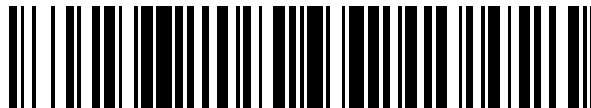


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 953**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2005 E 05782697 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 1765085**

54 Título: **Composiciones que comprenden células madre germinales femeninas y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

17.05.2004 US 572222 P
24.05.2004 US 574187 P
09.07.2004 US 586641 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2015

73 Titular/es:

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(100.0%)
55 FRUIT STREET
BOSTON, MA 02114, US

72 Inventor/es:

TILLY, JONATHAN L. y
JOHNSON, JOSHUA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 547 953 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden células madre germinales femeninas y métodos de uso de las mismas

5 Declaración de interés potencial para el gobierno

El gobierno de los Estados Unidos puede tener ciertos derechos sobre la presente invención en virtud de los números de concesión R01-AG12279 y R01-AG24999 del Instituto Nacional sobre el Envejecimiento de los Institutos Nacionales de Salud.

10 Antecedentes de la invención

Hasta hace poco, se creía que las gónadas femeninas de la mayoría de las especies de mamíferos, incluyendo los seres humanos, albergaban un número finito de células germinales detenidas meioticamente (ovocitos) encerradas dentro de folículos primordiales que servían como reserva de óvulos liberados en la ovulación durante cada ciclo menstrual (Gougeon, A. *et al.*, (1996) *Endocr Rev.* 17:121-55; Morita, Y. y Tilly, J. L., (1999) *Dev. Biol.* 213: 1-17). El número de ovocitos se reduce a lo largo de la vida postnatal, a través de mecanismos que implican la apoptosis (Tilly, J. L., (2001) *Nat Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 838-848), y era una creencia muy extendida que finalmente abandonaban los ovarios estériles de las células germinales (Faddy, M. J. *et al.*, (1976) *J. Exp. Zool.* 197: 173-186; Faddy, M. J. *et al.*, (1987) *Cell Tissue Kinet.* 20: 551-560; Faddy, M. J., (2000) *Mol. Cell Endocrinol.* 163: 43-48). En los seres humanos, el agotamiento de la reserva de ovocitos se produce normalmente durante la quinta década de la vida, conduciendo a la menopausia. (Richardson, S. J. *et al.* (1987) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65: 1231-1237).

De acuerdo con dicha doctrina básica de la biología reproductiva, se creía, además, que una vez agotada, la reserva de células germinales de ovario, esta no se podía reponer. (Zuckerman, S. (1951) *Recent Prog. Horm. Res.* 6: 63-108; Borum, K., (1961) *Exp. Cell Res.* 24: 495-507; Peters, H., (1970) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 259: 91-101; McLaren, A., (1984) *Symp. Soc. Exp. Biol.* 38: 7-23; Anderson, L. D. y Hirshfield, A. N. (1992) *Md. Med. J.* 41: 614-620). Por lo tanto, cualquier tratamiento que acelere la pérdida de ovocitos amenaza con reducir la fertilidad y causará la menopausia a una edad más temprana de lo esperado. Por ejemplo, la exposición de las mujeres a un amplio espectro de agentes que dañan el ovario, tales como agentes quimioterapéuticos y radioterapia, en general, conduce a la menopausia prematura y a la esterilidad irreversible. En la actualidad, las opciones terapéuticas limitadas de preservación de la fertilidad y la función ovárica normal en diversas condiciones adversas son invasivas, tales como, por ejemplo, la crioconservación de fragmentos de tejido de ovario u ovocitos individuales, y con frecuencia requieren terapia hormonal, que puede no ser médicamente apropiada para muchas mujeres con tumores sensibles hormonalmente (Waxman, J. (1983) *J. R. Soc. Med.* 76: 144-8; Familiari, G. *et al.*, (1993) *Hum. Reprod.* 8: 2080-7; Ried, H. L. y Jaffe, N., (1994) *Semin. Roentgenol.* 29: 6-14; Reichman, B. S. y Green, K. B. (1994) *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 16: 125-9). Además, actualmente no existen opciones terapéuticas para el aplazamiento de la insuficiencia ovárica normal en la menopausia. Por lo tanto, existe una gran necesidad en la técnica de seguir descubriendo y desarrollando intervenciones terapéuticas nuevas o menos invasivas para el restablecimiento de la función ovárica afectada y la infertilidad en las mujeres.

40 Sumario de la invención

Se ha demostrado ahora que las hembras de mamífero no pierden la capacidad de renovación de las células germinales durante la vida postnatal. Los ovarios mamíferos poseen células madre germinales femeninas mitóticamente competentes y células progenitoras de células madre germinales femeninas que, basándose en las tasas de degeneración y aclaramiento de los ovocitos, mantienen la producción de ovocitos y folículos en el ovario mamífero postnatal.

50 En el presente documento, se describe la caracterización de las células madre germinales femeninas no embrionarias y de sus células progenitoras. Por consiguiente, los métodos del presente documento se refieren, entre otras cosas, al uso de células madre germinales femeninas no embrionarias y de sus células progenitoras para ampliar la reserva de folículos como medio para mejorar o restablecer la fertilidad en las mujeres, y para mejorar los síntomas y las consecuencias de la menopausia.

55 La presente invención proporciona una célula no embrionaria aislada que es mitóticamente competente y que expresa *Vasa*, *Oct-4*, *Dazl*, *Stella* y, opcionalmente, un antígeno embrionario específico de estadio.

60 En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones que comprenden células madre germinales femeninas no embrionarias.

En una realización, la presente invención proporciona composiciones que comprenden células madre germinales femeninas no embrionarias, células que son mitóticamente competentes y que expresan *Vasa*, *Oct-4*, *Dazl*, *Stella* y, opcionalmente, un antígeno embrionario específico de estadio ("SSEA"). Preferentemente, el SSEA es SSEA-1. Coincidiendo con su fenotipo mitóticamente competente, las células madre germinales femeninas de la invención no expresan el factor de crecimiento/diferenciación 9 ("GDF-9"), las proteínas de la zona pelúcida (por ejemplo, proteína

de la zona pelúcida 3, "ZP3"), la histona desacetilasa 6 ("HDAC6") ni la proteína del complejo sinaptonémico 3 ("SCP3"). Tras el trasplante a un hospedador, las células madre germinales femeninas de la invención pueden producir ovocitos tras un período de al menos 1 semana, más preferentemente de 1 a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 semanas, de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 semanas o más de aproximadamente 5 semanas después del trasplante.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones que comprenden células progenitoras no embrionarias derivadas de células madre germinales femeninas. Las células progenitoras de células madre germinales femeninas ("células progenitoras") de la invención están presentes en el ovario y comparten características comunes de las células madre germinales femeninas. Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona composiciones que comprenden células progenitoras de células madre germinales femeninas, en las que las células expresan un SSEA, *Vasa*, *Oct-4*, *Dazl* y *Stella*, y en las que las células no expresan GDF-9, proteínas de la zona pelúcida (por ejemplo, ZP3), HDAC6 ni SCP3. Preferentemente, el SSEA es SSEA-1. Tras el trasplante en un hospedador, las células progenitoras de células madre germinales femeninas de la invención pueden producir ovocitos tras un período de menos de 1 semana, preferentemente de aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas después del trasplante.

En una realización, la presente invención proporciona una célula no embrionaria aislada, célula que es mitóticamente competente y que expresa *Vasa*, *Oct-4*, *Dazl*, *Stella* y, opcionalmente, un SSEA. En una realización específica, la célula aislada es una célula madre germinal femenina y, en otra realización específica, la célula aislada es una célula progenitora de células madre germinales femeninas que expresa SSEA. Preferentemente, las células madre germinales femeninas, o sus células progenitoras, son de mamífero, e incluso más preferentemente, son de ser humano.

En otra realización, la presente invención proporciona poblaciones purificadas de células madre germinales femeninas no embrionarias y/o de sus células progenitoras. En realizaciones específicas, la población purificada de células es del aproximadamente 50 al aproximadamente 55 %, del aproximadamente 55 al aproximadamente 60 %, del aproximadamente 65 al aproximadamente 70 %, del aproximadamente 70 al aproximadamente 75 %, del aproximadamente 75 al aproximadamente 80 %, del aproximadamente 80 al aproximadamente 85 %, del aproximadamente 85 al aproximadamente 90 %, del aproximadamente 90 al aproximadamente 95 % o del aproximadamente 95 al aproximadamente 100 % de las células de la composición.

En otra realización más, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden células madre germinales femeninas no embrionarias y/o sus células progenitoras, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender poblaciones purificadas de células madre germinales femeninas no embrionarias y/o sus células progenitoras.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra gráficos que representan la dinámica de las células germinales de ovario postnatal. El panel (a) muestra el número de folículos no atréticos, mientras que (b) muestra el número de folículos atréticos, en reposo (primordiales) e inmaduros totales (primordiales, primarios, preantrales pequeños) de los ovarios de ratones durante el desarrollo postnatal. El panel (c) representa la incidencia de la atresia de los folículos primordiales y primarios de los ovarios expuestos a 9,10-dimetilbenz[α]antraceno ("DMBA") a los 25 días del parto. El Panel (d) muestra la comparación de los números de folículos inmaduros atréticos y no atréticos en las cepas de ratón C57B1/6, ICD1 y AKR/J.

La Figura 2 muestra el número de ovocitos no atréticos restantes en monos rhesus.

La Figura 3 muestra estudios de inmunohistoquímica y RT-PCR de la expresión génica meiótica en los ovarios de ratones postnatales. Los Paneles (a) a (d) representan la inmunotinción con SPC3 en células individuales. Los Paneles (e) a (g) muestran la expresión de *Scp3*, *Spo11* y *Dmc1* en los ovarios frente a los testículos, o en diversos tejidos recogidos de ratones adultos jóvenes.

La Figura 4 muestra la expresión en ovario postnatal de genes asociados con células madre. El panel de la izquierda representa el análisis de RT-PCR de la expresión de *mili*, *pumilio-1* (*pum1*), *pumilio-2* (*pum2*) y *nucleostemina* en los ovarios de ratones extraídos en los días indicados de vida o a los 8 meses (8 m) del parto. El panel de la derecha muestra el análisis de la distribución tisular de los genes en muestras de ARN preparadas a partir de ovarios, cerebros, corazones, riñones, pulmones y bazo de ratonas a los 40 a 42 días del parto.

La Figura 5 representa la eliminación mediada por busulfán de la reserva de folículos primordiales en ratonas adultas. El gráfico de (a) muestra el número de folículos primordiales atréticos y no atréticos presentes en los ovarios de los ratones tratados con vehículo o con busulfán. El recuadro muestra los resultados para la atresia de los folículos primordiales. Los Paneles (b) a (e) representan el aspecto histológico de los ovarios de ratones tratados con vehículo o busulfán.

La Figura 6 es un gráfico que muestra la proporción de folículos primordiales con respecto a los primarios en la evaluación de los resultados a largo plazo del tratamiento contra el cáncer (busulfán) en la función ovárica de ratones. El cálculo de esta proporción permite estimar la tasa de pérdida de folículos primordiales a través de la activación del crecimiento.

La Figura 7 muestra gráficos que representan el efecto del inhibidor de la histona desacetilasa de amplio espectro (HDAC), tricostatina A (TSA), sobre el número de folículos inmaduros no atréticos por ovario. El panel de la izquierda muestra los números de folículos inmaduros no atréticos en respuesta al vehículo o a TSA, mientras que el panel de la derecha cuantifica los números de los folículos en reposo (primordiales) y de crecimiento temprano (primarios y preantrales pequeños).

La Figura 8 muestra que el tejido de ovario de tipo silvestre se adhiere al tejido de ovario hospedador transgénico positivo en proteína verde fluorescente (GFP), y se vasculariza. (a, b) Morfología bruta de un injerto de ovario representativo a las 3-4 semanas de la cirugía, antes de (a) y después de (b) la eliminación de la cavidad bursal. Los Paneles (c) a (f) muestran el aspecto histológico bruto de injertos de ovario representativos (línea blanca discontinua) observados bajo microscopio óptico (c, e) y de fluorescencia (GFP, d, f) a las 3-4 semanas de la cirugía.

La Figura 9 son micrografías que muestran que las células germinales transgénicas positivas en GFP forman ovocitos dentro de los folículos de los ovarios de tipo silvestre. Los Paneles (a) y (b) muestran la expresión de GFP en las secciones de tejido ovárico del hospedador (transgénicos positivos en GFP) e injertado (de tipo silvestre) teñidos mediante contraste con yoduro de propidio. (a) Folículos antrales de tejido de ovario injertado que contiene un ovocito positivo en GFP encerrado dentro de células de la granulosa negativas en GFP. (b) Folículo primario de tejido de ovario injertado que contiene un ovocito positivo en GFP encerrado dentro de células de la granulosa negativas en GFP (línea blanca discontinua).

La Figura 10 es un ejemplo adicional de la foliculogénesis del tejido de ovario injertado. Dos folículos inmaduros adyacentes compuestos de ovocitos transgénicos positivos en GFP y células de la granulosa de tipo silvestre presentes dentro de tejido ovárico de tipo silvestre 4 semanas después del injerto en la cavidad bursal del ovario de una hembra receptora transgénica positiva en GFP (PI, contraindicación con yoduro de propidio).

La Figura 11 muestra gráficos que representan la dinámica de los ovocitos en ratonas deficientes en *Bax* (gen desactivado, KO) poco tiempo después del parto (Día 4 después del parto) y a principios de la edad adulta reproductiva (Día 42 después del parto).

La Figura 12 muestra gráficos que representan la dinámica de los ovocitos en ratonas deficientes en caspasa-6 (gen desactivado, KO) poco tiempo después del parto (día 4 después del parto) y a principios de la edad adulta reproductiva (Día 42 después del parto).

La Figura 13 muestra la histología representativa de ovarios de tipo silvestre 4 días después del parto (A, ampliación en C) y ovarios deficientes en *Atm* (gen mutado de la ataxia-telangiectasia) (B, D). El análisis de RT-PCR muestra la presencia de marcadores germinales tanto en los ovarios de tipo silvestre como en los ovarios con *Atm* nulo (E).

La Figura 14 representa el análisis inmunohistoquímico de la expresión de SSEA1 (rojo, con los núcleos destacados con yoduro de propidio en azul) en los ovarios de ratones adultos (B, un aumento mayor de las células SSEA1+ mostradas en A; A y C, ovarios de diferentes ratones; D, una sola célula SSEA1+ de un ovario adulto, que muestra la expresión en la superficie celular del antígeno).

La Figura 15 muestra una presentación esquemática de una metodología de aislamiento de células madre germinales femeninas y/o de sus células progenitoras.

La Figura 16 representa la fracción aislada de SSEA-1 (inmunopurificada) que representa una población de células que expresan genes que denotan la pluripotencia (SSEA-1, *Oct-4*) y sitúa su linaje dentro de la línea germinal (*Dazl*, *Stella*, *Mvh/Vasa*), pero que carecen de los genes expresados en las células germinales sometidas a meiosis (SCP3) o en los ovocitos (GDF9, ZP3, HDAC6). El tejido de ovario residual contiene ovocitos en crecimiento y ovocitos primordiales en reposo y, por lo tanto, todos los genes marcadores se expresan en esta fracción.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término "expansión" se refiere a la propagación de una célula o células sin diferenciación terminal. La expresión "fenotipo de aislamiento" se refiere a las características estructurales y funcionales de las células madre germinales femeninas o de sus células progenitoras tras el aislamiento. La expresión "fenotipo de expansión" se refiere a las características estructurales y funcionales de las células madre germinales femeninas o de sus células progenitoras durante la expansión. El fenotipo de expansión puede ser idéntico al fenotipo de aislamiento, o como alternativa, el fenotipo de expansión puede estar más diferenciado que el fenotipo de aislamiento.

El término "diferenciación" se refiere al proceso de desarrollo del compromiso del linaje. Un "linaje" se refiere a una vía de desarrollo celular, en la que las células precursoras o "progenitoras" se someten a progresivos cambios fisiológicos para convertirse en un determinado tipo de célula que tiene una función característica (por ejemplo, células nerviosas, células musculares o células endoteliales). La diferenciación se produce por etapas, mediante las cuales las células van siendo cada vez más específicas hasta que alcanzan la madurez completa, también conocida como "diferenciación terminal". Una "célula diferenciada terminalmente" es una célula que se ha comprometido a un linaje específico y ha alcanzado la etapa final de la diferenciación (es decir, una célula que ha madurado completamente). Los ovocitos son un ejemplo de un tipo de célula terminalmente diferenciada.

El término "aislado/a", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula madre germinal femenina o a su célula progenitora, en un estado no natural (por ejemplo, aislada del organismo o de una muestra biológica del organismo). La muestra biológica puede incluir médula ósea, sangre periférica, ovario o bazo.

5 La expresión "células progenitoras", como se usa en el presente documento, son células del linaje germinal que 1) derivan de células madre germinales femeninas como su progenie, que contienen un conjunto de genes marcadores comunes; 2) están en una etapa temprana de diferenciación; y 3) conservan la capacidad mitótica.

10 El término "progenie", como se usa en el presente documento, son todas las células hijas derivadas de las células madre germinales femeninas, incluyendo las células progenitoras, las células diferenciadas y las células diferenciadas terminalmente.

15 La expresión "derivado/a de", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso de obtención de una célula hija.

El término "injertar" se refiere al proceso de contacto celular y de incorporación en un tejido existente de interés (por ejemplo, ovario) *in vivo*.

20 El término "agentes" se refieren a factores celulares (por ejemplo, biológicos) y farmacéuticos, preferentemente factores de crecimiento, citocinas, hormonas o pequeñas moléculas, o a los productos codificados genéticamente que modulan la función de la célula (por ejemplo, inducen el compromiso del linaje, aumentan la expansión, inhiben o potencian el crecimiento y la supervivencia celular). Por ejemplo, los "agentes de expansión" son agentes que aumentan la proliferación y/o la supervivencia de las células madre germinales femeninas o de sus células progenitoras. Los "agentes de diferenciación" son agentes que inducen las células madre germinales femeninas o de sus células progenitoras de diferenciarse en linajes de células comprometidas, tales como ovocitos.

30 Un "folículo" se refiere a una estructura de ovario que consiste en un solo ovocito rodeado por células somáticas (tecaintersticiales con o sin granulosa). Las células somáticas de la gónada encierran ovocitos individuales para formar folículos. Cada folículo totalmente formado está envuelto en una membrana basal completa. Aunque algunos de estos folículos recién formados comienzan a crecer casi inmediatamente, la mayoría de ellos permanece en la etapa de reposo hasta que bien se degeneran o alguna/s señal/es los activan para que entren en la fase de crecimiento. Para revisar la información sobre la estructura, función y fisiología de los ovarios, véase Gougeon, A., (1996) *Endocr Rev.* 17:121-55; Anderson, L. D. y Hirshfield, A. N. (1992) *Md Med J.* 41: 614-20; y Hirshfield, A. N. (1991) *Int Rev Cytol.* 124: 43-101.

35 La expresión "mitóticamente competente" se refiere a una célula que es capaz de realizar la mitosis, el proceso mediante el cual una célula se divide y produce dos células hijas a partir de una sola célula madre.

40 Una célula "no embrionaria" se refiere a una célula que se obtiene de una fuente post-natal (por ejemplo, tejido de bebé, de niño o de adulto).

45 Un "sujeto" es un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un primate, y lo más preferentemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, primates, seres humanos, animales de granja, animales deportivos y mascotas.

El término "obtención" como en "obtención del agente" pretende incluir la compra, la síntesis o la adquisición de otro modo del agente (o de la sustancia o del material indicados).

50 Se pretende que el término "comprende", la expresión "que comprende" y similares tenga el significado amplio que se les atribuye en la Ley de patentes de Estados Unidos, y puede significar "incluye", "que incluye" y similares.

Realizaciones de la invención

55 La presente invención proporciona composiciones que comprenden células madre germinales femeninas no embrionarias y células progenitoras de células madre germinales femeninas no embrionarias.

60 Las células madre germinales femeninas expresan marcadores que incluyen *Vasa*, *Oct-4*, *Dazl*, *Stella* y, opcionalmente, un SSEA. Las células madre germinales femeninas son mitóticamente competentes (es decir, capaces de realizar la mitosis) y, por consiguiente, no expresan el factor de crecimiento/diferenciación 9 ("GDF-9"), proteínas de la zona pelúcida (por ejemplo, la proteína de la zona pelúcida 3, "ZP3"), histona desacetilasa 6 ("HDAC6") ni la proteína del complejo sinaptonémico 3 ("SCP3"). Para más detalles, véanse las solicitudes de EE.UU. N° 2006/0010509, presentada el 17 de mayo de 2005 como número de expediente del mandatario 51588-62060, y 2006/0015961, presentada el 17 de mayo de 2005 como número de expediente del mandatario 51588-62065, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia para la descripción de las células madre germinales femeninas de la médula ósea y de la sangre periférica.

La presente invención también proporciona células progenitoras no embrionarias derivadas de células madre germinales femeninas no embrionarias. Las células progenitoras de células madre germinales femeninas de la invención pueden circular por todo el organismo y, lo más preferentemente, se pueden situar en la médula ósea, la sangre periférica y el ovario. Las células progenitoras de la invención expresan un SSEA, *Oct-4*, *Vasa*, *Dazl* y *Stella*, pero no expresan HDAC6, GDF-9 ni proteínas de la zona pelúcida (por ejemplo, ZP3) o SCP3. Preferentemente, el SSEA es SSEA-1.

Las células madre germinales femeninas y las células progenitoras de células madre germinales femeninas de la invención tienen distinciones funcionales. Tras el trasplante a un hospedador, las células madre germinales femeninas de la invención pueden producir ovocitos tras un período de al menos 1 semana, más preferentemente de 1 a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 semanas, de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 semanas o más de aproximadamente 5 semanas del trasplante. Las células progenitoras de células madre germinales femeninas tienen la capacidad de generar ovocitos más rápidamente que las células madre germinales femeninas. Tras el trasplante a un hospedador, las células progenitoras de células madre germinales femeninas de la invención pueden producir ovocitos tras un período de menos de 1 semana, preferentemente de aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas después del trasplante. Para más detalles, véase, la solicitud de EE.UU. N° 2006/0010509, presentada el 17 de mayo de 2005 como número de expediente del mandatario 51588-62060, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia para la descripción de la producción de ovocitos después de un trasplante.

Oct-4 es un gen expresado en células madre germinales femeninas y sus células progenitoras. El gen *Oct-4* codifica un factor de transcripción que está implicado en el establecimiento de la línea germinal de mamífero, y desempeña un papel significativo en la especificación temprana de las células germinales (revisado en Scholer (1991), *Trends Genet.* 7 (10):323-329). En el embrión de mamífero en desarrollo, *Oct-4* se regula negativamente durante la diferenciación del epiblasto, llegando a confinarse finalmente en el linaje de células germinales. En la línea germinal, la expresión de *Oct-4* se regula por separado de la expresión del epiblasto. La expresión de *Oct-4* es un marcador fenotípico de la totipotencia (Yeom *et al.* (1996), *Development* 122: 881-888).

Stella es un gen expresado en las células madre germinales femeninas y sus células progenitoras. *Stella* es un nuevo gen expresado específicamente en las células germinales primordiales y sus descendientes, incluyendo los ovocitos (Bortvin *et al.* (2004) *BMC Developmental Biology* 4(2):1-5). *Stella* codifica una proteína con un dominio similar a SAP y una estructura similar al motivo de factor de corte y empalme. Los embriones deficientes en la expresión de *Stella* están comprometidos en el desarrollo previo a la implantación y rara vez alcanzan la etapa de blastocisto. Por lo tanto, *Stella* es un factor materno implicado en la embriogénesis temprana.

Dazl es un gen expresado en células madre germinales femeninas y sus células progenitoras. El gen autosómico *Dazl* es un miembro de una familia de genes que contienen un dominio de unión de ARN consenso y se expresan en las células germinales. La pérdida de expresión de una proteína *Dazl* intacta en ratones se asocia con la incapacidad de las células germinales para completar la profase meiótica. En concreto, en ratonas con *Dazl* nulo, se produce la pérdida de las células germinales durante la vida fetal en un momento coincidente con la progresión de las células germinales a través de la profase meiótica. En ratones macho con *Dazl* nulo, las células germinales eran incapaces de progresar más allá de la etapa de leptoteno de la profase meiótica I. Por lo tanto, en ausencia de *Dazl*, se interrumpe la progresión a través de la profase meiótica (Saunders *et al.* (2003), "Reproduction", 126: 589-597).

Vasa es un gen expresado en células madre germinales femeninas y sus células progenitoras. *Vasa* es un componente del germoplasma que codifica una ARN helicasa dependiente de ATP de la familia DEAD (Liang *et al.* (1994) "Development", 120: 1201-1211; Lasko *et al.* (1988) *Nature*, 335: 611-167). La función molecular de *Vasa* se dirige a los ARNm diana de unión implicados en el establecimiento de las células germinales (por ejemplo, Oskar y Nanos), la ovogénesis, (por ejemplo, Gruken) y el inicio de la traducción (Gavis *et al.* (1996) "Development", 110: 521-528). *Vasa* es necesario para la formación de células polares y se restringe exclusivamente al linaje de células germinales durante el desarrollo. Por lo tanto, *Vasa* es un marcador molecular para el linaje de células germinales en la mayoría de las especies animales (Toshiaki *et al.* (2001) "Cell Structure and Function" 26:131-136).

Los antígenos embrionarios específicos de estadio se expresan opcionalmente en las células madre germinales femeninas y se expresan en las células progenitoras de células madre germinales femeninas de la invención. El antígeno embrionario específico de estadio 1 (SSEA-1) es un antígeno embrionario de superficie celular cuyas funciones están asociadas con la adhesión, la migración y la diferenciación celulares. Durante la formación del hipoblasto, se pueden identificar células positivas en SSEA-1 en el blastocelo y el hipoblasto, y más tarde en la media luna germinal. SSEA-1 funciona en el desarrollo temprano de las células germinales y las células neuronales. (D'Costa *et al.* (1999) *Int J. Dev. Biol.* 43(4): 349-356; Henderson *et al.* (2002) "Stem Cells" 20: 329-337). En realizaciones específicas, la expresión de los SSEA en las células madre germinales femeninas puede surgir cuando las células se están diferenciando.

Las células madre germinales femeninas y sus células progenitoras no expresan GDF-9, un gen expresado en células que ya han comenzado a diferenciarse en ovocitos. El factor de crecimiento/diferenciación-9 (GDF-9) es un miembro de la superfamilia de factores de crecimiento transformantes- β , altamente expresado en los ovarios. El

ARNm de GDF-9 se puede encontrar en los ovocitos neonatales y adultos a partir de la etapa de folículo primario de una sola capa hasta después de la ovulación (Dong, J. *et al* (1996) *Nature* 383: 531-5). El análisis de ratones deficientes en GDF-9 revela que solo se pueden formar folículos de una sola capa primordiales y primarios, pero en el desarrollo folicular, se produce un bloque más allá de la etapa de folículo de una sola capa primario, lo que produce la infertilidad completa.

Las células madre germinales femeninas y sus células progenitoras no expresan ZP1, ZP2 ni ZP3, que son productos génicos que comprenden la zona pelúcida (ZP) del ovocito. Su expresión está regulada por un factor de transcripción hélice-bucle-hélice básico (bHLH), FIG α . Los ratones con FIG α nulo no expresan los genes Zp ni forman folículos primordiales (Soyal, S. M., *et al* (2000) "Development", 127: 4645-4654). Las desactivaciones individuales de los genes ZP dan lugar a zonas pelúcidas anómalas o ausentes y a una reducción de la fertilidad (ZP1; Rankin T, *et al* (1999) "Development". 126: 3847-55) o a la esterilidad (ZP2, Rankin T. L., *et al*. (2001) "Development" 128: 1119-26; ZP3, Rankin T *et al* (1996) "Development" 122: 2903-10). Los productos proteicos ZP son glucosilados y posteriormente secretados para formar una matriz extracelular, que es importante para la fertilización *in vivo* y el desarrollo de preimplantación. La expresión de las proteínas ZP está regulada de manera precisa y se restringe a una fase de crecimiento de la ovogénesis de dos semanas. Las transcripciones de ARNm de ZP no se expresan en los ovocitos en reposo, sin embargo, una vez que los ovocitos comienzan a crecer, se empiezan a acumular las tres transcripciones de ZP.

