

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
07 de junio de 2018 (07.06.2018)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2018/100212 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

C12N 5/079 (2010.01) A61K 35/12 (2015.01)

C12N 5/0797 (2010.01) A61K 35/54 (2015.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2017/000143

(22) Fecha de presentación internacional:

16 de noviembre de 2017 (16.11.2017)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201601014 29 de noviembre de 2016 (29.11.2016) ES

(71) Solicitante: **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID** [ES/ES]; Avda. Séneca, 2, 28040 Madrid (ES).

(72) Inventores: **PICAZO GONZÁLEZ, Rosa ana**; Dpto. de Fisiología (Fisiología Animal), Facultad de Veterinaria, Avda. Puerta de Hierro, SN, 28040 Madrid (ES). **SÁNCHEZ MALDONADO, Belén**; Dpto. de Medicina y Cirugía, Facultad de Veterinaria, Avda. Puerta de Hierro, SN, 28040 Madrid (ES). **ROJO SALVADOR, Concepción**; Dpto. Anatomía y Anatomía Patológica, Comparadas - Fac. de Veterinaria, Avda. Puerta de Hierro, SN, 28040 Madrid (ES). **GARCIA PALENCIA, Pilar**; Dpto. de Medicina y Cirugía, Facultad de Veterinaria, Avda. Puerta de Hierro, SN, 28040 Madrid (ES). **SÁNCHEZ PÉREZ, Angeles**; Dpto. de Medicina y Cirugía, Facultad de Veterinaria - UCM, Avda. Puerta de Hierro, SN, 28040 Madrid (ES). **ARANDA ESPINOSA, Pedro José**; Dpto. de Medicina y Cirugía, Facultad de Veterinaria - UCM, Avda. Puerta de Hierro, SN, 28040 Madrid (ES). **ENCINAS CEREZO, Teresa**; Dpto. de Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria -

UCM, Avda. Puerta de Hierro, SN, 28040 Madrid (ES). **GI-LABERT SANTOS, Juan Antonio**; Dpto. de Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria - UCM, Avda. Puerta de Hierro, SN, 28040 Madrid (ES). **ROS RODRÍGUEZ, José María**; Dpto. de Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria - UCM, Avda. Puerta de Hierro, SN, 28040 Madrid (ES). **GALICIA GUERRERO, María Lourdes**; Calle Rio Mixteco, Manzana N° 10, Lote N° 22, 56560 México (MX).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING NEURAL STEM CELLS AND NEURAL PROGENITOR CELLS FROM NON-EMBRYONIC OVARIAN CORTICAL TISSUE

(54) Título: MÉTODO PARA OBTENER CÉLULAS TRONCALES NEURALES Y CÉLULAS PROGENITORAS NEURALES A PARTIR DE TEJIDO CORTICAL OVÁRICO NO EMBRIONARIO

(57) Abstract: The present invention relates to a method for obtaining neural stem cells and neural progenitor cells (NSC/NPC) from ovarian cortical tissue of pre-pubescent female mammals, without needing to add factors for inducing and/or expanding the neural line to the culture medium. The method of the invention can be used to obtain NSC/NPC after 8–21 days of incubation, improving the results by adding follicle stimulating hormone (FSH) to the culture medium. The NSC/NPC obtained using this method can be used in experimental models of *in-vitro* neurogenesis, in directed NSC/NPC differentiation to generate different types of nerve cells of interest in medicine for regenerating the nervous system, with use in autologous transplantation in cell therapy of neurodegenerative diseases, and to evaluate the neurotoxicity of different drugs, contaminants and chemical compounds.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un método para obtener células troncales neurales y células progenitoras neurales (CTN/CPN) a partir de tejido cortical ovárico de hembras prepúberes de mamífero, sin necesidad de añadir al medio de cultivo factores de inducción y/o expansión del linaje neural. Con el método de la invención se obtienen CTN/CPN tras 8-21 días de incubación, mejorando los resultados mediante la adición de FSH al medio de cultivo. Las CTN/CPN que se obtienen mediante este método pueden ser utilizadas en modelos experimentales de neurogénesis *in vitro*, en diferenciación dirigida de CTN/CPN para generar diversos tipos de células nerviosas de interés en medicina regenerativa del sistema nervioso, con aplicación al trasplante autólogo en terapia celular de patologías neurodegenerativas, así como para la evaluación de neurotoxicidad de diversos fármacos, contaminantes y compuestos químicos.

Publicada:

- *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
- *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

Título

Método para obtener células troncales neurales y células progenitoras neurales a partir de tejido cortical ovárico no embrionario.

5 Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el sector de la biomedicina. Más concretamente, se refiere al aislamiento y cultivo de células troncales neurales y progenitores neurales (CTN/CPN) a partir del cultivo de tejido cortical ovárico.

10 Estado de la técnica

Las células troncales neurales (CTN) son células multipotentes que derivan de células troncales embrionarias o de células troncales adultas, después de un proceso de especificación que tiene lugar tanto durante el desarrollo embrionario como, probablemente, en el periodo postnatal. En el curso de la neurogénesis, experimentan una intensa actividad proliferativa seguida de diferenciación para generar los distintos tipos de células nerviosas. Si bien las CTN son multipotentes, las células progenitoras neurales (CPN) que derivan directamente de las CTN, se encuentran comprometidas con el linaje neural, al que queda restringido su potencial de diferenciación. No obstante, las CPN experimentan numerosas mitosis antes de iniciar definitivamente la diferenciación hacia el destino celular final (Gage y Temple, 2013). Por tanto, las CTN/CPN disponen de capacidad para generar los tres tipos de células nerviosas, al ser expuestas a la acción de factores y estímulos adecuados.

25 Las CTN/CPN pueden generar esferoides de forma espontánea (Beck y cols., 2011). La formación de esferoides, conocidos en este caso como neuroesferas, es consecuencia de la intensa actividad proliferativa de estas células y del elevado nivel de expresión de proteínas de adhesividad en superficie, (revisado por Achilli y cols., 2012), de forma que cada mitosis genera células hijas que se agregan, o experimentan agregación sin necesidad de mitosis previas. Estos esferoides pueden estar integrados por CTN, CPN y precursores de células nerviosas cuya presencia depende en gran medida de las condiciones del sistema de cultivo. De los factores de transcripción SOX2, Nanog y OCT4, (asociados a pluripotencialidad), expresan de forma predominante SOX2 (Wang y cols., 2012) y marcadores característicos del linaje neural, como nestina, vimentina, PAX6, p75, entre otros (Zhang y Jiao, 2015), además de mostrar una intensa actividad proliferativa.

Actualmente, existen varios procedimientos para la obtención de CTN/CPN. En primer lugar, se pueden obtener a partir de células troncales embrionarias, que en cultivo se exponen a condiciones de especificación, expansión y posterior
5 diferenciación a tipos concretos de células nerviosas (Lee y cols., 2007; Naka y cols., 2008). Esta aproximación implica la obtención y utilización de embriones preimplantacionales, lo que añade complejidad a la experimentación con animales, e imposibilidad ética y legal en la especie humana.

10

La necesidad de superar las barreras éticas relacionadas con la utilización de embriones humanos y de generar procedimientos de aislamiento, diferenciación y trasplante celular autólogo en programas de medicina regenerativa humana, abrió un amplio campo de actividad investigadora
15 encaminada a establecer procedimientos de inducción de pluripotencialidad en células somáticas diferenciadas, la reprogramación del genoma celular. Takahashi y Yamanaka (2006) consiguieron reprogramar fibroblastos murinos a células pluripotentes, mediante transfección de los genes OCT4, SOX2, c-Myc y Klf. Las CTN pueden obtenerse a partir de células pluripotentes
20 inducidas, sometidas a procedimientos de especificación, expansión y diferenciación, similares a los que se aplican a las células troncales embrionarias (Chambers y cols., 2009; Koch y cols., 2011). Aunque los procedimientos de inducción han sido optimizados por diferentes grupos de investigación, eliminando la expresión de oncogenes asociados, esta
25 aproximación añade aún mayor complejidad y desventajas colaterales debidas a la posible sobreexpresión no deseada de transcritos relacionados con la reprogramación.

Como alternativa a estos procedimientos de reprogramación del genoma, se
30 han desarrollado métodos de inducción química de pluripotencialidad. Recientemente, se ha descrito un procedimiento para la obtención de CPN a partir de fibroblastos embrionarios en cultivo, en condiciones de hipoxia y expuestos a la acción de inhibidores de varias vías de señalización (Cheng y cols., 2014). En los últimos años, se han investigado vías alternativas para la
35 reprogramación química de células somáticas (Biswas y Jiang, 2016), así como la conversión directa de células somáticas en células nerviosas, después de su

exposición a condiciones de hipoxia (Thier y cols., 2012). Estas estrategias precisan de una amplia contrastación, antes de su aplicación en terapia celular.

5 Finalmente, las CTN/CPN se pueden aislar directamente de las áreas neurogénicas del cerebro durante el desarrollo embrionario (Tropepe y cols., 1999) y en el periodo postnatal y adulto (Reynolds y Weiss, 1992), para ser utilizadas en modelos experimentales de desarrollo *in vitro* y de patologías neurodegenerativas.

10 Por razones éticas, o científico-técnicas, los abordajes experimentales previamente mencionados no resultan del todo adecuados para el establecimiento de modelos de trasplante autólogo que proporcionen un avance significativo en medicina regenerativa del sistema nervioso, para lo que resultaría indispensable la obtención y utilización de células troncales adultas
15 del propio individuo. En relación con esta estrategia, destacan las investigaciones sobre derivación neural de células troncales adultas del tejido conectivo del músculo esquelético (Romero Ramos y cols., 2002) y del folículo piloso (Amoh y cols., 2012). En ovario de diversas especies de mamíferos, se ha constatado la existencia de células pluripotentes de origen epitelial y/o del
20 estroma de las que, una parte, puede diferenciar en cultivo a células que expresan algunos marcadores característicos de células nerviosas (Bukovsky y cols., 2008; Parte y cols., 2011; Gong y cols., 2010; Stimpfel y cols., 2014), proceso promovido mediante la adición de algunas hormonas esteroides al medio de cultivo.

25 Las condiciones de los sistemas de cultivo para la obtención de CTN/CPN a partir de la especificación, expansión y diferenciación de células troncales embrionarias y de células pluripotentes inducidas, son actualmente bien conocidas (Yan y cols., 2013, Naka y cols., 2008). Existen medios de cultivo
30 comerciales formulados para conseguir avanzar en cada etapa del proceso de derivación *in vitro*. En general, los medios definidos que se utilizan en la etapa de especificación y expansión, contienen, además de aditivos esenciales, los mitógenos EGF y FGF-2, fundamentales en el proceso de especificación de las células pluripotentes al linaje neuroepitelial, en el mantenimiento del estatus
35 indiferenciado de estas células, en su actividad proliferativa y en su capacidad de auto-renovación (Eiselova y cols., 2009, Nieto-Estévez y cols., 2013). La diferenciación terminal de células ya comprometidas con el linaje neural se

consigue retirando los factores inductores de proliferación, e incorporando factores de diferenciación al medio definido, como BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), GDNF (*glial cell derived neurotrophic factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), o suero fetal bovino (1%), además de
5 aditivos esenciales.

A pesar de todos los avances alcanzados, se sigue investigando para determinar métodos alternativos, más sencillos, eficaces y rápidos.

10 REFERENCIAS

- Achilli T.M., Meyer J., Morgan J.R. (2012). *Expert Opin. Biol. Ther.* 12(10): 1347-1360.
- 15 Amoh Y., Mii S., Aki R., Hamada Y., Kawahara K., Hoffman R.M., Katsuoka K. (2012). *Cell Cycle* 11 (18): 3513-3517.
- Beck H.C., Petersen J., Felthaus O., Schmalz G., Morsczeck (2011). *Neurochemical Research* 36(11):2002-2007.
- 20 Biswas D., and Jiang P (2016). *Int. J. Mol. Sci.* 17:226, Art. ID 17020226.
- Bukovsky A., Claude M.R., Svetlikova M. (2008). *Cell Cycle* 7:3577-3583.
- 25 Chambers S.M., Fasano C.A., Papapetrou E.P., Tomishima M., Sadelain M., Studer L., (2009). *Nat. Biotechnol.* 27:275-280.
- Cheng L., Hu W. y cols. (2014). *Cell Research* 24: 665-679.
- 30 Eisellova L., Matulka K., Kriz V., Kunova M., Schmidtova Z. y cols., (2009). *Stem Cells* 27: 1847-1857.
- Gage F.H., Temple, S. (2013). *Neuron* vol. 80 nº 3: 588-601.
- 35 Gil-Perotín S., Durán-Moreno M., Cebrián-Silla A., Ramírez M., García-Belda P., García-Verdugo J.M. (2013). *The Anatomical Record* 296: 1435-1452.

- Gong S.P., Lee S.T., J.H., Lee, E.J., Kim, D.Y., Lee, G., Chi, S.J., Ryu, B-K., Lee, C.H., Yum, K.E., Lee, H-J, Han J.Y., Tilly, J.L., Lim, J.M. (2010). *Fertility and Sterility* 93(8). Doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.12.053.
- 5 Koch P., Breuer P., Peitz M., Jungverdorben J., Kesavan, J., Poppe D., y cols. (2011). *Nature* 480:543-546.
- Lee H., Al Shamy G., Elkabetz Y., Schofield C.M., Harrision N.L., Panagiotakos G., Socci N.D., Tabar V., Studer L. (2007). *Stem Cells* 25:1931-1939.
- 10 Naka H., Nakamura S., Shimazaki T., Okano H. (2008). *Nature Protocol Exchange*, nº 479, doi: 10.1038/nprot.2008.168.
- Nieto-Estévez V., Pignatelli J., Aráuzo-Bravo M.J., Hurtado-Chong A., Vicario-
15 Abejón C. (2013). *PLoS ONE* 8(1):e53594.
- Parte S., Bhartiya D., Telang J., Daithankar V., Salvi V., Zaveri K., Hinduja I (2011). *Stem Cells and Development* 20 (8):1451-1464.
- 20 Reynolds B.A., Weiss S. (1992). *Science* 255: 1707-1710.
- Romero-Ramos M., Vourc'h P., Young H.E., Lucas P.A., Wu Y., Chivatacam O., Zaman R., Dunkelman N., El-Kalay A., Chesselet M-F. (2002). *J. Neurosci. Res.* 69:894-907.
- 25 Stimpfel M., Cerkovnik P., Novakovic S., Maver A., Virant-Klun I (2014). *J. Assist. Reprod. Genet.* 31: 959-974.
- Takahashi K., Yamanaka S. (2006). *Cell* 126: 663-676.
- 30 Thier M., Wörsdörfer P., Lakes Y.B., Gorris R., Herms S., Opitz T., Seiferling D., Quandel T., Hoffman P., Nöthen M.N., Brüstle O., Edenhofer F. (2012). *Cell Stem Cell* 10: 473-479.
- 35 Tropepe V., Sibilia M., Ciruna B.G., Rossant J., Wagner E.F., van der Kooy D. (1999). *Dev. Biol.* 208:166-188.

Wang Z, Oron E, Nelson B, Razis, S, Ivanova N (2012). Cell Stem Cell 10:440-454.

