



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 339 911**

② Número de solicitud: 200803351

⑤ Int. Cl.:
C12N 5/074 (2010.01)
A61K 35/55 (2006.01)
A61P 5/06 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **25.11.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
26.05.2010

⑰ Solicitante/s:
**Universidade de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS-Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES
Fundación Centro Nacional de Investigaciones
Oncológicas Carlos III**

⑱ Inventor/es: **Álvarez Villamarín, Clara;
Diéguez González, Carlos;
García Lavandeira, Montserrat y
Malumbres, Marcos**

⑲ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

⑳ Título: **Aislamiento de células hipofisarias multipotentes y diferenciación *in vitro* de las mismas.**

㉑ Resumen:

Aislamiento de células hipofisarias multipotentes y diferenciación *in vitro* de las mismas. El procedimiento de la invención se basa en la presencia en las células hipofisarias multipotentes de un receptor de la cara exterior de la membrana, GFRa2+, que no presentan otras células de la hipófisis. El procedimiento de aislamiento utiliza anticuerpos dirigidos contra ese receptor y técnicas que permiten la separación de las células a las que se hayan unido dichos anticuerpos. Una vez aisladas, las células pueden mantenerse en cultivo sin diferenciarse o puede provocarse su diferenciación, para dar lugar a células productoras de hormonas hipofisarias o a células con fenotipo de neuronas. Así, las células aisladas por el procedimiento de la invención pueden utilizarse para la producción de hormonas hipofisarias. El uso de anticuerpos dirigidos contra GFRa2+, acoplados a moléculas señalizadoras, permite también la identificación de la presencia de las células hipofisarias multipotentes en cualquier muestra.

ES 2 339 911 A1

DESCRIPCIÓN

Aislamiento de células hipofisarias multipotentes y diferenciación *in vitro* de las mismas.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a un método para el aislamiento de células multipotentes no hormonales de la hipófisis, a las células aisladas mediante dicho método, a su uso para el estudio de trastornos hipofisarios tales como el hipopituitarismo, a su uso para la obtención de hormonas mediante la diferenciación previa de dichas células y a la identificación de la presencia o ausencia de las células multipotentes en una muestra de hipófisis gracias a la identificación de la presencia de un marcador característico en su membrana.

Antecedentes de la invención

15 La hipófisis (mencionada también en algunos textos como glándula pituitaria) es un órgano endocrino central, situado debajo del hipotálamo, que regula funciones fisiológicas básicas tales como el crecimiento, la respuesta al estrés, la reproducción, la lactancia y la homeostasis metabólica. Consta de tres lóbulos: la adenohipófisis, donde las células secretoras forman agregados llamados acinares; el lóbulo intermedio, donde se concentran los melanotropos (sintetizan péptidos derivados del gen de de POMC: proopiomelanocortina), y la neurohipófisis, donde los terminales de los axones hipotalámicos liberan ADH (hormona antidiurética, conocida también como vasopresina) y oxitocina. Entre el lóbulo intermedio y la adenohipófisis se halla una hendidura alrededor de la cual se sitúa la llamada zona marginal. La capa de células opuesta a la hendidura se origina, como la adenohipófisis, en la bolsa de Rathke formada a partir del ectodermo oral durante el desarrollo embrionario.

25 La adenohipófisis alberga varios tipos de células endocrinas secretoras de hormonas que regulan la función de otros órganos y glándulas endocrinas a lo largo de la vida. Así, los somatotropos, lactotropos y tirotropos, que son células que expresan Pit-1, segregan la hormona del crecimiento (GH), la prolactina (PRL), y la hormona estimulante de la tiroides (TSH), respectivamente; los corticotropos segregan la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y los gonadotropos segregan la hormona luteinizante (LH) y/o la hormona estimulante del folículo (FSH). Todas estas células de la adenohipófisis surgen durante el desarrollo de un primordio ectodérmico común conocido como la bolsa de Rathke. Sin embargo, no se sabe mucho sobre la renovación de las células de la hipófisis a lo largo de la vida y su regulación homeostática durante cambios fisiológicos específicos tales como la pubertad o el embarazo o en condiciones patológicas tales como el desarrollo tumoral. Para explicar estos cambios, se han propuesto tanto la proliferación celular de las células secretoras individuales diferenciadas como la proliferación asimétrica, seguida de diferenciación terminal, de células madre/progenitoras, presentes en la hipófisis, que mantienen la homeostasis de esta glándula y generan las células endocrinas (productoras de hormonas) (Vankelecom H, 2007b; Melmed S, 2003).

Tal como ha sido revisado por Fuchs y colaboradores (Fuchs E *et al.*, 2004), las células madre adultas son células que se dividen infrecuentemente y residen en microambientes protegidos o nichos (revisado por Moore K A y Lemischka I R, 2006), con una tasa baja de erosión telomérica a lo largo de su tiempo de vida. Las células madre, además, residen frecuentemente en un microambiente tridimensional con expresión incrementada de la ruta Wnt/b-catenina. Existen también ciertos genes que son considerados como marcadores de células madre, entre los que se pueden citar los siguientes:

- 45 - Oct4, que es bien conocido por su expresión en la masa de células internas de la blástula, aunque su hipotético papel en la renovación de las células madre adultas pluripotenciales (Lengner C J *et al.*, 2007) debe ser mejor definido;
- 50 - Los genes Sox, que tienen papeles relevantes en las células madre embrionarias y adultas con una función significativa en los tejidos derivados del neuroectodermo (Pevny L H *et al.*, 1997). Las mutaciones del gen Sox9 son responsables de una enfermedad autosómica dominante muy grave llamada Displasia Campomélica, en la que los niños presentan en el momento del nacimiento muchos defectos esqueléticos y extraesqueléticos que incluyen la reversión del sexo y mueren muy jóvenes (Wunderle V M *et al.*, 1998). Las mutaciones en el gen Sox2 causan hipoplasia hipofisaria asociada con hipogonadismo hipogonadotrópico y anomalías encefálicas, oculares y óticas (Hagstrom S A *et al.*, 2005; Kelberman D *et al.*, 2006).

La existencia de una célula primordial en la hipófisis se propuso hace más de diez años, cuando en casos excepcionales adenomas hipofisarios humanos expresaron simultáneamente hormonas dependientes de Pit-1 (GH, PRL y TSH) más ACTH y hormonas gonadotrópicas, pero la identidad de esas supuestas células madre/progenitoras hipofisarias no está bien establecida.. De hecho, tal como ha sido revisado por Vankelecom (Vankelecom H, 2007a) se han descrito en la hipófisis diversas células no hormonales, cuya función no se comprende bien, y que se han propuesto como candidatas a células madre/progenitoras hipofisarias, células entre las cuales se incluyen células de la zona marginal que bordean la hendidura hipofisaria, originadas en la bolsa de Rathke, y las células foliculoestrelladas (FS) que se localizan por todo el parénquima hipofisario. En general, las evidencias presentadas en apoyo de esta función para los distintos tipos de células mencionadas pueden considerarse poco concluyentes y, además, los grupos descritos de células candidatas a células madre/progenitoras constituyen grupos de células heterogéneos, en los que no es segura la función de cada uno de los tipos de células que los integran.

Recientemente, ensayos realizados con células adenohipofisarias extraídas de ratones han permitido observar que una población colateral (células SD) que excluye de forma eficaz el colorante vital Hoechst 33342 (uno de los métodos utilizados para la posible identificación de células madre adultas en diversos tejidos), se segrega parcialmente con un grupo de células de la hipófisis que son capaces de formar esferas clonales flotantes en cultivo (Chen J *et al.*, 2005) (otro de los métodos habitualmente utilizados para aislar y caracterizar potenciales células madre/progenitoras de numerosos tejidos) y que expresan genes comúnmente reconocidos como marcadores de células madre, tales como Sca1 y, adicionalmente, en la mayor parte de ellas, Oct4, Nanog, nestina, prominina-1 y Bmi-1, así como también moléculas de señalización que han sido implicadas en la renovación de células madre y en la determinación del destino final de esas células en diversos tejidos (componentes de las rutas de señalización de Notch, Wnt o Shh, tales como Notch-1, Hes1, los receptores Fzd o el receptor de Shh Patched1). Estas células, sin embargo, eran negativas para el marcador Prop1, un factor de transcripción conocido por su expresión exclusiva durante el desarrollo de la hipófisis, cuya deficiencia es responsable del enanismo de Ames en ratones (Nasokin I O *et al.*, 2004), y del hipopituitarismo con Deficiencia Combinada de Hormonas Hipofisarias (CPHD) en seres humanos (Wu W *et al.*, 1998), una alteración esta última en la que la hipófisis experimenta una pérdida progresiva general de células secretoras de hormonas, que parece estar asociada a una pérdida de células progenitoras. Entre las células SD que eran positivas para el marcador Sca1, una pequeña proporción mostraba características fenotípicas de las células foliculoestrelladas (FS), tales como la capacidad de incorporación del dipéptido β -Ala-Lys-N ϵ -AMCA o la presencia de la proteína S100, lo que es indicativo de que la población analizada contiene una mezcla variada de diferentes tipos celulares y marcadores.. Sin embargo, a parte del profuso estudio descrito sobre expresión de marcadores y capacidad de generación de esferas, en el artículo no se aporta ninguna prueba de que alguna de estas células, o las esferas generadas a partir de ellas, sean capaces de diferenciarse dando lugar a diferentes linajes celulares adenohipofisarios.

Otros autores (Lepore D A *et al.*, 2005) han aislado células formadoras de colonias de la hipófisis (PCFCs), que son capaces de generar colonias a partir de cultivos primarios de células de hipófisis de ratón, mostrando un notable potencial clonogénico. La mayoría de las células PCFC detectadas por esos autores exhiben características morfológicas y antigénicas coincidentes con las de las células FS, incluida la capacidad de incorporar el dipéptido fluorescente β -Ala-Lys-N ϵ -AMCA (células AMCA+). Entre esas células clonogénicas AMCA+ obtenidas a partir de cultivos primarios, los autores detectaron una porción de células (2%) que expresaban la hormona del crecimiento (GH+), (característica que se encontró también en una proporción de las células AMCA+ detectadas en la propia hipófisis), así como una pequeña proporción (0,6%) de células PRL+, no detectándose células positivas para ACTH, FSH o α GSU. Aunque en el artículo se sugiere que las células PCFC podrían tener la capacidad de diferenciarse en células GH+ o PRL+, no se dan datos que demuestren que estas últimas se generen a partir de las primeras ni se indican las condiciones que permitirían tal diferenciación, ni *in vivo* ni *in vitro*. Tampoco se menciona en el artículo ningún otro marcador fisiológico relevante que permita distinguir aquellas células AMCA+ hipofisarias que, hipotéticamente, pudieran tener capacidad de diferenciarse en lactotropos o somatotropos, de las restantes células del heterogéneo grupo de las AMCA+. Aunque posteriores trabajos del mismo grupo (Lepore *et al.*, 2006) demostraron que la selección de las células AMCA+ por su capacidad de expresar el marcador ACE (la enzima convertidora de angiotensina) permite un enriquecimiento en el porcentaje de células PCFC, la cuestión de la posible capacidad de diferenciación de las células AMCA+ ACE+ seguía pendiente.

Recientemente, se ha descrito (Fauquier T *et al.*, 2008) en la hipófisis de ratón adulto la presencia de células que expresan Sox2, un miembro de la subfamilia SOXB1 de factores de transcripción que se requiere para el mantenimiento de varias poblaciones de células madre, de las células pluripotentes del embrión ratón previo al implante, y para el mantenimiento de sus células homologas *in vitro*, las células ES. Estas células Sox2+, que representan el 3-5% de las células del lóbulo anterior, parecen corresponder a células FS y células de la zona marginal. En la hipófisis de los ratones adultos, las células que expresan Sox2 expresan también E-cadherina (un marcador células adultas FS y de la zona marginal comúnmente abreviado como E-cad), aunque no todas ellas expresan S100. La mayor parte de las células Sox2+ E-cad+ expresan también Sox9, aunque un 1% de las células Sox2+ E-cad+ de la hipófisis adulta no expresan Sox9). El cultivo de células dispersas de adenohipofisis en condiciones que permiten la formación de esferas no adherentes permitió observar que las células formadoras de las esferas parecen ser Sox2+ E-cad+, pero la expresión de Sox9 o S100 sólo pudo observarse en ellas tras 6-7 días de cultivo. Las células Sox2+ E-cad+ Sox9- en cultivo fueron capaces de diferenciarse dando lugar a todos los tipos de células endocrinas presentes en la adenohipofisis, así como en células FS S100+. Las células Sox9+, en cambio, fueron incapaces de generar esferas secundarias a partir de monocapas de estas células. Todo esto parece indicar que las esferas no adherentes se forman a partir de las células Sox2+ E-cad+ S100- Sox9- que tapizan la hendidura de la hipófisis, que parecen ser células progenitoras capaces de diferenciarse dando lugar a todas las células endocrinas presentes en la adenohipofisis, mientras que las células Sox2+ Sox9+ de la hipófisis representan células amplificadoras transitorias, con una alta capacidad de dividirse, que han iniciado ya el proceso de diferenciación.

Los resultados de Fauquier *et al.* parecen demostrar la existencia en la hipófisis de ratón de células madre, localizadas tanto en la capa epitelial como también profusamente entremezcladas con las células diferenciadas, capaces de diferenciarse dando lugar tanto a células FS como a cualquiera de las células endocrinas de la adenohipofisis. Sin embargo, estas células Sox2+ Sox9- multipotentes carecen de un marcador característico que permita diferenciarlas de las células de tránsito Sox2+ Sox9+, también presentes en la hipófisis, que parecen representar un estadio intermedio transitorio en el proceso de diferenciación y que no son capaces de dar lugar a esferas flotantes en cultivo.

Sería interesante encontrar un marcador que permitiera identificar las células multipotentes, capaces de diferenciarse dando lugar a todas las células endocrinas de la hipófisis, y diferenciarlas tanto de las células progenitoras que

representan un estadio transitorio de diferenciación como de cualquier otra célula de la hipófisis. Ese marcador permitiría localizar de forma precisa la situación de estas células en la hipófisis y facilitaría su aislamiento específico, sin contaminaciones con otros tipos celulares. Idealmente, ese marcador debería estar presente tanto en las células madre/progenitoras multipotentes de ratón como en las hipotéticas células análogas que pudieran existir en seres humanos, y debería permitir el aislamiento de dichas células sin alterarlas. Preferiblemente, el marcador específico debería ser una proteína que se encontrara en la cara exterior de la membrana de las células, porque eso facilitaría la interacción de ese marcador con anticuerpos específicos dirigidos contra el mismo y posibilitaría el diseño de métodos de aislamiento específicos de células multipotentes de hipófisis mediante métodos basados en la separación de anticuerpos que han interactuado previamente con la muestra de interés y a los que ha quedado unido las moléculas contra las cuales van dirigidos, en este caso, el marcador de membrana, arrastrando con ello todo lo que esté unido al propio marcador, en este caso las propias células que, por lo demás, deberían quedar intactas y perfectamente viables.

La presente invención supone una solución a ese problema.

15 Compendio de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de la presencia en la hipófisis de un nicho de células multipotentes no hormonales que expresan el marcador GFRA2, el receptor alfa 2 del GDNF, el factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales. Este receptor, al igual que el receptor GFRA1, se expresa en supuestas células madre de la línea germinal en algunos tejidos tales como testículo y ovario (Widenfalk J *et al.*, 2000; Hoffmann M C *et al.*, 2005). En la hipófisis, los somatotropos (células productoras de GH) son las únicas células secretoras que expresan Ret y GFRA1 tanto en rata (Urbano A G *et al.*, 2000) como en seres humanos (Japón M A *et al.*, 2002). La expresión del GFRA2, en cambio, no se había descrito en hipófisis hasta ahora. Ello permite el aislamiento de las células multipotentes a partir de muestras de hipófisis gracias a la presencia del marcador GFRA2. Al contrario de lo que sucedía con otros marcadores mediante los cuales se había intentado previamente caracterizar las posibles células madre/progenitoras presentes en la hipófisis, el hecho de que se trate de un receptor de membrana orientado hacia el exterior de la misma, facilita el proceso de aislamiento de las células mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra dicho marcador, recurriendo a métodos basados en la separación de anticuerpos de muestras con las que han estado en contacto, arrastrando con ellos las moléculas a las que se hayan unido y las células en cuya membrana estén presentes. Todo ello da lugar a un proceso sencillo, en el que las células sufren pocas alteraciones.

Además, estas células multipotentes no hormonales expresan también b-catenina y E-cadherina de manera orientada, lo que sugiere una organización del nicho con una polaridad planar. El factor de transcripción específico de hipófisis Prop1 también se expresa en este nicho de la hipófisis de los adultos de forma exclusiva, de forma similar a marcadores bien establecidos de células madre/progenitoras tales como Sox2, Sox9 y Oct4, marcadores todos ellos que pueden suponer un apoyo a la hora de identificar de forma más precisa estas células multipotentes en muestras extraídas de la hipófisis y en su proceso de aislamiento.

Las células positivas para GFRA2 se pueden aislar fácilmente para formar esferoides no endocrinos en cultivo. Estos esferoides se pueden diferenciar para dar lugar a células productoras de hormonas o neuronas, lo que muestra que las células GFRA2+ hipofisarias pueden actuar como progenitores multipotenciales con potencial neuroectodérmico. *In vivo*, estas células muestran una disminución de la proliferación tras el nacimiento y la totalidad de las células del nicho comparte largos telómeros en sus núcleos, un rasgo distintivo de las células madre/progenitoras.

La proliferación de las células GFRA2+ está alterada en un modelo de hipopituitarismo de ratón, inducido por la falta del regulador del ciclo celular Cdk4, lo que indica que estas células pueden ser relevantes para la homeostasis y las enfermedades de la hipófisis.

Todos estos datos indican que la presencia del marcador GFRA2 permite el aislamiento y la identificación en la hipófisis del adulto de un nicho específico de células que expresan marcadores específicos de hipófisis y que presentan características de células multipotentes, que pueden diferenciarse *in vitro* para dar lugar a otros tipos celulares. Una vez aisladas, puede inducirse la diferenciación de estas células para dar lugar tanto a neuronas como a cualquiera de las células productoras de hormonas de la hipófisis, pudiendo así utilizarse para la producción de hormonas hipofisarias, que son compuestos de gran interés para la industria farmacéutica. Además, dada su implicación en varios trastornos de la hipófisis tales como el hipopituitarismo, tanto las células GFRA2+ aisladas como las células diferenciadas generadas a partir de ellas pueden ser útiles para el estudio de esos trastornos. La posibilidad que ofrece el marcador GFRA2+ de identificar claramente estas células en muestras de hipófisis también puede ayudar en el estudio de esos trastornos a partir de muestras extraídas de hipófisis, facilitando la detección en esas muestras, por ejemplo, de alteraciones que se produzca específicamente en esas células y/o que estén asociadas con síntomas y patologías detectadas en el individuo del que se extrajeran.

Así, en un aspecto de la misma, la invención se refiere a un método para el aislamiento de células hipofisarias multipotentes que comprende las etapas de:

- 65 a) poner en contacto una muestra de células post-embrionarias de hipófisis dispersas con una composición que comprende un anticuerpo que reconoce el receptor GFRA2;

ES 2 339 911 A1

- b) separar las células a las que se haya unido el anticuerpo que reconoce el receptor GFRA2 del resto de las células presentes en la muestra de partida.

Preferiblemente, el anticuerpo que reconoce el receptor GFRA2 es un anticuerpo monoclonal específico para dicho receptor. Se prefiere particularmente que el anticuerpo esté acoplado a una partícula magnética, bien directamente, bien porque el anticuerpo esté unido a un segundo anticuerpo que sea el que esté unido a la partícula magnética, pues ello facilita la separación por medios magnéticos de las células a las que se haya unido el anticuerpo del resto de las células presentes en la muestra.

En otro aspecto, la invención se refiere a las células aisladas por el método de la invención anteriormente descrito. Así, otro aspecto de la invención son las células multipotentes no hormonales aisladas, procedentes de hipófisis post-embriónica, caracterizadas por ser positivas para el marcador GFRA2. A estas células se aludirá también en adelante como las células multipotentes hipofisarias de la invención o las células GFRA2+.

Otro aspecto adicional de la invención lo constituye un método para la expansión de las células multipotentes hipofisarias de la invención, que comprende cultivar dichas células de manera que cumpla al menos una de las siguientes condiciones:

- a) en medio libre de suero;
- b) en un recipiente de cultivo recubierto de gelatina, utilizando un medio de cultivo que contiene medio aspirado de un cultivo de fibroblastos embrionarios;
- c) sobre células de soporte inactivadas para que no proliferen.

Cualquiera de estos métodos de cultivo son válidos para las células multipotentes hipofisarias de la invención, aunque dan lugar a fenotipos diferentes. El medio libre de suero puede ser, por ejemplo, medio DMEM/F12 1:1 suplementado con al menos un antibiótico, que comprende también uno o más suplementos diseñados para el crecimiento de células progenitoras nerviosas: un suplemento diseñado para permitir el crecimiento de células nerviosas diferenciadas o progenitoras de células nerviosas en ausencia de suero y células de soporte (suplemento B27 en el Ejemplo de la presente solicitud) y/o un suplemento diseñado para permitir el crecimiento de neuronas embrionarias o células embrionarias progenitoras de neuronas del sistema nervioso central (suplemento N2 en el Ejemplo de la presente invención). El medio aspirado de un cultivo de fibroblastos embrionarios puede obtenerse, por ejemplo, de fibroblastos embrionarios de ratón mantenidos en DMEM que contenía suero bovino fetal al 20%, aminoácidos no esenciales al 1%, glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM y al menos un antibiótico; este medio puede mezclarse, por ejemplo en una proporción 1:1, con otro medio diseñado preferiblemente para el crecimiento de células madre y/o progenitoras, tal como es el caso del medio StemM que se menciona posteriormente. También es posible realizar el crecimiento sobre células de soporte inactivadas para que no proliferen, que pueden ser, por ejemplo, fibroblastos embrionarios inactivados con mitomicina.

Una realización preferida de dicho método de expansión de las células multipotentes hipofisarias de la invención es aquella en la que, una vez obtenidos esferoides a partir de las células en cultivo, se modifican las condiciones de cultivo de los mismos para que se produzca su diferenciación en células productoras de hormonas hipofisarias (GH, PRL, TSH, ACTH, LH o FSH) o en células con fenotipo de neuronas. Así, una realización preferida del método de expansión de células multipotentes hipofisarias de la invención es aquél que comprende una etapa de diferenciación de las células en cultivo. Para ello, las células se siembran sobre una matriz polimérica y se cultivan en un medio que contiene suero, medio en el que se mantienen al menos un día, para permitir su adhesión a la matriz. La matriz polimérica puede ser, por ejemplo, colágeno tipo IV o poli-L-lisina. Según la matriz polimérica y el medio de cultivo específico por el que sustituye específicamente el medio libre de suero, se observa diferenciación en distintos tipos de células presentes en la hipófisis. Tal como se muestra posteriormente en Ejemplos de la presente solicitud, las células pueden estar en forma de esferoides cuando se induce su diferenciación.

En conexión con el método anterior, un aspecto más de la invención se refiere a las células diferenciadas derivadas de las células hipofisarias multipotentes no hormonales aisladas de la invención, caracterizadas por expresar al menos una hormona que se selecciona entre hormona del crecimiento (GH), prolactina (PRL), hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante del folículo (FSH) o por expresar el isotipo III de la beta-tubulina. A cualquiera de estas células diferenciadas a partir de las células multipotentes hipofisarias de la invención se aludirá también de aquí en adelante como las células diferenciadas hipofisarias de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una población de células aisladas derivadas de la hipófisis, a la que se denominará de aquí en adelante "población de células de la invención", que comprende células seleccionadas del grupo que comprende células multipotentes hipofisarias de la invención, células diferenciadas hipofisarias de la invención, y combinaciones de las mismas.

En un aspecto más, la invención se refiere también al uso de las células adultas hipofisarias multipotentes aisladas de la invención, de las células diferenciadas hipofisarias de la invención productoras de hormonas o de una población de células de la invención, para la producción de al menos una hormona que se selecciona entre hormona del crecimiento

ES 2 339 911 A1

(GH), prolactina (PRL), hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante del folículo (FSH).

Otro aspecto más es el uso de las células hipofisarias multipotentes de la invención, de las células diferenciadas hipofisarias de la invención o de una población de células de la invención para el estudio de un trastorno de la hipófisis seleccionado entre el hipopituitarismo o el quiste de la hendidura de Rathke.

En conexión con el anterior, un aspecto más de la invención lo constituye un método de identificación de células multipotentes hipofisarias en una muestra extraída de la hipófisis de un mamífero que comprende poner en contacto dicha muestra de hipófisis con una composición que comprende un anticuerpo primario que reconoce el receptor GFRa2, anticuerpo que se acopla a una sustancia que permite su detección. La sustancia que permite la detección del anticuerpo primario puede acoplarse a éste, bien uniendo la sustancia directamente al anticuerpo, bien uniendo la sustancia a un segundo anticuerpo que es capaz de unirse al primer anticuerpo.

Por último, otro aspecto de la invención se refiere al uso de las células adultas hipofisarias multipotentes aisladas de la invención, de las células diferenciadas hipofisarias de la invención o de una población de células de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del hipopituitarismo o el quiste de la hendidura de Rathke.

20 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 se refiere a la localización de las células que expresan GFRa2+ en un nicho de células epiteliales no secretoras de la zona marginal en la hipófisis adulta de ratas y ratones.

- La parte superior (panel A), correspondiente a muestras de rata, muestra la localización de la hipófisis, de sus tres lóbulos y la posición relativa de las células GFRa2+: las fotografías de la izquierda muestran tinciones de secciones coronales (arriba) y axiales (abajo) con hematoxilina y eosina, para mostrar la localización de la hipófisis bajo el hipotálamo y en la parte superior de la silla turca esfenoidal (Sc), así como la disposición de los tres lóbulos hipofisarios: adenohipófisis (AP), lóbulo intermedio (IL) y neurohipófisis (NP). Los dibujos de la parte intermedia son esquemas en los que se reproduce de forma simplificada la disposición de cada parte de acuerdo con las tinciones de la parte izquierda. Las fotografías de la parte derecha corresponden a pruebas de inmunofluorescencia realizadas en muestras de secciones coronales (arriba) y axiales (abajo), tratadas sólo con anticuerpos anti-GFRa2 o también con DAPI, donde se demuestra que las células GFRa2+ (rojo en el original) se disponen en una línea precisa en la frontera entre la adenohipófisis (AP) y el lóbulo intermedio (IL), cuya localización se indica mediante las puntas de flecha; unas pocas células, cuya tinción debida al anticuerpo anti-GFRa2+ es menos intensa, aparecen dispersas a través de la adenohipófisis (punta de flecha).

- Las fotografías del panel B corresponden a muestras de hipófisis de rata incubadas con anticuerpos marcados con marcadores fluorescentes: un anticuerpo anti-GFRa2 y un anticuerpo dirigido, en cada fotografía, a una hormona hipofisaria diferente, según se indica en el esquema superior izquierda de cada una de ellas: hormona del crecimiento (GH), prolactina (PRL), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH). Se indican las posiciones de la adenohipófisis (AP) y el lóbulo intermedio (IL); las puntas de flechas indican la posición de la línea de célula GFRa2+, que no coincide con las señales correspondientes a las hormonas hipofisarias, lo que demuestra que la línea de células GFRa2+ no expresa ninguna hormona hipofisaria.

- Las fotografías del panel C corresponden a muestras de hipófisis de rata incubadas con parejas de anticuerpos marcados con marcadores fluorescentes: un anticuerpo anti-GFRa2 y un segundo anticuerpo, cuya diana se indica de forma abreviada en la esquina superior izquierda de cada foto: anti-citoqueratinas (CytoK), anti-E-cadherina (E-cad) o anti-b-catenina (b-cat). En los casos indicados, se incluyó también un tinte con DAPI. En todos los casos, la coincidencia de las señales correspondientes al anticuerpo anti-GFRa2 y el segundo anticuerpo demuestra que las células GFRa2+ son células epiteliales con expresión incrementada de citoqueratinas, E-cadherina y beta-catenina en comparación con las otras células de la adenohipófisis. Las fotografías de la fila inferior permiten observar la orientación de las células GFRa2+ dentro del nicho, según la localización de la sección de la que procede la muestra, indicada en la parte inferior de cada foto, coronal (fotografía de la izquierda) o axial (resto de las fotografías de la fila): en el eje coronal aparecen GFRa2 o b-Catenina, respectivamente, como una línea delgada o una tinción verde en forma de U, mientras que, en el eje axial, GFRa2 aparece como una superficie amplia, mientras que la b-Catenina muestra una tinción en forma de anillo en orientación perpendicular. AP: adenohipófisis; IL: lóbulo intermedio.

