



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Obstetrícia e Ginecologia

Síndrome de Asherman: Novas perspetivas terapêuticas

João Nuno Almiro Patrício

JULHO'2018



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Obstetrícia e Ginecologia

Síndrome de Asherman: Novas perspetivas terapêuticas

João Nuno Almiro Patrício

Orientado por:

José Joaquim Domingues Nunes

JULHO'2018

Resumo

A Síndrome de Asherman (SA) é um conjunto de manifestações clínicas patológicas como a infertilidade e as alterações menstruais, na presença de sinéquias uterinas (SU). Estas surgem após o trauma uterino, em útero gravídico ou não gravídico, sendo a curetagem uterina a sua principal causa. Após o seu diagnóstico histeroscópico, os tratamentos atuais dedicam-se a tentar estabelecer a patência morfológica e funcional da cavidade uterina, bem como evitar a recorrência das SU. Em casos graves, refratários a esta abordagem, investigam-se atualmente terapêuticas alternativas. As células estaminais adultas residentes no endométrio podem ser um alvo terapêutico importante, visto que se encontram qualitativa ou quantitativamente disfuncionais na SA. A terapia celular com células estaminais derivadas da medula óssea (CEDMO) é já uma linha terapêutica bem-sucedida para várias patologias não relacionadas com tecidos hematopoiéticos. As linhas de investigação tentam hoje perceber se é possível aplicar o mesmo racional no endométrio.

Esta revisão seletiva dos trabalhos realizados acerca deste tópico mostra que estudos em modelos animais e em humanos demonstram enxerto das células estaminais circulantes a nível uterino e proliferação de células estaminais no tecido, com uma normalização menstrual e a recuperação da fertilidade, podendo significar uma cura para doentes com SA refratária aos métodos convencionais. No entanto, ainda não são completamente compreendidos quais os tipos de células envolvidos na regeneração do endométrio após o transplante, nem quais os mecanismos subjacentes.

Palavras-chave: Síndrome de Asherman, células estaminais, endométrio, terapia celular, medula óssea

Abstract

Asherman's syndrome is a set of pathological clinical manifestations such as infertility and menstrual abnormalities in the presence of uterine synechiae. These arise after the uterine trauma in the gravid or nongravid uterus and uterine curettage is its main cause. After its hysteroscopic diagnosis, the current treatments try to establish the

morphological and functional patency of the uterine cavity as well as to avoid the recurrence of the uterine synechiae. In severe cases, refractory to this approach, alternative therapies are currently being investigated. Adult stem cells resident in the endometrium may be an important therapeutic target since they are qualitatively or quantitatively dysfunctional in Asherman's syndrome. Cell therapy with stem cells derived from bone marrow is already a successful therapeutic line for several pathologies unrelated to hematopoietic tissues. Nowadays, new investigation approaches try to understand if it is possible to apply the same rationale in the endometrium.

This selective review of studies carried out on this topic shows that studies in animal models and in humans demonstrate grafting of circulating stem cells in the uterine endometrium and proliferation of stem cells in the tissue with a menstrual normalization and recovery of fertility which could mean a cure for patients with severe Asherman's syndrome refractory to conventional methods. However, the cell types involved in endometrial regeneration after transplantation and the underlying mechanisms are not fully understood.

Keywords: Asherman's syndrome, stem cells, endometrium, cell therapy, bone marrow

Índice

1. Introdução	6
2. Metodologia	9
3. Desenvolvimento	10
3.1 Definição de células estaminais	10
3.2 Geração de endométrio humano a partir de células estaminais embrionárias humanas (CEEH).....	10
3.3 Células estaminais endometriais	11
3.4 Células estaminais menstruais.....	14
3.5 Células estaminais derivadas da medula óssea (CEDMO).....	15
3.6 Estudos realizados em modelos animais.....	17
3.7 Estudos realizados em humanos.....	19
4. Conclusão.....	23
5. Bibliografia	26

1. Introdução

O endométrio humano é um tecido altamente regenerativo, realizando mais de 400 ciclos de regeneração, diferenciação e descamação durante os anos de vida reprodutiva de uma mulher. A cada mês, sob influência de níveis crescentes de estrogénio circulante, 4 a 10 mm de tecido endometrial regeneram durante a fase proliferativa do ciclo menstrual.^[1, 2] A mucosa endometrial humana é estrutural e funcionalmente dividida em duas zonas principais. Os dois terços superiores correspondem à camada funcional. Esta é a camada que descama durante a menstruação e se regenera no ciclo subsequente. A camada mais profunda, a camada basal, é permanente e providencia as células para a geração de uma nova camada funcional a cada mês.^[1] Durante o ciclo menstrual, o endométrio humano sofre alterações marcadas a nível morfológico e funcional, necessitando de uma capacidade extraordinária de regeneração e remodelação. Assim, a nível endometrial, o processo regenerativo parece dever-se à presença de células endometriais somáticas com atividade estaminal, que podem residir tanto na camada funcional como na camada basal.^[1, 3] Como tal, se as células estaminais endometriais são responsáveis pela regeneração do endométrio a cada ciclo menstrual, então o seu número ou função diminuídos, bem como a sua localização anormal, podem resultar num endométrio cicatricial fino (<7mm) e disfuncional, incapaz de suportar a implantação embrionária.^[4, 5]

A Síndrome de Asherman (SA) é uma condição caracterizada pela existência de sinéquias uterinas (SU) ou fibrose resultantes do dano da camada basal do endométrio, com perda do endométrio normal.^[4] Ocorre o desaparecimento completo da estrutura endometrial e a alteração da funcionalidade deste órgão.^[6] O facto de que as SU podem resultar em amenorreia secundária está demonstrado desde o final do século XIX, embora só em 1948 é que Joseph Asherman tenha descrito uma condição em 29 pacientes à qual deu o nome de SA.^[7]

Com a obliteração completa ou parcial da cavidade uterina ou do canal cervical, surgem as alterações menstruais - nomeadamente a hipomenorreia e a amenorreia - a infertilidade, os abortos de repetição, a dor pélvica, a restrição do crescimento intrauterino, erros de implantação placentar e outras complicações da gravidez, consoante a gravidade da patologia.^[8] A prevalência varia consoante a população estudada e os exames diagnósticos utilizados, mas estudos indicam que a percentagem

varia entre 2% e 22% em mulheres inférteis.^[9, 10] Importa ressaltar que nem sempre a presença de SU está associada aos sinais e sintomas da SA, devendo a situação ser referida como sinéquias assintomáticas, sendo o seu significado clínico questionável.^[10, 11] A incidência da SA tem vindo a aumentar nas últimas décadas, devido não só ao aumento do número de cesarianas e de cirurgias uterinas realizadas, como também ao maior enfoque na doença e à melhoria das capacidades de diagnóstico.^[12] A sua principal etiologia é o trauma, tanto em útero grávidico – por exemplo, após curetagem uterina pós-parto – como em útero não grávidico – por exemplo, através de procedimentos de ablação endometrial, cirurgias histeroscópicas de ressecção ou cirurgias abdominais que envolvam o útero, inserção de dispositivos intrauterinos (DIU), curetagem diagnóstica, abortos espontâneos, ou infeções, nomeadamente a tuberculose genital. A infeção e a inflamação podem também inibir a regeneração do endométrio traumatizado através do dano às células estaminais ou aos seus nichos, pela libertação de mediadores inflamatórios e por induzirem a deposição de tecido fibrótico.^[11]