Yan Y., Shin S., Jha B.S., Liu Q., Sheng J., Li F., Zhang M., Davis J., Bharti K.,
5 Zeng X., Rhao M., Malik N., Vemuri M.C. (2013). Stem Cells Translational
Medicine 2: 862-870.

Zhang J. and Jiao J. (2015). Biomed Research International 2015, Art.ID
727542: 1-14.

10

Descripción detallada de la invención

Método para obtener células troncales neurales y células progenitoras neurales
a partir de tejido cortical ovárico no embrionario.

15 Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para obtener
células troncales neurales y células progenitoras neurales (CTN/CPN) a partir
del tejido cortical ovárico postnatal-prepúber. Se trata de un método alternativo
con ventajas con respecto a las metodologías en uso actual en diversas
especies de mamíferos, a partir de embriones preimplantacionales (células
20 troncales embrionarias), de células somáticas reprogramadas genéticamente
(células pluripotentes inducidas), o a partir del cerebro fetal o postnatal con
fines meramente experimentales, ya que se utilizan muestras que han podido
ser tomadas con anterioridad y conservadas. Dichas muestras pueden
proceder de animales mamíferos, incluyendo la especie humana. Este método
25 incluye los siguientes pasos:

- a) fragmentar una muestra de tejido cortical ovárico de hembra en edad
postnatal-prepúber hasta obtener fragmentos de dimensiones iguales o
menores a 1,0 x 1,0 mm;
- b) digerir enzimáticamente los fragmentos de tejido cortical ovárico;
- 30 c) disgregar mecánicamente los fragmentos digeridos del paso b);
- d) eliminar los folículos ováricos preantrales y los oocitos de los fragmentos
disgregados del paso c), por filtración;
- e) incubar las células obtenidas mediante los pasos a) – d) durante 6-21 días
en placas tapizadas con fibronectina y en medio de cultivo completo, que
35 incluye medio esencial o de mantenimiento libre de suero, suplementado con
albúmina, insulina, transferrina, selenio y colesterol, en el que no se incluyen
factores de inducción y/o expansión neural.

Por factores de inducción neural se entienden aquellos factores que ejercen su acción en las células pluripotentes y causan el proceso de especificación celular hacia el linaje neuroepitelial. Por factores de expansión neural, se entienden aquellos que estimulan la proliferación de las células troncales neurales y progenitores neurales. Ejemplos de factores de inducción neural son: FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2), Nogina, Cordina, Folistatina, Cerberus, XNr3 y Sonic hedgehog (*SHH*), siendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF) el principal factor de expansión utilizado, así como también FGF2, HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), e IGF-I (factor de crecimiento insulínico tipo 1).

El medio de cultivo puede incluir antibióticos y/o antimicóticos para impedir la contaminación por bacterias y hongos.

Además, el medio completo puede contener como aditivo hormona foliculo-estimulante (FSH), lo que aumenta el rendimiento en la obtención de CTN/CPN. Preferentemente, la FSH se añade al medio en una concentración comprendida entre 20-100 ng/ml.

El método de la invención se puede aplicar a muestras de tejido cortical ovárico postnatal-prepúber de mamíferos, incluyendo mamíferos humanos.

En esta memoria descriptiva, se utilizan indistintamente los términos "tejido cortical ovárico" y "córtex".

Mediante este método, se aíslan y cultivan células del tejido cortical del ovario postnatal-prepúber y se obtienen, de forma homogénea y consistente, células que expresan genes y proteínas característicos de CTN/CPN. Tras 6-21 días de cultivo, se obtienen abundantes neuroesferas, esferoides cuyas células expresan genes característicos de CTN/CPN, como son: nestina, vimentina, SOX2, PAX6, p75 y transcritos característicos de diferenciación neural, como son: DCX (neuronas), GFAP (astrocitos) y Olig4 (oligodendrocitos).

Las células obtenidas mediante el método de la invención pueden ser utilizadas en el desarrollo de modelos experimentales para investigación básica en

neurogénesis y en modelos de autotrasplante en medicina regenerativa del sistema nervioso.

En esta invención, las células de origen pueden obtenerse utilizando muestras
5 que hayan sido tomadas de tejido cortical ovárico, lo que supone un avance cualitativo notable respecto a los sistemas convencionales para su aislamiento a partir de embriones preimplantacionales, permitiendo superar las barreras éticas y legales que afectan, en este sentido, a la especie humana. Por otra parte, este método proporciona una mayor sencillez en los procedimientos de
10 obtención de estas células cuando se utilizan animales de experimentación. La definición del método específico y las condiciones del cultivo, que permiten obtener una población celular uniforme, con identidad molecular correspondiente a células troncales neurales y progenitores neurales, aporta avances significativos respecto a los procedimientos habituales de aislamiento
15 de estas células, que se encuentran en nichos neurogénicos del cerebro en la edad postnatal y adulta, como el giro dentado del hipocampo o la zona subependimal. El elevado rendimiento del procedimiento de la invención, en la producción de células con marcadores de CTN/CPN, permite plantear la realización de ensayos de autotrasplante autólogo de células comprometidas
20 con el linaje neural, en programas de terapia celular de patologías neurológicas. Además, las CTN/CPN obtenidas pueden ser utilizadas en modelos experimentales de neurogénesis *in vitro*, en diferenciación dirigida de CTN/CPN para generar diversos tipos de células nerviosas de interés en medicina regenerativa del sistema nervioso, así como para la evaluación de
25 neurotoxicidad de diversos fármacos, contaminantes y compuestos químicos.

Breve descripción de las figuras

FIGURA 1. Gráficas representativas de la caracterización de la suspensión
30 celular inicial, por citometría de flujo, que demuestran la expresión y localización de los antígenos de superficie específicos de células troncales embrionarias, TRA-1-60 y SSEA4, cuyo marcaje se evaluó de forma individual (B, C) y combinada (D), respecto al control negativo (A), representado por -/-.
FIGURA 2. Microfotografías representativas del proceso de formación de
35 esferoides similares a cuerpos embrioides, durante la primera (A, B) y segunda (C-F) semana en cultivo.

FIGURA 3. Microfotografías que muestran la salida de grandes células desde los esferoides, que migran activamente (**A**, **B**) hacia áreas específicas del soporte de cultivo, en las que parecen reagruparse (**C**). Las células que salen de los esferoides, presentan un elevado ratio volumétrico núcleo:citoplasma y frecuentes mitosis (**D**, **E**).

FIGURA 4. Microfotografías representativas de los procesos de diferenciación de las células que emergen de los esferoides, que adquieren apariencia morfológica de células nerviosas diferenciadas (**A**, **B**, **E**), y en diferenciación (**C**, **D**, **F**).

FIGURA 5. Representación gráfica de la evolución temporal (D, tiempo en días) de los diámetros de los esferoides ($\varnothing$ μ m), en medio completo (**C**) y en medio completo con FSH como aditivo (FSH). Los números (1, 2, 3, 4) y las letras (a, b) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$), debidas al tiempo dentro de cada tratamiento (**C** o FSH) y entre tratamientos en cada punto temporal, respectivamente.

FIGURA 6. Representación gráfica de la cuantificación relativa (RQ) de los transcritos característicos de pluripotencialidad, SOX2 (**A**), OCT4 (**B**) y Nanog (**C**) determinada mediante RT-PCRQ, durante las tres semanas del cultivo, en los días (D) de muestreo correspondientes, respecto a sus niveles de expresión en la suspensión celular de partida (0, eje horizontal), en medio de cultivo completo (**C**) y medio de cultivo completo con FSH (FSH). Los números (1, 2, 3) y las letras (a, b) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en la expresión temporal de cada transcrito y debidas a la adición de FSH al medio de cultivo, respectivamente.

FIGURA 7. Representación gráfica de la cuantificación relativa (RQ) de los marcadores característicos de CTN/CPN, nestina (**A**), vimentina (**B**), PAX6 (**C**) y p75 (**D**), determinada mediante RT-PCRQ, durante las tres semanas del cultivo en los días (D) de muestreo (10, 15, 21), respecto a los niveles de expresión de cada transcrito en la suspensión celular de partida (0, eje horizontal). Los números (1, 2, 3) y las letras (a, b) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$), en la expresión temporal de cada transcrito y debidas a la adición de FSH al medio de cultivo en cada punto temporal, respectivamente.

FIGURA 8. Representación gráfica de la cuantificación relativa (RQ) de los marcadores característicos de diferenciación neural, doblecortina (DCX; **A**), proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP; **B**), y del factor de transcripción de oligodendrocitos 4 (OLIG4; **C**), determinada mediante RT-PCRQ, durante las

tres semanas de cultivo, en los días (D) de muestreo correspondientes, respecto a los niveles de expresión de cada transcrito en la suspensión celular de partida (0, eje horizontal). Los números (1, 2), y las letras (a, b) indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$), en la expresión temporal de cada transcrito y debidas a la adición de FSH al medio de cultivo en cada punto temporal, respectivamente.

FIGURA 9. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de nestina (A), vimentina (B), PAX6 (C) y p75 (D), en los esferoides obtenidos mediante el método de cultivo de la invención.

FIGURA 10. Imágenes representativas de los análisis de caracterización de la población celular por citometría de flujo, llevados a cabo sobre la suspensión celular de partida previa al cultivo (A), y en el día 6 de cultivo, en los grupos M1 (B), M2 (C) y M3 (D). Se analizan nestina (NEST), SOX2 (SOX), PAX6 (PAX) y p75 (P75).

FIGURA 11. A-B: Cortes semifinos teñidos con azul de metileno. **A:** Esferoide en el que se distinguen dos partes: la región central o "core" y la periférica, estructuralmente similar a un epitelio. **B:** Detalle de la imagen A, a mayores aumentos, que muestra la interacción entre las células de la región central y la periférica del esferoide. **C-G:** Ultramicrofotografías de los esferoides. **C:** Célula que ha abandonado el esferoide. **D:** Las células claras se localizan en la región periférica del esferoide. **E:** La región central del esferoide contiene células oscuras y compactadas por aposición de sus membranas y abundante degeneración celular. **F, G** La imagen D, a mayores aumentos, permite observar células con núcleos indentados (puntas de flecha) y citoplasmas con abundantes cisternas de retículo endoplásmico rugoso (flechas), mitocondrias (m) y filamentos (f). Barra de calibración: 100 μm (A); 50 μm (B); 1 μm (C, G); 5 μm (D); 10 μm (E); 2 μm (F).

FIGURA 12. A-C: Ultramicrofotografías de los esferoides que muestran detalles del citoplasma de las células claras: **A:** Filamentos agrupados (flecha). **B:** Abundantes estructuras similares a lisosomas y fagosomas (flecha). **C:** Superficie apical de las células claras con abundantes microvellosidades bien desarrolladas; interdigitación en el área apical de las membranas (punta de flecha). Las flechas indican la presencia de uniones intercelulares adherentes. **D:** Células oscuras en la región interior del esferoide que muestran núcleo reticulado (flecha) y aposición de membranas. **E:** Uniones y contactos intercelulares en las células claras: uniones adherentes (flechas pequeñas), fuerte interdigitación (punta de flecha) y procesos citoplasmáticos con

interdigitaciones lábiles con células adyacentes (flecha grande). F: Imágenes de degeneración celular (probablemente apoptosis) en la región central del esferoide. Barra de calibración: 0.2µm (A); 1 µm (B, C, D); 2µm (E); 5µm (F).

5 Modo de realización de la invención

1.- MÉTODO DE OBTENCIÓN DE CTN/CPN

10 **1.1.- Material biológico de partida:** para este ejemplo, se utilizó tejido cortical ovárico de hembra ovina prepúber (*Ovis aries*). El material biológico se obtuvo en los mataderos de Alpedrete (Carnes Alpedrete, SAT), de Colmenar Viejo (Cárnica Colmenar, SC) y de Leganés (Transformación Ganadera de Leganés, SA), en Madrid. Los ovarios se disecaron de la canal, inmediatamente después del sacrificio, y se transportaron al laboratorio en envases estériles conteniendo
15 medio de cultivo (M199, Sigma, ref. M7528), con antibiótico y antimicótico (antibiótico, antimicótico 100X Gibco, Life Technologies, ref. 15240), en nevera, a 2-8°C. Al llegar al laboratorio, se transfirieron a envases con medio renovado con antibiótico y antimicótico, previo al procesado.

20 **1.2.- Obtención de fragmentos del tejido cortical ovárico:** los ovarios se situaron sobre placas de Petri, en hielo, y se realizaron cortes repetidos, en áreas desprovistas de folículos antrales visibles macroscópicamente y bajo el microscopio estereoscópico, hasta obtener fragmentos de dimensiones inferiores a 1,0 X 1,0 mm. En promedio, se utilizaron unos 15-20 ovarios en
25 cada sesión experimental y se llevaron a cabo unas 40 sesiones para la puesta a punto del método.

1.3. Preparación de medios:

1.3.1.- Preparación del medio de digestión enzimática: se pesaron: 0,08 g
30 de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma, ref. A9418), 0,12 g de collagenasa tipo IA (Sigma, ref. C2674). Se añadieron 20 ml de solución Hanks con Ca²⁺ y Mg²⁺ (Sigma, ref. H9269), previamente atemperada a 37°C, 2000 UI de DNAsa (Sigma, ref. D4513). La mezcla se esterilizó por paso a través de filtro de 0,22 µm de poro (Millex GP, ref. SLGP033RS, Millipore) y se añadieron 200 µl de
35 antibiótico y antimicótico.

1.3.2.- Preparación del medio de resuspensión: se pesaron 0,04 g de BSA y se añadieron 10 ml de solución Hanks sin Ca²⁺ ni Mg²⁺, previamente

atemperada a 37°C, y 1000 UI de DNAsa; la mezcla se esterilizó por filtración y se añadieron 100 µl de antibiótico y antimicótico.

5 **1.3.3.- Preparación del medio completo y medio control:** se pesaron 0,20g de BSA y se añadieron 50 ml de medio M199 con 25mMHepes (Sigma ref. M7528), previamente atemperado a 37°C, 500 µl de ITS (Insulina, transferrina y selenio, Sigma, ref.I3146-5ML), 100 µl de Synthecol (colesterol, Sigma ref. S5442) y FSH (hormona folículo estimulante) ovina (0 o 50 ng/ml, en grupos control (M2) y en grupos tratados con FSH (M3), respectivamente; National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases, Ref. NIDDK-oFSH-18
10 AFP5862D). La mezcla se esterilizó por filtración y se añadieron 500 µl de antibiótico y antimicótico. Este medio de cultivo se utilizó en los cultivos de un mes de duración, que sirvieron para establecer el método y realizar la caracterización molecular, estructural y ultraestructural de los esferoides. Se mantuvieron los dos grupos de tratamiento (control y FSH) a lo largo de tres
15 semanas de cultivo, en todas las repeticiones experimentales.

1.3.4.- Preparación del medio control positivo: su composición es idéntica a la del medio completo control (sin FSH), suplementado con EGF (20 ng/ml; Sigma Ref.E9644) y FGF-2 (20 ng/ml; Sigma Ref. F0291). Este medio de cultivo (M1) se utilizó en el grupo control positivo de inducción neural, en los
20 experimentos realizados para contrastar comparativamente la eficiencia del método de cultivo que se presenta, en los que el periodo de cultivo fue de una semana.

