio el formulario de consentimiento al menos 24 horas antes de la movilización.
- Se realizó la evaluación médica correspondiente, con las exploraciones complementarias pertinentes y se validó por el médico responsable para la recogida de BMSC.
- Se pusieron a disposición los resultados del ensayo serológico pertinente (VIH, HBcAg, HBsAg, VHC, sífilis).
- Se evaluaron las venas para determinar su idoneidad para el procedimiento.

Entonces, se indujo la movilización BMSC a la sangre periférica mediante G-CSF (5 mcg/kg sc cada 12 horas) durante 4 días.

2. Recogida de BMSC

La recogida de BMSC se hizo mediante un procedimiento de aféresis convencional usando una vena periférica. Se realizó una selección positiva de las células CD133⁺ siguiendo el protocolo PO-7610-02 aprobado por el Hospital Clínico Universitario con la aplicación de tres lavados y posterior selección de células CD133⁺. En primer lugar, las células se lavaron e incubaron con un anticuerpo monoclonal, después se lavaron dos veces adicionales, y finalmente se sometieron a selección CD133⁺.

El procedimiento de selección se realizó durante un máximo de 3 horas o hasta que se recogieron al menos 50 millones de células CD133⁺.

3. Trasplante de células CD133⁺ a las arteriolas espirales uterinas por cateterización intraarterial

Veinticuatro horas después de su aislamiento, las células CD133⁺ autólogas se diluyeron en 15-30 cc de solución salina y después se instilaron en las arterias espirales. Las células se recogieron mediante una jeringa estéril en un recipiente y se llevaron al departamento de radiología antes de su instilación. Se instilaron al menos 45 millones de células. El procedimiento de cateterización de la arteria uterina se ha descrito ampliamente y usado en la embolización de miomas uterinos. El equipo de radiología requerido para este procedimiento fue un brazo en C radioquirúrgico o una sala de angiografía con un ecógrafo. En resumen, después de obtener acceso a la arteria femoral común usando la técnica de Seldinger, se colocó en un catéter 4F en la arteria y se usó para cateterizar ambas arterias hipogástricas usando un catéter angiográfico con una curva cobra 2 y una guía Terumo de 0,889 mm (0,035 pulgadas). Se colocó un microcatéter 2,5 F con una guía de 0,355 mm (0,014 pulgadas) a través del catéter cobra y la arteria uterina se cateteriza hasta la curva ascendente o hasta que el microcatéter ha alcanzado su nivel más distal. Una vez que el catéter se había estabilizado y se había comprobado su posición, se instilaron las BMSC CD133⁺ en una suspensión de solución salina. El diámetro del catéter para la inyección de células fue de 500-600 micrómetros y se perfundieron 15 cc.

Después de la intervención, la paciente permaneció durante una noche en el hospital y se le dio el alta el siguiente día sin complicaciones.

5 Criterios de sensibilidad

Esta técnica tiene como objetivo reposar el nicho vascular endometrial en pacientes que padecen síndrome de Asherman o atrofia endometrial usando BMSC CD133⁺ para reconstruir un endometrio funcional que pueda permitir la implantación de un embrión en paciente que experimentan ART con fracaso de implantación recurrente debido al endometrio. Por lo tanto, los siguientes indicadores se consideraron para un tratamiento satisfactorio:

- Resultado de menstruación, la menstruación debe reanudarse después del tratamiento con BMSC CD133⁺.
- El aumento del grosor endometrial. Mínimo de un 50 % del grosor máximo obtenido alguna vez con HRT medido mediante el eje longitudinal por ecografía vaginal en el fondo uterino (vgr de 4 a 6 mm).
- Evidencias histeroscópicas es histológicas de endometrio formado *de novo*.
- Funcionalidad del endometrio reconstruido en términos de tasa de recién nacidos vivos, tasas de embarazo e implantación después de remplazo del embrión en estas pacientes.

20 Resultados

Tabla 1. Desenlace clínico después de tratamiento con células madre CD133⁺

	Edad	Patología	Número de CD133 (mill)/kg	ART	Resultados
Paciente 1	40	síndrome de Asherman	93,5	Transferencia de embrión congelado Donación de óvulos D3 TET	Hidrometra cancelada
Paciente 2	31	s. de Asherman	113,02	ICSI PGD	
Paciente 3	44	s. de Asherman + atrofia	63,44	1.ª transferencia de embrión reciente Donación de óvulos (DET) Blasto	Prueba de embarazo: negativa
Paciente 4	38	s. de Asherman + atrofia	179,4	1.ª transferencia de embrión reciente Donación de óvulos (DET) Blasto	Prueba de embarazo: negativa
Paciente 5	43	atrofia	42	Transferencia de embrión congelado Donación de óvulos (DET) Blasto	Cancelada: endometrio irregular
Paciente 6	45	s. de Asherman	122,8	Transferencia de embrión congelado Donación de óvulos (DET) Blasto	Cancelada: endometrio delgado e irregular
Paciente 7	34	atrofia	200	ICSI PGD	
Paciente 8	35	atrofia	113	Transferencia de embrión congelado PGD	
Paciente 9	41	s. de Asherman + atrofia	184,7	Transferencia de embrión congelado (DET) D3 // Transferencia de embrión congelado (DET) D5	Prueba de embarazo: negativa

25 Tabla 2: Duración del ciclo y cantidad y duración de la menstruación en días después del trasplante de BMDCC CD133⁺ autólogas

Menstruación	Regularidad (días)	Cantidad (número de protecciones/día)	Duración (días)
2.º mes tras el tratamiento	26,5	2,6	3,8
4.º mes tras el tratamiento	25,4	1,6	3,1
6.º mes tras el tratamiento	26,1	1,4	2,1

Este es el primer estudio en serie de casos usando este tratamiento de células madre específicas aplicado de forma intravascular en AS. La incidencia de AS varía entre un 2-22 % de las mujeres infériles.

30 G-CSF es la citocina más habitualmente usada para la movilización de BMSC tanto en donantes autólogos como alogénicos. Este producto en general se tolera bien. Sin embargo, se ha demostrado que administrar una dosis mayor de 5 mcg/kg/día conlleva dolor osteomuscular en más de un 50 % de los casos. Si esto sucede, debe administrarse paracetamol como analgésico (500 mg/8 horas), mientras se mantiene la administración de G-CSF. Otras complicaciones observadas menos frecuentemente son: náuseas y vómitos, migraña, e insomnio. En cada caso, debe administrarse un tratamiento sintomático. En general, los síntomas desaparecen en 3-4 días después de detener la administración de G-CSF, aunque la sensación de astenia podría durar hasta 2 semanas desde la última dosis. Por

último, se ha asociado rotura esplénica en donantes sanos con la administración de G-CSF. Debido a este hecho, debe realizarse una exploración abdominal en todas las pacientes que presenten dolor en el hipocondrio izquierdo. La esplenomegalia detectada en esos casos debe ir seguida de la suspensión inmediata del G-CSF. A menudo se detectan niveles altos de fosfatasa alcalina y LDH sin ningún síntoma relacionado. La leucocitosis es bastante común, y los valores normalmente son de menos de $70 \times 10^9/l$.

