



# TERAPIA REGENERATIVA ENDOMETRIAL EN FALLA REPETIDA IMPLANTATORIA CON enMSCs

Alberto E. Tersoglio, MD

Dante R. Salatino, PhD

Sebastian Tersoglio

Adriana Gonzalez

Carolina Marín

Matías Castro

**INSTITUTO  
TERSOGGIO**

International Center for  
Assisted Reproduction

Mendoza - Argentina

## Características de las enMSCs

1. Tres clases de SCs en endometrio:  
Mesenquimales, Epiteliales y Endometriales.
2. Alta Disponibilidad (12 veces al año).
3. Obtención por métodos no o mínimamente invasivos.
4. Alta clonalidad.
5. Alto potencial de diferenciación.
6. Alta estabilidad al cariotipo (hasta 12 pasajes). Baja capacidad tumorigénica.
7. Capacidad inmunomodulatoria.
8. Baja capacidad Inmunogénica.
9. Capacidad Angiogénica.

## Propiedades inmunomodulatorias e inmunogénicas

1. Inhiben LB,LT y NK.
2. Suprimen cel Dendríticas
3. Liberan citoquinas inmunosupresivas como IFN- $\gamma$  y TNF $\alpha$
4. Su efecto sobre los monocitos son dependientes de las concentraciones. Bajo niveles promueven proliferación de mononucleares.
5. Se pueden expresar por un aumento de CD14.
6. Un aumento de IL-6 y IL-10.
7. La débil acción inmunogénica las hace de elección para prevenir injuria.

## OBJETIVOS:

### Primarios

1. Evaluar la intervención de la transferencia de enMSCs en pacientes estériles en un grupo de pacientes con FRI asociado a endometrio adelgazado.
2. Las variables analizadas fueron HP, IHQ, enCF.

### Secundarios

3. Los resultados clínicos medidos en término de embarazo clínico, nacido/s vivo/s por ciclo, aborto temprano y nacimientos prematuros.
4. Resultados perinatales.

## MATERIAL Y METODO:

N=30

Se consideró endometrio adelgazado al que luego de 7 días bajo estrogenoterapia no logra superar los 7 mm.

Los pacientes fueron evaluados con por lo menos dos biopsias endometriales, una en pretratamiento y una segunda en postratamiento, realizadas en día +7LH y día +6 de progesterona dependiendo de si eran ciclos espontáneos o de reemplazo.

Evaluación citométrica de la población Linfocítica endometrial(LT-NK-LB-CD4-CD8). HP de acuerdo a protocolo e IHQ (Rec E<sub>2</sub>, Pg, HSP29, CD<sub>138</sub>, CD<sub>20</sub>, CD<sub>56</sub> )

Cultivo MSC, entre el pasaje 5 a 7 caracterización a la confluencia (Human MSC analysis kit, BD Biosciences).

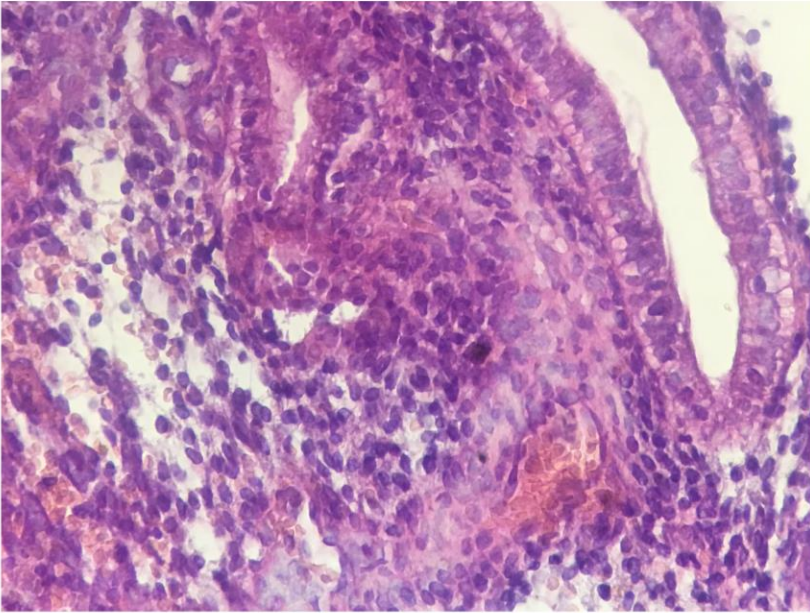
Transferencia transmiométrial por Endosonografía Vaginal.

Table 1 Demographic, Patient and basal clinical characteristics.

Number of cycles/patient	30
Number of previous IVF cycles	3.1 ( $\pm$ 0.73 )
Body Mass Index (Kg/m <sup>2</sup> )	25 ( $\pm$ 4,66)
Patient age (year)	41,03 ( $\pm$ 4,52)
Length of sterility (year)	10,12 ( $\pm$ 6,08)
Basal endometrial thickness (mm)	5,06( $\pm$ 1,05)
Oocyte donation	19/30 (63,33%)
Endometrial biopsy	
Normal	2/30 (6,7%)
Abnormal	28/30 (73,33%)
Chronic Endometritis	16/28 (57,14 %)
Histopathological Abnormal Pattern <sup>k</sup>	12/28 (42,85%)

Note: Values were represented by median  $\pm$  DS

# HISTOPATOLOGIA ENDOMETRIAL



#### VALORACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE SIGNOS DE ENDOMETRITIS

##### CELULAS PLASMÁTICAS: 0/1

- Valoración de plasmocitos en 20 cga: 0 (ausentes)

##### INFILTRACIÓN CELULAR: 0/4

- Linfocitos en cúmulos: ausentes
- Presencia de neutrófilos en epitelio superficial: ausentes
- Presencia de neutrófilos en luces glandulares: ausentes
- Presencia de eosinófilos: ausentes

##### CAMBIOS ESTROMALES: 2/3

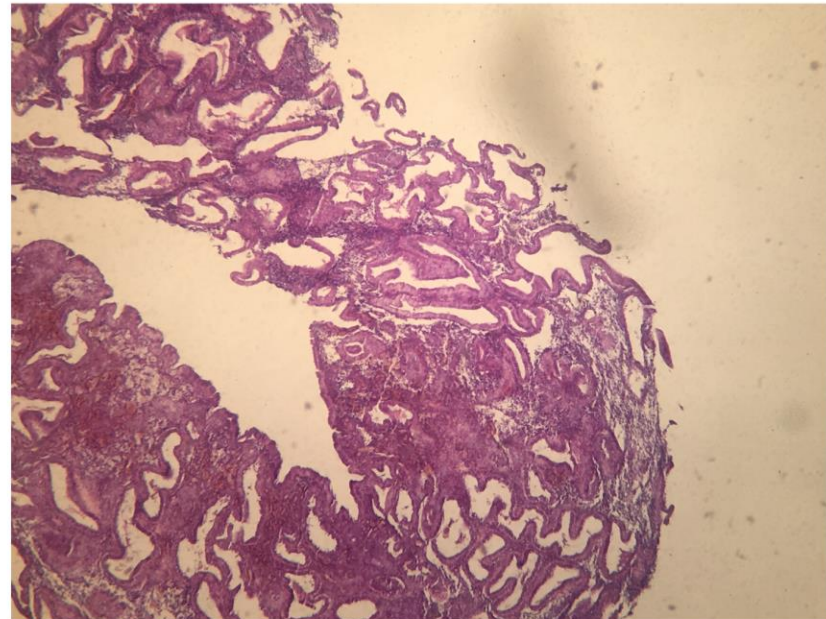
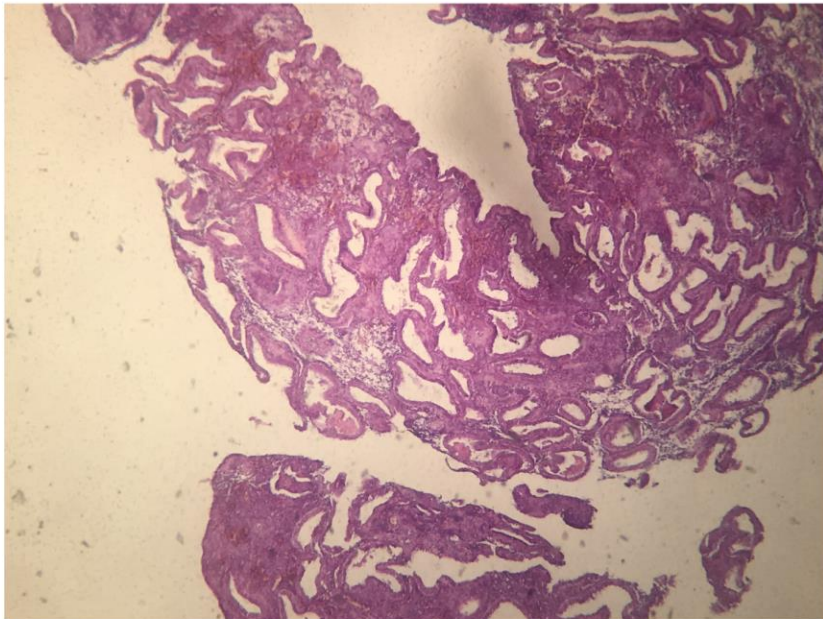
- Edema superficial de la mucosa: presente, focal
- Densidad elevada de células estromales: presente
- Presencia de células estromales fusiformes (pseudofibroblásticas): ausente