1.4.- Digestión enzimática de fragmentos de córtex: en la cabina de flujo
25 laminar, se transfirieron los fragmentos de córtex, obtenidos según se describe en el ejemplo 1.2., a un vial con medio de digestión enzimática. La mezcla se mantuvo en agitación suave y permanente a 37°C durante 30 minutos; se centrifugó (500 g, 10 min, a temperatura de laboratorio); se eliminó el sobrenadante y se añadieron 10 ml de medio de resuspensión.

30 **1.5.- Resuspensión y disgregación mecánica de fragmentos:** en la cabina de flujo laminar y con pipetas Pasteur de diámetro de punta decreciente, se sometió la suspensión a aspiración repetida, con el fin de conseguir la disrupción mecánica de los fragmentos no disgregados por el enzima; se
35 centrifugó (500 g, 12 min, a temperatura de laboratorio); se eliminó el medio sobrenadante, y el *pellet* se resuspendió con medio completo.

1.6.- Preparación de la suspensión celular mediante filtración: para eliminar de la suspensión celular los folículos ováricos preantrales en desarrollo y los oocitos, ésta se sometió a un proceso de filtración sucesiva a través de malla de 100 µm, 70 µm y, finalmente, 40 µm de trama (Cell Strainer, Beckton Dickinson, BD Falcon).

1.7.- Análisis de la viabilidad celular: se retiró una alícuota de la suspensión (20 µl), se añadió el mismo volumen de solución azul tripán (Sigma, ref. T8154) y se realizó un recuento de células viables y no viables al microscopio óptico, en la cámara de Neubauer. Los porcentajes de viabilidad media estuvieron comprendidos entre el 70 y el 90%.

1.8.- Cultivo de células corticales ováricas.

1.8.1.- Preparación de las placas de cultivo: las placas de 24 pocillos (Nunclon Delta, ref. 142475) se tapizaron con una solución de fibronectina (Sigma, ref. F4759; 10 µg/ml en medio M199), y se mantuvieron en la estufa a 37°C, 5% CO₂ y humedad a saturación, durante 24 horas previas al cultivo.

1.8.2.- Cultivo celular: se retiró la solución de fibronectina, se dispensó un volumen de suspensión celular que contenía 500.000 células vivas, en cada pocillo y se añadió medio de cultivo completo atemperado, hasta un volumen final de 500 µl.

- En los experimentos que permitieron establecer el método de cultivo y realizar la caracterización molecular, estructural y ultraestructural de los esferoides, las células se cultivaron durante 3 semanas a 37°C, con 5% de CO₂ y humedad a saturación.
- Una vez establecido el método de cultivo, en los experimentos cuyo objetivo fue definir el curso temporal del proceso de especificación y expansión, para obtener CTN/CPN, las células se cultivaron durante 6 días a 37°C, con 5% de CO₂ y humedad a saturación.
- El medio de cultivo se reemplazó por medio renovado de igual composición, cada 48 horas y se almacenó a -20° C en viales individuales identificados, para la realización posterior de análisis de hormonas y de factores reguladores locales.

2.- PRUEBAS DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO Y RESULTADOS

2.1.-El tejido cortical ovárico contiene células pluripotentes, antigénicamente similares a las células troncales embrionarias. Se realizó el análisis de la población celular de la suspensión de partida, mediante citometría de flujo, utilizando anticuerpos para TRA-1-60 y SSEA4, (Milli-Mark™, Merck-Millipore, Anti-SSEA-4, Clone MC-813-70 PE conjugate, ref. FCMA116P y Anti-TRA-1-60, clone TRA-1-60 FITC conjugate, ref. FCMA115F), que reconocen específicamente glicoproteínas de membrana de células troncales embrionarias de la especie humana. La suspensión celular se preparó como se describe en los ejemplos 1.4-1.6. Se dispensaron 500.000 células vivas en cada uno de 4 viales eppendorf, se lavaron con 500 µl de solución tampón fosfato (PBS) atemperado y se resuspendieron en medio de incubación (PBS, 2mM EDTA, Sigma ref. E-6758), 1% de BSA, sin anticuerpos (control negativo) o con anticuerpos (5 µl de cada anticuerpo de forma individual y combinada), hasta un volumen final de 50 µl, manteniendo la incubación durante 30 minutos a 2-8°C, protegida de la luz. Seguidamente, se añadieron 500 µl de PBS a 2-8°C a cada vial, se centrifugaron las muestras a 500 g durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió cada *pellet* con solución de paraformaldehído (Sigma, ref. P6148) al 0,5% en PBS. Las muestras se mantuvieron protegidas de la luz, a 2-8°C, hasta el análisis por citometría de flujo, 24 horas después, en muestras de la población celular comprendida entre 25.000 y 50.000 células.

Resultados: El 14,99% de las células presentó inmunorreactividad a TRA-1-60 y entre el 1,50% y el 4% a SSEA4 (Figura 1). La práctica totalidad de las células que expresaron este último marcador, colocalizaron TRA-1-60. Un 12,96% de las células localizaron TRA-1-60 exclusivamente. Ello indica que aproximadamente el 15 % de las células del tejido cortical ovárico son células troncales adultas, similares antigénicamente a células troncales embrionarias.

2.2.- Con este método de cultivo, las células del tejido cortical ovárico forman esferoides similares a cuerpos embrioides. Durante las 3 semanas de cultivo, en cada una de las réplicas experimentales, se llevaron a cabo dos puntos semanales de evaluación de la dinámica de organización celular en el cultivo, y la valoración morfométrica del desarrollo de los esferoides generados *in vitro*, en los que se determinó el diámetro de un número aproximado a 200 y su evolución durante el periodo de cultivo. Las mediciones se realizaron sobre imágenes fotográficas de los cultivos bajo un microscopio invertido (Nikon

Eclipse T/ S) provisto de cámara digital (Nikon DS-Fi1) y *software* para análisis de imagen (NIS-D-Elements, Nikon). Se evaluó la influencia de la adición de FSH al medio de cultivo completo sobre el desarrollo de los esferoides *in vitro*. Se consignaron los hallazgos relacionados con procesos de proliferación,
5 migración y diferenciación celular hacia tipos celulares especializados.

Resultados: desde el inicio del periodo de cultivo, en particular desde el día 3, se observó que una proporción significativa de células iniciaba la formación de agregados que experimentaron un incremento progresivo en sus diámetros,
10 hasta formar esferoides compactos al final de la primera semana de cultivo (Figura 2). Se contabilizaron, en promedio, entre 65 y 75 esferoides en cada pocillo de cultivo. Como hallazgos notables, se registraron: la presencia de frecuentes mitosis durante todo el periodo de cultivo (Figura 3D, E), la aparición de patrones de migración ordenada de células de gran diámetro con un elevado
15 ratio núcleo-citoplasma desde los esferoides al soporte de cultivo circundante (Figura 3A-C), desde el final de la primera semana, y la presencia de abundantes células con morfología neural diferenciada (Figura 4), durante la segunda semana de cultivo. Los esferoides alcanzaron el máximo desarrollo en la segunda semana, con diámetros comprendidos entre 120 y 200 μm , que
20 experimentaron una disminución ($p < 0.01$) desde el final de la segunda semana en adelante (Figura 5).

La adición de hormona FSH al medio de cultivo completo, causó incrementos significativos en los diámetros de los esferoides ($p < 0.01$), en la segunda y
25 tercera semana de cultivo, respecto a los cultivos no expuestos a la hormona, como muestra la gráfica correspondiente (Figura 5).

2.3.- Los esferoides presentan una actividad fosfatasa alcalina intensa y consistente a lo largo del cultivo. La detección de la actividad fosfatasa
30 alcalina se utiliza como análisis cualitativo inicial en la caracterización de células pluripotentes.

Cada semana, comenzando desde el día 5 de cultivo, se realizó el análisis de la actividad fosfatasa alcalina en un número representativo de pocillos. Se
35 utilizó un kit comercial (Alkaline Phosphatase Detection Kit, Millipore ref. SCR004, Merck-Millipore) según las indicaciones del fabricante.

Resultados: se detectó una actividad fosfatasa alcalina intensa en la totalidad de los esferoides durante el periodo de cultivo, que resultó ser máxima en las dos primeras semanas del mismo. En la tercera semana, en los esferoides de mayor diámetro, esta actividad se restringió a las células periféricas.

5

2.4.-La caracterización molecular de los esferoides a lo largo del cultivo demuestra la expresión predominante de transcritos de pluripotencialidad y del linaje neuroepitelial.

10 **2.4.1.- Expresión de genes específicos de pluripotencialidad.**

Se analizó la expresión de los factores de transcripción OCT4, Nanog y SOX2, por RT-PCR cuantitativa, en la suspensión celular preparada antes del cultivo (día 0) y en tres puntos temporales de muestreo durante las tres semanas de cultivo (días 10, 15 y 21), en extractos de ARN total obtenidos a partir de lisados de 300 esferoides por tratamiento y punto de muestreo en cada experimento, con tampón de lisis (Solución tampón de lisis celular; Ambion, ref.8540G2), en hielo. El ARN se extrajo en columnas de purificación (Kit RNeasymini kit, Quiagen, ref. 74104) y después del tratamiento con DNAsa (Turbo DNA Free Kit, Ambion ref. AM1907) se sometió a análisis por RT-PCR cuantitativa, en la Unidad de Genómica Antonia Martín Gallardo del Parque Científico de Madrid en el Campus de Cantoblanco, según procedimientos habituales. El diseño de los cebadores utilizados en el análisis se basó en las secuencias de los ARN mensajeros correspondientes a OCT4, Nanog, y SOX2 en la especie ovina, publicadas por el NCBI (National Center of Biotechnology Information), cuyos números de acceso aparecen detallados en la tabla 1.

Los niveles de expresión de cada transcrito, determinados en la suspensión celular antes del cultivo (D0), fueron adoptados como valores de referencia para la cuantificación relativa de cada uno de ellos a lo largo del tiempo en cultivo, en cada grupo (C vs FSH).

Resultados: Como se muestra en la Figura 6, la expresión de los transcritos asociados a pluripotencialidad, OCT4, Nanog y SOX2, se mantuvo en los esferoides a lo largo de las tres semanas de cultivo, con variaciones temporales. El resultado más destacable de estos experimentos fue el incremento en la expresión de SOX2 registrado el día 10 de cultivo, respecto a los niveles de expresión de este transcrito en la suspensión celular de partida

(Figura 6A). La transcripción de SOX2 se mantuvo por encima de los niveles basales (D0) a lo largo del cultivo, siendo superiores en el grupo tratado con FSH (FSH) a los 21 días (D21), respecto al grupo control (C). Frente al incremento en los niveles de transcripción de SOX2, OCT4 (Figura 6B) y Nanog (Figura 6C) experimentaron, de forma simultánea, una disminución en la expresión respecto a sus valores de referencia (D0) que, en el caso de OCT4 (Figura 6B), remontaron hasta superar los mismos el día 21 en cultivo (D21), en presencia de FSH (Figura 6B).

10 Cuando las células son pluripotentes, tanto en troncales adultas como embrionarias, la expresión equilibrada de estos tres transcritos (OCT4, NANOG y SOX2) mantiene a la célula en un estatus indiferenciado y con capacidad de autorrenovación permanente. En el primer paso de elección del destino celular, la especificación produce el predominio en la expresión de uno de los tres
15 transcritos. El predominio en la expresión de SOX2, sobre la de OCT4 y NANOG, dirige la especificación celular hacia el linaje neuroepitelial, es decir: la célula inicia el proceso de derivación hacia ese destino. El primer tipo celular que surge así es la célula troncal neural, con elevada expresión de SOX2, además de nestina, vimentina y otros. La célula troncal neural es particular
20 porque es aún multipotente y, si está expuesta a la acción de determinados factores, puede diferenciarse a células de diversos tejidos. Cuando la célula troncal neural avanza en su proceso de diferenciación, la expresión de SOX2 disminuye.

25 **2.4.2.- Expresión de transcritos característicos de especificación y diferenciación neural.**

Se analizó la expresión de nestina, vimentina, PAX6 y p75 como transcritos marcadores de especificación neural y de DCX, GFAP y Olig4, como transcritos asociados a diferenciación neural (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos,
30 respectivamente). Se siguió el procedimiento descrito en el apartado 2.4.1. Las secuencias de los cebadores utilizados se detallan en la tabla 1.

Los niveles de expresión de cada transcrito, determinados en la suspensión celular antes del cultivo (D0), fueron adoptados como valores de referencia
35 para la cuantificación relativa de cada uno de ellos a lo largo del tiempo en cultivo en cada grupo (C vs FSH), como en 2.4.1.

Resultados: La transcripción de nestina, vimentina, el receptor de neurotrofinas p75 y PAX6, marcadores característicos de CTN/CPN, fue predominante en todos los puntos temporales de análisis a lo largo del cultivo. La expresión de los cuatro marcadores aumentó ($p < 0.01$) respecto a los niveles de transcripción de los mismos en la suspensión celular de partida (Figura 7 A-D). En el caso de nestina (figura 7A), vimentina (figura 7B) y de receptor de neurotrofinas p75 (figura 7D), el incremento en el nivel de expresión respecto a los niveles de referencia (D0) se constató en el muestreo del día 10 (D10) de cultivo, y en el caso de PAX6 (figura 7C), su transcripción experimentó incrementos sostenidos en el tiempo, cuantificados desde el día 10 en adelante (D10-D15-D21), siendo significativamente superiores en presencia de FSH que en su ausencia (C). La expresión de p75 (Figura 7 D) disminuyó a partir del día 10 de cultivo, siendo esta disminución significativa el día 15 en presencia de FSH (FSH) y el día 21 en medio completo sin FSH (C).

También fue predominante la expresión de los transcritos asociados a diferenciación neural (Figura 8), doblecortina (DCX; figura 8A), proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP; figura 8B) y factor de transcripción de oligodendrocitos 4 (Olig4; figura 8C). El análisis de expresión relativa de los tres marcadores en cada punto temporal demostró el predominio de expresión de GFAP y DCX sobre la transcripción de Olig4 (GFAP>DCX>Olig4). Resultó destacable el incremento en la expresión de DCX y GFAP en los esferoides, en el intervalo comprendido desde el inicio del cultivo (D0) al día 10 (D10), con disminución posterior (D15, D21) hasta los valores de referencia (D0), tanto en presencia (FSH) como en ausencia de FSH (C). En relación con las variaciones de expresión de Olig4, la adición de FSH al medio de cultivo completo causó incrementos significativos en su transcripción ($p < 0.01$), en los días 10 y 15 del cultivo.

Los niveles de expresión de cada transcrito, determinados en la suspensión celular antes del cultivo (D0), fueron adoptados como valores de referencia para la cuantificación relativa de cada uno de ellos a lo largo del tiempo en cultivo en cada grupo (C vs FSH).

2.4.3.- Expresión relativa de transcritos de los tres estratos germinativos (ectodermo, endodermo y mesodermo), de pluripotencialidad y de especificación e inducción neural.

Se realizó un análisis de cuantificación relativa de transcritos característicos de ectodermo (nestina), endodermo (alfa-fetoproteína) y mesodermo (Brachyury). Se siguió el procedimiento descrito en el apartado 2.4.1. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se detallan en la tabla 1.