Ejemplo 2

Participantes en el estudio

Se invitó a diecisésis pacientes (que varían de 30-45 años de edad) diagnosticadas con síndrome de Asherman (AS) resistente basándose en la clasificación de la American Fertility Society (N = 11) o atrofia endometrial (N = 5) a participar en el estudio. Se confirmó diagnóstico previo de síndrome de Asherman grave o atrofia endometrial, y se realizaron histeroscopias en la fase proliferativa. Las pacientes diagnosticadas con AS se clasificaron según la clasificación de la AFS de adhesiones uterinas, y se obtuvieron biopsias endometriales. Todas las pacientes experimentaban poco o ningún sangrado menstrual durante sus ciclos naturales o después de hormonoterapia de remplazo (HRT). Los requisitos para participar en el estudio incluían los siguientes: función hepática, cardiaca y renal normal, ausencia de VIH, hepatitis B o C, sífilis, y patología psiquiátrica, y deseo de completar el estudio. Las pacientes se excluyeron en casos donde no había acceso a venas periféricas o había esplenomegalia.

Movilización y aislamiento de BMDSC

La movilización de BMDSC se indujo mediante una administración farmacológica de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (10 ug/kg/día en los días -4, -3, -2 y -1). G-CSF es una citocina ampliamente usada para este fin tanto en donantes autólogos como alogénicos. Cinco días después de la inyección, se aislaron las células CD133⁺ mediante aféresis a través venas periféricas usando el separador CobeSpectra (Terumo BCT Lakewood, CO). Se procesaron de dos a tres muestras por paciente y se obtuvo una selección positiva de células CD133⁺ siguiendo un protocolo establecido usando el sistema CliniMACS® (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania). La selección se realizó a las tres horas desde la recogida hasta que se obtuvieron 50 millones de células. Las células CD133⁺ aisladas se diluyeron en 15 a 30 cc de solución salina y se transportaron en una jeringa estéril al departamento de radiología para el suministro a las arteriolas espirales.

Suministro de BMDSC

Después del aislamiento de CD133⁺ con éxito, las pacientes se remitieron al departamento de radiología del HCU, donde se realizó cateterización intraarterial para suministrar las células al nicho de células madre endometrial usando una técnica usada para la embolización de fibroides. Se hizo una aproximación de la arteria femoral común usando la técnica de Seldinger, en que un introductor 4 F permitió la cateterización de ambas arterias hipogástricas con una curva de catéter angiográfico y una guía Terumo (0,889 mm (0,035 pulgadas)). A través del último catéter, se introdujo un microcatéter 2,5 F con una guía (0,355 mm (0,014 pulgadas)) para cateterizar la arteria uterina hasta las arteriolas espirales más distales que el microcatéter pudiera alcanzar (figura 9). Una vez la posición del catéter se estabilizó y verificó, se inyectaron 15 cc de una suspensión salina de las células CD133⁺ seleccionadas (que contenía de 42 a 200 $\times 10^6$ células, media de $123,56 \times 10^6 \pm 57,64$) a través de cada arteria uterina a las arteriolas espirales.

Seguimiento

A todas las pacientes se les administró hormonoterapia de remplazo (Progyluton™, Bayer, Berlín, Alemania) después de recibir el tratamiento celular. Se evaluó el estado de la cavidad endometrial por histeroscopia de diagnóstico, ecografía vaginal e histología para determinar el grosor endometrial y la presencia o ausencia de adhesiones endometriales antes de, 2, 3 y 6 meses después de, tratamiento celular. Entonces se animó a las pacientes a someterse a ART para intentar la concepción (figura 9).

Inmunohistoquímica endometrial

Se evaluó la formación de vasos sanguíneos mediante inmunohistoquímica de CD31 y a-sma-Cy3 en secciones de parafina usando anticuerpo anti-CD31 humano (Dako, Glostrup, Dinamarca) con un anticuerpo secundario de cabra antirratón 488 con Alexa, y anticuerpo de ratón anti-a-sma humano-Cy3 (Sigma-Aldrich, MO, EE. UU.). Los portaobjetos se contratiñeron con DAPI (Invitrogen, CA, EE. UU.). Los controles positivos incluían amígdala humana para CD31 y miometrio para a-sma. Los portaobjetos se examinaron en un microscopio fluorescente Nikon Eclipse 80i. Se usaron tres campos 20x diferentes para analizar la formación total de vasos sanguíneos por zona mediante el programa informático ImageJ. Los datos se presentan como valores específicos para cada paciente antes y 3 meses y 6 meses después del tratamiento celular.

Análisis estadístico

Se realizó análisis estadístico usando el programa informático SPSS 17.0 (IBM, MD, EE. UU.). Se usó una prueba de la t de muestras emparejadas para analizar las diferencias observadas en el recuento de los vasos sanguíneos maduros totales. Un valor p obtenido en un ensayo bilateral < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

5 Resultados

Dos pacientes se excluyeron inicialmente del estudio debido a la poca movilización de células CD133⁺ (< 40 millones) en un caso, y ausencia de acceso de venas periféricas en el otro. Un total de 16 pacientes completó el protocolo. No se presentaron complicaciones importantes.

10 Las pacientes se remitieron al estudio con un diagnóstico de AS resistente (N = 11) (tabla 3). Los antecedentes menstruales de las pacientes revelaron amenorrea en dos pacientes y oligomenorrea en nueve. Las causas de AS fueron dilatación traumática y legrado (D y L) (N = 9), miomectomía histeroscópica (N = 1), e inexplicada (N = 1). El número promedio de histeroscopias operatorias de reparación previamente intentadas fue dos. Ninguna paciente describió una mejora significativa de su estado endometrial a pesar del tratamiento quirúrgico. Tres pacientes se clasificaron como AS de grado III, cuatro pacientes se puntuaron como grado II + EA, dos pacientes seclarificaron como grado II y una paciente se clasificó como AS de grado I (figura 7A). El grosor endometrial máximo con altas dosis de HRT conseguido antes del tratamiento celular fue 4,3 mm ± 0,74 (que varía de 2,7-5 mm) (tabla 3).

15 20 Tabla 3: Características y resultados de pacientes con síndrome de Asherman

Pt.	MH preop	Etiología de AS	Intentos de repar. previos	Edad	ET preop. máx	Histeroscopia			MH posop	ET posop. máx	Result. embar.
						1 ^a imagen antes de terapia celular	2 ^a imagen antes de terapia celular	3 ^a imagen antes de terapia celular			
1	Oligo-menorrea	D y L	h/s x 6	39	4,5 mm	AS estadio III	estadio II	estadio I	Regular con HRT	5,2 mm	No
2	Oligo-menorrea	D y L	ninguno	30	4 mm	AS estadio III	estadio H	estadio I	Regular con HRT	6,5 mm	No
3	Oligo-menorrea	D y L	h/s x 2	43	4,5 mm	AS estadio H	estadio I	estadio I	Regular con HRT	7 mm	Sí, BP
4	Amenorrea	D y L	h/s x 5	37	4,5 mm	EA+AS estadio H	estadio I	estadio I	Regular con HRT	6,1 mm	No
6	Oligo-menorrea	Inexplicada	h/s x 1	45	5 mm	EA+AS estadio I	estadio I	cavidad uterina normalizada	Regular con HRT	5 mm	No
7	Oligo-menorrea	D y L	h/s x 9	34	3,5 mm	EA+AS estadio H	estadio I	estadio I	Regular con HRT		Sí, SP Rotura prematura de membranas a las 17 sem.
8	Amenorrea	D y L; DIU (LNG 5 años)	h/s x 1	35	3,5 mm	EA+AS estadio H	estadio I	estadio I	Regular con HRT	7,1 mm	Sin transfer. Todos los embriones anómalos
9	Oligo-menorrea	D y L	ninguno	40	4,7 mm	AS estadio III	estadio I	no realizada	Regular con HRT	12 mm	No
11	Oligo-menorrea	Im	h/s x 2	40	5 mm	AS estadio I	estadio I	no realizada	Regular con HRT	6 mm	Sí, BP
13	Oligo-menorrea	D y L mm/t	ninguno	43	3 mm	EA+AS estadio H	estadio I	no realizada	Regular con HRT	8 mm	Sí, EP
15	Oligo-menorrea	D y L	h/s x 2	32	5 mm	AS estadio H	cavidad uterina normalizada	no realizada	Regular con HRT	6,8 mm	Sí, BP