##### CAMBIOS CELULARES DEL EPITELIO GLANDULAR: 0/1

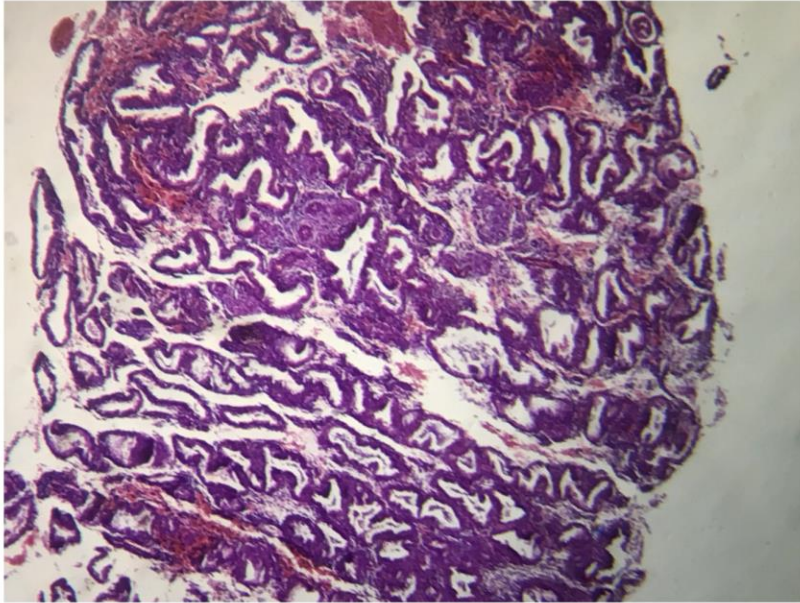
- Pseudoestratificación: ausente

##### OTROS: 0/1

- Micropólipos: ausentes







#### VALORACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE SIGNOS DE ENDOMETRITIS

##### DIRECTOS

##### CELULAS PLASMÁTICAS: 1/1

- Valoración de plasmocitos en 20 cga: 6/20 cga

##### INDIRECTOS

##### INFILTRACIÓN CELULAR: 1/4

- Linfocitos en cúmulos: ausentes
- Células polimorfonucleares en estroma: focales y aisladas
- Células polimorfonucleares en epitelio superficial: ausentes
- Células polimorfonucleares en luces glandulares: ausentes

##### CAMBIOS ESTROMALES: 2/3

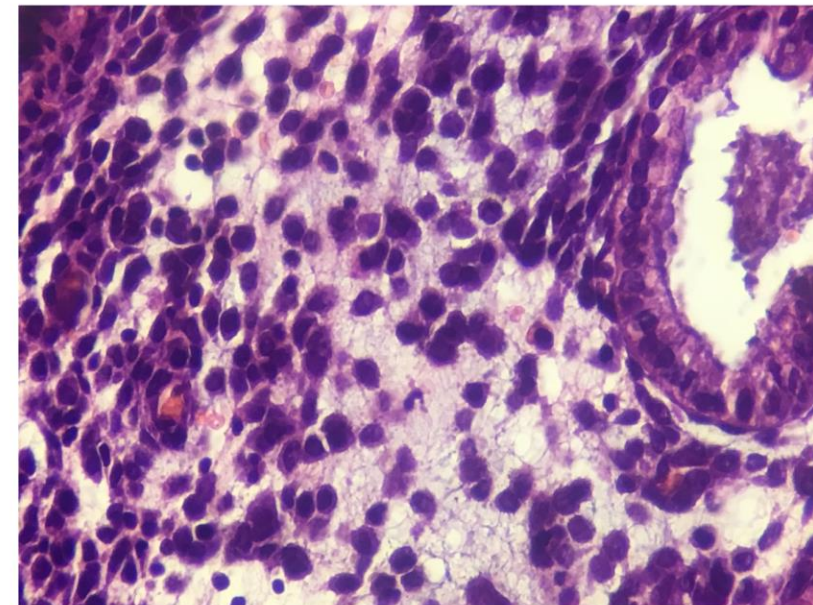
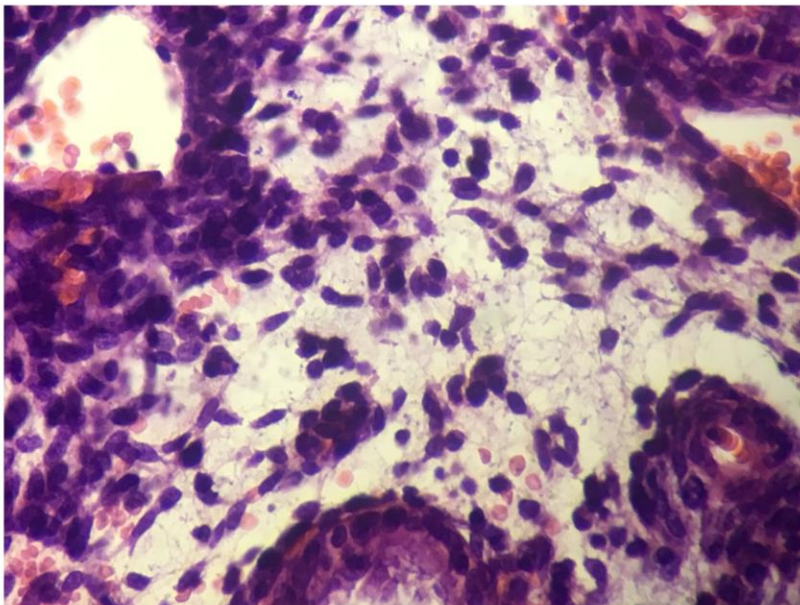
- Edema superficial de la mucosa: presente
- Densidad elevada de células estromales: ausente
- Células estromales fusiformes (pseudofibroblásticas/spindle cell): presentes

##### CAMBIOS CELULARES DEL EPITELIO GLANDULAR: 1/1

- Pseudoestratificación: presente, focal

##### OTROS: 0/1

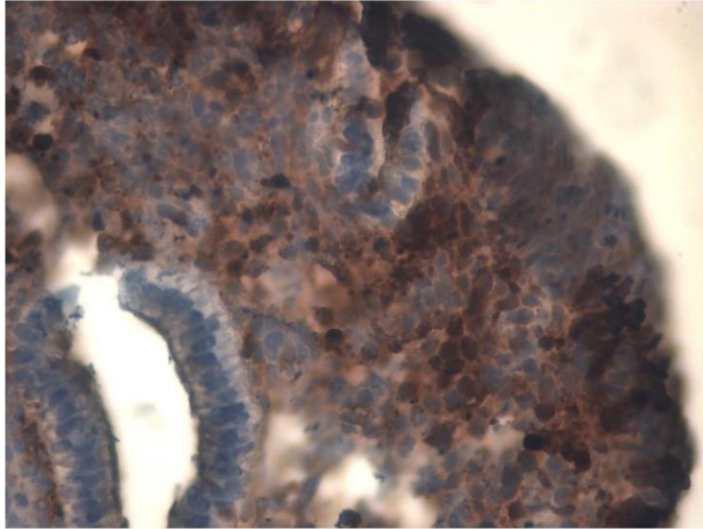
- Micropólipos: ausentes



# INMUNOHISTOQUIMICA ENDOMETRIAL

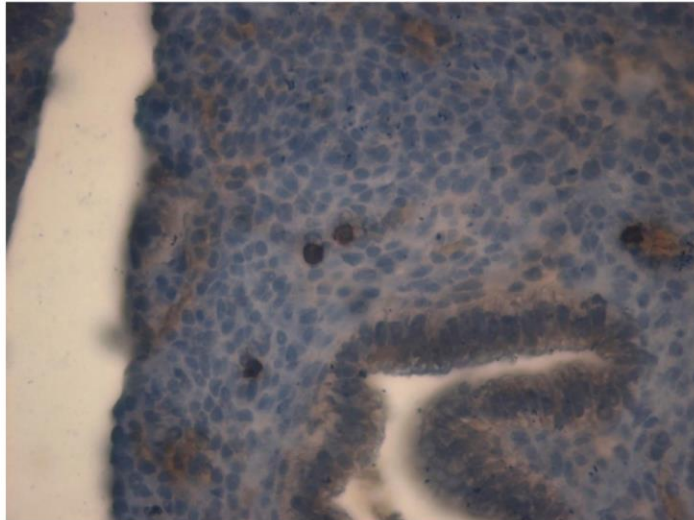


### Kappa Lambda

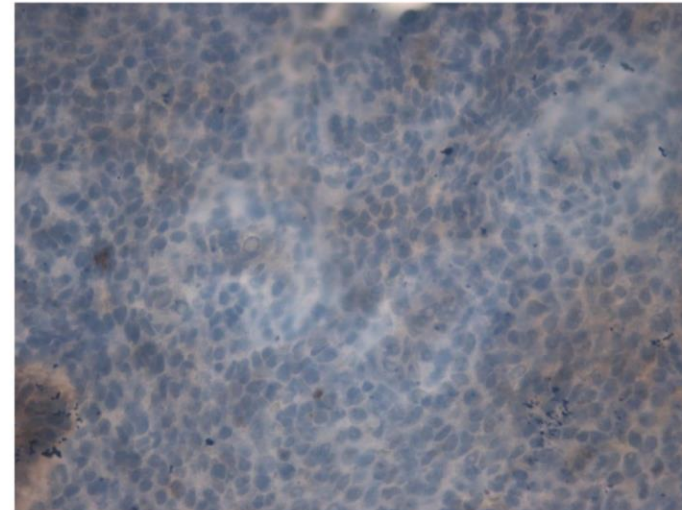


MARCADOR	RESULTADO
Receptor de Progesterona (Dako, monoclonal) <sup>1</sup>	Positivo moderado en epitelio glandular, más débil en epitelio superficial y negativo en el estroma.
HSP27 (monoclonal) <sup>2</sup>	Positividad moderada a intensa en epitelio superficial y positividad moderada en glandular. Negativo en estroma.
CD20 (Dako, monoclonal) <sup>3</sup>	Negativo
Cadenas κλ (Dako, monoclonal) <sup>34</sup>	Presencia de células plasmáticas en áreas del estroma donde llega a un 20%/hpf.
CD57 (Dako, monoclonal) <sup>5</sup>	Presentes en el estroma: 4%/hpf en áreas.