- Las fotografías del panel D corresponden a secciones de parafina de hipófisis de ratón, donde se muestra, a 200 (200x: fotos superiores) y 1000 aumentos (1000x: fotos inferiores) la localización de las células GFRa2 (marcadas con flechas en la foto de la izquierda) y su colocalización con E-cadherina (fotografías intermedias) y b-catenina (fotografías de la derecha).

La Fig. 2 se refiere a la distribución de las células GFRa2+, así como a su proporción y la expresión relativa de GFRa2 en ellas respecto a otros tejidos (testículos):

ES 2 339 911 A1

- En el panel A, se muestran fotografías de secciones completas de hipófisis de rata de 10 días de edad (únicas hipófisis suficientemente pequeñas como para poder obtener imágenes de secciones completas de las mismas), observadas con un bajo número de aumentos (100x), teñidas con DAPI (izquierda) o un anticuerpo anti-b-catenina (derecha). AP, adenohipófisis, IL, lóbulo intermedio; NP: neurohipófisis.

- El panel B corresponde a la fotografía de un gel de electroforesis en el que se amplificaron, a partir de RNA extraído de adenohipófisis o testículos de rata, fragmentos específicos correspondientes a los genes del receptor GFRa2+ y de la β -actina (b-act) como control de carga. Se demuestra que la expresión del mRNA de GFRa2 en la adenohipófisis de rata (AP) es comparable a la de los testículos (Test), una glándula bien conocida por la expresión de GFR-alfa.

- El panel C muestra gráficos obtenidos en ensayos de citometría de flujo realizados con células dispersas de adenohipófisis de ratón tratadas con un anticuerpo anti-conejo marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) con una incubación previa con un anticuerpo anti-GFRa2 (gráficos de la derecha) o en ausencia de anticuerpo anti-GFRa2 (gráficos de la izquierda: control negativo). Los gráficos superiores representan el recuento de células FITC+ con el nivel de señal de fluorescencia indicada en abscisas; los gráficos inferiores son diagramas de puntos en los que se representa, para cada célula, la dispersión frontal (FSC: *forward scatter*) frente a la lateral (SSC: *side scatter*). En el gráfico inferior derecho, la zona rodeada con una elipse corresponde a las células GFRa2+ detectadas después de la unión específica de un anticuerpo anti-GFRa2; el valor "0.9" indicado sobre dicho gráfico indica el porcentaje correspondiente a las células GFRa2+ sobre el total de células adenohipofisarias.

La Fig. 3 se refiere a la colocalización o ausencia de la misma de distintos marcadores de células madre/progenitoras, o implicados en el desarrollo hipofisario, en las células positivas para el marcador GFRa2 en muestras de hipófisis de roedores:

- El panel A muestra fotografías de secciones de parafina de hipófisis de ratón, donde se muestra, a 200 (columna izquierda), 400 (columna intermedia) o 600 aumentos (columna derecha) la localización de las células positivas para Sox2 (línea superior de fotografías) y Sox9 (línea inferior de fotografías). AP, adenohipófisis, IL, lóbulo intermedio; NP: neurohipófisis.

- El panel B muestra fotografías de ensayos de inmunofluorescencia en los que se detecta la localización de Sox9 y Sox2 en hipófisis de rata (fotografías con las leyendas "Sox9" y "rSox2" en su parte izquierda) y de ratón (fotografía con la leyenda "mSox2") y su colocalización con b-catenina (fotografía del extremo derecho, con la leyenda adicional "b-cat"). Las puntas de flecha indican la localización de las señales correspondientes a Sox2 y Sox9.

- El panel C corresponde a ensayos de inmunofluorescencia realizados sobre muestras de hipófisis de rata con anticuerpos fluorescentes anti-GFRa2 y/o dirigidos contra Oct4, en algunos casos, con una tinción de los núcleos con DAPI, tal como se indica en la esquina superior izquierda de las fotografías, tomadas con el número de aumentos indicado en la esquina superior derecha. Las fotografías de la fila superior corresponden a secciones axiales, mientras que las inferiores corresponden a secciones coronales. Se indica la localización de la adenohipófisis (AP) y el lóbulo intermedio (IL). Se observa que las células GFRa2+ (señaladas con puntas de flecha) muestran también una clara señal correspondiente a Oct4, que da lugar en muchos casos a la aparición de una señal amarilla en las fotografías originales (mezcla del color rojo correspondiente al marcador de GFRa2 y el verde correspondiente al marcador de Oct4).

- El panel D corresponde a ensayos de inmunofluorescencia realizados sobre muestras de hipófisis de rata, con mareajes dobles. En la primera fotografía, el mareaje se realizó con anticuerpos fluorescentes anti-GFRa2 y anticuerpos anti-SSEA4, observándose colocalización de las señales correspondientes a los marcadores fluorescentes unidos a cada anticuerpo, indicadas por puntas de flecha. Las fotografías centrales corresponden a anticuerpos anti-Sox9 y anti-GFRa1, marcados con marcadores fluorescentes diferentes, observándose sólo la señal correspondiente al marcador fluorescente de los anticuerpos anti-Sox9 (puntas de flecha con relleno, indicando la localización de señales rojas en el original), salvo en el caso de los somatotropos (puntas de flecha sin relleno, indicando la localización de señales verdes en el original). La fotografía de la izquierda, obtenida con marcadores fluorescentes unidos a anticuerpos anti-Oct4 y anti-GH (hormona del crecimiento), demuestra que no existe colocalización de la señal correspondiente a Oct4 (indicada con puntas de flecha, en el límite entre el lóbulo intermedio (IL) y la adenohipófisis (AP)) y la de la hormona del crecimiento (señales rojas situadas en la parte inferior derecha, en la zona de la AP).

- El panel E muestra secciones de parafina de hipófisis de ratón teñidas por inmunohistoquímica dirigida contra Sox4. Se observa que Sox4 se expresa en la adenohipófisis de ratón, pero no aparece tinción para esta proteína en la zona correspondiente a las células GFRa2+.

- El panel F corresponde a ensayos de inmunofluorescencia, con tinción doble, realizados sobre muestras de hipófisis de ratón con anticuerpos fluorescentes anti-GFRa2 (señales rojas en el original, indicadas mediante flechas con relleno) y anti-nestina (señales verdes en el original), con una tinción adicional de los núcleos con DAPI en la fotografía de la izquierda, tal como se indica en la esquina superior izquierda de las fotografías, tomadas con el número de aumentos indicado en la esquina superior derecha. Se observa que las células positivas para nestina están dispersas por el lóbulo intermedio (IL) y la adenohipófisis (AP), pero no coinciden con las células GFRa2+ (marcadas con puntas de flecha en el par de fotografías situadas más a la izquierda). Se observa, sin embargo, que existen estructuras finas similares a axones que vienen de la neurohipófisis y que entran en contacto con las células GFRa2 (señaladas mediante la punta de flecha que aparece en la fotografía de la derecha, tomada a 600 aumentos).

ES 2 339 911 A1

- El panel G corresponde a ensayos de inmunofluorescencia, con tinción doble, realizados sobre muestras de hipófisis de ratón con un anticuerpo fluorescente anti-Nanog (señales rojas en el original) y un segundo anticuerpo marcado de forma que da lugar a señales verdes en el original que se indican mediante puntas de flecha, bien un anticuerpo anti-Sox2 (fotografía situada más a la izquierda) o bien anti-b-catenina (par de fotografías situadas más a la derecha). La tinción para Nanog sólo se observa en el lóbulo intermedio (IL) y no se solapa con la señal de Sox2 de ratón (mSox2) o la de b-catenina, que son proteínas expresadas por las células GFRA2+.

- El panel H corresponde a ensayos de inmunofluorescencia, con tinción doble, realizados sobre muestras de hipófisis con un anticuerpo fluorescente anti-GFRA2 (que da lugar a señales rojas) y con un segundo anticuerpo que da lugar a señales verdes en el original, dirigido bien contra el receptor Ret de hipófisis de ratón (par de fotografías situadas más a la izquierda) o bien contra neurturina, en hipófisis de rata (par de fotografías situadas más a la derecha). Se observa que el anticuerpo dirigido contra el receptor Ret tiñe específicamente células de la adenohipófisis (AP) y se expresa también en neuronas de la neurohipófisis (NP), aunque también tiñe débilmente células GFRA2+ (señales amarillas en el original, indicadas mediante puntas de flecha). El ligando del receptor GFRA2+, neurturina, se localiza exclusivamente en la adenohipófisis.

- El panel I corresponde a ensayos de inmunofluorescencia, realizados sobre muestras de hipófisis de rata, con un anticuerpo fluorescente anti-S-100 (señales rojas en el original, marcadas con puntas de flecha con relleno en la primera y en la tercera de las fotografías) y, adicionalmente, en las tres siguientes fotografías, con DAPI y con un anticuerpo anti-b-catenina (señales verdes en el original, marcadas con puntas de flecha sin relleno en la tercera y cuarta fotografías). Se observa que alrededor de la mitad de las células GFRA2/b-catenina + muestran señal para S-100.

- Los paneles J y K corresponden a la detección mediante anticuerpos de las células que expresan vimentina, en hipófisis de rata (panel J) e hipófisis de ratón (panel K). Se observa que la vimentina (señales rojas, indicadas por puntas de flecha, en las fotografías originales de inmunofluorescencia del panel J) se expresa en una línea de células vecina a las células b-catenina/GFRA2+ (señales rojas, indicadas por asteriscos, en las fotografías originales de inmunofluorescencia del panel J) y paralela a las mismas, situadas más próximas al lóbulo intermedio (IL); la fijación provoca en algunas ocasiones la separación de ambas líneas de células (fotografía situada más a la derecha en el panel J). En la hipófisis de ratón se observa un patrón de tinción similar (panel K).

- El panel L corresponde a ensayos de inmunofluorescencia, con tinción doble, realizados sobre muestras de hipófisis de ratón con anticuerpos fluorescentes anti-b-catenina (señales verdes en el original, indicadas mediante puntas de flecha en la fotografía de la izquierda) y anti-Pit-1, con una tinción adicional de los núcleos con DAPI en la fotografía de la derecha, tal como se indica en la esquina superior izquierda de las fotografías. Se observa señal para Pit-1 en la zona de la adenohipófisis (AP), pero no así en el lóbulo intermedio (LI) ni en la localización de las células positivas para b-catenina que bordea a la adenohipófisis.

- El panel M muestra fotografías correspondientes a ensayos de inmunofluorescencia realizados con anticuerpos anti-GFRA2+ (señales rojas en las fotografías originales) y anti-Prop1 (señales verdes en las fotografías originales), realizados en hipófisis de rata. Se muestran las fotografías tomadas a los aumentos indicados en la esquina superior derecha de cada fotografía. Los anticuerpos utilizados en cada caso y la presencia opcional de DAPI se indican sobre la fotografía, así como la localización de la adenohipófisis (AP), lóbulo intermedio (IL) y neurohipófisis (NP). Se observa la colocalización de las señales indicativas de la presencia de GFRA2 y Prop1 en la zona marginal entre la adenohipófisis y el lóbulo intermedio (señales amarillas en la fotografía situada más a la derecha en la fila superior, indicadas mediante puntas de flecha). Se aprecia que los núcleos positivos para Prop1 están rodeados por la tinción de membrana de GFRA2.

La Fig. 4 muestra que la zona marginal (MZ) de la hipófisis humana contiene un nicho similar de células GFRA2+.

- Panel A: muestra en su parte superior izquierda con un dibujo que representa la anatomía de la hipófisis humana con una adenohipófisis anterior (AP) y una neurohipófisis posterior (NP); el límite se denomina zona marginal (MZ) y contiene estructuras dilatadas habitualmente denominadas quistes remanentes de Rathke. La sección de plano marcada en el dibujo que contiene las letras MZ representa la posición de la sección teñida con hematoxilina que se presenta a la derecha de este dibujo. Inmediatamente debajo se muestran sendas imágenes, obtenidas por inmunofluorescencia, tras tratar secciones análogas con anticuerpos fluorescentes anti-GFRA2+ (fotografía inferior izquierda) o anti-Oct4 (fotografía inferior derecha), que demuestran que las células que bordean los quistes de Rathke expresan GFRA2 y Oct4.

- Paneles B y C: La tinción de secciones de parafina conteniendo la zona marginal (pareja de fotografías marcada "MZ") o correspondientes a la adenohipófisis (pareja de fotografías marcada "AP") demuestra que esas mismas células de la zona marginal también expresan Sox9 (panel B) y Sox2 (panel C) y que la hipófisis humana también contiene pequeños grupos de células Sox9+ o Sox2+ dentro de la adenohipófisis.

- Panel D: La tinción inmunohistoquímica de secciones de parafina que contienen la zona marginal demuestran que, de forma similar a lo que sucede en hipófisis de rata, S-100 (fotografía de la izquierda) se expresa en aproximadamente la mitad de las células GFRA2+ que bordean los quistes de Rathke, mientras que las células alargadas vimentina+ (fotografía de la derecha) rodean el epitelio de células GFRA2+.

ES 2 339 911 A1

- Panel E: Detección en transferencia Western (WB: *Western blot*) del factor proteico específico de hipófisis Prop1 en hipófisis de rata (carriles marcados "rAP") y humana (carriles marcados "hAP"). Esta proteína está ausente de los restantes carriles: no se expresa en células HeLa o en una línea celular de hipófisis similar a somatotropos (GH4C1). Como control de carga se utilizó tubulina (Tub).

5

- Panel F: Los ensayos de tinción inmunohistoquímica demuestran que el ligando de GFRa2, la neurturina (NTN) se expresa también en la hipófisis humana, y se localiza exclusivamente en la adenohipófisis (AP), como sucede en los roedores.

10

- Panel G: Detección en transferencia Western (WB) del GFRa2, neurturina (NTN) y prolactina (PRL) en muestras de adenohipófisis de rata (carriles marcados "rAP") y seres humanos (carriles marcados "hAP"), así como en células HeLa (control positivo humano para GFRa2), utilizando b-actina (b-act) como control de carga. Se observa señal en todos los carriles correspondientes a muestras de adenohipófisis, aunque la prolactina muestra una pequeña diferencia en el peso molecular entre las especies estudiadas.

15

La Fig. 5 muestra un esquema del método de aislamiento de células GFRa2+ de la invención, en el que se recurre a la dispersión con colagenasa (la dispersión con tripsina no da lugar a crecimiento celular), incubación con un anticuerpo anti-GFRa2 de conejo, incubación con un anticuerpo anti-conejo acoplado a partículas magnéticas (Macs), que son retenidas por la columna acoplada a un imán. Una vez eluidas, las células se mantienen en un medio libre de suero (SpherM) 7 días, dando lugar a esferoides. En la parte derecha de la Fig. 5 se muestran varias fotografías de tinción con Hoechst (columna de fotografías más próxima al borde de la página) u obtenidas con un microscopio de contraste de fase (columna adyacente a la anterior) de algunos de estos esferoides. Las flechas negras sobre los bordes de esferoides indican presencia de cilios.

20

La Fig. 6 muestra las características de los esferoides obtenidos al incubar las células GFRa2+ en medio de cultivo SpherM.

25

- El panel A muestra fotografías de ensayos de inmunofluorescencia practicados sobre los esferoides con anticuerpos dirigidos contra las moléculas indicadas sobre las fotografías: se muestra tinción positiva para GFRa2 y Prop1, así como para b-catenina (b-cat), ésta última en forma de líneas finas. No aparece señal de fluorescencia correspondiente a las hormonas prolactina (PRL) u hormona del crecimiento (GH).

30

- El panel B muestra la incorporación de BrdU por parte de los esferoides. Se muestran fotografías de las pruebas de inmunofluorescencia realizadas a los 7 días de cultivo a esferoides incubados con BrdU durante las 12 horas previas a la fijación (parte izquierda) y sendos gráficos: en el primero (gráfico intermedio) se indica el porcentaje de incorporación de BrdU por esferoide o acúmulo de células, tanto para células GFRa2+ (barras con relleno) como para células GFRa2- (barras sin relleno), en ambos casos mantenidas en cultivo 5 días en presencia de BrdU; en el segundo gráfico, se indica el porcentaje de incorporación de BrdU para los mismos tipos de células según los días de cultivo (1, 3 ó 7 días). Con ello se demuestra la existencia de proliferación "de novo" dentro de los esferoides formados a partir de células GFRa2+, en contraposición a lo que sucede con las células GFRa2-.

35

40

- El panel C muestra un gráfico en el que se representa el número de esferoides observados en el cultivo cuando las células se cultivan en condiciones subóptimas (SpherM diluido a la mitad: 0.5x SpherM), en ausencia (control) o en presencia de neurturina (NTN). Tanto a los 3 días de cultivo (barra NTN 3d) como tras 7 días de cultivo (barra NTN 7d) el número de esferoides es superior en presencia de neurturina sobre el control, indicando que el NTN funciona como un promotor fisiológico de la formación de esferoides.

45

La Fig. 7 se refiere a los marcadores expresados por las células diferenciadas a partir de esferoides:

50

- El Panel A muestra fotografías de pruebas de inmunofluorescencia realizadas sobre esferoides diferenciados sobre colágeno tipo IV, con el medio de diferenciación que se indica en la esquina inferior izquierda de cada fotografía (DifM 1 a 5), utilizando anticuerpos marcados dirigidos contra las hormonas que se indican en la esquina superior izquierda (GH, PRL, ACTH, TSH o FSH). Los núcleos se tiñeron con DAPI, resultando ser de tamaño intermedio con respecto a los de las células que se muestran en el siguiente panel. En cada caso, las flechas muestran la localización de la señal correspondiente a cada una de las hormonas.

55

- El panel B muestra fotografías realizadas sobre esferoides diferenciados sobre Poli-L-lisina con el medio de diferenciación 4 (DifM4), tomadas en diferentes condiciones: con un microscopio de contraste de fase (fotografía superior izquierda) o con detección de la inmunofluorescencia asociada bien a anticuerpos anti-beta-tubulina III (fotografías superior derecha e inferior izquierda), o bien a anticuerpo anti-neurofilamentos (NF) y anti-hormona del crecimiento (GH) (con ausencia de señal para ésta última, aunque se observa señal para NF, indicada con una punta de flecha). La tinción de los núcleos con DAPI mostró núcleos pequeños (células beta-tubulina III positivas, en las que la localización del núcleo se indica con una punta de flecha sin relleno) o grandes (células NF+, en cuya fotografía las señales no marcadas corresponden a la tinción de los núcleos con DAPI).

60

- El panel C muestra fotografías de fragmentos de electroforesis de muestras obtenidas al someter a RT-PCR extractos de las muestras que se indican sobre los carriles: la fracción de células excluidas de la columna de purificación que contenía anticuerpos anti-GFRa2+ (95% Gfra2-) o la fracción de células retenidas en la columna y posteriormente

65

ES 2 339 911 A1

5 eluida (90% Gfra2+), en cada uno de los casos bien cuando estaban recién purificadas (“Rec purif”) o tras 5 días en cultivo (“5 D”), así como muestras obtenidas de células diferenciadas (“Difn”) a partir de esferoides, sobre Poli-L-lisina (“Pol-L-Lys”) en medio de diferenciación 4 (“DifM4”), a los 14 días de la diferenciación (14d). A la izquierda de cada fragmento de fotografía se indica el gen al que corresponde el fragmento de mRNA amplificado en cada caso.

10 - El panel D muestra fotografías de ensayos de inmunofluorescencias realizados con dos anticuerpos, según se indica en la esquina superior izquierda de cada fotografía, sobre células diferenciadas a partir de esferoides en los medios de diferenciación indicados en la esquina inferior derecha.. En general, parece observarse señal correspondiente a un solo marcador: prolactina en la primera fotografía (puntas de flecha sin relleno), TSH en la segunda (puntas de flecha con relleno) y beta-tubulina III en la tercera (punta de flecha sin relleno).

15 - El panel E muestra fotografías de ensayos de inmunofluorescencia realizados con anticuerpos dirigidos contra neurofilamentos (NF) y/o hormona del crecimiento (GH), según se indica en la esquina superior izquierda de las mismas (fila superior) o en la esquina inferior derecha (fila inferior). Las puntas de flecha sin relleno indican la localización de señales de color verde (NF), mientras que las puntas de flecha con relleno indican la localización de señales rojas (GH) que, en el caso de la penúltima fotografía (tinción doble NF y GH, obtenida a 630 aumentos), se han colocado en lugares de colocalización de señal para NF y GH. En la última fotografía del panel, las puntas de flechas con relleno indican la localización de células negativas.

20 La Fig. 8 se refiere a la funcionalidad del nicho de células GFRa2+ a lo largo de la vida, demostrando que el nicho está presente al nacer y se mantiene en la edad adulta con proliferación reducida:

25 - El panel A muestra fotografías de inmunofluorescencia de secciones axiales de hipófisis de ratas recién nacidas (24 h) y de 10 días (10d), tratadas con anticuerpo anti-GFRa2+ y anti-GH (24 horas) o anti-b-catenina (10 días). Las flechas indican la localización de la señal correspondiente a GFRa2 (rojo en el original), que se colocaliza con señales correspondientes a b-batenina (verde en el original). Se observa que las ratas analizadas presentan un nicho similar GFRa2+/b-Catenina+/GH-.

30 - El panel B muestra la tinción por inmunofluorescencia doble con Ki67 (señales verdes en el original, indicadas por flechas sin relleno) y GFRa2 (señales rojas en el original, no señaladas) de hipófisis jóvenes de rata (parte superior: 10 días) o adultas (parte inferior: 60 días), observándose abundante proliferación celular en el nicho de células GFRa2+ a los 10 días, en contraposición a la hipófisis de ratas adultas.

35 - El panel C muestra la tinción de hipófisis adultas de ratón de Sox2 (parte superior) o Ki67 (parte inferior) que confirman la disminución de la proliferación celular en hipófisis adultas, que raramente se observa en la localización de las células GFRa2+ (Sox2+).

40 - El panel D muestra gráficos que representan el factor de variación observado respecto al valor obtenido en muestras de 60 días (60d) en el análisis cuantitativo por RT-PCR de la expresión de GFRa2, Oct4, Prop1, GH, Ret y Pit1 en la adenohipófisis de ratas recién nacidas (24 h: 24 horas) e hipófisis de ratas de 10, 20, 30 y 60 días (10d, 20d, 30d, 60d). Se observa que la expresión de los marcadores de células progenitoras GFRa2, Oct4, Prop1 disminuye con la edad, mientras que la expresión de los marcadores somatotróficos Ret y Pit-1 presenta un pico hacia la pubertad, día 10 a 20, o se incrementa con el crecimiento hasta llegar a la edad adulta.

45 - El panel E se refiere a la retención de BrdU en el nicho GPS. Se muestran las imágenes correspondientes a las imágenes de tres ratas diferentes (filas 1 a 3) de 60 días de edad, sometidas a pruebas de retención de BrdU (columna intermedia), tinción con DAPI (columna de la izquierda) y tinción con DAPI+retención de BrdU (columna de la derecha). Los núcleos de hipófisis adultas dentro del nicho retienen el BrdU inyectado a las ratas como los de las recién nacidas.

AP: adenohipófisis; IL: lóbulo intermedio; NP: neurohipófisis.

50 La Fig. 9 se refiere a la longitud de los telómeros en las células de la hipófisis.

55 - El panel A muestra un esquema de cromosomas de células maduras, con telómeros cortos, frente a los de células progenitoras, con telómeros largos.

60 - El panel B muestra un esquema de la distribución de las células en la hipófisis de ratón según la longitud de sus telómeros. La línea de color gris situada entre el lóbulo intermedio (IL) y la adenohipófisis (AP) corresponde a una línea fina de núcleos que contienen telómeros largos. Las siguientes líneas de células en dirección a la AP o a IL/NP (II: “Líneas 2-5”) presenta un acortamiento de los telómeros; el grueso de las células secretoras (III: “Resto”), tienen los telómeros cortos característicos de células diferenciadas.

65 - El panel C muestra tinciones de muestras de hipófisis normales de ratón, bien con hematoxilina y eosina (H&E) (fotografías de la izquierda), o bien tinciones realizadas por inmunocitoquímica con anticuerpos frente a Sox2 o Sox9 tal como se indica sobre las fotografías, mostrando las células GFRa2+ en los límites de adenohipófisis/lóbulo intermedio (región I de la AP (adenohipófisis) y región I del lóbulo intermedio (IL) y algunos grupos dispersos por la

adenohipófisis (principalmente en la región III de la adenohipófisis). El par de fotografías de la derecha corresponde a pruebas de telomapeo en muestras de los mismos animales, que corroboran que los telómeros más largos aparecen en esas mismas zonas: las señales rojas (las señales indicativas de mayor intensidad de fluorescencia, correspondientes aproximadamente a 18000-30000 unidades arbitrarias de fluorescencia, indicativa de telómeros más largos) aparecen en la línea correspondiente a la zona marginal (región I), mientras que las líneas de células de la región II de la adenohipófisis (AP), progresivamente más alejadas de la hendidura, presentaban señales menos intensas (naranja), correspondiendo la señal más tenue (verde) a las células secretoras de la adenohipófisis.

- El panel D muestra sendos gráficos en los que se representa el tanto por uno de células comprendidas en uno de los intervalos de longitud de telómero que se indican, en unidades arbitrarias, a la derecha de los gráficos, en cada uno de los compartimentos (I, II ó III) del lóbulo intermedio (gráfico de la izquierda, marcado "IL") o de la adenohipófisis (gráfico de la derecha, marcado como "AP").

La Fig. 10 se refiere a la influencia de la deficiencia en Cdk4 sobre la proporción relativa de los diferentes tipos celulares en la hipófisis:

- El panel A muestra un esquema de los alelos presentes en los ratones con Cdk4 anulado (Cdk4(n/n)): el alelo con el Cdk4 anulado, Cdk4(n) se obtiene mediante la inserción de un cásete de resistencia a neomicina en el intrón 1 de Cdk4; la anulación de ambos alelos conduce a la obtención de ratones Cdk4(n/n). Esta mutación se rescata expresando la recombinasa Cre, que provoca la eliminación del cásete de resistencia a neomicina y conduce a la obtención de los ratones Cdk4(R/R), en los que se expresan alelos mutantes Cdk4^{R24C}, que codifica un Cdk4 hiperactivo.

- El panel B muestra, en su parte superior izquierda, fotografías de hipófisis de ratones salvajes Cdk4(+/+) (izquierda); ratones en los que se han anulado los dos alelos de Cdk4, Cdk4(n/n) (columna intermedia), y ratones en los que se ha rescatado la expresión de Cdk4, Cdk4(R/R). La parte inferior izquierda muestra fotografías de muestras de las adenohipófisis de esos mismos animales, teñidas por inmunohistoquímica. A la derecha de las fotografías se muestran gráficos en los que se indica la relación entre el número total de células de los distintos lóbulos de la hipófisis (AP: adenohipófisis; IL: lóbulo intermedio; NP: neurohipófisis) de cada uno de estos animales, referidos en todos los casos al número total de células detectado en los animales Cdk4(+/+) (valor 1 en cada uno de los casos).

- El panel C muestra tinciones de la zona marginal de ratones Cdk4(+/+) (izquierda), Cdk4(n/n) (columna intermedia) y Cdk4(R/R) (columna derecha) realizadas con anticuerpos dirigidos contra Ki67 (fila superior), Sox2 (fila intermedia) y Sox9 (fila inferior), donde se observa que el nicho de células GFRA2+ aparece engrosado. Los gráficos de la parte derecha del panel, que muestran la relación entre el número total de células Sox2+ (columna izquierda de cada pareja) o Sox9+ (columna derecha de cada pareja) detectados en la adenohipófisis (AP) y el lóbulo intermedio (IL) en cada uno de los tres tipos de ratones, referidos siempre al número total detectado en los ratones salvajes, Cdk4(+/+).

- El panel D muestra el porcentaje relativo, respecto al total de células de la hipófisis, de células productoras de las hormonas que se indican en la parte superior derecha de cada uno de los gráficos, detectadas en ratones salvajes Cdk4(+/+) (primera de las barras de cada gráfico, con el relleno más oscuro), en ratones Cdk4(n/n) en los que se ha anulado la expresión de los dos alelos del gen Cdk4 (segunda barra de cada gráfico), o en ratones Cdk4(R/R) en los que se ha rescatado la expresión del gen (tercera barra de cada gráfico, con el relleno más claro).