Nota: Pt= paciente; MH=antecedentes menstruales; ET=grosor endometrial; D y L=dilatación/legrado; POF=fallo ovárico prematuro; h/s=histeroscopia; hm=miomectomía histeroscópica; Im=miomectomía laparoscópica; AS=síndrome de Asherman (clasificado

mediante la clasificación de la American Fertility Society de adhesiones intrauterinas, 1998); EA=atrofia endometrial; BP=embarazo bioquímico; EP=embarazo ectópico; SP=embarazo espontáneo; ART=tratamiento de reproducción asistida; LNG=levonorgestrel; HRT=hormonoterapia de remplazo

- 5 Las pacientes con EA y fracaso de implantación (N = 5) (tabla 4) incluidas en este estudio tenían antecedentes menstruales previos de amenorrea (N = 3) u oligomenorrea (N = 2). La etiología era D y L previo (N = 1), inexplicada (N = 1), el uso de un DIU de levonorgestrel (N = 1), fallo ovárico prematuro (N = 1) y una miomectomía histeroscópica previa (N = 1). El número promedio de histeroscopias operatorias de reparación previas intentadas fue dos. Se observó atrofia endometrial grave en todos los casos (figura 7B). El grosor endometrial máximo con dosis altas de HRT alcanzadas antes del tratamiento celular fue de 4,2 mm + 0,8 (que varía de 2,7-5 mm) (tabla 4).
- 10

Tabla 4: Características y resultados de pacientes con atrofia endometrial

Pt	MH preop	Etiología de atrofia	Intentos de repar. previos	Edad	ET preop. máx	Histeroscopia			MH posop	ET posop. máx	Result. embar
						1ª imagen antes de terapia celular	2ª imagen antes de terapia celular	3ª imagen antes de terapia celular			
5	Oligo-menorrea	hm	h/s x 3	42	5 mm	atrofia endometrial	Endometrio normal	Endometrio normal	Regular con HRT	6-8 mm	No
10	Amenorrea	D y L	h/s x 2	38	4 mm	atrofia endometrial	Endometrio normal	no realizada	Regular con HRT	7 mm	Sí, aborto clínico a las 9 semanas
12	Oligo-menorrea	Inexplic.	h/s x 2	35	4-3 mm	atrofia endometrial	Endometrio normal	no realizada	Regular con HRT	5-7 mm	Sí, embarazo en curso
14	amenorrea	POF; DIU (LNG 2 años)	h/s x 1	30	2-7 mm	atrofia endometrial	atrofia endometrial	no realizada	Regular con HRT	3-1 mm	Sin transferencia por fracaso de terapia celular
16	amenorrea	POF	h/s x 1	41	5 mm	atrofia endometrial	Cavidad uterina normalizada	no realizada	Regular con HRT	5-7 mm	No

15 Nota: Pt=paciente; MH=antecedentes menstruales; ET=grosor endometrial; D y L=dilatación/legrado; POF=fallo ovárico prematuro; h/s=histeroscopia; hm=miomectomía histeroscópica; Im=miomectomía laparoscópica; AS=síndrome de Asherman (clasificado mediante la clasificación de la American Fertility Society de adhesiones intrauterinas, 1998); EA=atrofia endometrial; BP=embarazo bioquímico; EP=embarazo ectópico; SP=embarazo espontáneo; ART=tratamiento de reproducción asistida; LNG=levonorgestrel; HRT=hormonoterapia de remplazo

- 20 Reconstrucción endometrial después de tratamiento con células madre

25 Despues del tratamiento con BMDSC CD133⁺ autólogas, los ciclos menstruales se reanudaron con HRT en las 16 pacientes, excepto una con EA. Sin embargo, la duración e intensidad de la menstruación, evaluada por el número de compresas usadas, disminuyó progresivamente de una media de 5,06 días (intervalo, 3-7 días) en el primer mes hasta 2,12 (intervalo, 1-3 días) en el sexto mes después del tratamiento celular (figura 1A complementaria). El volumen menstrual también disminuyó de una media de 2,68 (intervalo, 1-5) hasta 1,5 (intervalo, 1-4) compresas por día en el sexto mes.

- 30 35 Las observaciones uterinas realizadas 2, 3 y 6 meses después del tratamiento celular revelaron mejoras en el endometrio y la cavidad uterina (tablas 3 y 4; figura 7). Específicamente, todas las pacientes diagnosticadas con AS en estadio III mejoran hasta estadio I, mientras que una de las dos pacientes afectadas con estadio II mostró una cavidad endometrial completamente normalizada y la otra mejoró hasta estadio I. La paciente restante, inicialmente diagnosticada como estadio I, mejoró con respecto a la puntuación calificativa como se muestra en la tabla 3. El grosor endometrial posoperatorio máximo obtenido fue de 6,7 mm (intervalo, 3,1-12 mm) (tabla 3, figura 7A). En el grupo de EA, se observó un endometrio normal después del tratamiento celular en cuatro de las cinco pacientes (tabla 4; figura 7B). El grosor endometrial máximo obtenido después de tratamiento celular fue de 5,7 mm (intervalo, 5-12 mm) (tabla 4).

- 40 Se evaluó el número total de vasos sanguíneos maduros formados en 8 pacientes mediante la colocalización de CD31 y a-smo realizada antes de, y 3 y 6 meses después de, tratamiento celular (figure 8). Se observó un aumento gradual de formación de vasos sanguíneos después de 3 meses de tratamiento (pacientes 4, 5, 7, 12 y 13), mientras que se encontró un número consistente de vasos sanguíneos maduros en otras (pacientes 6, 9 y 10) (figura 8H). Para comparar los resultados entre el punto de partida del experimento (denominado control) y 3 meses después del tratamiento específico con células CD133⁺, se examinaron los promedios correspondientes y los EEM de los datos.

Se observó un número aumentado de vasos sanguíneos maduros totales (CD31+/a-sma+) en pacientes después de tres meses de tratamiento ($p = 0,021$). Estos resultados sugieren una neoangiogénesis característica después de inyección autóloga de células CD133⁺ en pacientes con AS y EA que disminuye progresivamente después de 6 meses (figura 8I).

- 5 Se evaluó la funcionalidad del endometrio reconstruido mediante el resultado reproductivo de pacientes que desean concebir después de tratamiento con BMDSC CD133⁺ autólogas (tablas 3 y 4). Dos pacientes quedaron embarazadas espontáneamente, dos y cuatro meses después del tratamiento celular, respectivamente, que dieron como resultado un embarazo en curso (paciente 15) y un aborto natural durante la 17.^a semana debido a rotura prematura de las membranas (paciente 7). Se obtuvieron seis embarazos positivos después de 13 transferencias de embrión, que dieron como resultado tres embarazos bioquímicos, un aborto natural en la novena semana debido a un embrión cromosómicamente anómalo evaluado después del aborto natural, un embarazo ectópico y un embarazo en curso (paciente 12). En un caso, la transferencia del embrión se canceló debido a anomalías cromosómicas en todos los embriones (paciente 8) y, en otro caso, no se realizó la transferencia debido al fracaso en el tratamiento celular (paciente 14).