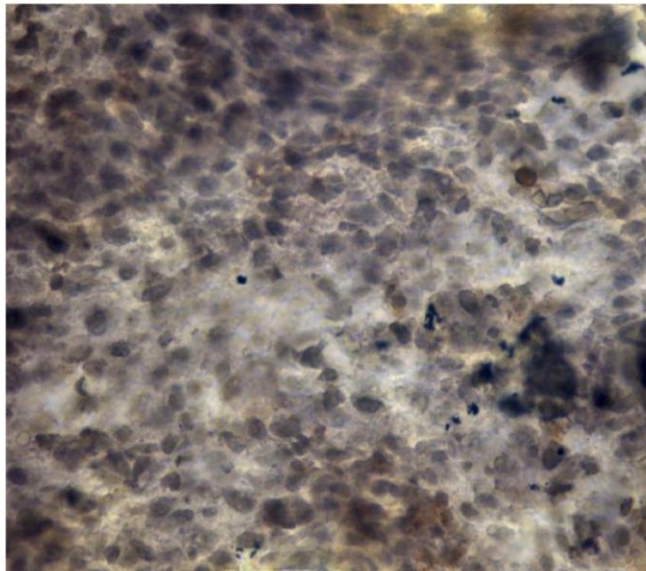
### Natural Killer



### CD20

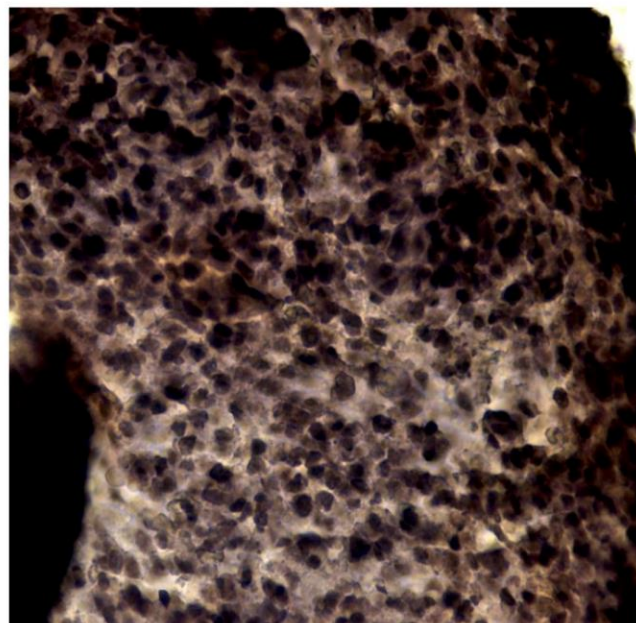


CD45

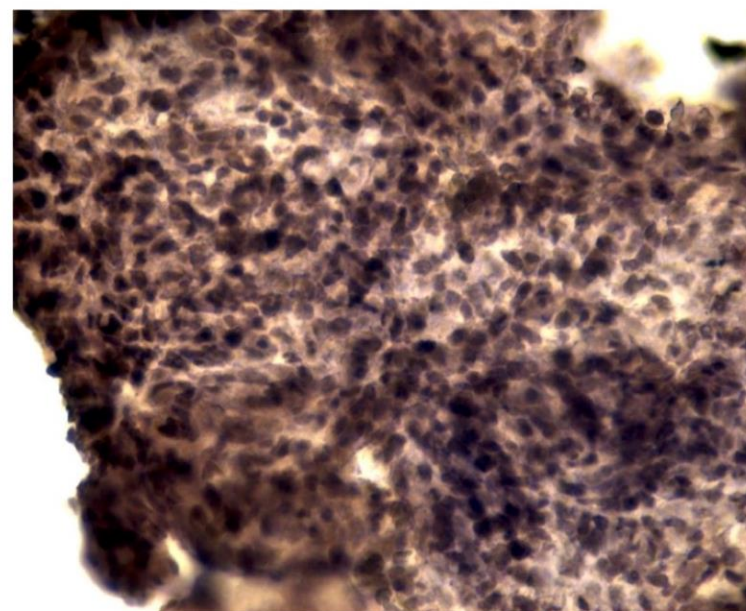


MARCADOR	RESULTADO
<b>Receptor de Progesterona</b> (Dako, monoclonal) <sup>1</sup>	Epitelio Superficial: Intensidad 1 (debil) proporción 2 (10-33%). Epitelio Glandular: Intensidad 2 (moderada) proporción 4 (mayor 66%). Estroma: Intensidad 1 (debil), proporción 1 (menor 10%).
<b>HSP27</b> (monoclonal) <sup>2</sup>	Epitelio Superficial: Intensidad 1 (debil) proporción 2 (10 al 33%). Epitelio Glandular: Intensidad 1 (débil) proporción 2 (10 al 33%). Estroma: 0
<b>CD20</b> (Dako, monoclonal) <sup>3</sup>	0+/1.650 células estromales: 0% (la muestra es escasa)
<b>CD138</b> (Novus, monoclonal) <sup>34</sup>	3+/20 hpf: 0.15
<b>CD56</b> (Novus, monoclonal) <sup>5</sup>	21+/1.500 celulas estromales: 1,4% (poca muestra)
<b>CD45</b> (Dako, monoclonal)	45+/1.500 células estromales: 3%

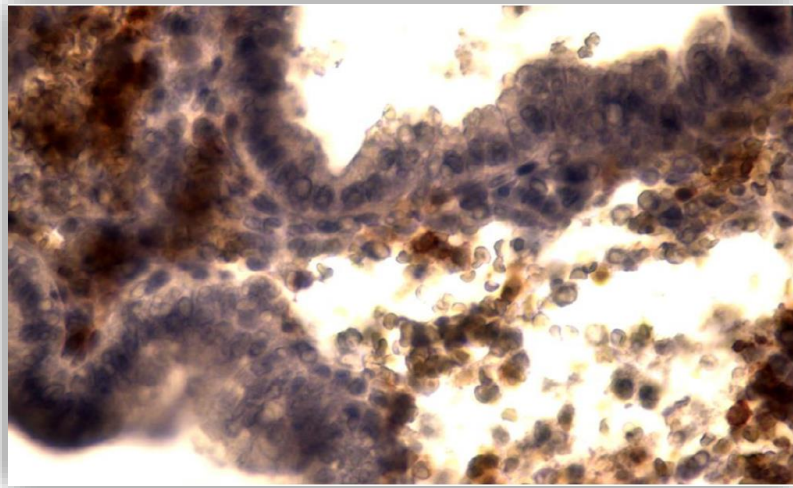
CD56



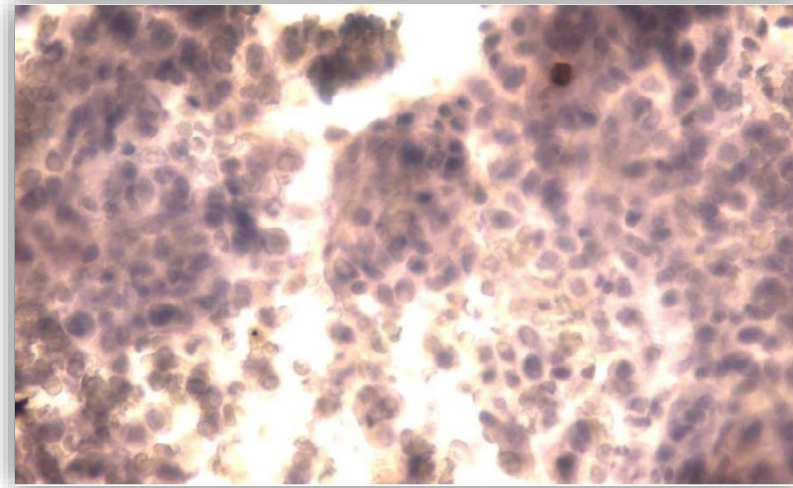
CD138





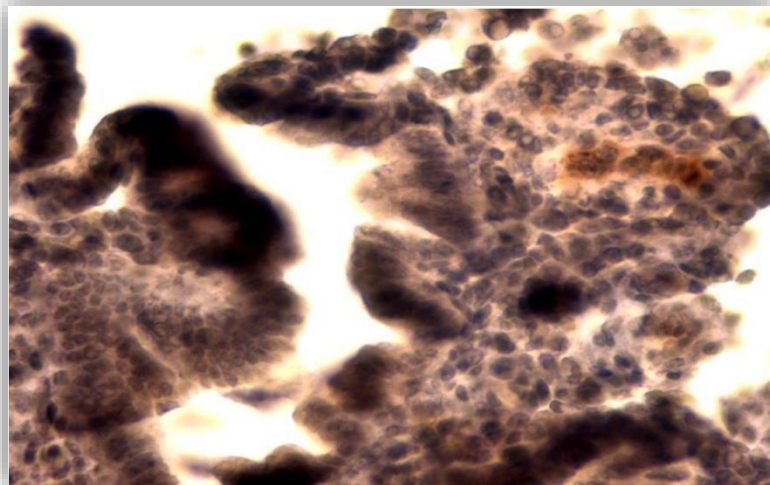


**CD45**

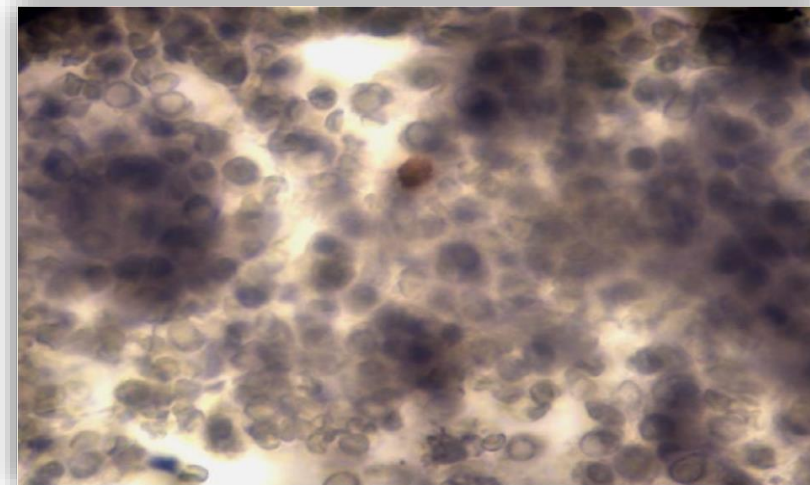


**CD56**

<b>CD20</b> (Dako, monoclonal) <sup>3</sup>	65+/3.900 células estromales: 1,66%
<b>CD138</b> (Novus, monoclonal) <sup>34</sup>	9+/20 hpf : 0.45 %
<b>CD56</b> (Novus, monoclonal) <sup>5</sup>	45+/4.100 células estromales: 1,097%
<b>CD45</b> (Dako, monoclonal)	270+/3.700 células estromales: 7.29%