Las células madre germinales femeninas y sus células progenitoras no expresan HDAC6. Las HDAC o histonas desacetilasas están implicadas en el desarrollo de los folículos ováricos. HDAC6, en particular, se puede detectar en los ovocitos (primordiales) de la etapa de vesícula germinal en reposo (Verdel, A., *et al*. (2003) "Zygote" 11: 323-8; Figura 16). HDAC6 es una histona desacetilasa de clase II y ha participado como una desacetilasa asociada a los microtúbulos (Hubbert, C. *et al*, (2002), *Nature* 417: 455-8). Las HDAC son la diana de inhibidores que incluyen, pero sin limitación, la tricostatina A y la trapoxina, siendo ambas metabolitos microbianos que generan la diferenciación celular, la detención del ciclo celular y la reversión de la morfología de la célula transformada.

Las células madre germinales femeninas y sus células progenitoras no expresan SCP3, lo que coincide con las observaciones de que son células madre premeióticas (es decir, diploides). La proteína del complejo sinaptonémico SCP3 es parte del elemento lateral del complejo sinaptonémico, una estructura proteica específica de la meiosis esencial para la sinapsis de los cromosomas homólogos. El complejo sinaptonémico potencia el apareamiento y la segregación de los cromosomas homólogos, influye en el número y en la distribución relativa de los cruces, y convierte los cruces en quiasmas. SCP3 es específico de la meiosis, y puede formar fibras cruzadas estriadas de múltiples cadenas, formando un núcleo fibroso ordenado en el elemento lateral (Yuan, L. *et al*, (1998) *J. Cell. Biol.* 142: 331-339). La ausencia de SCP3 en ratones puede dar lugar a aneuploidía de células germinales femeninas y a la muerte del embrión, posiblemente debido a un defecto en la integridad estructural de los cromosomas meióticos (Yuan, L. *et al*, (2002) *Science* 296: 1115-8).

Las células madre germinales femeninas y sus células progenitoras se pueden aislar de homogenizado ovárico usando separación de inmunofinidad con el antígeno embrionario específico de estadio 1 ("anti-SSEA-1") (disponible en el mercado, por ejemplo, en Chemicon (MAB4301)).

Se pueden emplear los métodos de separación y aislamiento basados en anticuerpos generalmente conocidos en la técnica para obtener células germinales positivas en SSEA-1 de homogenizado ovárico. En una realización, en el procedimiento de separación, se pueden usar perlas magnéticas. Por ejemplo, se pueden usar el kit de aglutinante biotina CELLlection y el dispositivo magnético de Dynal Biotech para aislar las células positivas en SSEA-1. Se pueden unir anticuerpos biotinilados anti-SSEA-1 a perlas magnéticas recubiertas y combinarlas con homogenizado celular, fraccionándose posteriormente la combinación mediante separación magnética. Tras el aislamiento, se pueden retirar las perlas de afinidad. Además, se pueden recoger alícuotas de células aisladas y separarlas por citometría de flujo. Las técnicas de aislamiento de células de varias etapas pueden maximizar la preparación de células vivas para el cultivo y la manipulación, la congelación y/o el trasplante posteriores.

Las células madre germinales y sus células progenitoras también se pueden aislar de homogenizado ovárico usando microdissección de captura por láser. Usando esta técnica, se obtienen células madre germinales femeninas a partir de cortes de tejido ovárico. El tejido ovárico puede ser recién preparado, congelado o fijado antes del corte. A continuación, se lleva a cabo la microdissección de captura por láser para aislar las células madre germinales femeninas. El procedimiento de microdissección de captura por láser es muy conocido en la técnica, véase, por ejemplo, Eltoum I. A. *et al*. , (2002) *Adv. Anat. Pathol.* 9: 316-322).

La microdissección de captura por láser hace uso de un aparato de láser pulsante en combinación con un microscopio especialmente adaptado y un sistema informático de visualización en tiempo real. En primer lugar, se identifican las células diana o los tipos de células diana de un corte de tejido heterogéneo en un portaobjetos histológico y se "marcan" mediante marcaje de su perímetro a través de un interfaz informático. Estas células se pueden haber marcado específicamente usando técnicas histológicas, inmunohistoquímicas u otras técnicas compatibles para mejorar el contraste entre los tipos de células deseados y no deseados. A continuación, se aplican pulsos de láser en el perímetro de las células que se van a capturar como se especifica. Lo más habitual es que el

láser pulsante genere la adherencia de las células deseadas, "marcadas", a un sustrato de captura patentado, mientras que las células no deseadas se excluyen y permanecen unidas al portaobjetos histológico. A continuación, se procesan las células unidas al sustrato de captura para posteriores análisis (por ejemplo, el análisis de la expresión génica en determinados tipos de células de un tejido).

Las células madre germinales femeninas y sus células progenitoras se pueden aislar por medios convencionales conocidos en la técnica para la separación de células madre de la sangre y de la médula ósea (por ejemplo, clasificación celular). Preferentemente, el protocolo de aislamiento incluye la generación de una fracción kif⁺/lin⁻ que tiene agotadas las células hematopoyéticas. Se pueden emplear medios de selección adicionales basados en el perfil único de expresión génica (por ejemplo, *Vasa*, *Oct-4*, *Dazl* y *Stella*) para purificar adicionalmente las poblaciones de células que comprenden células madre germinales femeninas y sus células progenitoras. Las composiciones que comprenden células madre germinales femeninas y sus células progenitoras se pueden aislar y purificar posteriormente hasta el punto de volverlas sustancialmente exentas de la muestra biológica de la que se obtuvieron (por ejemplo, médula ósea, sangre periférica, ovario).

Se pueden obtener células progenitoras de células madre germinales femeninas a partir de células madre germinales femeninas, por ejemplo, mediante la expansión en cultivo. Por lo tanto, las células progenitoras pueden ser células que tengan un "fenotipo de expansión".

I. Administración

La presente invención proporciona composiciones que comprenden células madre germinales femeninas no embrionarias o células progenitoras derivadas de células madre germinales femeninas no embrionarias. Las composiciones pueden ser composiciones farmacéuticas que comprenden células madre germinales femeninas no embrionarias o células progenitoras derivadas de células madre germinales femeninas no embrionarias y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de células madre germinales femeninas o células progenitoras derivadas de células madre germinales femeninas, se pueden proporcionar directamente a un tejido, tal como tejido ovárico. Tras el trasplante o la implantación, las células pueden injertarse y diferenciarse en ovocitos. "Injertar" se refiere al proceso de contacto celular e incorporación a un tejido existente de interés (por ejemplo, ovario) *in vivo*. Se pueden proporcionar agentes de expansión y diferenciación antes de, durante o después de la administración para aumentar la cantidad de ovocitos *in vivo*.

La administración puede ser autóloga o heteróloga (es decir, alogénica). Por ejemplo, las células madre germinales femeninas o células progenitoras derivadas de células madre germinales femeninas se pueden obtener de un sujeto, y administrarlas al mismo sujeto o a un sujeto diferente.

Preferentemente, las células injertadas sufren ovogénesis seguida de foliculogénesis, en la que las células se diferencian en un ovocito dentro de un folículo. La foliculogénesis es un proceso en el que una estructura de ovario que consiste en un solo ovocito se rodea de células somáticas (teca-intersticiales con o sin gránulos). Las células somáticas de la gónada encierran ovocitos individuales para formar folículos. Cada folículo totalmente formado está envuelto en una membrana basal completa. Aunque algunos de estos folículos recién formados comienzan a crecer casi inmediatamente, la mayoría de ellos permanece en la etapa de reposo hasta que bien se degeneran o alguna/s señal/es los activan para entrar en la fase de crecimiento.

Las células madre germinales de la invención o su progenie (por ejemplo, células progenitoras, y la progenie diferenciada y progenie diferenciada terminalmente) se pueden administrar mediante inyección localizada, incluyendo la administración a través de catéter, inyección sistémica, inyección localizada, inyección intravenosa, inyección intrauterina o administración parenteral. Cuando se administra una composición terapéutica de la presente invención (por ejemplo, una composición farmacéutica), por lo general, se formulará en una forma de dosificación unitaria inyectable (solución, suspensión, emulsión).

Las composiciones de la invención se pueden proporcionar convenientemente en forma de preparaciones líquidas estériles, por ejemplo, soluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones, dispersiones o composiciones viscosas, que pueden estar tamponadas a un pH seleccionado. Normalmente, las preparaciones líquidas son más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y composiciones sólidas. Además, las composiciones líquidas son algo más convenientes de administrar, especialmente por inyección. Las composiciones viscosas, por otro lado, pueden formularse en el intervalo de viscosidad apropiado para proporcionar períodos de contacto más prolongados con los tejidos específicos. Las composiciones líquidas o viscosas pueden comprender vehículos, que pueden ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación de las células utilizadas en la práctica de la presente invención en la cantidad requerida del disolvente apropiado con diversas cantidades de los

5 otros ingredientes, según se desee. Dichas composiciones pueden estar mezcladas con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa, o similares. Las composiciones también se pueden liofilizar. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes, dispersantes o emulsionantes (por ejemplo, metilcelulosa), agentes de tamponamiento del pH, gelificantes o aditivos para aumentar la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes y similares, dependiendo de la vía de administración y de la preparación deseada. Para preparar preparaciones adecuadas, sin necesidad de experimentación, se pueden consultar textos convencionales, tales como "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", XVII edición, 1985.

10 Se pueden añadir diversos aditivos que mejoren la estabilidad y la esterilidad de las composiciones, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de los microorganismos se puede garantizar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. Se puede obtener la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante el uso de agentes que retarden la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, cualquier vehículo, diluyente o aditivo usado tendría que ser compatible con las células madre germinales o sus células progenitoras.

20 Las composiciones pueden ser isotónicas, es decir, pueden tener la misma presión osmótica que la sangre y el líquido lagrimal. La isotonicidad deseada de las composiciones de la presente invención se puede conseguir usando cloruro de sodio u otros agentes farmacéuticamente aceptables tales como dextrosa, ácido bórico, tartrato de sodio, propilenglicol, u otros solutos inorgánicos u orgánicos. El cloruro de sodio se prefiere particularmente para los tampones que contienen iones de sodio.

25 Si se desea, es posible mantener la viscosidad de las composiciones en el nivel seleccionado usando un agente espesante farmacéuticamente aceptable. Se prefiere la metilcelulosa, porque es fácil de obtener y resulta económica, y se trabaja fácilmente con ella. Otros agentes espesantes adecuados incluyen, por ejemplo, goma de xantano, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carbómero, y similares. La concentración preferida del espesante dependerá del agente seleccionado. Es una cuestión importante usar una cantidad que logre la viscosidad seleccionada. Obviamente, la elección de los vehículos adecuados y otros aditivos dependerá de la vía exacta de administración y de la naturaleza de la forma de dosificación en particular, por ejemplo, de la forma de dosificación líquida (por ejemplo, si la composición se va a formular en una solución, una suspensión, un gel u otra forma líquida, tal como una forma de liberación a lo largo del tiempo o una forma rellena de líquido).

35 Un método para aumentar potencialmente la supervivencia celular cuando se introducen las células en un sujeto en necesidad de ello consiste en incorporar células madre germinales o su progenie (por ejemplo, derivadas *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*) de interés en un biopolímero o polímero sintético. Dependiendo del estado del sujeto, la zona de la inyección podría resultar inhóspita para la siembra y el crecimiento celular, debido a la cicatrización u otros impedimentos. Los ejemplos de biopolímero incluyen, pero sin limitación, células mezcladas con fibronectina, fibrina, fibrinógeno, trombina, colágeno y proteoglicanos. Este se podría construir con o sin factores de expansión o diferenciación incluidos. Además, estos podrían estar en suspensión, pero el tiempo de residencia en los sitios sometidos al flujo sería nominal. Otra alternativa es un gel tridimensional con células atrapadas en los intersticios de la mezcla biopolimérica celular. Una vez más, se podrían incluir factores de expansión o diferenciación con las células. Estos se podrían desplegar por inyección a través de diversas vías descritas en el presente documento.

45 Los expertos en la materia reconocerán que se han de seleccionar componentes de las composiciones que sean químicamente inertes y no que no afecten a la viabilidad ni a la eficacia de las células madre germinales o sus células progenitoras como se describe en la presente invención. Esto no presentará ningún problema para los expertos en los principios químicos y farmacéuticos, o los problemas se podrán evitar fácilmente mediante la consulta de textos convencionales o mediante experimentos sencillos (sin la necesidad de realizar experimentación compleja), a partir de la presente divulgación y los documentos citados en la misma.

55 Una consideración relativa al uso terapéutico de las células madre germinales y de su progenie es la cantidad de células necesaria para lograr un efecto óptimo. En estudios actuales realizados en seres humanos de células de médula ósea mononucleares autólogas, se han usado dosis empíricas que varían de 1 a 4×10^7 células con resultados alentadores. Sin embargo, los diferentes escenarios pueden requerir la optimización de la cantidad de células inyectadas en un tejido de interés, tal como el tejido ovárico. Por lo tanto, la cantidad de células por administrar variará según el sujeto que se esté tratando. Preferentemente, se pueden administrar de 10^2 a 10^6 , más preferentemente de 10^3 a 10^5 , y aún más preferentemente 10^4 células madre a un sujeto humano. Sin embargo, la determinación exacta de lo que se consideraría una dosis eficaz puede basarse en factores individuales para cada paciente, incluyendo el tamaño, edad, sexo, peso y estado del paciente en particular. Se pueden administrar tan pocas como 100-1.000 células para ciertas aplicaciones deseadas entre los pacientes seleccionados. Por lo tanto, las dosis se pueden determinar fácilmente por los expertos en la materia a partir de la presente divulgación y el conocimiento en la técnica.

65 Otra consideración relativa al uso de células madre germinales o de sus células progenitoras es la pureza de la población. Las células de ovario, por ejemplo, comprenden poblaciones mixtas de células que se pueden purificar

hasta un grado suficiente para producir un efecto deseado. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente el porcentaje de células madre germinales o de sus células progenitoras de una población usando diversos métodos bien conocidos, tales como la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Los intervalos preferidos de pureza en las poblaciones que comprenden células madre germinales o sus células progenitoras son del aproximadamente 50 al aproximadamente 55 %, del aproximadamente 55 al aproximadamente 60 %, y del aproximadamente 65 al aproximadamente 70 %. Más preferentemente, la pureza es del aproximadamente 70 al aproximadamente 75 %, del aproximadamente 75 al aproximadamente 80 %, del aproximadamente 80 al aproximadamente 85 %; y aún más preferentemente, la pureza es del aproximadamente 85 al aproximadamente 90 %, del aproximadamente 90 al aproximadamente 95 %, y del aproximadamente 95 al aproximadamente 100 %. La pureza de las células madre germinales o de sus células progenitoras se puede determinar de acuerdo con el perfil de marcador genético dentro de una población. Las dosis pueden ser fácilmente ajustadas por los expertos en la materia (por ejemplo, una reducción en la pureza puede requerir un aumento de la dosis).

El experto en la materia puede determinar fácilmente la cantidad de células, y aditivos, vehículos y/o portadores opcionales de las composiciones y que se van a administrar en los métodos de la invención. Por lo general, no hay ningún aditivo (además de la/s célula/s madre y/o el/los agente/s activo/s) presente en una cantidad del 0,001 al 50 % (en peso) de solución en solución salina tamponada con fosfato, y el principio activo está presente en el orden de los microgramos a los miligramos, tal como del aproximadamente 0,0001 al aproximadamente 5 % en peso, preferentemente del aproximadamente 0,0001 al aproximadamente 1 % en peso, más preferentemente del aproximadamente 0,0001 al aproximadamente 0,05 % en peso o del aproximadamente 0,001 al aproximadamente 20 % en peso, preferentemente del aproximadamente 0,01 al aproximadamente 10 % en peso, y todavía más preferentemente del aproximadamente 0,05 al aproximadamente 5 % en peso. Por supuesto, para cualquier composición por administrar a un animal o ser humano, y para cualquier método particular de administración, se prefiere determinar, por tanto: la toxicidad, tal como mediante la determinación de la dosis letal (DL) y la DL₅₀ en un modelo animal adecuado, por ejemplo, roedor tal como ratón; y, la dosis de la o las composiciones, la concentración de los componentes en la misma y el momento de administración de la o las composiciones que generen una respuesta adecuada. Dichas determinaciones no requieren experimentación excesiva gracias al conocimiento del experto en la materia, la presente divulgación y los documentos citados en el presente documento. Y, el momento de las administraciones secuenciales se puede determinar sin experimentación excesiva.

II. Modulación de células madre germinales y producción de ovocitos

En el presente documento, se describen métodos de producción de ovocitos, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. La producción de ovocitos se puede aumentar mediante el aumento del número de células madre germinales femeninas o de las células progenitoras derivadas de células madre germinales femeninas. El número de células madre germinales femeninas o células progenitoras derivadas de células madre germinales femeninas se puede aumentar mediante el aumento de la supervivencia o de la proliferación de las células madre germinales femeninas o células progenitoras derivadas de células madre germinales femeninas existentes.

Los agentes (por ejemplo, agentes de expansión) que aumentan la proliferación o la supervivencia de las células madre germinales femeninas o de las células progenitoras derivadas de células madre germinales femeninas incluyen, pero sin limitación, una hormona o factor de crecimiento (por ejemplo, un IGF, TGF, BMP, proteína Wnt o FGF), una molécula de señalización celular (por ejemplo, S1P o RA), o un compuesto farmacológico o farmacéutico (por ejemplo, un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de la apoptosis tal como inhibidor de Bax o inhibidor de caspasa, un inhibidor de la producción de óxido nítrico o un inhibidor de la actividad de HDAC).

Los agentes que comprenden factores de crecimiento son conocidos en la técnica por aumentar la proliferación o la supervivencia de las células madre. Por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.750.376 y 5.851.832 describen métodos para el cultivo y la proliferación *in vitro* de células madre neuronales usando TGF. También se ha descrito un papel activo en la expansión y proliferación de las células madre para BMP (Zhu, G. *et al*, (1999) *Dev. Biol.* 215: 118-29 y Kawase, E. *et al*, (2001) "Development" 131: 1365) y las proteínas Wnt (Pazianos, G. *et al*, (2003) *Biotechniques* 35: 1240 y Constantinescu, S. (2003) *J. Cell Mol. Med.* 7: 103). Las patentes de EE.UU. N° 5.453.357 y 5.851.832 describen sistemas de cultivo de células madre proliferativas que utilizan FGF. El contenido de cada una de dichas referencias se incorpora específicamente en el presente documento por referencia por su descripción de los agentes de expansión conocidos en la técnica.

Los agentes que comprenden moléculas de señalización celular también se conocen en la técnica por aumentar la proliferación o supervivencia de las células madre. Por ejemplo, la esfingosina-1-fosfato es conocida por inducir la proliferación de células progenitoras neuronales (Harada, J. *et al*, (2004) *J. Neurochem.* 88: 1026). La solicitud de patente de EE.UU. N° 20030113913 describe el uso de ácido retinoico en la autorrenovación de células madre en cultivo.

Los agentes que comprenden compuestos farmacológicos o farmacéuticos también son conocidos en la técnica por aumentar la proliferación o supervivencia de las células madre. Por ejemplo, los inhibidores de la quinasa glucógeno sintasa mantienen la pluripotencia de las células madre embrionarias a través de la activación de la señalización de Wnt (Sato, N. *et al*, (2004) *Nat Med* 10:55-63). Los inhibidores de la apoptosis (Wang, Y. *et al*, (2004) *Mol. Cell*.

Endocrinol. 218: 165), los inhibidores de óxido nítrico/óxido nítrico sintasa (Matarredona, E. R. *et al.*, (2004) *Brain Res* 995:274) y los inhibidores de las histona desacetilasas (Lee, J. H. *et al.*, (2004) "Genesis" 38: 32- 8) también son conocidos por aumentar la proliferación y/o la pluripotencia. Por ejemplo, el péptido humanina es un inhibidor de la función de Bax que suprime la apoptosis (Guo, B. *et al.*, (2003), *Nature* 423: 456-461).

La producción de ovocitos se puede aumentar aún más mediante el contacto de composiciones que comprenden células madre germinales femeninas o células progenitoras derivadas de células madre germinales femeninas con un agente que diferencie las células madre germinales femeninas o sus células progenitoras en ovocitos (por ejemplo, agentes de diferenciación). Dichos agentes de diferenciación incluyen, pero sin limitación, un factor hormonal o de crecimiento (por ejemplo, TGF, BMP, proteína Wnt, SCF o LIF), una molécula de señalización (por ejemplo, esteroide activador de la meiosis, "FF-MAS") o un agente farmacológico o farmacéutico (por ejemplo, un modulador de la función de la proteína Id o la función del factor de transcripción Snail/Slug).

Los agentes que comprenden factores de crecimiento son conocidos en la técnica por inducir la diferenciación de las células madre. Por ejemplo, TGF- β puede inducir la diferenciación de células madre hematopoyéticas (Ruscetti, F. W. *et al.*, (2001) *Int. J. Hematol.* 74: 18-25). La solicitud de patente de EE.UU. N° 2002142457 describe métodos de diferenciación de los cardiomiocitos usando BMP. Pera *et al.* describen la diferenciación de células madre embrionarias humanas usando BMP-2 (Pera, M. F. *et al.*, (2004) *J. Cell Sci.* 117:1269). La solicitud de patente de EE.UU. N° 20040014210 y la patente de EE.UU. N° 6.485.972 describen métodos de uso de las proteínas Wnt para inducir la diferenciación. La patente de EE.UU. N° 6.586.243 describe la diferenciación de las células dendríticas en presencia de SCF. La patente de EE.UU. N° 6.395.546 describe métodos de generación de neuronas dopaminérgicas *in vitro* a partir de células del sistema nervioso central embrionarias y adultas usando LIF.

Los agentes que comprenden moléculas de señalización también son conocidos por inducir la diferenciación de los ovocitos. FF-Mas es conocido por potenciar la maduración de los ovocitos (Marin Bivens, C. L. *et al.*, (2004) documentos BOR en prensa). El contenido de cada una de dichas referencias se incorpora específicamente en el presente documento por referencia por su descripción de agentes de diferenciación conocidos en la técnica.

También se conocen en la técnica agentes que comprenden compuestos farmacológicos o farmacéuticos que inducen la diferenciación de las células madre. Por ejemplo, los moduladores de Id están implicados en la diferenciación hematopoyética (Nogueira, M. M. *et al.*, (2000) 276:803) y los moduladores de Snail/Slug son conocidos por inducir la diferenciación de células madre (Le Douarin, N. M. *et al.*, (1994) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 685-695; Plescia, C. *et al.*, (2001) "Differentiation" 68: 254-69).

También se describen métodos de reducción de las células madre germinales femeninas o células progenitoras derivadas de células madre germinales femeninas *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, que comprenden poner en contacto células madre germinales femeninas o sus células progenitoras con un agente que reduzca la proliferación celular, inhiba la supervivencia celular o potencie la muerte celular. La proliferación no deseada de las células de la invención puede dar lugar a fenotipos cancerosos y precancerosos (por ejemplo, tumores de células germinales, cáncer de ovario). Dichos métodos se pueden usar para controlar la proliferación no deseada (por ejemplo, el cáncer) o como medidas anticonceptivas mediante la reducción del número de células madre germinales y, opcionalmente, de sus células progenitoras u ovocitos.

Los agentes que reducen la proliferación celular incluyen, pero sin limitación, una hormona o un factor de crecimiento (por ejemplo, TGF- β), un antagonista peptídico de hormonas mitogénicas o factores de crecimiento (por ejemplo, los antagonistas de BMP, PRDC y Gremlin), o un compuesto farmacológico o farmacéutico (por ejemplo, un inhibidor del ciclo celular o un inhibidor de la señalización de los factores de crecimiento).

Los agentes que inhiben la supervivencia celular incluyen, pero sin limitación, una hormona, un factor de crecimiento o una citocina (por ejemplo, un miembro de la superfamilia de TNF proapoptóticos, tales como TNF- α , FasL y TRAIL), un antagonista de la función de los miembros de la familia Bcl-2 pro-supervivencia, una molécula de señalización (por ejemplo, una ceramida) o un compuesto farmacológico o farmacéutico (por ejemplo, un inhibidor de la señalización de los factores de crecimiento). Los miembros de la familia Bcl-2 pro-supervivencia incluyen Bcl-2, Bcl-xl (Cory, S. y Adams, J. M. (2000) *Nat Rev Cancer* 2(9):647-656; Lutz., R. J. (2000) "Cell Survival Apoptosis" 28:51-56), Bcl-W (Gibson, L., *et al.* (1996) "Oncogene" 13, 665-675; Cory, S. y Adams, J. M. (2000) *Nat Rev Cancer* 2(9):647-656), Mcl-1 (Kozopas, K. M., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 90:3516-3520; Reynolds, J. E., *et al.* (1994) *Cancer Res.* 54:6348-6352; Cory, S. y Adams, J. M. (2000) *Nat Rev Cancer* 2(9):647-656) y A1 (Cory, S. y Adams, J. M. (2000) *Nat Rev Cancer* 2(9):647-656; Gonzales, J., *et al.* (2003) "Blood" 101(7):2679-2685; Reed, J. C. (1997) *Nature* 387:773-776).

Los agentes que potencian la muerte celular incluyen, pero sin limitación, un miembro la superfamilia de factores de necrosis tumoral proapoptóticos (por ejemplo, TNF- α , FasL y TRAIL), agonista de la función de los miembros de la familia Bcl-2 proapoptótica y ceramida. Los miembros de la familia Bcl-2 proapoptótica incluyen Bax (Oltvai, Z. N., *et al.* (1993): *Cell* 74: 609-619), Bak (Oltvai, Z. N., *et al.* (1993): *Cell* 74: 609-619), Bak (Chittenden, T., *et al.* (1995) *Nature* 374:733-736), Bid (Luo, X., *et al.* (1998) *Cell* 94:481-490), Hrk (Inohara, N. *et al.* (1997) *EMBO J* 16(7):1686-1694), Bod (Hsu, *et al.* (1998) *Mol Endocrinol.* 12(9):1432-1440), Bim (O'Connor, L., *et al.* (1998) *EMBO J.* 17(2):385-

395), Noxa (Oda, E., *et al.* (2000) *Science* 288, 1053-1058; Yakovlev, A. G., *et al.* (2004) *J Biol Chem* 279(27):28367-28374), puma (Nakano, K. y Vousden, K. H. (2001) *Mol Cell* 7(3):683-694), Bok (Yakovlev, A. G., *et al.* (2004) *J Biol Chem* 279(27):28367-28374; Hsu, S. Y., *et al.* (1997) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 94(23):12401-6) y Bcl-xs (Boise, L. H., *et al.* (1993) *Cell* 74:597-608).

Se conocen varios agentes en la técnica que inhiben la proliferación o la supervivencia celular, o potencian la muerte celular, incluyendo PRDC (Sudo *et al.*, (2004) *J. Biol. Chem.*, publicación avanzada), TNF (Wong, G. *et al.*, (2004) *Exp. Neurol.* 187: 171), FasL (Sakata, S. *et al.*, (2003) *Cell Death Differ.* 10: 676) y TRAIL (Pitti, R. M., *et al.* (1996) *J Biol Chem* 271: 12687-12690; Wiley, S. R., *et al.* (1995) "Immunity" 3: 673-682). La ceramida media la acción del factor de necrosis tumoral en las células hematopoyéticas humanas primitivas (Maguer-Satta, V. *et al.*, (2000) "Blood" 96: 4118-23). Se sabe que el agonista/antagonista de los miembros de la familia Bcl-2 tales como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, A1, Bax, Bak, Bid, Hrk, Bod, Bim, Noxa, Puma, Bok y Bcl-xs inhiben la supervivencia de las células madre (Lindsten, T. *et al.*, (2003) *J. Neurosci.* 23: 11112-9). También se conocen en la técnica agentes que comprenden compuestos farmacológicos o farmacéuticos que inhiben la supervivencia celular. Por ejemplo, los inhibidores de la señalización de los factores de crecimiento, tales como QSulf1, una heparano-sulfato-6-O-endosulfatasa que inhibe la señalización del factor de crecimiento de fibroblastos, pueden inhibir la supervivencia de las células madre (Wang, S. *et al.*, (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 101: 4833).