Em termos diagnósticos, o exame físico normalmente não revela qualquer alteração, pelo que é necessária a realização de exames complementares.^[8] A histeroscopia está hoje estabelecida como exame-padrão para o diagnóstico de SU e permite confirmar com exatidão a presença, a extensão e as características morfológicas das sinéquias, bem como a qualidade do endométrio.^[11] Uma vez que este método possibilita uma visualização direta da cavidade, permite delinear uma abordagem terapêutica e classificar a doença segundo as características histeroscópicas.^[8] A classificação das sinéquias é útil, já que o prognóstico da doença se relaciona com a gravidade da mesma.^[13] Foram propostos, até hoje, sete sistemas de classificação, não havendo estudos que relacionem os vários sistemas, tornando a sua comparação e interpretação difícil.^[14] Nenhum dos sistemas foi validado ou reconhecido de modo consensual.^[11] Outras alternativas diagnósticas são a histerossalpingografia, a histerossonografia e a ecografia transvaginal.^[11]

O tratamento de escolha da SA é cirúrgico, através da sinequiólise por histeroscopia, na tentativa de restaurar o volume e a forma habituais da cavidade uterina e do canal cervical e facilitar a comunicação entre a cavidade uterina, o canal cervical e as trompas de Falópio e, de forma secundária, tratar os sintomas associados e prevenir a sua recorrência. Apesar dos avanços nas técnicas histeroscópicas, o prognóstico mantém-se

reservado nos casos graves e cerca de 50% não são passíveis de cura com as técnicas mencionadas.^[6, 15] A recorrência é comum e pode ocorrer em 30 a 66% das mulheres tratadas.^[11]

Assim existem várias técnicas de prevenção de recorrência, havendo vários métodos preventivos disponíveis, como por exemplo a suplementação hormonal, a introdução de métodos de barreira semissólidos (géis) ou sólidos (DIU), ou *stents*. Mesmo assim, foi identificada uma taxa de recorrência entre 3,1% e 23,5% entre todos os casos e 20% a 62,5% em casos graves de SU.^[16] As doentes com recorrência das sinéquias ou aqueles que não respondem às opções terapêuticas atualmente disponíveis estão em desvantagem e têm de recorrer a gravidezes de substituição, em países que o permitem, ou à adoção.

Posto isto, surgiu um novo ramo de abordagem à SA, através da administração de células estaminais humanas para a reconstrução do endométrio após dano significativo e a formação de SU.

Este trabalho é uma revisão seletiva de artigos obtidos através da PubMed. Foram selecionados artigos de língua inglesa, e que abordam a forma como a investigação atual poderá trazer resultados positivos em termos terapêuticos para as mulheres com SA grave, que não respondam aos atuais métodos terapêuticos e preventivos, conseguindo assim ultrapassar a sua problemática de infertilidade.

2. Metodologia

Este trabalho é uma revisão seletiva de artigos de revisão e de casos clínicos originais obtidos através da PubMed, após pesquisa de diferentes combinações das palavras-chave *Asherman Syndrome* com *cell therapy, management, review, endometrium, stem cells* e *bone marrow*, da qual resultaram 204 artigos.

Como critérios de inclusão, foram considerados artigos escritos em língua inglesa, publicados a partir de 2000 em fontes de caráter fidedigno, como *journals*, de que são exemplo *The Journal of Minimally Invasive Gynecology, Reproductive Biology and Endocrinology, Journal of Human Reproductive Sciences, Journal of Assisted Reproduction and Genetics, Journal of Cellular and Molecular Medicine, Reproductive BioMedicine Online* e *Human Reproduction*, bem como diferentes seminários e manuais relacionados com as áreas de “células estaminais e desenvolvimento” e “Medicina Reprodutiva” e o manual da Sociedade Americana para a Medicina Reprodutiva, o manual de Doenças Metabólicas e Endocrinológicas, e o manual da Associação Médica Americana.

Após exclusão de artigos repetidos e leitura atenta dos resumos dos artigos mais relevantes e pertinentes tendo em conta o objetivo do trabalho, foram inicialmente consultados 18 artigos.

Foi ainda objeto de consulta a *guideline* de 2017 da Associação Americana de Laparoscopistas Ginecológicos (*American Association of Gynecologic Laparoscopists*) em colaboração com a Sociedade Europeia de Endoscopia Ginecológica (*European Society of Gynaecological Endoscopy*), bem como vários artigos que constavam nas referências bibliográficas dos artigos pesquisados originalmente, considerados relevantes pelo autor desta revisão tendo em conta (1) a melhor compreensão de estudos que estiveram na base de algumas conclusões; (2) informações adicionais; (3) a sistematização de conteúdos.

3. Desenvolvimento

3.1 Definição de células estaminais

A popularidade das células estaminais tem vindo a surgir na última década, tendo em conta a sua capacidade de se dividir e diferenciar em tipos celulares especializados e que se conseguem renovar a si mesmos.^[12] A homeostase dos tecidos adultos é regulada predominantemente por células estaminais, que representam uma minoria da população celular e mesmo assim têm a capacidade de renovar e regenerar o tecido. A localização destas células nos nichos de células estaminais protege as células estaminais do dano e também permitem o recrutamento de novas células de outros tecidos, num processo designado “*homing*”, que geralmente se inicia após o dano tecidual através de sinais que promovem a migração celular para repovoar os nichos danificados.^[15]

A terapia celular necessita de populações de células estaminais, identificadas e isoladas através de marcadores específicos, como o CD133. Este é um marcador de superfície detetado em células progenitoras endoteliais e estaminais hematopoiéticas com alta atividade proliferativa, mas que também foi encontrado em células circulantes com capacidade regenerativa endotelial. A eficácia de células CD133+ na promoção da neoangiogénese foi demonstrada não apenas em modelos animais, mas também em ensaios clínicos com humanos com doenças isquémicas, com excelente perfil de segurança. Estudos animais demonstraram também a capacidade de enxerto de células humanas CD133+ no endométrio de ratinhos imunocomprometidos com SA induzido.^[15]