- El panel E muestra fotografías correspondientes al telomapeo llevado a cabo en muestras de hipófisis de ratones Cdk4(+/+) (izquierda), Cdk4(n/n) (centro) y Cdk4(R/R) (derecha), que permitía observar en las fotografías originales en color una tinción de color rojo (correspondiente a telómeros largos) por toda la hipófisis de los ratones Cdk4(n/n), mientras que en los ratones Cdk4(+/+) y Cdk4(R/R) la tinción en rojo se concentra en la zona marginal, con algunos puntos dispersos por la adenohipófisis. En la parte derecha del panel se muestra un gráfico en los que se representa el tanto por uno de células comprendidas en uno de los intervalos de longitud de telómero que se indican, en unidades arbitrarias, a la derecha de los gráficos, en la región III de la adenohipófisis, observándose que aproximadamente un 48% de las células de los ratones Cdk4(n/n) muestran telómeros largos, mientras que este número es aproximadamente del 12% en la adenohipófisis de los ratones de tipo salvaje o en las que se ha rescatado la expresión de Cdk4.

Descripción detallada de la invención

Tal como se ha comentado anteriormente, la presente invención se basa en el descubrimiento de la presencia en la hipófisis de un nicho de células multipotentes no hormonales que expresan el marcador GFRA2, el receptor alfa 2 del GDNF. Esas células, además, expresan marcadores adicionales de células madre tales como Oct4, miembros de la familia Sox de factores de transcripción (Sox2 y Sox9) y el factor de transcripción específico de hipófisis Prop1. La presencia de los receptores GFRA2 y la expresión de Sox2, Sox9 y Oct4 hace de estas células un grupo con características únicas, no presentes en otros tipos de células de la hipófisis.

GFRA2 pertenece a una familia de receptores (GFRA1-4) que modulan rutas de señalización iniciadas por sus ligandos, GDNF, neurturina (NTN), artemina (ART) y persefina (PSP). Estas proteínas funcionan como correceptores de la tirosina quinasa Ret, aunque también se han sugerido funciones independientes de Ret para GDNF/GFRA1. GFRA2 funciona como un receptor específico de NTN, tal como se ha demostrado *in vivo*, al observarse un fenotipo

ES 2 339 911 A1

casi idéntico en ratones deficientes o en NTN o en GFRa2 (Heuckeroth R O *et al*, 1999; Rossi J *et al*, 1999). En algunos tejidos, tales como testículo y ovario, los receptores GFRa1 y 2 se expresan en supuestas células madre de la línea germinal (Widenfalk J *et al.*, 2000; Hofmann M C *et al*, 2005).

5 En la presente solicitud se describe que GFRa2 se expresa también en un nicho de células multipotentes no hormonales en la hipófisis, que son capaces de diferenciarse dando lugar a células endocrinas (productoras de hormonas) y neuronas. Las características de estas células GFRa2+, que son consideradas las células multipotentes hipofisarias de la invención, pueden resumirse en las siguientes:

- 10 - Expresan el receptor GFRa2.
- Expresan también marcadores bien establecidos de células madre embrionarias tales como Oct4, Sox2 y Sox9.
- 15 - Expresan además otros marcadores de células madre tales como SSEA, así como proteínas de la ruta de Wnt (b-catenina y E-cadherina).
- Muestran una expresión clara de la proteína homeobox específica de la hipófisis Prophet de Pit1 (Prop1), un factor de transcripción requerido para el desarrollo de la hipófisis, mutado en enfermedades hipofisarias.
- 20 - Son negativas para Sox4, Nanog o Nestina.
- Sólo una porción de ellas, aproximadamente la mitad, expresan S-100.
- 25 - En la hipófisis, están organizadas en una capa unicelular alrededor de la hendidura que se origina desde la bolsa de Rathke y también forman pequeñas agrupaciones por toda la adenohipofisis. Las células alargadas que están en contacto con ellas expresan vimentina.
- En los animales adultos (post-embrionarios), estas células muestran una replicación lenta y telómeros largos, dos rasgos adicionales de células progenitoras.
- 30 - *In vitro*, estas células forman esferoides, que son capaces de diferenciarse ante estímulos específicos para dar lugar a células productoras de hormonas o a neuronas.

35 Estas características diferencian a las células GFRa2+ de otras células de la hipófisis e indican que se trata de células madre/progenitoras que expresan proteínas específicas de esta glándula y marcadores bien establecidos de células madre del ectodermo. La presencia del receptor GFRa2+ (una proteína que no se expresa en otras células de la hipófisis y que se utiliza como marcador de la cara extracelular de la membrana plasmática) dota a estas células de un marcador que permite su identificación y su diferenciación de otras células hipofisarias en muestras de tejido extraídas de la hipófisis y, que facilita su aislamiento a partir de dichas muestras. Su presencia parece ser general en las hipófisis de mamíferos, dado que pueden identificarse en hipófisis de roedores (rata y ratón) y también, de seres humanos. Por tanto, aprovechando la presencia del marcador GFRa2+, las células pueden aislarse de hipófisis de mamíferos, preferiblemente seres humanos. La capacidad de formar esferoides en cultivo y el potencial que muestran *in vitro* para diferenciarse, dando lugar a cualquiera de las células productoras de hormonas (las llamadas células endocrinas o células hormonales) de la adenohipofisis o a células con fenotipo de neuronas, permite utilizarlas, una vez aisladas, para la producción de hormonas tales como la hormona del crecimiento, prolactina, hormona estimulante de tiroides, hormona adrenocorticotrópica, hormona estimulante del folículo o la hormona luteinizante.

45 La ausencia de expresión en estas células de los marcadores Nanog o Nestina diferencia a estas células de las células Sca1+ Oct4+ anteriormente descritas por Chen y colaboradores, capaces también de formar esferas flotantes en cultivo. También se diferencian de las células capaces de formar esferas no adherentes descritas por Fauquier y colaboradores, pues en el artículo de estos autores se indicaba que eran las células Sox2+ E-cad+ Sox9- las que parecían tener la capacidad de formar esferas no adherentes y de diferenciarse dando lugar a las células endocrinas presentes en la hipófisis, mientras que las células Sox9+ se consideraban células amplificadoras transitorias, incapaces de formar esferas, y que habían iniciado ya el proceso de diferenciación. Las células GFRa2+, en cambio, que son también Sox2+ y Sox9+, son capaces de formar esferoides en cultivo y de diferenciarse dando lugar a cualquiera de los tipos de células hormonales de la adenohipofisis.

50 Las células de la invención son positivas para ciertos marcadores fenotípicos y negativas para otros. “Positiva” quiere decir que el marcador se expresa en esa célula. Para que un marcador se considere como expresado, debe estar presente a un nivel detectable. “Nivel detectable” quiere decir que el marcador se puede detectar utilizando alguna de las metodologías habituales tales como el análisis mediante PCR, inmunodetección o análisis por FACS.

65 La comparación entre el nivel de expresión de un marcador en una célula de la invención, y el nivel de expresión del mismo marcador en otra célula, tal como por ejemplo otra célula adenohipofisaria, se puede llevar a cabo comparando los dos tipos de células, aisladas de individuos de una misma especie. Preferiblemente, la especie es una especie de mamífero y, más preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

ES 2 339 911 A1

Se considera que una población de células expresa un marcador si al menos el 70% de las células de la población muestran una expresión detectable del marcador. Preferiblemente, se considerará que una población de células expresa un marcador si al menos el 80% de las células de la población muestra una expresión detectable del marcador.

5 De acuerdo con este criterio se han establecido los marcadores expresados por las células de la invención. En el caso concreto de las células multipotentes hipofisarias de la invención, los marcadores expresados o ausentes de las mismas se resumen en la Tabla 4, mostrada en el Ejemplo 2. Tal como se ha comentado, además de la expresión del receptor GFRa2, destaca la expresión del factor de transcripción específico de hipófisis Prop1 y la presencia de marcadores adicionales de células madre tales como Sox2, Sox9 y Oct4, pero son claramente negativas para Sox4,
10 Nanog o Nestina. Esto ha permitido realizar ensayos para comprobar su localización *in vivo* y su presencia en distintas especies de mamíferos, tales como rata, ratón y seres humanos. Los experimentos de tinción por inmunofluorescencia se repitieron en múltiples hipófisis de animales diferentes (más de 10) y varias veces por animal (criosecciones); además, el hecho de poder utilizar dobles tinciones permite mayores garantías de que las células detectadas en todos los casos son las mismas.

15 Los resultados, descritos principalmente en los Ejemplos 2 y 3 de la presente memoria descriptiva, muestran la existencia de un nicho organizado de células primordiales en la hipófisis de rata, ratón y seres humanos, localizado principalmente en la zona marginal de la hipófisis en el caso de rata y ratón, pudiendo localizarse en seres humanos alrededor de las reminiscencias de la hendidura de Rathke homóloga a la zona marginal de las hipófisis murinas; algunas células que expresan los mismos marcadores pueden localizarse también dispersas por la adenohipofisis de cualquiera de las especies analizadas. Estas células GFRa2+ de la zona marginal expresan también E-cadherina y b-catenina de manera polarizada (coronal frente a axial). La tinción perpendicular en el nicho de células GPSs de GFRa2 frente a la b-catenina, recuerda a la polaridad planar, una coordinación específica que hace que una capa de células epiteliales migre de forma coordinada en una dirección fisiológica durante el desarrollo embrionario (revisado en el
20 2007 por Zallen J A, y Lawrence P A *et al.*). La polaridad planar del nicho de células GFRa2+ también sugiere una señalización asimétrica funcional en la que pueden estar implicadas tanto la ruta de GFRa2 como la de Wnt. Así, la ruta de Ret/GFRa2 puede ayudar a indicar a las células del nicho el lado correcto al que migrar y/o en el que proliferar. La expresión del ligando NTN (neurturina) en células discretas a través de la adenohipofisis puede crear además un gradiente que dirija estos procesos en las células GFRa2+. Esta situación muestra reminiscencias con respecto a la del nicho presente en los túbulos seminíferos de los testículos, en los que Ret y GFRa1/GFRa2, junto con sus ligandos GDNF y NTN, juegan un papel importante en la interacción entre multipotencialidad frente a diferenciación en las células madre germinales. De forma similar, en la hipófisis, el eje NTN/GFRa2 puede modular la fisiología de estas células multipotentes, mientras que el sistema Ret/GFRa1 controla la diferenciación y el destino de los somatotropos (muerte frente a supervivencia) a través de la regulación de Pit1.

35 Los ensayos descritos en los Ejemplos mencionados muestran la utilidad del marcador GFRa2+ y/o de otros marcadores expresados por las células GFRa2+, tales como b-catenina, E-cadherina, Sox2, Sox9 u Oct4, para identificar la presencia de estas células multipotentes en cualquier muestra de hipófisis. Es por ello que uno de los objetos de la invención es un método de identificación de células adultas multipotentes hipofisarias en una muestra extraída de la hipófisis de un mamífero que comprende poner en contacto dicha muestra de hipófisis con una composición que comprende un anticuerpo que reconoce el receptor GFRa2, anticuerpo que se acopla a una sustancia que permite su detección. Opcionalmente, el método de identificación puede comprender una etapa complementaria en la que la muestra se pone en contacto con un segundo anticuerpo primario que reconoce otro marcador seleccionado entre b-catenina, E-cadherina, Sox2, Sox9, Oct4 o Prop1, segundo anticuerpo que se acopla igualmente a una sustancia que
40 permite su detección, diferente de la que permite la detección de GFRa2.

Tanto si se detecta sólo el receptor GFRa2 como si se detecta también un marcador adicional, la sustancia que permite la detección del anticuerpo unido al marcador reconocido por el mismo puede estar unida directamente al anticuerpo o, preferiblemente, puede estar unida a un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo específico para el marcador, tal como un anticuerpo secundario que reconoce el fragmento constante del anticuerpo específico para el marcador, entendiendo como anticuerpo específico para el marcador tanto el anticuerpo que reconoce el receptor GFRa2 como el anticuerpo que reconoce el segundo marcador opcional (B-catenina, E-cadherina, Sox2, Sox9, Oct4 o Prop1). En este segundo caso, el método de identificación comprende al menos una etapa adicional en la que la muestra tratada con el anticuerpo específico para el marcador se pone en contacto con al menos un anticuerpo secundario, que reconoce al menos uno de los anticuerpos primarios unidos a un marcador, y que lleva unida la sustancia que permite su detección. En el caso de que la muestra se ponga en contacto con un anticuerpo primario que reconoce el receptor GFRa2 y con un segundo anticuerpo primario que reconoce un segundo marcador, el método de identificación comprenderá el tratamiento de la muestra que se ha puesto en contacto con los anticuerpos primarios con al menos dos anticuerpos secundarios, uno que reconoce el anticuerpo que reconoce el receptor GFRa2 y un segundo anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario que reconoce el segundo marcador.
50
55
60

En cuanto a las sustancias que permiten la detección de los anticuerpos, puede ser cualquiera de las habituales para los expertos en la técnica. Se prefiere que se seleccione entre una enzima que cataliza la conversión de un compuesto en un compuesto coloreado, o, más preferiblemente, un compuesto que absorbe luz de una longitud de onda y emite luz de una longitud de onda diferente (fluoróforo). Entre los fluoróforos de uso común, comercialmente disponibles, pueden citarse la fluoresceína (que se presenta habitualmente en forma de tiocianato de fluoresceína, FITC), los de la familia de derivados de cianina (Cy2, Cy3, Cy5...) y distintas familias de derivados de coumarina, rodamina, fluoresceína y cianina, tales como los de la familia Alexa Fluor (derivados de sulfonación distribuidos por Molecular Probes), que
65

pueden adquirirse ya unidos a distintos anticuerpo secundarios. Entre las enzimas que catalizan la conversión de un compuesto (cromógeno) en un compuesto coloreado y que se usan habitualmente en ensayos de inmunodetección pueden citarse la fosfatasa alcalina (enzima que elimina grupos fosfato y puede dar lugar a reacciones coloreadas en presencia, por ejemplo, de naftol AS fosfato y una sal de diazonio tal como Fast Blue BBN o Fast Red TN) y la peroxidasa de rábano (abreviada por sus siglas en inglés HRP, cuya actividad se revela en presencia de H₂O₂ y, por ejemplo, diaminobenzidina); también puede utilizarse el sistema biotina-estreptavidina.

Cualquier que sea la sustancia que permite la detección de los anticuerpos primarios unidos a los marcadores, la localización de la señal correspondiente al compuesto coloreado generado o de la señal de fluorescencia indicará la localización de una célula hipofisaria multipotente de la invención.

De forma análoga a como se ha realizado en los ensayos que se describen más adelante en la presente memoria, se prefiere que la observación de la presencia o ausencia de los marcadores ensayados en las células en estudio se realice mediante ensayos de inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo que reconoce el receptor GFRa2 (anti-GFRa2), que puede estar él mismo unido a un marcador fluorescente (fluoróforo) o, preferiblemente, utilizando un anticuerpo secundario que reconozca el anticuerpo anti-GFRa2 y que esté unido a un marcador fluorescente. Se prefieren las tinciones dobles, en las que las células se tratan adicionalmente con un segundo anticuerpo primario que reconoce otro marcador seleccionado entre b-catenina, E-cadherina, Sox2, Sox9, Oct4 o Prop1 y cuya posible unión a las células de la muestra se pone de manifiesto gracias a un marcador fluorescente diferente, que dé lugar a un color distinguible del correspondiente al primer marcador fluorescente, segundo marcador fluorescente que puede estar al segundo anticuerpo primario o, preferiblemente, a un segundo anticuerpo secundario capaz de reconocer el segundo anticuerpo primario utilizado. Para detectar la presencia o ausencia de señal, se prefiere el uso de un microscopio confocal a un aumento suficientemente grande como para poder distinguir partes de la célula, para poder comprobar que la localización de la señal de cada marcador fluorescente coincida con la localización esperable para el marcador que se pretende detectar: GFRa2, que es un marcador de la cara extracelular de la membrana plasmática, debe estar por fuera de b-catenina, por ejemplo, que está pegada a la cara intracelular de la membrana plasmática; en ese caso, por ejemplo, se considerarán como dobles positivas aquellas células en las que la señal correspondiente a un marcador se vea literalmente dentro de la señal del otro, o incluso, donde los colores detectados correspondan a la mezcla de los colores de los dos marcadores fluorescentes al ser observados al microscopio confocal. Además, para facilitar la correcta identificación de la localización de los marcadores fluorescentes, se prefiere realizar una contratinción con DAPI, para delimitar el núcleo. Adicionalmente, para aumentar la seguridad en la identificación de las células multipotentes hipofisarias de la invención en muestras de hipófisis, se recomienda hacer recuentos de células positivas y de células dobles positivas en varias imágenes focales de la misma hipófisis e, incluso, si fuera compatible con el ensayo que se estuviera realizando, en imágenes correspondientes a hipófisis de diferentes animales. En el caso de muestras de ratón, los porcentajes de coincidencia entre GFRa2 y cualquiera de los restantes marcadores con los que se prefiere su combinación (b-catenina, e-cadherina, Sox2, Sox9, Oct4 o Prop1) deberían ser análogos a los reflejados en la Tabla 4: superiores al 80-85% en cualquiera de esos casos.

La presencia del marcador GFRa2 permite también el aislamiento de las células hipofisarias multipotentes no hormonales de la invención. Ello permite mantenerlas en cultivo, obtener esferoides a partir de las mismas y, si se desea, diferenciarlas para obtener células productas de hormonas (a las que se alude como células hormonales o endocrinas) o, incluso, células con características de neuronas. Es por ello que otro aspecto de la invención lo constituye un método para el aislamiento de células hipofisarias multipotentes no hormonales, que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto una muestra de células post-embrionarias de hipófisis dispersas con una composición que comprende un anticuerpo que reconoce el receptor GFRa2;
- b) separar las células a las que se haya unido el anticuerpo que reconoce el receptor GFRa2 del resto de las células presentes en la muestra de partida.

Se prefiere que la dispersión de las células presentes en la muestra de hipófisis de partida se lleve a cabo mediante una digestión de dicha muestra con collagenasa, preferiblemente tras haber realizado un troceado mecánico previo (por ejemplo, con un homogeneizador Potter). Se prefiere evitar la dispersión de las células con tripsina, porque los receptores GFRa son proteínas extracelulares unidos covalentemente a la membrana plasmática a través de un anclaje de glicofosfatidil-inositol sensible al tratamiento con tripsina y la dispersión de las células con tripsina no da lugar a la obtención de esferoides viables.

Se prefiere que el anticuerpo se acople a una sustancia o partícula que facilite la separación de las células a las que se haya unido dicho anticuerpo, bien porque la sustancia o partícula esté directamente unido al anticuerpo que reconoce el receptor, o bien porque la sustancia o partícula esté unida a un anticuerpo secundario que reconozca el anticuerpo que se une al receptor GFRa2. En ese segundo caso, previamente a la etapa de separación de las células a las que se haya unido el anticuerpo que reconoce el receptor GFRa2 del resto de las células presentes en la muestra, dicha muestra deberá ponerse en contacto con el anticuerpo secundario que lleva unida la sustancia o partícula que facilita la separación. Generalmente, este anticuerpo secundario es un anticuerpo producido en una especie distinta a la especie del animal o la línea celular en la que se generó el primer anticuerpo, el anticuerpo anti-GFRa2, y reconoce el fragmento constante de ese primer anticuerpo. Se prefiere que tanto el anticuerpo que reconoce el receptor GFRa2 (anticuerpo anti-GFRa2) como el anticuerpo anti-GFRa2 sean anticuerpos monoclonales.

ES 2 339 911 A1

En cuanto a la sustancia o partícula que permite la separación de las células a las que se haya unido el anticuerpo que reconoce el receptor GFRA2, existen distintas posibilidades bien conocidas por los expertos en la técnica. Se prefiere particularmente que la sustancia se seleccione entre un compuesto fluorescente o una partícula magnética, aunque puede utilizarse cualquier otra sustancia que permita, por ejemplo, que las células sean retenidas al entrar en contacto con una matriz a la que está unida un compuesto que se une a la partícula acoplada al anticuerpo. Un ejemplo de una sustancia que se corresponde con esta última opción sería la biotina (que daría lugar a que las células acopladas a ella quedaran retenidas por matrices que tuvieran unida avidina y/o estreptavidina). En otra posible realización de la invención, no existe una sustancia o partícula adicional, acoplada a alguno de los anticuerpos previamente a la etapa de separación, sino que son los propios anticuerpos los que permiten que las células que los llevan unidos queden retenidas: ése sería el caso, por ejemplo, de una realización en la que la muestra de células se pusiera en contacto con una matriz que llevara unida proteína A, que es una proteína que se une al fragmento constante de los anticuerpos de distintas especies (con alta afinidad por los anticuerpos humanos, de burro, conejo, perro, cerdo y cobaya, menor afinidad pero aún útil por ratón, vaca o caballo, y la afinidad es baja y por ello es poco útil para detectar anticuerpos de oveja, cabra, rata o gallina) y que permitiría que las células que los tuvieran unidos quedaran retenidas en la matriz.

Cuando el anticuerpo está unido a un compuesto fluorescente, la separación de las células a las que se haya unido el anticuerpo que reconoce el receptor GFRA2 (anticuerpo anti-GFRA2) puede hacerse por el método conocido como separación de células activadas por fluorescencia, más conocido por las siglas FACS (del inglés *fluorescence activated cell sorting*). En este método, la muestra de células, que se encuentra en forma de finas gotas tras atravesar una estrecha boquilla vibratoria, son escaneadas por un láser que excita el compuesto fluorescente, que emite luz de un determinado color, la cual es detectada por un tubo multiplicador; a partir de los datos de luz dispersa y fluorescencia, un ordenador determina cuáles son las células que se deben separar (las que han emitido luz de la longitud de onda de emisión del compuesto fluorescente). Las células que se consideran positivas son separadas del resto mediante la aplicación de una descarga eléctrica a la corriente de gotas de células, que da lugar a la formación de una gota con carga que contiene la célula de interés, que se desvía hacia el tubo colector. La técnica permite también realizar un recuento de células y deducir su tamaño según la luz dispersada por ellas. Una descripción más detallada de aplicación de esta metodología puede encontrarse más adelante, en el apartado denominado “Separación de células GFRA2+ por clasificación por señal fluorescente”; en esa aplicación, el compuesto fluorescente utilizado es Alexa 488 (Molecular Probes, A21441) y el acoplamiento al anticuerpo anti-GFRA2 y, por tanto, su asociación con las células, se produce gracias a que el compuesto fluorescente está unido a un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo anti-GFRA2.

Cuando el anticuerpo está unido a una partícula magnética, la separación de las células a las que se haya unido el anticuerpo que reconoce el receptor GFRA2 puede realizarse por medios magnéticos, mediante el uso de un imán. En particular, puede utilizarse la tecnología de separación de células activadas por medios magnéticos conocida por MACS[®], de Miltenyi Biotec, en las que la separación magnética tiene lugar haciendo pasar la muestra de células (previamente tratadas con el anticuerpo anti-GFRA2, que puede llevar el mismo unida al menos una partícula magnética o que puede acoplarse a la misma gracias a que la muestra de células es tratada adicionalmente con un anticuerpo secundario que lleva unida al menos una partícula magnética y que reconoce el anticuerpo anti-GFRA2) por una columna que se inserta en un separador que posibilita la inducción de un campo magnético en el relleno de la columna suficientemente fuerte como para retener las células a las que se han unido los anticuerpos anti-GFRA2, a los cuales, a su vez, se ha unido el anticuerpo secundario que lleva unida la partícula magnética; las células a las que no se hayan unido anticuerpos anti-GFRA2, en cambio, no quedarán retenidas en la columna, pues los anticuerpos secundarios con partículas magnéticas no habrán encontrado anticuerpos anti-GFRA2 por los que unirse a ellas. La posterior retirada de la columna del separador permite la elución de las células GFRA2+, que estarán ahora aisladas del resto de las células de la muestra de partida. Una descripción más detallada de esta metodología puede encontrarse a través de la información de la casa Miltenyi Biotec accesible en Internet (http://www.miltenyibiotec.com/en/NN_21_MACS_Cell_Separation.aspx); la descripción de una aplicación concreta de esta tecnología puede encontrarse más adelante en la presente memoria, en el apartado “Aislamiento de células GFRA2+ por medios magnéticos”, cuya utilidad puede comprobarse en el Ejemplo 3.

En cualquiera de los casos, se prefiere que la muestra de células de hipófisis dispersas se haya obtenido a partir de una muestra de tejido de hipófisis de un mamífero que pertenece a una especie seleccionada entre ratón, rata o ser humano. Se prefiere que el mamífero sea un adulto. En el caso del ratón, pueden considerarse individuos adultos los de al menos 4 o, preferiblemente, 5 semanas de edad; en el caso de la rata, los de al menos 60 días de edad. En lo que se refiere a los seres humanos, tal como se utiliza en la invención, se considerarán individuos adultos aquellos que tengan al menos 18 años de edad.

El término “aislada” indica que la célula o población de células a la cual se refiere no está en su entorno natural, sino que ha sido separada del tejido que la rodea. Una muestra de células de la invención puede considerarse sustancialmente separada del tejido que las rodea en su entorno natural si contiene menos del 25%, preferiblemente menos del 15%, de células y otros materiales biológicos distintos de las células de la invención. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término se refiere a células que se han extraído del organismo en el que se han originado y que están presentes en un cultivo de células o en una forma de almacenamiento prolongado de las mismas, como puede ser congeladas en un recipiente en un medio de congelación adecuado seleccionado entre cualquiera de los conocidos por los expertos en la técnica.

ES 2 339 911 A1

Las células multipotentes hipofisarias aisladas de la invención pueden expandirse *in vitro*, siendo posible su cultivo en distintas condiciones. Dependiendo de las condiciones de cultivo, las células GFRa2+ dan lugar a fenotipos diferentes:

- 5 - al cultivarse en placas de cultivo sin recubrimiento, de superficie no adherente, en un medio carente de suero, las células crecen asociadas en grupos, formando unas estructuras flotantes similares a esferas, a las que se denomina esferoides y que pueden ser compactos o huecos. Tal como se muestra más adelante, para ello es preferible que se le añadan al medio de cultivo uno o más suplementos diseñados para el crecimiento de células progenitoras neuronales en ausencia de suero (tal como es el caso del medio SpherM que se describe más adelante), y al menos un antibiótico.
- 10 - cuando se cultivan en condiciones que favorecen su adherencia al soporte de cultivo (por ejemplo, en placas cubiertas de gelatina), en un medio de cultivo que incluye en su composición un medio acondicionado en un cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), el medio MEFM que se describe más adelante, las células se adhieren a la superficie y crecen como células dispersas, que siguen siendo positivas para GFRa2, así como para Prop. Si a este medio se le añade factor inhibidor de leucemia (LIF) (un factor que inhibe la diferenciación de células madre embrionarias) y un medio libre de suero diseñado para el crecimiento de células madre embrionarias indiferenciadas, tal como el medio comercial ESGRO® (Chemicon, Millipore), las células no se adhieren a la superficie recubierta de gelatina, sino que crecen lenta pero continuamente, formando esferas compactas o si se cultivan en una placa de superficie no adherente, con un medio carente de suero. Las células GFRa2+ aisladas son capaces de permanecer sin diferenciarse cuando se las hace crecer en un medio acondicionado de fibroblastos embrionarios de ratón, tal como el medio MEFM; en estas condiciones, sin embargo, parte de las células se diferencian espontáneamente durante los pases.
- 25 - las células GFRa2+ permanecen sin diferenciar y forman colonias similares a cuerpos embrionarios cuando se las hace crecer directamente sobre células de soporte, lo cual es una característica compartida por todas las células madre/progenitoras descritas. Las llamadas células de soporte (a las que se alude habitualmente por el término inglés *feeders*) son células que sirven como capa basal para las células madre y que les proporcionan ciertos factores secretados, una matriz extracelular, y contactos celulares para el mantenimiento de las células madre en estado indiferenciado sin perder su pluripotencialidad. Es habitual utilizar como células de soporte fibroblastos embrionarios derivados de ratón o de seres humanos, dispuestos en monocapa. También es habitual inactivarlas para impedir que se multipliquen, lo cual suele hacerse mediante irradiación con rayos gamma o mediante mitomicina.