Discusión

20 Desde un punto de vista histológico, AS corresponde a un remplazo del estroma endometrial por un tejido fibroso que afecta a las células madre endometriales y, por lo tanto, la función tisular. Habitualmente las glándulas se remplazan por un epitelio cubo-columnar inactivo que en general no es sensible a estimulación hormonal y causa la completa desaparición de la estructura endometrial que afecta al nicho de células madre endometriales y, por lo tanto, la función tisular. Durante los primeros 50 a 60 años desde el descubrimiento de AS, los investigadores se centraron en la prevalencia, etiología y patología de la afección. Con la llegada de la endoscopia, se desarrollaron nuevos métodos para el diagnóstico y tratamiento de la afección; sin embargo, a pesar de los avances tecnológicos, aproximadamente un 50 % de los casos de AS actualmente no tienen cura completa.

30 Aquí, se describe el primer caso de tratamiento con células madre dirigido específicamente al nicho de células madre endometriales. En condiciones estables, las EPC en circulación (cEP) representan únicamente un 0,01 % de las células en la circulación. Por lo tanto, se planeó la movilización de cEP acoplada a la infusión directa en el órgano afectado. Se aislaron BMDSC CD133⁺ autólogas después de la movilización con G-CSF y después se reintrodujeron en las arteriolas espirales del útero de la paciente usando procedimientos radiológicos no invasivos. Las BMDSC CD133⁺ regeneran la vascularización e inducen proliferación endometrial, que da lugar a la creación de un endometrio reconstruido autólogo. Las BMDSC CD133⁺ se han explorado recientemente en ensayos clínicos para medicina regenerativa en aplicaciones no hemáticas.

40 El objetivo principal fue la reconstrucción del endometrio, evaluada en primer lugar por reanudación de la menstruación, que se produjo en 15 de las 16 pacientes nuestras. Aunque la duración e intensidad de la menstruación disminuyeron progresivamente seis meses después del tratamiento celular, el tratamiento con células madre supuso una diferencia inmediata en la morfología endometrial. La visualización histeroscópica de la cavidad uterina, el grosor endometrial medido por ecografía vaginal y la neoangiogénesis a través de inmunohistoquímica fueron coherentes con una reconstrucción eficaz, aunque transitoria del endometrio. El objetivo secundario era ensayar la funcionalidad del endometrio reconstruido intentando la concepción. Se consiguieron varios embarazos espontáneos, con el uso de ART, después del tratamiento celular, y los dos abortos naturales observados en este estudio no estuvieron relacionados con la funcionalidad endometrial.

50 El injerto celular fue la preocupación principal porque el CEI no permitía marcar las BMDSC CD133⁺ con nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIO) para rastrear las células inyectadas. En su lugar, se utilizó un modelo murino experimental inmunodeficiente para el síndrome de Asherman para este fin. Se usó una alícuota de 1 millón de BMDSC CD133⁺ de pacientes implicadas en el estudio para la caracterización adicional y se ensayó para células Lgr5⁺ y la actividad aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1), dando como resultado un $75,72 \pm 8$ % de células Lgr5⁺ y un $77,45 \pm 7,81$ % de actividad ALDH1, que identifican el estado de células madres y progenitoras, respectivamente. Se incubó otra alícuota de 1 millón de células con 50 µg/ml de rodamina B Molday ION durante 18 h produciendo una eficacia de marcaje de más de un 97 % en todos los experimentos. Después, las células marcadas con SPIO se inyectaron en un modelo de ratón inmunodeficiente de síndrome de Asherman a través de una vena de la cola o inyección intrauterina. Se detectó injerto celular por la identificación de depósitos intracelulares de hierro usando tinción con azul de Prusia, que revela que las BMDSC CD133⁺ se injertaban predominantemente alrededor de los vasos sanguíneos endometriales del endometrio traumatizado.

- 60 Un caso clínico previo mostró resultados positivos tratando AS con el aislamiento de células madre autólogas de células CD9, CD40 y CD90 de médula ósea y colocándolas en la cavidad endometrial, mientras que otro caso clínico describió la colocación directa de células madre mononucleares no caracterizadas en la zona subendometrial con una aguja. Ambos casos clínicos difieren en el tipo de células suministradas y el nicho de células madre diana.
- 65 El presente estudio demuestra que el tratamiento con células BMDSC CD133⁺ autólogas es útil en el tratamiento de pacientes con AS y EA resistente que desean concebir.

Referencias

1. Cha J, Vilella F, Dey SK y Simon C. "Molecular Interplay in Successful Implantation" en *Ten Critical Topics in Reproductive Medicine*, S. Sanders. Science/AAAS, Washington, DC, 2013, pág. 44-48.
2. Cervello I, Gil-Sanchis C, Mas A, Delgado-Rosas F, Martinez-Conejero JA, Galan A, Martinez-Romero A, Martinez S, Navarro I, Ferro J, Horcajadas JA, Esteban FJ, et al. Human endometrial side population cells exhibit genotypic, phenotypic and functional features of somatic stem cells. *PLoS ONE* 2010; 5: e10964.
3. Cervello I, Mas A, Gil-Sanchis C, Peris L, Faus A, Saunders PT, Critchley HO, Simon C. Reconstruction of endometrium from human endometrial side population cell lines. *PLoS ONE* 2011; 6: e21221.
4. Masuda H, Matsuzaki Y, Hiratsu E, Ono M, Nagashima T, et al. (2010) Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration. *PLoS One*. 5(4): e10387.
5. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 (5411): 143-7.
6. Taylor HS. (2004) Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA*. 292(1): 81-5.
7. Du H, Taylor HS. (2007) Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells* 25(8): 2082-6.
8. Mints M, Jansson M, Sadeghi B, Westgren M, Uzunel M, et al. (2008) Endometrial endothelial cells are derived from donor stem cells in a bone marrow transplant recipient. *Hum Reprod*. 23(1): 139-43.
9. Ikoma T, Kyo S, Maida Y, Ozaki S, Takakura M, et al. (2009) Bone marrow-derived cells from male donors can compose endometrial glands in female transplant recipients. *Am J Obstet Gynecol*. 201(6): 608.e1-8.
10. Cervello I, Gil-Sanchis C, Mas A, Faus A, Sanz J, Moscardo F, Higuera G, Sanz MA, Pellicer A, Simon C. Bone marrow-derived cells from male donors do not contribute to the endometrial side population of the recipient. *PLoS ONE* 2012; 7: e30260.
11. Du H, Taylor HS. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells* 2007; 25: 2082-2086.
12. Brantincsak A, Brownstein MJ, Cassiani-Ingoni R, Pastorino S, Szalayoval, Toth ZE, Key S, Nemeth K, Pickel J, Mezey E. CD45-positive blood cells give rise to uterine epithelial cells in mice. *Stem Cells* 2007; 25: 2820-2826.
13. Zhou Y, Gan Y, Taylor HS. Cigarette smoke inhibits recruitment of bone marrow-derived stem cells to the uterus. *Reprod Toxicol* 2011; 31: 123-127.
14. Du H, Naqvi H, Taylor HS. Ischemia/reperfusion injury promotes and granulocyte-colony stimulating factor inhibits migration of bone marrow derived stem cells to endometrium. *Stem Cells Dev* 2012; 21: 3324-3331.
15. Morelli S, Rameshwar P y Goldsmith LT. Experimental Evidence for Bone Marrow as a Source of Nonhematopoietic Endometrial Stromal and Epithelial Compartment Cells in a Murine Model. *Biol Reprod* 2013; 89: 7, 1-7.
16. Aghajanova L, Horcajadas JA, Esteban FJ, Giudice LC. The bone marrow derived human mesenchymal stem cell: potential progenitor of the endometrial stromal fibroblast. *Biol Reprod* 2010; 82: 1076-1087.
17. Urbich C y Dommeler S. Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circ Res*. 2004; 95: 343-353.
18. Yu D, Wong YM, Cheong Y, Xia E, Li TC. Asherman syndrome-one century later. *Fertil Steril* 2008; 89: 759-79.
19. Ravina JH, Herbreteau D, Ciraru-Vigneron N, et al. Arterial embolisation to treat uterine myomata. *Lancet* 1995; 346(8976): 671-2.
20. Chaitanya B Nagori, Sonal Y Panchal, y Himanshu Patel. Endometrial regeneration using autologous adult stem cells followed by conception by in vitro fertilization in a patient of severe Asherman's syndrome. *J Hum Reprod Sci*; 4(1): 43-48 (2011).
21. Gargett CE, Healy DL. Generating receptive endometrium in Asherman's syndrome. *J Hum Reprod Sci*, 4(1): 49-52 (2011).
22. Bradley EA, Reidy JF, Forman RG, Jarosz J, Braude PR. Transcatheter uterine artery embolisation to treat large uterine fibroids. *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105(2): 235-40.
23. Dmowski WP, Greenblatt RB. Asherman's syndrome and risk of placenta accreta. *Obstet Gynecol* 1969; 34: 288-299.
24. Ventolini G, Zhang M, Gruber J. Hysteroscopy in the evaluation of patients with recurrent pregnancy loss: a cohort study in a primary care population. *Surg Endosc* 2004; 18: 1782-1784.
25. Senturk LM, Erel CT. Thin endometrium in assisted reproductive technology. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2008; 20:221-228.
26. Sher G, Fisch JD. Effect of vaginal sildenafil on the outcome of in vitro fertilization (IVF) after multiple IVF failures attributed to poor endometrial development. *Fertil Steril* 2002; 78: 1073-6.
27. Okusami AA, Moore ME, Hurwitz JM, Richlin SS. A case series of patients with endometrial insufficiency treatment with pentoxifylline and alphatocopherol. *Fertil Steril* 2007; 88: S200.
28. Brantincsak A, Brownstein MJ, Cassiani-Ingoni R, et al. CD45-positive blood cells give rise to uterine epithelial cells in mice. *Stem Cells* 2007; 25: 2820-2826.
29. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. 2003; 9: 702-12.