3.2 Geração de endométrio humano a partir de células estaminais embrionárias humanas (CEEH)

Para muitos órgãos vitais, o transplante de células humanas derivadas de CEEH pode ser uma opção para regenerar o tecido danificado. A indução *in vitro* da diferenciação de CEEH, utilizando fatores de crescimento e o mesênquima uterino de ratinho, produziu uma população de precursores mullerianos homogénea que foram xenoenxertados *in vivo* para continuarem a sua diferenciação.^[17] O estudo das células diferenciadas mostrou células epiteliais humanas derivadas de CEEH que expressavam marcadores mullerianos característicos. Com o tempo, os derivados epiteliais

demonstraram aspetos característicos de epitélio endometrial humano maturo, cuja proliferação era induzida pelo estrogénio endógeno.^[1] Estes estudos realçam a capacidade do mesênquima endometrial de ratinho guiar a diferenciação das CEEH e lançam a hipótese de induzir células pluripotentes a diferenciar-se em epitélio endometrial humano adulto *in vitro*, com recurso a células do estroma do endométrio da própria doente.^[1,5] Os derivados mullerianos resultantes poderiam então ser transplantados para doentes com SA ou SU e regenerar o seu endométrio.^[1, 5, 18]

As células pluripotentes do indivíduo têm um potencial de utilização autóloga como células estaminais adultas e as que são induzidas a partir de fibroblastos de mulheres com SA poderiam providenciar uma alternativa para gerar células epiteliais e do estroma endometriais e transplantá-las para a cavidade uterina para reconstrução do endométrio.^[5, 18]

3.3 Células estaminais endometriais

Já em 2011, o grupo de Cervelló et al referia que a existência de células estaminais somáticas no endométrio humano e de ratinho era atribuída a uma subpopulação particular de origem mesenquimatosa localizada na camada basal.^[19] Em 2012, o grupo de Garget afirmava que a primeira evidência de células estaminais adultas no endométrio humano surgira de estudos de clonagem celular, que identificaram pequenas populações de células com atividade de formação de colónias, tanto epiteliais como do estroma.^[18] Estas tinham a capacidade de se autoregenerar, facto demonstrado pela clonagem seriada *in vitro*, e alto potencial proliferativo, propriedades funcionais chave das células estaminais adultas.^[18, 20] As células epiteliais diferenciaram-se em estruturas semelhantes a glândulas, enquanto as do estroma eram multipotentes e diferenciaram-se em células de músculo liso, adipócitos, osteoblastos e condrócitos, tendo uma plasticidade típica de células estaminais mesenquimatosas.^[18] Outro dos fatores investigados por este grupo foi a existência de angiogénese na reconstrução do tecido endometrial durante o ciclo menstrual ou após o parto, processo necessário para suportar o tecido rapidamente crescente e que ocorre pelo alongamento vascular, intussusceção e incorporação de células progenitoras endoteliais circulantes.^[21] Estas células têm picos nas fases proliferativa, ovulatória e luteínica, e expressam recetores de estrogénio. O estrogénio promove a migração destas células no ratinho.

A localização vascular das células *side population* (SP) (referidas a seguir) e a localização perivascular das células estaminais mesenquimatosas sugere que o nicho de células estaminais está associado aos vasos sanguíneos, uma conveniente porta de entrada das células derivadas da medula óssea (MO).^[18]

Relativamente às células estaminais mesenquimatosas, o grupo demonstrou a existência deste tipo de células, marcadas por CD 146 e PDGF-R β , como células multipotentes, localizadas em regiões perivasculares tanto na camada basal como na camada funcional.^[6] Para além disso, o grupo identificou um novo marcador, W5C5, que purifica as células estaminais mesenquimatosas endometriais, células que reconstruem o tecido do estroma humano. O endométrio humano é a única fonte de onde essas células podem ser isoladas com técnicas minimamente invasivas sem a necessidade de anestesia, por biópsia endometrial. As células W5C5+ e as células SP reconstituem o estroma endometrial *in vivo*, embora o segundo tipo de células produza também endotélio e glândulas endometriais, sugerindo um maior potencial de uma única população de células estaminais adultas ou que uma mistura de tipos de células estaminais reconstruam estes componentes de tecido endometrial.^[18]

O grupo de Deane et al reforçou a ideia da multipotencialidade e alto potencial proliferativo das células estaminais mesenquimatosas endometriais e afirmou a sua utilidade clínica se usadas de forma autóloga, evitando a rejeição do transplante. Estas células apresentam um perfil de expressão génica mais semelhante a fibroblastos que a células endoteliais, e a sua localização, o potencial de resposta a estímulos hipóxicos, inflamatórios e proteolíticos e a capacidade imunomoduladora, migratória e angiogénica, fazem acreditar que podem ter um papel na regeneração endometrial. Após serem recolhidas, purificadas, expandidas em cultura e diferenciadas, podem ser utilizadas em condições com endométrio fino e disfuncional como a SA.^[5] O grupo notou ainda que as taxas de sucesso das técnicas de fertilização *in vitro* (FIV) aumentam quando o endométrio sofre curetagem no ciclo anterior à transferência embrionária. Isto levanta a hipótese de que existe ativação de células endometriais estaminais quiescentes em resposta ao estímulo lesivo, o qual pode provocar a iniciação do ciclo celular destas células. ^[5, 22]

Relativamente às células SP, estas têm atividade clonogénica que co-expressam marcadores de células estaminais e são capazes de se diferenciar em diversas linhagens celulares, podendo também levar a novas terapêuticas para a SA.^[15] As evidências sugerem que esta subpopulação pode representar, pelo menos em parte, a população de células estaminais somáticas do endométrio. Os resultados do estudo do grupo de Cervelló em 2011, confirmam e estendem as descobertas de um estudo anterior que sugeria que as células SP endometriais tanto do estroma como epiteliais são potenciais células estaminais endometriais humanas.^[23] Neste estudo, demonstrou-se que as linhagens de células SP endometriais humanas são capazes de se diferenciar em tecido semelhante a endométrio *in vivo*. Demonstrou-se também que estas células não expressam recetores de estrogénio alfa e de progesterona e, como tal, não serão responsivas à estimulação hormonal. Relatos de outros estudos indicam que o estrogénio regula a proliferação epitelial endometrial através de sinalização parácrina e células do estroma positivas para o recetor de estrogénio alfa, o que suporta a noção de que o estroma desempenha um papel fundamental na reconstrução endometrial normal em resposta ao estrogénio.^[19] Quando estas células foram injetadas em ratinhos, as células do estroma foram capazes de responder a estradiol e progesterona exógenos e a camada celular epitelial humana formada no endométrio reconstruído expressava recetores de progesterona.