Los agentes se pueden administrar a los sujetos en necesidad de ellos mediante una variedad de vías de administración. Los métodos de administración, en general, se pueden poner en práctica usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, lo que significa cualquier modo que produzca niveles eficaces de los compuestos activos sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Dichos modos de administración incluyen la administración oral, rectal, tópica, intraocular, bucal, intravaginal, intracisternal, intracerebroventricular, intratraqueal, nasal, transdérmica, dentro de/sobre implantes, por ejemplo, fibras tales como colágeno, bombas osmóticas o injertos que comprendan células transformadas apropiadamente, etc. o vías parenterales. El término "parenteral" incluye la vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o infusión. Las vías intravenosa o intramuscular no son particularmente adecuadas para la terapia a largo plazo ni la profilaxis. Un método particular de administración implica el recubrimiento, la incrustación o la derivatización de fibras tales como fibras de colágeno, polímeros de proteínas, etc., con proteínas terapéuticas. Otras metodologías útiles se describen en Otto, D. *et al.*, *J. Neurosci. Res.* 22: 93-91 y en Otto, D. y Unsicker, K. J. *Neurosci.* 10: 912-1921.

Las aplicaciones *in vitro* y *ex vivo* pueden implicar el cultivo de las células madre germinales o de sus células progenitoras con el agente seleccionado para lograr el resultado deseado.

Los agentes se pueden administrar junto con reactivos adicionales en un kit. Los kits pueden incluir instrucciones para el régimen de tratamiento o ensayo, reactivos, equipos (tubos de ensayo, vasos de reacción, agujas, jeringas, etc.) y patrones para la calibración o realización del tratamiento o del ensayo. Las instrucciones suministradas en un kit se pueden referir a los parámetros de funcionamiento adecuados en forma de una etiqueta o de un prospecto por separado. Opcionalmente, el kit puede comprender además información sobre el patrón o control de manera que la muestra de ensayo se pueda comparar con el patrón o control de la información para determinar si se ha obtenido un resultado consistente.

III. Cultivo

Las células madre germinales de la invención y las células progenitoras derivadas de las células madre germinales se pueden usar para diversas aplicaciones clínicas y preclínicas, que pueden incluir, pero sin limitación, el uso experimental en métodos de detección toxicológica o genómica, así como el tratamiento de las enfermedades desveladas en el presente documento.

En el presente documento, se describen métodos de expansión de células madre germinales femeninas o células progenitoras derivadas de células madre germinales femeninas, *in vitro*, que comprenden poner en contacto una célula madre germinal femenina o su célula progenitora con un agente que potencie la proliferación o la supervivencia celular. Los agentes de expansión pueden ser los mismos que se usan *in vivo* y *ex vivo*, e incluyen, pero sin limitación, una hormona o un factor de crecimiento (por ejemplo, un IGF, TGF, BMP, proteína Wnt o FGF), una molécula de señalización celular (por ejemplo, S1P o RA), o un compuesto farmacológico o farmacéutico (por ejemplo, un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de la apoptosis tal como un inhibidor de Bax o un inhibidor de caspasa, un inhibidor de la producción de óxido nítrico o un inhibidor de la actividad de HDAC).

Las células madre germinales femeninas y sus células progenitoras pueden proporcionar tipos de células cultivadas diferenciadas y no diferenciadas para la detección toxicológica o genómica de alto rendimiento, así como para un uso terapéutico. Las células pueden cultivarse, por ejemplo, en placas de cultivo de 96 pocillos o de múltiples pocillos para proporcionar un sistema para la detección ampliada y de alto rendimiento de, por ejemplo, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento o composiciones farmacéuticas diana en farmacogenómica o farmacogenética. Por lo tanto, se pueden examinar, por ejemplo, citocinas, hormonas, composiciones farmacéuticas y factores de crecimiento de una manera oportuna y rentable para dilucidar sus efectos con mayor claridad.

Las células madre germinales de la invención o las células progenitoras derivadas de las células madre germinales proporcionan además un sistema único en el que las células se pueden diferenciar para formar linajes celulares específicos (por ejemplo, ovocitos). Los cultivos de células (del mismo individuo y de diferentes individuos) se pueden tratar con agentes de diferenciación de interés para estimular la producción de ovocitos, que luego se pueden usar para una variedad de aplicaciones terapéuticas (por ejemplo, la fertilización *in vitro*, la transferencia nuclear de células somáticas).

Es posible evaluar en cultivo la modulación de propiedades de las células madre germinales femeninas o sus células progenitoras, tales como su velocidad de proliferación, su tasa de mortalidad, su diferenciación en ovocitos u otros tipos de células, su longevidad, su idoneidad para la manipulación, el trasplante, el cultivo, la preservación u otras propiedades. Las células aisladas se pueden cultivar en una variedad de medios adecuados para el cultivo celular. Los aditivos incluyen, pero sin limitación, suero, antibióticos (si son necesarios) y moléculas bioactivas como LIF, ligando Kit y β FGF, ligando Flt-3, etc.

La diferenciación de las células madre germinales femeninas o de sus células progenitoras, representada por la entrada meiótica y el desarrollo de los ovocitos, o el desarrollo en otros linajes de células, incluyendo las células somáticas, se puede lograr usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Al igual que con otras células precursoras indiferenciadas o parcialmente diferenciadas, se puede inducir a las células madre germinales o a sus células progenitoras a seguir una determinada vía de desarrollo mediante el cultivo en medio que contenga agentes conocidos en la técnica. Dichos agentes se pueden proporcionar a través de esquemas de "cultivo conjunto", en los que las células que secretan dichos factores se cultivan junto con células madre germinales o sus células progenitoras para dirigir el desarrollo de las células madre germinales o de sus células progenitoras. Estos agentes incluyen, pero sin limitación, los siguientes (con respecto a las vías de señalización biológicas, se incluirán, en cada caso, antagonistas, agonistas u otros moduladores farmacológicos o biológicos de la función): moléculas de la vía Wnt, TGF β ; y/o moléculas de la vía BMP, moduladores de los mecanismos epigenéticos incluyendo vías de modificación de histona (incluyendo, pero sin limitación, acetilación, metilación, etc.), gonadotropinas, hormonas esteroides (incluyendo, pero sin limitación, estrógenos, progesterona, andrógenos, etc.), IGF y/o moléculas de señalización de insulina, leptina y otras moléculas de señalización relacionadas, miembros de la familia de los esfingolípidos (incluyendo, pero sin limitación, esfingosina-1-fosfato, ceramida, etc.), reguladores de la apoptosis (incluyendo, pero sin limitación, inhibidores de caspasa, inhibidor de Bax humana, etc.), moléculas de la vía de Notch, reguladores del ciclo celular incluyendo las denominadas vías celulares de senescencia (incluyendo, pero sin limitación, Bmi-1, el locus Ink4a, etc.), reguladores de las quinasas receptoras y cascadas de quinasas intracelulares, y estrategias que modulan la expresión génica a través de la interferencia de la expresión génica (incluyendo, pero sin limitación, las variantes de ARN de interferencia, tecnologías de morfolino o moléculas de ARN antisentido, etc.). En la Tabla 1, se muestran algunos ejemplos específicos de dichos factores, las células progenitoras/precursoras en las que actúan y los tipos de células resultantes formados.

Tabla 1. Ejemplos seleccionados de agentes de diferenciación

Agente	Progenitor/precursor	Célula diferenciada
Factor de crecimiento endotelial vascular	Célula madre embrionaria	Célula hematopoyética ¹
Sonic Hedgehog	Placa ventral mesencefálica	Neurona motora ²
Factor de crecimiento de tipo insulina II	Célula madre embrionaria	Mioblasto ³
Osteogenina	Osteoprogenitor	Osteoblasto ⁴
Factor de diferenciación de linfocitos T citotóxicos	Célula de bazo	Linfocito T citotóxico ⁵
Catenina β	Célula madre cutánea	Queratinocito folicular ⁶
Proteína morfogénica ósea 2	Célula madre mesenquimal	Adipocitos, Osteoblastos ⁷
Interleucina 2	Precursor de médula ósea	Linfocitos citolíticos naturales ⁸
Factor de crecimiento transformante β	Fibroblasto cardíaco	Miocito cardíaco ⁹
Factor de crecimiento nervioso	Célula cromafina	Neurona simpática ¹⁰
Factor de células madre	Cresta neuronal	Melanocito ¹¹
Interleucina 1	Progenitor mesencefálico	Neurona dopaminérgica ¹²
Factor de crecimiento de fibroblastos 2	GHFT	Lactotrofo ¹³
Ácido retinoico	Leucemia promielocítica	Granulocito ¹⁴
Wnt3	Célula madre embrionaria	Célula hematopoyética ¹⁵

¹Keller, *et al.* (1999) *Exp. Hematol.* 27:777-787.
²Marti, *et al.* (1995) *Nature.* 375:322-325.
³Prellé, *et al.* (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271:631-638.
⁴Amedee, *et al.* (1994) *Differentiation* 58:157-164.
⁵Hardt, *et al.* (1985) *Eur. J. Immunol* 15:472-478.
⁶Hnelsken, *et al.* (2001) *Cell.* 105:533-545.
⁷Ji, *et al.* (2000) *J. Bone Miner. Metab.* 18:132-139.
⁸Migliorati, *et al.* (1987) *J. Immunol.* 138:3618-3625.
⁹Eghbali, *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 88:795-799.
¹⁰Niijima, *et al.* (1995) *J. Neurosci.* 15:1180-1194.

- ¹¹Guo, *et al.* (1997) *Dev. Biol.* 184:61-69.
¹²Ling, *et al.* (1998) *Exp. Neurol.* 149:411-423.
¹³Lopez-Fernandez, *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275:21653-60.
¹⁴Wang, *et al.* (1989) *Leuk. Res.* 13:1091-1097.
¹⁵Lako, *et al.* (2001) *Mech. Dev.* 103:49-59.

Las células de la presente invención pueden proporcionar una variedad de tipos de células, incluyendo tipos de células terminalmente diferenciadas y no diferenciadas, para las técnicas de detección de alto rendimiento usadas para identificar una multitud de agentes biológicos o farmacológicos diana. Es importante destacar que las células madre germinales femeninas o sus células progenitoras proporcionan una fuente de células cultivadas de una variedad de sujetos genéticamente diversos, que pueden responder de manera diferente a los agentes biológicos y farmacológicos.

En el presente documento, se describen métodos de uso de las células madre germinales o de sus células progenitoras descritas en el presente documento para caracterizar las respuestas celulares farmacogenéticas a agentes biológicos o farmacológicos. En el método de uso de células madre germinales o de sus células progenitoras para caracterizar las respuestas celulares farmacogenéticas a agentes biológicos o farmacológicos, o bibliotecas combinatorias de dichos agentes, las células madre germinales o sus células progenitoras se aíslan preferentemente de una población estadísticamente significativa de sujetos, se expanden en cultivo y se ponen en contacto con uno o más agentes biológicos o farmacológicos. Las células madre germinales de la invención o sus células progenitoras, opcionalmente, pueden ser inducidas a diferenciarse, de modo que las células diferenciadas sean la diana deseada por un cierto agente biológico o farmacológico, ya sea antes o después de la expansión en cultivo. Mediante la comparación de una o más respuestas celulares de los cultivos de los sujetos de la población estadísticamente significativa, se pueden determinar los efectos del agente biológico o farmacológico. Los efectos del agente biológico o farmacológico pueden ser la inducción de la apoptosis, los cambios en la expresión génica, el daño cromosómico, y las reducciones o los aumentos de las hormonas que intervienen en la función ovárica.

Como alternativa, se pueden usar células madre germinales genéticamente idénticas, sus células progenitoras o su progenie para detectar compuestos separados, tales como compuestos de una biblioteca combinatoria. Se han descrito sistemas de expresión de genes para su uso en combinación con la detección basada en células de alto rendimiento (Jayawickreme, C. y Kost, T., (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 629-634).

También se describe en el presente documento un órgano obtenido por ingeniería tisular (por ejemplo, ovario), o parte del mismo o corte específico del mismo, o un dispositivo obtenido por ingeniería tisular que comprenda un tejido de interés y, opcionalmente, citocinas, hormonas, factores de crecimiento o factores de diferenciación que induzcan a la diferenciación en un tipo de célula deseada, en el que las células madre germinales de la invención o sus células progenitoras se usan para generar tejidos incluyendo, pero sin limitación, tejido ovárico. Los órganos obtenidos por ingeniería tisular se pueden usar con un armazón biocompatible para soportar el crecimiento celular en una configuración tridimensional, que puede ser biodegradable. Los órganos obtenidos por ingeniería tisular generados a partir de las células madre germinales de la presente invención o de sus células progenitoras se pueden implantar en un sujeto en necesidad de un órgano de reemplazo, o parte o corte específico del mismo.

Los órganos homogéneos, sus partes o células individuales derivadas de los cultivos de células madre germinales o células progenitoras de la invención se pueden implantar en un hospedador. Del mismo modo, los órganos heterogéneos, sus partes o cortes derivados de células madre germinales o células progenitoras inducidos a diferenciarse en múltiples tipos de tejidos se pueden implantar en un sujeto en necesidad de ello. El trasplante puede ser autólogo, de manera que el donante de las células madre a partir de las que se derivan el órgano o las unidades de órgano es el destinatario del tejido obtenido por ingeniería tisular. El trasplante puede ser heterólogo, de manera que el donante de las células madre a partir de las que se derivan el órgano o las unidades de órgano no es el receptor del tejido obtenido por ingeniería tisular.

Una vez transferidos a un hospedador, los órganos obtenidos por ingeniería tisular pueden recuperar la función y la arquitectura del tejido nativo del hospedador. Los órganos obtenidos por ingeniería tisular beneficiarán a los sujetos en una amplia variedad de aplicaciones, incluyendo el tratamiento del cáncer y de otras enfermedades desveladas en el presente documento, defectos congénitos o daño debido a la resección quirúrgica.

Los armazones de polímero que se pueden usar en el desarrollo de los órganos obtenidos por ingeniería tisular derivados de las células madre germinales de la invención funcionan en lugar de un armazón o de una matriz de tejido conjuntivo, y están diseñados para optimizar el intercambio de gases, nutrientes y residuos por difusión. Los armazones de polímero pueden comprender, por ejemplo, una matriz porosa, no tejida, de fibras. El armazón de polímero puede estar conformado para maximizar el área superficial, para permitir la difusión adecuada de nutrientes y factores de crecimiento a las células. Teniendo en cuenta estos parámetros, el experto en la materia podría configurar un armazón de polímero que tuviera un área superficial suficiente para que las células se nutrieran por difusión hasta que los nuevos vasos sanguíneos entrelazaran el tejido obtenido por ingeniería implantado usando métodos conocidos en la técnica. Los armazones de polímero pueden comprender una estructura fibrilar. Las fibras

pueden ser redondas, festoneadas, aplanadas, en forma de estrella, solitarias o entrelazadas con otras fibras. Se pueden usar fibras de ramificación, aumentando el área superficial proporcionalmente al volumen.

A menos que se especifique lo contrario, el término "polímero" incluye polímeros y monómeros que se pueden polimerizar o adherir para formar una unidad integral. El polímero puede ser biodegradable o no biodegradable, normalmente a través de hidrólisis o escisión enzimática. El término "biodegradable" se refiere a materiales que son biorreabsorbibles y/o se degradan y/o se descomponen por degradación mecánica tras la interacción con un entorno fisiológico en componentes que son metabolizables o excretables, en un periodo de tiempo de minutos a tres años, preferentemente inferior a un año, a la vez que mantiene la integridad estructural necesaria. Como se usa en referencia a los polímeros, el término "degradar" se refiere a la escisión de la cadena polimérica, de modo que el peso molecular permanece aproximadamente constante a nivel del oligómero, permaneciendo partículas de polímero tras la degradación.

Los materiales adecuados para la fabricación de armazones de polímero incluyen el ácido poliláctico (PLA), ácido poli-L-láctico (PLLA), ácido poli-D-láctico (PDLA), poliglicólido, ácido poliglicólico (PGA), poliláctido-co-glicólido (PLGA), polidioxanona, poligluconato, copolímeros de ácido poliláctico y óxido de polietileno, celulosa modificada, colágeno, polihidroxibutirato, ácido polihidroxipropiónico, polifosfoéster, ácido poli(α -hidroxi), policaprolactona, policarbonatos, poliamidas, polianhídridos, poliaminoácidos, polioctoésteres, poliacetales, policianoacrilatos, uretanos degradables, poliácridatos de poliéster alifáticos, polimetacrilato, acetatos de celulosa sustituidos con acilo, poliuretanos no degradables, poliestirenos, cloruro de polivinilo, fluoruro de polivinilo, imidazol de polivinilo, poliolefinas clorosulfonadas, óxido de polietileno, alcohol polivinílico, teflón RTM, nylon de silicio y materiales con memoria de forma tales como poli (estireno-bloque-butadieno), polinorborno, hidrogeles, aleaciones metálicas y oligo(ϵ -caprolactona)diol como segmento de cambio/oligo(*p*-dioxianona)diol como reticulación física. Se pueden obtener otros polímeros adecuados por referencia a "The Polymer Handbook", III Edición (Wiley, N.Y., 1989).

Al armazón polimérico, se pueden incorporar, o se pueden proporcionar en combinación con el mismo, factores, entre los que se incluyen, pero sin limitación, nutrientes, factores de crecimiento, inductores de la diferenciación o la desdiferenciación, productos de secreción, inmunomoduladores, inhibidores de la inflamación, factores de regresión, hormonas u otros compuestos biológicamente activos.

IV. Ensayos de selección

En el presente documento, se describen métodos de identificación de moduladores, es decir, compuestos o agentes candidatos o de ensayo (por ejemplo, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, peptoides, moléculas pequeñas u otros fármacos) que modulan las células madre germinales femeninas o las células progenitoras de células madre germinales femeninas. Los agentes así identificados se pueden usar para modular, por ejemplo, la proliferación, la supervivencia y la diferenciación de una célula madre germinal femenina o su célula progenitora, por ejemplo, en un protocolo terapéutico.

Los agentes de ensayo descritos en el presente documento se pueden obtener por separado o usando cualquiera de las numerosas metodologías de los métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, incluyendo: bibliotecas biológicas; bibliotecas de peptoides (bibliotecas de moléculas que tienen las funcionalidades de péptidos, pero con una nueva estructura no peptídica que son resistentes a la degradación enzimática pero que, sin embargo, siguen siendo bioactivas; véase, por ejemplo, Zuckermann, R. N. (1994) *et al.*, *J. Med. Chem.* 37: 2678-85); bibliotecas de fase sólida o fase de solución paralelas espacialmente direccionables; métodos de bibliotecas sintéticas que requieren desconvolución; el método de biblioteca "de un compuesto de una perla"; y métodos de bibliotecas sintéticas que usan selección por cromatografía de afinidad. Las metodologías de biblioteca biológica y biblioteca de peptoides se limitan a las bibliotecas de compuestos de péptidos, mientras que las otras cuatro metodologías son aplicables a bibliotecas de péptidos, oligómeros no peptídicos o pequeñas moléculas (Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12: 145).

Los ejemplos de métodos de síntesis de bibliotecas moleculares se pueden encontrar en la técnica, por ejemplo, en: DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90:6909; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91:11422; Zuckermann *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho *et al.* (1993) *Science* 261:1303; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; y Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233.

Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (por ejemplo, Honghten (1992), *Biotichniques* 13:412-421), o sobre perlas (Lam (1991), *Nature* 354:82-84), chips (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), bacterias (Ladner, patente de EE.UU. N° 5.223.409), esporas (Ladner, patente de EE.UU. N° 5.223.409), plásmidos (Cull *et al.* (1992) *Proc Natl Acad Sc i EE.UU.* 89:1865-1869) o en fagos (Scott y Smith (1990) *Science* 249:386-390; Devlin (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla *et al.*, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310; Ladner *supra*).

Los compuestos químicos que se usarán como agentes de ensayo (es decir, posible inhibidor, antagonista, agonista) se pueden obtener del mercado o se pueden sintetizar a partir de materiales de partida fácilmente disponibles

- usando técnicas convencionales de síntesis y metodologías conocidas por los expertos habituales en la materia. Las transformaciones de química sintética y las metodologías de grupos protectores (protección y desprotección) útiles en la síntesis de los compuestos identificados mediante los métodos descritos en el presente documento son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellas tales como las descritas en R. Larock (1989)
- 5 "Comprehensive Organic Transformations", VCH Publishers; T. W. Greene y P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", II ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser y M. Fieser, "Fieser y Fieser's Reagents for Organic Synthesis", John Wiley and Sons (1994); y L. Paquette, ed., "Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis", John Wiley and Sons (1995), y las ediciones posteriores de los mismos.
- 10 En un aspecto, los compuestos son moléculas orgánicas pequeñas, es decir, compuestos que tienen peso molecular inferior a 1.000 uma, como alternativa, de 350 a 750 uma. En otros aspectos, los compuestos son: (i) aquellos que son no peptídicos; (ii) aquellos que tienen entre 1 y 5, ambos inclusive, grupos de anillo heterocíclico o heteroarilo, que pueden tener sustituyentes adicionales; (iii) aquellos en sus respectivas formas de sal farmacéuticamente aceptables; o (iv) aquellos que son peptídicos.
- 15 El término "heterocíclico" se refiere a un sistema anular no aromático monocíclico de 3 a 8 miembros, bicíclico de 8 a 12 miembros o tricíclico de 11 a 14 miembros que tiene de 1 a 3 heteroátomos si es monocíclico, de 1 a 6 heteroátomos si es bicíclico o de 1 a 9 heteroátomos si tricíclico, siendo dichos heteroátomos seleccionados entre O, N o S (por ejemplo, átomos de carbono y 1-3, 1-6 o 1-9 heteroátomos de N, O o S si es monocíclico, bicíclico o tricíclico, respectivamente), en el que 0, 1, 2 o 3 átomos de cada anillo pueden estar sustituidos por un sustituyente.
- 20 El término "heteroarilo" se refiere a un sistema anular aromático monocíclico de 5 a 8 miembros, bicíclico de 8 a 12 miembros o tricíclico de 11 a 14 miembros que tiene de 1 a 3 heteroátomos si es monocíclico, de 1 a 6 heteroátomos si es bicíclico o de 1 a 9 heteroátomos si tricíclico, siendo dichos heteroátomos seleccionados entre O, N o S (por ejemplo, átomos de carbono y 1-3, 1-6 o 1-9 heteroátomos de N, O o S si es monocíclico, bicíclico o tricíclico, respectivamente), en el que 0, 1, 2, 3 o 4 átomos de cada anillo pueden estar sustituidos con un sustituyente.
- 25 El término "sustituyentes" se refiere a un grupo "sustituido" en un grupo alquilo, cicloalquilo, arilo, heterocíclico o heteroarilo en cualquier átomo de dicho grupo. Los sustituyentes adecuados incluyen, sin limitación, alquilo, alquenilo, alquínico, alcoxi, halo, hidroxilo, ciano, nitro, amino, SO₃H, perfluoroalquilo, perfluoroalcoxi, metilendioxi, etilendioxi, carboxilo, oxo, tioxi, imino (alquilo, arilo, aralquilo), S(O)_nalquilo (donde n es 0-2), S(O)_narilo (donde n es 0-2), S(O)_nheteroarilo (donde n es 0-2), S(O)_nheterocíclico (donde n es 0-2), amina (mono-, di-, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, heteroaralquilo y combinaciones de los mismos), éster (alquilo, aralquilo, heteroaralquilo), amida (mono-, di-, alquilo, aralquilo, heteroaralquilo y combinaciones de los mismos), sulfonamida (mono-, di-, alquilo, aralquilo, heteroaralquilo y combinaciones de los mismos), arilo no sustituido, heteroarilo no sustituido, heterocíclico no sustituido y cicloalquilo no sustituido. En un aspecto, los sustituyentes de un grupo son independientemente uno cualquiera o cualquier subconjunto de los sustituyentes anteriormente mencionados.
- 30 Las combinaciones de sustituyentes y variables de los compuestos descritas en el presente documento son solo aquellas que dan como resultado la formación de compuestos estables. El término "estable", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que poseen estabilidad suficiente para permitir su fabricación y que mantienen la integridad del compuesto durante un período de tiempo suficiente para que sea útil para los fines detallados en el presente documento (por ejemplo, transporte, almacenamiento, ensayo, administración terapéutica a un sujeto).
- 35 Los compuestos descritos en el presente documento pueden contener uno o más centros asimétricos y, por lo tanto, se pueden presentar en forma de racematos y mezclas racémicas, enantiómeros individuales, diastereómeros individuales y mezclas diastereoméricas. La totalidad de dichas formas isoméricas de estos compuestos se incluyen expresamente en la presente invención. Los compuestos descritos en el presente documento también se pueden representar en múltiples formas tautoméricas, estando todas ellas incluidas en el presente documento. Los compuestos también pueden darse en las formas isoméricas de doble enlace *cis* o *trans* o *E* o *Z*. La totalidad de dichas formas isoméricas de dichos compuestos se incluyen expresamente en la presente invención.
- 40 Los agentes de ensayo también pueden ser péptidos (por ejemplo, factores de crecimiento, citocinas, ligandos receptores).
- 45 Los métodos de selección puede implicar la identificación de un agente que aumente la proliferación o la supervivencia de las células madre germinales femeninas o de células progenitoras de células madre germinales femeninas. Por lo general, dichos métodos implican poner en contacto una población de las células madre germinales femeninas o células progenitoras con un agente de ensayo en cultivo, y cuantificar el número de nuevas células madre o células progenitoras producidas como resultado de ello. Simultáneamente, se puede ensayar la comparación con un control no tratado. Cuando se detecta un aumento en el número de células madre o células progenitoras con respecto al control, se determina que el agente de ensayo tiene la actividad deseada.
- 50 En la práctica de los métodos descritos en el presente documento, puede ser deseable emplear una población purificada de células madre germinales femeninas o sus células progenitoras. Una población purificada de células
- 55
- 60
- 65

madre germinales femeninas o células progenitoras de células madre germinales femeninas tiene aproximadamente un 50-55 %, 55-60 %, 60-65 % y 65-70 % de pureza. Más preferentemente, la pureza es de aproximadamente 70-75 %, 75-80 %, 80-85 %; y aún más preferentemente, la pureza es de aproximadamente 85-90 %, 90-95 % y 95-100 %.

En otros métodos, el agente de ensayo se ensaya usando una muestra biológica en lugar de una población purificada de células madre o células progenitoras. La expresión "muestra biológica" incluye tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Las muestras biológicas preferidas incluyen médula ósea, sangre periférica y tejido ovárico.

También se pueden detectar mayores cantidades de células madre germinales femeninas o células progenitoras de células madre germinales femeninas mediante un aumento en la expresión génica de marcadores genéticos que incluyen un SSEA (por ejemplo, SSEA-1), *Oct-4*, *Dazl*, *Stella* y *Vasa*. El nivel de expresión se puede medir de una serie de maneras, incluyendo, pero sin limitación: la medición del ARNm codificado por marcadores genéticos; la medición de la cantidad de proteína codificada por los marcadores genéticos; o la medición de la actividad de la proteína codificada por los marcadores genéticos.

El nivel de ARNm correspondiente a un marcador genético se puede determinar tanto mediante formatos tanto *in situ* como *in vitro*. El ARNm aislado puede usarse en ensayos de hibridación o de amplificación que incluyen, pero sin limitación, análisis Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa y matrices de sondas. Un método de diagnóstico para la detección de los niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que pueda hibridarse con el ARNm codificado por el gen objeto de la detección. La sonda de ácido nucleico es suficiente para hibridarse específicamente en condiciones rigurosas con ARNm o ADN genómico. La sonda se puede disponer en una dirección de una matriz, por ejemplo, una matriz descrita más adelante. En el presente documento, se describen otras sondas adecuadas para su uso en los ensayos de diagnóstico.