30. Uchida N, Buck DW, He D, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 14720-14725.
31. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2443-2456.
- 5 32. Richardson GD, Robson CN, Lang SH, Neal DE, Maitland NJ, Collins AT. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci* 2004; 117: 3539-3545.
33. Kordes C, Sawitsa I, Müller-Marbach A, et al. CD133⁺ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 410-417.
- 10 34. The American Fertility Society classifications of adnexal adhesions, distal tubal occlusion, tubal occlusion secondary to tubal ligation, tubal pregnancies, Mullerian anomalies and intrauterine adhesions. *Fertil Steril* 1988; 49: 944-55.
35. Gordon PR, Leimig T, Babarin-Dorner A, et al. Large-scale isolation of CD133⁺ progenitor cells from G-CSF mobilized peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transpl* 2003; 31: 17-22.
- 15 36. Goodwin SC, Spies JB, Worthington-Kirsch R, et al. Uterine artery embolization for treatment of leiomyomata: long-term outcomes from the FIBROID Registry. *Obstet Gynecol*. 2008; 111(1): 22-33.
37. Cervello I, Gil-Sanchis C, Santamaría X, Cabanillas S, Diaz A, Faus A, Pellicer A, Simón C. Human bone marrow-derived stem cells improve endometrial regeneration in a murine experimental Asherman's syndrome model. *Human Reprod* 2015, en impresión.
- 20 38. Asherman JG. Amenorrhoea traumatica (atretica). *J Obstet Gynaecol Br Emp* 1948; 55: 23-30.
39. Donnez J, Nisolle M. Hysteroscopic lysis of intrauterine adhesions (Asherman's syndrome). En Donnez J (ed): *Atlas of laser operative laparoscopy and hysteroscopy*. Nueva York: Press-Parthenon Publishers 1994: 3-12.
40. March CM, management of Ashermans Syndrome. *Reprod Biomed Online* 2011 (1): 63-76.
41. Singh N, Mohanty S, Seth T, Shankar M, Bhaskaran S, Dharmendra S. Autologous stem cell transplantation in refractory Asherman's syndrome: A novel cell based therapy. *J Hum Reprod Sci* 2014; 7: 93-8.

25

REIVINDICACIONES

1. Células madre derivadas de médula ósea (BMDSC) CD133⁺ autólogas aisladas para uso en inducir regeneración endometrial en un sujeto en necesidad de ello, en donde las BMDSC CD133⁺ aisladas se administran en las arterias uterinas del sujeto y donde el sujeto tiene atrofia endometrial que es resistente al tratamiento hormonal.
2. Células madre derivadas de médula ósea (BMDSC) CD133⁺ autólogas aisladas para uso en el tratamiento de síndrome de Asherman o atrofia endometrial en un sujeto en necesidad de ello, en donde las BMDSC CD133⁺ aisladas se administran en las arterias uterinas del sujeto y donde el sujeto tiene atrofia endometrial que es resistente al tratamiento hormonal.
3. Las BMDSC CD133⁺ aisladas para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el sujeto tiene un espesor endometrial, en el momento de la implantación, de menos de 5 mm.
4. Las BMDSC CD133⁺ aisladas para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el sujeto tiene amenorrea, hipomenorrea u oligomenorrea.
5. Las BMDSC CD133⁺ aisladas para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el sujeto ha tenido abortos recurrentes.
6. Las BMDSC CD133⁺ aisladas para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el sujeto ha tenido uno o más fracasos previos de implantación del embrión.
7. Las BMDSC CD133⁺ aisladas para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde las BMDSC CD133⁺ autólogas aisladas se han aislado de sangre periférica del sujeto después de la administración al sujeto de un agente para movilizar BMDSC de la médula ósea a la sangre periférica del sujeto.
8. Las BMDSC CD133⁺ aisladas para uso según la reivindicación 7, en donde el agente para movilizar las BMDSC es factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).
9. Las BMDSC CD133⁺ aisladas para uso según las reivindicaciones 7 o 8, en donde las BMDSC CD133⁺ autólogas se aíslan de la circulación periférica del sujeto por aféresis usando un anticuerpo anti-CD133.
10. Las BMDSC CD133⁺ aisladas para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde las BMDSC CD133⁺ se administran a las arterias uterinas a través de un catéter.
11. Las BMDSC CD133⁺ aisladas para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde las BMDSC CD133⁺ se administran a las arteriolas espirales uterinas del sujeto.
12. Las BMDSC CD133⁺ aisladas para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde al menos 45 millones de BMDSC CD133⁺ se administran al sujeto.
13. Las BMDSC CD133⁺ aisladas para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde las células se proporcionan como una combinación matriz-célula.