35 Como se describe más adelante en el Ejemplo 3, cuando se las células se cultivan en condiciones en las que se favorece la no adherencia, en una capa sin recubrimiento en medio carente de suero, los esferoides formados a partir de las células son móviles y presentan cilios especializados, no cual no es sorprendente teniendo en cuenta las características de las células a partir de las cuales se originan, pues uno de los papeles de la polaridad planar en la embriogénesis es inducir cilios orientados durante la migración morfogénica. Los esferoides mantienen la expresión de GFRa2, pero son negativos con respecto a la expresión de hormonas hipofisarias. Sin embargo, como se muestra en el Ejemplo 4, si los esferoides formados se ponen en las condiciones de cultivo adecuadas, es decir, cuando se les dirige de forma apropiada con un medio de diferenciación específico, son capaces de diferenciarse para dar células secretoras hipofisarias, pero también hacia fenotipos similares a los de las neuronas (a células positivas para beta-tubulina III, proteína característica de neuronas). Esto no es sorprendente porque tanto la bolsa de Rathke inicial como el tubo encefálico neural, derivan del ectodermo anterior. Dependiendo del medio de diferenciación, a partir de las células multipotentes hipofisarias se obtienen células diferenciadas diferentes: bien células con fenotipo de neuronas y ausencia de producción de hormonas hipofisarias, o bien células que producen al menos una hormona hipofisaria concreta, que preferiblemente será la única hormona expresada por la célula y por la población de la que forme parte.

50 Es por todo ello que otro aspecto de la invención lo constituye un método para la expansión *in vitro* de una célula multipotente hipofisaria aislada de la invención, en alguna de las tres condiciones de cultivo citadas en los párrafos anteriores. Una realización preferida de este método de expansión de la invención es aquella que incluye una etapa en la que se provoca la diferenciación de las células en cultivo, cambiando sus condiciones de cultivo. Dependiendo de las condiciones previas en las que se hayan mantenido las células (condiciones en las que se haya favorecido su no adherencia, por ejemplo), puede ser necesario sembrarlas sobre una matriz polimérica, en un medio que contenga suero, dejando suficiente tiempo para que las células que se desea diferenciar se adhieran a la matriz polimérica (generalmente, al menos un día).

60 En el caso de desearse su diferenciación a neuronas, se prefiere que las células en cultivo se siembren sobre poli-L-lisina en un medio que contenga suero. Una vez transcurrido suficiente tiempo para que se adhieran a dicha matriz (al menos un día), se modifica el medio de cultivo, para cultivarlas en el medio adecuado, tal como el medio de diferenciación DifM4 que se describe más adelante en la presente memoria.

65 En el caso de desearse su diferenciación a células productoras de hormonas hipofisarias, se prefiere que las células se siembren sobre colágeno tipo IV, en un medio que contenga suero. Una vez transcurrido suficiente tiempo para que se adhieran a dicha matriz (al menos un día), se provoca su diferenciación con un medio específico, diferente según el tipo de hormona que se desee obtener.

Tanto en el caso de diferenciación a neuronas como a células endocrinas, se considera que al menos 14 días en medio de diferenciación es tiempo suficiente para obtener diferenciación de las células.

5 En el Ejemplo 5 se describe un caso concreto de diferenciación de células que se habían expandido previamente formando esferoides, y cuya diferenciación se provoca en distintos medios, logrando con ello, según las condiciones, tanto obtener células con fenotipo de neuronas como para células productoras de hormonas hipofisarias. Según el medio de diferenciación elegido, la hormona hipofisaria producida por las células mayoritariamente una u otra, pues se obtienen células diferentes. Como se ha comentado previamente, cualquiera de estas células diferenciadas a partir de las células multipotentes hipofisarias aisladas de la invención se considerarán las células diferenciadas hipofisarias de la invención, incluidas aquellas que muestren un fenotipo característico de hormonas.

15 Tal como ocurre en el Ejemplo 5, una posible realización de la invención es aquélla en la que las células se han mantenido en cultivo, previamente a la inducción de su diferenciación, en condiciones que favorecen la formación de esferoides. En ese caso, se prefiere que las células se mantengan en estas condiciones de cultivo durante al menos tres días; más preferiblemente, se mantendrán en estas condiciones durante al menos 5-7 días, con lo que se formarán esferoides. Esto facilitará, si se desea, la separación de esferoides de forma individual, para someterlos a las condiciones de diferenciación.

20 Las células multipotentes hipofisarias aisladas de la invención generalmente no se obtienen de forma individual, sino que se encuentran en muestras donde hay otras células multipotentes hipofisarias aisladas; su expansión da lugar a su multiplicación y, por tanto, a la generación de más células, con las que compartirán el recipiente. Por tanto, puede considerarse que tanto el método de aislamiento de células da lugar a poblaciones de células que, a su vez, generalmente son utilizadas como tales para poner en práctica el método de expansión de la invención. Es por ello que se habla también de “población de células de la invención”. Tal como se comentó anteriormente, una “población de células de la invención” comprende células seleccionadas del grupo que comprende células multipotentes hipofisarias de la invención, células diferenciadas hipofisarias de la invención, y combinaciones de las mismas. Estas poblaciones de células constituyen también un aspecto de la invención. El término se refiere a una preparación de células que incluye, además de células, componentes no celulares tales como medio de cultivo de células, que puede incluir proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, nucleótidos, coenzimas, antioxidantes, metales, compuestos antibióticos de distinta naturaleza química, etc. Además, la preparación de células puede tener componentes que no afecten al crecimiento o viabilidad de las células, pero que se usan para proporcionar las células en un formato particular, tales como una matriz polimérica de encapsulación.

35 Puesto que las células multipotentes hipofisarias aisladas de la invención pueden diferenciarse para dar lugar a células que producen hormonas de la hipófisis, en general de forma específica (es decir, las células que producen prolactina, por ejemplo, no producen hormona del crecimiento u otras hormonas hipofisarias), las células multipotentes hipofisarias aisladas de la invención, las células hipofisarias diferenciadas en células hormonales (endocrinas) de la invención o las poblaciones de células de la invención pueden utilizarse para la producción de hormonas hipofisarias, que son productos de interés farmacéutico. Por ello, otro aspecto de la invención es el uso de las células multipotentes hipofisarias aisladas de la invención, de las células diferenciadas a partir de ellas que produzcan hormonas o de poblaciones de las mismas para la producción de hormonas hipofisarias (GH, PRL; ACTH; FSH, LH; TSH).

45 Las células GFRA2+ pueden tener también otras utilidades, derivadas de los importantes papeles en células progenitoras y órganos específicos de los seres humanos que presentan algunos de los genes adicionales al receptor GFRA2 que son expresados por ellas, tales como Oct4, Sox2 (cuyas mutaciones pueden causar hipoplasia hipofisaria asociada a hipogonadismo hipogonadotrópico) y Sox9 (cuyas mutaciones son responsables de la displasia campomélica). También es importante la expresión del gen Prop1, factor de transcripción conocido por su expresión exclusiva durante el desarrollo de la hipófisis, cuyas mutaciones son responsables del enanismo de Ames y de la CPHD. Puesto que, tal como se demuestra más adelante, la expresión de Prop1 en la hipófisis del adulto está restringida al nicho de las células GFRA2+, la desregulación de estas células puede tener consecuencias importantes en la homeostasis de la hipófisis del adulto: los ratones con enanismo de Ames y los ratones que carecen de Prop1 tienen un volumen hipofisario normal en el momento del nacimiento, pero el órgano no crece ni se diferencia durante la vida postnatal, de forma similar al fenotipo de CPHD en seres humanos, mientras que los ratones transgénicos para Prop1 tienen retraso en la pubertad.

60 Los ensayos descritos más adelante en el Ejemplo 6 indican que la deficiencia hipofisaria inducida por mutaciones en Prop1 tiene similitudes con el hipopituitarismo inducido mediante la inactivación del regulador del ciclo celular Cdk4. Las células GFRA2+ (que expresan también Prop1) están presentes en este modelo, aunque con proliferación postnatal reducida acompañada por una disminución global de células productoras endocrinas. Estas células de la adenohipófisis muestran telómeros más largos, lo que sugiere un número deficitario de divisiones celulares a partir de sus células progenitoras. Es interesante que los ratones deficientes en GFRA2 muestran una deficiencia significativa para prosperar tras el destete, aunque no se ha apuntado la implicación de una función de la hipófisis en este fenotipo.

65 Todos estos datos indican que las células GFRA2+ aisladas (las células multipotentes hipofisarias aisladas de la invención), así como las células derivadas de ellas, podrían ser útiles para el trastorno del hipopituitarismo.

Además de este trastorno, también es importante citar una enfermedad benigna no neoplásica denominada quiste de la hendidura de Rathke (RCC), que se caracteriza de hecho por un quiste hipofisario en la zona marginal que muestra como característica patognomónica que define la enfermedad el estar rodeado por células ciliadas (Islam O *et al.*, 2007). Se piensa que estos quistes se originan a partir de reminiscencias de la bolsa de Rathke y, de hecho, su localización es la misma que se esquematiza en la Fig. 6 para las células GFRa2+ humanas.

Parece razonable que la hipófisis deba tener un control estricto sobre los mecanismos de diferenciación y proliferación para asegurar el funcionamiento apropiado de procesos corporales importantes (metabolismo, crecimiento, pubertad o reproducción). El nicho de células GFRa2+ del que se informa en la presente memoria puede tener contribuciones relevantes en la homeostasis postnatal de la hipófisis. La alteración del control proliferativo de las células GFRa2+ mediante mutaciones específicas de pérdida de función (carencia de Prop1 o carencia de Cdk4), da como resultado una disminución de la proliferación y enfermedad hipoplásica.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que las células GFRa2+ forman un nicho de células adultas precursoras con relevancia funcional en la expansión fisiológica de la glándula hipofisaria lo largo de la vida. Por todo ello, un aspecto adicional de la invención lo constituye el uso de las células multipotentes hipofisarias aisladas de la invención, de las células diferenciadas hipofisarias de la invención derivadas a partir de ellas o de una población de células de la invención para el estudio de un trastorno de hipófisis seleccionado entre el hipopituitarismo o el quiste de la hendidura de Rathke.

Incluso, dado que las mutaciones en uno de los genes expresados en este nicho de células, Prop1, parecen estar implicadas en el desarrollo del hipopituitarismo, y dado que la desregulación de las células GFRa2+ parece tener importantes consecuencias en la evolución de enfermedades hipoplásicas, las células GFRa2+ aisladas o las células derivadas de ellas podrían ser de utilidad para el tratamiento de alguno de estos trastornos. Es por ello que un aspecto más de la invención es el uso de una célula multipotente hipofisaria aislada de la invención, de una célula diferenciada hipofisaria de la invención derivada de la anterior o de una población de células de la invención, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno de la hipófisis seleccionado entre el hipopituitarismo o el quiste de la hendidura de Rathke.

La invención se ilustrará ahora con más detalle mediante los Ejemplos y Figuras que aparecen a continuación.

Ejemplos

Los ejemplos expuestos en la presente sección se llevaron a cabo con las siguientes muestras y técnicas experimentales:

- Muestras humanas y de roedores

Las ratas utilizadas procedían del animalario de la Universidad de Santiago de Compostela (USC), una instalación registrada, en la que se mantienen los animales en condiciones adecuadas, de acuerdo con la legislación (Directiva 86/609/CEE, Real Decreto 223/88 y Orden ministerial 13/10/89). El proyecto contó con la aprobación del Comité Ético de la USC. Las muestras de hipófisis adultas de rata se obtuvieron de ratas adultas Sprague-Dowley (200-250 gr, 60 días) machos/hembras; para estudiar la expresión durante el desarrollo postnatal de recién nacidos y adultos, se compararon hipófisis de ratas de 10, 20, 30 y 60 días.

Las muestras de hipófisis humanas se seleccionaron del banco de muestras del Departamento de Patología, Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla, España), de individuos adultos normales. Se requirió el consentimiento informado de los pacientes, siguiendo las directrices del Comité Ético del Hospital.

Los ratones deficientes en Cdk4 se generaron tal como ha sido descrito previamente (Rane S G *et al.*, 1999). Estos ratones se mantuvieron en un contexto mixto 129/Sv x C57BL/6J siguiendo las directrices institucionales del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y el protocolo aprobado por el Comité de Bioética y Cuidado de Animales de la Comunidad de Madrid. Los animales se observaron diariamente y los ratones que mostraban síntomas de enfermedad se sacrificaron de acuerdo con las Directrices para el Sacrificio de Animales por razones humanitarias utilizadas en investigación biomédica.

A efectos comparativos sobre la influencia del estadio de desarrollo, se consideraron ratones adultos aquellos de más de 28 días si eran hembras o de más de 42 días en el caso de machos.

- Anticuerpos y diluciones

Los ensayos en los que se incluyeron pruebas de inmunodetección se llevaron a cabo con los anticuerpos que se muestran a continuación en las Tablas 1 y 2:

ES 2 339 911 A1

TABLA 1

Anticuerpos primarios y diluciones utilizados en ensayos de inmunodetección

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

	Proteína	Especie	N° Catálogo	Suministrador	Dilución			WB
					Tejido	Esferoide	Diferenciación	
	GFRa2	Conejo	AB5141	Chemicon	1:500	1:50	1:50	1:600
	GH	Conejo	AFP-C11981A	NIDDK	1:800	1:300	1:300	1:1000
	GH	Cobaya	AFP 222 387 790	NIDDK	1:800			
	ACTH	Ratón	M3501	DakoCytomation	1:100		1:50	
	PRL	Ratón	E30610M	Biodesign	1:200	1:100	1:100	1:1000
	beta-TSH	Cabra	sc-7813	Santa Cruz B	1:200			
	beta-TSH	Conejo	AFP-1274789	NIDDK			1:50	
	beta-FSH	Ratón	18-0020	Zymed Laboratories	1:75		1:50	
	beta-LH	Ratón	MS-9078-P	Neo Markers	1:250			
	Citoqueratinas	Ratón	NCL-C11	Novo Castra	1:45			
	E-Cadherina	Ratón	C20820-050	BD Biosciences	1:75	1:50		
	b-Catenina	Ratón	05-665	Upstate	1:300 (IF)	1:50		
	b-Catenina	Conejo	sc-1496	Santa Cruz B	1:200 (IHQ)			
	Oct4	Ratón	MAB4305	Chemicon	1:100	1:50		
	SSEA-4	Ratón	MC-813-70	Banco de hibridomas	1:50			
	Nanog	Conejo	Ab5731	Chemicon	1:800 (IHQ)			
	Prop1	Cobaya	Contra GST-Prop ¹⁵⁵⁻²³⁰ e His-Prop ¹⁵⁵⁻²³⁰	* Obtenido por grupo inventores	1:250	1:50	1:50	1:500
	S100 (rata)	Conejo	RTU-RTUS100p	Novocastra	Predilución comercial			
	S100 (ratón, humano)	Conejo	Z0311	Dako	1:100 (ratón) 1:2000 (humano)			
	Vimentina (rata)	Conejo	(H-84): sc-5565	Santa Cruz B	1:200			
	Vimentina (ratón)	Cobaya	RDI-PROGP53	Fitzgerald	1:25 (Prot K)			
	Vimentina (humana)	Ratón	Clon V9 M0725	Dako	1:500 (citrato)			
	Nestina	Ratón	Rat-401	Banco de hibridomas	1:100			
	Ki67 (rata)	Ratón	M7248	DakoCytomation	1:250			
	Ki67 (ratón)	Ratón	000310Q10(SP6)	Master D	1:200			
	Sox2	Ratón	MAB4343	Chemicon	1:100			
	Sox2	Conejo	AB5603	Chemicon	1:300 (IHQ) 1:500 (IF)			
	Sox9	Conejo	AB5535	Chemicon	1:200 (IHQ) 1:500 (IF)			
	Sox4	Conejo	S7318	Sigma	1:50			
	NTN	Cabra	AF477	R&D Systems	1:100			1:500
	Ret	Cabra	sc-1290	Santa Cruz B	1:100			
	Pit1	Conejo	sc-442	Santa Cruz	1:300			
	beta-Tubulina isótipo III	Ratón	T8660	Sigma-Aldrich			1:100	
	Neurofilamento (PAN)	Ratón	FNP7,DA2,RmdO2011	Zymed Laboratories			Predilución comercial	

ES 2 339 911 A1

El anticuerpo policlonal anti-Prop1 es un anticuerpo de preparación propia obtenido de cobayas, contra el dominio carboxilo terminal de Prop1 de ratón. El cDNA que codifica los aminoácidos 151a 223 se clonó, corriente abajo, en un vector GST o His-tag. Las proteínas de fusión se expresaron en *Escherichia coli* BL21 y se purificaron parcialmente sobre glutation-agarosa (Sigma) o Ni²⁺-NTA-agarosa (Quiagen). Las inmunizaciones iniciales se llevaron a cabo con la proteína de fusión GST-Prop-1 y los refuerzos finales se llevaron a cabo con las proteínas de fusión His-Prop-1. Ya se había demostrado previamente que este anticuerpo reconoce el factor de transcripción Prop1 en el estadio embrionario E12.5 (Suh H. *et al.*, 2002).

TABLA 2

Anticuerpos secundarios y diluciones utilizados en ensayos de inmunodetección

Anticuerpo secundario	Marcaje	Nº catálogo	Suministrador	Dilución			
				Tejido	Esferoide	Diferenciación	WB
Conejo anti-Ratón	Cy TM 2	315-226-047	Jackson ImmunoResearch	1:1000	1:400	1:400	
Cabra anti-Conejo	Cy TM 3	111-166-047	Jackson ImmunoResearch	1:1000	1:600	1:600	
Burro anti-Cabra	Alexa Fluor 488	A-11055	Molecular Probes	1:250			
Cabra anti-Cobaya	Alexa Fluor 488	A-11073	Molecular Probes	1:1500	1:600		
Cabra anti-Conejo	Biotinilado	BA-100	Vector Labs	1:200			
Cabra anti-Ratón	Biotinilado	BA-200	Vector Labs	1:200			
Cabra Anti-Conejo	Fosfatasa alcalina	AC31RL	Tropix				1:5000
Cabra Anti-Ratón	Fosfatasa alcalina	AC32ML	Tropix				1:5000
Proteína A	HRP	NA9120V	Amersham				1:5000

- Inmunodetección

Para realizar pruebas de inmunofluorescencia, las hipófisis se orientaron y se introdujeron en un criomolde (Sakura) de plástico relleno con medio de congelación (Tissue-Tek OCT Compound, de Sakura) y se congelaron dentro de un frasco de vidrio relleno de isopentano previamente inmerso en N₂ líquido; los criomoldes congelados se mantuvieron a -80°C hasta que fueron seccionados en criosecciones de 10 µm. Estas secciones se fijaron en paraformaldehído al 10% durante 10 minutos (GFRa2, Prop1, Oct4, Citoqueratinas, E-cadherina, SSEA-4, Sox2 de conejo, Nanog, Nestina, ACTH, PRL, FSH, LH) o con metanol a -20°C durante 5 minutos (GFRa2, Prop-1, Ret, Oct4, b-catenina, Sox2 de conejo, Nanog, GFRa1, GH, TSH) o paraformaldehído al 0,5% durante 20 minutos (GFRa2, GH, Ki-67); para los ensayos de Sox2 y Sox9 de ratón, las hipófisis se fijaron en paraformaldehído al 4% durante toda la noche antes de congelarse y seccionarse. Los anticuerpos primarios se aplicaron a las muestras en PBS durante toda la noche, se lavaron profusamente con PBS seguido de una hora de incubación con anticuerpos secundarios, lavando y montando las muestras utilizando GelMount (Biomedica).

Las inmunofluorescencias dobles se llevaron a cabo en días consecutivos; para impedir señales de fondo debidas a los anticuerpos secundarios; el orden fue dependiente de la especie del anticuerpo primario: el primer día, cabra, cobaya o conejo; el segundo día conejo o ratón, respectivamente. La contratinción de los núcleos se llevó a cabo con 20 µg/ml DAPI (Sigma). Los núcleos se contratñeron con 20 µg/ml de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol: compuesto fluorescente que se une al DNA y permite la tinción de los núcleos celulares) (Sigma). En paralelo se obtuvieron también, de forma rutinaria, muestras que correspondían a los controles negativos (en los que se utilizó PBS en lugar del anticuerpo primario) y controles de preadsorción (en los que los anticuerpo se incubaron previamente, durante toda la noche, con un exceso de un fragmento peptídico de la proteína a detectar (15 aminoácidos de la parte central del GFRa2 humano: suministrado por Abcam, nº de catálogo ab39769), de la proteína de fusión (GST-Prop₁₅₅₋₂₂₃) o de la proteína de longitud completa (Nanog human, suministrada por Abcam, nº catálogo ab50053), aboliendo con ello la señal específica prácticamente por completo). Para analizar los resultados, se utilizó un Microscopio Confocal TCS-SP2-DMRE a un aumento suficientemente grande (630x, con zoom de 1,5x =930x, con zoom de 2x =>1000x) como para ser capaz de distinguir partes de la célula, acoplándole láseres de Ar, He/Ne 543 y He/Ne 633 (Leica), y software LCS.

ES 2 339 911 A1

La inmunofluorescencia de esferoides se llevó a cabo pipeteándolos sobre la parte superior de insertos Isopore® de membranas de policarbonato de 8 μm de tamaño de poro (Millipore) y fijándolos con etanol al 70% a temperatura ambiente durante 30 minutos, más HCl 4 M durante 20 minutos (para el mareaje con BrdU) o con metanol a -20°C durante 5 minutos para la tinción con otros anticuerpos, antes de realizar los tratamientos con anticuerpos que se acaban de describir. Para comprobar que los esferoides se obtenían de células que se dividían y no de agregados de células secretoras de la hipófisis, la fracción de células purificadas GFRa2 (90% de células GFRa2+) se incubó desde el inicio del cultivo con BrdU 10 μM durante al menos cinco días. También se hicieron experimentos para ver la tasa de células en división con esferoides de 1, 3 ó 7 días que fueron incubados con BrdU en las últimas 12 horas previas a la fijación; estos esferoides se fijaron con etanol al 70% a temperatura ambiente durante 30 minutos, más HCl 4M durante 20 minutos.

Las células diferenciadas, por su parte, se fijaron en metanol (hormonas) o en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos (beta-tubulina III) antes del tratamiento con los anticuerpos.

Para llevar a cabo la inmunocitoquímica y el mapeo de los telómeros, las hipófisis se fijaron en formalina al 10% tamponada a 4°C , se deshidrataron mediante alcoholes graduados y xileno, y se embebieron en parafina. Previamente a ser embebidas, las hipófisis se orientaron con el fin de obtener secciones sagitales o coronales específicas de 5 μM . Previamente a la inmunohistoquímica (IHC), los portaobjetos embebidos en parafina se desparafinaron, rehidrataron, sumergieron en solución de citrato 10 mM y se hicieron accesibles los epitopos mediante tres pulsos de 5 min de microondas de alta energía. Los portaobjetos se lavaron en agua, se bloquearon con una dilución 1:10 de suero normal de cabra (Vector Labs) y se incubaron con anticuerpos primarios. Los portaobjetos se incubaron entonces con anticuerpos secundarios biotinilados seguidos por el revelado de la señal con un reactivo para la inmunoperoxidasa (ABC-HRP, Vector Labs) y DAB (Sigma). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina y se analizaron mediante microscopía óptica.

Para realizar inmunotransferencias, las células o los tejidos se lisaron tal como se ha descrito previamente (Cani-bano C *et al*, 2007; García A *et al.*, 2001). Brevemente tras añadir SDS al 1% a 95°C durante 5 minutos, el lisado se diluyó 1:5 con Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Glicerol al 10%, Tritón al 1%, EGTA 5 mM, MgCl 1,5 mM suplementado con PMSF 0,1 M (Sigma), aprotinina 5 mg/ml (Sigma), Na_3VO_4 al 2% (Sigma), pirofosfato sódico 0,1 M (Sigma), se homogeneizó a través de una jeringuilla del calibre 20 y se incubó durante 20 minutos en hielo. Los Usados se centrifugaron durante 5 minutos a 14000 rpm y los sobrenadantes se mantuvieron a -20°C . 75 mg de proteínas totales se cargaron en geles de PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) con SDS al 8-15%. Una vez transferidas las proteínas separadas a una membrana de nitrocelulosa siguiendo el procedimiento conocido como transferencia Western (*Western blot*: WB). La incubación con anticuerpos primarios se llevó a cabo durante toda la noche y para la inmunodetección se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina y el sistema CSS (Tropix).

- Técnica de retención de BrdU

A ratas de tres días se les inyectó subcutáneamente 50 μg BrdU (Sigma)/g peso corporal en NaCl al 0,9%, dos veces/día durante 3,5 días. 60 días más tarde, se sacrificaron los animales y se congelaron las hipófisis como se ha comentado anteriormente en la sección de "Inmunodetección", en el párrafo correspondiente a la inmunofluorescencia. Las criosecciones se fijaron en metanol a -20°C durante 10 minutos, se lavaron y se incubaron en HCl 4 M durante 20 minutos. Tras el lavado, se llevó a cabo la inmunofluorescencia con anti-BrdU (BD) como se ha descrito anteriormente.

- Recuento de células inmunoteñidas en secciones de parafina

Las hipófisis se embebieron en parafina, en orientación sagital o coronal. Se llevó a cabo una tinción con hematoxilina en secciones, cada 50 μm , para detectar la mayor sección por cada hipófisis. La inmunohistoquímica se llevó a cabo en tres secciones cercanas a la zona intermedia, separadas por al menos 20 μm . El recuento se realizó en un mínimo de 3 hipófisis por orientación y, considerando un mínimo de 250 células por ratón.

- FISH cuantitativa confocal de telómeros (Telomapeo)

Para llevar a cabo el telomapeo, se hibridaron los telómeros con una sonda de ácido nucleico peptídico (PNA) diseñada para telómeros marcada con el fluoróforo Cy3 (PNA telomere Cy3 probé, de Applied Biosystems) y la longitud de los telómeros se determinó tal como ha sido previamente descrito (Flores I, *et al.*, 2008). Brevemente, los portaobjetos se desparafinaron mediante tres lavados con xileno (de 3 minutos cada uno), luego se trataron durante 3 minutos con una serie de etanol al 100, 95 y 70%, lo cual fue seguido de un protocolo de Q-FISH para telómeros llevado a cabo tal como está descrito (Samper *et al*, 2000). Las señales de DAPI y Cy3 se recogieron simultáneamente en canales separados utilizando un microscopio confocal ultraspectral (Leica TCS-SP2-A-OBS-UV) utilizando como lente una PL APO 20x/0.70 PH2, con el software LCS de Leica, y se generaron para la cuantificación de imágenes proyecciones máximas de pilas de imágenes (10 secciones en pasos de 1,0 μm). El láser DPSS-561 (láser Cy3) se mantuvo a una intensidad constante para capturar todas las imágenes de los tejidos de ratón. Sobre las imágenes confocales se llevó a cabo un análisis cuantitativo de imágenes de alto rendimiento utilizando la plataforma Metamorph (versión 6.3r6; Molecular Devices, Union City, CA). La imagen de DAPI se utilizó para definir el área nuclear y la imagen de Cy3 para cuantificar la fluorescencia de los telómeros. En todos los casos, se restó el ruido de fondo de cada imagen antes de realizar medidas cuantitativas. Para las imágenes de DAPI se estableció el umbral de intensidad de señal, se segmenta-

ES 2 339 911 A1

ron y se convirtieron en imágenes binarias de 1 bit. La máscara binaria de DAPI se aplicó a la correspondiente imagen de Cy3 para obtener una imagen combinada con información sobre la fluorescencia de los telómeros para cada núcleo. La intensidad de fluorescencia de Cy3 (fluorescencia de los telómeros) se midió como “valores medios de gray” (valor total de gray/área de los núcleos) unidades (unidades arbitrarias de fluorescencia). Estos valores de “fluorescencia media de los telómeros” representan siempre la intensidad media en píxeles del Cy3 para el área nuclear total, y no el valor medio de las intensidades individuales de los puntos de los telómeros, descartando con ello que las diferencias en el tamaño nuclear puedan influir en las medidas de las longitudes de los telómeros. Para clasificar los núcleos de acuerdo con la fluorescencia media de sus telómeros se utilizó un código de cuatro colores. Finalmente, los valores de fluorescencia de los telómeros de cada región histológica se exportaron a Excel y se generaron los histogramas de frecuencias.