En un formato, se inmoviliza ARNm (o ADNc) sobre una superficie y se pone en contacto con las sondas, por ejemplo, procesando el ARNm aislado sobre un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En un formato alternativo, las sondas se inmovilizan en una superficie y el ARNm (o ADNc) se pone en contacto con las sondas, por ejemplo, en una matriz de chips de genes bidimensional descrita más adelante. El experto en la materia puede adaptar métodos de detección de ARNm conocidos para su uso en la detección del nivel de ARNm codificado por los marcadores genéticos descritos en el presente documento.

Se puede evaluar el nivel de ARNm de una muestra con amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante RT-PCR (Mullis (1987) Patente de EE.UU. N° 4.683.202), reacción en cadena de la ligasa (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 88: 189-193), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli *et al* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 87: 1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh *et al* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86: 1173-1177), Q-β Replicasa (Lizardi *et al* (1988) *Bio/Technology* 6:1197), replicación de círculo rodante (Lizardi *et al*, patente de EE.UU. N° 5.854.033) o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas conocidas en la materia. Como se usan en el presente documento, los cebadores de amplificación se definen como un par de moléculas de ácido nucleico que pueden hibridarse con las regiones 5' o 3' de un gen (hebras positivas y negativas, respectivamente, o viceversa) y contienen una región corta entre ellas. En general, los cebadores de amplificación son de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos de longitud y flanquean una región de aproximadamente 50 a 200 nucleótidos de longitud. En condiciones apropiadas y con los reactivos apropiados, dichos cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

Para los métodos *in situ*, se puede preparar/procesar una muestra de células o tejido, e inmovilizarla sobre un soporte, normalmente, un portaobjetos de vidrio, y luego ponerla en contacto con una sonda que se pueda hibridar con el ARNm que codifica el marcador genético que se esté analizando.

Los métodos de selección pueden implicar la identificación de un agente que aumente la diferenciación de las células madre germinales femeninas o células progenitoras de las células madre germinales femeninas en ovocitos. Dichos métodos normalmente implicarán poner en contacto una población de las células madre o células progenitoras con un agente de ensayo en cultivo, y cuantifica el número de nuevos ovocitos producidos como resultado de ello. Simultáneamente, se puede evaluar la comparación con un control no tratado. Cuando se detecta un aumento en el número de ovocitos con respecto al control, se determina que el agente de ensayo tiene la actividad deseada. El agente de ensayo también puede ensayarse usando una muestra biológica (por ejemplo, tejido de ovario). Se pueden realizar ensayos posteriores usando una población de células madre o células progenitoras para distinguir la actividad funcional del agente (por ejemplo, la diferenciación en lugar del aumento de la proliferación o supervivencia) donde el resultado es ambiguo.

Se pueden detectar los aumentos de las cantidades de ovocitos mediante una reducción de la expresión génica de los marcadores genéticos de células madre o progenitoras que incluyen un SSEA (por ejemplo, SSEA-1), *Oct-4*, *Dazl*, *Stella* y *Vasa*, o un aumento de los marcadores de ovocitos tales como HDAC6, GDF9 y ZP3.

Los métodos de selección descritos en el presente documento pueden implicar la identificación de un agente que reduzca la proliferación o la supervivencia de las células madre germinales femeninas o células progenitoras de células madre germinales femeninas. Por lo general, dichos métodos implican poner en contacto una población de las células madre o células progenitoras, o una muestra biológica que contenga dichas células, con un agente de ensayo en cultivo, y cuantificar el número de células madre o células progenitoras perdidas como resultado de ello. Simultáneamente, se puede evaluar la comparación con un control no tratado. Cuando se detecta una reducción del número de células madre o células progenitoras con respecto al control, se determina que el agente de ensayo tiene la actividad deseada.

IV. Usos médicos

Las células madre germinales femeninas de la invención o sus células progenitoras se pueden usar en una variedad de aplicaciones terapéuticas (por ejemplo, la generación de ovocitos para el restablecimiento *in vivo* o procedimientos *ex vivo*, incluyendo la fertilización *in vitro* y la transferencia nuclear de células somáticas). Por consiguiente, los métodos descritos en el presente documento se refieren al uso de células madre germinales femeninas no embrionarias o células progenitoras derivadas de células madre germinales femeninas para, entre otras cosas, ampliar la reserva de folículos como un medio para mejorar o restablecer la fertilidad en las mujeres y para mejorar los síntomas y las consecuencias de la menopausia.

Por lo tanto, se describe una célula madre germinal femenina, su célula progenitora o la progenie de la misma, para su uso en el tratamiento de la infertilidad, en el que la célula se injerta en un tejido y se diferencia en un ovocito, que más tarde se puede proporcionar para la fertilización (por ejemplo, después de la ovulación o la fertilización *in vitro*). Preferentemente, el tejido es tejido ovárico, sin embargo, otros tejidos del organismo pueden acoger la célula implantada que, a su vez, genera un ovocito. Se pueden extraer y usar ovocitos albergados en los tejidos extraováricos para los procedimientos incluyendo la fecundación *in vitro*.

También se describe un agente que aumenta la producción o la supervivencia de células madre germinales femeninas o de sus células progenitoras para su uso en el tratamiento de la infertilidad, en el que el uso comprende poner en contacto tejido ovárico de un sujeto femenino. Como se ha descrito anteriormente, es posible aumentar la producción de ovocitos mediante el aumento del número (es decir, de la proliferación) o del tiempo de vida (es decir, de la supervivencia) de las células madre germinales femeninas o de sus células progenitoras, así como mediante la diferenciación de las células madre germinales femeninas o de sus células progenitoras en ovocitos. Dichos ovocitos se pueden proporcionar más tarde para la fertilización posterior a la ovulación de la paciente.

También se describe una célula madre germinal femenina, o su célula progenitora, para su uso en la reparación del tejido ovárico dañado, uso en el que la célula se proporciona al tejido, la célula se injerta en el tejido y se diferencia en un ovocito. El daño se puede causar, por ejemplo, por la exposición a factores citotóxicos, fármacos quimioterapéuticos, radiación, privación hormonal, privación de factores de crecimiento, privación de citocinas, anticuerpos del receptor celular, y similares. Los fármacos quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación, 5-FU, vinblastina, actinomicina D, etopósido, cisplatino, metotrexato, doxorubicina, entre otros. El daño también se puede causar por enfermedades que afectan a la función ovárica, incluyendo, pero sin limitación, cáncer, enfermedad de ovario poliquístico, trastornos genéticos, trastornos inmunológicos, trastornos metabólicos y similares.

También se describe una célula madre germinal femenina, o su célula progenitora, para su uso en el restablecimiento de la función de los ovarios en una paciente menopáusica, que comprende proporcionar una célula madre germinal femenina o su célula progenitora, a una paciente, de modo que la célula se injerta en el ovario y se diferencia en un ovocito. La paciente menopáusica puede estar en una etapa bien de peri- o post-menopausia, estando dicha menopausia causada por procesos normales (por ejemplo, por envejecimiento) o por procesos patológicos (por ejemplo, cirugía, enfermedad, daños de ovario).

La función ovárica en una mujer post-menopáusica también se puede restablecer mediante el contacto del tejido ovárico de la paciente con un agente que aumente la cantidad de células madre germinales femeninas o de sus células progenitoras (por ejemplo, aumentando el número o la duración de la vida de las células madre germinales femeninas, así como aumentando la diferenciación de las células madre germinales femeninas en ovocitos).

El restablecimiento de la función ovárica puede aliviar los síntomas adversos y las complicaciones asociados con los trastornos de la menopausia, incluyendo, pero sin limitación, trastornos somáticos tales como osteoporosis, enfermedad cardiovascular, disfunción sexual somática, sofocos, sequedad vaginal, trastornos del sueño, depresión, irritabilidad, pérdida de la libido, desequilibrios hormonales, y similares, así como trastornos cognitivos tales como pérdida de memoria; trastornos emocionales y depresión.

Además, se describe un método de anticoncepción en un sujeto femenino que comprende poner en contacto tejido ovárico del sujeto con un agente que reduce la proliferación, la función o la supervivencia de las células madre germinales femeninas o de sus células progenitoras.

Las células madre germinales de la invención, sus células progenitoras, o su progenie derivada *in vitro*, se pueden administrar como se ha descrito anteriormente. Antes de la administración, las células madre germinales, sus células progenitoras o su progenie derivada *in vitro*, descritas en el presente documento, opcionalmente, se pueden modificar genéticamente, *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*, mediante la introducción de ADN o ARN o proteína heterólogos en la célula mediante una variedad de métodos recombinantes conocidos por los expertos en la materia. Estos métodos se agrupan, en general, en cuatro categorías principales: (1) transferencia viral, incluyendo el uso de vectores virales de ADN o ARN, tales como retrovirus (incluyendo lentivirus), virus de simio 40 (SV40), adenovirus, virus Sindbis y el virus del papiloma bovino, por ejemplo; (2) transporte de productos químicos, incluyendo la transfección con fosfato de calcio y los métodos de transfección de DEAE-dextrano; (3) transferencia de fusión de membranas, usando vesículas membranosas cargadas con ADN tales como liposomas, glóbulos rojos fantasma y protoplastos, por ejemplo; y (4) técnicas de transferencia física tales como microinyección, electroporación o transferencia directa de ADN "desnudo".

Las células madre germinales de la invención, sus células progenitoras, o su progenie derivada *in vitro*, se pueden modificar genéticamente mediante la inserción de ADN aislado preseleccionado, mediante la sustitución de un segmento del genoma celular con ADN aislado preseleccionado o mediante la delección de o la inactivación de al menos una porción del genoma celular de la célula. La delección o inactivación de al menos una porción del genoma celular se puede lograr mediante una variedad de medios, incluyendo, pero sin limitación, la recombinación genética, mediante tecnología antisentido (que puede incluir el uso de ácidos nucleicos peptídicos o PNA), o mediante tecnología de ribozimas, por ejemplo. El genoma modificado puede contener la secuencia genética de un gen marcador seleccionable o rastreable que se expresa de modo que la célula con genoma modificado, o su progenie, se pueda diferenciar de las células que tienen un genoma no modificado. Por ejemplo, el marcador puede ser una proteína fluorescente verde, roja o amarilla, β -galactosidasa, el gen de resistencia a la neomicina, dihidrofolato reductasa (DHFR) o higromicina, pero no se limita a dichos ejemplos.

En algunos casos, el defecto subyacente de un estado patológico es una mutación en el ADN que codifica una proteína tal como una proteína metabólica. Preferentemente, el polipéptido codificado por el ADN heterólogo carece de una mutación asociada con un estado patológico. En otros casos, un estado patológico está asociado con una reducción de la expresión de una proteína. Una célula madre germinal modificada genéticamente, o su progenie, pueden contener ADN que codifique dicha proteína bajo el control de un promotor que dirija la expresión potente de la proteína recombinante. Como alternativa, la célula puede expresar un gen que pueda ser regulado por un promotor inducible u otro mecanismo de control, donde las condiciones requieran una regulación muy controlada o una programación de la expresión de una proteína, una enzima u otro producto celular. Dichas células madre, cuando se trasplantan en un sujeto que padece expresión anormalmente baja de la proteína, producen altos niveles de la proteína para conferir un beneficio terapéutico. Por ejemplo, la célula madre germinal de la invención, sus células progenitoras o su progenie derivada *in vitro* pueden contener ADN heterólogo que codifique los genes que se vayan a expresar, por ejemplo, en terapia génica. Las células madre germinales de la invención, sus células progenitoras o su progenie pueden contener ADN heterólogo que codifique *Atm*, el gen responsable de la enfermedad humana Ataxia-telangiectasia, en la que se interrumpe la fertilidad. La administración de *Atm* mediante células madre germinales, sus células progenitoras o su progenie derivada *in vitro* puede aliviar aún más los defectos de la función ovárica. También se prevé el ADN que codifica un producto génico que altera las propiedades funcionales de las células madre germinales en ausencia de cualquier estado patológico. Por ejemplo, sería beneficiosa la administración de un gen que inhibiera la apoptosis o impidiera la diferenciación.

La inserción de una o más secuencias de ADN previamente seleccionadas se puede realizar mediante recombinación homóloga o mediante la integración viral en el genoma de la célula hospedadora. La secuencia del gen deseado también se puede incorporar en la célula, en particular, en su núcleo, usando un vector de expresión de plásmido y una secuencia de localización nuclear. Los métodos para dirigir polinucleótidos al núcleo se han descrito en la técnica. El material genético puede introducirse usando promotores que permitan inducir el gen de interés positiva o negativamente usando ciertos productos químicos/fármacos, eliminarlo tras la administración de un determinado fármaco/compuesto químico o poder marcarlo para permitir la inducción mediante la expresión de productos químicos (incluyendo, pero sin limitación, el receptor de estrógeno mutado sensible al tamoxifeno) en compartimentos celulares específicos (incluyendo, pero sin limitación, la membrana celular).

Se puede usar la transfección con fosfato de calcio para introducir ADN de plásmido que contenga un gen o un polinucleótido diana en células madre germinales cultivadas o aisladas, o sus células progenitoras, y es un método convencional de transferencia de ADN para los expertos en la materia. Se puede preferir la transfección DEAE-dextrano, que también es conocida por los expertos en la materia, frente a la transfección de fosfato de calcio, cuando se desee la transfección transitoria, ya que a menudo es más eficaz. Dado que las células de la presente invención son células aisladas, la microinyección puede ser particularmente eficaz para la transferencia de material genético a las células. Este método es ventajoso debido a que proporciona la administración del material genético deseado directamente al núcleo, evitando la degradación tanto lisosomal como citoplasmática del polinucleótido inyectado. Esta técnica se ha usado eficazmente para realizar la modificación de la línea germinal en animales transgénicos. Las células de la presente invención también se pueden modificar genéticamente usando la electroporación.

La administración liposomal de ADN o ARN para modificar genéticamente las células se puede realizar usando liposomas catiónicos, que forman un complejo estable con el polinucleótido. Para la estabilización del complejo de liposomas, se pueden añadir dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE) o dioleoil-fosfatidilcolina (DOPQ). Los reactivos disponibles en el mercado para la transferencia liposomal incluyen la lipofectina (Life Technologies). La lipofectina, por ejemplo, es una mezcla del lípido catiónico cloruro de *N*-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-*N*-*N*-*N*-trimetilamonio y DOPE. Los liposomas pueden portar trozos más grandes de ADN, en general, pueden proteger al polinucleótido de la degradación y pueden ser dirigidos a células o tejidos específicos. La eficacia de la transferencia de genes mediada por lípidos catiónicos se puede mejorar mediante la incorporación de componentes de la envoltura viral o celular purificados, tales como la glucoproteína G purificada de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G). Las técnicas de transferencia génica que han demostrado ser eficaces para la administración de ADN en líneas celulares de mamífero primarias y establecidas usando ADN recubierto con lipopoliamina se pueden usar para introducir ADN diana en las células madre germinales descritas en el presente documento.

Se puede inyectar ADN desnudo de plásmido directamente en una masa tisular formada por células diferenciadas de las células madre germinales aisladas o sus células progenitoras. Esta técnica ha demostrado ser eficaz en la transferencia de ADN de plásmido al tejido muscular esquelético, donde se ha observado la expresión en el músculo esquelético de ratón durante más de 19 meses después de una sola inyección intramuscular. Las células que se dividen más rápidamente absorben el ADN desnudo de plásmido de manera más eficaz. Por lo tanto, es ventajoso estimular la división celular antes del tratamiento con ADN de plásmido. También se puede usar la transferencia de genes con microproyectiles para transferir genes a las células madre *in vitro* o *in vivo*. El procedimiento básico para la transferencia de genes con microproyectiles fue descrito por J. Wolff en "Gene Therapeutics" (1994), página 195. Del mismo modo, ya se han descrito previamente técnicas de inyección de micropartículas, y los métodos son conocidos por los expertos en la materia. También se pueden unir péptidos señal al ADN de plásmido para dirigir el ADN al núcleo y obtener una expresión más eficaz.

Se usan vectores virales para modificar genéticamente las células madre germinales de la presente invención y su progenie. Se usan vectores virales, pues son los métodos físicos descritos anteriormente, para administrar uno o más genes diana, polinucleótidos, moléculas antisentido o secuencias de ribozimas, por ejemplo, a las células. Los vectores virales y métodos para usarlos en la administración de ADN a las células son bien conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos de vectores virales que se pueden usar para modificar genéticamente las células de la presente invención incluyen, pero sin limitación, vectores adenovirales, vectores virales adenoasociados, vectores retrovirales (incluyendo vectores lentivirales), vectores alfavirales (por ejemplo, vectores de Sindbis) y vectores del virus herpes.

La transfección de péptidos o proteínas es otro método que se puede usar para modificar genéticamente las células madre germinales de la invención y su progenie. Los péptidos incluyendo, pero sin limitación, Pep-1 (disponible en el mercado como ChariotTM) y MPG, pueden transportar de manera rápida y eficaz proteínas, péptidos, anticuerpos y ácidos nucleicos biológicamente activos directamente a las células, con una eficacia del aproximadamente 60 % al aproximadamente 95 % (Morris, M. C. *et al.*, (2001) *Nat. Biotech.* 19: 1173-1176). Sin el deseo de quedar vinculados a teoría alguna, el péptido forma un enlace no covalente con la macromolécula de interés (es decir, proteína, ácido nucleico). La reacción de unión estabiliza la proteína y la protege de la degradación. Tras la administración a la célula de interés, tal como las células madre de la invención, el complejo de péptido-macromolécula se disocia, dejando la macromolécula biológicamente activa y libre para acudir a su orgánulo diana. La administración se puede producir en presencia o ausencia de suero. La absorción y administración pueden ocurrir a 4 °C, lo que elimina el procesamiento endosómico de las macromoléculas entrantes. El movimiento de las macromoléculas por la vía endosomal puede modificar la macromolécula tras la absorción. Los péptidos tales como Pep-1, mediante la administración directa de una proteína, un anticuerpo o un péptido de interés, pasan por alto el proceso de transcripción-traducción.

VI. Fertilización *in vitro*

Los ovocitos producidos a partir de las células madre germinales de la invención, o células progenitoras derivadas de las células madre germinales de la invención, como se describe en el presente documento, también se pueden usar para los métodos de fertilización *in vitro*. Por consiguiente, la invención proporciona métodos de fertilización *in vitro* de un sujeto femenino. El método comprende las etapas de: bien producir un ovocito mediante el cultivo de una célula madre germinal femenina, o su célula progenitora, en presencia de un agente de diferenciación de los ovocitos, o diferenciar *in vivo* la célula madre germinal femenina, o su célula progenitora, en un ovocito y obtener el ovocito; fertilizar el ovocito *in vitro* para formar un cigoto; e implantar el cigoto en el útero de un sujeto femenino.

Los métodos de fertilización *in vitro* son bien conocidos en la técnica, y actualmente se están convirtiendo con rapidez en métodos habituales. En general, primero se evalúa a las parejas para diagnosticar su/s problema/s de infertilidad concreto/s. Estos pueden variar desde infertilidad sin explicación aparente de ambos miembros de la pareja a problemas graves de la mujer (por ejemplo, endometriosis que da lugar a oviductos que no son patentes con ciclos menstruales irregulares o poliquistosis ovárica) o del varón (por ejemplo, recuento bajo de espermatozoides con anomalías morfológicas o incapacidad para eyacular con normalidad por lesión de la médula

espinal, eyaculación retrógrada o vasectomía reversa). Los resultados de estas evaluaciones también determinan el procedimiento específico que se va a realizar para cada pareja.

Los procedimientos suelen comenzar con la administración de un fármaco para regular negativamente el sistema hipotalámico/pituitario (agonista de LHRH). Este proceso reduce las concentraciones en suero de las gonadotropinas, y los folículos ováricos en desarrollo se degeneran, proporcionando así un conjunto de nuevos folículos en las etapas tempranas del desarrollo. Esto permite un control más preciso de la maduración de estos nuevos folículos mediante la administración de gonadotropinas exógenas en ausencia de influencias por el eje hipotalámico pituitario. El progreso de maduración y el número de folículos en crecimiento (por lo general, de cuatro y diez estimulados por ovario) son supervisados mediante observaciones diarias usando ultrasonidos y determinaciones de estradiol en suero. Cuando los folículos alcanzan el tamaño preovulatorio (18-21 mm) y las concentraciones de estradiol continúan aumentando linealmente, se inicia la respuesta ovulatoria mediante la administración exógena de gonadotropinas coriónicas humanas (hCG).

Los ovocitos se pueden obtener a partir de células madre germinales, o células progenitoras derivadas de células madre germinales, como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Las células madre germinales, o las células progenitoras derivadas de células madre germinales, se pueden cultivar en presencia de un agente de diferenciación que induzca la diferenciación en ovocitos. El agente de diferenciación se puede suministrar de forma exógena (por ejemplo, añadirse al medio de cultivo) o de fuentes endógenas durante el cultivo conjunto con tejido ovárico alogénico o heterogénico. Las células madre germinales femeninas o sus células progenitoras también se pueden cultivar en una estructura obtenida por ingeniería tisular en la que el agente de diferenciación se suministra bien exógena o endógenamente, obteniéndose ovocitos.

Cada ovocito se puede evaluar morfológicamente y transferirlo a una placa de Petri que contenga medios de cultivo y suero inactivado por calor. El varón proporciona una muestra de semen, que se procesa usando un procedimiento de "capacitación", mediante el que se obtendrá el esperma móvil más activo para la inseminación. Si hay oviductos de la mujer presentes, en este momento, se puede realizar un procedimiento denominado GIFT (transferencia intratubárica de gametos). Mediante este método, se disponen los complejos de ovocito-cumulus rodeados de esperma directamente en los oviductos por laparoscopia. Este procedimiento simula mejor las secuencias de hechos normales y permite que se produzca la fecundación dentro de los oviductos. No es de sorprender que el procedimiento GIFT tenga la mayor tasa de éxito con el 22 % de los 3.750 pacientes sometidos a recuperación de óvulos en 1990 que tuvieron un parto viable. Un procedimiento alternativo, la ZIFT (transferencia intratubárica de cigotos), permite la selección de cigotos fertilizados *in vitro* para su transferencia a los oviductos al día siguiente de la recuperación de los óvulos. En este momento, los cigotos adicionales se pueden congelar para la transferencia futura o la donación a parejas sin gametos femeninos. Sin embargo, la mayoría de los pacientes que tienen problemas de infertilidad más graves requerirá una incubación adicional de uno a dos días en cultivo de manera que sea posible seleccionar preembriones en los primeros estados de escisión para su transferencia al útero. Este procedimiento IVF-UT (transferencia uterina de fertilización *in vitro*) implica la transferencia transcervical de varios preembriones de 2 a 6 células (día 2) o de 8 a 16 células (día 3) al fondo del útero (de 4 a 5 preembriones proporcionan una tasa óptima de éxito).

También se describen procedimientos de fertilización *in vitro* en las patentes de EE.UU. N° 6.610.543 6.585.982, 6.544.166, 6.352.997, 6.281.013, 6.196.965, 6.130.086, 6.110.741, 6.040.340, 6.011.015, 6.010.448, 5.961.444, 5.882.928, 5.827.174, 5.760.024, 5.744.366, 5.635.366, 5.691.194, 5.627.066, 5.563.059, 5.541.081, 5.538.948, 5.532.155, 5.512.476, 5.360.389, 5.296.375, 5.160.312, 5.147.315, 5.084.004, 4.902.286, 4.865.589, 4.846.785, 4.845.077, 4.832.681, 4.790.814, 4.725.579, 4.701.161, 4.654.025, 4.642.094, 4.589.402, 4.339.434, 4.326.505, 4.193.392, 4.062.942 y 3.854.470.

Los siguientes ejemplos se exponen meramente con fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Dinámica postnatal de células germinales del ovario

Se realizaron los recuentos de los folículos sanos (no atréticos) y en degeneración (atréticos) de los ovarios de ratonas para evaluar la dinámica de las células germinales de los mamíferos femeninos. En particular, se calcularon las tasas de degeneración para determinar la edad de predicción en la que se produciría el agotamiento de la reserva de ovocitos (es decir, de folículos) en ausencia de una nueva producción de ovocitos.

Las ratonas C57BL/6 y CD1 de tipo silvestre de edad especificada y preñadas de forma programada se obtuvieron en Charles River Laboratories, mientras que los ratones AKR/J se obtuvieron en Jackson Laboratories. Se fijaron los ovarios en ácido acético glacial 0,34 N, formalina al 10 % y etanol al 28 %, se embebieron en parafina, y se seccionaron en serie (8 μ m). Se alinearon las secciones en orden sobre portaobjetos de vidrio de microscopio, y se tiñeron con hematoxilina y azul de metilo pícrico. A continuación, se determinó el número de folículos no atréticos o atréticos primordiales, primarios y preantrales. Los folículos primordiales se identificaron como aquellos que tenían un ovocito compacto rodeado de una sola capa de células aplanadas de la granulosa, mientras que los folículos

primarios se identificaron como los que tenían un ovocito ampliado rodeado por una sola capa de células cúbicas de la granulosa. Los folículos que se encontraban en una etapa intermedia (ovocito compacto o ampliado con una sola capa mixta de células aplanadas y cúbicas de la granulosa) se clasificaron como primarios. Los folículos preantrales se identificaron como aquellos que tenían un ovocito ampliado rodeado de al menos una segunda capa parcial o completa de células cúbicas de la granulosa, pero no más de cuatro capas completas de células cúbicas de la granulosa. Solo se evaluaron los folículos que contenían un ovocito con un núcleo claramente visible. Los folículos en las fases de desarrollo primordial, primaria y preantral (inmaduros) se clasificaron como atréticos si el ovocito se estaba degenerando (contorneado, condensado) o estaba fragmentado. No se incluyeron en el análisis los folículos groseramente atréticos que carecían de restos de ovocitos. Dado que este procedimiento muestreó una quinta parte de todo el volumen del ovario, el número total de folículos por ovario (sanos o atréticos) se estimó, por tanto, multiplicando los recuentos acumulativos para cada ovario por un factor de corrección de cinco (Zuckerman, S. (1951) *Recent Prog. Horm. Res.* 6: 63-108; Tilly, J. L. (2003) *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1: 1-11). Todos los recuentos fueron realizados por un solo histólogo especializado en el ovario de una manera ciega, y otros dos miembros del grupo evaluaron periódicamente muestras aleatorias para verificar la exactitud y la reproducibilidad de los datos.

Los análisis del número de folículos en reposo no atréticos (primordiales) y en fase temprana de crecimiento (primarios, preantrales) revelaron que aproximadamente un tercio de la dotación máxima de folículos inmaduros se perdió durante el desarrollo hacia la edad adulta (véase la Figura 1a), en consonancia con estudios previos de desarrollo de los folículos en ratones. A lo largo de los 20 primeros días de vida, la atresia se produjo a un ritmo bajo pero constante (Figura 1b), en consonancia con una reducción proporcional del número de folículos no atréticos durante este período de tiempo (Figura 1a). Sin embargo, la incidencia de la atresia aumentó notablemente hacia el día 30 y aún más hacia el día 40, alcanzando un nivel máximo superior a 1.200 folículos moribundos por ovario el día 42, que se mantuvo así en la vida reproductiva (Figura 1b).

El aclaramiento de las células apoptóticas *in vivo* se produce en un periodo de 3 a 18 horas (Wyllie, A. H. *et al.*, (1980) *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306; Iijiri, K. y Potten, C. S. (1983) *Br. J. Cancer* 47: 175-185; Bursch, W. *et al.*, (1990) "Carcinogenesis" 11: 847-853). Sin embargo, se realizaron experimentos para descartar la posibilidad de que la gran población de folículos atréticos observada en los animales adultos simplemente representara la acumulación de cadáveres de ovocitos en los folículos que habían degenerado semanas antes. El primer experimento, basado en estudios anteriores que demuestran que se producen niveles altos de apoptosis de los ovocitos en el ovario de las ratonas recién nacidas, coincidiendo con la formación de los folículos, evaluó los cambios producidos en el número de ovocitos no atréticos entre los días 1 y 4 después del parto en comparación con el número de ovocitos degenerativos en el día 4. Había más de 8.000 ovocitos no atréticos por ovario el día 1, y este grupo se redujo en casi un 50 % hacia el día 4. Sin embargo, solo se encontraron 218 ovocitos degenerativos por ovario el día 4, lo que indica que más de 3.000 ovocitos habían muerto y habían desaparecido del ovario entre los días 1 y 4 posteriores al parto. La Tabla 2 contiene los datos de medición de la degeneración del desarrollo y el aclaramiento de los ovocitos en el ovario de ratonas neonatales.