FIG. 1

A. DISEÑO DEL ESTUDIO

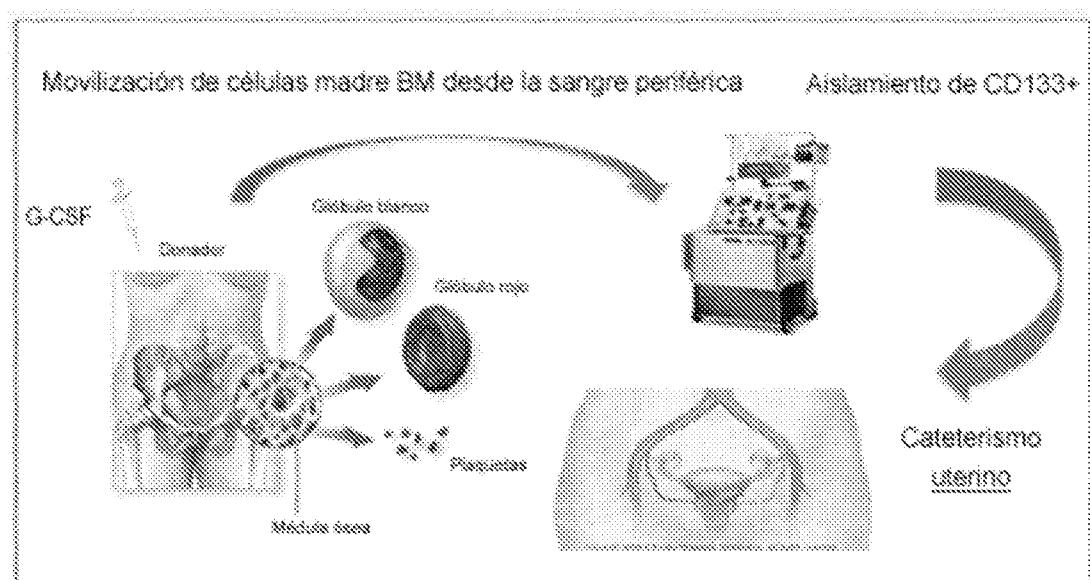


FIG. 2

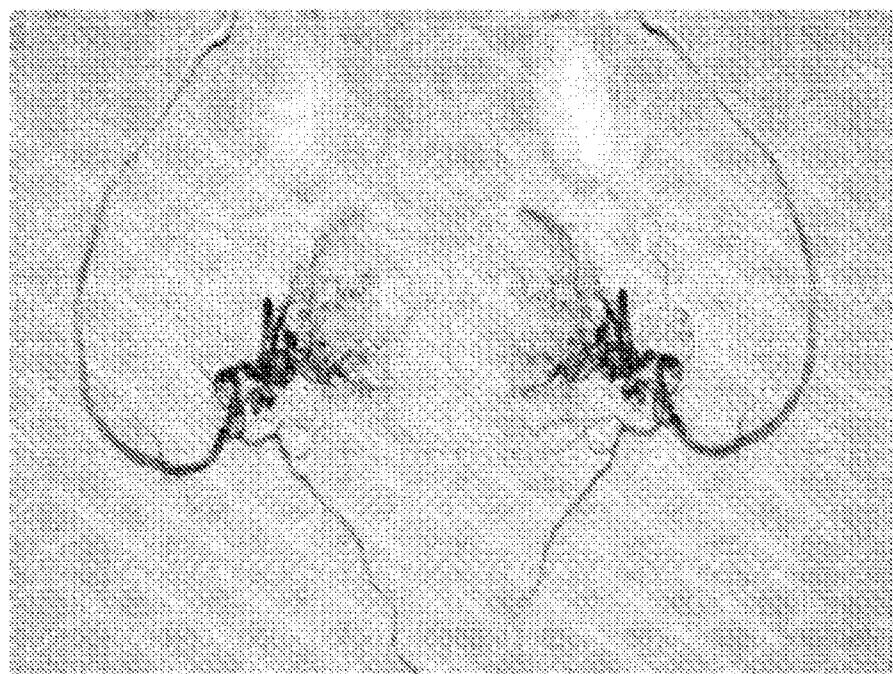


FIG. 3

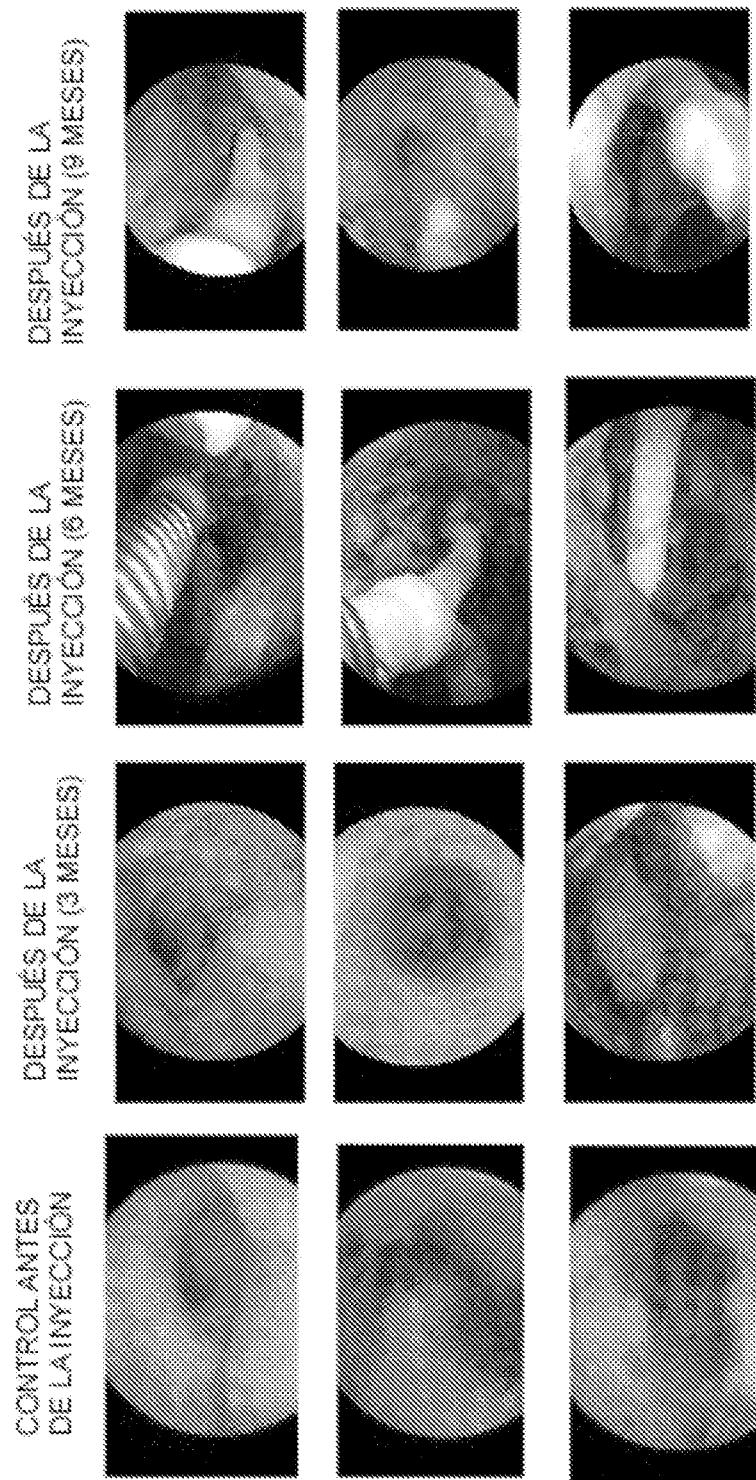


FIG. 4

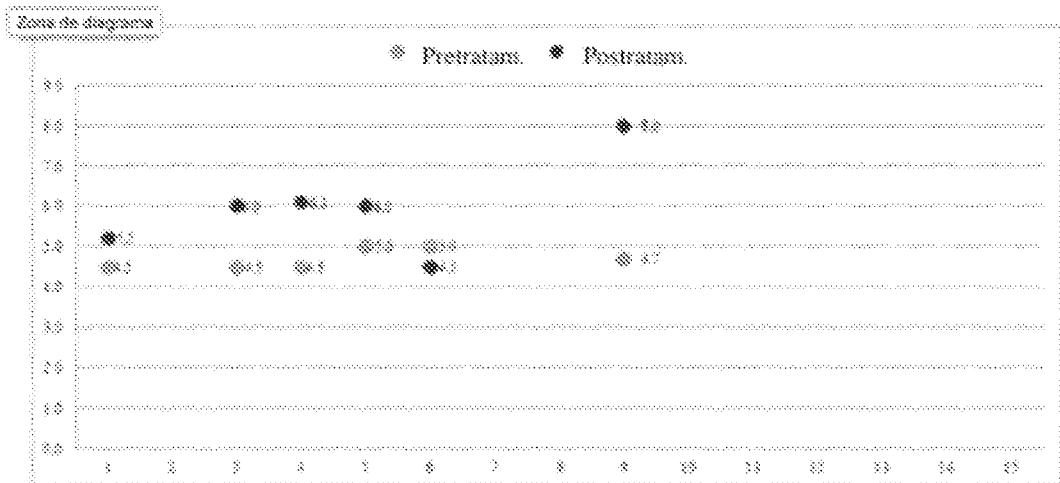