Já os trabalhos do grupo de Gargett et al reforçam que uma forma de identificar a atividade de células estaminais adultas é examinar as células SP endometriais que mostraram pouco crescimento clonal, visto a maioria ser quiescente, aspeto característico das células estaminais adultas. Por outro lado, células cultivadas mostraram atividade clonal bastante aumentada.^[24] O grupo referiu novamente que estas células são uma população mista, considerando que as células predominantes são endoteliais, existindo também de células epiteliais e do estroma.^[25] Tanto as células SP epiteliais como do estroma têm características estaminais mesenquimatosas e estudos de imunohistoquímica mostram células a delinear os vasos sanguíneos nas camadas funcional e basal.^[24, 25] Assim, a identificação destas células suporta que células estaminais adultas residem no endométrio humano, apesar de a sua natureza exata ainda ser desconhecida. Apesar de tudo, não só a administração de células SP a pacientes com SA poderá ter o potencial de reconstruir o endométrio, como talvez seja também possível que células SP endógenas em endométrio inadequado possam ser estimuladas

para regenerar um endométrio espesso, hormonalmente responsivo, capaz de suportar a implantação.^[19]

O grupo de Dean et al vem reforçar a ideia de que este tipo de células endometriais humanas se diferencia em estruturas glandulares que expressam marcadores epiteliais, estruturas do estroma e células semelhantes a progenitoras endoteliais.^[5] Quando transplantadas para baixo da cápsula renal ou da pele de um ratinho imunodeficiente, as células SP produzem estruturas endoteliais, do estroma ou epiteliais,^[23, 25, 26] o que reforça a ideia de que se reconstitui o endométrio de forma mais eficaz quando são incluídas células endometriais não fracionadas como suporte.^[26] Por fim, as células SP têm maior capacidade de se diferenciarem em estruturas vasculares, glandulares e do estroma *in vivo* quando comparadas com células não pertencentes a esta categoria.^[25, 26] Assim, consegue-se hoje perceber o enfoque na terapia celular no nicho endometrial, a qual pretende restabelecer todos os componentes celulares da camada funcional, como tentativa de representar uma abordagem terapêutica etiológica da SA.

3.4 Células estaminais menstruais

Na sua revisão, o grupo de Gargett^[18] sugeriu que se perdem células estaminais mesenquimatosas endometriais durante a menstruação, ao contrário de células epiteliais, o que sugere que, ao não serem perdidos durante a menstruação, os progenitores epiteliais mais provavelmente residem na camada basal. As células menstruais apresentam uma capacidade alargada de diferenciação, revelam-se pouco imunogénicas quando transplantadas para ratinhos imunocompetentes e podem até ter propriedades imunomoduladoras, sendo caracteristicamente clonogénicas multipotentes. Já os estudos de Deane^[5] realçam que o sangue menstrual é uma fonte de células estaminais mesenquimatosas, designadas células endometriais regenerativas, semelhantes às células do estroma tanto do endométrio como da MO, embora com algumas diferenças na expressão de marcadores, e capazes de se diferenciarem em diversas linhagens, com alto potencial proliferativo.^[1, 18]

Na tentativa de investigar se o transplante autólogo de células do estroma derivadas da menstruação, com posterior suplementação hormonal com estradiol e progesterona, regenerava o endométrio em doentes com SA grave, o grupo de Tan et al^[27] utilizou uma mistura de células estaminais mesenquimatosas e fibroblastos do estroma

diretamente isoladas do sangue menstrual das mulheres. Basearam-se nos estudos já referidos, bem como em outros onde se defende a clonogenicidade, o alto potencial proliferativo e a multipotência *in vitro*,^[28] a ausência de expressão de marcadores hematopoiéticos ou endoteliais à superfície^[29] e a possibilidade de estas células serem reprogramadas a células estaminais pluripotentes induzidas,^[30] sendo candidatas promissoras para terapia celular. O estudo concluiu que o transplante destas células aumentou significativamente a espessura do endométrio em mulheres com SA grave, com recuperação da morfologia endometrial ao seu estado normal e três mulheres, de uma amostra de sete, engravidaram com sucesso. Isto sugere que o transplante autólogo deste tipo de células pode ser uma boa opção para a regeneração endometrial desde que se consigam cultivar células suficientes para o tratamento. Os investigadores fizeram uma pequena incisão a nível uterino a fim de induzir a implantação das células nessa região. No entanto, só essa lesão no endométrio mostrou aumentar a taxa de gravidez em procedimentos de procriação medicamente assistida^[31] o que levanta a necessidade de haver mais estudos controlados para corroborarem o efeito isolado do transplante de células do estroma derivadas da menstruação. O grupo concluiu também que grande parte das doentes com SA grave não mostra qualquer resposta à terapêutica com estrogénio de forma isolada e que a eficácia das células em causa ao induzir crescimento endometrial sob estimulação endometrial sugere que a perda de células estaminais seja a principal causa para o aparecimento de sinéquias na patologia. Assim, põe-se a hipótese de que as células estaminais adultas de locais saudáveis não conseguem migrar para as regiões lesadas devido a razões ainda desconhecidas, enquanto as células do estroma derivadas da menstruação transplantadas conseguem suplementar essas regiões deficitárias em células estaminais. Não obstante, é preciso mais investigação para validar esta hipótese.

3.5 Células estaminais derivadas da medula óssea (CEDMO)

Na MO é possível encontrar vários tipos de células estaminais adultas, incluindo células estaminais hematopoiéticas, células estaminais mesenquimatosas e células progenitoras endoteliais. Elas circulam em muito pequeno número, migram para locais de lesão tecidual, são incorporadas em diversos órgãos e diferenciam-se em células do novo tecido ou contribuem para a angiogénese.^[32, 33] Os fatores tróficos libertados pelas

células estaminais mesenquimatosas que contribuem para a angiogénese, a ativação de células estaminais endógenas e a modulação da resposta inflamatória promovem a reparação tecidual.^[34] O grupo de Gargett^[1] referiu também que as células mielóides derivadas da MO também têm a capacidade de entrar em órgãos e diferenciarem-se noutros tecidos como o endométrio.

Numa outra revisão^[18], o grupo de Gargett refere que vários estudos, tanto em modelos animais como em humanos (referidos a seguir), sugerem que as células derivadas da MO podem ter um importante papel na promoção da regeneração endometrial quando outros métodos falharam anteriormente. Os trabalhos de Deane^[5] realçam a importância da lesão no endométrio ao aumentar a incorporação destas células, o que não se verifica na mobilização de progenitores da MO mediada pelo fator de estimulação de colónias de granulócitos. O grupo referiu que as células incorporadas não parecem proliferar ou contribuir para a regeneração endometrial, sugerindo que desempenham um papel pequeno na reparação. Será então mais provável que as células estaminais e não as células derivadas da MO mediem a regeneração endometrial após a menstruação.

O grupo de Cervelló,^[15] referiu que novas evidências sugerem que as CEDMO podem contribuir para a regeneração tecidual através da rápida revascularização de tecidos lesados. Assim, a introdução exógena de progenitores endoteliais vasculares pode facilitar a restauração de vários órgãos e tecidos, algo demonstrado em modelos animais e em ensaios clínicos com humanos, com excelente perfil de segurança. Como tal, o grupo considerou que a utilização de células estaminais autólogas da MO, mobilizadas e isoladas do sangue periférico e subsequentemente instiladas nas artérias espiraladas através de cateterização arterial, pode representar uma possível ferramenta de tratamento na SA. Tan^[27] aponta, no entanto, para um fator limitante: a necessidade de medidas agressivas para a obtenção de células a partir da MO, que não só aumentam o risco de infeção, como são dolorosas.