5

Resultados: La expresión de transcritos de pluripotencialidad, OCT4, SOX2 y Nanog, se mantuvo a lo largo del cultivo, pero a un nivel significativamente inferior ($p < 0.01$) respecto a la expresión de nestina, p75, vimentina, DCX, GFAP y Olig4, en las dos primeras semanas, y respecto a PAX6 en la segunda y tercera semana. La expresión de transcritos de pluripotencialidad se mantuvo en niveles similares o incluso algo superiores a la expresión de los genes característicos de especificación de endodermo (AFP) y mesodermo (Brachyury). La expresión de Brachyury, disminuyó en la primera semana de cultivo respecto a los niveles de partida ($p < 0.01$) y se mantuvo con niveles en el límite de detección de la técnica en la segunda y tercera semana. La expresión de AFP, residual al igual que la de Brachyury, experimentó un incremento en la primera y segunda semana de cultivo, respecto a los valores cuantificados en la suspensión celular de partida. La expresión predominante fue por tanto la de transcritos de especificación y diferenciación neural.

20

Tabla 1. Relación de transcritos y oligonucleótidos utilizados en los análisis.

Transcrito	Número de acceso	Oligonucleótidos	SEQ ID NO:
OCT4	XM_004018968.3	F CAAATCAGCCACATCGCC	1
		R AGAACCACACTCGGACCA	2
Nanog	FJ970651.1 Exon 2-3	F GCACAGAGAAGGAAGAGAAGG	3
		R GCTGGAGACTGAGGTATTTCTG	4
SOX2	X96997.1	F GGAGGACAGCAAGAAACAG	5
		R GCGTGAGTGTAGATGGGA	6
Nestina	XM_004002626.1	F CTCCAGAACTACTAAAGCCTACAG	7
		R CCAGCGACTCTTGACTTTCC	8
Vimentina	XM_004014247.1	F GTTTCCAAGCCTGACCTCAC	9
		R GACTTGTACCATTCTCAGCC	10
P75	XM_004013355.1	F CTCATCCCTGTCTATTGCTCCA	11
		R TTCCACCTCTTGAAGGCGA	12
Pax6	XM_004016373.1	F AACATCCTTTACCCAAGAGCA	13

		R TTTCTCGGGCAAACACATCTG	14
Alfa-fetoproteína	XM_004009903.1	F ATGAATACTCAAGAAGACACCCAG	15
		R CGAACCACTCTTTGAAATATCCC	16
Brachyury	XM_004011450.1	F AACGCCATGTACTCCTTCCT	17
		R CCCGTTACGTACTTCCAG	18
Doblecortina	XM_004022416.1	F- CGAGAAGAAAGCCAAGAAGGT	19
		R- CAGAGGACACAGCGTACAC	20
GFAP	XM_004012992.1	F- GAAGCAGATGAAGCCACCC	21
		R- CTCAATCTTCCTCTCCAGATCCA	22
Olig4	XM_004022161.1	F- GCCCATATCCACTCTTTACCC	23
		R- TTCTCAGTACCCAGGTTAGCA	24

2.5.- Las células que integran los esferoides expresan mayoritariamente marcadores de CTN/CPN: experimentos de inmunolocalización.

En muestreos representativos de esferoides obtenidos en los días 10, 15 y 21 de cultivo, se llevó a cabo la inmunolocalización de nestina, vimentina, PAX6 y del receptor de neurotrofinas p75. Este análisis se efectuó sobre cortes seriados de los esferoides incluidos en parafina en grupos (30-40 esferoides por grupo de tratamiento y tiempo en cada bloque), utilizando anticuerpos primarios y reactivos comerciales de inmunohistoquímica (Novolink Polymer Detection System, Novocastra ref. RE7150-K), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La incubación con anticuerpos primarios se llevó a cabo en cámara húmeda, en las siguientes condiciones: el anticuerpo anti-PAX6 (ref. HPA030775, Sigma-Aldrich, Inc, Saint Louise, USA) se utilizó a una dilución 1:400, en incubación durante la noche a 2-8°C; el anticuerpo anti-p75 (NGFR p75; ref. N3908, Sigma Aldrich, Inc, Saint Louise, USA) se utilizó a una dilución 1:1500, en incubación durante la noche a 2-8°C; el anticuerpo anti-vimentina (clone V9 Dako Glostrup, Denmark) se utilizó a una dilución 1:500, con incubación durante 1 hora a temperatura de laboratorio; el anticuerpo anti-nestina (ref. N5413 Sigma Aldrich, Inc, Saint Louise, USA) se utilizó a una dilución 1:200 con incubación de 1 hora a temperatura de laboratorio. La inmunolocalización se reveló con diaminobencidina y los cortes se sometieron a contraste con hematoxilina. Después del montaje, se procedió al análisis de imagen y recuento de células positivas y negativas para cada marcador.

Resultados: Los porcentajes de células con inmunolocalización de los marcadores de CTN/CPN, nestina, vimentina, p75 y PAX6, durante las tres semanas de cultivo, se detallan en la tabla 2. Ni el tiempo en cultivo, ni la adición de FSH al medio influyeron en los porcentajes de células con inmunolocalización de nestina y vimentina. La adición de FSH al medio, redujo el porcentaje de células con inmunolocalización de PAX6 sólo el día 10 de cultivo, e incrementó progresivamente los porcentajes de inmunolocalización de este marcador, que resultaron significativos el día 21 de cultivo, respecto al día 10. La adición de FSH al medio, redujo los porcentajes de células con inmunolocalización de p75 en los días 10 y 15 ($p < 0.05$), sin afectar a los mismos a lo largo del tiempo en cultivo. En la figura 9, se presentan imágenes representativas de los experimentos de inmunolocalización de nestina (figura 9A), vimentina (figura 9B), PAX6 (figura 9C) y p75 (figura 9D).

Tabla 2. Resultados de la inmunolocalización de los marcadores asociados al linaje neuroepitelial, nestina, vimentina, p75 y PAX6.

<i>Cultivo</i>		<i>Nestina</i>	<i>Vimentina</i>	<i>PAX6</i>	<i>p75</i>
<i>días</i>	<i>medio</i>				
10	C	43,51±5,5	80,91±1,3	88,26±1,6	86,30±2,3 ^a
	FSH	25,46±6,6	79,63±5,1	78,00±3,8 ¹	74,47±2,5 ^b
15	C	44,75±5,8	73,82±3,4	93,54±0,7	78,90±4,8 ^a
	FSH	29,94±5,8	84,58±10,8	85,95±2,0 ¹	61,35±8,9 ^b
21	C	49,98±5,3	95,8±3,6	88,72±1,79	76,74±11,0
	FSH	44,36±8,9	86,0±4,0	94,27±0,30 ²	70,68±9,8

Los números distintos indican diferencias significativas ($p < 0.05$; ANOVA) entre los diferentes puntos temporales para cada antígeno, en cada grupo (C vs FSH). Las letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$; ANOVA) en la inmunolocalización de cada marcador, asociadas a la adición de FSH al medio de cultivo completo (C vs FSH), dentro de cada punto temporal de análisis.

2.6.- El proceso de especificación tiene lugar desde el día 6 de cultivo, cuando las células colocalizan de forma mayoritaria cuatro marcadores característicos de CTN/CPN y se mantienen en estado proliferativo.

Se realizó un análisis de caracterización celular por citometría de flujo durante
5 los primeros seis días de cultivo, con el objetivo de estudiar la evolución temporal en la expresión e inmunolocalización de marcadores característicos de células troncales neurales y progenitores neurales y un marcador de proliferación celular. Se incluyó un grupo experimental expuesto al medio M1, descrito en el ejemplo 1.3.3., como medio control positivo. Para ello, las células
10 se cultivaron según el procedimiento que se indica en el apartado 1.8. En estos experimentos, se utilizaron medios y soluciones sin rojo fenol con el fin de evitar fenómenos de autofluorescencia en las preparaciones celulares, por lo que se utilizaron productos equivalentes, exentos de este indicador de pH. Para los marcajes celulares previos a la citometría de flujo, se utilizaron los anticuerpos
15 primarios anti-SOX2 (ref. S9072, Sigma Aldrich, Inc, Saint Louise, USA), nestina (ref. N5413 Sigma Aldrich, Inc, Saint Louise, USA), p75 (ref.N3908, Sigma Aldrich, Inc, Saint Louise, USA), PAX6 (ref. HPA030775, Sigma-Aldrich, Inc, Saint Louise, USA) y Ki67 (ref. PA0118, Leica Biosystems, Nussloch, Germany), marcados con los fluorocromos PERCP (Abcam Per CP
20 Conjugation Kit ref. ab102907; Abcam, Cambridge, UK), Alexa488 (Apex Antibody Labeling Kits, ref. A10468; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts USA), PE (Zenon Rabbit IgG Labelling Kits, ref. Z25355, Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) y Alexa 647 (Zenon Rabbit IgG Labelling Kits, ref. Z25308, Invitrogen Thermo Fisher Scientific,
25 Massachusetts, USA), con el fin de revelar la colocalización de los antígenos correspondientes y su evolución temporal en cultivo. Los análisis se realizaron los días 0, 3 y 6 en cultivo. El día 0, después de preparar la suspensión celular previa al cultivo, las células se sometieron a fijación en solución de paraformaldehído al 2% en PBS a pH 7.4, durante 15 minutos a 2-8°C, seguido
30 de permeabilización con PBS pH7.4 con Triton X100 (1/1000) durante 5 minutos a 2-8°C y posterior bloqueo en PBS con 5% de BSA durante 5 minutos a 2-8°C. En los días 3 y 6, los cultivos se trataron con solución de Accutasa (Stem Pro Accutase Gibco Invitrogen. Ref. A11105-01), siguiendo las recomendaciones del fabricante. En todos los casos, las suspensiones
35 celulares resultantes se distribuyeron en viales eppendorf (200.000 a 500.000 células por vial) y se incubaron durante 60 minutos a 2-8°C en oscuridad, con los anticuerpos previamente marcados con fluorocromos, en simple y

combinados. Seguidamente, se lavaron mediante adición de PBS refrigerado y se resuspendieron en solución de paraformaldehído al 0,5 % en PBS a pH 7,4, hasta el análisis por citometría de flujo que se efectuó 24 horas más tarde en el Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

Resultados: Los resultados mostraron que en la suspensión celular previa al cultivo hay un 8,32% de células con fenotipo Nestina+/SOX2+/Pax6+/Ki67+, característico de CTN/CPN. En el grupo control positivo (M1), el día 3, el porcentaje fue del 45%, frente a un 4,45% en M2 y un 1,21% en el M3. El día 6 de cultivo, esos porcentajes fueron del 98,45% en el grupo M1, 83,16% en el M2 y 88,77% en el grupo M3. Los resultados demuestran que, en el día 6 de cultivo, se alcanza la inducción neural de forma mayoritaria en los tres grupos de tratamiento. Los esferoides de los grupos M2 y M3 están integrados por células que expresan mayoritariamente fenotipo antigénico correspondiente a CTN/CPN. Parte de los resultados más representativos se presentan en la figura 10.

Frente a un porcentaje aproximado al 10% de células con inmunorreactividad para SOX2 antes del cultivo, de las cuales más del 99% colocalizaban nestina y Ki67 (A), el día 6 de cultivo, SOX2 se localizó en el 98% (M1, B), 92,3% (M2, C) y 94% (M3, D) de las células que, además, mostraron colocalización mayoritaria con nestina (NEST), PAX6 (PAX) y p75 (P75), marcadores característicos de CTN/CPN.

2.7.- La caracterización de los esferoides por análisis ultraestructural corrobora que se trata de neuroesferas.

El análisis ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión se llevó a cabo en esferoides muestreados durante la segunda semana de cultivo. Los esferoides se sometieron a fijación en solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,5%, en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado con PBS, los esferoides se transfirieron a una solución de tetróxido de osmio al 1% en PBS, durante 1 hora, se deshidrataron mediante inmersión en concentraciones crecientes de etanol-acetona y fueron finalmente incluidos en resina Epon 812. Se prepararon cortes semifinos (0,5 µm de espesor) y ultrafinos (50-70 nm de espesor) con un ultramicrotomo (Leica-Reichert *Ultracut E*), que se tiñeron respectivamente con azul de metileno y con

citrato uranil acetato de plomo. Los cortes se examinaron al microscopio electrónico de transmisión (Jeol Jem 1010), en el Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid.

- 5 **Resultados:** El análisis ultraestructural de los esferoides (Figuras 11 y 12), permitió destacar numerosas similitudes entre éstos y las neuroesferas, esferoides integrados por CTN/CPN, descritos por otros autores (Gil-Perotín y cols., 2013). La observación de cortes semifinos (figura 11A-B), permitió distinguir dos áreas de distribución celular en la estructura del esferoide: la
- 10 región central o "core" y el área periférica, integrada por células dispuestas a modo de epitelio, entre las que destacan algunas células de gran tamaño que protruyen y salen del esferoide (figura 11C). Entre las semejanzas de los esferoides de la invención con las neuroesferas, destacan las siguientes: se distinguen dos tipos celulares principales, según su densidad electrónica, las
- 15 células claras (figura 11D) y oscuras (figura 11E), distribuidas en la esfera de manera organizada. Ambos tipos de células disponen de gran abundancia de ribosomas libres, patrones de cromatina dispersa y nucléolos con configuración reticulada, lo que indica que las células son muy activas desde el punto de vista de la síntesis de proteínas (figura 11F, G). Las células situadas en la periferia
- 20 de la esfera son mayoritariamente claras y se encuentran organizadas en uno o varios estratos. En la zona central de la esfera, predominan las células oscuras, que muestran una organización espacial más desordenada. Destaca, en las células claras, la presencia abundante de haces de filamentos (figura 12A), que raramente se observa en las células oscuras, y la abundancia de
- 25 lisosomas y fagosomas (figura 12B). En los esferoides de la presente invención, así como en las neuroesferas caracterizadas por los autores referidos anteriormente, las células claras de la periferia disponen de abundantes uniones intercelulares de tipo adherente, que juegan un papel importante en los procesos de agregación celular y migración que caracterizan
- 30 a la formación y desarrollo de las neuroesferas (figura 12C, E). El análisis de imagen de las células claras de la periferia de los esferoides de la presente invención reveló un metabolismo celular intenso, dadas las características de su citoplasma y la abundancia de organelas, asociado al intercambio activo de nutrientes y, posiblemente, de factores reguladores. En el estrato o estratos
- 35 celulares de la periferia, se distinguen también numerosas interdigitaciones como tipo de unión intercelular (figura 12C, E). Además, destaca la elevada incidencia de actividad migratoria de las células claras más superficiales, que

- primero aparecen aplanadas y progresivamente protruyen, hasta desligarse del esferoide y migrar (figura 11C). Las células de los esferoides son morfológicamente heterogéneas, frecuentemente con núcleos oscuros, y con una elevada incidencia de fenómenos de fagocitosis, apoptosis y necrosis
- 5 celular, que predominan en la masa celular central del esferoide (figura 12F), mientras que la periferia se encuentra integrada por células más activas con una actividad biosintética intensa y uniones intercelulares como las descritas en este ejemplo.
- 10 Con los resultados obtenidos en los ejemplos aquí expuestos, podemos concluir que los esferoides de la invención son neuroesferas.