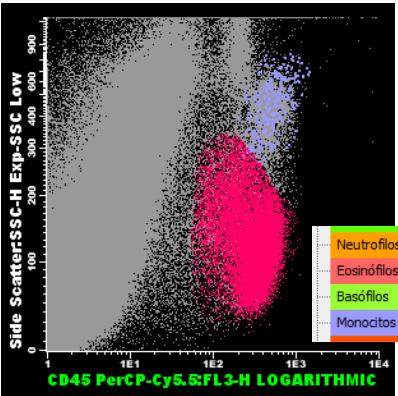
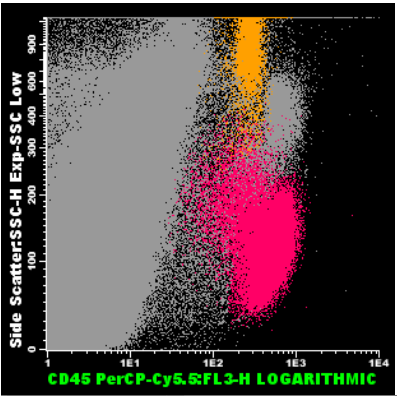
**CD138**



**CD20**

# CITOMETRIA DE FLUJO ENDOMETRIAL

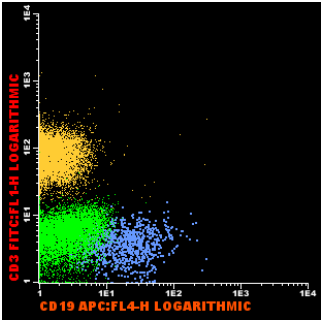
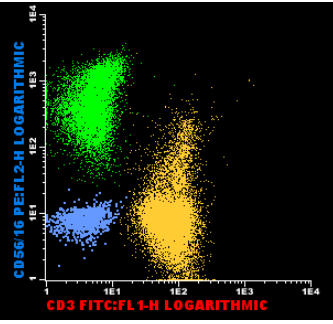
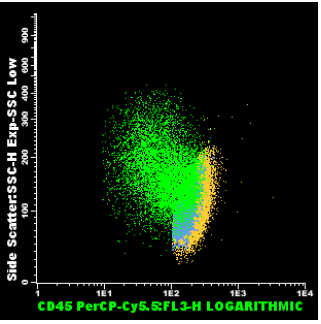
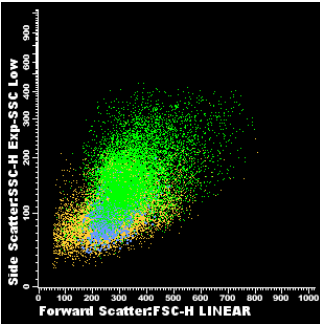
### CITOMETRIA DE FLUJO DE CELULAS ENDOMETRIALES.



Neutrofilos	0	NA	NA	NA
Eosinófilos	0	NA	NA	NA
Basófilos	0	NA	NA	NA
Monocitos	284	0,10	1,23	0,10

Eventos	462925	442806	91,69	91,69	91,69
Otros Eventos	442806	91,69	91,69	91,69	
Células Totales	40119	8,31	8,31	8,31	
Otros Células Totales	0	NA	NA	NA	
Preec. erit	0	NA	NA	NA	
Eritroblastos	0	NA	NA	NA	
Promielocitos	0	NA	NA	NA	
Plasmocitos	0	NA	NA	NA	
Otros Plasmocitos	0	NA	NA	NA	
k	0	NA	NA	NA	
l	0	NA	NA	NA	
Preec B 34+	0	NA	NA	NA	
Preec B 34-	0	NA	NA	NA	
Neutrofilos	9765	2,02	24,34	2,02	
Eosinófilos	0	NA	NA	NA	
Basófilos	0	NA	NA	NA	
Monocitos	0	NA	NA	NA	
Promonocitos	0	NA	NA	NA	
Linfocitos	30354	6,29	75,66	6,29	

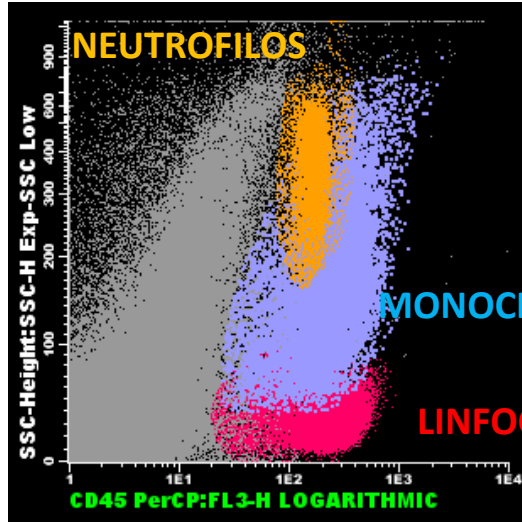
Paciente: GOMENSORO, ANDREA  
 Material: Biopsia de endometrio  
 Fecha: 27/08/2018  
 Solicitado por: Dr. Tersoglio



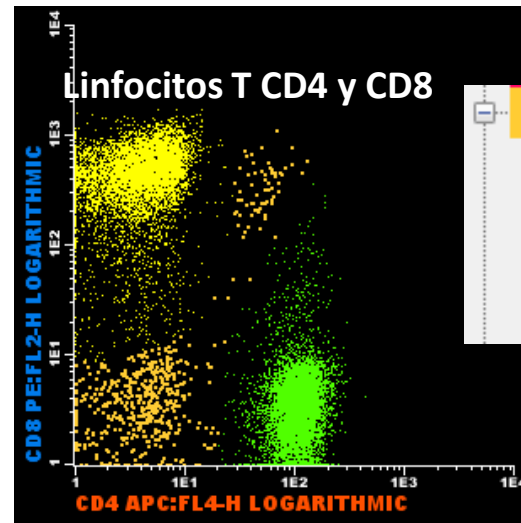
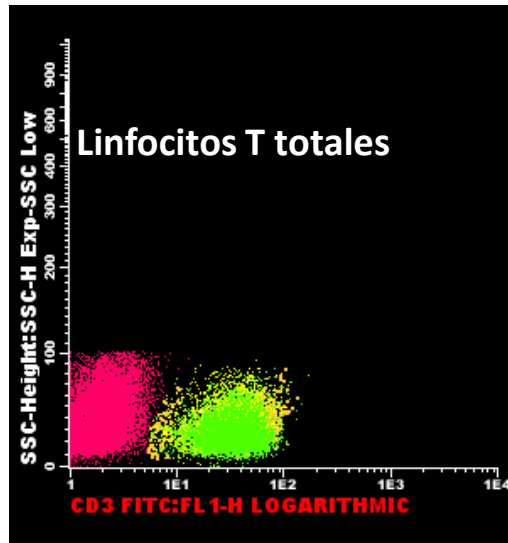
Linfocitos	26065	6,46	100,00	100,00
f rto abs linfos: 6500,				
Otros Linfocitos	0	NA	NA	NA
Linfocitos T	15415	3,82	59,14	59,14
f CD4/CD8: NA				
Otros Linfocitos	15415	3,82	100,00	59,14
Linfocitos T CD4+	0	NA	NA	NA
Linfocitos T CD8+	0	NA	NA	NA
dp	0	NA	NA	NA
dn	0	NA	NA	NA
otros Li	0	NA	NA	NA
Linfocitos B	919	0,23	3,53	3,53
f K / L: NA				
Otros Linfocitos	919	0,23	100,00	3,53
kappa	0	NA	NA	NA
Lambda	0	NA	NA	NA
Células NK	9731	2,41	37,33	37,33

**CITOMETRIA DE FLUJO DE CELULAS  
ENDOMETRIALES.**

Paciente: OJEDA, MARIA ALEJANDRA (22440)  
Material: Biopsia de endometrio  
Fecha: 01/08/2018  
Solicitado por: Dr. Tersoglio

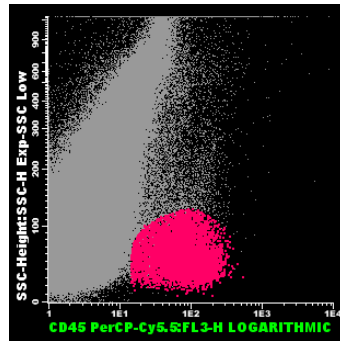
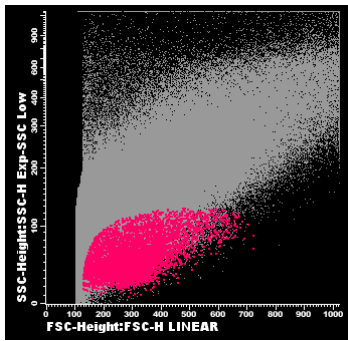


Neutrofilos	9674	3,72	20,03	3,72
Eosinófilos	0	NA	NA	NA
Basófilos	0	NA	NA	NA
Monocitos	11026	4,23	22,83	4,23
Promonocitos	0	NA	NA	NA
Linfocitos	27599	10,60	57,14	10,60