Em seguida realçam-se os principais estudos realizados em modelos animais e humanos, relativamente à terapia celular com CEDMO.

3.6 Estudos realizados em modelos animais

O ratinho é um modelo animal bem estabelecido, estudado e compreendido, sendo possível realizar investigação relativamente à função endometrial e daí retirar conclusões extrapoláveis ou adaptáveis aos seres humanos.

Foram identificadas possíveis células estaminais no endométrio de ratinho. Em modelos pré-púberes de crescimento e desenvolvimento endometrial, essas células no epitélio luminal funcionam como células progenitoras, ao iniciar uma resposta proliferativa responsiva ao estrogénio. Relativamente às células do estroma, apenas 12% destas possíveis células progenitoras iniciaram uma resposta proliferativa. No entanto, estas parecem importantes na regeneração do estroma endometrial para suportar as glândulas e o epitélio luminal que se regeneram rapidamente. Estas células estaminais estão localizadas junto à transição endométrio-miométrio em regiões perivasculares, sugerindo que a angiogénese ocorre simultaneamente à regeneração endometrial. Estes nichos perivasculares podem transmitir indiretamente sinais proliferativos mediados por estrogénio via fatores de crescimento, enquanto que as células dos nichos endoteliais podem sentir o dano tecidual ou a necessidade de fornecer um suporte vascular para a mucosa que cresce rapidamente.^[20]

A revisão de Gargett^[1] referiu que as células derivadas da MO se incorporam em pequeno número no endométrio, sugerindo assim uma expansão clonal limitada de células epiteliais endometriais ao longo do tempo. A incorporação destas células no endométrio de humanos e de ratinhos parece mais provável durante a regeneração após lesão. Parece também que as células endometriais derivadas de células estaminais residentes mais provavelmente contribuem para a regeneração endometrial do que as células da MO.

O grupo de Du et al^[35] determinou que a lesão de isquémia/reperfusão uterina influencia o enxerto das CEDMO no endométrio, com um aumento de quase duas vezes mais de células recrutadas para o estroma uterino. No entanto, não existiu uma alteração significativa no número de células epiteliais, podendo isto indicar que o principal alvo da lesão é o estroma. Os trabalhos de Alawadhi et al mostraram resultados semelhantes, sugerindo que o estroma seja o primeiro e principal alvo do recrutamento das células estaminais e da regeneração do tecido uterino após lesão.^[36] Não se observou uma expansão clonal em larga escala nem substituição celular, sugerindo que o principal

mecanismo pelo qual o útero recupera após lesão seja a capacidade de as células estaminais mesenquimatosas produzirem fatores tróficos. As alterações hormonais sistêmicas não tiveram efeito na migração das CEDMO para o útero e a reparação endometrial completa pode ocorrer na ausência de estrogénio, o que sugere que este seja apenas essencial para o crescimento endometrial durante o ciclo menstrual. Por outro lado, sinais de lesão emitidos localmente parecem ser mais importantes na mobilização destas células.^[35]

O estudo do grupo de Alawadhi et al^[36] relatou o recrutamento independente da existência de um ciclo reprodutivo ou de estimulação hormonal e referiu que o fluxo de células estaminais para o útero é provavelmente um mecanismo de reparação em resposta à lesão ou à gravidez, ao invés de um meio de substituição de células endometriais perdidas. Acresce que a redução do número de células estaminais pode ser um fator limitante na reparação do útero após lesão extensa, como ocorre na SA e sugere-se que a suplementação com CEDMO possa regenerar o endométrio e melhorar a fertilidade após trauma uterino. Propõe-se que um sinal secretado na lesão localizada, e não um efeito local de recrutamento, pode atrair as células estaminais, mesmo numa pequena área de dano, o que poderia explicar o sucesso das biópsias endometriais na melhoria das taxas de sucesso na gravidez por FIV.

O grupo de Kilic et al^[12] avaliou o efeito das células estaminais na indução de proliferação endometrial e angiogénese em ratinhos nos quais se induziu SA. Foi demonstrada uma proliferação marcada no tecido endometrial em todos os grupos tratados, sendo as células estaminais do tecido adiposo tão eficazes quanto o estrogénio na promoção da proliferação endometrial. Demonstrou-se também que a combinação dos dois métodos era mais eficaz a reduzir a fibrose e a melhorar a proliferação endometrial, garantindo a reparação tecidual.

Em 2015, o grupo de Cervelló et al^[15] demonstrou que existe efetivamente o enxerto de CEDMO CD133+ quando estas são administradas de forma sistémica ou intrauterina num modelo de ratinho com SA. Já o grupo de Liu et al^[37] mostrou que a via de administração sistémica resulta em maior recrutamento de células de dador para o útero lesado do que a injeção local direta, sendo recrutadas para o estroma e não para o epitélio, localizando-se em proximidade aos vasos sanguíneos, mas não na parede vascular, sugerindo que estas células estaminais entram no útero por via hematogénea.

Demonstrou-se também que as CEDMO são recrutadas para o útero em maior número que as células derivadas do útero. Também não se identificaram diferenças entre os cornos uterinos lesados e não lesados em termos de recrutamento celular, sugerindo que a lesão uterina providencia um estímulo para o recrutamento de células de forma global e não apenas para a região afetada, tal como apontado em estudos anteriores.

Resultados semelhantes foram detetados pelo grupo de Cervelló et al.^[15] Os autores defendem que quando as CEDMO ou do útero são administradas de forma sistémica, o sangue providencia-as com vários fatores tróficos, que podem aumentar a sua sobrevivência quando comparado com a injeção local intraluminal. Isto pode explicar porque é que as células estaminais injetadas localmente têm baixa percentagem de células no útero e decrescem ao longo do tempo.

3.7 Estudos realizados em humanos

O envolvimento da MO na diferenciação em inúmeras células não hematopoiéticas é conhecido há já vários anos. A primeira prova deste fenómeno no endométrio humano surgiu em 2004,^[38] num trabalho que descreve a presença de CEDMO no endométrio humano após transplante a partir de um dador *mismatched*. As células endometriais derivadas de dador foram detetadas em amostras de biópsia endometrial em todos os recetores de MO, perfazendo um total de 0,2% a 48% das células epiteliais e 0,3% a 52% das células do estroma. Estas células foram localizadas em áreas específicas, sugerindo que terá havido proliferação das células estaminais derivadas de dador. Assim, comprovou-se que as células endometriais podem originar-se a partir de CEDMO de dador, sugerindo-se que estas contribuem para a regeneração do tecido endometrial. O maior número de células do estroma derivadas de dador, por comparação com as epiteliais, sugere taxas de diferenciação diferentes consoante o tipo de célula em questão.