REIVINDICACIONES

1. Método para obtener células troncales neurales y células progenitoras neurales (CTN/CPN) a partir de muestras de tejido cortical ovárico posnatal/prepúber que incluye los siguientes pasos:
 - a) fragmentar una muestra de tejido cortical ovárico posnatal/prepúber hasta obtener fragmentos de dimensiones iguales o menores a 1,0 x 1,0 mm;
 - b) digerir enzimáticamente los fragmentos de tejido cortical ovárico del paso a);
 - c) disgregar mecánicamente los fragmentos digeridos del paso b);
 - d) eliminar los folículos ováricos preantrales y los oocitos de los fragmentos disgregados del paso c), por filtración;
 - e) incubar las células obtenidas mediante los pasos a) – d) durante 6-21 días en placas tapizadas con fibronectina y en medio de cultivo completo, que incluye medio esencial o de mantenimiento libre de suero, suplementado con albúmina sérica bovina, insulina, transferrina, selenio y colesterol, donde no se incluyen factores de inducción y/o expansión del linaje neural.
2. Método según reivindicación 1 en el que el medio de cultivo del paso e) incluye hormona foliculo-estimulante (FSH).
3. Método según reivindicación 2 en el que la concentración de FSH es de 50ng/ml de medio de cultivo.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el medio de cultivo del paso e) incluye tampón HEPES, antibióticos y/o antimicóticos.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la incubación del paso e) se mantiene durante 6 días.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las muestras de tejido cortical ovárico proceden de un mamífero.
7. Método según la reivindicación 6 en el que el mamífero es de la especie ovina.