Tabla 2: Degeneración del desarrollo y aclaramiento de los ovocitos en ovarios de ratonas neonatales

Criterio de valoración analizado	Edad/es después del parto	Número/s por ovario
Ovocitos no atréticos	Día 1	8.338 ± 1.150
Ovocitos no atréticos	Día 4	4.733 ± 68
Ovocitos perdidos	Día 1 a Día 4	3.605
Ovocitos atréticos	Día 4	218 ± 26
Ovocitos atréticos aclarados	Día 1 a Día 4	3.387

Se empleó una segunda metodología para evaluar las tasas de aclaramiento de los ovocitos degenerativos, usando el producto químico 9,10-dimetilbenz[α]antraceno (DMBA) para sincronizar la atresia de los folículos primordiales y primarios. Estudios anteriores han demostrado que DMBA induce la degeneración de los ovocitos inmaduros de una manera que se asemeja morfológicamente a la muerte de los ovocitos de desarrollo. Para estos experimentos, se aplicó a ratones C57BL/6 una sola inyección intraperitoneal de vehículo (aceite de maíz) o DMBA (80 mg por kg de peso corporal; resuspendido en aceite de maíz) el día 25 después del parto, y se extirparon los ovarios justo antes de la inyección y a intervalos de 24 horas después de la inyección durante un total de hasta 96 horas. En las ratonas que habían recibido una sola inyección de DMBA, la incidencia de la atresia de los folículos aumentó notablemente entre las 24 y 48 horas después de la inyección, y se mantuvo en una meseta de aproximadamente 850 folículos atréticos por ovario de las 48 a 72 horas después de la inyección (Figura 1c). Hacia las 96 horas después de la inyección, no quedaban folículos primordiales ni primarios sanos en los ovarios, y la incidencia de la atresia volvió a niveles casi basales (Figura 1c). Por lo tanto, al igual que la tasa de aclaramiento de los ovocitos degenerativos entre los días 1 y 4 después del parto, la sincronización inducida por DMBA de la atresia reveló que más de 3.500 ovocitos contenidos dentro de los folículos primordiales y primarios habían iniciado la apoptosis y se habían aclarado del ovario en un plazo de 3 días.

Dado este hallazgo, que significa que del 1 % (días 8, 12 y 20) a tanto como el 16 % (día 40) o más (33 %, 42 días; véase la Figura 1d) de la reserva de folículos inmaduros se está degenerando en cualquier momento dado en

condiciones normales, cabría predecir el agotamiento completo de la reserva folicular hacia la juventud. Sin embargo, la reserva de folículos no atréticos se redujo desde los niveles máximos en el día 12 a solo el 36 % en el día 40 (Figura 1a). Esto indicó que la tasa de agotamiento de los folículos durante la vida postnatal, según lo determinado por la evaluación de los cambios producidos en el número de folículos no atréticos, fue muy incongruente con el número de folículos que se estaban eliminando en realidad de los ovarios a través de la atresia en el mismo marco temporal.

Para confirmar que estos hallazgos no eran un fenómeno relacionado con los ratones C57BL/6, se analizaron los cambios producidos en el número de folículos desde el nacimiento hasta la edad adulta en otras cepas de ratones y se compararon con los datos correspondientes de las ratonas C57BL/6. En los ratones CD1, la reserva de folículos no atréticos se redujo en solo el 4 % entre los días 4 y 42 después del parto, a pesar de una incidencia relativamente alta de la atresia, comparable a la observada en las ratonas C57BL/6 (Figura 1d). La población de folículos no atréticos en ratones AKR/J fue un 20 % mayor el día 42 que el día 4, de nuevo a pesar de una marcada incidencia de la atresia (Figura 1d). Estos datos ponen de manifiesto una discordancia evidente entre los cambios producidos en el número de folículos no atréticos y la correspondiente incidencia de la atresia en el ovario de los mamíferos postnatales.

Se realizaron estudios similares en monos rhesus. Los análisis previos de la pérdida de ovocitos postnatal habían sido explicados mediante un simple deterioro exponencial (Olesen, C. *et al.*, (2004) *Mol. Reprod. Dev.* 67 (1): 116-26). La pérdida de ovocitos después de un número de períodos de tiempo se había proyectado mediante la utilización de la siguiente ecuación: $t_n = a(1-r)^n$; en la que t_n = el número calculado de ovocitos restantes después de n períodos de tiempo y un porcentaje constante de folículos moribundos, representado por r . Los resultados de la aplicación de esta ecuación usando el número de folículos sanos y moribundos de los ovarios de monos rhesus resultaron ser incompatibles con la idea de que no se forman nuevos folículos después del nacimiento en el primate. Más bien, estos datos sostienen que las primates, al igual que las ratonas, deben producir nuevos ovocitos durante la adolescencia y la vida adulta.

Con el uso de ovarios de monos rhesus hembra adolescentes y maduras, Vermande-Van Eck midió tanto el porcentaje de ovocitos moribundos en un momento dado (4,5 %), como la tasa de aclaramiento de los ovocitos moribundos de los ovarios (14 días como máximo). Usando estos valores, el deterioro exponencial de los ovocitos resultaría en una reducción aproximada del 95 % de la reserva de ovocitos en solo dos años de tiempo (véase la Figura 2). La incidencia de los folículos moribundos se mantuvo estable tanto en la juventud como en la vida adulta. Por lo tanto, independientemente de la edad en que se inicie dicho deterioro, el ovario del mono rhesus estaría en peligro de entrar en un estado menopáusico en solo dos años. Sin embargo, se sabe que el ovario del mono rhesus funciona desde el inicio de la pubertad (aproximadamente a los 4 años de edad) durante aproximadamente 20 años antes de la aparición de la menopausia (Schramm, R. D. *et al.*, (2002) *Hum. Reprod.* 17: 1597-1603). No obstante, proyectando la curva de deterioro exponencial dada, los parámetros de Vermande Van-Eck hasta los 7,7 años se traducen en solo 6 ovocitos restantes.

Al igual que con los experimentos realizados en ratones, los hallazgos obtenidos en monos rhesus son incompatibles con el concepto de una reserva fija de ovocitos al nacer en las primates. El modelo descrito en el presente documento representa un mecanismo para continuar la renovación de los folículos ováricos después del nacimiento.

Ejemplo 2: Expresión de genes de entrada meiótica y genes implicados en la función de las células madre en los ovarios postnatales

La replicación de las células germinales para producir ovocitos para la formación de folículos en la vida postnatal requeriría la expresión de los genes implicados en el inicio de la meiosis. Por lo tanto, se examinó la expresión de la proteína del complejo sinaptonémico 3 (SCP3), una proteína específica de la meiosis necesaria para la formación de los elementos laterales axiales del complejo sinaptonémico, en los ovarios de ratón en la pubertad y en la juventud. Después de la fijación en paraformaldehído al 4 % con tampón neutro y la introducción en parafina, se cortaron secciones de tejido de 6 μ m de los ovarios y se montaron en portaobjetos. Se desenceraron las secciones en xilenos, se volvieron a hidratar y se hirvieron durante 5 minutos en citrato de sodio 10 mM usando un horno de microondas.

A continuación, se usaron anticuerpos primarios específicos de SCP3 para los análisis inmunohistoquímicos según las recomendaciones del proveedor. Se usó suero normal de burro en la solución TNK para el bloqueo, y se aplicó una dilución 1:300 de un anticuerpo de cabra anti-SCP3 (Walpita, D. *et al.*, (1999) *Proc. Natl Acad. Sci.* 96: 5622-5627; Russell, L. B. *et al.*, (2000) *Mutat. Res.* 464: 201-212) a las secciones, seguida de una IgG anti-cabra de burro biotinilada (Santa Cruz Biotechnology) para la detección usando el sistema conjugado de estreptavidina-peroxidasa con diaminobenzidina como sustrato colorimétrico. Para evitar el enmascaramiento de la señal inmunorreactiva con los colorantes vitales, se tomaron fotomicrografías de las secciones bajo la óptica Hoffman sin contraindicación previa. A localización inmunohistoquímica de SCP3 reveló células inmunorreactivas individuales en o cerca de la superficie del ovario (Figuras 3a y 3b). La posibilidad de que SCP3 fuera portado simplemente como un producto proteico

estable en los ovocitos formados durante el período perinatal fue descartada por el hallazgo de que los ovocitos contenidos dentro de los folículos inmaduros no fueron inmunorreactivos (Figuras 3c y 3d).

La expresión en los ovarios postnatales de SCP3 se confirmó a nivel del ARN mensajero, al igual que la expresión de la endonucleasa SPO11 y la recombinasa DMC1 (Figura 3e), siendo también ambas necesarias para el inicio de la meiosis en los mamíferos. Además, también se examinaron los niveles de expresión de los genes relacionados con la función de las células madre, tales como *pum1*, *pum2*, nucleostemina y *mili*. Se han identificado genes ortólogos en *Drosophila* como fundamentales para el mantenimiento de la función de las células madre germinales en el ovario, tales como las proteínas de unión al ARN codificadas por *piwi* y *pumilio* (Lin, H. (1997) *Annu. Rev. Genet.* 31: 455-491; Spradling, A. H. *et al.* (2001) *Nature* 414: 98-104; Lin, H. (2002) *Nature Rev. Genet.* 3: 931-940). En *C. elegans*, la pérdida de la función de cualquiera de los ortólogos de *piwi* (*prg-1* y *prg-2*) u ortólogos de *pumilio* (*fbf-1* y *fbf-2*) agota las células madre germinales, y se sabe que existen ortólogos de mamífero de *piwi* (*miwilhiwi* y *mili*) y *pumilio* (*pumilio-1* y *pumilio-2*) (Cox, D. N. *et al.* (1998) *Genes Dev.* 12: 3715-3727; Crittenden, S. L. *et al.* (2002) *Nature* 417:660-663; Kuramochi-Miyagawa, S. *et al.* (2001) *Mech. Dev.* 108: 121-133; Spassov, D. S. y Jurecic, R. (2002) *Gene* 299:195-204).

Para los ovarios recogidos en cada momento y para los tejidos de control, se extrajo el ARN total y se transcribió a la inversa 1 µg de ARN total (Superscript II RT; Invitrogen) usando cebadores oligo-dT. Se realizó la amplificación a través de 28 ciclos de PCR con *Taq* polimerasa y tampón D (Epicentre) con los conjuntos de cebadores específicos para cada gen (véase la Tabla 3). Se amplificó conjuntamente el gen ribosomal *L7* y se usó como control de carga para cada muestra, y los 28 ciclos resultaron estar dentro del intervalo lineal de amplificación para cada conjunto de cebadores experimental.

Tabla 3: Datos relativos al análisis de RT-PCR de expresión génica

Gen	Nº de acceso	Tamaño del producto	Secuencia del cebador (5'-3')	Región amplificada
<i>Dmc1</i> <i>Dmc1-d3</i>	D64107	973	D: gaaggaggatcaagttgtgc	3-976
		858 (-d)	I: gcttcatttcaggcatctc	
<i>L7</i>	NM_011291	199	D: ggagctcatctatgagaaggc	209-408
<i>Scp3</i>	NM_011517	436	D: gagccgctgagcaaacatcta	36-472
			I: atatccagttcccactgctgc	
<i>Spo11a,b</i>	XM_123992; AF163054	431(a)	D: ccgaggcctcgttctcgac	22-453
		321(b)	I: tgtccaccgcagcctggttc	
<i>Mili</i>	AB032605	441	D: tggactcgaggggtgtg	2304- 2745
			I: cagggtcagattgcag	
<i>Nucleostemina</i>	AY181025	600	D: cacaagaagcctaggaaggac	120-720
			I: ctccaagaagctccaagg	
<i>Pum1</i>	NM_030722	497	D: gcagtgtctggcaggactct	30-527
			I: ggcactgtctcgccattgatc	
<i>Pum2</i>	NM_030723	400	D: ggagagagactgcatggggaa	133-533
			I: gcgactccaggagtgcgatt	

Se aislaron, subclonaron y secuenciaron todos los productos de PCR para su confirmación. En las muestras que presentaban más de un producto amplificado por conjunto de cebadores, se aisló, se subclonó y se secuenció cada banda. Se determinó que estas bandas adicionales eran variantes de corte y empalme conocidas de los genes diana (es decir, *Dmc1/Dmc1d*; *Spo11a/Spo11b*).

Trabajos previos han demostrado que la expresión de SCP3 y DMC1 en las células germinales se limita a las fases de cigoteno o paquiteno de la meiosis. Estas etapas son anteriores a la etapa de diploteno posterior, donde se observa la primera detención meiótica en los ovocitos. Por consiguiente, la presencia de transcripciones de ARNm previas al diploteno, como la proteína SCP3, refleja la expresión dentro de las células distintas de los ovocitos detenidos en la meiosis en ese momento. Los niveles de expresión de SCP3, SPO11 y DMC1 variaron del 6 % (SPO11 y DMC1) al 25 % (SCP3) de los observados en los testículos adultos (Figura 3f), lo cual es significativo si se considera que la producción de células germinales postnatal diaria en el testículo es mucho mayor que la estimada para los ovarios. La expresión en los ovarios de los tres genes relacionados con la meiosis se redujo con la edad (Figura 3e), observándose una expresión mínima a nula de estos genes en los tejidos no gonadales (Figura 3g).

El análisis de los ovarios recogidos de ratones en diversos momentos de su vida neonatal, juvenil y adulta reveló la expresión de *mili*, *pumilio-1* y *pumilio-2*, mostrando *mili* una reducción relacionada con la edad en sus niveles de expresión (Figura 4). Además, también se identificó la expresión de nucleostemina, un gen recientemente implicado

en la renovación de las células madre en los mamíferos (Tsai, R. Y. L. y McKay, R. D. G. (2002) *Genes Dev.* 16: 2.991-3003), en el ovario de ratón durante la vida neonatal, juvenil y adulta (Figura 4).

Ejemplo 3: Renovación postnatal de los folículos ováricos

5 La importancia de las células germinales proliferativas para la reposición de la reserva de folículos postnatal se verificó además mediante el uso de busulfán, un tóxico de células germinales ampliamente usado en la caracterización de células madre espermatogoniales en ratones macho. En el testículo, el busulfán se dirige específicamente a las células madre germinales y a las espermatogonias, pero no a las células germinales post-meióticas, lo que conduce al fallo de la espermatogénesis. Los roedores hembra expuestos en el útero muestran un fallo gametogénico similar en respuesta al busulfán solo si el producto químico se administra durante el período de la proliferación de las células germinales de ovario fetal, pues las hembras expuestas al busulfán en el útero una vez cesada la proliferación de las células germinales nacen con ovarios que son histológica y funcionalmente similares a los ovarios de las ratonas expuestas a vehículo.

15 Se administró a ratonas por inyección vehículo (DMSO) o busulfán (20 mg/kg de peso corporal; resuspendido en DMSO) el día 25 y, de nuevo, el día 35 después del parto, y se extrajeron los ovarios 10 días después de la segunda inyección para analizar los cambios en el número de folículos primordiales no atréticos. Los ovarios de las hembras tratadas con busulfán poseían menos del 5 % de la reserva de folículos primordiales presente en los controles tratados con vehículo 20 días después del inicio del experimento (Figura 5a). Sin embargo, los ovarios expuestos al busulfán conservaron un aspecto histológico, por lo demás, normal, incluyendo la presencia de folículos sanos en maduración con ovocitos no degenerativos, así como cuerpos lúteos, indicativo de la ovulación (Figuras 5b-5e).

25 Para dilucidar si la pérdida de folículos primordiales observada en las hembras tratadas con busulfán (Figura 5a) se debía a la toxicidad a los ovocitos existentes, se extrajeron los ovarios de ratonas en múltiples puntos temporales durante y después de la pauta de dosificación de busulfán descrita anteriormente, y se analizaron para determinar la incidencia de la atresia de los folículos primordiales. El busulfán causó un ligero aumento, transitorio, en el número de folículos primordiales atréticos, con una meseta de solo 46 por ovario 5 días después de la primera inyección, que rápidamente se redujo a niveles basales a partir de entonces (Figura 5a, inserción). Esta respuesta atrética relativamente inferior y aguda al busulfán fue insignificante teniendo en cuenta que había más de 2.000 folículos primordiales ausentes en los ovarios expuestos al busulfán en comparación con los controles tratados con vehículo (Figura 5a). Estos datos refuerzan la idea de que las células germinales proliferativas no solo persisten en el ovario postnatal, sino que también están obligadas a renovar rutinariamente la reserva de folículos.

35 Para determinar la tasa de renovación de los folículos primordiales en el ovario de ratón postnatal, se evaluaron estos resultados en el contexto de una investigación realizada en el pasado sobre la cinética de la maduración de los folículos en ratonas. Los análisis previos demostraron que la reserva de folículos primordiales se reduce en un promedio de 89 folículos al día, debido bien a la degeneración o a la activación del crecimiento hacia la etapa primaria del desarrollo, entre los días 14 y 42 después del parto (Faddy, M. J. *et al*, *Cell Tissue Kinet.* (1987) 551-560). En esta franja de tiempo comparable descrita en el presente documento (16-40 días después del parto; véase la Figura 1a), cabría esperar que esta tasa de salida redujera la población de folículos primordiales en 2.136 folículos durante este período de 24 días. Sin embargo, el número de folículos primordiales disminuyó en solo 294 entre los días 16 y 40 después del parto (Figura 1a). La diferencia entre estos dos valores, o 1.842 folículos primordiales, representa la tasa de renovación de los folículos primordiales durante este período de 24 días, produciendo un promedio de 77 nuevos folículos primordiales por ovario al día. Teniendo en cuenta este cálculo, la tasa de agotamiento de los folículos primordiales al día debe ser la diferencia entre la tasa de salida al día proporcionada por los análisis anteriores (89 folículos) y la tasa de renovación al día (77 folículos), para una pérdida neta de 12 folículos primordiales por ovario al día. Usando este valor, cabría esperar que la reserva de folículos primordiales se redujera entre los días 16 y 40 después del parto en un total de 288 folículos, un número muy cercano al que se deriva de la comparación de los recuentos reales de los folículos primordiales no atréticos del día 16 frente a los del día 40 (2.334 frente a 2.040, o una pérdida neta de 294 folículos primordiales; Figura 1a).

55 Por lo tanto, en conjunto, el tratamiento con busulfán provoca una reducción del 95 % de la reserva de ovocitos (primordiales) en reposo en ratonas en el transcurso de tres semanas, y este efecto no se debe a ninguna mejor atresia de la reserva de ovocitos primordiales.

60 Aunque no había precedentes en la literatura sobre la inducción del busulfán a la activación del crecimiento de los folículos primordiales, y no se observaron evidencias morfológicas de dicho resultado, se ha determinado el número de folículos primarios (crecimiento activado) a lo largo del tiempo, y se ha calculado la proporción media de los folículos primordiales con respecto a los folículos primarios a lo largo del tiempo. No se observó ningún cambio significativo en la proporción de los folículos primordiales con respecto a los folículos primarios entre el tratamiento con busulfán y el tratamiento con vehículo (Figura 6), lo que indica que el tratamiento con busulfán no redujo la reserva primordial mediante el aumento de la activación del crecimiento de los folículos. Estos datos apoyan aún más la conclusión de que el busulfán agota específicamente el soporte de células madre germinales de la producción de ovocitos en los ovarios, dando lugar a una pérdida gradual de la reserva de folículos primordiales a través de una ausencia de renovación de ovocitos y de folículos.

También se estudió el resultado a largo plazo del tratamiento contra el cáncer en la función ovárica de las mujeres. Los regímenes de quimioterapia que contenían busulfán dieron lugar a una incidencia casi total de la insuficiencia ovárica prematura (FOP), independientemente de otros fármacos usados en la terapia de combinación. Por ejemplo, los datos clínicos combinados de tres estudios mostraron que 20 de 21 adolescentes (edad media = 11,5) tratadas con regímenes quimioterapéuticos que contenían busulfán experimentaron hipogonadismo indicativo de POF, mientras que los tratamientos comparables que carecían de busulfán solo causaron POF en 22 de 37 niñas (edad media = 8,7) (Thibaud, E. *et al.*, (1998) *Bone Marrow Transplant.* 21:287-290; Teinturier, C. *et al.*, (1998) *Bone Marrow Transplant.* 22: 989-994; Afify, Z. *et al.*, (2000) *Bone Marrow Transplant* 25:1087-1092). Del mismo modo, 4 de 4 niñas púberes (edad media = 13) tratadas con busulfán en terapia de combinación mostraron daño en el ovario que requirió reemplazo hormonal (Legault, L. y Bonny, Y. (1999) *Pediatric Transplant* 3:60-66). En otro estudio, el tratamiento con busulfán en mujeres con edades comprendidas entre los 16 y los 40 años (edad media = 30) causó POF en 19 de 19 casos (Sanders J. E. *et al.*, (1996) *Blood* 87 3045-3052). Por otra parte, en un estudio donde la terapia combinada con busulfán y ciclofosfamida se comparó con la ciclofosfamida sola, 72 o 73 pacientes tratadas con ambos agentes presentaron POF (edades 14 a 57, mediana = 38), mientras que la ciclofosfamida sola produjo POF en 47 de 103 pacientes (edades 13-58, mediana = 28) (Grigg, A. P. *et al.*, (2000) *Bone Marrow Transplant* 26:1089-1095).

La exposición al busulfán produjo POF en 115 de 117 pacientes, mientras que los tratamientos de quimioterapia comparables que carecían de busulfán solo se asociaron con POF en 69 de 140 casos. Aunque el tratamiento con busulfán puede provocar POF en los seres humanos mediante la aceleración de la pérdida de los ovocitos (muerte), basándose en los hallazgos obtenidos con el busulfán en ratonas, los resultados de estos ensayos clínicos con busulfán también pueden indicar una destrucción irreversible de las células madre germinales femeninas humanas que conduce a POF.

La existencia de células madre germinales femeninas de mamífero implica una capacidad inherente de los ovarios para generar, o regenerar tras una lesión, nuevas reservas de folículos que contienen ovocitos en reposo (primordiales) de una manera regulada. Para abordar esta cuestión directamente, se administró doxorubicina a ratonas adultas por inyección para sincronizar la muerte de los ovocitos (Pérez, G. I. *et al.*, (1997) *Nature Med.* 3,1228-32), y se extrajeron los ovarios en múltiples intervalos después de la exposición al fármaco para evaluar la dinámica de las células germinales. Como era de esperar, se produjo una pérdida rápida y elevada de los folículos primordiales y en fase temprana de crecimiento (ovocitos) en las primeras 24 h posteriores al tratamiento con doxorubicina (datos no mostrados). Sin embargo, se observó una regeneración espontánea de las reservas tanto de los folículos primordiales como de los inmaduros, entre las 24 y las 36 h después del tratamiento, y el número de folículos inmaduros que contenían ovocitos se estabilizó a partir de entonces (datos no mostrados).

Para mostrar, además, que el ovario adulto de los mamíferos es completamente capaz de producir ovocitos *de novo*, se usó un informe reciente que muestra que la inhibición de la desacetilación de las histonas expande rápidamente las células madre hematopoyéticas (Milhem, M. *et al.*, (2004) *Blood* 103, 4102-4110) como base para probar si la supresión aguda *in vivo* de la actividad de la histona desacetilasa (HDAC) podría mejorar, de manera similar, la función de las células madre germinales. Se aplicó a ratonas prepuberales una sola inyección intraperitoneal del inhibidor de la histona desacetilasa de amplio espectro, la tricostatina A (TSA; 10 mg/kg de peso corporal, resuspendida en DMSO) o vehículo (DMSO). Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la inyección, se prepararon preparados histológicos de ovarios, y se realizó el recuento de los folículos que contenían ovocitos mediante procedimientos convencionales de laboratorio (véase el Ejemplo 1). El tratamiento con TSA causó un aumento del 53 % en el número total de folículos inmaduros sanos que contenían ovocitos por ovario en comparación con los ovarios de ratones de control que habían recibido el tratamiento con vehículo. No solo aumentó la reserva de los folículos en reposo (primordiales) en un 42 %, sino que también aumentó el número de folículos en fase temprana de crecimiento (primarios) (Figura 7c).

El tratamiento con TSA bien redujo la incidencia de la pérdida de folículos maduros (muerte o atresia) o aumentó la producción de nuevos ovocitos y folículos por las células madre germinales. Dado que el nivel de referencia medio de la atresia de los folículos inmaduros en ratones de 13 días de vida sin tratar es de 16 ± 4 ($n = 4$), una reducción en la tasa de atresia no puede explicar el gran aumento (de más de 1.600) de los folículos inmaduros sanos. Sin la producción de nuevos ovocitos, resulta imposible el aumento del número de folículos primordiales que contienen ovocitos. En particular, de no generarse la producción de nuevos ovocitos, el aumento de los folículos primarios se debe sustraer de su fuente, es decir, del número de folículos primordiales. Como el número de folículos primordiales no se reduce, sino que aumenta, la única explicación para el aumento drástico del número de ovocitos y folículos tras la exposición a TSA es una nueva producción significativa de ovocitos inmaduros por parte de las células madre germinales.

Se obtuvieron resultados más sorprendentes en la edad adulta, en tanto en cuanto TSA aumentó el número de folículos primordiales en ratonas a los 240 días de vida en un 89 % en el transcurso de 24 h (datos no mostrados). Dado que los aumentos observados no se podían atribuir a la reducción de la tasa de activación del crecimiento de los folículos primordiales hacia la etapa primaria de desarrollo (Figura 7b, datos no mostrados) ni a la reducción de la incidencia de la atresia (datos no mostrados), estos datos proporcionan pruebas adicionales de que la ovogénesis y la foliculogénesis persisten en la vida adulta de las hembras de los mamíferos.

Ejemplo 4: Pruebas de foliculogénesis ovárica postnatal

Se usaron ratones transgénicos con expresión ubicua de GFP (obtenidos en los laboratorios Jackson, cepa STOCK TgN(GFPU)5Nagy) para proporcionar pruebas adicionales de foliculogénesis continua en la vida postnatal. Se cruzaron ratones macho y hembra transgénicos heterocigóticos con la expresión ubicua de GFP para generar descendencia femenina de tipo silvestre y transgénica para el injerto de ovario intrabursal. En resumen, se anestesiaron hembras transgénicas adultas jóvenes (58-69 días después del parto) (avertina, 200 mg por kg, intraperitoneal) para dejar al descubierto uno de los dos ovarios de cada ratón a través de incisiones dorso-laterales. Para cada animal, se realizó un pequeño orificio en la bolsa ovárica lateralmente cerca del hilio, y se extirpó aproximadamente la mitad del ovario hospedador para preparar el injerto. Se biseccionaron los ovarios extraídos de las hembras donantes (camada de tipo silvestre), y se dispuso la mitad de un ovario de tipo silvestre dentro de la cavidad bursal de la receptora transgénica en contacto con el resto de tejido ovárico hospedador. A continuación, se dejó asentar el tracto reproductivo de nuevo en la cavidad peritoneal y se cerró la incisión. Para este experimento, se usó un total de seis hospedadoras transgénicas, cuatro de los cuales recibió injertos de ovario de tipo silvestre unilaterales, mientras que las dos restantes recibieron injertos de ovario de tipo silvestre bilaterales. Entre 3-4 semanas después de la cirugía, se extirparon y se procesaron los tejidos ováricos para la visualización de GFP, tras la contratinción con yoduro de propidio, por microscopía confocal de barrido láser. Los fragmentos de ovario injertados, después de una inspección visual en bruto, mostraron evidencias de neovascularización y adhesión al tejido ovárico hospedador (Figura 8). El análisis de microscopía confocal reveló ovocitos positivos en GFP encerrados en los folículos en los fragmentos de ovario de tipo silvestre que eran indistinguibles de los ovocitos encerrados en los folículos en el tejido ovárico hospedador (Figuras 9 y 10). Por otra parte, las células de la granulosa que envolvían los ovocitos positivos en GFP en los injertos fueron negativos para GFP, lo que indica que las células germinales transgénicas se habían infiltrado en el tejido injertado e iniciado la foliculogénesis con las células somáticas residentes de tipo silvestre.