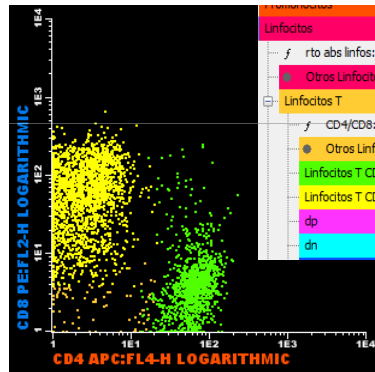
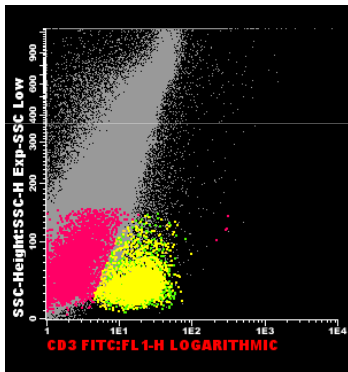
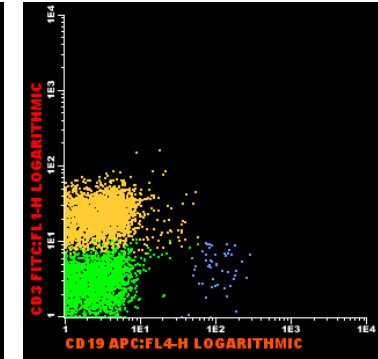
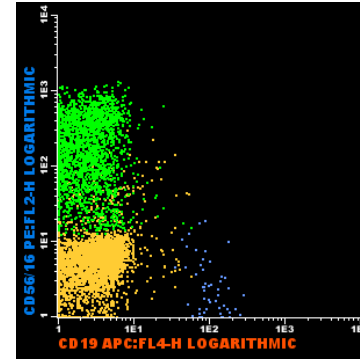


Linfocitos T	13824	5,31	50,09	5,77
$f$ CD4/CD8: 1,09				
Otros Linfocitos	525	0,20	3,80	0,22
Linfocitos T CD4+	6949	2,67	50,27	2,90
Linfocitos T CD8+	6350	2,44	45,93	2,65



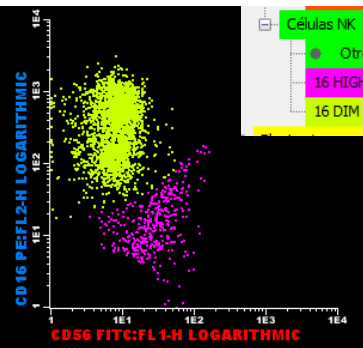
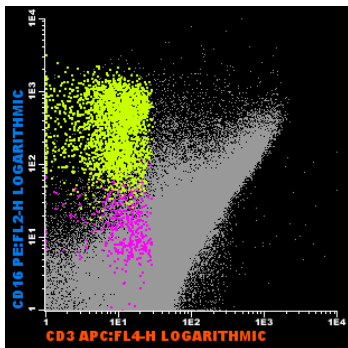


Eventos		1000000			
●	Otros Eventos	792138	79,21	79,21	99,29
●	Células Totales	5680	0,57	0,57	0,71
●	Otros Células Totales	0	NA	NA	NA
●	Prec erit	0	NA	NA	NA
●	Eritroblastos	0	NA	NA	NA
●	Promielocitos	0	NA	NA	NA
●	Plasmocitos	0	NA	NA	NA
●	Otros Plasmocitos	0	NA	NA	NA
●	k	0	NA	NA	NA
●	l	0	NA	NA	NA
●	Prec B 34+	0	NA	NA	NA
●	Prec B 34-	0	NA	NA	NA
●	Neutrófilos	0	NA	NA	NA
●	Eosinófilos	0	NA	NA	NA
●	Basófilos	0	NA	NA	NA
●	Monocitos	0	NA	NA	NA
●	Promonocitos	0	NA	NA	NA
●	Linfoctos	5680	0,57	100,00	0,71



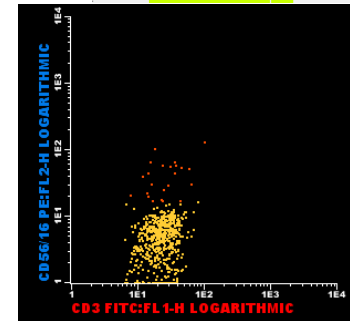
●	Linfoctos	7037	0,70	100,00	0,00
f	rto abs linfo: 6500,				
●	Otros Linfoctos	3766	0,38	53,52	0,00
●	Linfoctos T	3271	0,33	46,48	100,00
f	CD4/CD8: 0,56				
●	Otros Linfoctos	78	0,01	2,38	2,38
●	Linfoctos T CD4+	1142	0,11	34,91	34,91
●	Linfoctos T CD8+	2051	0,21	62,70	62,70
●	dp	0	NA	NA	NA
●	dn	0	NA	NA	NA

●	Linfoctos	4957	0,50	100,00	100,00
f	rto abs linfo: 6500,				
●	Otros Linfoctos	0	NA	NA	NA
●	Linfoctos T	2729	0,27	55,05	55,05
f	CD4/CD8: NA				
●	Otros Linfoctos	2729	0,27	100,00	55,05
●	Linfoctos T CD4+	0	NA	NA	NA
●	Linfoctos T CD8+	0	NA	NA	NA
●	dp	0	NA	NA	NA
●	dn	0	NA	NA	NA
●	otros Li	0	NA	NA	NA
●	Linfoctos B	50	0,00	1,01	1,01
f	K / L: NA				
●	Otros Linfoctos	50	0,00	100,00	1,01
●	kappa	0	NA	NA	NA
●	Lambda	0	NA	NA	NA
●	Células NK	2178	0,22	43,94	43,94
●	Otros Células NK	2178	0,22	100,00	43,94
●	16 HIGH	0	NA	NA	NA
●	16 DIM	0	NA	NA	NA

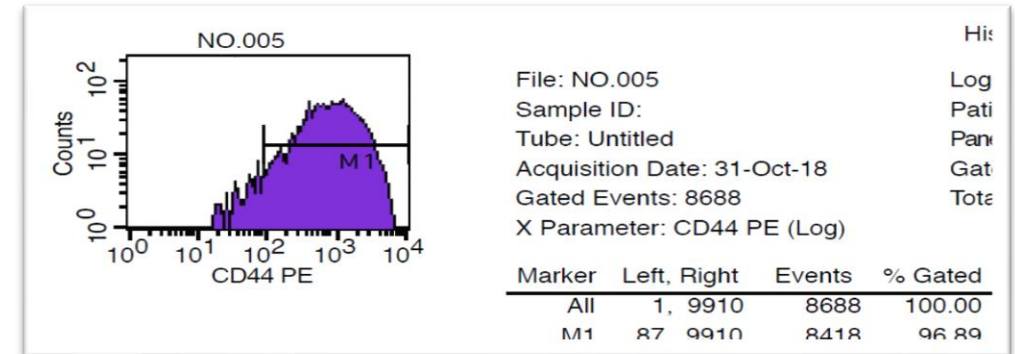
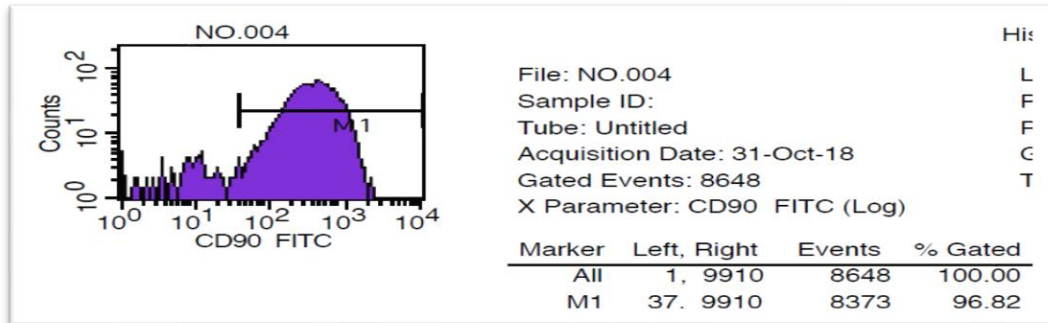
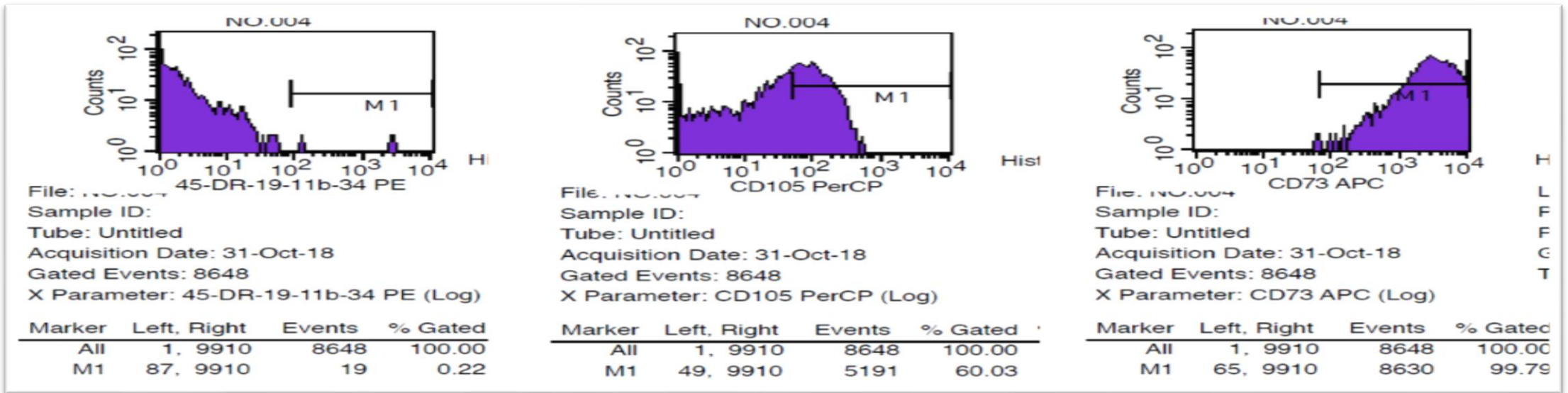