8. Método según la reivindicación 6 en el que el mamífero es de la especie humana.

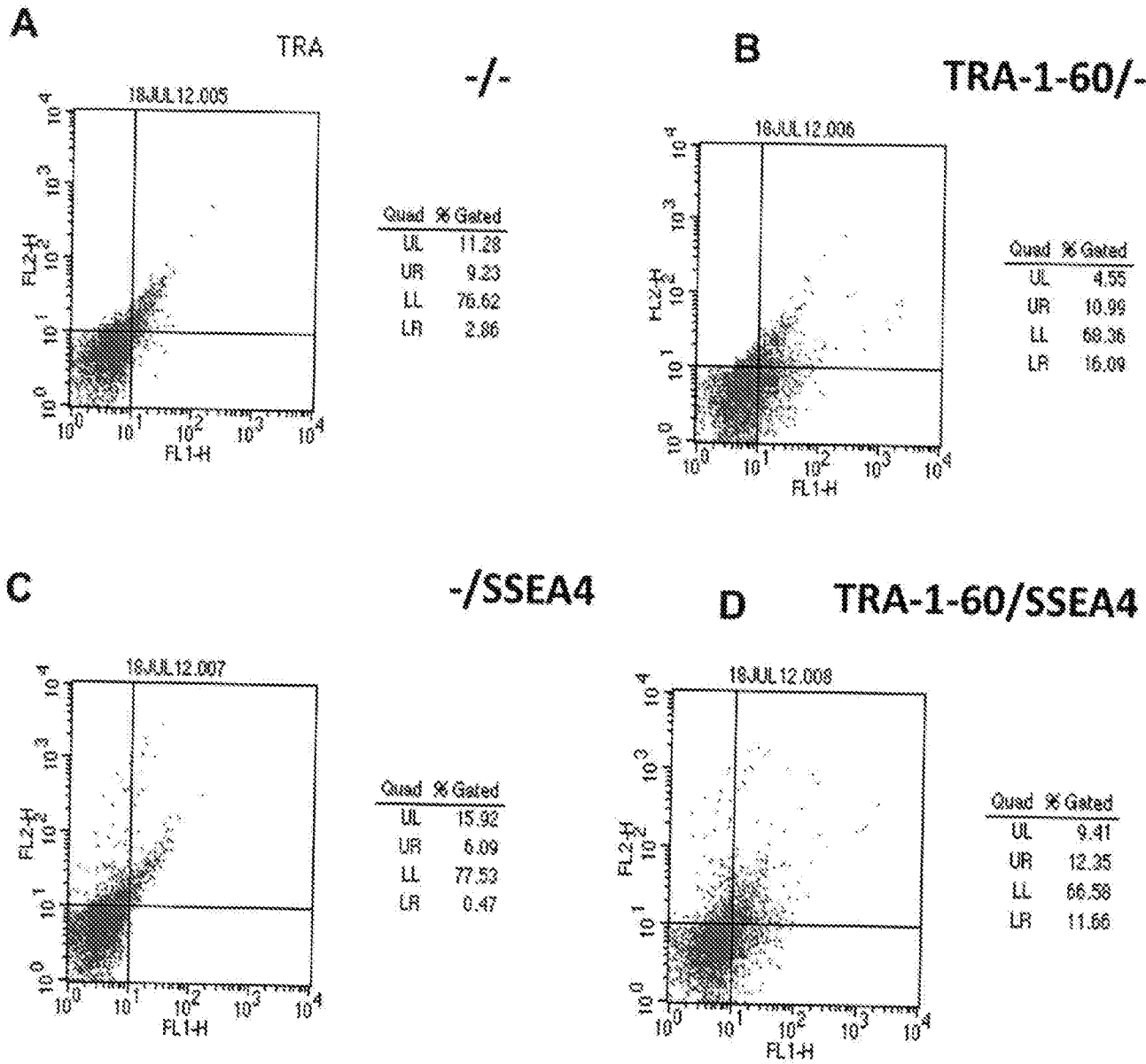


Figura 1

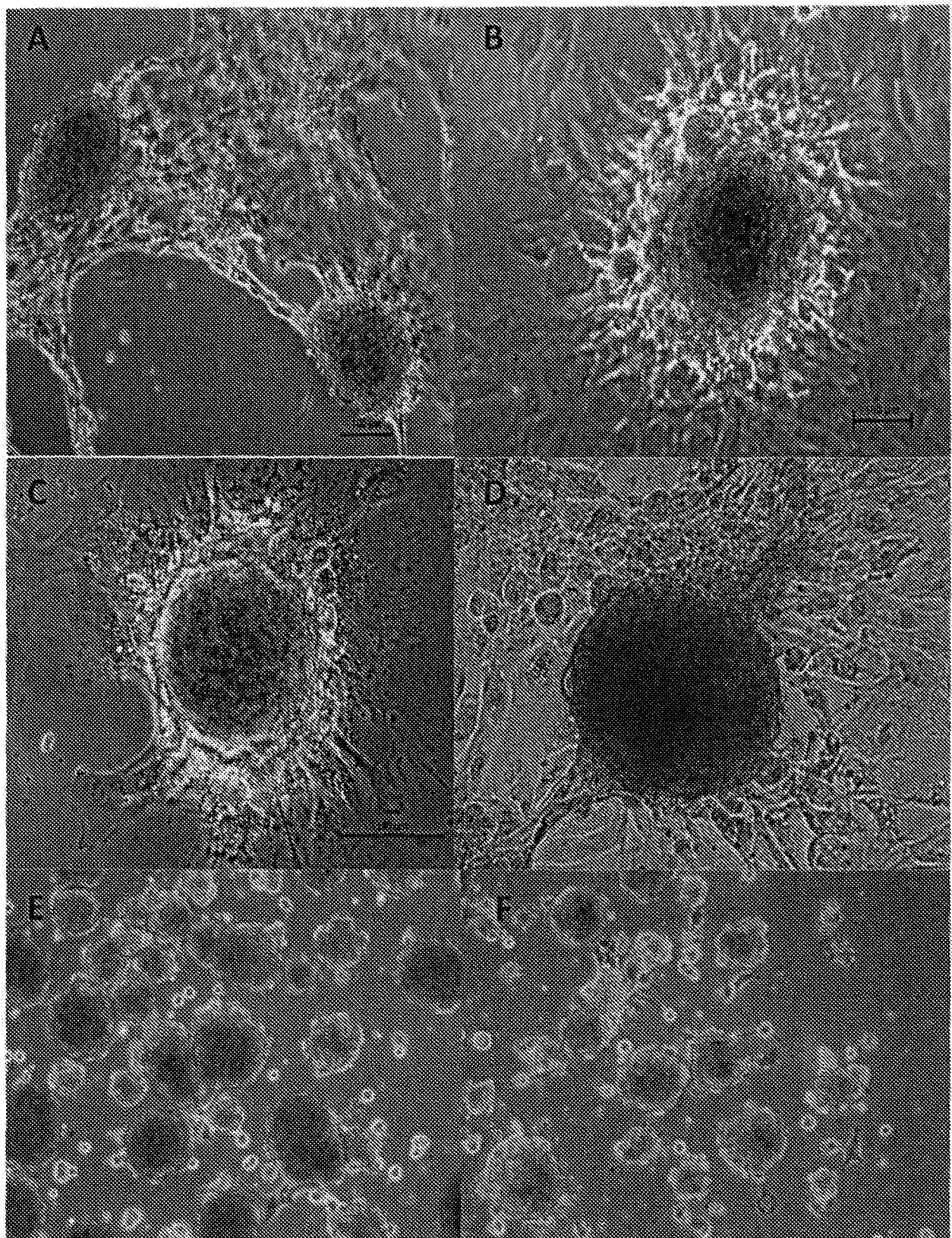


Figura 2

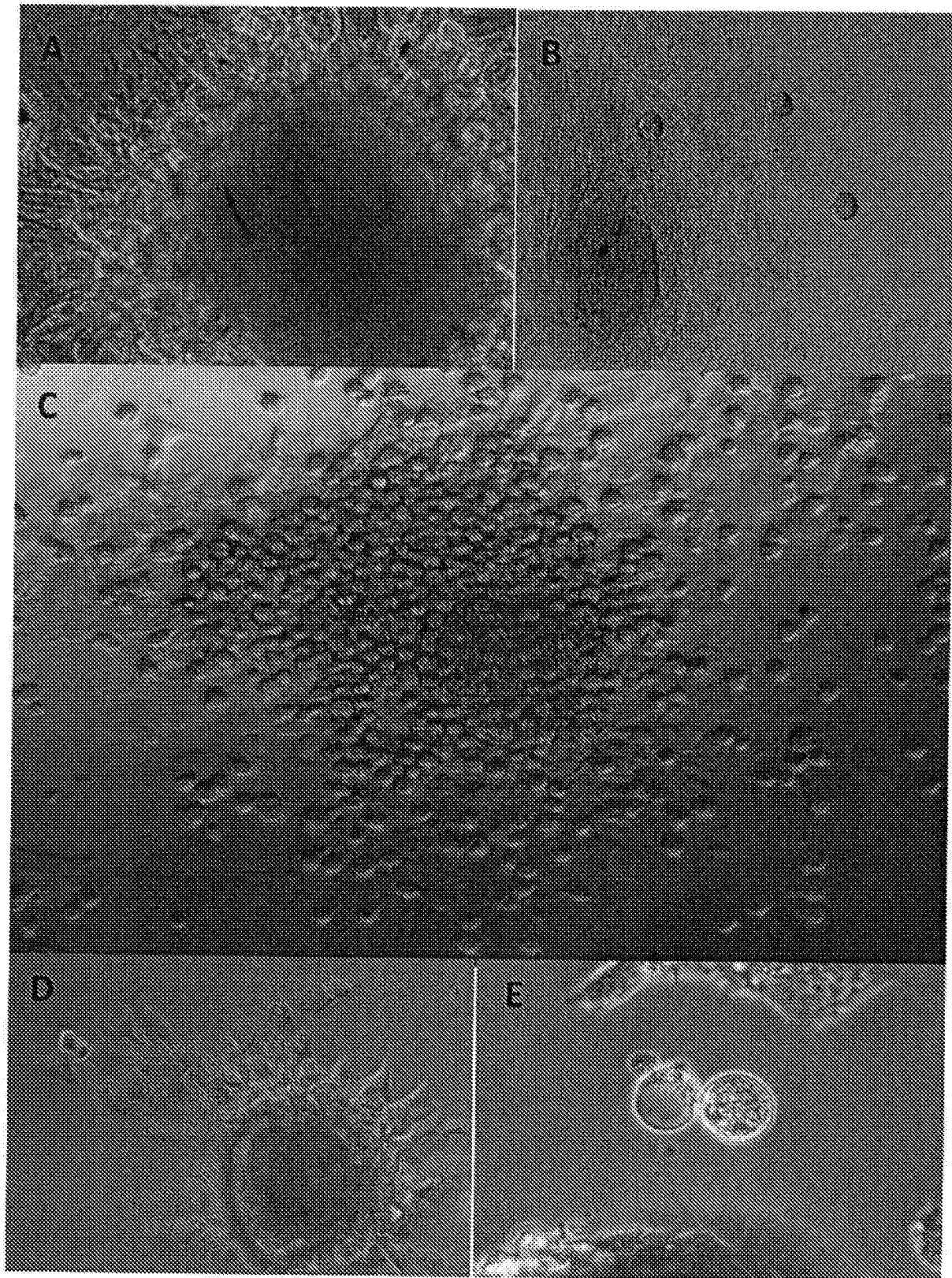


Figura 3

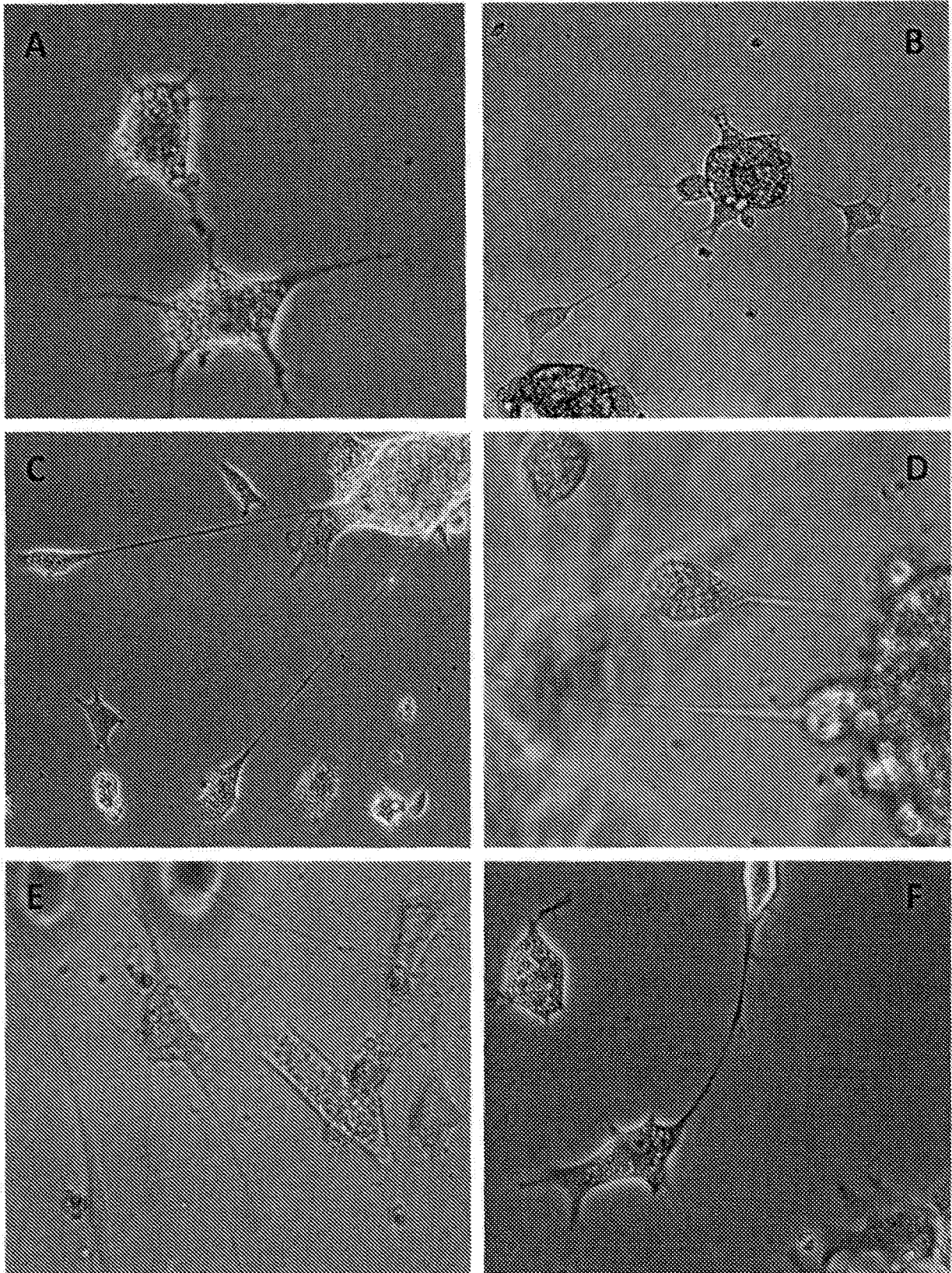


Figura 4

5/15

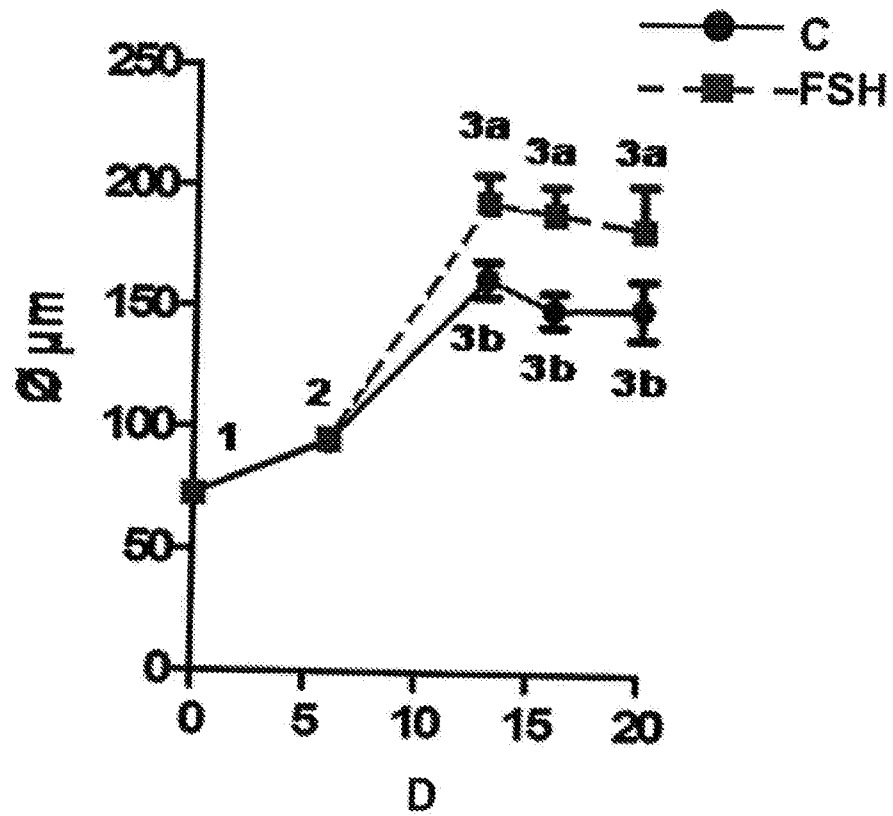
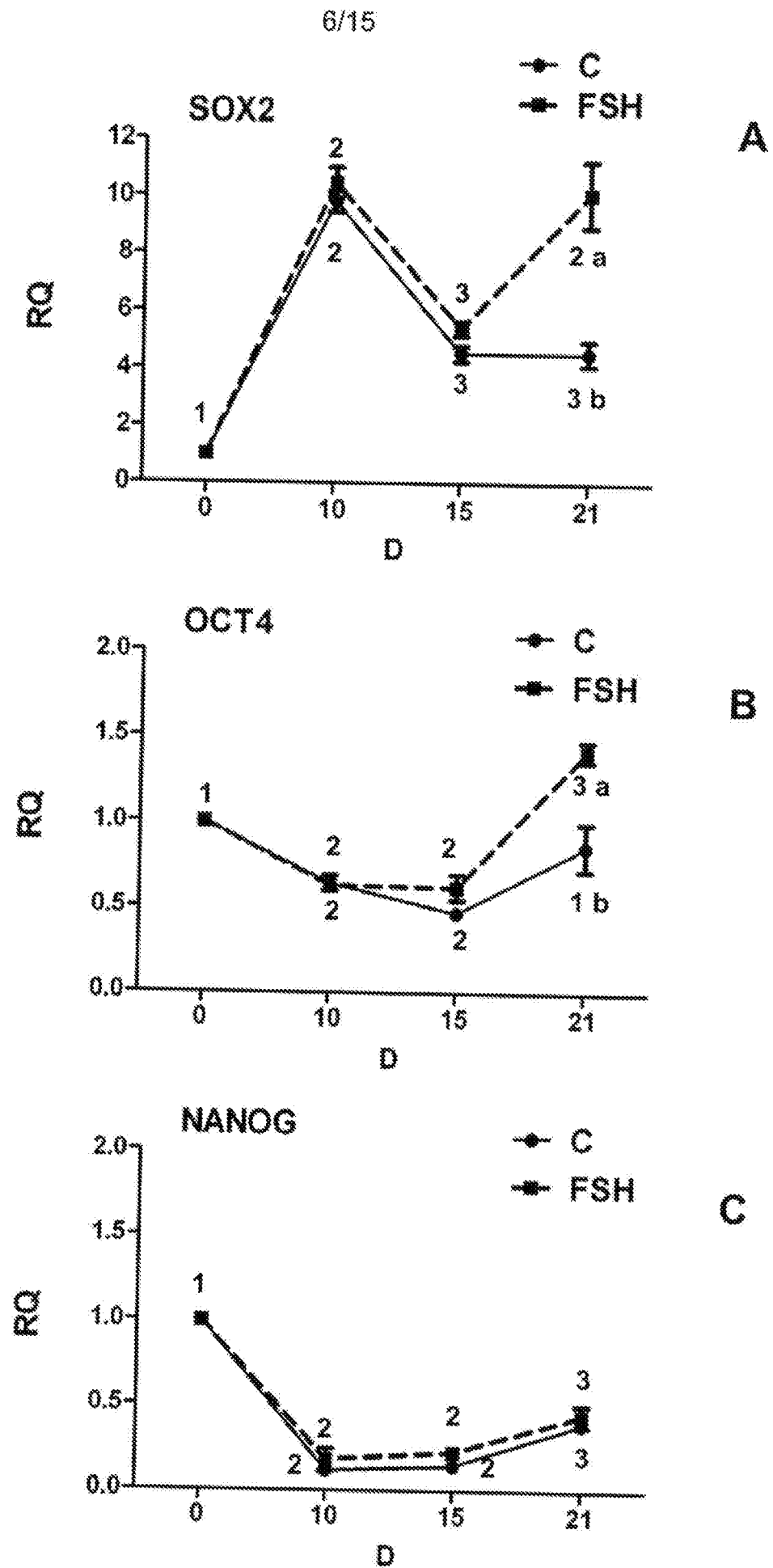


Figura 5

Figura 6



7/15

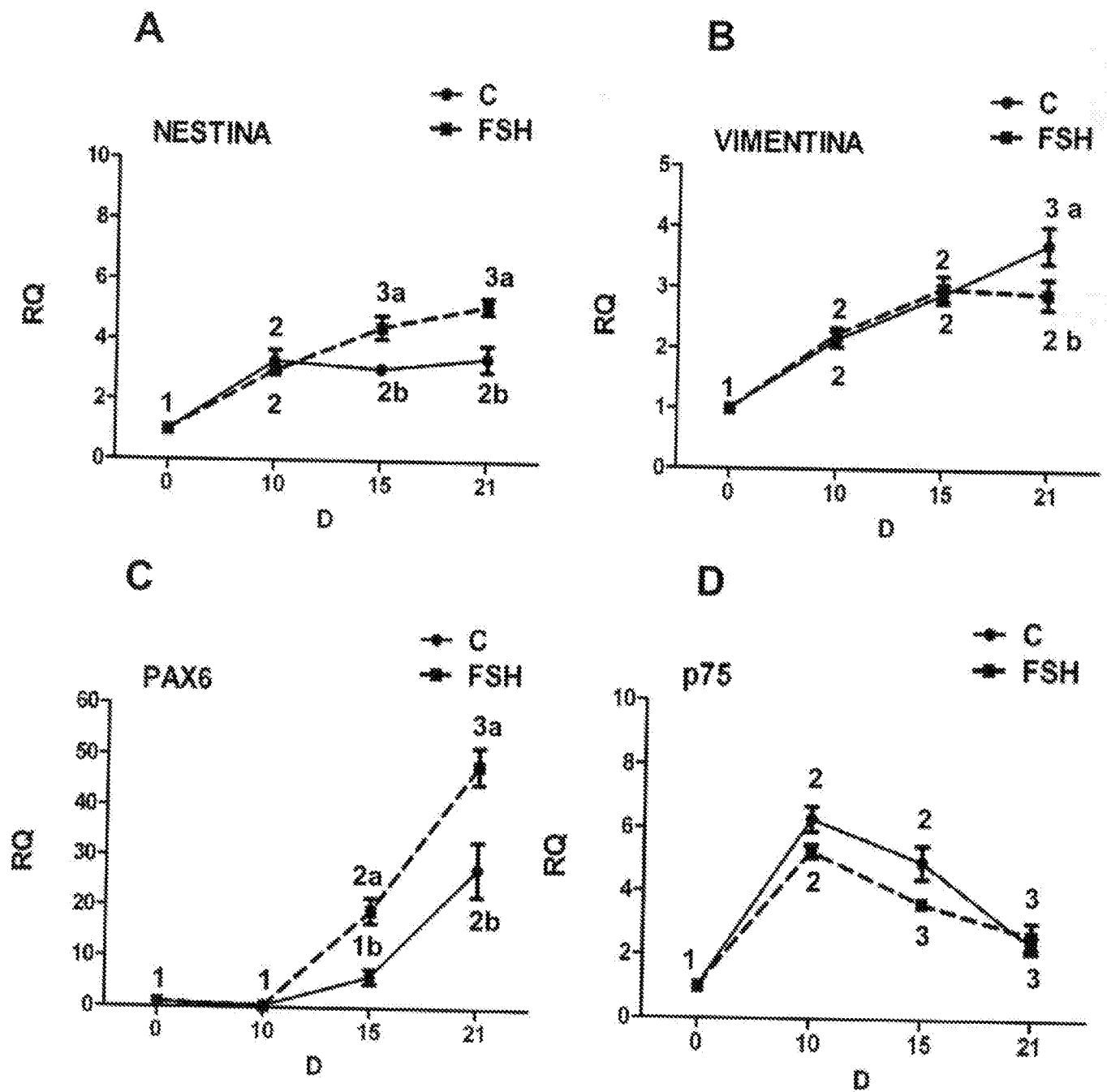
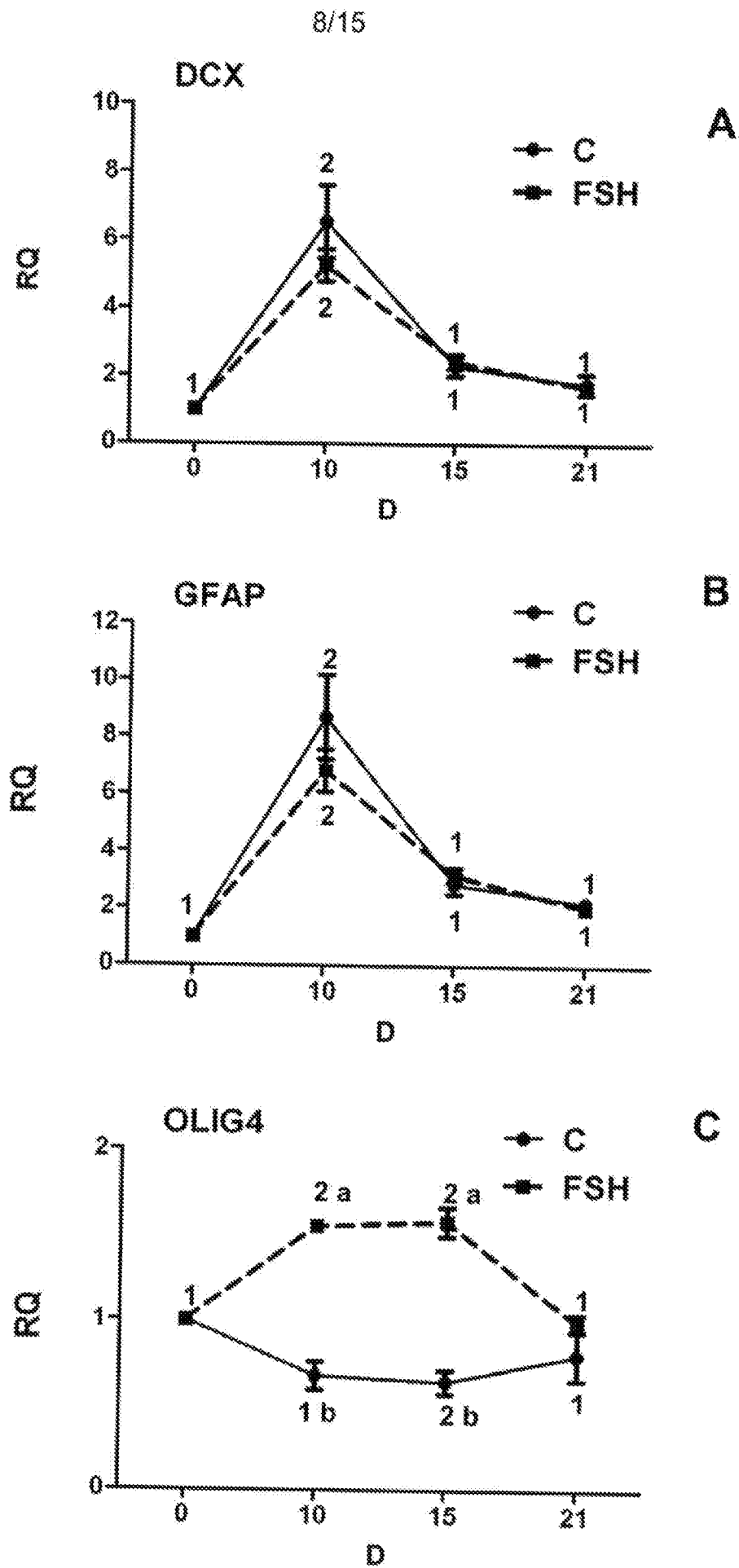