Para mantener la adición de nuevos folículos primordiales durante la vida juvenil y adulta, el ovario de ratón debe poseer bien una pequeña reserva de células madre germinales en división asimétrica o una gran reserva de células germinales premeióticas no renovables que producen ovocitos tras las divisiones simétricas. Estudios histomorfométricos el día 30 después del parto revelaron la presencia de 63 ± 8 de dichas células por ovario (media \pm error estándar, $n = 4$ ratones), un número cercano al esperado para una pequeña reserva de células germinales que se dividen asimétricamente.

Ejemplo 5: Dinámica de los ovocitos en modelos de ratones transgénicos

Se volvieron a evaluar los datos publicados a partir del análisis de la dinámica de los ovocitos en el ratón con *Bax* desactivado (Perez *et al.*, (1999) *Nature Genetics* 21: 200-203) y los datos contemporáneos inéditos del ratón con *Caspasa 6* desactivado, y se compararon a la vista de los resultados que demuestran la foliculogénesis postnatal de los ovocitos del presente documento. Los datos mostrados en el presente documento proporcionan más pruebas de la función de las células madre germinales y, por primera vez, revelan los efectos de estos ratones con el gen regulador de la apoptosis desactivado sobre la producción de nuevos ovocitos por parte de las células madre germinales. Se prepararon preparados histológicos de ovarios, y se realizó el recuento de los folículos que contenían ovocitos mediante procedimientos convencionales de laboratorio (Tilly, J. L. (2003) *Biol Re prod Endocrinol* 1:11; véase también el Ejemplo 1). La proteína *Bax* ha demostrado ser una molécula proapoptótica fundamental dentro de las células somáticas del ovario y de los ovocitos (Tilly, J. L. (1996) *Rev Reprod* 1:162-172; Perez, G. I. *et al.*, (1997) *Nature Med.* 3: 1228-1232). Los ratones con *Bax* desactivado mostraron tener la función ovárica enormemente ampliada, con de 200 a 300 folículos no atréticos presentes en los ovarios de las hembras con 20-22 meses de vida en comparación con prácticamente cero en los controles de tipo silvestre de la misma edad. Los datos que comparan los números de folículos inmaduros durante la vida postnatal temprana (Día 4) y principios de la edad adulta reproductiva se han mostrado anteriormente. Si bien la dotación de ovocitos en la vida temprana es comparable entre los ratones con *Bax* nulo y de tipo silvestre, los ratones con *Bax* nulo tienen casi 2,5 veces más folículos primordiales en el Día 42 que los de tipo silvestre, y un número significativamente mayor de folículos primarios, también (Figura 11). La medición simultánea de la atresia, o de la muerte, en estos ratones el Día 42 reveló una reducción importante de la atresia de los folículos primordiales. Por lo tanto, los ratones con *Bax* nulo no consiguen eliminar el número normal de folículos primordiales en comparación con los ratones de tipo silvestre.

La Caspasa-6 es también una molécula proapoptótica que funciona como una proteasa que escinde dianas intracelulares estructurales durante el inicio de la apoptosis (Ruchaud, S. *et al.* (2002) *EMBO J* 21: 1967-1977). El ratón con *Caspasa-6* desactivado no da lugar a un fenotipo manifiesto. Recientemente, sin embargo, los ratones con *Caspasa-6* nulo, mostraron un fenotipo de ovario similar al de los ratones con *Bax* nulo, en tanto en cuanto, el Día 4, había un número similar de folículos inmaduros presentes tanto en los ovarios con *caspasa-6* nulo como en los de los ratones de tipo silvestre (Figura 12). Los ratones con *caspasa-6* nulo también tuvieron un aumento significativo en el número de folículos primordiales y un gran aumento en el número de folículos inmaduros totales el Día 42 de vida. Sin embargo, cuando se midió la atresia de los folículos inmaduros en estos ratones el Día 42, a diferencia de los ratones con *Bax* nulo, los ratones con *Caspasa-6* nulo no mostraron ningún cambio en la cantidad de la atresia. Dado que se observa una reducción de la cantidad de atresia, la otra única explicación para el aumento del número

de folículos en ratones con *Caspasa-6* nulo es un aumento en la producción de nuevos ovocitos debido a la supresión de *Caspasa-6*. Por lo tanto, *Caspasa-6* es un regulador de la apoptosis de las células madre germinales.

Como se muestra en el presente documento, *Bax* es un regulador de la muerte de los ovocitos. Dado que la atresia de los folículos primordiales es solo de la mitad en los ratones con *Bax* nulo, y que los ovarios con *Bax* nulo contienen ovocitos durante un máximo de 10 a 14 meses más que los ovarios de tipo silvestre, *Bax* también regula la apoptosis de las células madre germinales. Por el contrario, se puede ver directamente que la *Caspasa-6* regula la función/muerte de las células madre germinales, pero no regula la muerte de los ovocitos. Por lo tanto, la *Caspasa-6* y *Bax* son reguladores de la producción de ovocitos en el nivel de las células madre germinales progenitoras de ovocitos. Por lo tanto, la modulación de la función de las células madre germinales mediante la modulación de la función de los reguladores apoptóticos clave *in vivo* es una estrategia importante para la ampliación de la función ovárica en los mamíferos.

Para demostrar mejor la existencia de células madre germinales femeninas postnatales, se compararon los ovarios de ratones de tipo silvestre con los ovarios de ratones deficientes en el gen con *mutación de la Ataxia-telangiectasia (Atm)*. Los ratones macho y hembra deficientes en *Atm* han demostrado ser infértiles debido a la pérdida completa de la producción de gametos maduros, por ejemplo, de espermatozoides y ovocitos (Barlow, C. *et al.* (1996) *Cell* 86: 159-171). La deficiencia en *Atm* ha demostrado producir etapas aberrantes de meiosis tempranas, detectadas ya en la etapa de leptoteno, que se traducen en un aumento de la apoptosis de los gametos en desarrollo (Barlow, C. *et al.* (1998) *Development* 125: 4007-17) y, por tanto, la pérdida total de gametos. Los ovarios de las hembras deficientes en *Atm* demostraron ser completamente estériles de ovocitos y folículos a los 11 días de vida (Barlow, C. *et al.* (1998) *Development* 125: 4007-17). La histología representativa de los ovarios de tipo silvestre (Figura 13A, ampliación en C) y con *Atm* nulo (Figura 13B, D) a los cuatro días del parto se representa en la Figura 13. Por lo tanto, si se ha generado toda la producción de ovocitos antes del nacimiento y ha dado lugar a una reserva fija de ovocitos en etapa de diploteno dentro de los folículos primordiales en el nacimiento y la deficiencia en *Atm* da lugar a una falta total de ovocitos, no debería producirse la expresión génica de marcadores germinales ni de ovocitos en estos ovarios "estériles". Sin embargo, debido a la detección de las células madre germinales en el ovario femenino postnatal, las células madre germinales premeióticas pueden estar presentes y ser capaces de realizar la autorrenovación, pero resulta imposible la producción continua de ovocitos debido a la entrada meiótica en ausencia de *Atm*. Se realizó la expresión de marcadores germinales en el ovario deficiente en *Atm* frente a los controles de tipo silvestre mediante transcripción inversa seguida de PCR y, en la Figura 13, panel derecho, se muestran los datos representativos (n = 3). Como se predijo, el marcador de pluripotencia *Oct-4* (Brehm, A. *et al.* (1998) *APMIS* 106:114-126) y los marcadores germinales *Dazl* (McNeilly, J. R. *et al.* (2000) *Endocrinology* 141:4284-4294; Nishi, S. *et al.* (1999) *Mol Hum Reprod* 5: 495-497) y *Stella* (Bortvin, A. *et al.* (2004) *BMC Dev Biol* 23: 2) se expresan todos en el ovario deficiente en *Atm* el día 71 después del parto. La comparación semicuantitativa de los niveles relativos de estos genes mediante el examen del control de carga L7 muestra que, como era de esperar, estos genes se expresan a niveles mucho más bajos que en los ovarios de tipo silvestre que contienen ovocitos. Se preparó el ovario contralateral de cada animal usado para el análisis de RT-PCR para la histología, y, como era de esperar, la toma de muestras y el examen de las secciones histológicas de los ratones con *Atm* nulo no revelaron ningún ovocito ni estructuras que se asemejaran a los folículos. Por lo tanto, la deficiencia en *Atm* da lugar a un grupo de células madre germinales que puede renovarse hasta por lo menos varias semanas de la vida adulta (Día 71), pero no puede, según lo informado, producir ovocitos viables debido al defecto meiótico que da lugar a la muerte de gametos.

Ejemplo 6. Aislamiento y caracterización de células de ovarios de ratón adulto

El antígeno embrionario específico de estadio 1 (SSEA-1) ha mostrado decorar la superficie de las células de mamífero especializadas, en concreto, de las células madre embrionarias (Henderson, J. K. *et al.*, (2002) *Stem Cells* 20: 329-37; Furusawa, T. *et al.*, (2004) *Biol Reprod.* 70: 1452-7) y las células germinales primordiales ("PGC") (Matsui, Y. *et al.*, (1992) *Cell* 70: 841-7; Gomperts, M. *et al.*, (1994) *Development.* 120: 135-41). Por lo tanto, SSEA-1 era un posible marcador de las células madre germinales femeninas y de sus células progenitoras. Además, la expresión por PGC fetal de SSEA-1 se correlaciona con el período de desarrollo bien establecido en el que las células germinales (femeninas y masculinas) son premeióticas y capaces de dividirse. Por extensión, las células madre germinales femeninas postnatales, también premeióticas y capaces de dividirse, también pudieron expresar SSEA-1.

La detección inmunohistoquímica de SSEA-1 en el ovario de ratón (adulto y prepuberal) reveló una pequeña población central de células positivas en SSEA-1 en el núcleo o en la región medular del ovario (Figura 14). Sin embargo, aparte de un bajo nivel de inmunorreactividad ocasionalmente observada en algunas células dispersas de la granulosa, SSEA1 no fue expresado en ninguna otra zona del ovario ni en ningún tipo de célula de origen conocido, incluyendo los ovocitos. En cambio, estas células son comunes y corrientes si se comparan morfológicamente con las células vecinas, que comparten su aspecto estromal. La inmunorreactividad de SSEA-1 ahora revela sus propiedades de células madre. Por lo tanto, se seleccionó SSEA-1 como marcador para usarlo en el aislamiento de esta población de células que se esperaba que fuera de células madre germinales femeninas o sus células progenitoras postnatales.

En la Figura 15, se muestra una estrategia para el aislamiento. Se extirparon los ovarios adultos (día 51 después del parto) y se homogenizaron de la siguiente manera. Se dispuso cada ovario en 250 µl de medio DMEM (Gibco # 11995-06), previamente calentado hasta 37 °C y se fragmentó con la aguja de una jeringa y pinzas. Se tuvo cuidado de dejar intactos los folículos en crecimiento macroscópicos, y se intentó fragmentar al máximo las estructuras medulares/estromales. Se añadieron doscientos cincuenta µl de medio de homogenización dos veces concentrado previamente calentado (DMEM + 1 mg/ml de colagenasa [Gibco # 17100-017]) a la placa que contenía el ovario fragmentado, y se transfirieron el tejido/medio a un tubo cónico de 15 ml. Se incubaron los tejidos en medios de homogenización con agitación durante 45 minutos a 37 °C. Se centrifugaron el tejido y las células digeridos a través de un filtro de células de 40 micrómetros durante 10 minutos a 1.000 x g. Se retiró el medio, y se volvieron a suspender las células sedimentadas de cada ovario homogenizado en 500 µl de solución salina tamponada con fosfato ("PBS")-albúmina de suero bovino al 0,1 % ("BSA") y se enfrió hasta 4 °C antes de la posterior separación inmunomagnética.

Se aislaron las células del homogenizado ovárico usando perlas de IgM anti-ratón (Dynabeads de IgM de rata anti-ratón M-450; DYNAL Biotech), previamente recubiertas mediante la adición de 3 µg de anticuerpo anti-SSEA-1 por alícuota de 50 µl de perlas e incubando durante 15 minutos a 4 °C con balanceo. Se lavaron las perlas recubiertas 3 veces con PBS-BSA al 0,1 % y se sedimentaron usando MPC Dynal, y luego se volvieron a suspender en PBS-BSA al 0,1 %. Después, se añadieron 12,5 µl de perlas recubiertas a cada alícuota de 500 µl de células de ovario. Se incubaron las células y las perlas con agitación suave a 4 °C durante 30 minutos. Se aislaron las células unidas a las perlas lavando 3 veces en PBS-BSA al 0,1 % después de la sedimentación con MPC Dynal. Después de la última separación, se eliminó el sobrenadante, y se volvieron a suspender las perlas, incluyendo las células unidas, en 250 µl de reactivo Tri (Sigma, T9424), se agitaron con movimientos vorticiales y se almacenaron a -80 °C antes del aislamiento del ARN.

La fracción celular aislada, positiva en SSEA-1, se usó para la transcripción inversa del ARN mensajero/amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con el fin de determinar su perfil de expresión génica. Se extrajo el ARN total de cada muestra y se transcribió de forma inversa 1 µg (Superscript II RT; Invitrogen) usando los cebadores oligo-dT. A continuación, se realizó la amplificación a través de 28-35 ciclos de PCR usando *Taq* polimerasa y tampón D (Epicentre) con los conjuntos de cebadores específicos para cada gen (Tabla 4a, b). Para cada muestra, se amplificó el ARN codificado por el gen ribosomal *L7* y se usó como control de carga (gen constitutivo). Se aislaron, se subclonaron y se secuenciaron todos los productos de PCR para su confirmación.

Tabla 4a: Análisis RT-PCR de la expresión génica en tejidos de ratón

Gen	Nº de acceso	Tamaño del producto	Secuencia de cebador (5'-3') ¹	Región amplificada ²
<i>Dazl</i>	NM_010021	317	D: gtgtgtcgaagggctatggat I: acaggcagctgatccagtg	230-547
<i>Fragilis</i>	NM_025378	150	D: gttatcaccattgttagtgcac I: aatgagtgttacacctgcgtg	355-505
<i>Gdf9</i>	L06444	708	D: tgccctctccctcatcttg I: cacttccccgctcacacag	747-1454
HDAC6	NM_010413	383	D: acgctgactacattgctgct I: tctcaactgatctctccagg	944-1327
<i>L7</i>	NM_011291	199	D: ggagctcatctatgagaaggc I: aagacgaaggagctgcagaac	209-408
<i>Mvh</i>	NM_010029	212	D: ggaaaccagcagcaagtgat I: tggagtctcatcctctgg	479-691
<i>Oct4</i>	X52437	589	D: cccaagttggcgtggagactt I: cttctggcgcggttacagaa	158-747
<i>Scp3</i>	NM_011517	436	D: gagccgctgagcaaacatcta I: atatccagttcccactgctgc	36-472
<i>Stella</i>	AY082485	353	D: cccaatgaaggacctgaaac I: aatggctcactgtcccgtca	27-380
<i>Zp3</i>	M20026	182	D: ccgagctgtgcaattccaga I: aaccctctgagccaagggtga	50-232

La fracción aislada de SSEA-1 mostrada en la Figura 16 es una fracción de células que expresan genes que denotan la pluripotencia (*Oct-4*; Brehm, A. *et al*, (1998) *APMIS* 106: 114-126), y la colocación de su linaje dentro de

la línea germinal (Dazi: McNeilly, J. R. *et al.*, (2000) *Endocrinology* 141: 4284-4294, Nishi, S. *et al.*, (1999) *Mol Hum Reprod* 5: 495-497; Stella: Bortvin, A. *et al.*, (2004) *BMC Dev Bio* 4: 23: 2; y el homólogo *Vasa* de ratón, *Mvh*: Fujiwara, Y. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91, 12258-12262). Esta fracción no expresa genes que se encuentran en los ovocitos en crecimiento (por ejemplo, GDF-9: Dong, J. *et al.*, (1996) *Nature* 383: 531-535; y *ZP3*: Dean, J. (2002) *J. Repr od. Immunol.* 51 (1-2) 171-80) ni en los ovocitos primordiales en reposo (por ejemplo, HDAC6) (Figura 16). Todos estos genes, como era de esperar, se expresan en la fracción con SSEA-1 agotado de las células, ya que esta fracción contiene ovocitos. Además, dado que la fracción celular aislada de SSEA-1 no expresa genes que se encuentran en los ovocitos primordiales en reposo ni en los ovocitos en crecimiento, esta fracción está contaminada de ovocitos. Además, estas células tampoco expresan la proteína del complejo sinaptonémico SCP3, un marcador de entrada meiótica (Yuan, L. *et al.*, 2000 *Mol Cell* 5: 73-83; Johnson, J. *et al.*, 2004 *Nature* 428: 145-150) apoyando su identificación como células madre germinales femeninas y/o sus células progenitoras.

Por separado, se aislaron las células madre germinales femeninas vivas y/o sus células progenitoras de los homogenizados de ovario descritos previamente (véase más arriba) usando la metodología anterior con ligeras modificaciones. En este caso, el anticuerpo anti-SSEA-1 se biotiniló a través de éster de *N*-hidroxisuccinimida de cadena larga de biotina con reactividad de amina primaria (NHS-LC-biotina). Para consultar una descripción completa de los procedimientos de biotinilación, véase "Pierce Catalogue and Handbook" (Pierce, Rockford, EE.UU.).

Entonces, se usó el kit de aglutinante de biotina CELLection de Dynal Biotech para aislar las células positivas en SSEA-1. Las perlas CELLection se prefieren cuando se desea la retirada posterior al aislamiento de las perlas de afinidad de las células. Los métodos se describen brevemente de la siguiente manera. Se volvieron a suspender perlas CELLection bien y se transfirieron alícuotas de 50 μ l a un tubo adecuado para el MPC Dynal. Se dispuso el tubo en el MPC Dynal durante 1 minuto, se retiró y se añadieron 1-2 ml de tampón (por ejemplo, PBS con Tween-20 al 0,1 %) para volver a realizar la suspensión.

Para recubrir las perlas con anticuerpo anti-SSEA-1 biotinilado, se combinaron 2-3 μ g de anticuerpo biotinilado y 50 μ l de perlas en un tubo y se centrifugaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se dispuso el tubo en el MPC Dynal durante 1 minuto para sedimentar las perlas recubiertas con anticuerpo anti-SSEA-1. Se lavaron las perlas con 1 ml de PBS con Tween-20 al 0,1 %, y se sedimentaron usando el MPC Dynal, tres veces. Se volvieron a suspender las perlas recubiertas en el volumen original de PBS con BSA al 0,1 %), dando una concentración final de 4×10^8 perlas/ml (nótese que, opcionalmente, se puede añadir azida de sodio al 0,02 % como conservante).

Como se ha detallado anteriormente, se volvieron a suspender células de un ovario en 500 μ l de PBS-BSA al 0,1 % y se enfriaron hasta 4 °C, tras lo que se combinaron 12,5 μ l de perlas recubiertas con anti-SSEA-1 con cada muestra de 0,5 ml de homogenizado de ovario. Se incubaron las células y las perlas con balanceo suave a 4 °C durante 30 minutos. Se aislaron las células unidas a las perlas lavando 3 veces en PBS-BSA al 0,1 % después de la sedimentación con el MPC Dynal. Se retiró el tubo del MPC Dynal, y se combinaron las células en roseta con RPMI 1640 (que contenía FCS al 1 %). Se volvieron a suspender las células en roseta mediante la aplicación con pipeta, se transfirieron a un nuevo vial y se dispusieron en el MPC Dynal durante 1 minuto. Se retiró el tubo del MPC Dynal y se volvieron a suspender las células pipeteando las células en roseta en un mínimo de 500 μ l de RPMI (que contenía FCS al 1 %). Se repitió esta etapa dos veces. Después del lavado final, se retiró el líquido, y se volvieron a suspender las células en roseta en medio RPMI (FCS al 1 %) previamente calentado hasta 37 °C. Se añadió tampón de liberación a 2 μ l, y se incubó la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente con inclinación suave y rotación. Se lavaron vigorosamente las rosetas con una pipeta 8 veces, y luego se colocan en el MPC Dynal durante 1 minuto. Se pipeteó el sobrenadante que contenía las células liberadas a un nuevo tubo de ensayo que contenía 200 μ l de RPMI (con FCS al 10 %). Se recogieron alícuotas de células (por ejemplo, 50-100 μ l) y se almacenaron para su uso futuro en el cultivo y el trasplante *in vitro* a hembras receptoras.

Referencias

Allen, E. (1923). "Ovogenesis during sexual maturity". *Am. J. Anat.* 31, 439-470.

Attar, E. C. y Scadden, D. T. (2004). "Regulation of hematopoietic stem cell growth". *Leukemia* 18, 1760-1768.

Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J.N., Ried, T., Tagle, D. y Wynshaw-Boris, A. (1996). "Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia". *Cell* 86, 159-171.

Barlow, C., Liyanage, M., Moens, P.B., Tarsounas, M., Nagashima, K., Brown, K., Rottinghaus, S., Jackson, S.P., Tagle, D., Ried, T. y Wynshaw-Boris, A. (1998). "Atm deficiency results in severe meiotic disruption as early as leptotema of prophase I". *Development* 125,4007-4017.

- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. y Wheeler, D. L. (2004). GenBank: update. *Nucleic Acids Res.* 32 Database issue, D23-D26.
- 5 Bonadonna, G. y Valagussa, P. (1985). "Adjuvant systemic therapy for resectable breast cancer". *J. Clin. Oncol.* 3,259-275.
- Borum, K. "Oogenesis in the mouse. (1961). A study of meiotic prophase". *Exp. Cell Res.* 24, 495-507.
- 10 Braat, A. K., Zandbergen, T., van de Water, S., Goos, H. J. y Zivkovic, D. (1999). "Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of vasaRNA". *Dev. Dyn.* 216, 153-167.
- Brinster, C. J., Ryu, B. Y., Avarbock, M. R., Karagenc, L., Brinster, R. L. y Orwig, K. E. (2003). "Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation". *Biol. Reprod.* 69, 412-420.
- 15 Brinster, R. L. (2002). "Germline stem cell transplantation and transgenesis". *Science* 296, 2174-2176.
- Bucci, L. R. y Meistrich, M. L. (1987). "Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations". *Mutat. Res.* 176, 259-268.
- 20 Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knicht, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divietti, P., Bringham, F. R., Milner, L. A., Kronenberg, H. M. y Scadden, D. T. (2003). "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche". *Nature* 425, 841-846.
- Canning, J., Takai, Y. y Tilly, J. L. (2003). "Evidence for genetic modifiers of ovarian follicular endowment and development from studies of five inbred mouse strains". *Endocrinology* 144,9-12.
- 25 Capela, A. y Temple, S. (2002). "LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal". *Neuron* 35, 865-875.
- 30 Castrillon, D. H., Quade, B. J., Wang, T. Y., Quigley, C. y Crum, C. P. (2000). "The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage". *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 97, 9585-9590.
- Cohen, P. Y Pollard, J. W. (2001). "Regulation of meiotic recombination and prophase I progression in mammals". *BioEssays* 23, 996-1009.
- 35 Cooke, H. J., Lee, M., Kerr, S. y Ruggiu, M. (1996). "A murine homologue of the human DAZ gene is autosomal and expressed only in male and female gonads". *Hum. Mol. Genet.* 5, 513-516.
- Cooper R. L., Goldman, J. y Vandenbergh, J. G. (1993). "Monitoring of estrous cyclicity in the laboratory rodent by vaginal lavage". *In Methods in Repr oductive Toxicology*, R. E. Chapin y J. J. Heindel, eds. (Orlando, FL: Academic Press), pág. 45-56.
- 40 Dearden, P., Grbic, M. y Donly, C. (2003). "Vasa expression and germ-cell specification in the spider mite *Tetranychus urticae*". *Dev. Genes Evol.* 212, 599-603.
- 45 Deng, W. y Lin, H. (2001). "Asymmetric germ cell division and oocyte determination during *Drosophila* oogenesis". *Int. Rev. Cytol.* 203,93-138.
- Dialynas, D. P., Quan, Z. S., Wall, K. A., Pierres, A., Quintans, J., Loken, M. R., Pierres, M. y Fitch, F.W. (1984). "Characterization of the murine T cell surface molecule designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: similarity of L3T4 to the human Leu 3/T4 molecule". *J. Immunol.* 131, 2445-2451.
- 50 Dias Neto, E., Correa, R. G., Verjovski-Almeida, S., Briones, M. R., Nagai, M. A., da Silva, W. Jr., Zago, M. A., Bordin, S., Costa, F. F., Goldman, G. H., Carvalho, A. F., Matsukuma, A., Baia, G. S., Simpson, D. H., Brunstein, A., de Oliveira, P. S., Bucher, P., Jongeneel, C.V., O'Hare, M. J., Soares, F., Brentani, R. R., Reis, L. F., de Souza, S. J. y Simpson, A. J. (2000). "Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags". *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU., 97, 3491-3496.
- 55 Di Giacomo, M., Barchi, M., Baudet, F., Edelman, W., Keeney, S. y Jasin, M. (2005). "Distinct DNA-damage-dependent and -independent responses drive the loss of oocytes in recombination-defective mouse mutants". *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 102, 737-742.
- 60 Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N. y Matzuk, M. M. (1996). "Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis". *Nature* 383, 531-535.
- 65

- Erickson, G. F. y Shimasaki, S. (2000). "The role of the oocyte in folliculogenesis". *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 193-198.
- 5 Fabioux, C., Huvet, A., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J. Y., Minguant, C., Le Pennec, M. (2004). "Oyster *Vasa*-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 592-598.
- Faddy, M. J., Gosden, R. G., Gougeon, A., Richardson, S. J. y Nelson, J. F. (1992). "Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause". *Hum. Reprod.* 7,1342-1346.
- 10 Fox, M., Damjanov, I., Martinez-Hernandez, A., Knowles, B. B. y Solter, D. (1981). "Immunohistochemical localization of the early embryonic antigen (SSEA-1) in post-implantation mouse embryos and fetal and adult tissues". *Dev. Biol.* 83, 391-398.
- 15 Franchi, L. L., Mandl, A. M. y Zuckerman, S. (1962). "The development of the ovary and the process of oogenesis". En *The Ovary*, S. Zuckerman, ed. (Nueva York, NY: Academic Press), pág. 1-88.
- Fujiwara, Y., Komiya, T., Kawabata, H., Sato, M., Fujimoto, H., Furusawa, M. y Noce, T. (1994). "Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila Vasa* and its specific expression in germ cell lineage". *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91, 12258-12262.
- 20 Geijsen, N., Horoschak, M., Kim, K., Gribnau, J., Eggen, K. y Daley, G.Q. (2004). "Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells". *Nature* 427,148-154.
- 25 Generoso, W. M., Stout, S. K. y Huff, S.W. (1971). "Effects of alkylating agents on reproductive capacity of adult female mice". *Mutat. Res.* 13, 171-184.
- Gilboa, L. y Lehmann, R. (2004). "Repression of primordial germ cell differentiation parallels germ line stem cell maintenance". *Curr. Biol.* 14, 981-986.
- 30 Gosden, R. G. (1996). "The vocabulary of the egg". *Nature* 383, 485-486.
- Gosden, R. G. (2004). "Germline stem cells in the postnatal ovary: is the ovary more like a testis?" *Hum. Reprod. Actualización* 10, 193-195.
- 35 Gosden, R. G., Laing, S. C., Felicio, L. S., Nelson, J. F. y Finch, C. E. (1983). "Imminent oocyte exhaustion and reduced follicular recruitment mark the transition to acyclicity in aging C57BL/6J mice". *Biol. Reprod.* 28, 255-260.
- 40 Green, E. L. y Bernstein, S.E. (1970). "Do cells outside the testes participate in repopulating the germinal epithelium after irradiation? Negative results". *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 17, 87-92.
- Grove, J. E., Bruscia, E. y Krause, D. S. (2004). "Plasticity of bone marrow-derived stem cells". *Stem Cells* 22, 487-500.
- 45 Hadjantonakis, A. K., Gertsenstein, M., Ikawa, M., Okabe, M. y Nagy, A. (1998). "Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells". *Mech. Dev.* 76,79-90.
- Heike, T. y Nakahata, T. (2004). "Stem cell plasticity in the hematopoietic system". *Int. J. Hematol.* 79, 7-14.
- 50 Hershlag, A. y Schuster, M. W. (2004). "Return of fertility after autologous stem cell transplantation". *Fertil. Steril.* 77, 419-421.
- Herzog, E. L., Chai, L. y Krause, D. S. (2003). "Plasticity of marrow-derived stem cells". *Blood* 102, 3483-3493.
- 55 Hirshfield, A. N. (1991). "Development of follicles in the mammalian ovary". *Int. Rev. Cytol.* 124,43-101.
- Ikenishi, K. (1998). "Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*". *Dev. Growth Differ.* 40, 1-10.
- 60 Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K. y Tilly, J.L. (2004). "Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary". *Nature* 428,145-150.
- 65 Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S., Toyoshima, M., Niwa, O., Oshimura, M., Heike, T., Nakahata, T., Ishino, F., Ogura, A. y Shinohara, T. (2004). "Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis". *Cell* 119, 1001-1012.