- Cebadores y condiciones de qRT-PCR

El RNA total de hipófisis de rata se extrajo con el RNeasy Mini Kit (Quiagen). Se retro transcribió 1 µg de RNA utilizando el protocolo estándar para MMLV (Invitrogen) en 20 µl de mezcla de reacción. 3 µl de la mezcla de reacción se amplificaron con la mezcla Cybergreen PCR (Roche) en un aparato 7300 TaqMan (Applied Biosystems), utilizando las siguientes condiciones: 95°C 2”, 60°C 15”, 72°C 15”.

Los cebadores utilizados según los genes de interés se indican a continuación en la Tabla 3:

TABLA 3

Cebadores para amplificar fragmentos de RNA expresado en hipófisis de rata

Genes	Cebadores directo (F) e inverso (R)	SEQ ID NO:	Fragmento (pb)
GRFa2	F-5'TTCAGGCTCGCTTCAATCTT 3'	1	122
	R-5'AACTGCAAGAAGCTTCGCTC 3'	2	
Oct4	F-5'CAAGTTGGCGTGGAGACTCTGC 3'	3	299
	R-5'AGACAACCATCTGCCGCTTCG 3'	4	
Prop1	F-5'GACAGCTGGAGTCAGCCTTT 3'	5	153
	R-5'GCAAGAGCGGTCACTACTCC 3'	6	
GH	F-5'GCAGAGAACTGACATGGAATTG 3'	7	269
	R-5' GATGACGCTCTGCTCAAAA 3'	8	
Ret	F-5' CGGCACACCTCTGCTCATATG 3'	9	325
	R-5'CTGGAGGAAGACGGTGAGCA 3'	10	
Pit1	F-5'TTCCAGACCACACCCTGAGT 3'	11	190
	R-5'ACTTTTCCGCTGAGTTCCT 3'	12	
Hprt	F-5'CAGTCCCAGCGTCGTATT 3'	13	139
	R-5'AGCAAGTCTTTCAGTCCTGTC 3'	14	

- Separación de células GFRA2+ por clasificación por señal fluorescente

Para separar y aislar células GFRA2+ por el método basado en la separación de células activadas por fluorescencia (FACS), se diseccionaron hipófisis de ratones tipo silvestre y se trocearon mecánicamente en PBS-1 (PBS suplementado con 2,7 mg/ml D-glucosa, 10 mg/ml BSA, CaCl₂ 0,5 mM, MgCl₂ 1 mM). Los fragmentos se sometieron a una digestión adicional con colagenasa 0,1%, 100 UI/ml de DNAsa, CaCl₂ 5 mM en PBS durante 45 minutos con agitación suave. Después de centrifugar, las células se lavaron durante 15 minutos en PBS-2 (PBS suplementado con 2,7 mg/ml de D-glucosa, 10 mg/ml BSA) con agitación suave. Después de este lavado, las células se centrifugaron y se dividieron en dos alícuotas idénticas. La primera alícuota se incubó durante 45 minutos con el anticuerpo anti-GFRa2 1:50 en PBS-3 (PBS suplementado con FCS al 0,5% y NaN₃ 0,1%); la segunda alícuota se mantuvo en el mismo volumen de PBS-3 sin ningún anticuerpo. Después de la incubación, y de dos lavados adicionales en PBS-3, ambas alícuotas se incubaron durante 45 minutos, en la oscuridad y con agitación suave, con un anticuerpo de pollo anti-conejo diluido 1:50 marcado con Alexa 488 (Molecular Probes, A21441) en PBS-3. Tras dos últimos lavados en PBS-3, las células se analizaron en un citómetro FACScanto (Becton Dickinson).

ES 2 339 911 A1

- Aislamiento de células GFRa2+ por medios magnéticos

Se prepararon suspensiones de células aisladas de reciente obtención a partir de hipófisis de rata o de ratón, utilizando el método de separación de células magnéticas activadas (MACS[®], de Miltenyi Biotec). Para ello, las células de adenohipófisis se diseccionaron separándolas de la neurohipófisis y el lóbulo intermedio, se lavaron en DMEM (Sigma) y se incubaron con colagenasa IA (Sigma) al 0,4%, DNAsa I al 0,05% (Sigma) (con o sin tripsina al 0,5%, de Sigma) en DMEM suplementado con suero de caballo al 20% (HS, Gibco) en un incubador; la dispersión mecánica se llevó a cabo cada 5 minutos. Tras 20 minutos, las células dispersas se lavaron dos veces en DMEM con HS al 20% y se incubaron con un anticuerpo de conejo anti-GFRa2 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de esta incubación, se añadieron 1 ml de BSA al 0,5% (Sigma) y EDTA 2 mM en PBS (pH 7) y las células se lavaron y resuspendieron en 200 μ l del mismo tampón más 50 ml de partículas magnéticas acopladas a un anticuerpo anti-conejo (MicroBeads, de Miltenyi Biotec) durante 15 minutos a 4°C. Después del lavado, la suspensión de células y partículas se hizo pasar a través de una columna de separación por medios magnéticos (MS Column, de Miltenyi Biotec) unida a un separador magnético (MiniMACS, de Miltenyi Biotec), con dos lavados de 500 μ l (para arrastrar las células GFRa2-). Las células GFRa2+ se eluyeron en 1 ml de medio MEFM, StemM o SpherM según se deseara utilizarlas para su cultivo en forma de células adheridas al soporte de cultivo (medio MEFM), como esferoides (medio SpherM) o como colonias similares a cuerpos embrionarios (medio StemM) (Para las composiciones de los medios, véanse los apartados correspondientes a cada una de las formas de cultivo en las que se utilizan).

20 - Cultivos de células GFRa2+ adheridas al soporte de cultivo

Tras eluir las células con 1 ml de medio MEFM (StemM medio acondicionado para MEFs 1:1 (vol/vol), las células se sembraron en pocillos recubiertos de gelatina y se cultivaron en este medio de cultivo. Los medios de cultivo combinados 1:1 para obtener el medio MEFM tienen la siguiente composición:

25 Medio StemM (Millipore)

- aminoácidos no esenciales al 1%
- 30 - glutamina 2 mM
- β -mercaptoetanol 0,1 mM
- Medio de sustitución de suero Knockout[™] (KO) (Invitrogen): 20%
- 35 - Medio KO-DMEM (Invitrogen), suplementado con al menos un antibiótico: 80%.

40 *Medio Acondicionado para MEFs:* se realizó un pase de cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) en DMEM suplementado con al menos un antibiótico que contenía FBS (suero bovino fetal) al 20%, aminoácidos no esenciales al 1%, glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM; tras 6 días sin cambios, el medio se recogió, filtró y congeló en alícuotas.

Como suplemento de antibiótico se utilizaron penicilina, 100 UI/ml y estreptomina 100 mg/ml.

45 - Cultivo de células GFRa2+ como colonias similares a cuerpos embrionarios

Se trató con mitomicina fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) tal como se ha descrito previamente y se congelaron en alícuotas. En el momento requerido, se descongeló una alícuota y se sembraron los fibroblastos en forma de monocapa. Al día siguiente, las células purificadas GFRa2+ se eluyeron de la columna de separación por medios magnéticos en medio StemM (Millipore) y se colocaron sobre la monocapa de MEFs. Dos semanas más tarde se formaron colonias. Las colonias, flotantes o adheridas, se pasaron de forma rutinaria cada 25 días con la ayuda de la solución de enzimas proteolíticas y colagenolíticas Accutase[™] (Chemicon).

- Cultivo de células GFRa2+ en forma de esferas flotantes

55 El cultivo de las células se llevó a cabo en medio MEFM-E (medio MEFM más 1000 U/ml de ESGRO[®] (Chemicon)), ni se adherieron a la placa recubierta ni se diferenciaron: crecieron como grupos de células flotantes en el medio. Su crecimiento fue lento pero continuado. Su pase se realizó cada 25 días, mediante centrifugación, dispersión por pipeteado, y dilución 1:3.

60 - Cultivo de células GFRa2+ en forma de esferoides

El cultivo de las células se llevó a cabo en medio SpherM, que tiene la siguiente composición:

65 SpherM

- Suplemento N2 1x (Invitrogen)
- Suplemento B27 1x (Invitrogen)

ES 2 339 911 A1

- Suplemento de antibióticos:

- Penicilina: 100 UI/ml
- Estreptomina: 100 µg/ml
- Anfotericina B: 2,5 µg/ml

en medio DMEM/F 12 1:1 (vol/vol).

Tras eluir las células en este medio, se cultivaron 2500 células en una placa p35 (BD Falcon™), durante 5-7 días. Entonces, los esferoides se grabaron en vídeo, se fijaron para realizaron pruebas de inmunofluorescencia o se indujo su diferenciación.

Para los experimentos relacionados con la incorporación y retención de BrdU, se añadió al cultivo, desde el inicio del mismo, BrdU 10 µM (Sigma), pero se observó un efecto tóxico con tratamientos más largos de 5 días. Para evaluar el porcentaje de división celular en esferoides de diferentes días, se añadió BrdU durante las 12 horas de incubación previas a la fijación.

- *Diferenciación de esferoides*

Para inducir su diferenciación, en el día 5 de cultivo se extrajo cuidadosamente cada esferoide individual de la placa de cultivo pipeteándolo con la ayuda de un microscopio y se colocó sobre un portaobjetos BD Falcon™ CultureSlide (BD Biosciences) asociado a una cámara de cultivo, tras haber sido tratado el portaobjetos con colágeno tipo IV (para la diferenciación a células endocrinas adenohipofisarias) o con poli-L-lisina (para la diferenciación neuronal). El esferoide se cultivó en medio SpherM (descrito en el apartado anterior) con FCS al 10%. Al día siguiente, el medio se reemplazó durante 15 días por uno de los siguientes medios de diferenciación:

- a) *Medio de diferenciación 1 (DifM1)*: Medio SSM/medio acondicionado en la línea celular de hipófisis de rata GH4C1, 1:1 (vol/vol), suplementado con antibióticos. El medio SSM (medio semisintético) había sido previamente descrito por el grupo de los autores de la invención para cultivos primarios de hipófisis, con la siguiente composición: medio DMEM/F12 de Ham 6,5:3,5 (vol/vol) suplementado con los siguientes compuestos adquiridos a la casa Sigma: (por litro) BSA (2 g), HEPES (2,38 g), hidrocortisona (143 µg), T3 (0,4 µg), transferrina (10 mg), glucagón (10 ng), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (0,1 µg), y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (0,2 µg). El medio acondicionado en la línea celular GH4C1 (ATCC N° CCL-82.2) se obtuvo cultivando dicha línea celular en DMEM + FCS al 10%; después de 6 días sin cambios, se recogió el medio, se filtró y se congeló en alícuotas.
- b) *Medio de diferenciación 2 (DifM2)*: Medio DMEM/F12 de Ham (1:1), suplemento N2 1x (Invitrogen) + medio acondicionado en la línea celular de hipófisis de rata GH4C1, 1:1 (vol/vol), suplementado con antibióticos.
- c) *Medio de diferenciación 3 (DifM3)*: Suplemento N2 1x (Invitrogen), FBS al 1% en SSM suplementado con antibióticos.
- d) *Medio de diferenciación 4 (DifM4)*: Suplemento B27 1x (Invitrogen), FGF 0,5 ng/ml, GHRH (somatoliberrina u hormona liberadora de la GH) 10⁻⁹ M, Ghrelina 10⁻⁹ M, somatostatina 10⁻⁹ M, hidrocortisona 10⁻⁹ M, 5 µg/ml transferrina, 10 µg/ml de insulina (todas ellas obtenidas de Sigma) en DMEM/F12 de Ham 1:1 (vol/vol), suplementado con antibióticos.
- e) *Medio de diferenciación 5 (DifM5)*: SSM/medio acondicionado en la línea celular de hipófisis de rata GH3, 1:1 (vol/vol), suplementado con antibióticos. El medio acondicionado en la línea celular GH3 (ATCC N° CCL-82.1) se obtuvo cultivando dicha línea celular en DMEM + FCS al 2,5% + suero de caballo al 15%; después de 6 días sin cambios, se recogió el medio, se filtró y se congeló en alícuotas.

Como suplemento de antibióticos se utilizó, en todos los medios, penicilina, 100 unidades/ml y estreptomina 100 mg/ml.

- Ejemplo 1

La expresión de GFRA2 está restringida principalmente a un nicho polarizado de la hipófisis

Para comprobar si la expresión de GFRA2 se podía detectar en la hipófisis y la localización en la que aparecía dicha expresión, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con muestras de rata y ratón.

Tal como se muestra en la Fig. 1, en la hipófisis de roedores (rata y ratón), la expresión de GFRa2 está restringida a un subgrupo claramente diferenciable de células no endocrinas alineadas en una monocapa de células en la zona marginal (ZM) situada alrededor de la hendidura entre el lóbulo intermedio (IL) y la adenohipófisis (véase la Fig. 1 A, correspondiente a hipófisis de rata). Un número limitado de células GFRa2+ aparecen distribuidas también por toda la adenohipófisis, habitualmente como pequeñas agrupaciones que contienen 1-6 células (Fig. 1 A).

Tal como se demuestra en las fotografías de muestras incubadas con el anticuerpo anti-GFRa2 y un anticuerpo dirigido contra una de las hormonas adenohipofisarias (Fig. 1 B) u otros marcadores significativos (citoqueratinas, E-cadherina o b-catenina: Fig. 1 C), las células GFRa2+ no expresan ninguna hormona hipofisaria, pero muestran una expresión significativa de marcadores epiteliales tales como citoqueratinas y E-cadherina, así como de b-catenina, tanto en hipófisis de rata (Fig. 1C) como en hipófisis de ratón (Fig. 1D). El mareaje con b-catenina en particular es bastante significativo, pues, como puede observarse en la Fig. 2A, rara vez es positivo en otras células de esta glándula endocrina: las secciones completas de hipófisis de rata teñidas con DAPI (izquierda) o con un anticuerpo dirigido contra b-catenina (derecha), demuestran un enriquecimiento en esta proteína en la zona correspondiente al nicho situado entre la adenohipófisis y el lóbulo intermedio.

El nicho GFRa2+ de la zona marginal parece tener una organización con una polaridad planar, como se observa en las fotografías de la fila inferior del panel C de la Fig. 1, que permite comparar de nuevo secciones axiales y coronales. Los anticuerpos anti-GFRa2 tiñen una línea muy fina del eje coronal de las células de la ZM. Sin embargo, GFRa2 resulta ampliamente teñido en las células de la ZM del eje axial. Una polarización similar se encuentra para la b-catenina, donde cada célula aparece como una línea en forma de U en las secciones coronales frente a los anillos completos de las secciones axiales. Es interesante que las tinciones de GFRa2 (membrana) y b-catenina (citoplasma) son perpendiculares (véase las secciones Axiales de 400x y 1000x), lo que sugiere que el nicho de células GFRa2 se forma a partir de células cilíndricas con coordinación para la polaridad planar, una coordinación específica de capas de células epiteliales para migrar en una dirección fisiológica.

La fotografía de la Fig. 2 B, correspondiente a las bandas de electroforesis de fragmentos amplificados de mRNA de GFRa2 extraídos de hipófisis y testículo de rata, demuestran que GFRa2 se expresa en la hipófisis de rata a niveles similares a los de los testículos; un resultado similar se encontró para los ovarios, otra glándula endocrina donde habían sido previamente descritos los receptores GFRa1 y 2.

Para averiguar la proporción de células de la hipófisis que conforman este nicho de células GFRa2+, se realizaron ensayos de análisis por citometría de flujo con una suspensión de células de adenohipófisis de ratón dispersas enzimáticamente, que se incubaron secuencialmente con un anticuerpo anti-GFRa2 de ratón generado en conejo, seguido de un anticuerpo anti-conejo marcado con FITC. Los resultados se muestran en el panel C de la Fig. 2, donde puede comprobarse que la población que presenta la señal FITC más intensa (la representada en la parte derecha de cada uno de los gráficos superiores), supone aproximadamente un 0,9% de la suspensión total de células en las muestras GFRa2+, mientras que en el control negativo (anticuerpo secundario solamente), dicha población supone menos de 0,1%. La población GFRa2+ se componen de células pequeñas homogéneas, como se puede ver por el bajo nivel de población en el FSC (*forward scatter*: dispersión frontal) frente a la población que no presenta señal de FITC, o comparando la señal débil FITC+ con el control.

- Ejemplo 2

Las células del nicho GFRa2+ expresan factores específicos de la hipófisis y marcadores de células madre en hipófisis de ratón y seres humanos

Para verificar la expresión de otros marcadores de células madre/progenitoras por parte de las células GFRa2+ y comprobar el porcentaje de células en las que podía observarse coexpresión de GFRa2+ y otros marcadores, se realizaron ensayos de tinción por inmunofluorescencia con mareaje doble, que se repitieron en hipófisis de animales diferentes (más de 10) y con distintas criosecciones obtenidas de muestras de hipófisis de un mismo animal. Se utilizó el microscopio confocal con un aumento suficientemente grande (630x, con zoom de 1,5x= 930x, con zoom de 2x=>1000x) como para poder distinguir parte de la célula; se contratiñó siempre con DAPI para delimitar el núcleo y se comprobó que cada una de las señales fluorescentes coincidía en localización con la localización esperable para el marcador que se pretendía detectar. Así, en el caso de la tinción doble GFRa2/b-catenina, la señal correspondiente a GFRa2, que es un marcador de la cara extracelular de la membrana plasmática, debe aparecer por fuera de la de b-catenina, que está pegada a la cara intracelular de la membrana plasmática. Para realizar el recuento de células doblemente positivas, se consideraron como tales aquellas en las que un marcador se veía literalmente dentro del otro o, incluso, en las que aparecían mezclas de colores (por ejemplo, amarillo: mezcla de rojo (señal correspondiente a GFRa2) y verde (señal correspondiente a b-catenina)) en el microscopio confocal. Se contaron varias imágenes confocales de la misma hipófisis y de hipófisis de diferentes animales, con tinciones hechas en diferentes días.

Las pruebas realizadas demuestran que en el nicho de células GFRa2+ se expresan también otros diversos marcadores de células madre/progenitoras. En la Tabla 4 se presenta una lista de los marcadores ensayados, así como en porcentaje relativo de las células GFRa2+ que los expresan.

TABLA 4

Marcadores expresados o ausentes de células GFRa2+

	Marcador	% de células GFRa2+ que contienen el marcador*
5	<hr/>	
10	Hormonas	
	GH	0 %
	ACTH	0 %
15	PRL	0 %
	TSH	0 %
	FSH	0 %
20	LH	0 %
	Marcadores epiteliales y ruta de Wnt	
	Multi-citoqueratina	90 %
25	E-cadherina	86 %
	b-catenina	91 %
	Ruta de GFR2a2	
30	Ret	78 %
	NTN	0 %
35	Marcadores de células madre	
	SSEA4	100 %
	Prop1	99 %
40	Oct4	94 %
	Sox2	91 %
	Sox9	96 %
45	Sox4	0 %
	Nestina	0 %
	Nanog	0 %
50	Isl-1	0 %
	Pax6	0 %
	Otros marcadores	
55	S-100	43%
	Vimentina	<3%
60	Marcadores de proliferación	
	Ki67 en GPS adultas	0 %
	Ki67 a los 10 días	13 %

65 * Para cada combinación de marcadores se contaron 125-200 células

ES 2 339 911 A1

Los resultados mostrados en esta Tabla están ilustrados por las fotografías de ensayos de tinciones e inmunofluorescencia con parejas de anticuerpos mostrados en las Figs. 3 y 4. En particular, se observa que en este nicho de células se expresan los factores de transcripción recientemente descritos Sox 2 y Sox9 (Figs. 3 A -ratón- y B -rata y ratón-), donde puede observarse cotinción con GFRA2/b-catenina. Estas células también muestran una señal clara para Oct4 (Fig. 3 C), y SSEA4, un marcador glicolipídico de células madre embrionarias (Fig. 3D, primera fotografía de la fila). Como se ve en la Tabla, el porcentaje de coincidencia para los marcadores de células madre positivos en células GFRA2+ supera en todos los casos el 90%. Sin embargo, este nicho de células es negativo respecto a otros marcadores de células progenitoras tales como Sox4, Nestina, Nanog (Fig. 3, paneles E, F y G, respectivamente), Isl-1 o Pax6.

Las células GFRA2+ no expresan el receptor GFRA1 (cuya expresión sí se observa en somatotropos, como se ve en las fotografías intermedias del panel D de la Fig. 3), y también son negativas para expresión de la hormona del crecimiento (véase la última figura del panel D de la Fig. 3, donde no hay colocalización de la señal de Oct4 y GH). Las células GFRA2+ también expresan el receptor Ret, aunque menos intensamente que los somatotropos (Fig. 3, panel H). Por otra parte, el ligando específico de GFRA2, NTN, se expresa exclusivamente en grupos dispersos por la adenohipófisis y no en el nicho (Fig. 3, panel H).

Por su parte, la tinción doble con otros marcadores, tales como el marcador de células folículoestrelladas S-100, se produce sólo en una porción de las células, que en el caso del mencionado marcador se aproxima a la mitad (43%) (véase la Fig. 3, panel I, correspondiente a hipófisis de rata). El marcador de células madre mesenquimales vimentina, otro marcador de células folículoestrelladas, se expresa en la misma zona que las células GFRA2+, pero no exactamente en las mismas células, sino en células contiguas más próximas al lóbulo intermedio, situadas justo en la línea que marca el límite del mismo, paralelas a la línea de células GFRA2+, tanto en hipófisis de ratón como en hipófisis de rata (véase la Fig. 3, paneles J y K). Finalmente, la nestina, que también es un marcador de células folículoestrelladas, se expresa en los tres lóbulos de la hipófisis en agrupaciones largas y finas pero, como se ha comentado anteriormente, no se localiza con la tinción para GFRA2.

Las células GFRA2+ no expresan el factor de transcripción específico de hipófisis Pit1 (Fig. 3, panel L), un factor de transcripción hipofisario expresado por somatotropos, lactotropos y tirotropos, pero muestran una señal clara y específica para Prop1, un factor de transcripción claramente implicado en el desarrollo y homeostasis de la hipófisis (Fig. 3, panel M): los núcleos positivos para Prop1 aparecen rodeados por la tinción de membrana de GFRA2.

Dado que las células GFRA2+ expresan factores específicos de la hipófisis de relevancia fisiológica clara tales como Prop1, y marcadores fiables de células madre/progenitoras de la familia Sox/Oct, estas células pueden denominarse también de forma abreviada como GPS (células GFRA2+, Prop1+, Sox+). Además de estos marcadores moleculares, la observación de estas células en movimiento y su grabación en vídeo permitió observar que estas células retienen rasgos embrionarios tales como ausencia de gránulos secretores o presencia de microvellosidades y cilios.

Para establecer la relevancia para los seres humanos de los hallazgos en roedores, se realizó un estudio similar en hipófisis humanas normales completas. Los resultados, mostrados en la Fig. 4, demuestran que un nicho similar de células, que expresan GFRA2, Oct4, Sox9, Sox2 y Prop1, está presente también en la zona marginal de la hipófisis humana, alrededor de los denominados quistes remanentes de Rathke. Esos marcadores son expresados también por pequeñas agrupaciones adicionales esparcidas por la adenohipófisis. Como en los roedores, la neurturina no se expresa en el nicho de células de la zona marginal, sino en pequeñas agrupaciones de células dentro de la adenohipófisis (AP) (Fig. 4 F).

- Ejemplo 3

Las células GFRA2+ forman esferoides similares a los embrionarios

Para centrarse específicamente en el potencial de diferenciación del nicho de células GPS, se aislaron células individuales GRF2+ por medios magnéticos, tal como está explicado en la correspondiente sección metodológica. Un esquema del método de aislamiento de células GRF2+ mediante la aplicación de la metodología MACS se representa en la Fig. 5: dispersión con colagenasa (la dispersión de las células con tripsina no da como resultado esferoides viables, porque los receptores GFRA son proteínas extracelulares unidas covalentemente a la membrana plasmática a través de un anclaje GPI de glicosilfosfatidil-inositol sensible al tratamiento con tripsina); incubación con un anticuerpo anti-GFRA2 de conejo; incubación con un anticuerpo anti-conejo acoplado a partículas magnéticas (Macs); y paso por una columna acoplada a un imán en la que son retenidas las células GFRA2+ que llevan unido el anticuerpo anti-GFRA2+, que a su vez está unido al anticuerpo secundario ligado a partículas magnéticas. La posterior elución de las células retenidas permite su aislamiento.

Una vez aisladas, las células se mantuvieron en cultivo en suspensión en un medio específico libre de suero (SpherM). Se utilizaron placas de 35 cm de diámetro, en cada una de las cuales se sembraron 2500 células, bien de la fracción purificada GFRA2+, inicialmente retenida en la columna (positiva para GFRA2 en un 90% según las pruebas de inmunofluorescencia practicadas) o bien de la fracción de células excluidas GFRA2- (negativas en un 95% respecto a GFRA2). Después de siete días, las células GFRA2+ formaron estructuras esferoides compactas o huecas, con una pequeña cavidad rodeada de células pequeñas (139 esferoides/placa, aproximadamente 40 células/esferoide), mientras que las placas en las que se habían cultivado células GFRA2- presentaban sólo unos pocos acúmulos compactos de

ES 2 339 911 A1

células (12 acúmulos/placa, 4-8 células/acúmulo). En la parte derecha de la Fig. 5 se muestran varias fotografías de tinción con Hoechst u obtenidas con un microscopio de contraste de fase de los esferoides formados tras 7 días de cultivo. Algunos de estos esferoides contenían cilios y mostraban movimientos activos.

5 La Fig. 6 muestra características de estos esferoides. En el panel A puede apreciarse que los esferoides mantienen la expresión de GFRa2 y, además, muestran una tinción positiva para Prop1 y b-catenina (líneas finas); también mantienen la expresión de Oct4 y E-cadherina. Sin embargo, en estas condiciones de cultivo, estas células siguen siendo negativas con respecto a las hormonas hipofisarias.

10 Tal como puede apreciarse en el panel B de la Fig. 6, los ensayos de incorporación de BrdU muestran que existe proliferación “de novo” dentro de los esferoides, tanto a los 3 días de cultivo como a los 7 días. Por el contrario, la fracción de células negativas respecto a GFRa2 mantenida en paralelo permaneció en forma de células aisladas con excepción de unos pocos acúmulos de 4-8 células y la tinción negativa para BrdU muestra que no se multiplicaron.

15 El ligando de GFRa2, Neurturina o NTN (50 ng/ml) tiene un efecto trófico en el número de esferoides, actuando como un promotor fisiológico de la formación de esferoides, cuando el SpherM se diluye a la mitad, dando lugar a que las células se cultiven en condiciones sub-óptimas. Esto puede apreciarse en el gráfico del panel C de la Fig. 6, e indica una dependencia parcial del ligando y una función significativa de la ruta NTN/Ret/GFRa2 en las células GFRa2+.

20 Cuando se dispersan con tripsina, las células esferoides son capaces de generar esferoides secundarios aunque con una eficacia tres veces menor: sólo un tercio de las células genera esferoides. Es difícil obtener esferoides terciarios, con una eficacia más de 10 veces menor, y son inestables y entran inmediatamente en muerte apoptótica.

25 El cultivo de las GFRa2+ purificadas mediante métodos magnéticos da lugar a fenotipos diferentes según las condiciones de cultivo:

30 - Si las células GFRa2+ se hacen crecer en pocillos recubiertos de gelatina en presencia de medios acondicionados de MEFs (MEFM al 50%), se adhieren al pocilio y son capaces de crecer lentamente como un cultivo disperso, en el que las células siguen siendo positivas para GFRa2 y Prop. Sin embargo, después del segundo pase aparecen al microscopio estructuras diferenciadas como “tubos” o colonias que expresan una pigmentación roja, entremezcladas con las células dispersas GFRa2+.

35 - Si las células se hacen crecer directamente sobre MEFs tratados con mitomicina sobre el medio característico para células madre (StemM), las células crecen como colonias indiferenciadas y muestran cilios.

- En presencia de medio MEFM suplementado con LIF (ESGRO), las células no se adhieren a la placa recubierta de gelatina, sino que crecen como esferas flotantes.

40 Los autores de la invención han conseguido mantener los cultivos de células GFRa2+, bien como esferas, bien como colonias flotantes/adheridas, al menos hasta el 7º pase, pareciendo que es posible mantenerlas durante más tiempo.