●	Células NK	2835	0,28	40,17	100,00
●	Otros Células NK	0	NA	NA	NA
●	16 HIGH	386	0,04	13,62	13,62
●	16 DIM	2449	0,24	86,38	86,38

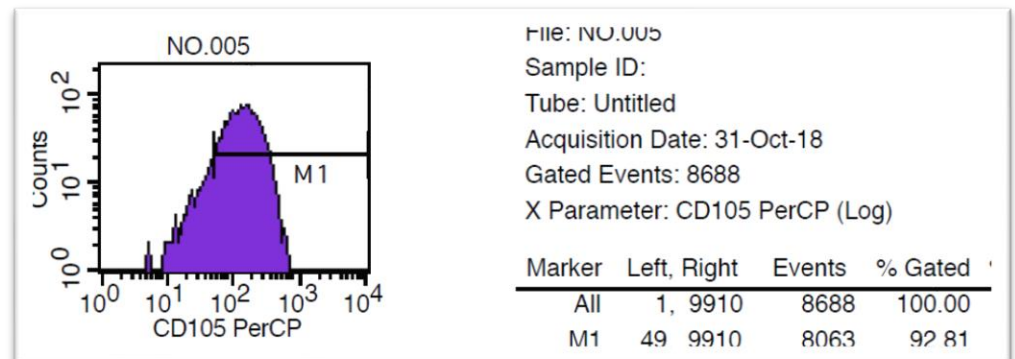
## CITOMETRIA DE FLUJO DE CELULAS ENDOMETRIALES.



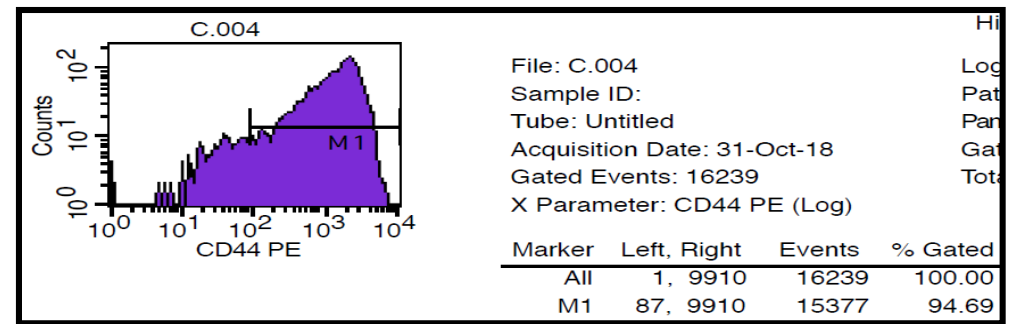
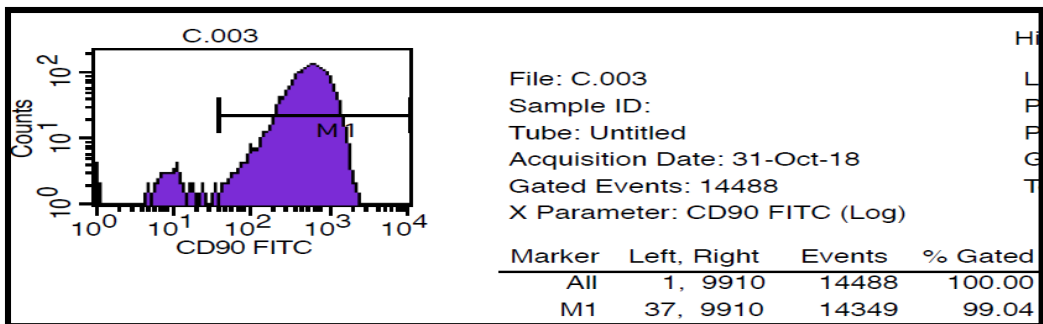
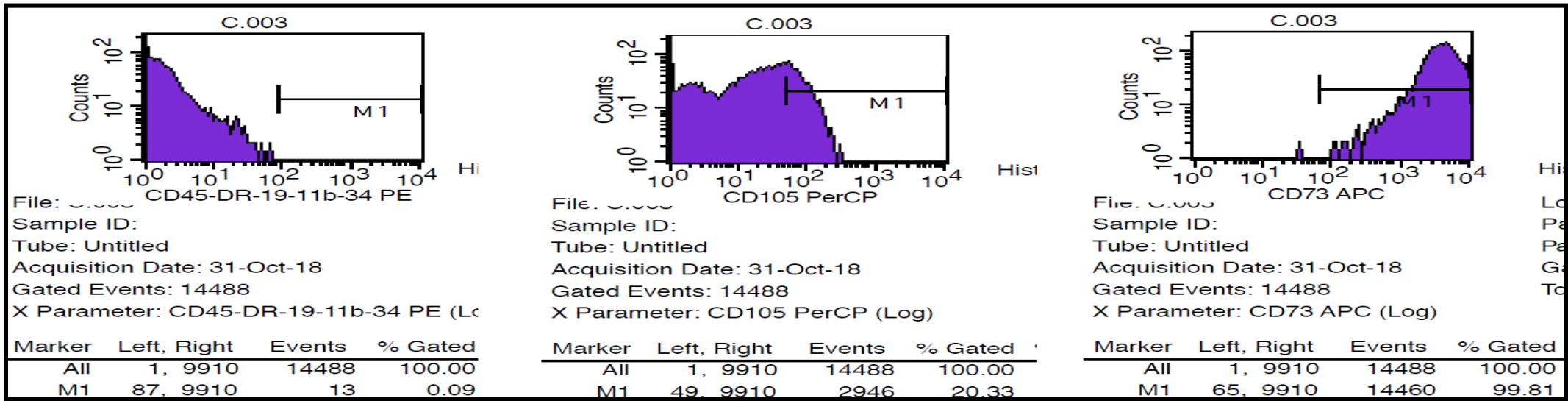
Paciente: SEQUEIRO, ESTELA  
 Material: Biopsia de endometrio  
 Fecha: 08/08/2018  
 Solicitado por: Dr. Tersoglio



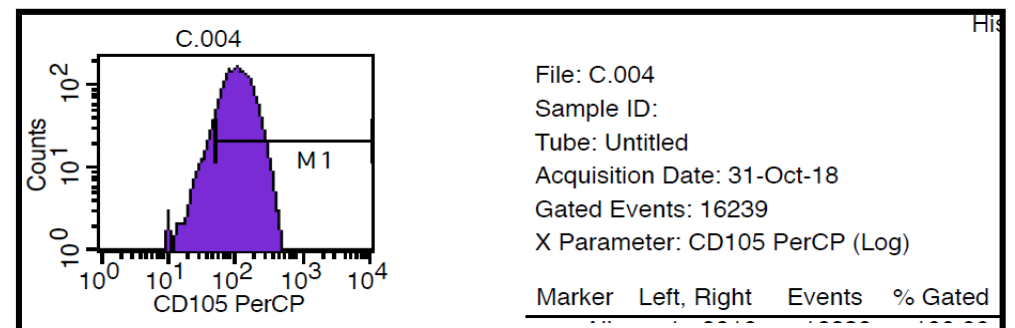
MARCADOR	% positividad
<b>CD45+HLA DR+CD11b+CD19+CD34</b>	<b>0.22</b>
<b>CD90</b>	<b>96.8</b>
<b>CD105</b>	<b>92.8</b>
<b>CD73</b>	<b>99.8</b>
<b>CD44</b>	<b>96.9</b>