FIG. 5

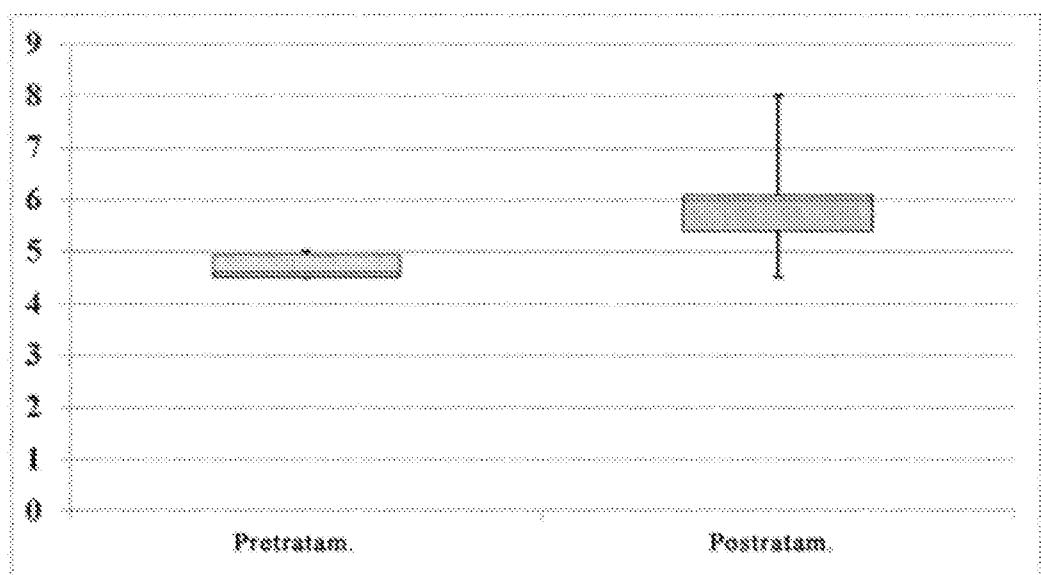


FIG. 6

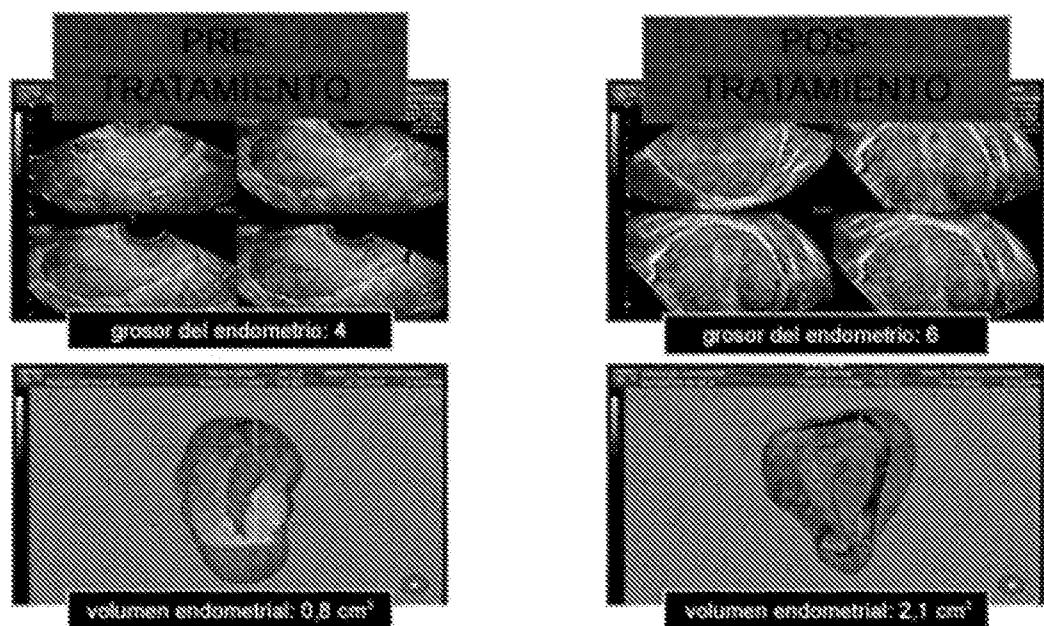


FIG. 7A

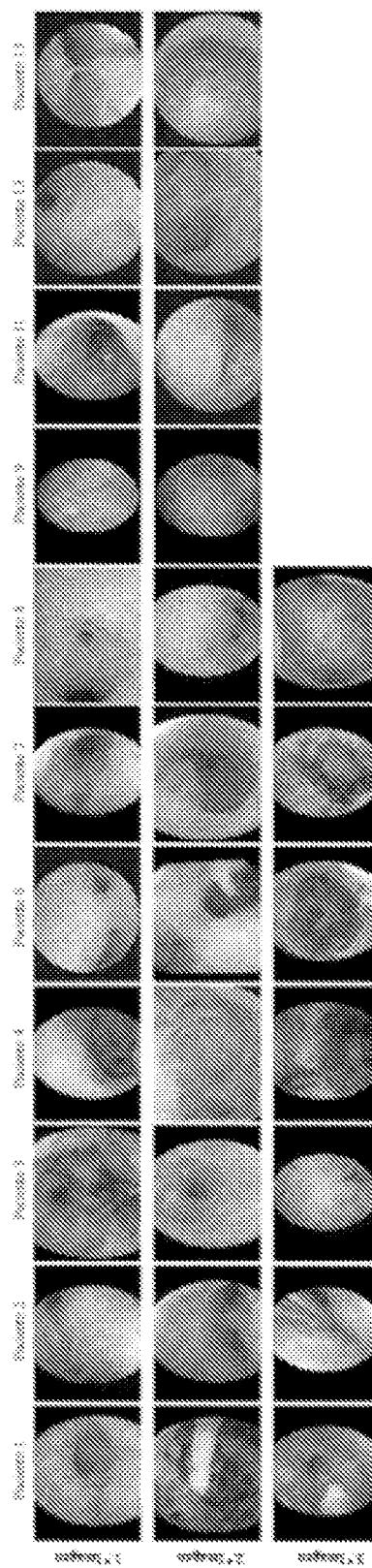
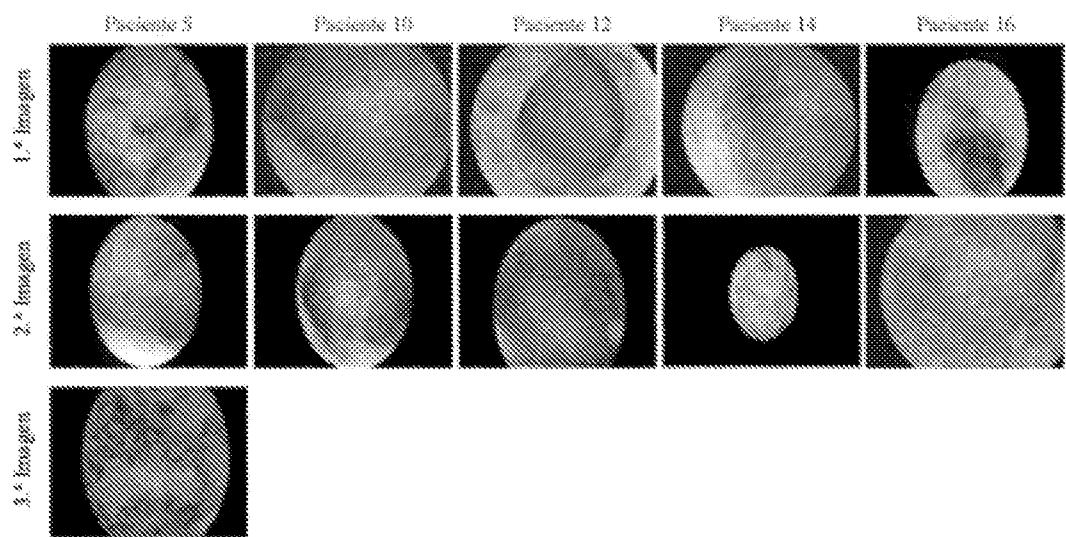