- Komiya, T., Itoh, K., Ikenishi, K. y Furusawa, M. (1994). "Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of *Xenopus laevis*". *Dev. Biol.* 162,354-363.
- 5 Lawson, K. A. y Hage, W. J. (1994). "Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse". *Ciba Found. Symp.* 182, 68-84, 84-91.
- Lin, H. (2002). "The stem-cell niche theory: lessons from flies". *Nat. Rev. Genet.* 3, 931-940.
- 10 Marani, E., van Oers, J. W., Tetteroo, P. A., Poelmann, R. E., van der Veecken, J. y Deenen, M. G. (1986). "Stage specific embryonic carbohydrate surface antigens of primordial germ cells in mouse embryos: FAL (S.S.E.A.-1) and globoside (S.S.E.A.-3)". *Acta Morphol. Neerl. Scand.* 24, 103-110.
- 15 Matzuk, M. M., Burns, K. H., Viveiros, M. M. y Eppig, J. J. (2002). "Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation". *Science* 296, 2178-2180.
- McGrath, S. A., Esqueda, A. F. y Lee, S. J. (1995). "Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9". *Mol. Endocrinol.* 9, 131-136.
- 20 McLaren, A. (1984). "Meiosis and differentiation of mouse germ cells". *Symp. Soc. Exp. Biol.* 38,7-23.
- McLaren, A. (2003). "Primordial germ cells in the mouse". *Dev. Biol.* 262, 1-15.
- 25 Medvinsky, A. y Dzierzak, E. (1996). "Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region". *Cell* 86, 897-906.
- Meirelles, L. da S. y Nardi, N. B. (2003). "Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization". *Br. J. Haematol.* 123,702-711.
- 30 Milhem, M., Mahmud, N., Lavelle, D., Araki, H., DeSimone, J., Sauntharajah, Y. y Hoffman, R. (2004). "Modification of hematopoietic stem cell fate by 5aza 2'deoxyctidine and trichostatin A". *Blood* 103,4102-4110.
- Mintz, B. y Russell, E. S. (1957). "Gene-induced embryological modification of primordial germ cells in the mouse". *J. Exp. Zool.* 134, 207-230.
- 35 Molyneaux, K. y Wylie, C. (2004). "Primordial germ cell migration". *Int. J. Dev. Biol.* 48, 537-544.
- 40 Morita, Y., Perez, G. I., Paris, F., Miranda, S., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Xie, Z., Reed, J. C., Schuchman, E. H., Kolesnick, R. N. y Tilly, J. L. (2000). "Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy". *Nat. Med.* 6, 1109-1114.
- Morrison, S. J., Uchida, N., Weissman, I. L. (1995). "The biology of hematopoietic stem cells". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11,35-71.
- 45 Noce, T., Okamoto-Ito, S. y Tsunekawa, N. (2001). "Vasa homolog genes in mammalian germ cell development". *Cell Struct. Funct* 26, 131-136.
- 50 Okada, S., Nakauchi, H., Nagayoshi, K., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Miura, Y. y Suda, T. (1991). Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule. *Blood* 78, 1706-1712.
- Okada, S., Nakauchi, H., Nagayoshi, K., Nishikawa, S., Miura, Y. y Suda, T. (1992). "In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells". *Blood* 80, 3044-3050.
- 55 Perez, G. I., Knudson, C.M., Leykin, L., Korsmeyer, S. J. y Tilly, J. L. (1997). "Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction". *Nat. Med.* 3, 1228-1232.
- Perez, G. I., Robles, R., Knudson, C. M., Flaws, J.A., Korsmeyer, S. J. y Tilly, J. L. (1999). "Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency". *Nat. Genet.* 21, 200-203
- 60 Peters, H. (1969). "The development of the mouse ovary from birth to maturity". *Acta Endocrinol.* 62, 98-116.
- Peters, H. (1970). "Migration of gonocytes into the mammalian gonad and their differentiation". *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.* 259,91-101.
- 65 Philpott, C. C., Ringuette, M. J. y Dean, J. (1987). "Oocyte-specific expression and developmental regulation of ZP3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida". *Dev. Biol.* 121, 568-575.

- Pfaffl, M.W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR". *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- 5 Rajkovic, A., Pangas, S. A., Ballow, D., Suzumori, N. y Matzuk, M. M. (2004). "NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression". *Science* 305, 1157-1159.
- Rich, I.N. (1995). "Primordial germ cells are capable of producing cells of the hematopoietic system in vitro". *Blood* 86, 463-472.
- 10 Richardson, S. J., Senikas, V. y Nelson, J. F. (1987). "Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65, 1231-1237.
- Rongo, C., Broihier, H. T., Moore, L., Van Doren, M., Forbes, A. y Lehmann, R. (1997). "Germ plasm assembly and germ cell migration in *Drosophila*". *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 62, 1-11.
- 15 Roussell, D. L. y Bennett, K. L. (1993). "glh-1, a germ-line putative RNA helicase from *Caenorhabditis*, has four zinc fingers." *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90, 9300-9304.
- Ryu, B. Y., Orwig, K. E., Avarbock, M. R. y Brinster, R. L. (2003). "Stem cell and niche development in the postnatal rat testis". *Dev. Biol.* 263, 253-263.
- 20 Saitou, M., Barton, S. C. y Surani, M. A. (2002). "A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice". *Nature* 418, 293-300.
- 25 Salooja, N., Chatterjee, R., McMillan, A. K., Kelsey, S.M., Newland, A. C., Milligan, D. W., Franklin, I. M., Hutchinson, R. M., Linch, D. C. y Goldstone, A. H. (1994). "Successful pregnancies in women following single autotransplant for acute myeloid leukemia with a chemotherapy ablation protocol". *Bone Marrow Transplant.* 13,431-435.
- 30 Salooja, N., Szydlo, R. M., Socie, G., Rio, B., Chatterjee, R., Ljungman, P., Van Lint, M.T., Powles, R., Jackson, G., Hinterberger-Fischer, M., Kolb, H. J. y Apperley, J. F; "Late Effects Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation". (2001). Pregnancy outcomes after peripheral blood or bone marrow transplantation: a retrospective study. *Lancet* 358, 271-276.
- 35 Salustri, A., Fulop, C., Camaioni, A. y Hascall, V. C. (2004). "Oocyte-granulosa cell interactions". En *The Ovary*, II Edición, P. C. K. Leung y E. Y. Adashi, eds. (San Diego: Elsevier Academic Press), pág. 131-143.
- 40 Samuelsson, A., Fuchs, T., Simonsson, B. y Bjorkholm, M. (1993). "Successful pregnancy in a 28-year-old patient autografted for acute lymphoblastic leukemia following myeloablative treatment including total body irradiation". *Bone Marrow Transplant.* 12, 659-660.
- 45 Sanders, J. E., Hawley, J., Levy, W., Gooley, T., Buckner, C. D., Deeg, H.J., Doney, K., Storb, R., Sullivan, K., Witherspoon, R. y Appelbaum, F.R. (1996). "Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation". *Blood* 87, 3045-3052.
- Sarmiento, M., Glasebrook, A. L. y Fitch, F. W. (1980). "IgG or IgM monoclonal antibodies reactive with different determinants on the molecular complex bearing Lyt2 antigen block T cell-mediated cytolysis in the absence of complement". *J. Immunol.* 125, 2665-2672.
- 50 Schöler, H. R., Hatzopoulos, A. K., Balling, R., Suzuki, N. y Gruss, P. (1989). "A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor". *EMBO J.* 8, 2543-2550.
- 55 Sette, C., Dolci, S., Geremia, R. y Rossi, P. (2000). "The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells". *Int. J. Dev. Biol.* 44, 599-608.
- Shen, H., Cheng, T., Olszak, I., Garcia-Zepeda, E., Lu, Z., Herrmann, S., Falon, R., Luster, A. D. y Scadden, D. T. (2001). "CXCR-4 desensitization is associated with tissue localization of hematopoietic progenitor cells". *J. Immunol.* 166, 5027-5033.
- 60 Shiromizu, K., Thorgeirsson, S. S. y Mattison, D. R. (1984). "Effect of cyclophosphamide on oocyte and follicle number in Sprague-Dawley rats, C57BL/6N and DBA/2N mice". *Pediatr. Pharmacol.* 4, 213-221.
- 65 Soyol, S. M., Amlah, A. y Dean, J. (2000). "FIG α , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation". *Development* 127, 4645-4654.

- Spangrude, G. J. y Scollay, R. (1990). "A simplified method for enrichment of mouse hematopoietic stem cells". *Exp. Hematol.* 18, 920-926.
- 5 Spangrude, G. J., Heimfeld, S. y Weissman, I. L. (1988). "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells". *Science* 241, 58-62.
- Spradling, A. C. (1993). "Developmental genetics of oogenesis". En *The Development of Drosophila melanogaster*, Volumen I, M. Bate y A. Martinez Arias, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press), pág. 1-70.
- 10 Spradling, A. H., Drummond-Barbosa, D. y Kai, T. (2001). "Stem cells find their niche". *Nature* 414, 98-104.
- Su, A. I., Cooke, M. P., Ching, K. A., Hakak, Y., Walker, J. R., Wiltshire, T., Orth, A. P., Vega, R. G., Sapinoso, L. M., Moqrich, A., Patapoutian, A., Hampton, G. M., Schultz, P. G. y Hogenesch, J. B. (2004). "A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes". *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 101,6062-6067.
- 15 Suzumori, N., Yan, C., Matzuk, M. M. y Rajkovic, A. (2002). "Nobox is a homeobox-encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes". *Mech. Dev.* 111, 137-141.
- 20 Szabo, P. E., Hübner, K., Schöler, H. y Mann, J. R. (2002). "Allele-specific expression of imprinted genes in mouse migratory primordial germ cells". *Mech. Dev.* 115, 157-160.
- te Velde, E. R. y Pearson, P. L. (2002). "The variability of female reproductive ageing". *Hum. Reprod. Update* 8, 141-154.
- 25 Telfer, E. E. (2004). "Germline stem cells in the postnatal mammalian ovary: a phenomenon of prosimian primates and mice?" *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 24.
- Tilly, J. L. (2001). "Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 838-848.
- 30 Tilly, J. L. (2003). "Ovarian follicle counts - not as simple as 1,2,3". *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 11.
- Tropel, P., Noel, D., Platet, N., Legrand, P., Benabid, A.-L. y Berger, F. (2004). "Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow". *Exp. Cell Res.* 295, 395-406.
- 35 Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S. y Saga, Y. (2003). "Conserved roles of nanos proteins in germ cell development". *Science* 301, 1239-1241.
- 40 Van de Rijn, M., Heimfeld, S., Spangrude, G. J. y Weissman, I. L. (1989). "Mouse hematopoietic stem-cell antigen Sca-1 is a member of the Ly-6 antigen family". *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86, 4634-4638.
- van den Hurk, R. y Zhao, J. (2005). "Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles". *Theriogenology* 63, 1717-1751.
- 45 Williams, D. E., de Vries, P., Namen, A. E., Widmer, M. B. y Lyman, S. D. (1992). "The Steel factor". *Dev. Biol.* 151,368-376.
- Wognum, A. W., Eaves, A. C. y Thomas, T. E. (2003). "Identification and isolation of hematopoietic stem cells". *Arch. Med. Res.* 34, 461-475.
- 50 Xu, Y., Ashley, T., Brainerd, E. E., Bronson, R. T., Meyn, M. S. y Baltimore, D. (1996). "Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma". *Genes Dev.* 10, 2411-2422.
- 55 Yeom, Y. I., Fuhrmann, G., Ovitt, C. E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hübner, K. y Schöler, H. R. (1996). "Germline regulatory element of *Oct-4* specific for the totipotent cycle of embryonal cells". *Development* 122, 881-894.
- 60 Yoshimizu, T., Sugiyama, N., De Felice, M., Yeom, Y. I., Ohbo, K., Masuko, K., Obinata, M., Abe, K., Schöler, H. R. y Matsui, Y. (1999). "Germline-specific expression of the *Oct-4*/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice". *Dev. Growth Differ.* 41, 675-684.
- 65 Yuan, L., Liu, J. G., Hoja, M. R., Wilbertz, J., Nordqvist, K. y Hoog, C. (2002). "Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3". *Science* 296, 1115-1118.

Zhu, C. H. y Xie, T. (2003). "Clonal expansion of ovarian germline stem cells during niche formation in *Drosophila*". *Development* 130, 2579-258.

5

Zuckerman, S. (1951). "The number of oocytes in the mature ovary". *Recent Prog. Horm. Res.* 6,63-108.

Zuckerman, S. y Baker, T. G. (1977). "The development of the ovary and the process of oogenesis". En *The Ovary*, S. Zuckerman y B. J. Weir, eds. (Nueva York, NY: Academic Press), pág. 41-67.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula no embrionaria aislada que es mitóticamente competente y expresa *Vasa*, *Oct-4*, *Dazl*, *Stella* y, opcionalmente, un antígeno embrionario específico de estadio.
2. La célula aislada de la reivindicación 1, en la que la célula es una célula progenitora de célula madre germinal femenina que expresa el antígeno embrionario específico de estadio, y en la que dicha célula progenitora de célula madre germinal femenina deriva de tejido ovárico.
- 10 3. La célula aislada de la reivindicación 1, en la que la célula es una célula madre germinal femenina derivada de tejido ovárico.
4. La célula aislada de la reivindicación 1, en la que el antígeno embrionario específico de estadio es el antígeno embrionario específico de estadio 1.
- 15 5. La célula aislada de la reivindicación 1, en la que la célula expresa el antígeno embrionario específico de estadio.
6. La célula aislada de la reivindicación 5, en la que el antígeno embrionario específico de estadio es el antígeno embrionario específico de estadio 1.
- 20 7. La célula aislada de la reivindicación 3, en la que la célula puede producir ovocitos después de un período de al menos 1 semana, de 1 a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 semanas, de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 semanas o de más de aproximadamente 5 semanas después del trasplante a un hospedador.
- 25 8. La célula aislada de la reivindicación 2, en la que la célula puede producir ovocitos después de un período de menos de 1 semana después del trasplante a un hospedador.
- 30 9. La célula aislada de la reivindicación 8, en la que la célula puede producir ovocitos después de un período de menos de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 48 horas después del trasplante a un hospedador.
10. La célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la célula es una célula de mamífero.
- 35 11. La célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la célula es una célula de ser humano.
12. Una composición farmacéutica que comprende una población purificada de células no embrionarias que son mitóticamente competentes y que expresan *Vasa*, *Oct-4*, *Dazl*, *Stella* y, opcionalmente, un antígeno embrionario específico de estadio, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 40 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en la que el antígeno embrionario específico de estadio es el antígeno embrionario específico de estadio 1.
- 45 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en la que las células son células progenitoras de células madre germinales femeninas que expresan el antígeno embrionario específico de estadio, y en la que las células progenitoras de células madre germinales femeninas derivan de tejido ovárico.
- 50 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en la que las células son células madre germinales femeninas derivadas de tejido ovárico.
16. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en la que las células son de mamífero.
- 55 17. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en la que las células son de ser humano.