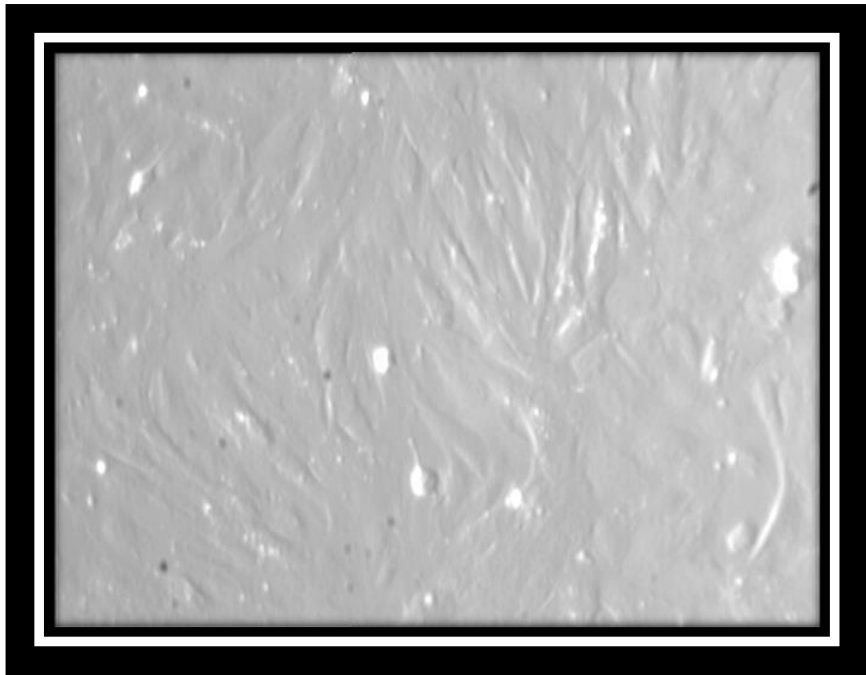
Paciente Ochoa



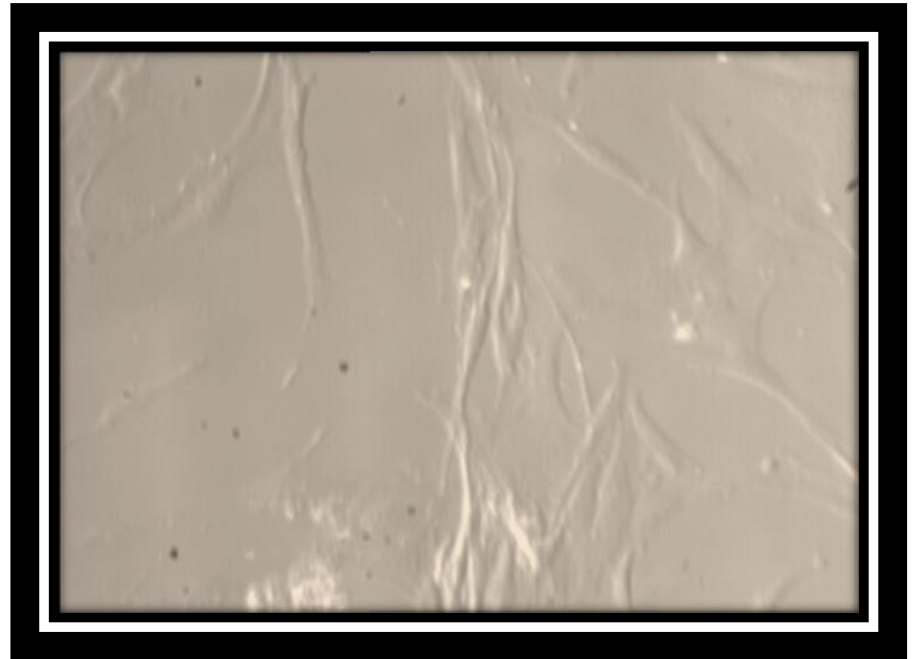
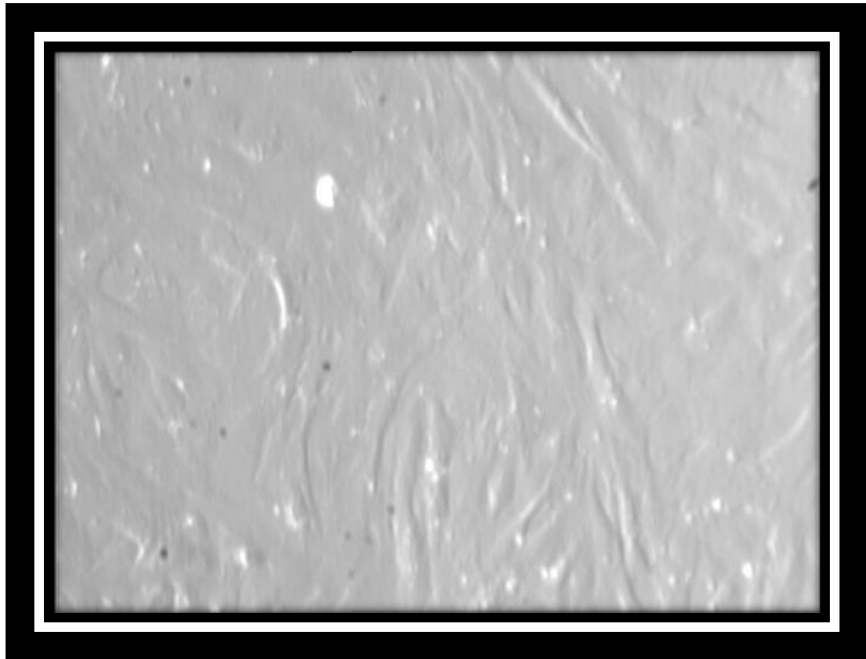
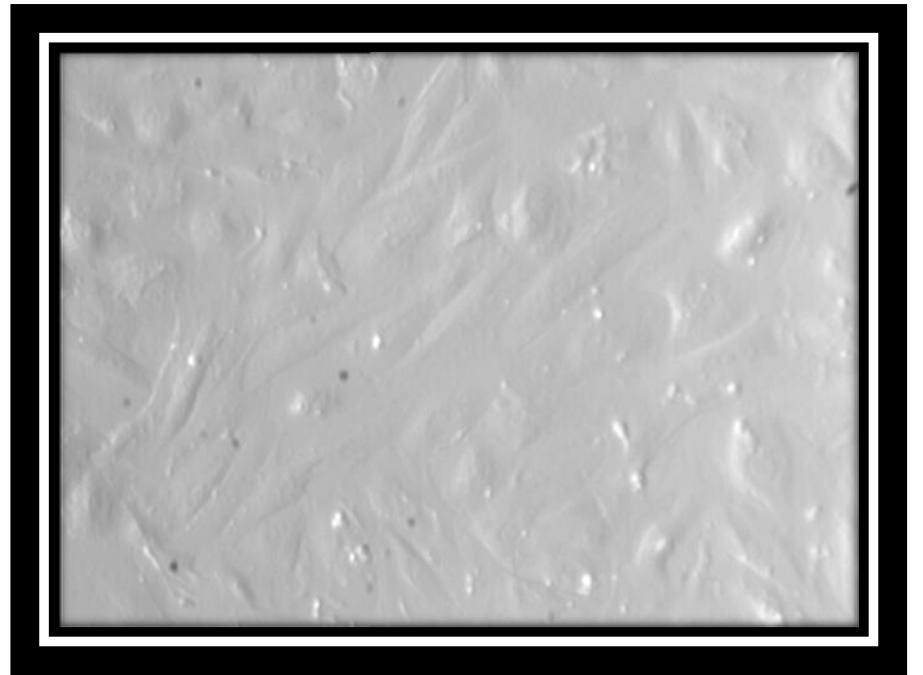
MARCADOR	% positividad
<b>CD45+HLA DR+CD11b+CD19+CD34</b>	<b>0.09</b>
<b>CD90</b>	<b>99</b>
<b>CD105</b>	<b>92</b>
<b>CD73</b>	<b>99.8</b>
<b>CD44</b>	<b>94.7</b>