45 - Ejemplo 4

Los esferoides GFRa2+ son capaces de diferenciarse en células productoras de hormonas

50 A continuación se comprobó si los esferoides GFRa2+ mantienen la capacidad de diferenciarse dando lugar a células endocrinas. Para ello, los esferoides se incubaron en condiciones de diferenciación, tal como se ha explicado en el apartado correspondiente: aislándolos por pipeteo observándolos con un microscopio de contraste de fase y sembrándolos sobre pocillos/portaobjetos recubiertos de Colágeno Tipo IV (el colágeno característico de las membranas basales de las capas epiteliales). Tras inducir la adhesión con suero durante un día, se produjo la incubación en uno de los medios de diferenciación DifM 1 a 5 cuya composición se detalló anteriormente.

55 Esta estrategia permitió diferenciar los esferoides en células productoras de GH o PRL o TSH o ACTH o FSH, tal como puede observarse en el panel A de la Fig. 7. Tras la diferenciación no se observó ninguna célula positiva para GFRa2 o Prop1.

60 Cuando los esferoides se sembraron sobre Poli-L-lisina con DifM4, se obtuvieron células positivas para beta-tubulina-III (panel B de la Fig. 7). La beta-tubulina III es característica de las neuronas y, de hecho, algunas de estas células presentan apariencia bipolar, como puede observarse en la fotografía de contraste de fase con la que comienza dicho panel, lo que sugiere un potencial de células madre ectodérmicas para las células hipofisarias GFRa2+. Las pruebas de inmunofluorescencia con anticuerpos dirigidos al proteína característica de los filamentos intermedios neuronales, los neurofilamentos (NF), dio lugar a resultados positivos similares, con ausencia de tinción para la hormona del crecimiento.

65 Para evaluar la expresión de RNA a lo largo de proceso de diferenciación, se llevó a cabo un análisis por RT-PCR de la fracción GFRa2+ (90% de pureza) y la fracción GFRa2- (95% de pureza) inmediatamente después del proceso

ES 2 339 911 A1

de separación de ambas fracciones, así como en las células derivadas de ambas fracciones tras 5 días de cultivo en SpherM y en las células obtenidas tras la diferenciación de un único esferoide sembrado sobre Poli-L-lisina y crecido en DifM4. Tal como puede observarse en el panel C de la Fig. 7, los marcadores característicos de células madre Prop1 y Oct4 mostraban una fuerte expresión en la fracción GFRA2+ y estaban ausentes de las células GFRA2-. La expresión de hormona del crecimiento (GH) sigue estando presente tras el proceso de purificación, probablemente debido a la abundancia de somatotropos en la hipófisis. Tras el cultivo en medio SpherM, la expresión de los marcadores GFRA2, Prop1 y Oct4 decae en los esferoides obtenidos de las células GFRA2+ aunque los marcadores de células madre siguen estando presentes en los esferoides y la posición de la banda correspondiente a GFRA2 se desplaza hacia arriba; no se detecta presencia en los esferoides del marcador de células secretoras GH o del marcador de diferenciación beta-tubulina III. Cuando se induce la diferenciación de los esferoides, dejan de detectarse los marcadores característicos de las células GFRA2+, pero se expresan de nuevo GH y beta-tubulina III.

La Tabla 5 muestra un resumen de los marcadores observados en las células diferenciadas con los distintos protocolos, tras 15 días de diferenciación, fijar el contenido de los pocillos y realizar pruebas de inmunofluorescencia. En los casos en los que se realizaron inmunofluorescencias dobles, se indica entre paréntesis el número de células positivas tanto para el marcador indicado al comienzo de la columna como para el marcador adicional analizado, habiéndose subrayado aquellos pocillos en los que se detectó más de un tipo de células, de manera que los datos correspondientes a pocillos no subrayados en los que hay una cifra indicada entre paréntesis corresponden a pocillos en los que se detectó un único tipo de célula).

TABLA 5

Marcadores detectados con los medios de diferenciación DifM1-5

	GH		PRL		bTSH		ACTH		bFSH		Tub b III		NeuroF	
	n°+	núcleos	n°+	núcleos	n°+	núcleos	n°+	núcleos	n°+	núcleos	n°+	núcleos	n°+	núcleos
DifM1	n.d.		n.d.		0	10	9 10	38 18	n.d.		n.d.		n.d.	
DifM2	<u>1(1)</u>	25	0	17	6(0)	29	0(0)	29	<u>5(1)</u>	25	n.d.		n.d.	
	<u>1(1)</u>	52	17	17			<u>12(1)</u>	52			n.d.		n.d.	
	8(0)	27			7(0)	9	0(0)	9	0(0)	27	n.d.		n.d.	
	<u>3(2)</u>	58							<u>2(2)</u>	58	n.d.		n.d.	
DifM3	0(0)	17	6(0)	17	0	15	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
	0(b)	18	6(a)	51			n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
	0	13	2(a)	3			n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
DifM4 (polilisina)	<u>6(5)</u>	93			7(0)	28	n.d.		n.d.		5	15	<u>10(5)</u>	93
	3(0)	9			<u>26(0)</u>	27	n.d.		n.d.		0(0)	28	0(0)	9
	7(0)	37	0	18			n.d.		n.d.		<u>1(0)</u>	27	0(0)	9
	0(0)	117					n.d.		n.d.		0(0)	37		
	0(0)	50					n.d.		n.d.		2(0)	117		
	0(0)	25					n.d.		n.d.		24(0)	25	1(0)	50
DifM5	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	

(a) Pocillos en los que se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia para GFRA2 (con resultado negativo)

(b) Pocillos en los que se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia para Prop1 (con resultado negativo)

n.d.: Ningún dato (ensayos no realizados).

Los protocolos de diferenciación parecen ser bastante específicos, puesto que sólo se obtienen lactotropos (productores de prolactina, PRL) con el medio de diferenciación DifM3, mientras que la hormona del crecimiento no se detecta nunca al provocar la diferenciación en ese medio. Cuando se analizaron simultáneamente dos marcadores, pudieron

observarse tanto células negativas, células positivas para un único marcador o células positivas para dos marcadores, tal como puede deducirse de la tabla y de las inmunotinciones dobles del panel D de la Fig. 7. En general, se observó que las células positivas para alguna hormona mostraban núcleos de tamaño intermedio, mientras que las células positivas para NF mostraban núcleos de menor tamaño y las células positivas para beta-tubulina III frecuentemente mostraban núcleos grandes, mayores que los de las células productoras de hormonas.

- Ejemplo 5

10 *Funcionalidad del nicho de células GFRa2+ a lo largo de la vida: Proliferación lenta y telómeros largos en animales adultos*

A continuación se estudió la funcionalidad del nicho del animal a lo largo de la vida.

15 5.1. *Retención de BrdU*

Tal como puede observarse en la Fig. 8, las hipófisis de ratas recién nacidas (24 horas) y de 10 días presentan un nicho de células similar al detectado en animales adultos GFRa2+/b-catenina+/GH- (panel A). Las células GFRa2+ se dividen activamente durante el desarrollo temprano postnatal (10 días) en la hipófisis de rata pero pierden potencial proliferativo con la edad, especialmente al llegar a la edad adulta, como se detecta mediante la tinción del nicho de células GFRa2+ con el anticuerpo monoclonal Ki67, que detecta una proteína nuclear que se expresa en las células que entran en el ciclo celular (panel B). También en las hipófisis de ratones adultos (panel C) la división celular es escasa y raramente se observa en células GFRa2+.

25 Los gráficos del panel D de la Fig. 8, referidos al análisis cuantitativo por RT-PCR de la expresión de diversos marcadores de células madre y hormonas en la adenohipófisis, muestran que la expresión de esos marcadores va disminuyendo durante el desarrollo postnatal hasta la edad adulta en relación inversa con la producción de hormonas o el factor de transcripción Pit1, lo que sugiere una división de células progenitoras para incrementar la masa de la hipófisis reduciendo el número de células progenitoras. La expresión de los marcadores somatotróficos Ret y Pit-1 presenta un pico hacia la pubertad (días 10 a 20), o se incrementa con el crecimiento hasta llegar a la edad adulta.

30 Para analizar la frecuencia de replicación del supuesto nicho de células progenitoras, se utilizó la técnica de retención de BrdU. En las ratas, las células GFRa2+ retuvieron específicamente BrdU incluso 60 días después de una inyección en el caso de ser recién nacidas, mientras que esta señal se perdía en la mayor parte de las otras células de la hipófisis (panel E de la Fig. 8). Estos resultados sugieren que el nicho de células GFRa2 se replican lentamente después del nacimiento, una propiedad compartida por la mayor parte de las células madre/progenitoras.

5.2. *Telomapeo*

40 Para investigar más ampliamente el número de divisiones celulares en este nicho, se utilizó una técnica de reciente aparición para cuantificar la longitud de los telómeros *in situ*. Esta técnica, llamada “telomapeo”, está basada en la hibridación *in situ* específica de una muestra de DNA telomérico fluorescente sobre secciones de parafina (Flores *et al.*, 2008). La relación entre la longitud de los telómeros y el tipo de célula se basa en el hecho de que la longitud de los telómeros disminuye con las divisiones celulares. Así, las células maduras que habitualmente han experimentado muchas divisiones presentan telómeros cortos, pues la longitud de los telómeros disminuye gradualmente con cada ciclo celular debido a la replicación incompleta del DNA telomérico. Tener los telómeros largos, en cambio, se considera un hito de las células madre/progenitoras, puesto que estas células se dividen más lentamente y la longitud de los telómeros se mantiene en valores más similares a los de las células embrionarias. La diferencia entre los telómeros de células maduras y células progenitoras se esquematiza en la parte A de la Fig. 9.

50 Al realizar el ensayo de telomapeo sobre hipófisis normales de ratones adultos, se encontró una línea fina de núcleos que contienen telómeros largos, exactamente en la primera línea de células del límite entre el lóbulo intermedio y la adenohipófisis (regiones I), que se corresponde en su posición con el nicho de células GFRa2+; las siguientes líneas de células en dirección hacia la adenohipófisis o lóbulo intermedio/neurohipófisis presentan un acortamiento de los telómeros, mientras que el grueso de células secretoras tienen telómeros cortos, característicos de células diferenciadas. En la parte B de la Fig. 9 se esquematiza las diferentes regiones encontradas en la hipófisis según la longitud de los telómeros, mientras que en la parte D se muestran gráficos de barras acumulativos con los tantos por uno que representan las células cuyos telómeros están comprendidos en cada uno de los intervalos representados a la derecha de la imagen en cada una de las regiones del lóbulo intermedio y de la adenohipófisis.

60 El análisis de telomapeo cuantificado en el panel D indica que la región I de la adenohipófisis contiene en su mayor parte células con telómeros largos (alrededor del 28% de la región I de la adenohipófisis corresponde a células “en reposo” cuyos telómeros muestran una señal de fluorescencia equivalente a 18000-30000 unidades arbitrarias de fluorescencia, que aparece de color rojo en las fotografías de la columna derecha del panel C. Es interesante que los telómeros más largos de la hipófisis se marquen específicamente en la zona marginal, donde están localizadas las células GFRa2+. En el lóbulo intermedio, las únicas células con telómeros largos están localizadas también en la región I del lóbulo.

El porcentaje de células con telómeros largos disminuye progresivamente en las regiones II y III, donde se encuentran dispersas algunas células GFRa2+ con largos telómeros. La mayor parte de las células de la adenohipófisis mostraban telómeros cortos, lo que sugiere un componente abundante de células maduras que han sufrido muchas divisiones celulares.

Estos resultados sugieren que las células progenitoras de la hipófisis están localizadas en la zona marginal, donde se localizan las GFRa2+.

- Ejemplo 6

Regulación alterada del ciclo celular de las células GFRa2+ en modelos de ratones genéticamente modificados con hipófisis hipoplásicas

En algunos nichos de células madre/progenitoras se ha demostrado que la proliferación depende en gran medida de la actividad cdk4, que está cuidadosamente regulada a la baja en el nicho y que se incrementa según va entrando la célula progenitora en el estado denominado amplificador del tránsito para convertirse en célula diferenciada (Horsley V *et al*, 2008). Para comprender más ampliamente el papel fisiológico del nicho de células GFRa2+ en la función de la hipófisis, se hizo uso de un modelo genético de disfunción de la hipófisis inducido por la ablación de la ruta de Cdk4 del ciclo celular. Los ratones deficientes en Cdk4 en los cuales se ha inactivado Cdk4 mediante la inserción de una cásete de resistencia a neomicina (neo) [ratones Cdk4(n/n)] (Rane SG *et al*. 1999) muestran hipófisis hipoplásicas, con una disminución dramática de todas las células secretoras de hormonas de la adenohipófisis durante la vida postnatal. Esto puede observarse, por ejemplo en el panel A de la Fig. 10, donde se aprecia la diferencia de tamaño entre las hipófisis de los ratones Cdk4(+/+) y Cdk4(n/n): los ratones deficientes en Cdk4 (Cdk4(n/n)) muestran una hipófisis hipoplásica mucho más pequeña que los de tipo salvaje debido a su baja celularidad (véase la diferencia en la tinción de células mostrada en la parte inferior del panel B de la Fig. 10) y menor tamaño. Estas diferencias afectan principalmente a la adenohipófisis, que, como se ve en el gráfico situado a la derecha de las fotografías del panel B de la Fig. 10, contiene aproximadamente el 5% de células que las hipófisis de tipo salvaje hacia los 2 meses de edad. Este fenotipo se rescata en los ratones Cdk4(R/R), que muestran una hipófisis mayor con un incremento de 2 veces en la adenohipófisis hacia los dos meses.

Estas hipófisis nulas para Cdk4 muestran una tinción normal de Ki67 durante el desarrollo embrionario pero una disminución de la proliferación después del nacimiento, de forma similar a lo que se ha observado previamente en células endocrinas nulas para Cdk4 en el páncreas (Martín J *et al*, 2003). Aun así, el nicho de células GFRa2+ no sólo se mantuvo en los ratones Cdk4(n/n), sino que se engrosó en estos animales, presentando en ellos más capas celulares, tal como puede observarse en las fotografías del panel C de la Fig. 10, lo que sugiere una producción normal de estas células durante el desarrollo embrionario, pero una diferenciación anormal en células productoras de hormonas. Así, mientras que los ratones de tipo silvestre contienen aproximadamente 0,9% de células GFRa2+, estas células muestran un enriquecimiento de 3-3,5 veces en la adenohipófisis y de 2 veces en el lóbulo intermedio de los ratones Cdk4(n/n) (Fig. 10, gráficos del panel C). En cambio, como muestran los gráficos del panel D de la Fig. 10, a pesar de que el número total de células productoras de hormonas disminuye en los animales deficientes en Cdk4, el porcentaje relativo de células productoras de hormonas no se ve alterado en gran medida en los ratones deficientes en Cdk4, lo que sugiere una deficiencia global en la producción de todas estas células a partir de estos progenitores.

En consonancia con estas observaciones, las hipófisis nulas para Cdk4 muestran largos telómeros por toda la adenohipófisis (panel E de la Fig. 10), lo que sugiere un número reducido de ciclos celulares en estas hipófisis anteriores pequeñas. La longitud global de los telómeros se incrementa significativamente en la región III distal de la adenohipófisis de ratones Cdk4(-/-): aproximadamente un 48% de estas células muestran telómeros largos, mientras que este número es aproximadamente del 12% en la adenohipófisis de tipo salvaje o en las que se ha rescatado Cdk4, Cdk4^{R24C}.

Es interesante que los tres fenotipos analizados (celularidad y tamaño de la hipófisis reducidos, incremento en el componente de células GFRa2+ y largos telómeros en la adenohipófisis) se rescatan cuando se reexpresa Cdk4 [ratones Cdk4(R/R)] expresando la recombinasa Cre y retirando la cásete neo (véanse las columnas de fotografías de la parte derecha de los paneles B, C y D, así como las barras correspondientes en los gráficos adyacentes a ellas), en paralelo con la recuperación de la función normal de la hipófisis.

Estos datos obtenidos en animales relacionan claramente las células GFRa2+ con el crecimiento postnatal de la hipófisis y sugieren que Cdk4 participa en el control de la proliferación postnatal de este nicho de células.

Referencias

Canibano, C., Rodríguez, N. L., Saez, C., Tovar, S., Garcia-Lavandeira, M., Borrello, M. G., Vidal, A., Costantini, F., Japon, M., Dieguez, C. *et al*. 2007. The dependence receptor Ret induces apoptosis in somatotrophs through a Pit-1/p53 pathway, preventing tumor growth. *EMBO J*. **26**:2015-2028.

Chen, J., Hersmus, N., Van Duppen, V., Caesens, P., Deneff, C., Vankelecom, H. 2005. The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. *Endocrinology* **146**:3985-3998.

- Fauquier, T., Rizzoti, K., Dattani, M., Lovell-Badge, R., Robinson, I.C.** 2008. SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:2907-2912.
- Flores, I., Canela, A., Vera, E., Tejera, A., Cotsarelis, G., Blasco, M. A.** 2008. The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev.* Publicación electrónica previa a su impresión PMID: 18283121.
- Fuchs, E., Tumber, T., Guasch, G.** 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* **116**:769-778.
- García, A., Alvarez, C. V., Smith, R. G., Dieguez, C.** 2001. Regulation of Pit-1 expression by ghrelin and GHRP-6 through the GH secretagogue receptor. *Mol. Endocrinol.* **15**:1484-1495.
- Hagstrom, S. A., Pauer, G. J., Reid, J., Simpson, E., Crowe, S., Maumenee, I. H., Traboulsi, E. I.** 2005. SOX2 mutation causes anophthalmia, hearing loss, and brain anomalies. *Am. J. Med. Genet. A.* **138**:95-98.
- Heuckeroth, R. O., Enomoto, H., Grider, J. R., Golden, J. P., Hanke, J. A., Jackman, A., Molliver, D. C., Bardgett, M. E., Snider, W. D., Johnson, E. M., Jr et al.** 1999. Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron* **22**:253-263.
- Hofmann, M. C., Braydich-Stolle, L., Dym, M.** 2005. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev. Biol.* **279**:114-124.
- Horsley, V., Aliprantis, A. O., Polak, L., Glimcher, L. H., Fuchs, E.** 2008. NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. *Cell* **132**:299-310.
- Islam, O., Butt, T., Abrahams, J.** 2007. Rathke Cleft Cysts. <http://www.emedicine.com/radio/topic594.htm>.
- Japon, M. A., Urbano, A. G., Saez, C., Segura, D. I., Cerro, A. L., Dieguez, C., Alvarez, C. V.** 2002. Glial-derived neurotropic factor and RET gene expression in normal human anterior pituitary cell types and in pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**:1879-1884.
- Kelberman, D., Rizzoti, K., Avilion, A., Bitner-Glindzicz, M., Cianfarani, S., Collins, J., Chong, W. K., Kirk, J. M., Achermann, J. C., Ross, R. et al.** 2006. Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **116**:2442-2455.
- Lengner, C. J., Camargo, F. D., Hochedlinger, K., Welstead, G. G., Zaidi, S., Gokhale, S., Scholer, H. R., Tomilin, A., Jaenisch, R.** 2007. Oct4 Expression Is Not Required for Mouse Somatic Stem Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell* **1**:403-415.
- Lepore, D. A., Jokubaitis, V. J., Simmons, P. J., Roeszler, K. N., Rossi, R., Bauer, K., Thomas, P. Q.** 2006. A role for angiotensin-converting enzyme in the characterization, enrichment, and proliferation potential of adult murine pituitary colony-forming cells. *Stem Cells* **24**:2382-2390.
- Lepore, D. A., Roeszler, K., Wagner, J., Ross, S. A., Bauer, K., Thomas, P. Q.** 2005. Identification and enrichment of colony-forming cells from the adult murine pituitary. *Exp. Cell Res.* **308**:166-176.
- Martin, J., Hunt, S. L., Dubus, P., Sotillo, R., Nehme-Pelluard, F., Magnuson, M. A., Parlow, A. F., Malumbres, M., Ortega, S., Barbacid, M.** 2003. Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic beta-cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene* **22**:5261-5269.
- Melmed, S.** 2003. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J. Clin. Invest.* **112**:1603-1618.
- Moore, K. A., Lemischka, I. R.** 2006. Stem cells and their niches. *Science* **311**:1880-1885.
- Nasonkin, I. O., Ward, R. D., Raetzman, L. T., Seasholtz, A. F., Saunders, T. L., Gillespie, P. J., Camper, S. A.** 2004. Pituitary hypoplasia and respiratory distress syndrome in Prop1 knockout mice. *Hum. Mol. Genet.* **13**:2727-2735.
- Pevny, L. H., Lovell-Badge, R.** 1997. Sox genes find their feet. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**:338-344.
- Rane, S. G., Dubus, P., Mettus, R. V., Galbreath, E. J., Boden, G., Reddy, E. P., Barbacid, M.** 1999. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat. Genet.* **22**:44-52.
- Rossi, J., Luukko, K., Poteryaev, D., Laurikainen, A., Sun, Y. F., Laakso, T., Eerikainen, S., Tuominen, R., Lakso, M., Rauvala, H. et al.** 1999. Retarded growth and deficits in the enteric and parasympathetic nervous system in mice lacking GFR alpha2, a functional neurturin receptor. *Neuron* **22**:243-252.

Saeger, W., Ludecke, D. K., Buchfelder, M., Fahlbusch, R., Quabbe, H. J., Petersenn, S. 2007. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the Germán Pituitary Tumor Registry. *Eur. J. Endocrinol.* **156**:203-216.

5 **Samper E. F. Goytisolo, P. Slijepcevic, P. van Buul, M. A. Blasco.** 2000. Mammalian Ku86 prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Rep.* **1**:244-252.

Suh H., Gage P. J., Druin J., Camper S. A. 2002. Pitx2 i required at multiple stages of pituitary organogenesis: Pituitary primordium formation and cell specification. *Development* **129**(2): 329-337.

10 **Urbano, A. G., Suarez-Penaranda, J. M., Dieguez, C., Alvarez, C. V.** 2000. GDNF and RET-gene expression in anterior pituitary-cell types. *Endocrinology* **141**:1893-1896.

Vankelecom, H. 2007. Stem cells in the postnatal pituitary? *Neuroendocrinology* **85**:110-130.

15 **Vankelecom, H.** 2007. Non-hormonal cell types in the pituitary candidating for stem cell. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**:559-570.

Widenfalk, J., Parvinen, M., Lindqvist, E., Olson, L. 2000. Neurturin, RET, GFRalpha-1 and GFRalpha-2, but not GFRalpha-3, mRNA are expressed in mice gonads. *Cell Tissue Res.* **299**:409-415.

20 **Wu, W., Cogan, J. D., Pfaffle, R. W., Dasen, J. S., Frisch, H., O'Connell, S. M., Flynn, S. E., Brown, M. R., Mullis, P. E., Parks, J. S. et al.** 1998. Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat. Genet.* **18**:147-149.

25 **Wunderle, V. M., Critcher, R., Hastie, N., Goodfellow, P. N., Schedl, A.** 1998. Deletion of long-range regulatory elements upstream of SOX9 causes campomelic dysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:10649-10654.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para el aislamiento de células hipofisarias multipotentes, que comprende las etapas de:

- 5 a) poner en contacto una muestra de células post-embriónicas dispersas de hipófisis con una composición que comprende un anticuerpo que reconoce el receptor GFRa2 (anticuerpo anti-GFRa2);
- 10 b) separar las células a las que se haya unido el anticuerpo que reconoce el receptor GFRa2 del resto de las células presentes en la muestra de partida.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la dispersión de las células presentes en la muestra de hipófisis de partida se lleva a cabo digiriendo dicha muestra con colagenasa.

15 3. Método según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo anti-GFRa2 se acopla a una sustancia o partícula que facilita la separación de las células a las que se haya unido dicho anticuerpo, bien porque la sustancia o partícula esté directamente unido al anticuerpo anti-GFRa2, o bien porque la sustancia o partícula esté unida a un anticuerpo secundario que reconozca el anticuerpo anti-GFRa2.

20 4. Método según la reivindicación 3, en el que la sustancia o partícula a la que se acopla el anticuerpo anti-GFRa2 se selecciona entre un compuesto fluorescente y una partícula magnética.

25 5. Método según la reivindicación 4, en el que la sustancia a la que se acopla el anticuerpo anti-GFRa2 es un compuesto fluorescente.

6. Método según la reivindicación 5, en el que la separación de las células a las que se ha unido el anticuerpo anti-GFRa2 se produce mediante separación de células activadas por fluorescencia (FACS).

30 7. Método según la reivindicación 4, en el que la sustancia a la que se acopla el anticuerpo anti-GFRa2 es una partícula magnética.

8. Método según la reivindicación 7, en el que la separación de las células a las que se ha unido el anticuerpo anti-GFRa2 se produce por medios magnéticos.

35 9. Método según la reivindicación 8, en el que la separación de las células a las que se ha unido el anticuerpo anti-GFRa2 se produce mediante la aplicación de la metodología de separación de células activadas por medios magnéticos (MACS).

40 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en el que la muestra que ha sido puesta en contacto con el anticuerpo anti-GFRa2 se pone en contacto, previamente a la etapa de separación de las células, con un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo anti-GFRa2 y que lleva una unida una sustancia o partícula que facilita la separación de las células.

45 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra de células de hipófisis dispersas se ha obtenido a partir de una muestra de tejido de hipófisis de un mamífero seleccionado entre ratón, rata y ser humano.

12. Método según la reivindicación 11, en el que el mamífero es un mamífero adulto.

50 13. Una célula multipotente no hormonal aislada, procedente de hipófisis post-embriónica, **caracterizada** por ser positiva para el receptor GFRa2.

14. Célula aislada según la reivindicación 13, que es positiva para los marcadores Oct4, Sox2 y Sox9.

55 15. Célula aislada según la reivindicación 13 ó 14, que es positiva para los marcadores b-catenina y E-cadherina.

16. Célula aislada según la reivindicación 15, que es positiva para los marcadores SSEA y Prop1.

60 17. Célula aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, que es negativa para los marcadores Sox4, Nanog y nestina.

18. Célula según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, que procede de la hipófisis de un mamífero seleccionado entre ratón, rata o ser humano.

65 19. Célula según la reivindicación 18, que procede de la hipófisis de un mamífero adulto.

ES 2 339 911 A1

20. Célula según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, que se ha aislado mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

21. Un método de identificación de células multipotentes hipofisarias en una muestra extraída de la hipófisis de un mamífero que comprende poner en contacto dicha muestra de hipófisis con una composición que comprende un anticuerpo primario que reconoce el receptor GFRA2 (anticuerpo anti-GFRA2), anticuerpo que se acopla a una sustancia que permite su detección.

22. Método de identificación de células según la reivindicación 21, en el que la muestra se pone opcionalmente en contacto con un segundo anticuerpo primario que reconoce un marcador seleccionado entre b-catenina, E-cadherina, Sox2, Sox9, Oct4 y Prop1, segundo anticuerpo que se acopla a una sustancia que permite su detección y que es diferente de la sustancia que se acopla al anticuerpo anti-GFRA2.

23. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22, en el que la sustancia que permite la detección del anticuerpo que reconoce un marcador está unida directamente al anticuerpo.

24. Método según la reivindicación 21 ó 22, en el que la sustancia que permite la detección del anticuerpo que reconoce un marcador está a un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario.

25. Método según la reivindicación 24, en el que la muestra puesta en contacto con el anticuerpo anti-GFRA2 y, opcionalmente, con un anticuerpo que reconoce un marcador seleccionado entre b-catenina, E-cadherina, Sox2, Sox9 y Oct4, se pone en contacto con al menos un anticuerpo secundario que reconozca ese anticuerpo primario por cada uno de los anticuerpos primarios que reconozcan GFRA2, b-catenina, E-cadherina, Sox2, Sox9 u Oct4 que se hayan puesto en contacto con la muestra extraída de la hipófisis, estando cada anticuerpo secundario unido a una sustancia que permita su detección y siendo diferentes entre sí cada una de las sustancias unidas a un anticuerpo secundario diferente.

26. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, en el que la sustancia que permite la detección del anticuerpo se selecciona entre un fluoróforo y una enzima que cataliza la conversión de un compuesto en un compuesto coloreado.

27. Método según la reivindicación 26, en el que la sustancia que permite la detección del anticuerpo es un fluoróforo se selecciona entre Cy3, Cy5, Alexa Fluor 488 o FITC.

28. Método según la reivindicación 28, en el que la sustancia que permite la detección del anticuerpo es una enzima que se selecciona entre fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano.