Figura 7

Figura 8



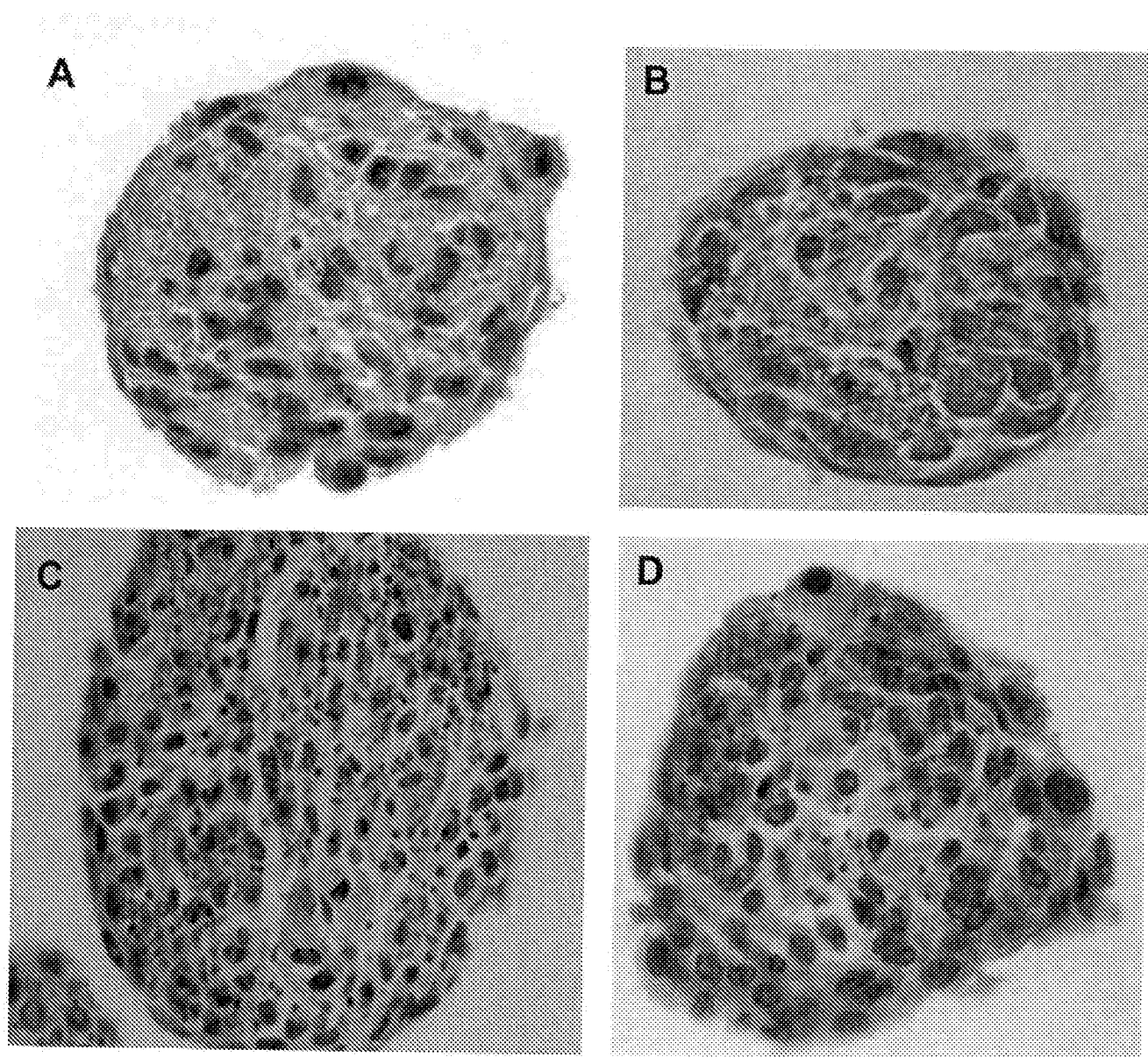


Figura 9

10/15

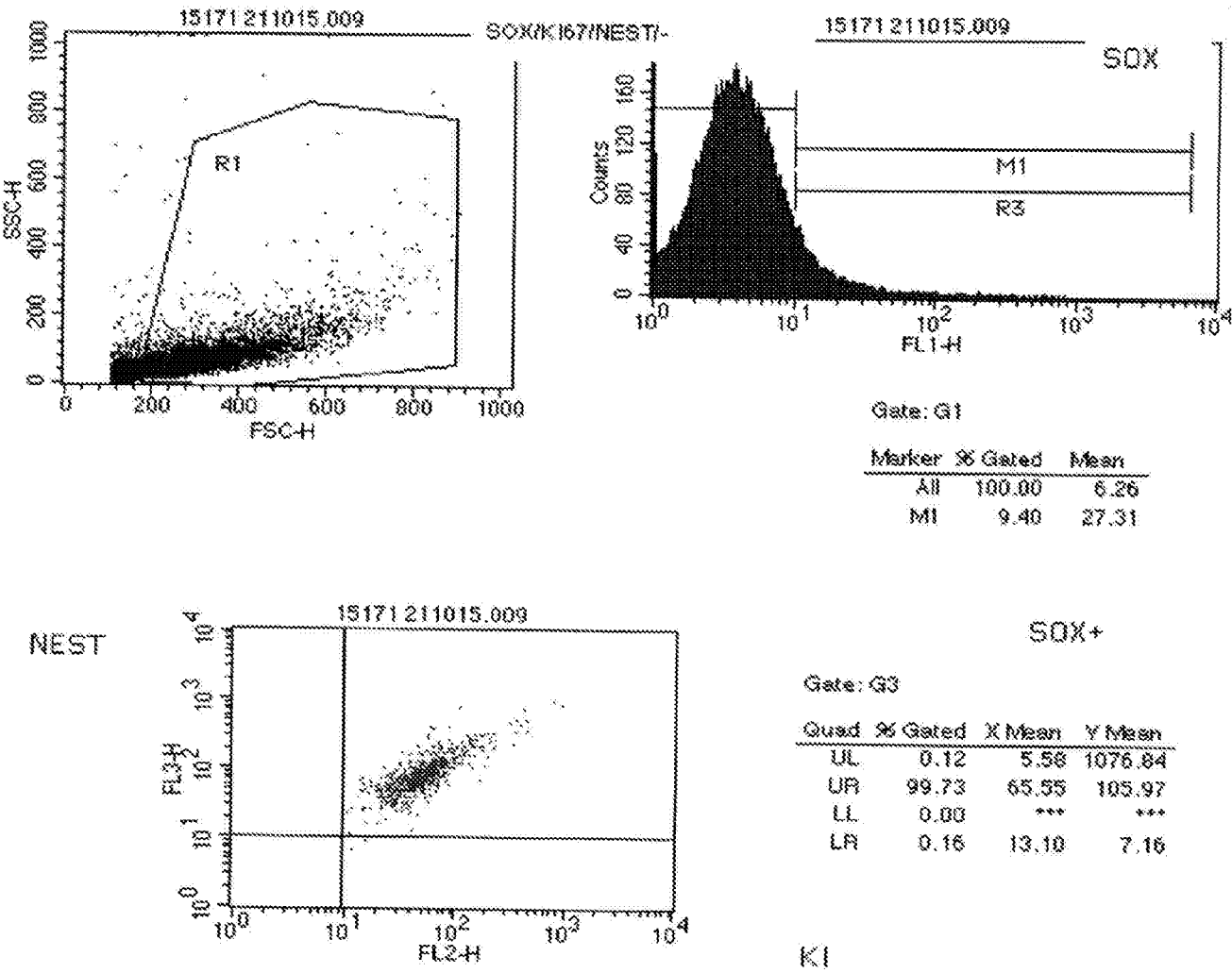
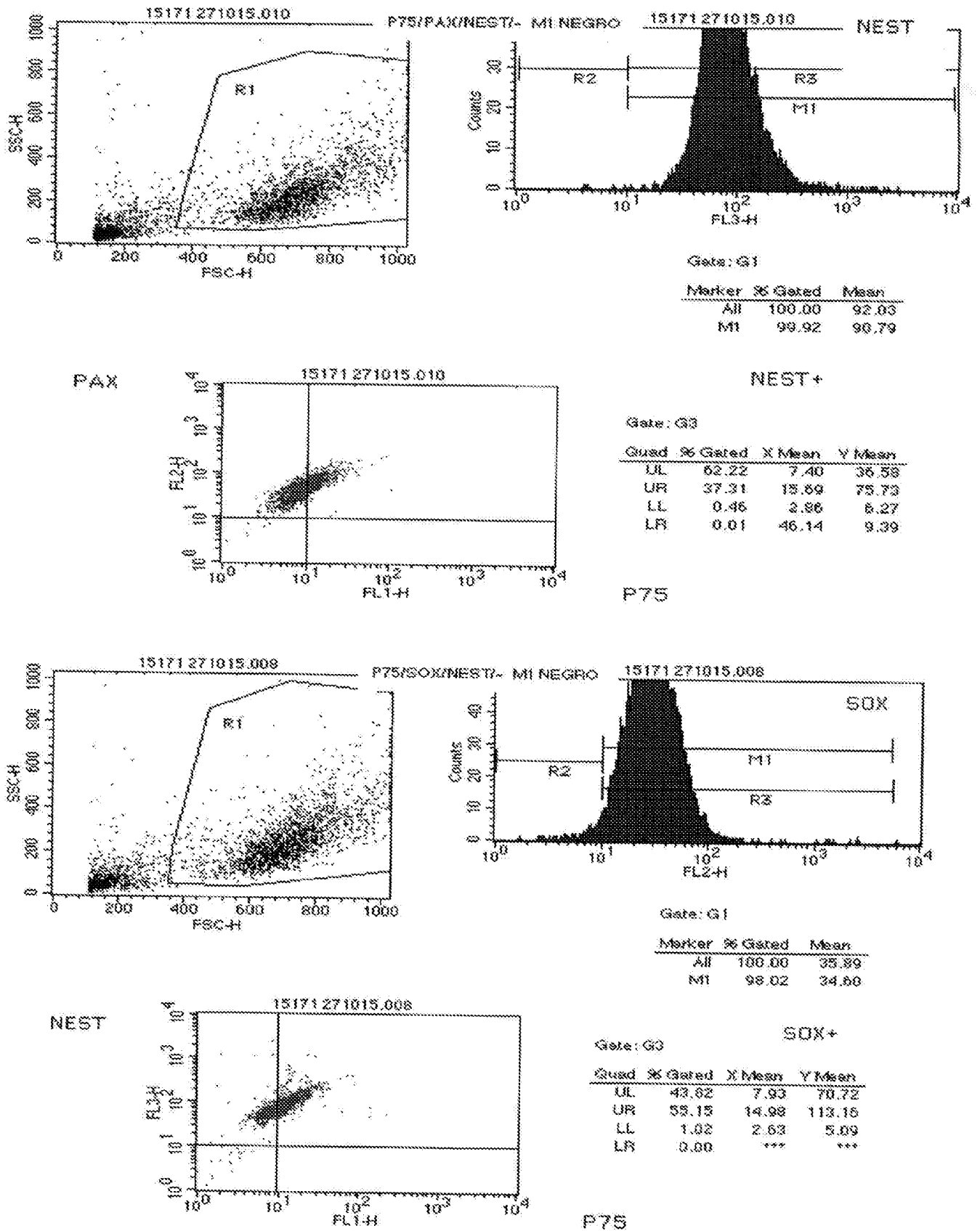