O grupo de Nagori et al^[39] mostrou que o uso de CEDMO autólogas foi eficaz na regeneração endometrial e angiogénese de uma paciente com SA grave refratário ao tratamento convencional. O grupo considerou que se a camada basal do endométrio se recuperasse e fosse posteriormente estimulada, deveria ocorrer um aumento da espessura endometrial. Quis-se então regenerar o endométrio com células estaminais

adultas autólogas, após curetagem, e com suplementação hormonal em altas doses, tentando a regeneração através da diferenciação das células da MO, da estimulação induzida pela lesão de células estaminais endometriais pouco funcionantes, ou de ambos. Neste estudo, tanto as células do estroma como as células epiteliais derivaram da MO. Estes dados demonstram o potencial das células estaminais em regenerar ou reparar este tecido após a lesão, sendo a proliferação e desenvolvimento do endométrio totalmente regulado por estímulos hormonais. Após a regeneração do endométrio lesado, foi conseguida uma gravidez após transferência embrionária.

Garget et al,^[1] debruçou-se sobre o caso de uma mulher com SA grave, refratário à terapêutica cirúrgica e métodos de prevenção secundária. Optou-se por utilizar a terapia celular com CEDMO autólogas para gerar um endométrio funcional. O endométrio estreito e não responsivo foi tratado com sucesso com transplante intrauterino de fibroblastos e células estaminais do estroma derivados da MO e curetagem, sendo que ambos podem promover de forma independente ou sinérgica o crescimento de células endometriais: as células da MO pela produção de fatores tróficos que promovem a angiogénese e o crescimento tecidual, e a curetagem por estimular células progenitoras endometriais em células ativadas para regenerar o tecido endometrial.

Em 2012, Cervelló et al^[40] estudou se as células derivadas da MO de dador do sexo masculino contribuem para a população de células SP endometriais e, como tal, se contribuem para a fonte endógena de células estaminais adultas ou não. Os autores confirmaram que as células XY com origem na MO do dador migram para o endométrio do recetor e se diferenciam, contribuindo para a composição celular do estroma e do epitélio. Os resultados deste estudo indicam que pode ocorrer uma diferenciação final da população de células da MO em tecido endometrial, mas que este evento não está relacionado com as células estaminais endometriais endógenas, uma vez que se demonstra que as células SP endometriais não têm origem em células derivadas da MO. Assim, os autores consideraram que as células da MO não contribuem para as células SP endometriais, mas podem contribuir como fonte exógena para formar células endometriais diferenciadas, mesmo que de forma limitada em condições patológicas.

Continuam por ser identificados os mecanismos que controlam a diferenciação das células derivadas da MO em diferentes tipos de células endometriais e porque é que a contribuição desas células é mais importante para o componente do estroma do que para

o componente epitelial. Parte destas questões parece ser respondida pelo estudo de Gargett^[1] que confirma a possível estimulação de células estaminais endometriais quiescentes para um estado de proliferação celular de forma a ajudar a regenerar o endométrio danificado.

O estudo de Singh et al^[16] investigou seis pacientes com SA refratário, tendo sido transplantadas células mononucleares CD 34+ da MO - células progenitoras endoteliais que promovem a angiogénese e a reparação tecidual, impedem a criação de tecido cicatricial, modulam as respostas inflamatórias e imunes e ativam células progenitoras específicas - para a região subendometrial, não tendo sido realizada nenhuma curetagem. A espessura endometrial média pós-transplante aumentou de forma significativa, até um máximo de 6,7 mm, não sendo o suficiente para iniciar tratamentos de FIV. A regeneração vista nas pacientes pode ter-se devido ao facto de as células incorporadas se diferenciarem em epitélio e estroma endometrial ou às células da MO ativarem as células progenitoras endometriais residentes remanescentes, ao providenciarem fatores de crescimento. Ademais, o estrogénio oral administrado pode ter promovido a proliferação de um endométrio que, quando reparado, se tornou responsivo. O facto de não se ter realizado lesão endometrial antes da implantação de células estaminais, pode ter resultado nos resultados menos encorajadores no que à fertilidade diz respeito.

Por fim, o grupo de Santamaria et al^[6] quis perceber se a terapia celular com CEDMO CD133+ oferece uma arma terapêutica eficaz e segura em pacientes com SA refratária. Os autores perceberam que as células derivadas da MO que expressavam esse marcador regeneraram a vascularização e induziram a proliferação endometrial, levando à reconstrução autóloga do endométrio. Nos primeiros 3 meses, a terapia celular em conjunto com a terapia de reposição hormonal aumentou o volume e a duração das menstruações de todas as 11 mulheres com SA refratária, assim como a espessura do endométrio e o seu processo de angiogénese, ao mesmo tempo que diminuiu o grau das sinéquias intrauterinas. Este estudo foi a primeira instância em que se utiliza terapêutica de células estaminais dirigidas ao nicho de células estaminais endometriais. Apesar da duração e da intensidade da menstruação diminuir progressivamente após 6 meses de terapia celular, foi promissor observar que este tipo de terapia leva a uma diferença imediata na morfologia endometrial. Todos os resultados foram consistentes com uma reconstrução do endométrio eficaz, embora apenas transitória. Em termos funcionais,

várias foram as gravidezes conseguidas espontaneamente ou através de técnicas de procriação medicamente assistida após a terapia celular.

Estes resultados, juntamente com os resultados de Cervelló em ratinhos^[15] mostram que as células derivadas da MO CD133+ induzem a proliferação das células endometriais ao seu redor no endométrio traumatizado, principalmente no que ao compartimento epitelial diz respeito. O mecanismo proposto é que as células que incorporam os tecidos induzem a secreção de fatores parácrinos que ativam a mitose das células ao seu redor, induzindo assim a regeneração endometrial.

4. Conclusão

Hoje em dia, é claro que a SA se associa à perda de endométrio normal. O objetivo final do tratamento da SA é restaurar a fertilidade de uma mulher. Embora a sinequiólise histeroscópica melhore os resultados na recuperação menstrual e na fertilidade, não existe atualmente nenhuma técnica que seja verdadeiramente eficaz, nomeadamente em casos de SA grave. O crescimento endometrial no SA é inconsistente. A incapacidade de regeneração de novo endométrio reflete normalmente a perda do endométrio basal, sendo que o seu dano grave pode destruir as células estaminais progenitoras locais.^[4]

Células estaminais adultas são células indiferenciadas raras que têm vindo a ser identificadas pelas suas propriedades funcionais na maior parte dos tecidos e órgãos adultos no organismo humano. O seu papel é manter a homeostase tecidual, permitindo a substituição de células perdidas por lesão, sendo utilizadas com sucesso no tratamento de várias doenças, nomeadamente doenças hematopoiéticas como o mieloma múltiplo, a leucemia e os linfomas^[38] e não hematopoiéticas como doenças vasculares isquémicas, metabólicas, hemoglobinopatias, doenças neurológicas ou autoimunes.^[41] Raras populações de células progenitoras epiteliais e células estaminais do estroma foram identificadas no endométrio humano e são provavelmente responsáveis pela regeneração da camada funcional do endométrio após a menstruação e o parto.^[1, 3, 18] Assim, considera-se que poderá ser possível ativar as células estaminais endometriais endógenas em doentes cujo endométrio não é suficientemente espesso ou é mesmo atrófico ou, por outro lado, transplantar CEDMO ou outros tipos de células estaminais para a cavidade uterina, para regenerar o endométrio.^[12] A terapia celular no endométrio pretende restabelecer todos os componentes celulares da camada funcional, como tentativa de representar uma abordagem terapêutica etiológica da doença.