29. Método para la expansión *in vitro* de una célula aislada por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o de una célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, que comprende cultivar dichas células de manera que cumpla al menos una de las siguientes condiciones:

- a) en medio libre de suero;
- b) en un recipiente de cultivo recubierto de gelatina, utilizando un medio de cultivo que contiene medio aspirado de un cultivo de fibroblastos embrionarios;
- c) sobre células de soporte inactivadas para que no proliferen.

30. Método según la reivindicación 29, en el que la expansión se produce en un medio libre de suero es medio DMEM/F12 1:1 que comprende un suplemento diseñado para permitir el crecimiento de células nerviosas diferenciadas o células progenitoras de células nerviosas en ausencia de suero y de células de soporte inactivadas y/o con un suplemento diseñado para permitir el crecimiento de neuronas embrionarias o células embrionarias progenitoras de neuronas de sistema nerviosos central.

31. Método según la reivindicación 30, en el que el medio libre de suero es medio DMEM/F12 1:1 que comprende:

- Suplemento B27 1x
- Suplemento N2 1x
- al menos un antibiótico.

32. Método según la reivindicación 29, en el que la expansión se produce en un recipiente de cultivo recubierto de gelatina, en un medio de cultivo que contiene medio aspirado de un cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) mantenidos durante 6 días en DMEM que contenía suero bovino fetal al 20%, aminoácidos no esenciales al 1%, glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM y al menos un antibiótico.

ES 2 339 911 A1

33. Método según la reivindicación 32, en el que el medio de cultivo es una mezcla 1:1 (vol/vol) de medio StemM y medio acondicionado en MEF, cada uno de los cuales consiste en lo siguiente:

5 a) Medio StemM:

- aminoácidos no esenciales al 1%,
- glutamina 2 mM,
- 10 - β -mercaptoetanol 0,1 mM
- medio de sustitución de suero Knockout™ (KO) al 20%,
- medio KO-DMEM al 80%, suplementado con al menos un antibiótico;

15 b) Medio acondicionado en MEF:

20 medio aspirado y filtrado de un cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) mantenidos durante 6 días en DMEM que contenía suero bovino fetal al 20%, aminoácidos no esenciales al 1%, glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM y al menos un antibiótico.

34. Método según la reivindicación 33, en el que el medio de cultivo contiene adicionalmente ESGRO®.

25 35. Método según la reivindicación 29, en el que la expansión de las células se produce sobre células de soporte inactivadas para que no proliferen.

30 36. Método según la reivindicación 35, en el que las células de soporte inactivadas son fibroblastos embrionarios inactivados con mitomicina.

37. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 36, que comprende una etapa de diferenciación de las células en cultivo.

35 38. Método según la reivindicación 37, en el que las células en cultivo se siembran sobre una matriz polimérica y se cultivan en un medio que contiene suero.

39. Método según la reivindicación 38, en el que las células en cultivo se siembran sobre colágeno tipo IV.

40 40. Método según la reivindicación 39, en el que las células en cultivo se mantienen al menos durante al menos un día en el medio que contiene suero.

41. Método según la reivindicación 39 ó 40, en el que el medio que contiene suero se sustituye por un medio de diferenciación que es una mezcla 1:1 (vol/vol) de medio SSM y medio acondicionado en la línea celular de hipótesis de rata GH4C1, suplementado con al menos un antibiótico, donde:

- 45 a) el medio SSM es una mezcla de medio DMEM/F12 de Ham 6,5:3,5 (vol/vol), suplementada con: (por litro) BSA (2 g), HEPES (2,38 g), hidrocortisona (143 μ g), T3 (0,4 μ g), transferrina (10 mg), glucagón (10 ng), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (0,1 μ g), y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (0,2 μ g);
- 50 b) el medio acondicionado en la línea celular GH4C1 (ATCC N° CCL-82.2) es el medio aspirado y filtrado de un cultivo de la línea celular GH4C1 mantenido durante 6 días en DMEM + FCS al 10%.

55 42. Método según la reivindicación 39 ó 40, en el que el medio que contiene suero se sustituye por un medio de diferenciación que es una mezcla 1:1 (vol/vol) de una mezcla DMEM/F12 de Ham 1:1 (vol/vol) y medio acondicionado en la línea celular de hipótesis de rata GH4C1, suplementado con al menos un antibiótico.

60 43. Método según la reivindicación 39 ó 40, en el que el medio que contiene suero se sustituye por un medio de diferenciación compuesto por SSM, suero bovino fetal (FBS) al 1% y suplemento N2 1x, suplementado con al menos un antibiótico.

65 44. Método según la reivindicación 39 ó 40, en el que el medio que contiene suero se sustituye por un medio de diferenciación que contiene suplemento B27 1x, FGF 0,5 ng/ml, GHRH 10⁻⁹ M, Ghrelina 10⁻⁹ M, somatostatina 10⁻⁹ M, hidrocortisona 10⁻⁹ M, 5 μ g/ml transferrina, 10 μ g/ml de insulina en DMEM/F12 de Ham 1:1 (vol/vol), suplementado con al menos un antibiótico.

ES 2 339 911 A1

45. Método según la reivindicación 39 ó 40, en el que el medio que contiene suero se sustituye por un medio de diferenciación que es una mezcla 1:1 de medio SSM y medio acondicionado en la línea celular de hipófisis de rata GH3, suplementado con al menos un antibiótico, donde:

- 5 a) el medio SSM es una mezcla de medio DMEM/F12 de Ham 6,5:3,5 (vol/vol), suplementada con: (por litro) BSA (2 g), HEPES (2,38 g), hidrocortisona (143 μ g), T3 (0,4 μ g), transferrina (10 mg), glucagón (10 ng), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (0,1 μ g), y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (0,2 μ g);
- 10 b) el medio acondicionado en la línea celular GH3 (ATCC N° CCL-82.1) es el medio aspirado y filtrado de un cultivo de la línea celular GH3 mantenido durante 6 días en DMEM + FCS al 2,5% + suero de caballo al 15%.

15 46. Método según la reivindicación 38, en el que las células en cultivo se siembran sobre poli-L-lisina.

47. Método según la reivindicación 46, en el que las células en cultivo se mantienen al menos un día en el medio que contiene suero.

20 48. Método según la reivindicación 46 ó 47, en el que el medio que contiene suero se sustituye por un medio de diferenciación que contiene suplemento B27 1x, FGF 0,5 ng/ml, GHRH 10-9 M, Ghrelina 10-9 M, somatostatina 10-9 M, hidrocortisona 10-9 M, 5 μ g/ml transferrina, 10 μ g/ml de insulina en DMEM/F12 de Ham 1:1 (vol/vol), suplementado con al menos un antibiótico.

25 49. Método según la reivindicación 38, en el que el cultivo de las células previo a su diferenciación se produce por un método según una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 31.

50. Método según la reivindicación 49, en el que las células se mantienen en cultivo durante al menos 3 días previamente a su diferenciación, hasta obtener esferoides.

30 51. Método según la reivindicación 48, en el que las células se mantienen en cultivo durante al menos 5 a 7 días previamente a su diferenciación, hasta obtener esferoides.

52. Método según la reivindicación 50 ó 51, en el que las células en cultivo que se siembran sobre una matriz polimérica para su diferenciación están en forma de esferoides.

35 53. Método según la reivindicación 52, en el que los esferoides sembrados sobre la matriz polimérica se mantienen durante al menos un día en una mezcla 1:1 (vol/vol) de DMEM y F12 que comprende adicionalmente Suplemento B27 1x, Suplemento N2 1x y FCS al 10%, suplementado con al menos un antibiótico.

40 54. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 41, en el que el antibiótico con el que se suplementan los medios de cultivo se selecciona entre penicilina, estreptomina, anfotericina B o mezclas de los mismos.

45 55. Método según la reivindicación 54, en el que el antibiótico es una mezcla de penicilina (100 UI/ml) y estreptomina (100 mg/ml).

56. Método según la reivindicación 54, en el que el antibiótico es una mezcla de penicilina (100 UI/ml), estreptomina (100 μ g/ml) y anfotericina B (2,5 μ g/ml).

50 57. Una población de células aisladas derivadas de la hipófisis que comprende células seleccionadas del grupo de las células aisladas por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, células aisladas de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19 y células obtenidas por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 56, o combinaciones de las mismas.

55 58. Uso de una célula aislada por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, de una célula aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, de una célula obtenida por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 56, o de una población de células de la reivindicación 57, para la producción de al menos una hormona que se selecciona entre hormona del crecimiento (GH), prolactina (PRL), hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante del folículo (FSH).

60 59. Uso según la reivindicación 58, en el que las células se utilizan para la producción de hormona del crecimiento (GH) y las células se diferencian por el método de la reivindicación 42.

65 60. Uso según la reivindicación 58, en el que las células se utilizan para la producción de prolactina (PRL) y las células se diferencian por el método de la reivindicación 43.

61. Uso según la reivindicación 58, en el que las células se utilizan para la producción de hormona estimulante de la tiroides (TSH) y las células se diferencian por el método de la reivindicación 44 o por el método de la reivindicación 48.

ES 2 339 911 A1

62. Uso según la reivindicación 58, en el que las células se utilizan para la producción de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y las células se diferencian por el método de la reivindicación 41.

5 63. Uso según la reivindicación 58, en el que las células se utilizan para la producción de hormona estimulante del folículo (FSH) y las células se diferencian por el método de la reivindicación 45.

10 64. Uso de una célula seleccionada del grupo de las células aisladas por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, las células aisladas de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19 y las células obtenidas por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 56, o de una población de células de la reivindicación 57, para el estudio de un trastorno de la hipófisis seleccionado entre el hipopituitarismo o el quiste de la hendidura de Rathke.

15 65. Uso de una célula seleccionada del grupo de las células aisladas por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, las células aisladas de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19 y las células obtenidas por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 56, o de una población de células de la reivindicación 57, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno de la hipófisis seleccionado entre el hipopituitarismo o el quiste de la hendidura de Rathke.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

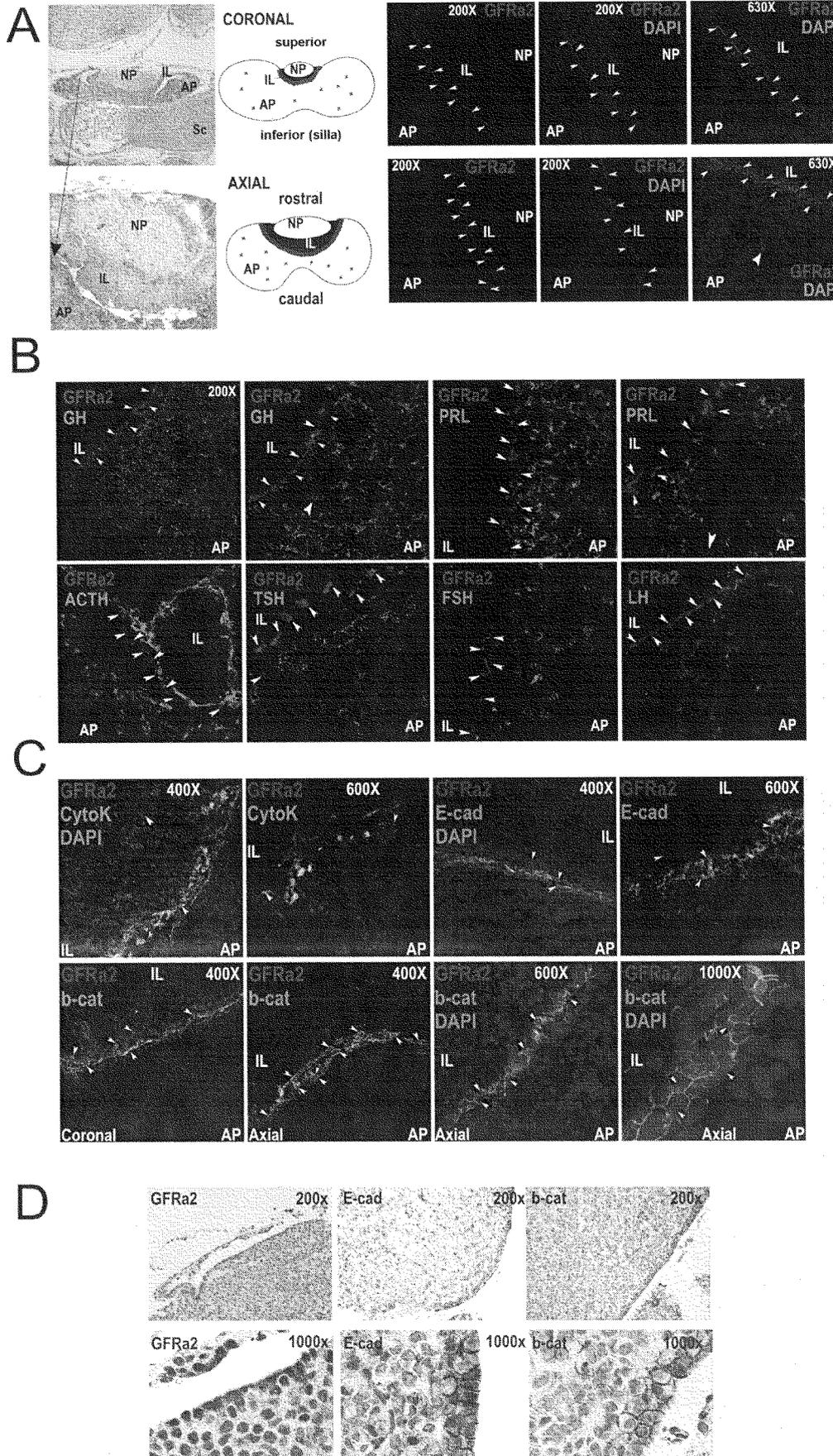
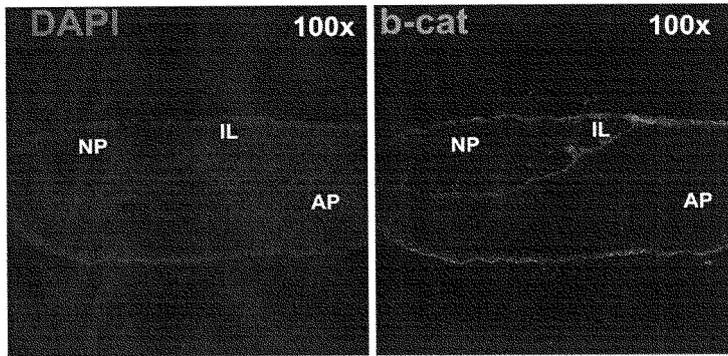
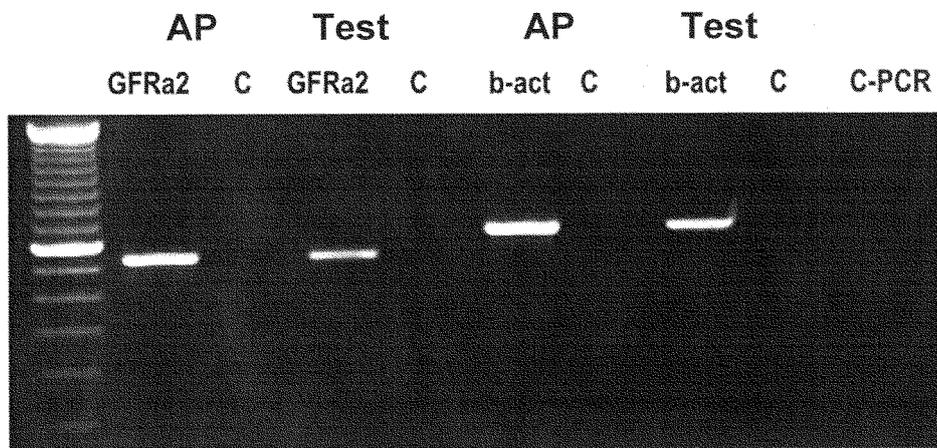


Fig. 1

A



B



C

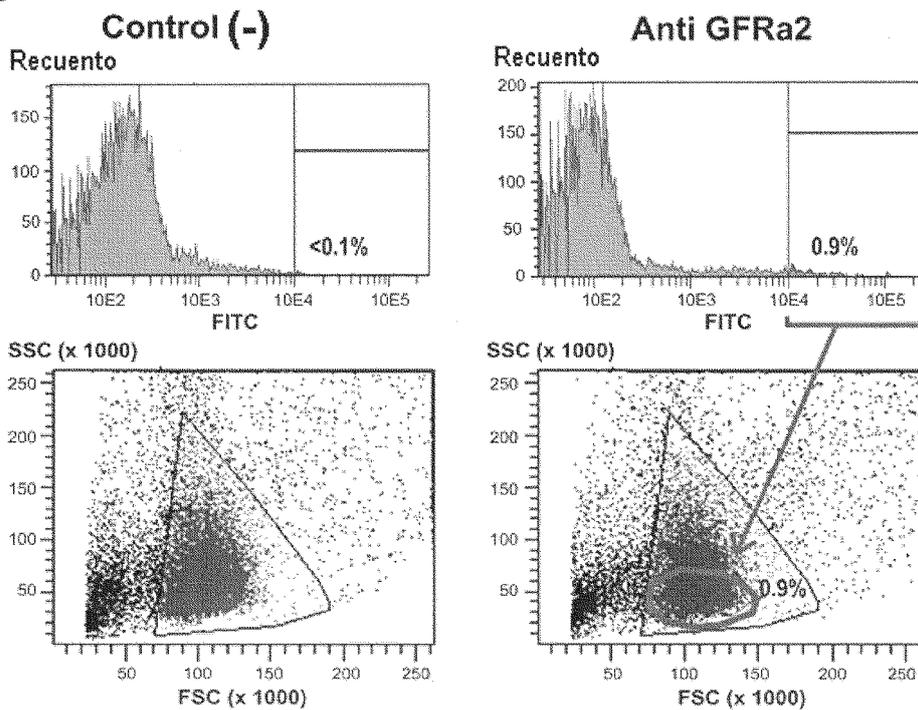


Fig. 2

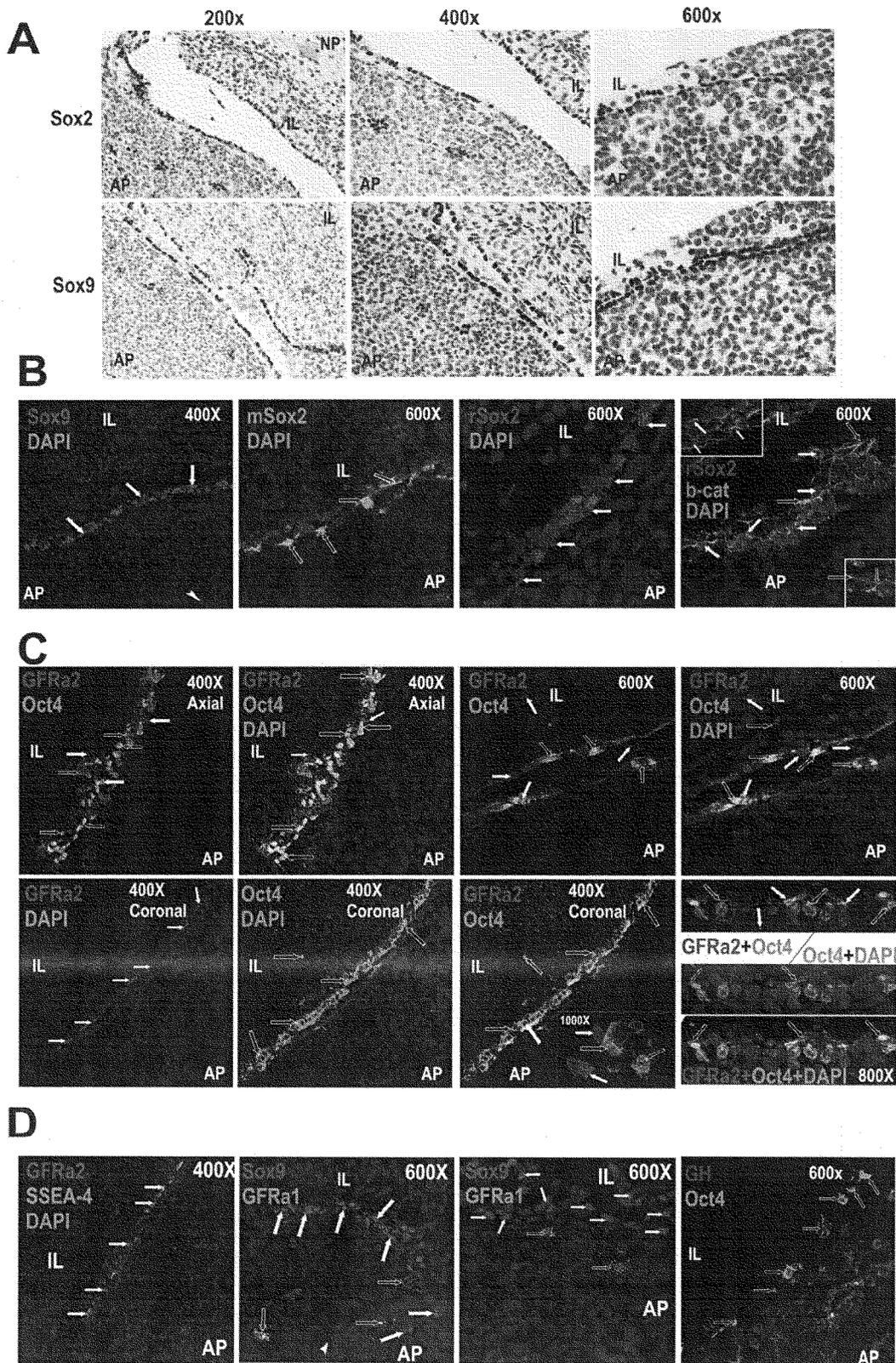


Fig. 3

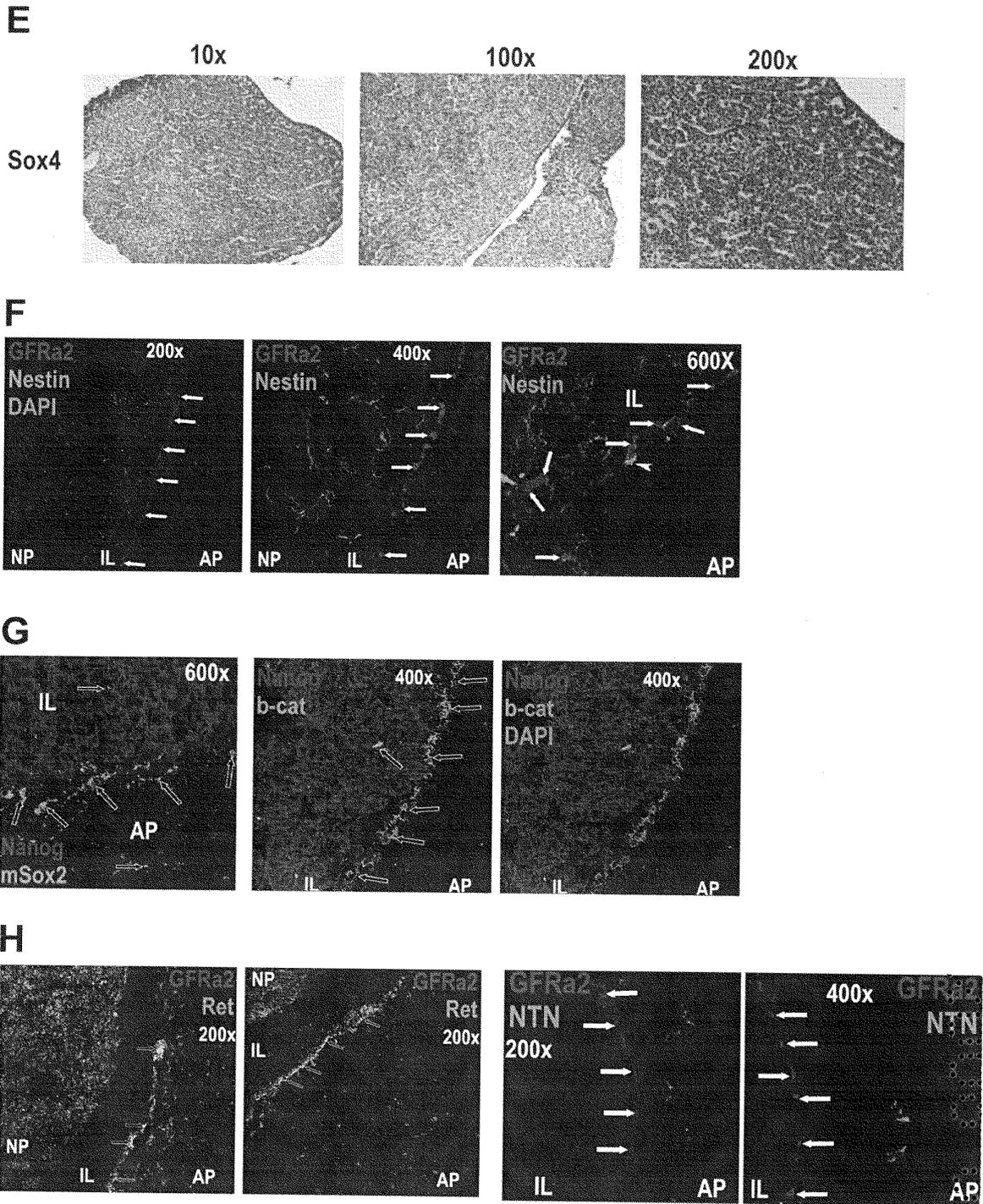


Fig. 3 (cont.)

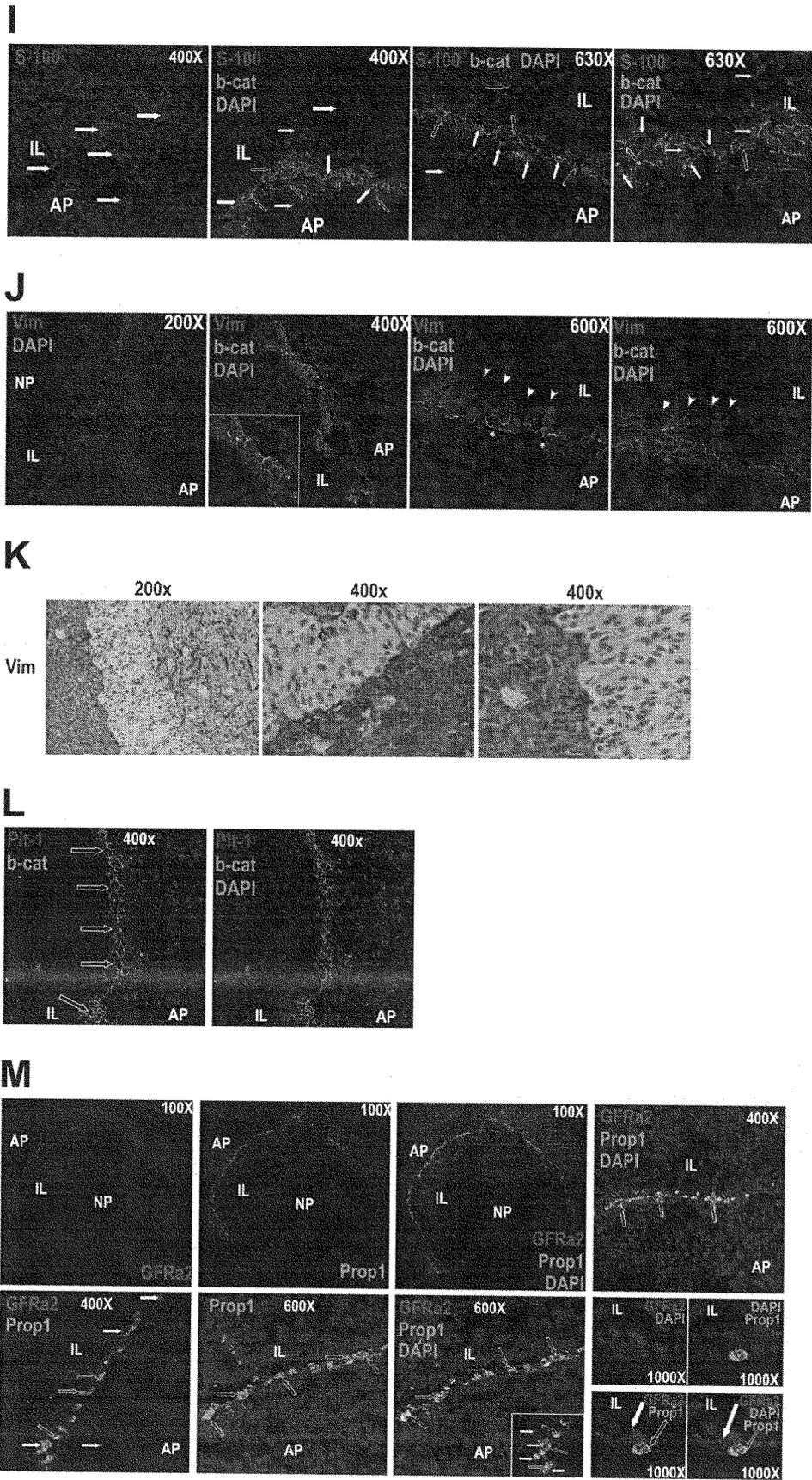


Fig. 3 (cont.)