Figura 10A

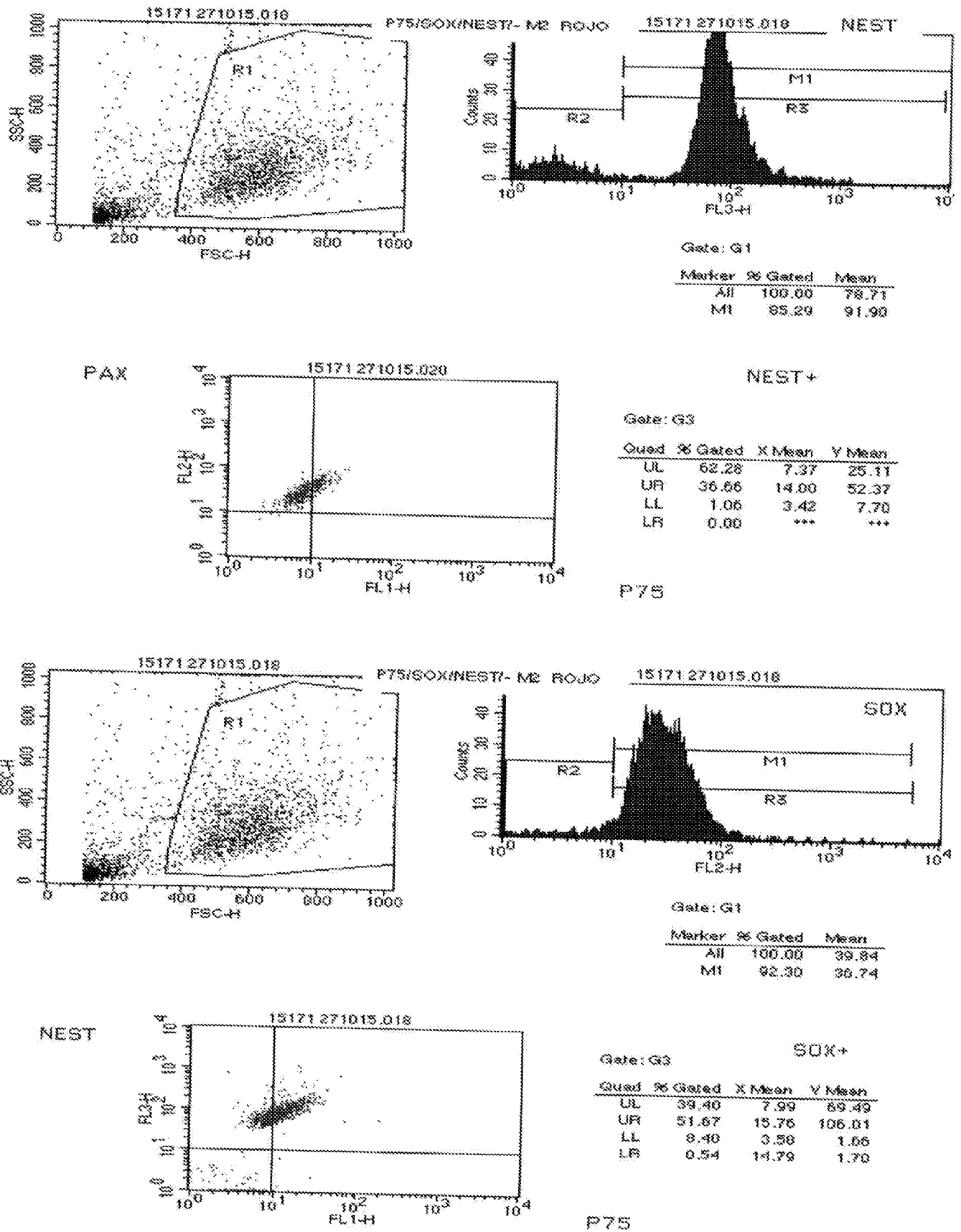
11/15

Figura 10B



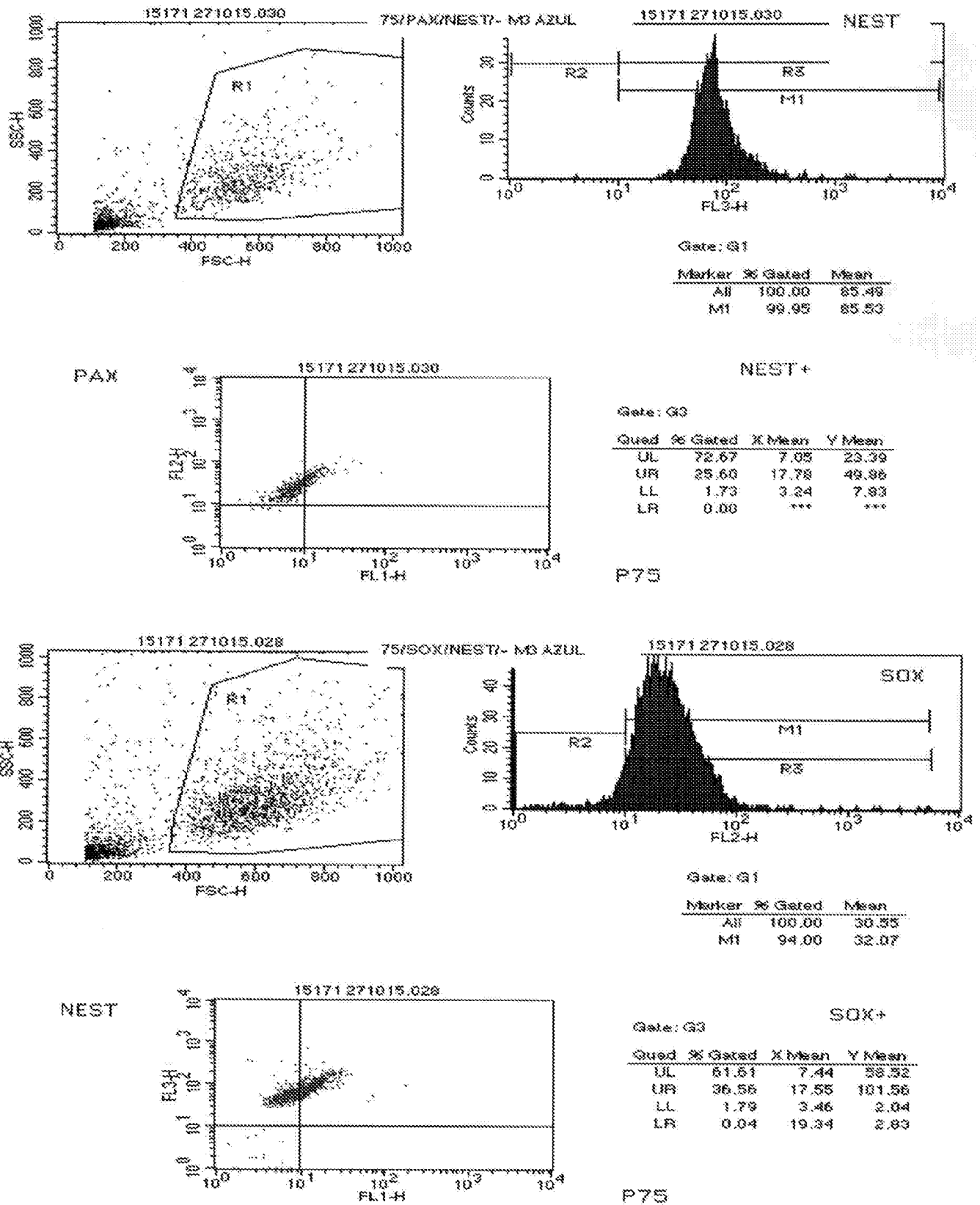
12/15

Figura 10C



13/15

Figura 10D



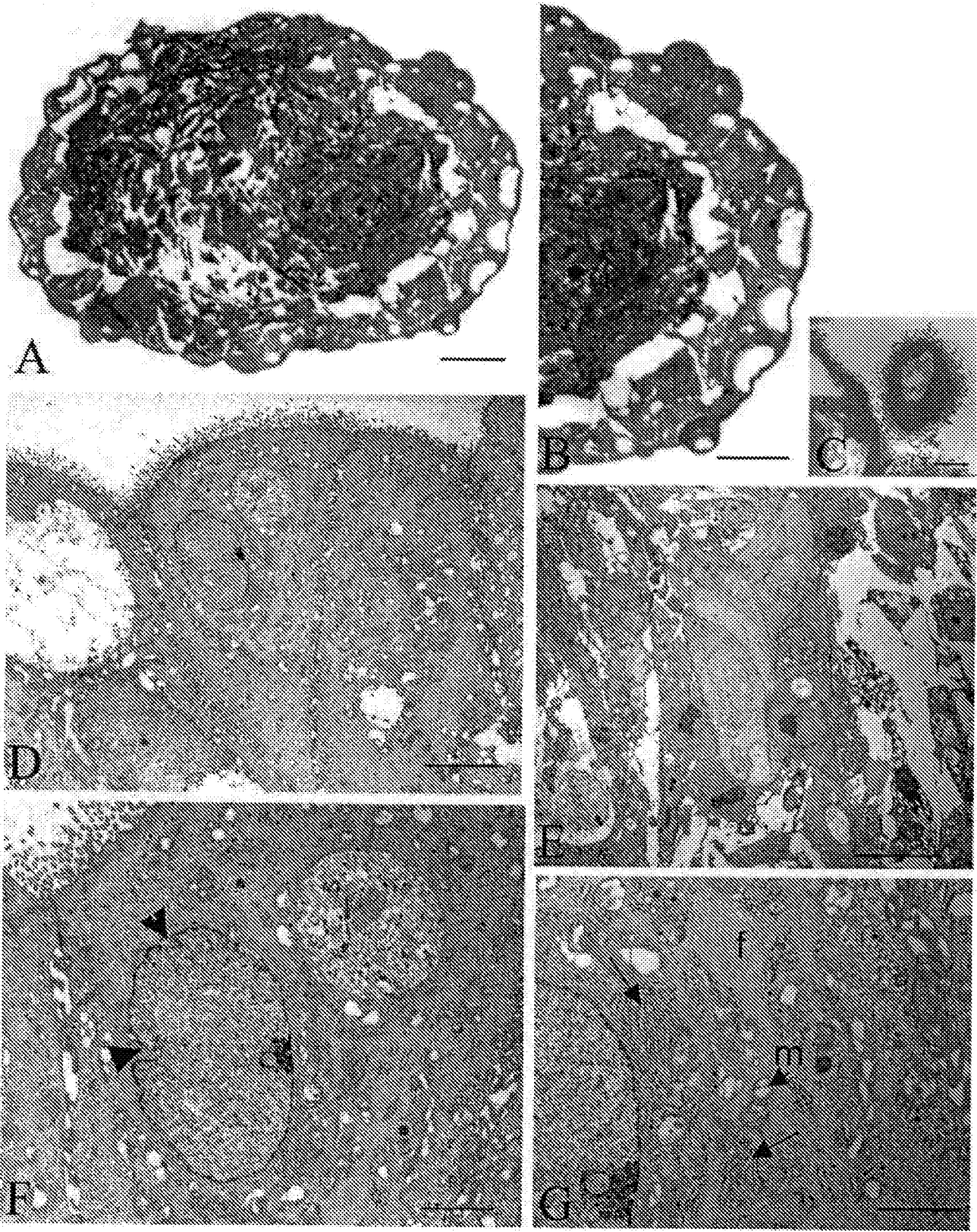


Figura 11

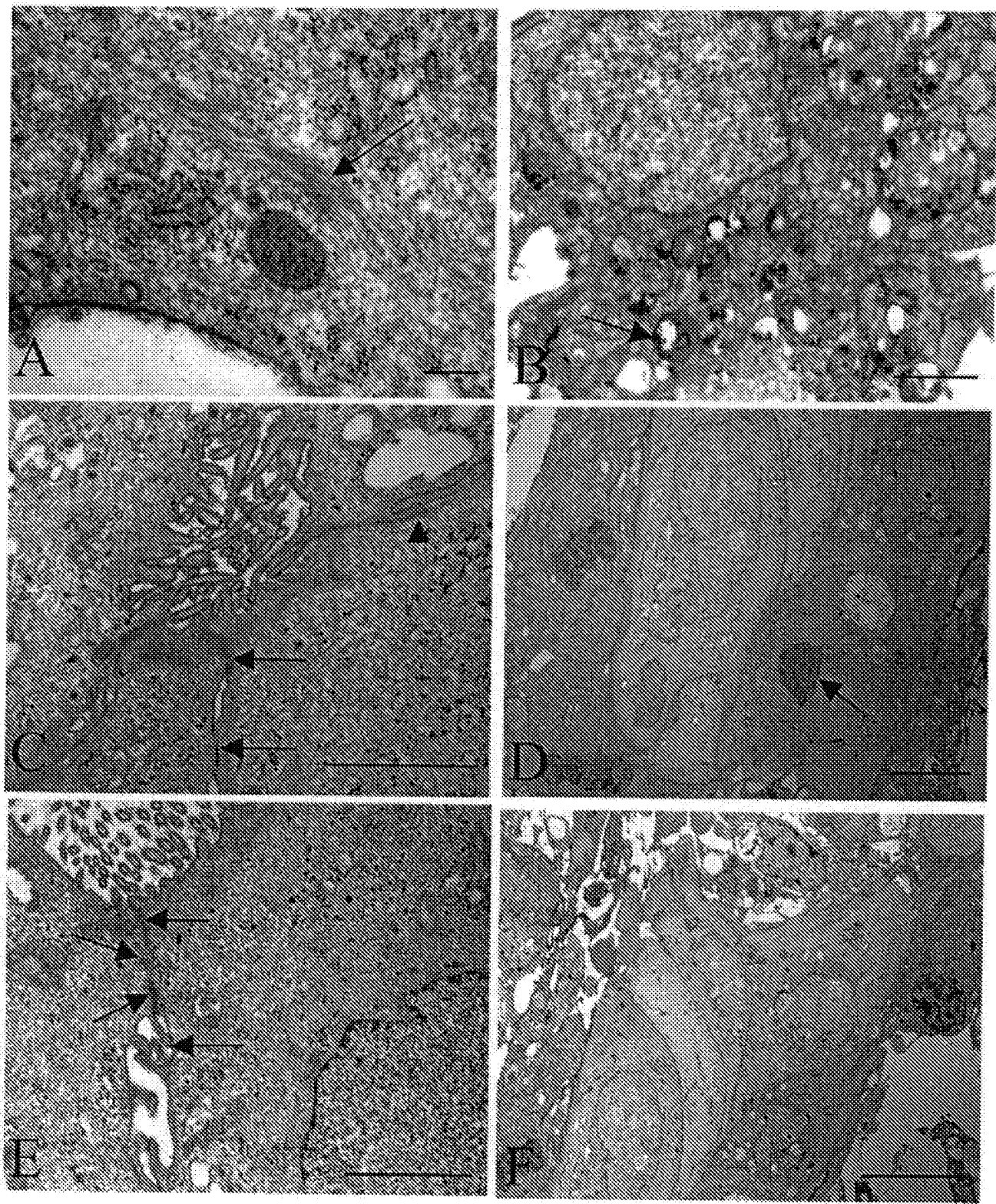


Figura 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2017/000143

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INTERNET

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANTONIN BUKOVSKY <i>et al.</i> Steroid-mediated differentiation of neural/neuronal cells from epithelial ovarian precursors <i>in vitro</i> . Cell cycle, 15/11/2008, VOL. 7 Issue 22 Pags: 3577-3583 ISSN 1538-4101 (Print) 1551-4005 (Online) journal homepage, page 3577, left column and right column, first paragraph and page 3578, right column, third paragraph.	1-8
A	US 2010227396 A1 (LIM JEONG MOOK <i>et al.</i>) 09/09/2010, paragraphs [0038], [0045], [0046], [0048], [0049], [0053], [0055], [0056], [0059] and [0132].	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27/02/2018

Date of mailing of the international search report
(28/02/2018)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
S. González Peñalba

Telephone No. 91 3493025

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/000143

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PARTE SEEMA <i>et al.</i> Detection, characterization, and spontaneous differentiation <i>in vitro</i> of very small embryonic-like putative stem cells in adult mammalian ovary.. Stem cells and development. United States Aug 2011. 31/07/2011, Vol. 20, N° 8, Pages 1451 - 1464, ISSN 1557-8534 (Electronic), <DOI: doi:10.1089/scd.2010.0461 pubmed:21291304> pages 1451 and 1456; page 1461, left column, last paragraph and right column, first paragraph.	1-8
A	WO 0231123 A1 (UNIV EDINBURGH <i>et al.</i>) 18/04/2002, page 1, first paragraph; page 3, last paragraph; page 4, first and third paragraphs; page 5 last paragraph – page 6, first paragraph and claim 12, 18 and 24.	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/000143

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/079 (2010.01)

C12N5/0797 (2010.01)

A61K35/12 (2015.01)

A61K35/54 (2015.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2017/000143

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO0231123 A1	18.04.2002	AU9401001 A	22.04.2002
-----	-----	-----	-----
US2010227396 A1	09.09.2010	US8916380 B2	23.12.2014
		KR20090074018 A	03.07.2009
		KR101538089B B1	22.07.2015
		WO2008020666 A1	21.02.2008
		WO2008020657 A1	21.02.2008
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2017/000143

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INTERNET

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	ANTONIN BUKOVSKY <i>et al.</i> Steroid-mediated differentiation of neural/neuronal cells from epithelial ovarian precursors <i>in vitro</i> . Cell cycle, 15/11/2008, VOL. 7 Issue 22 Pags: 3577-3583 ISSN 1538-4101 (Print) 1551-4005 (Online) jorunal hemopage, página 3577, columna izquierda y columna derecha, primer párrafo y página 3578, columna derecha, tercer párrafo.	1-8
A	US 2010227396 A1 (LIM JEONG MOOK <i>et al.</i>) 09/09/2010, párrafos [0038], [0045], [0046], [0048], [0049], [0053], [0055], [0056], [0059] y [0132].	1-8

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
27/02/2018

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
28 de febrero de 2018 (28/02/2018)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
S. González Peñalba
Nº de teléfono 91 3493025

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2017/000143

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	PARTE SEEMA <i>et al.</i> Detection, characterization, and spontaneous differentiation <i>in vitro</i> of very small embryonic-like putative stem cells in adult mammalian ovary.. Stem cells and development. United States Aug 2011. 31/07/2011, Vol. 20, N° 8, Páginas 1451 - 1464, ISSN 1557-8534 (Electronic), <DOI: doi:10.1089/scd.2010.0461 pubmed:21291304> páginas 1451 y 1456; página 1461, columna izquierda, último párrafo y columna derecha, primer párrafo.	1-8
A	WO 0231123 A1 (UNIV EDINBURGH <i>et al.</i>) 18/04/2002, página 1, primer párrafo; página 3, último párrafo; página 4, primer y tercer párrafos; página 5 último párrafo – página 6, primer párrafo y reivindicación 12, 18 y 24.	1-8

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C12N5/079 (2010.01)

C12N5/0797 (2010.01)

A61K35/12 (2015.01)

A61K35/54 (2015.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2017/000143

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO0231123 A1	18.04.2002	AU9401001 A	22.04.2002
-----	-----	-----	-----
US2010227396 A1	09.09.2010	US8916380 B2	23.12.2014
		KR20090074018 A	03.07.2009
		KR101538089B B1	22.07.2015
		WO2008020666 A1	21.02.2008
		WO2008020657 A1	21.02.2008
-----	-----	-----	-----