Paciente Camerucci



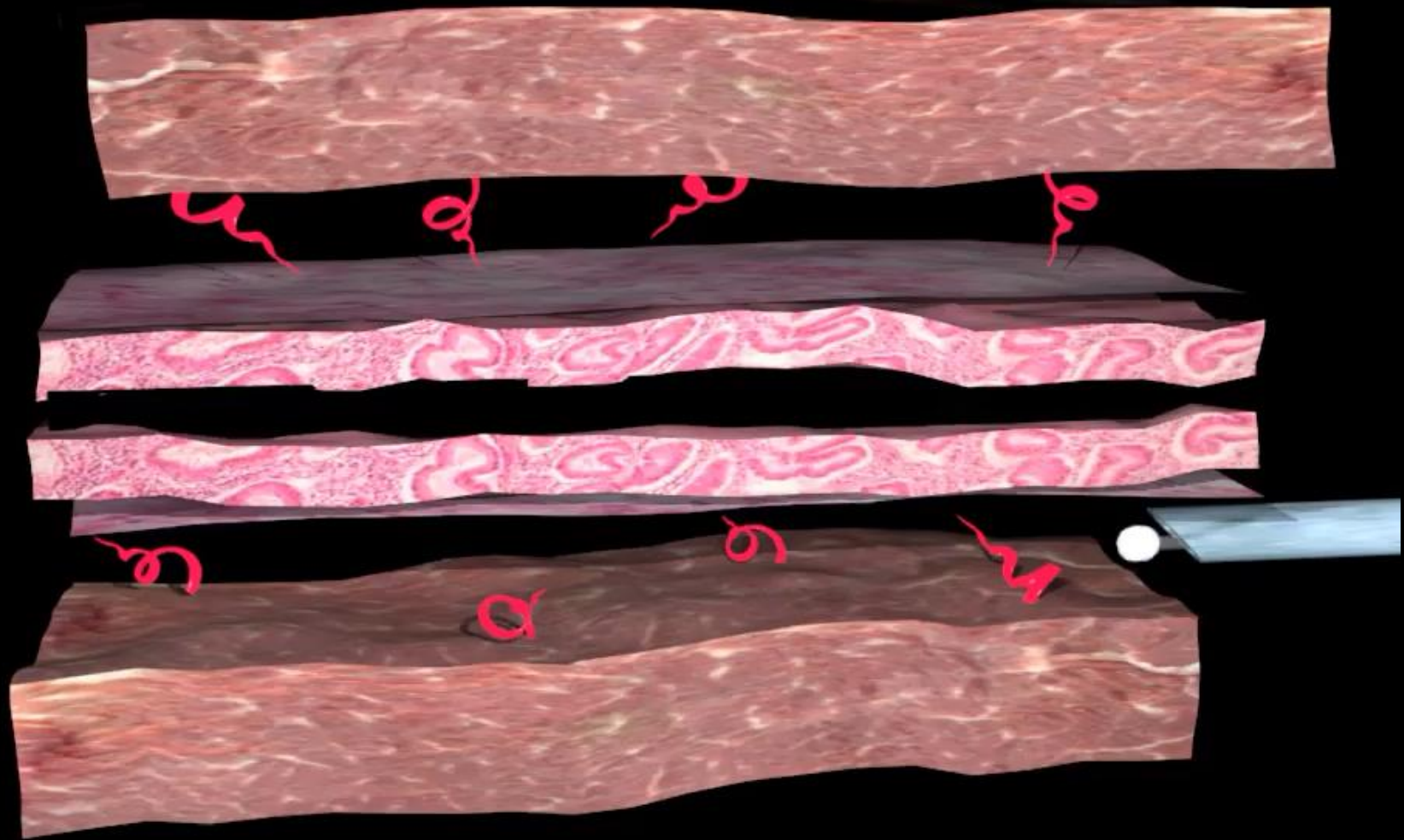
enMSCs

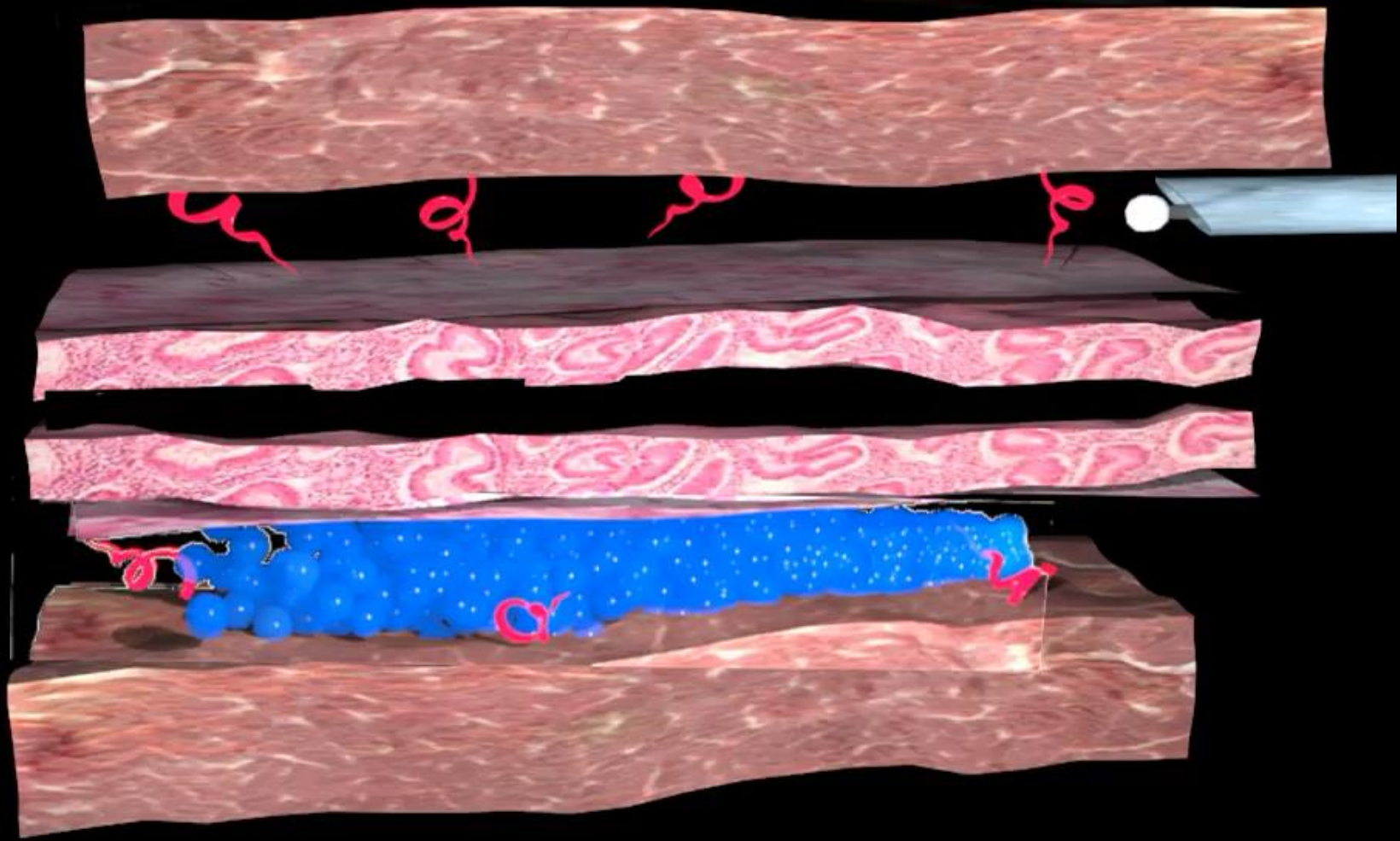


# TRANSFERENCIA TRANSMIOMETRICAL DE enMSCs

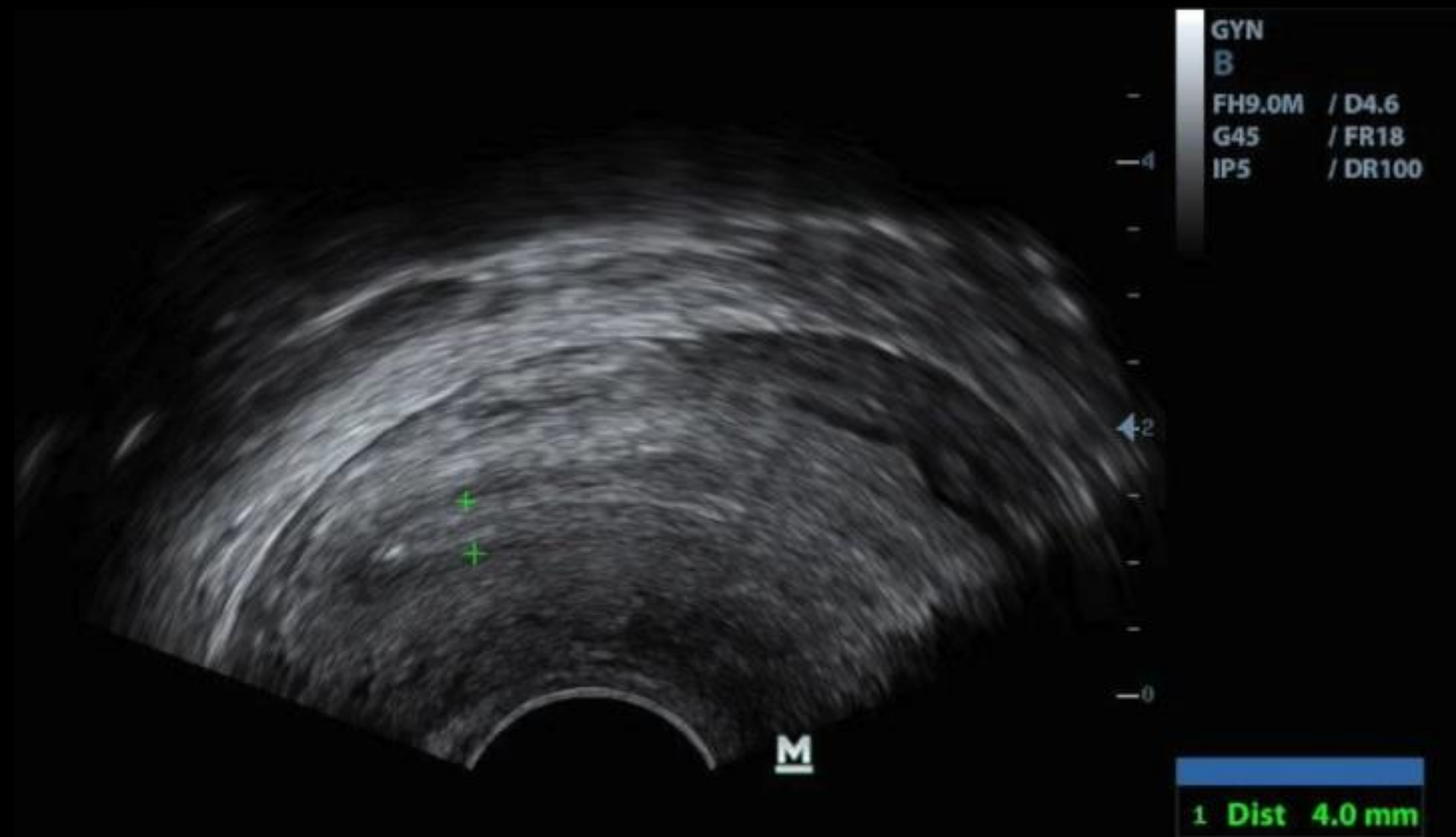












**Table 2 Evolution of Endometrial Variables Pre and Post Treatment eMSCs**

<u>Variables</u>	<u>Pre SC<sub>s</sub></u>	<u>Post SC<sub>s</sub></u>	<u>p-value*</u>
Endometrial Thickness. No oestrogen replacement	5,08 ± 1,06	7,49 ± 2,17	p = 0.000089*
Endometrial Thickness. With oestrogen replacement	5,89± 0,85	10,48 ± 1,69	p = 0.000002*
<b>LB</b>			
Normal <sup>a</sup>	11/30 (36,7%)	21/30 (70%)	p = 0.021**
Abnormal <sup>b</sup>	19/30 (63,3%)	9/30 (30%)	
<b>NK</b>			
Normal <sup>a</sup>	15/30 (50%)	23/30 (76,7%)	p = 0.039**
Abnormal <sup>b</sup>	15/30 (50%)	7/30 (23,3%)	
<b>CD4</b>			
Normal <sup>a</sup>	14/30 (46,7%)	23/30 (76,7%)	p = 0.022**
Abnormal <sup>b</sup>	16/30 (53,3%)	7/30 (23,3%)	
<b>CD8</b>			
Normal <sup>a</sup>	12/30 (40%)	24/30 (80%)	p = 0.004**
Abnormal <sup>b</sup>	18/30 (60%)	6/30 (20%)	
<b>Histopathology and IHQ</b>			
Normal	2/30 (6,7%)	24/30 (80%)	p = 0.000**
Abnormal	28/30 (93,3%)	6/30 (20%)	

\* Wilcoxon Test , \*\* Chi-Square McNemar Test, Normal <sup>a</sup>: within the range of reference values ( $\mu \pm 2DS$  CI 95 %), Abnormal <sup>b</sup>: outside the range of reference values ( $\mu \pm 2DS$  CI 95 %).

Table 3 Clinical and Pregnancy Outcome

	<u>N = 30</u>	<u>Total</u>	<u>Persistence EC</u>
Clinical Pregnancy		19 (63,33%)	3 (50,00%)
LBR		14 (46,67%)	3 (50,00%)
Miscarriage		5 (16,67%)	0 (50,00%)
Nº Pregnancy		11 (36,67%)	3 (50,00%)
Single Birth		11 (78,57%)	3 (100,00%)
Double Birth		1 (7,14%)	0 (0,00%)
Triple Birth		2 (14,29%)	0 (0,00%)
Preterm Birth		8 (57,14%)	1 (33,33%)

MUCHAS GRACIAS!