A evidência sugere que as células endometriais podem originar-se a partir de CEEH que se diferenciam em epitélio endometrial humano^[1, 5, 18] ou de CEDMO, que circulam em muito baixo número e enxertam o endométrio humano e outros órgãos,^[32, 33] com estudos realizados em humanos e em ratinhos a demonstrar enxerto de células derivadas da MO no endométrio num cenário de dano ou inflamação tecidual.^[5, 35, 36] As alterações hormonais sistémicas não demonstraram ter efeito na migração das CEDMO para o útero e a reparação endometrial completa pode ocorrer na ausência de estrogénio, o que sugere que este seja apenas essencial para o crescimento endometrial durante o

ciclo menstrual. Por outro lado, sinais de lesão emitidos localmente parecem ser mais importantes na mobilização destas células. O maior número de células do estroma derivadas de dador, por comparação com as epiteliais, sugere taxas de diferenciação diferentes consoante o tipo de célula em questão.^[36] Por outro lado, as células da MO não contribuem para as células SP endometriais.^[40]

Existe efetivamente o enxerto de CEDMO CD133+ quando estas são administradas de forma sistémica ou intrauterina num modelo de ratinho com SA, sendo que também em humanos as células CD133+ induzem a proliferação de células ao seu redor no endométrio traumatizado, principalmente no que ao compartimento epitelial diz respeito.^[3, 6]

Sugere-se também que a lesão induzida por biópsia ou curetagem do endométrio ativa células estaminais endometriais residentes ou os nichos de células estaminais a produzir um endométrio mais espesso e recetivo. Propõe-se que um sinal emitido na região da lesão, e não um efeito local de recrutamento, possa atrair as células estaminais, o que poderia explicar o sucesso das biópsias endometriais na melhoria das taxas de sucesso na gravidez por FIV.^[31, 36]

Não se sabe se a presença de células estaminais endometriais ativadas promove a incorporação das raras células estaminais circulantes da MO no endométrio para aumentar a resposta. Também não se tem a certeza se fatores tróficos libertados por células da MO contribuem para a ativação de células estaminais endometriais residentes. No entanto, o baixo número de células enxertadas e a regulação de fatores de crescimento específicos sugerem que a proliferação celular endometrial não seja um resultado direto da divisão das células injetadas, mas de um efeito indireto devido à secreção de fatores parácrinos no nicho de células estaminais endometriais.^[15, 19]

O tipo de célula da MO que se diferencia em células endometriais ainda não foi elucidado, podendo ser células mielóides, células estaminais hematopoiéticas, células mesenquimatosas ou células endoteliais progenitoras. A maioria dos estudos mostra que provavelmente haverá uma maior contribuição por parte de fibroblastos e células mesenquimatosas do estroma que de células progenitoras endoteliais, que através de moléculas bioativas promovem a angiogénese e a reparação celular, inibindo a cicatrização e modulando as reações inflamatórias e imunes, ativando também células estaminais específicas do tecido.^[5, 18] Este tipo de mecanismos ocorre em sistemas

melhor caracterizados, como é o caso do miocárdio lesado, podendo também resultar no caso da cavidade uterina.^[4]

Outra abordagem que parece eficaz, é o transplante autólogo de células menstruais, que pode ser uma boa opção para a regeneração endometrial desde que se consigam cultivar células suficientes para o tratamento. Neste caso, as células do estroma transplantadas conseguem suplementar as regiões deficitárias em células estaminais.^[27]

Por fim, percebe-se que administração sistêmica de CEDMO ou células derivadas do útero resulta em melhor recrutamento para o útero lesado que a injeção local, sendo recrutadas para o estroma e não para o epitélio. O sangue parece providenciar vários fatores tróficos, que podem aumentar a sua sobrevivência quando comparado com a injeção local intraluminal.^[15, 37] Por outro lado, as células derivadas da MO parecem ser mais adequadas para a restauração do útero lesado que as células derivadas do útero.^[37] Permanece por determinar se as estratégias para aumentar o número de células estaminais enxertadas poderiam aumentar a reparação de tecido endometrial.

5. Bibliografia

1. Gargett, C.E., Nguyen, H.P.T. and Ye, L. (2012) Endometrial regeneration and endometrial stem/progenitor cells. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, **13**, 235–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847235>.
2. Gargett, C.E., Chan, R.W.S. and Schwab, K.E. (2008) Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: Role of stem/progenitor cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **288**, 22–29.
3. Cervelló, I., Gil-Sanchis, C., Santamaría, X., Cabanillas, S., Díaz, A., Faus, A., et al. (2015) Human CD133(+) bone marrow-derived stem cells promote endometrial proliferation in a murine model of Asherman syndrome. *Fertility and sterility*, **104**, 1552-60.e1–3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26384164>.
4. Gargett, C.E. and Healy, D.L. (2011) Generating receptive endometrium in Asherman's syndrome. **4**, 49–52.
5. Deane, J.A., Gualano, R.C. and Gargett, C.E. (2013) Regenerating endometrium from stem/progenitor cells: Is it abnormal in endometriosis, Asherman's syndrome and infertility? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, **25**, 193–200.
6. Santamaria, X., Cabanillas, S., Cervelló, I., Arbona, C., Raga, F., Ferro, J., et al. (2016) Autologous cell therapy with CD133+ bone marrow-derived stem cells for refractory Asherman's syndrome and endometrial atrophy: a pilot cohort study. *Human reproduction (Oxford, England)*, **31**, 1087–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27005892>.
7. Asherman, J.G. (1948) Amenorrhoea Traumatica (Atretica). *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, **55**, 23–30.
8. Deans, R. and Abbott, J. (2010) Review of Intrauterine Adhesions. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, **17**, 555–569. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmig.2010.04.016>.
9. Wallach, E.E., Schenker, J.G. and Margalioth, E.J. (1982) Intrauterine adhesions: an updated appraisal. *Fertility and Sterility*, **37**, 593–610. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028216462680>.