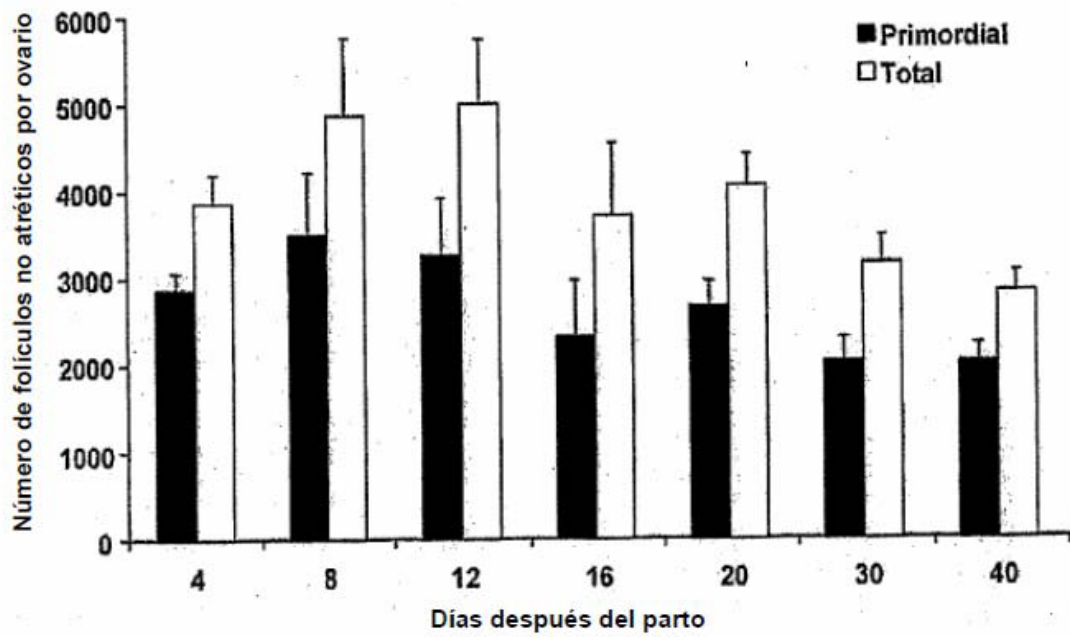


FIG. 1A

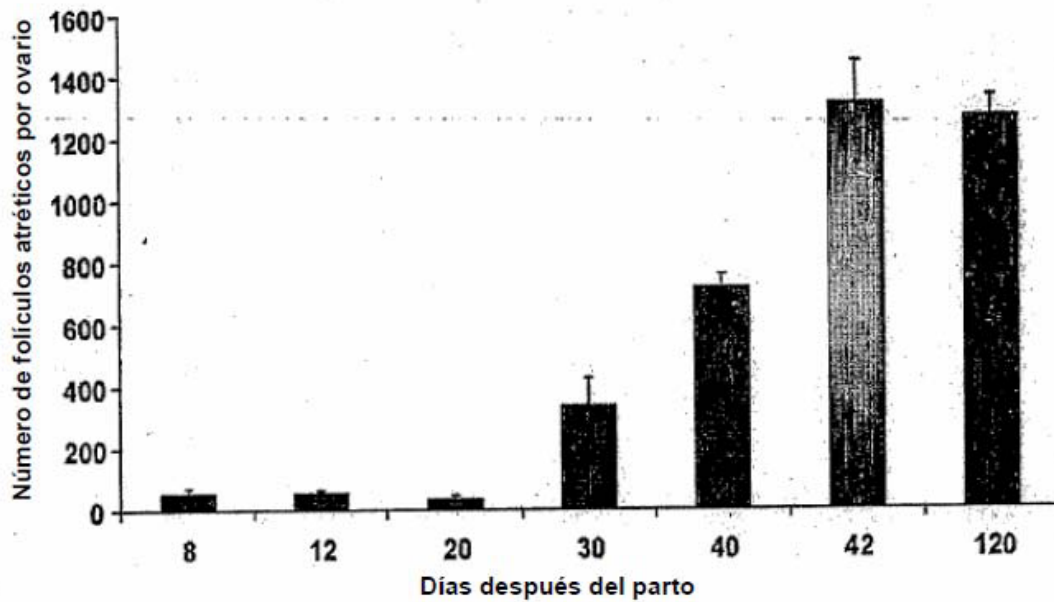


FIG. 1B

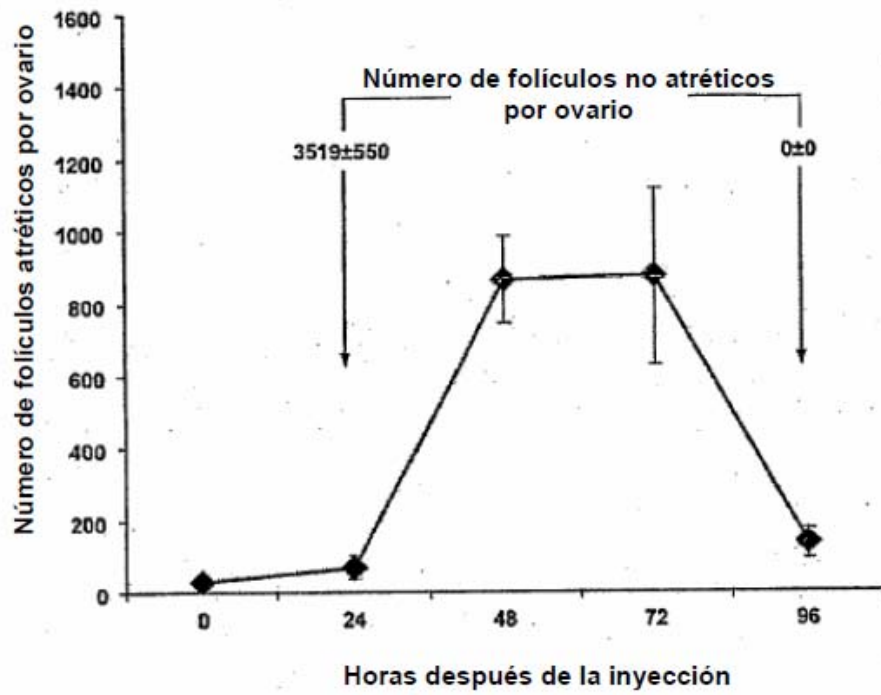


FIG. 1C

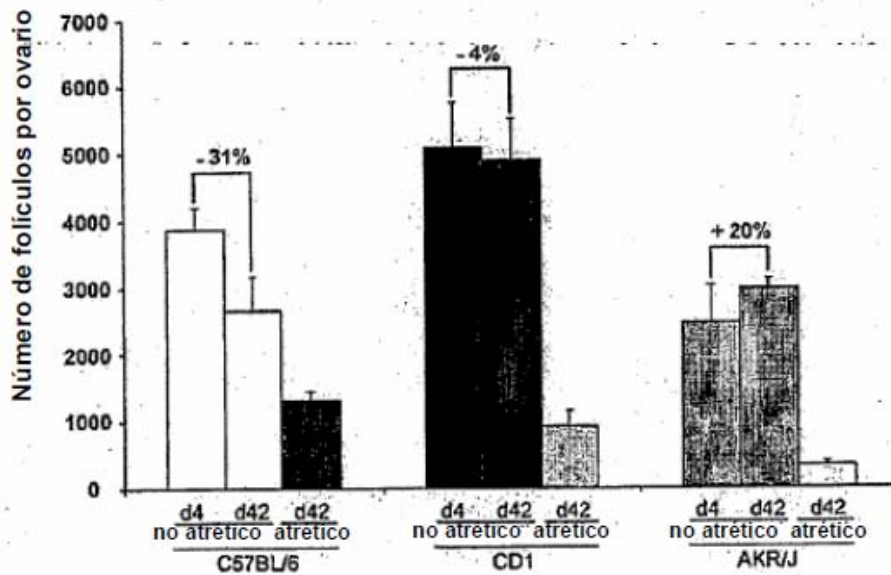


FIG. 1D

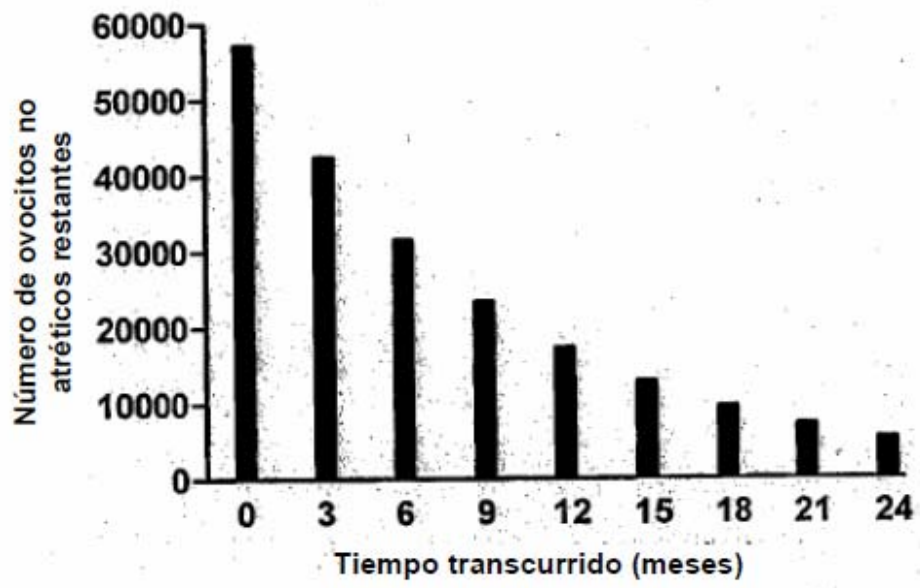


FIG. 2

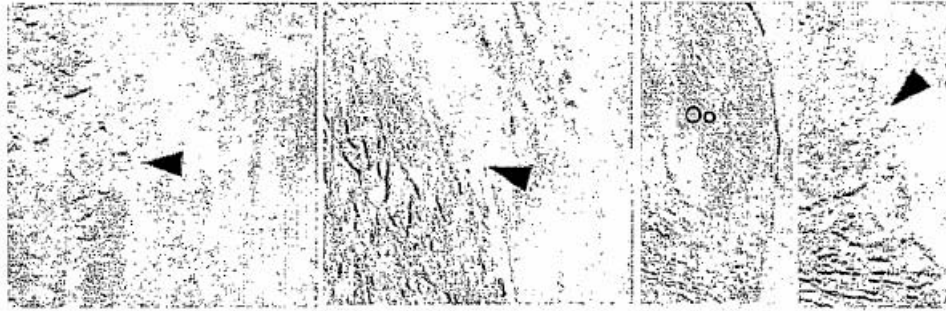


FIG. 3A

FIG. 3B

FIG. 3C FIG. 3D



FIG. 3E



FIG. 3F

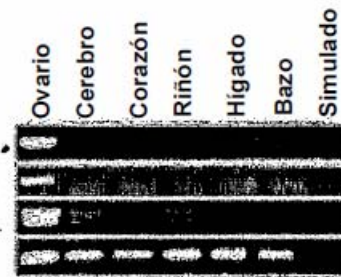


FIG. 3G

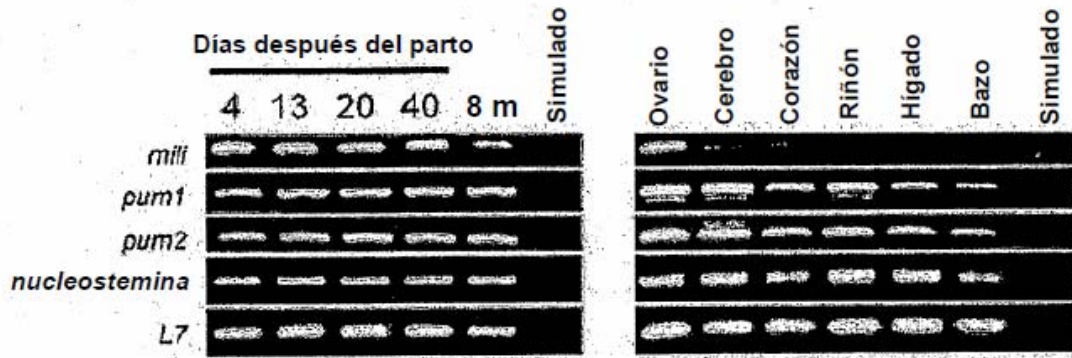


FIG. 4

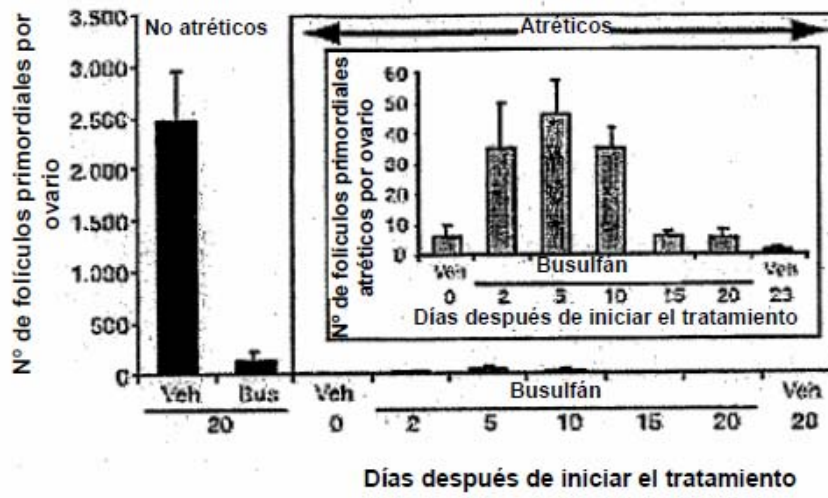


FIG. 5A



FIG. 5B



FIG. 5C



FIG. 5D



FIG. 5D

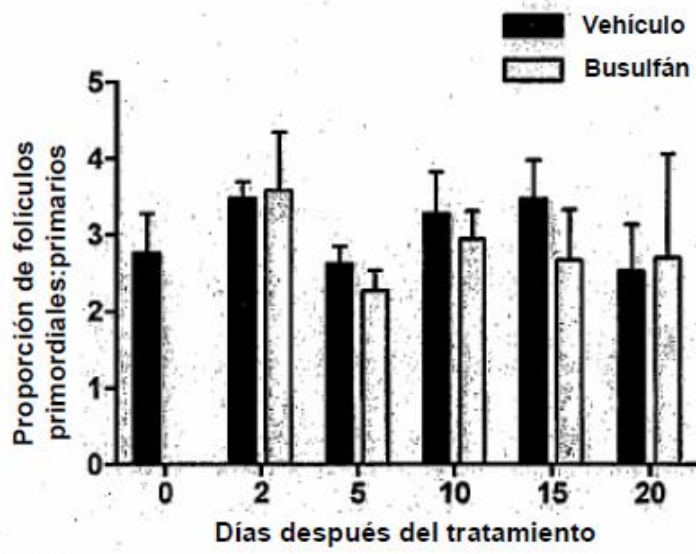


FIG. 6

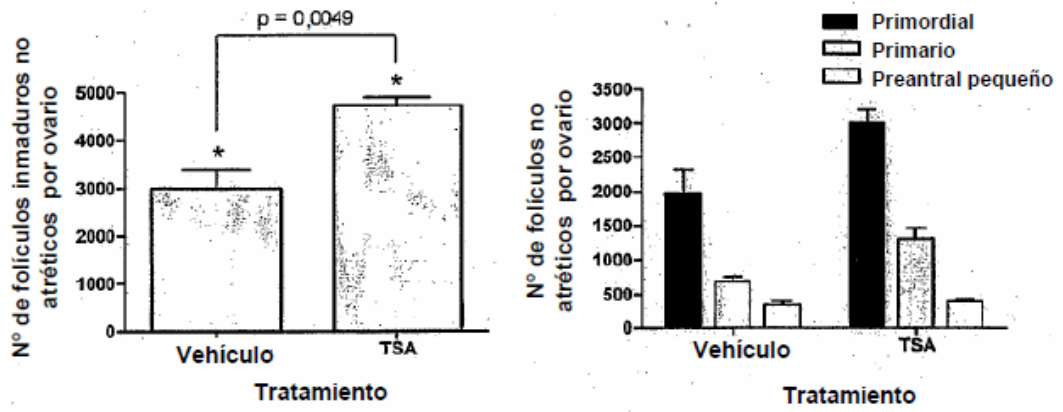


FIG. 7

CAVIDAD BURSAL INTACTA



FIG. 8A

CAVIDAD BURSAL RETIRADA



FIG. 8A

MICROSCOPIO ÓPTICO

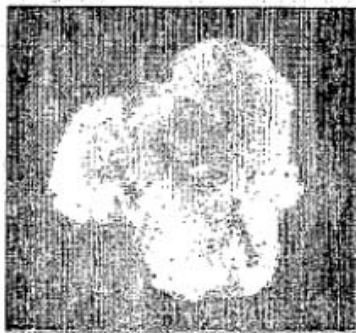


FIG. 8C

GFP



FIG. 8D

MICROSCOPIO ÓPTICO



FIG. 8E

GFP

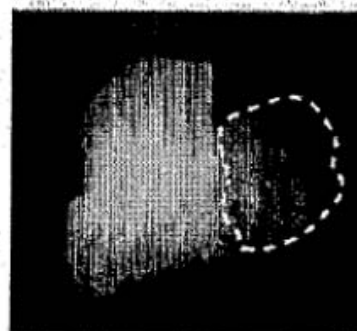


FIG. 8F

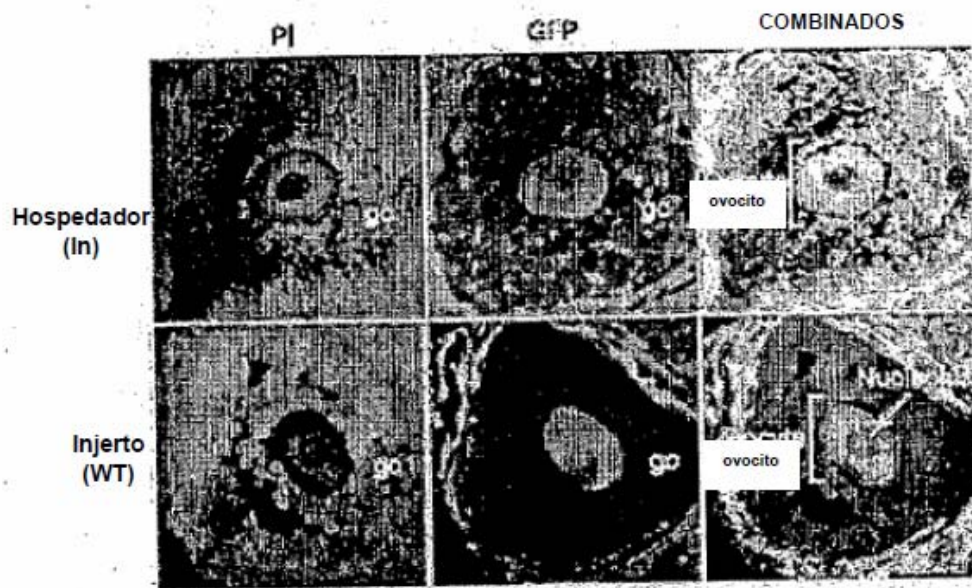


FIG. 9A

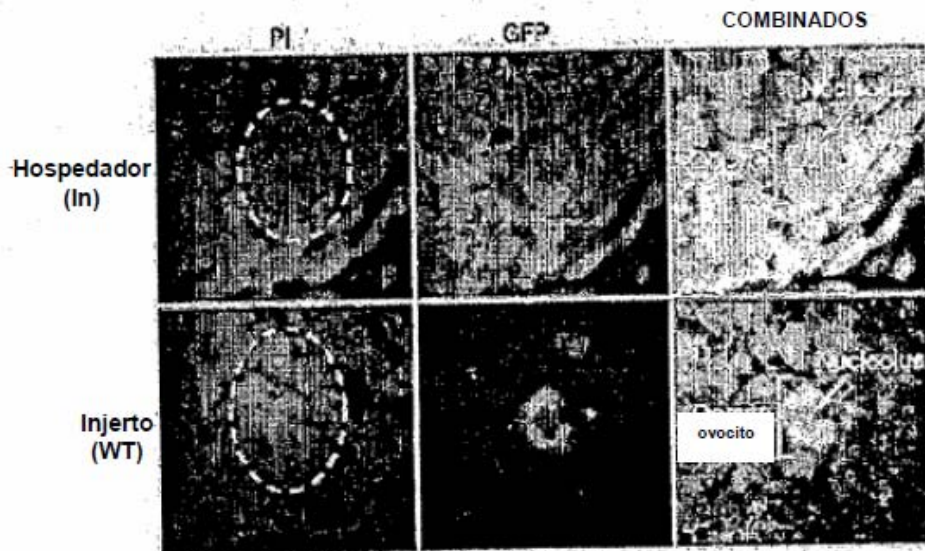


FIG. 9B

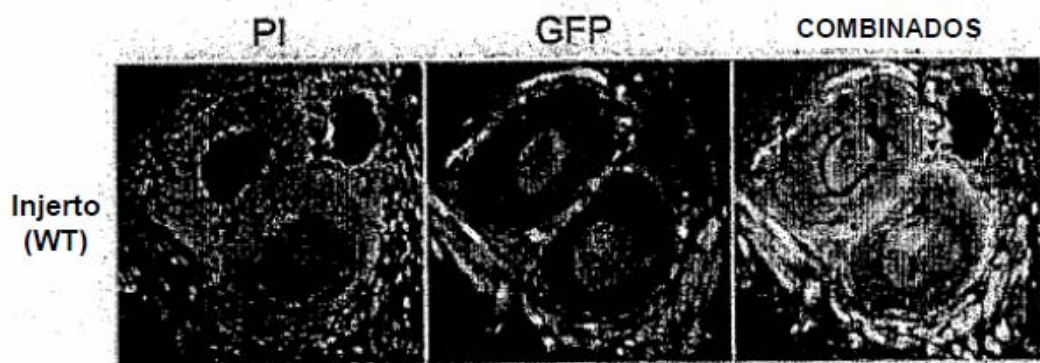


FIG. 10

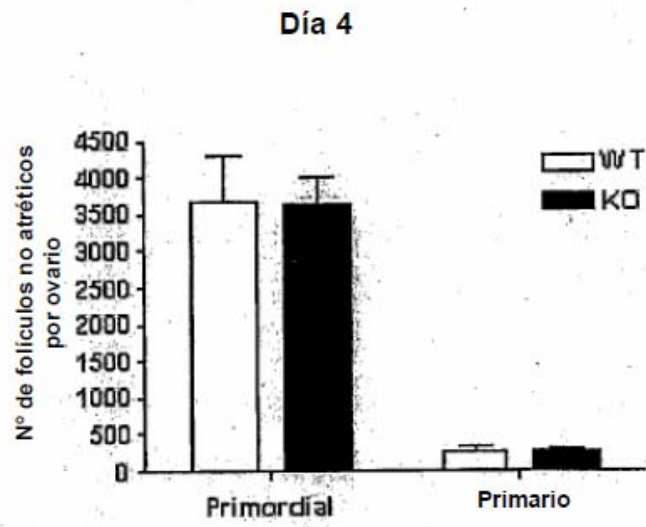


FIG. 11A

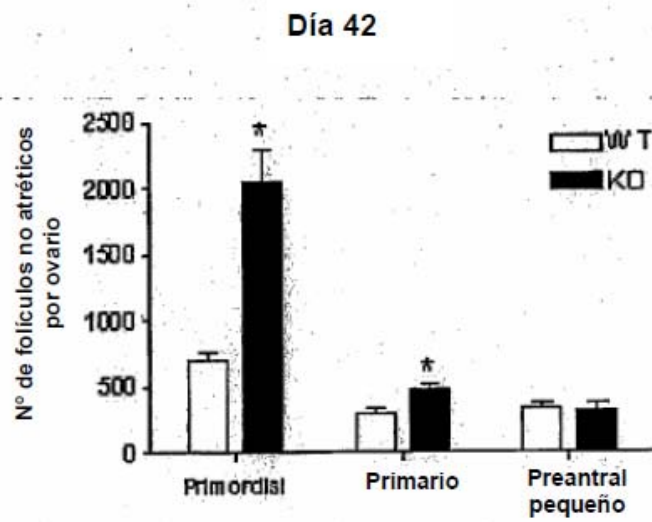


FIG. 11B

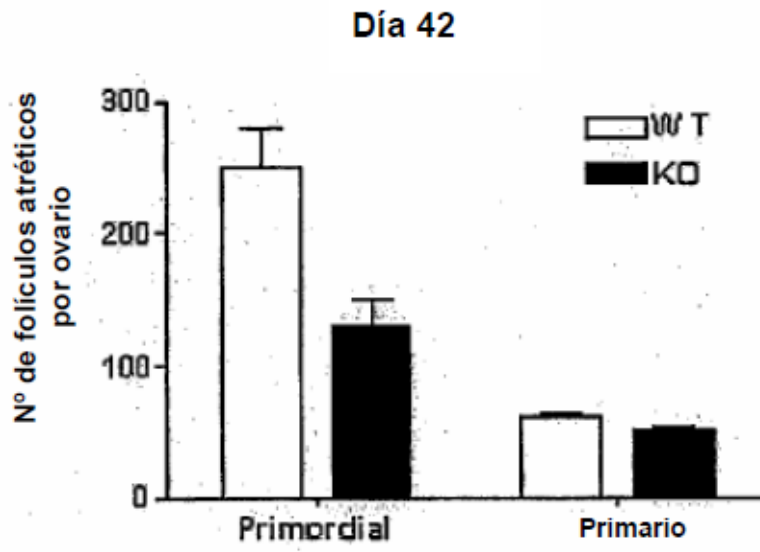
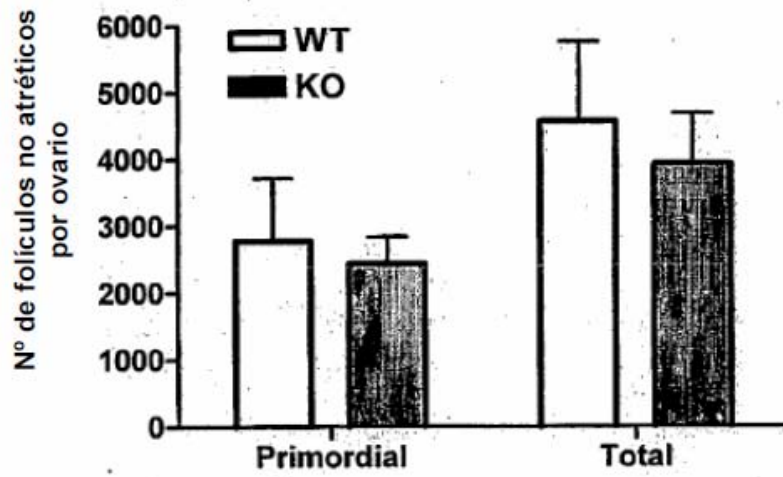
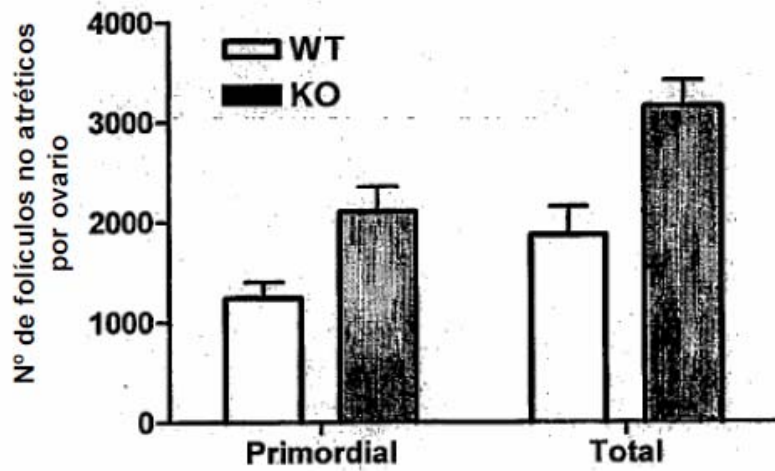


FIG. 11C



Día 4

FIG. 12A



Día 42

FIG. 12B

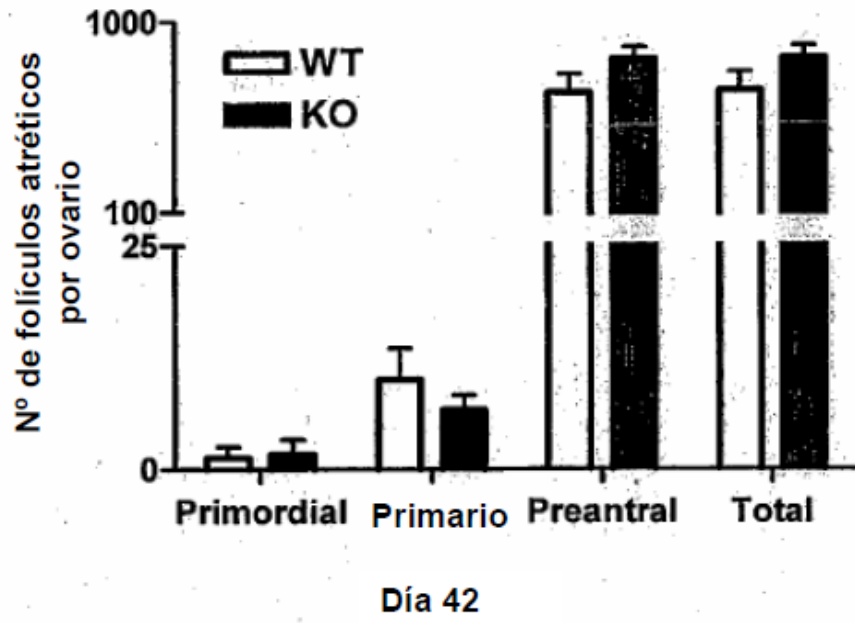


FIG. 12C

Tipo silvestre

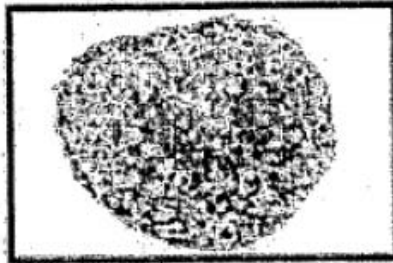


FIG. 13A

Atm^{-/-}



FIG. 13B

Tipo silvestre



FIG. 13C

Atm^{-/-}

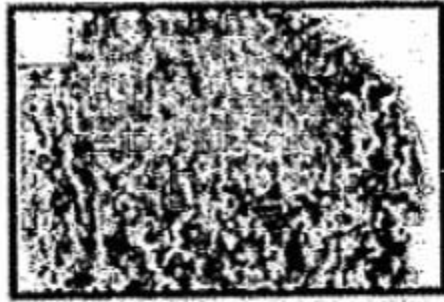


FIG. 13D

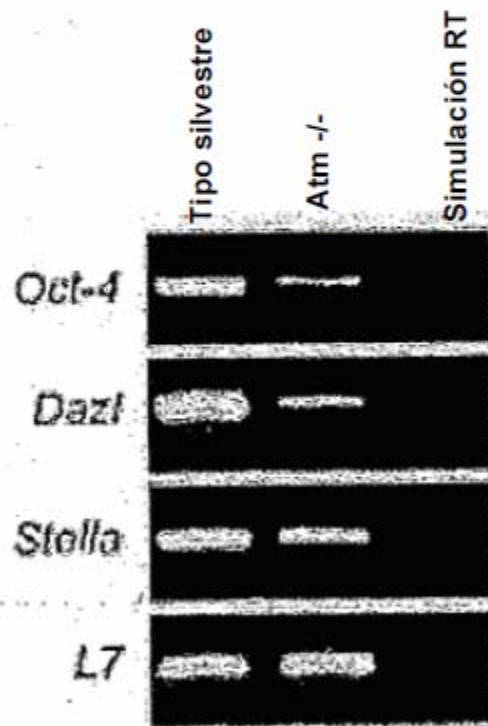


FIG. 13E

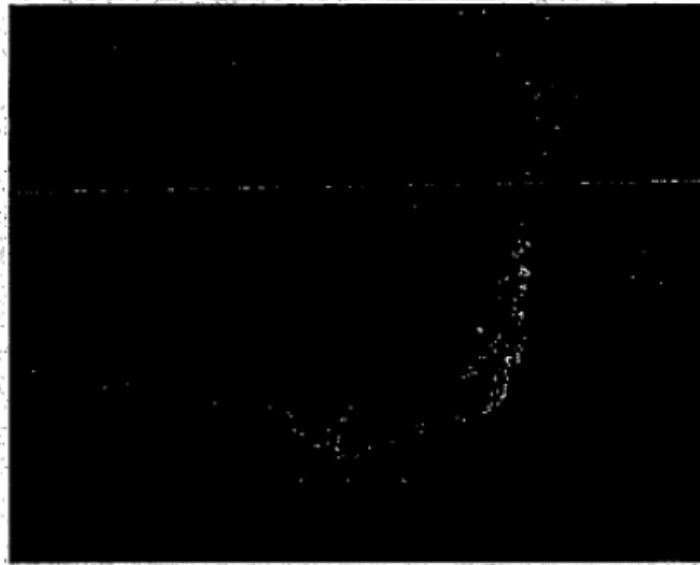


FIG. 14A

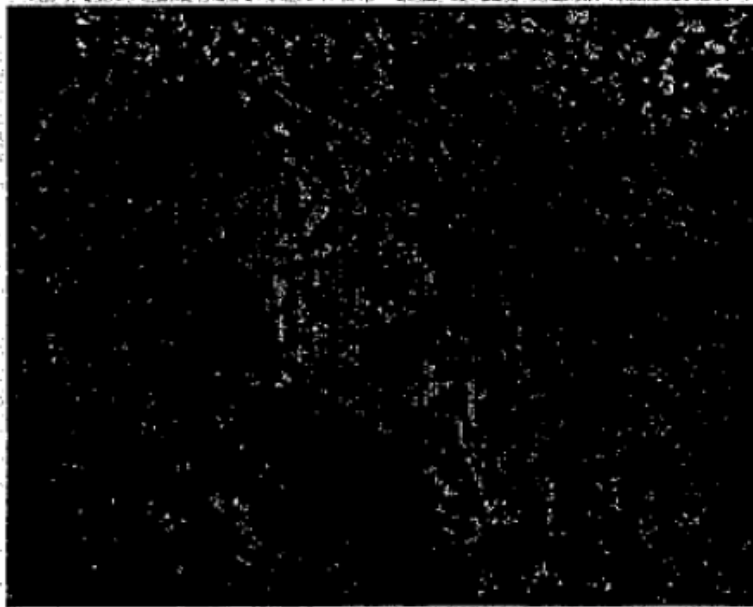


FIG. 14B

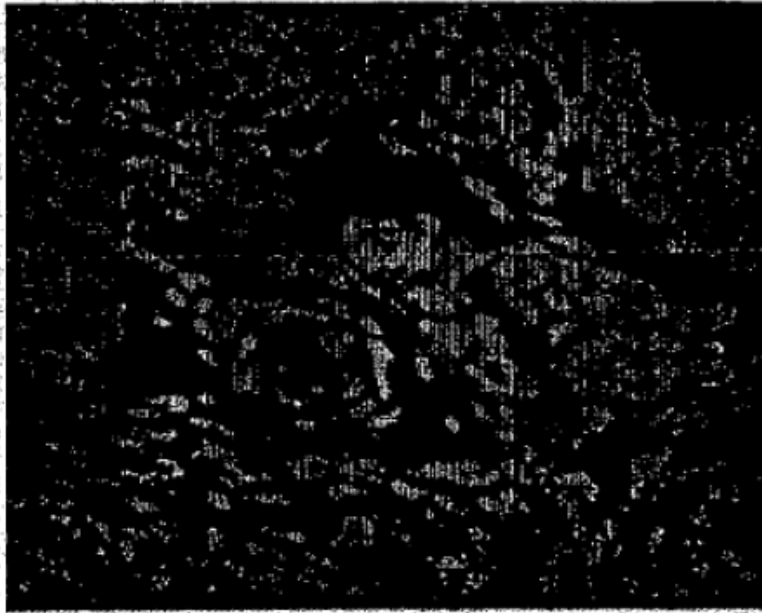


FIG. 14C



FIG. 14D

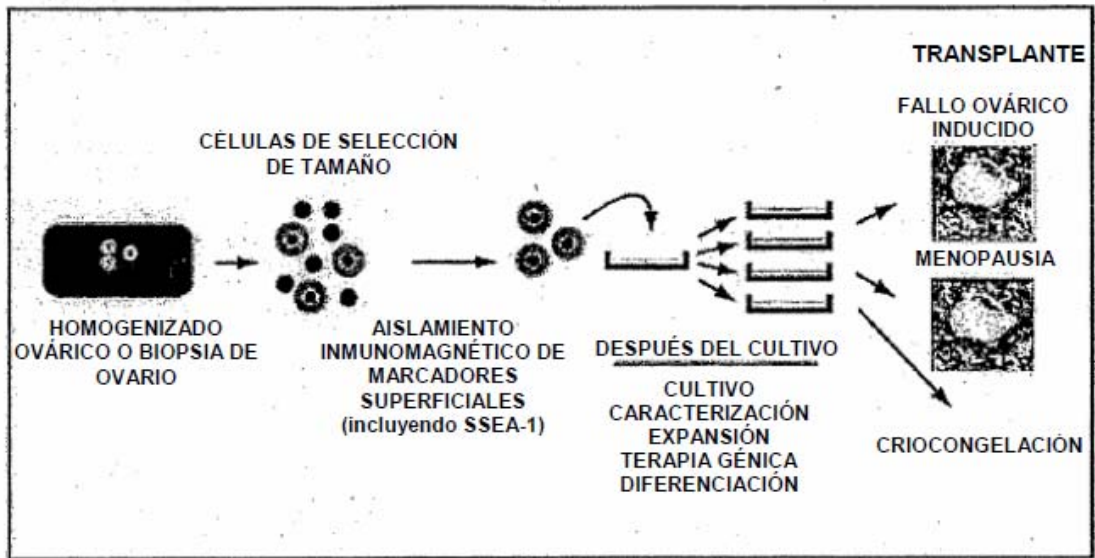


FIG. 15

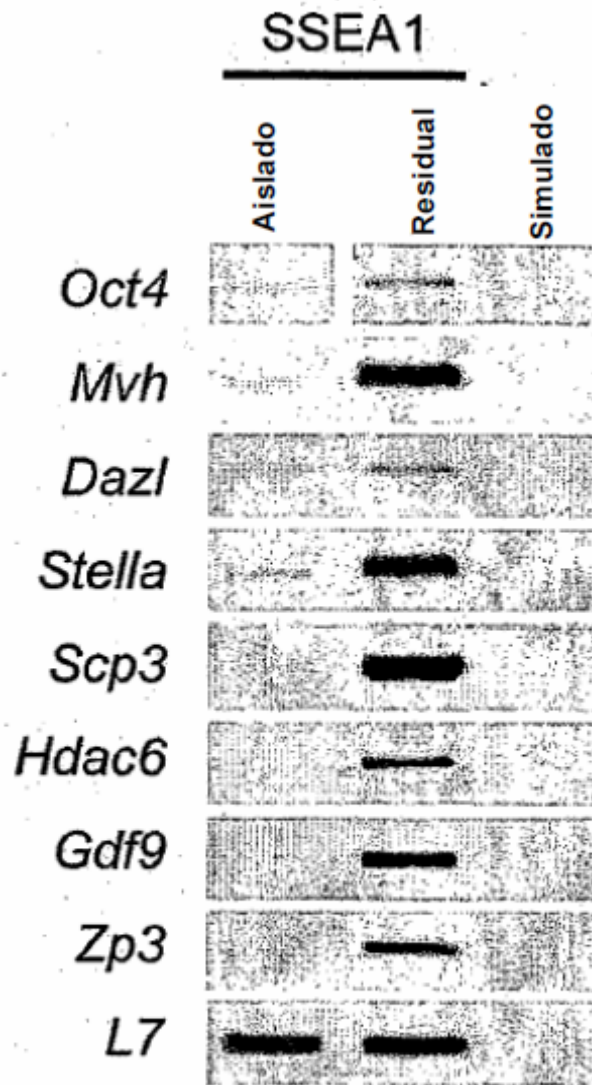


FIG. 16