FIG. 7B



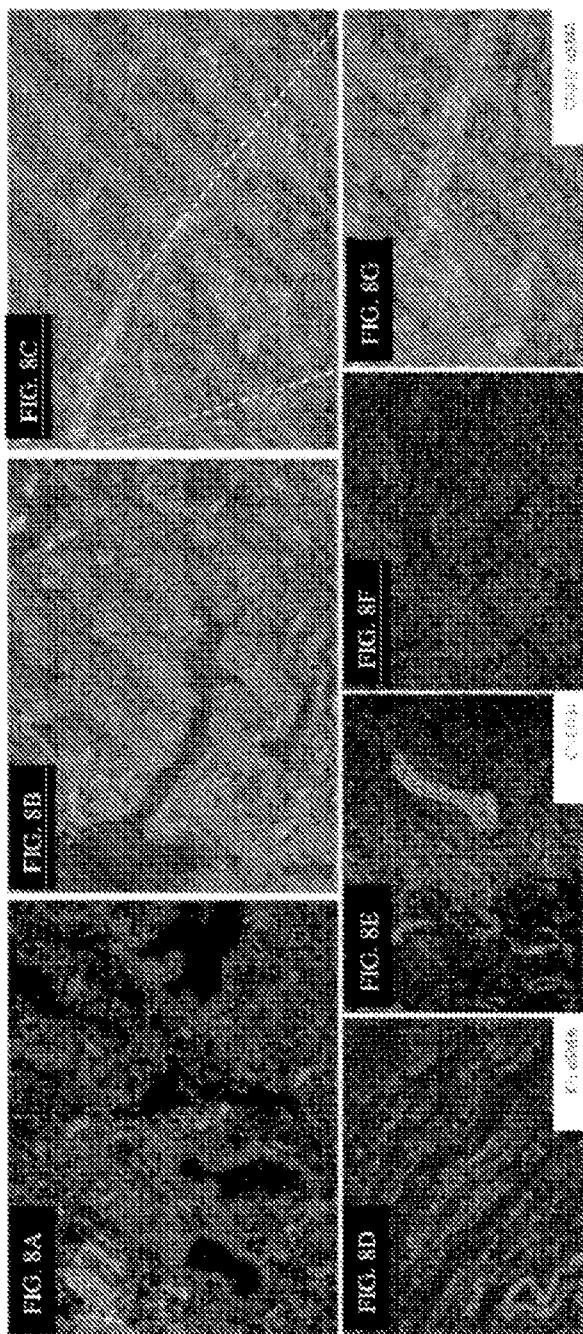


FIG. 8H

Vasos sanguíneos maduros

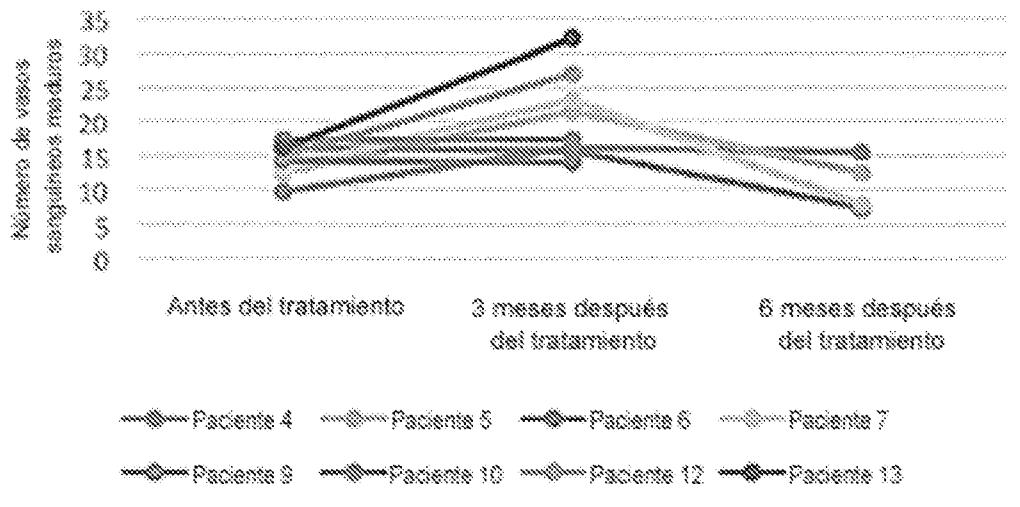
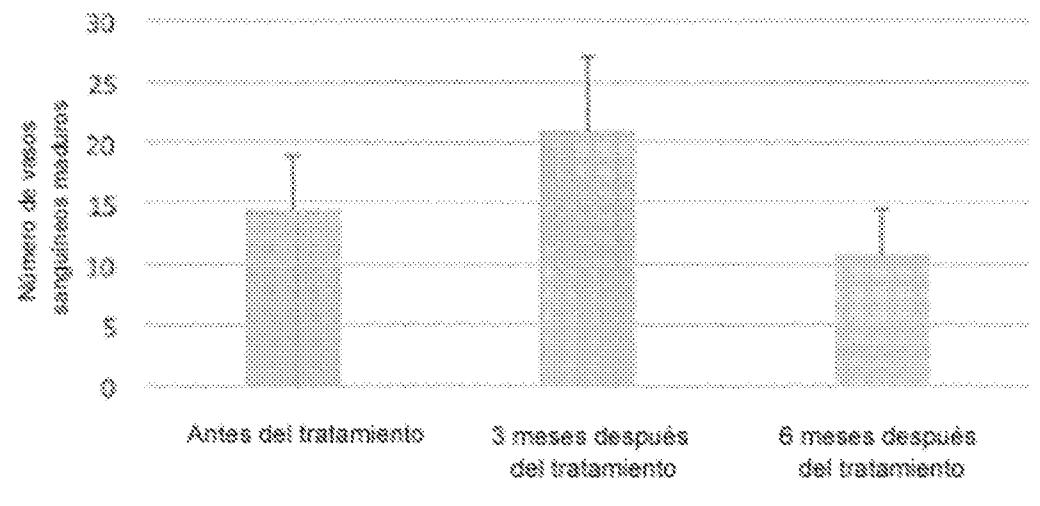


FIG. 8I

Promedio de vasos sanguíneos maduros (n=4)



66

Movilización de BMODSC desde la sangre periférica

Alzamiento de CD133+

Catechismo uterino