10. Yu, D., Wong, Y.M., Cheong, Y., Xia, E. and Li, T.C. (2008) Asherman syndrome-one century later. *Fertility and Sterility*, **89**, 759–779.
11. Abbott, J.A., Munro, M.G., Singh, S.S., Scheib, S., Jackson, T.R., Jansen, F., et al. (2017) AAGL practice report: practice guidelines on intrauterine adhesions developed in collaboration with the European Society of Gynaecological Endoscopy (ESGE). *Gynecological Surgery*, **14**, 1–11.
12. Kilic, S., Yuksel, B., Pinarli, F., Albayrak, A., Boztok, B. and Delibasi, T. (2014) Effect of stem cell application on Asherman syndrome, an experimental rat model. *Journal of assisted reproduction and genetics*, **31**, 975–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24974357>.
13. Magos, A. (2002) Hysteroscopic treatment of Asherman's syndrome. *Reproductive biomedicine online*, **4 Suppl 3**, 46–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470565>.
14. Kodaman, P.H. and Arici, A. (2007) Intra-uterine adhesions and fertility outcome: How to optimize success? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, **19**, 207–214.
15. Cervelló, I., Santamaría, X., Miyazaki, K., Maruyama, T. and Simón, C. (2015) Cell Therapy and Tissue Engineering from and toward the Uterus. *Seminars in Reproductive Medicine*, **33**, 366–371.
16. Singh, N., Mohanty, S., Seth, T., Shankar, M., Dharmendra, S. and Bhaskaran, S. (2014) Autologous stem cell transplantation in refractory Asherman's syndrome: A novel cell based therapy. *Journal of Human Reproductive Sciences*, **7**, 93. <http://www.jhrsonline.org/text.asp?2014/7/2/93/138864>.
17. Ye, L., Mayberry, R., Lo, C.Y., Britt, K.L., Stanley, E.G., Elefanty, A.G., et al. (2011) Generation of human female reproductive tract epithelium from human embryonic stem cells. *PLoS ONE*, **6**.
18. Gargett, C.E. and Ye, L. (2012) Endometrial reconstruction from stem cells. *Fertility and Sterility*, **98**, 11–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.05.004>.

19. Cervelló, I., Mas, A., Gil-Sanchis, C., Peris, L., Faus, A., Saunders, P.T.K., et al. (2011) Reconstruction of endometrium from human endometrial side population cell lines. *PLoS ONE*, **6**, 1–12.
20. Gargett, C.E. (2006) Uterine stem cells: What is the evidence? *Human Reproduction Update*, **13**, 87–101. <https://academic.oup.com/humupd/article-lookup/doi/10.1093/humupd/dml045>.
21. Gargett, C.E. and Rogers, P.A.W. (2001) Human endometrial angiogenesis. *Reproduction*, **121**, 181–186.
22. Barash, A., Dekel, N., Fieldust, S., Segal, I., Schechtman, E. and Granot, I. (2003) Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, **79**, 1317–1322.
23. Cervelló, I., Gil-Sanchis, C., Mas, A., Delgado-Rosas, F., Martínez-Conejero, J.A., Galán, A., et al. (2010) Human endometrial side population cells exhibit genotypic, phenotypic and functional features of somatic stem cells. *PLoS ONE*, **5**.
24. Tsuji, S., Yoshimoto, M., Takahashi, K., Noda, Y., Nakahata, T. and Heike, T. (2008) Side population cells contribute to the genesis of human endometrium. *Fertility and Sterility*, **90**, 1528–1537.
25. Masuda, H., Matsuzaki, Y., Hiratsu, E., Ono, M., Nagashima, T., Kajitani, T., et al. (2010) Stem cell-like properties of the endometrial side population: Implication in endometrial regeneration. *PLoS ONE*, **5**.
26. Miyazaki, K., Maruyama, T., Masuda, H., Yamasaki, A., Uchida, S., Oda, H., et al. (2012) Stem Cell-Like Differentiation Potentials of Endometrial Side Population Cells as Revealed by a Newly Developed In Vivo Endometrial Stem Cell Assay. *PLoS ONE*, **7**.
27. Tan, J., Li, P., Wang, Q., Li, Y., Li, X., Zhao, D., et al. (2016) Autologous menstrual blood-derived stromal cells transplantation for severe Asherman's syndrome. *Human reproduction (Oxford, England)*, **31**, 2723–2729. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27664218>.

28. Rossignoli, F., Caselli, A., Grisendi, G., Piccinno, S., Burns, J.S., Murgia, A., et al. (2013) Isolation, characterization, and transduction of endometrial decidual tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood. *BioMed Research International*, **2013**.
29. Meng, X., Ichim, T.E., Zhong, J., Rogers, A., Yin, Z., Jackson, J., et al. (2007) Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. *Journal of Translational Medicine*, **5**, 1–10.
30. Li, Y., Li, X., Zhao, H., Feng, R., Zhang, X., Tai, D., et al. (2013) Efficient Induction of Pluripotent Stem Cells from Menstrual Blood. *Stem Cells and Development*, **22**, 1147–1158. <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2012.0428>.
31. Nastri, C.O., Lensen, S.F., Gibreel, A., Raine-Fenning, N., Maheshwari, A., Ferriani, R.A., et al. (2015) Endometrial injury in women undergoing assisted reproductive techniques. *The Cochrane database of systematic reviews*, **7**, CD009517. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22786529>.
32. Du, H. and Taylor, H.S. (2010) Stem cells and reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, **22**, 235–241.
33. Chan, R.W.S., Schwab, K.E. and Gargett, C.E. (2004) Clonogenicity of Human Endometrial Epithelial and Stromal Cells¹. *Biology of Reproduction*, **70**, 1738–1750. <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.103.024109>.
34. Caplan, A.I. (2009) Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of pathology*, **217**, 318–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19023885>.
35. Du, H., Naqvi, H. and Taylor, H.S. (2012) Ischemia/reperfusion injury promotes and granulocyte-colony stimulating factor inhibits migration of bone marrow-derived stem cells to endometrium. *Stem cells and development*, **21**, 3324–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22897736>.
36. Alawadhi, F., Du, H., Cakmak, H. and Taylor, H.S. (2014) Bone Marrow-Derived

Stem Cell (BMDSC) transplantation improves fertility in a murine model of Asherman's syndrome. *PloS one*, **9**, e96662. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24819371>.

37. Liu, Y., Tal, R., Pluchino, N., Mamillapalli, R. and Taylor, H.S. (2018) Systemic administration of bone marrow-derived cells leads to better uterine engraftment than use of uterine-derived cells or local injection. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **22**, 67–76.
38. Taylor, H.S. (2004) Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA*, **292**, 81–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15238594>.
39. Nagori, C.B., Panchal, S.Y. and Patel, H. (2011) Endometrial regeneration using autologous adult stem cells followed by conception by in vitro fertilization in a patient of severe Asherman's syndrome. *Journal of human reproductive sciences*, **4**, 43–8. <http://www.jhrsonline.org/text.asp?2011/4/1/43/82360>.
40. Cervelló I; Gil-Sanchis C; Mas A; Faus A; Sans K, et al (2012) Bone Marrow-Derived Cells from Male Donors Do Not Contribute to the Endometrial Side Population of the Recipient. **7**.
41. Yuksel, B., Kilik, S., Taser, F., Pinarli, F. and Delbasi, T. (2012) Male fertility preservation, current options with stem cells. *Niche*, **1**, 42–5.