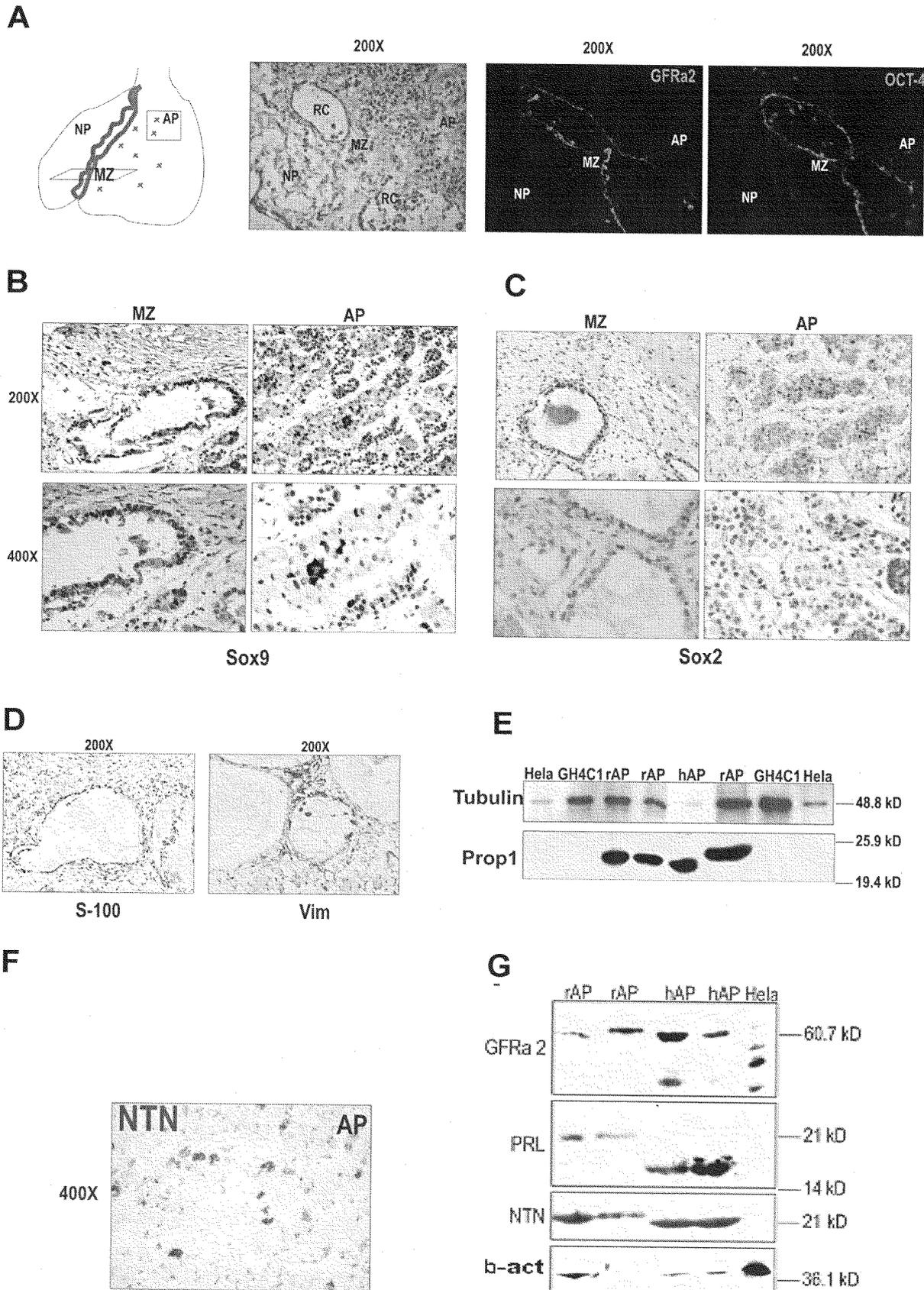


Fig. 4

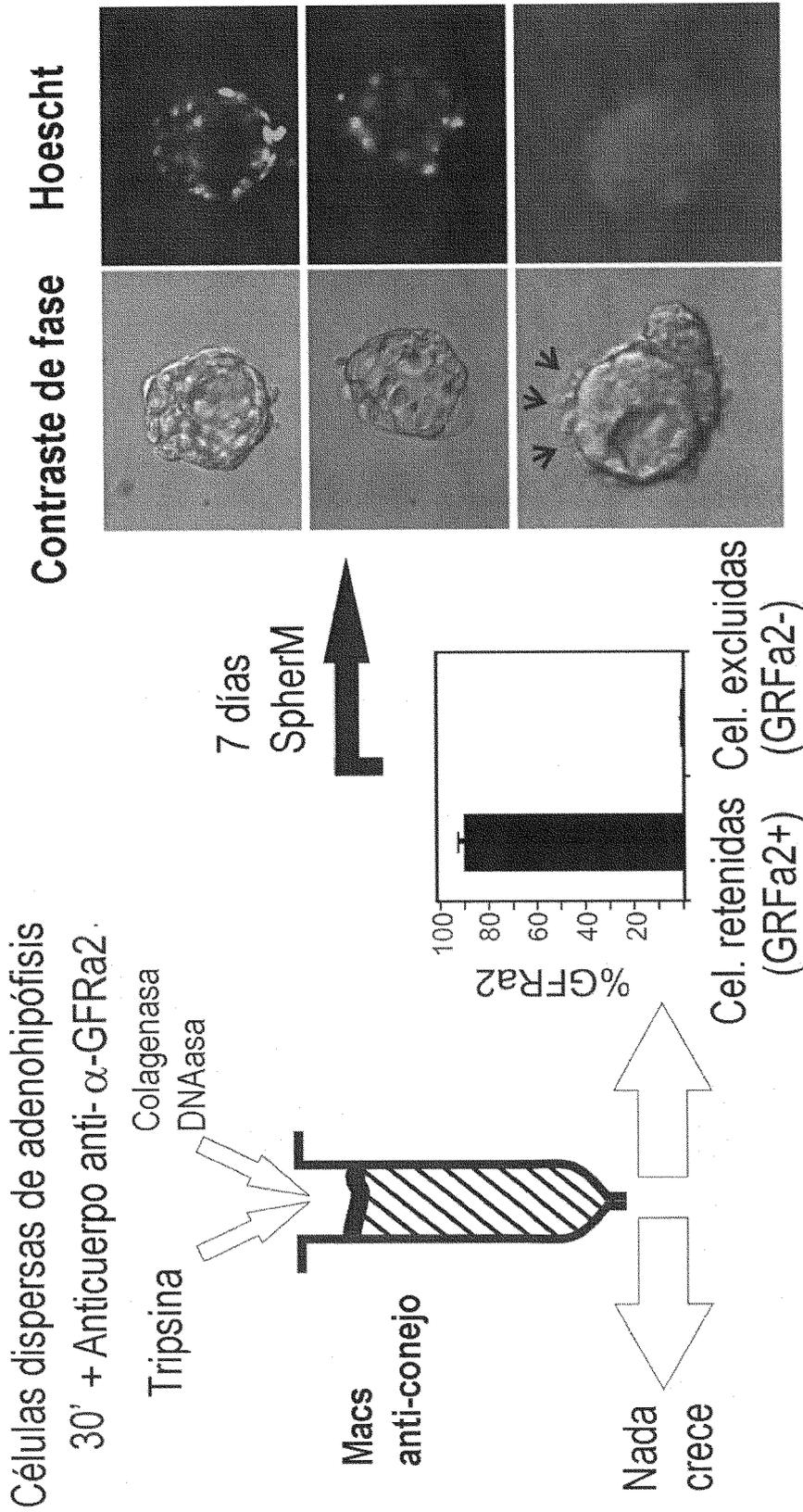
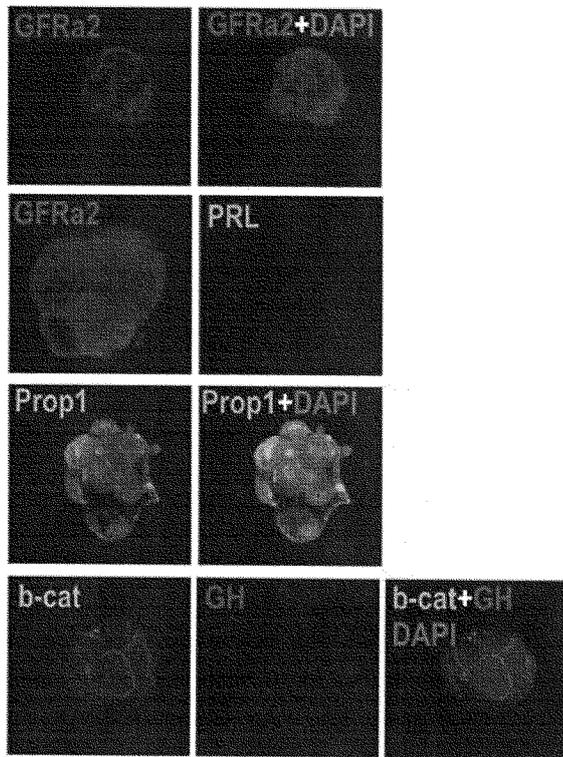
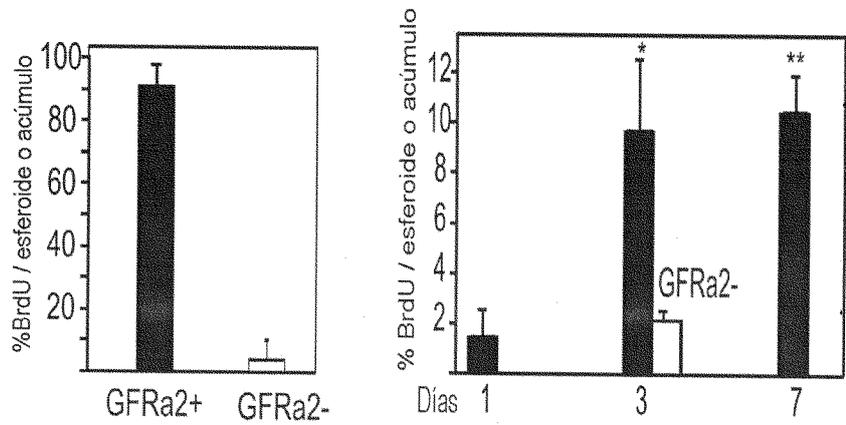


Fig. 5

A



B



C

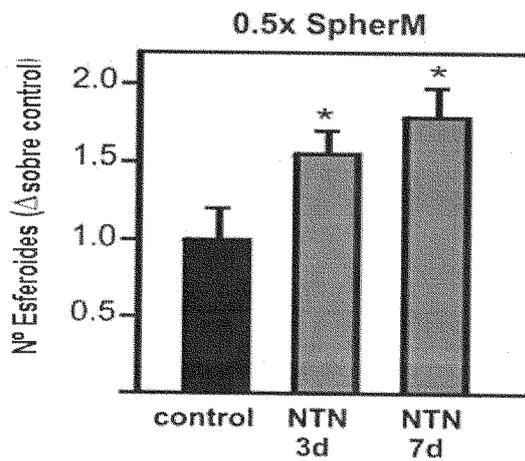


Fig. 6

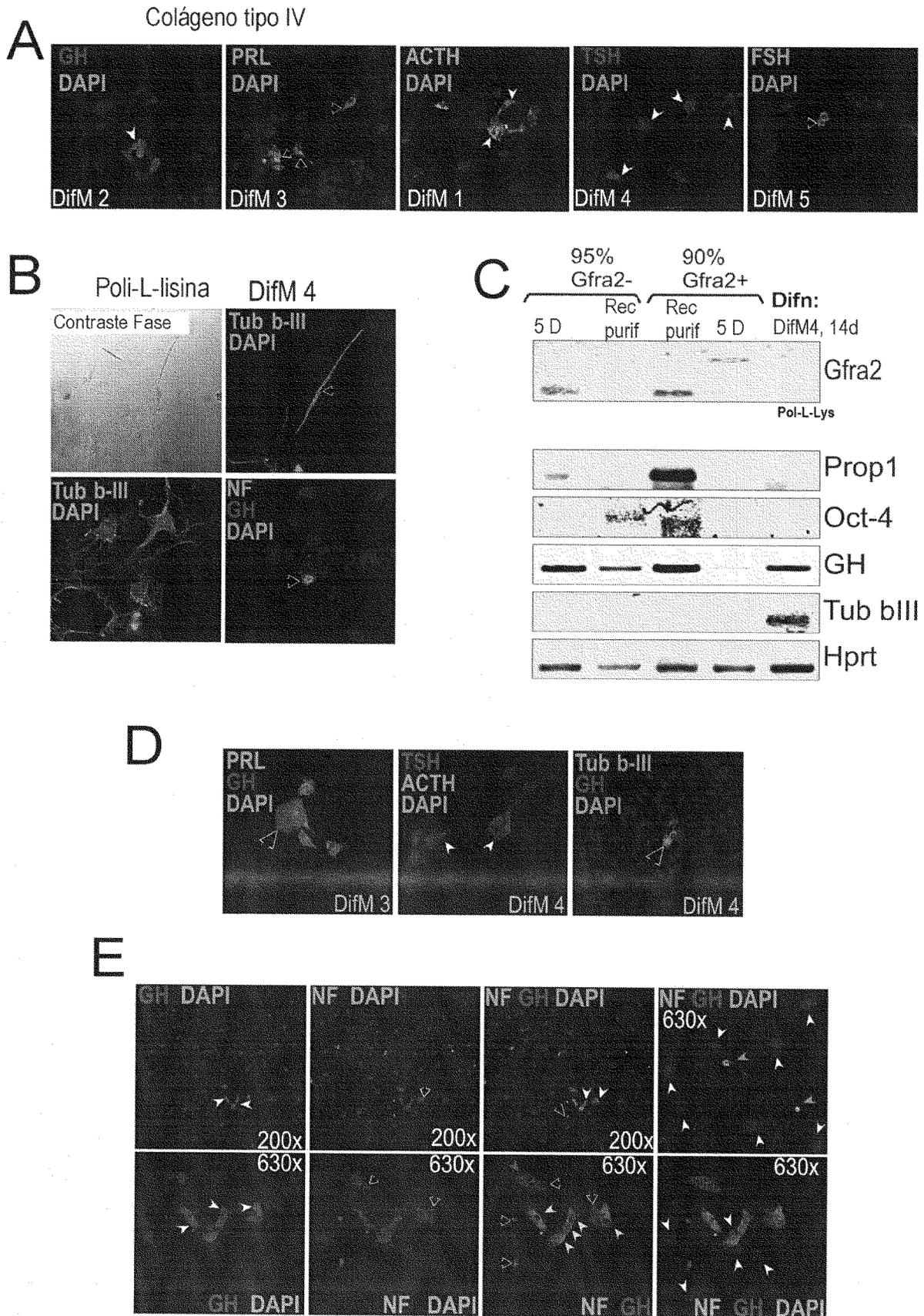


Fig. 7

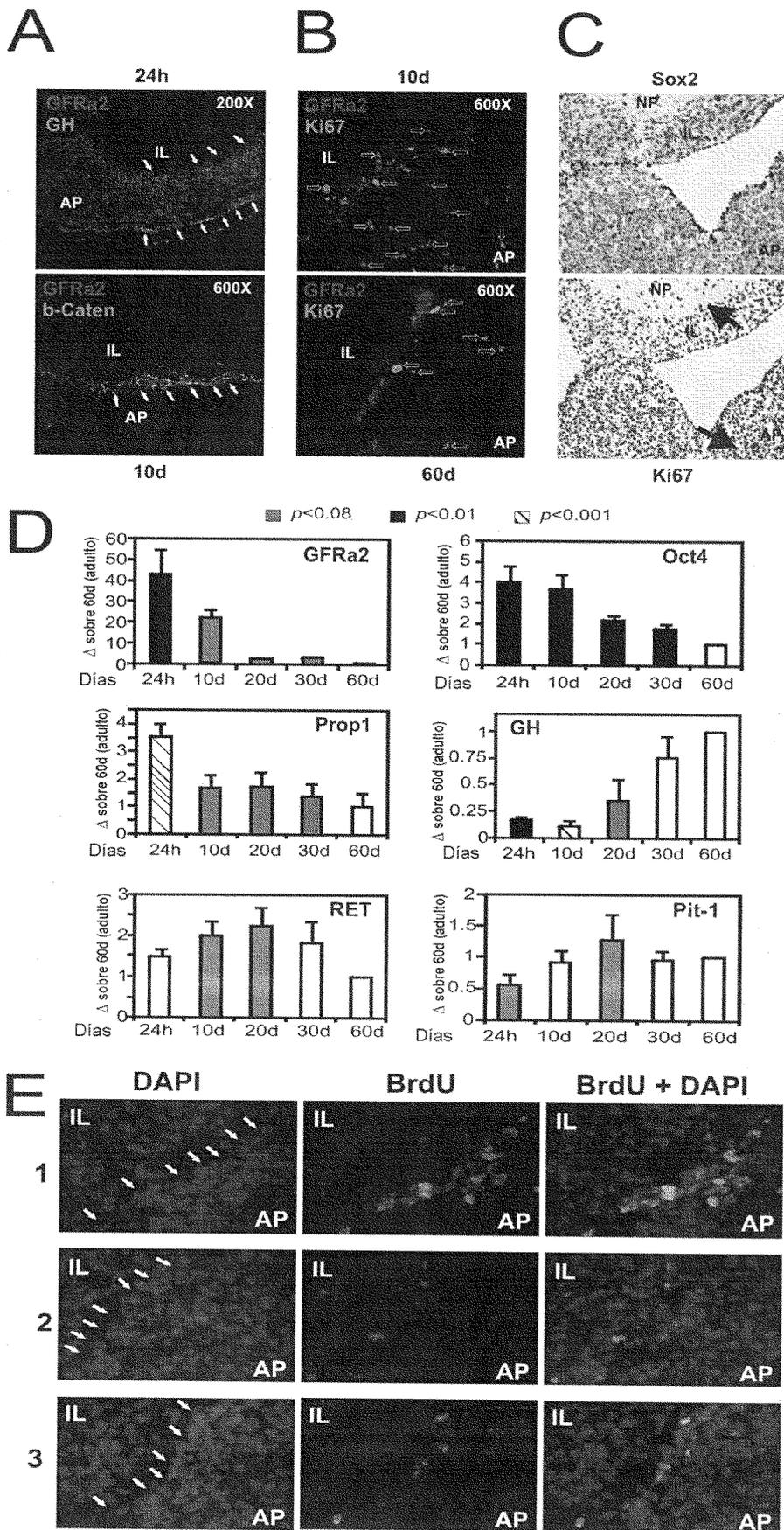


Fig. 8

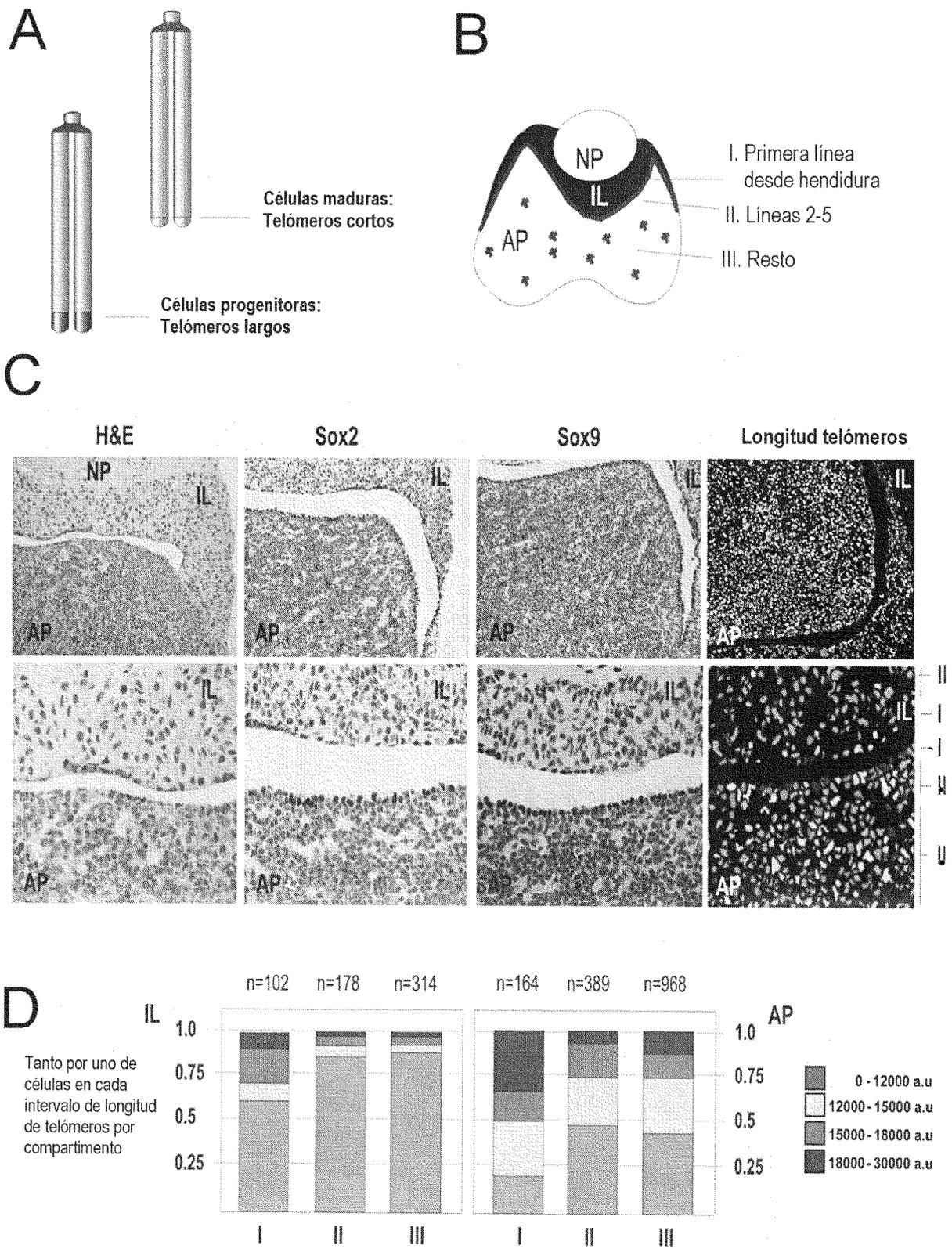


Fig. 9

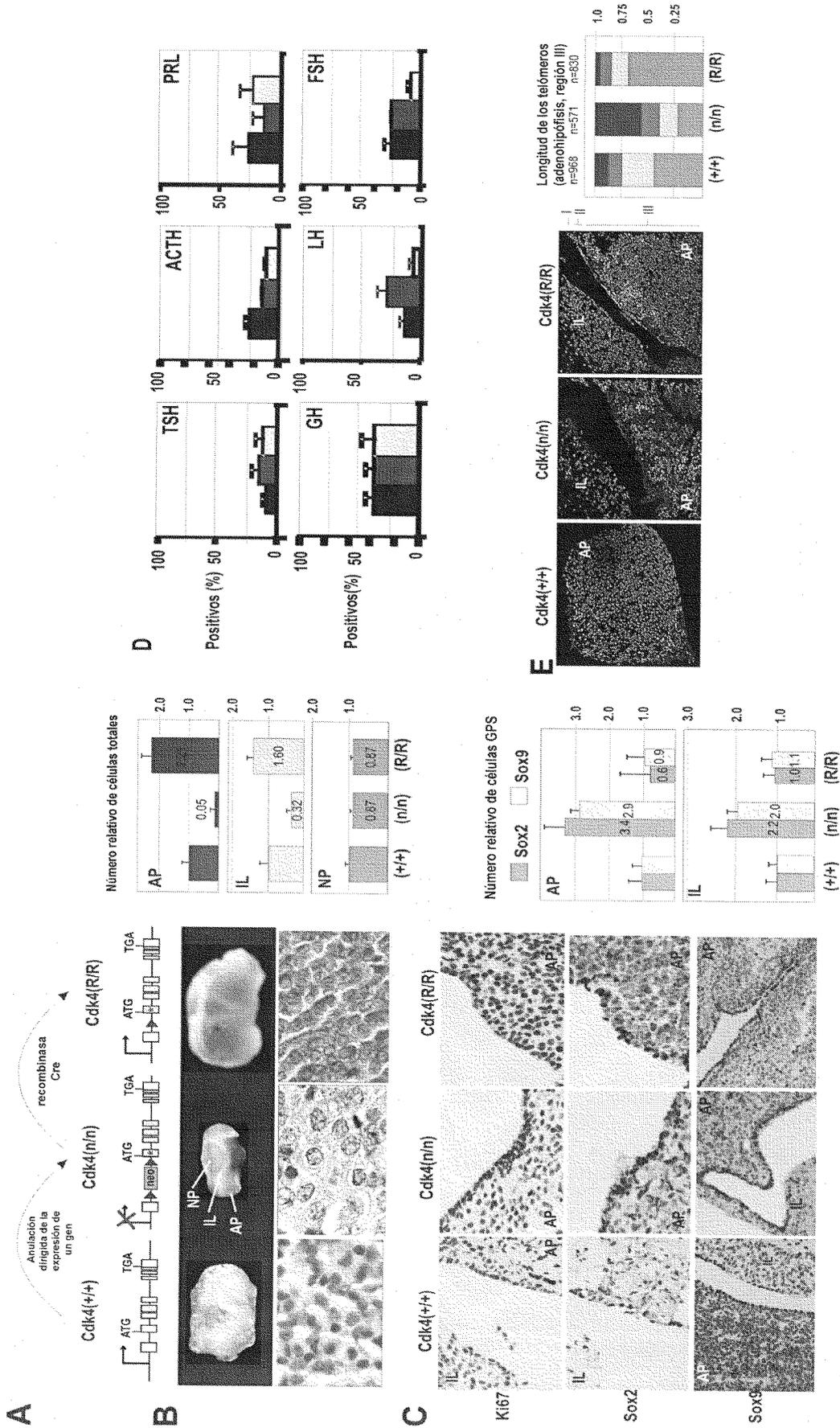


Fig. 10

ES 2 339 911 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Universidade de Santiago de Compostela;
Fundación Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas Carlos III
- <120> AISLAMIENTO DE CÉLULAS HIPOFISARIAS MULTIPOTENTES Y DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE LAS MISMAS
- 10 <130> P-100752
- <160> 14
- 15 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 20
- 20 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> Cebador directo para amplificar un fragmento del RNA del gen GFRA2
- <400> 1
- 30 ttcaggctcg ctcaatctt 20
- <210> 2
- <211> 20
- 35 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 40 <223> Cebador inverso para amplificar un fragmento del RNA del gen GFRA2
- <400> 2
- 45 aactgcaaga agcttcgctc 20
- <210> 3
- <211> 22
- 50 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 55 <223> Cebador directo para amplificar un fragmento del RNA del gen Oct4
- <400> 3
- 60 caagttggcg tggagactct gc 22
- <210> 4
- <211> 21
- 65 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial

ES 2 339 911 A1

	<220>		
	<223> Cebador inverso para amplificar un fragmento del RNA del gen Oct4		
5	<400> 4		
	agacaaccat ctgccgcttc g		21
10	<210> 5		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador directo para amplificar un fragmento del RNA del gen Prop1		
20	<400> 5		
	gacagctgga gtcagccttt		20
25	<210> 6		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador inverso para amplificar un fragmento del RNA del gen Prop1		
35	<400> 6		
	gcaagagcgg tcactactcc		20
40	<210> 7		
	<211> 22		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador directo para la amplificación de un fragmento del RNA de la hormona del crecimiento (GH)		
50	<400> 7		
	gcagagaact gacatggaat tg		22
55	<210> 8		
	<211> 19		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Cebador inverso para la amplificación de un fragmento del RNA de la hormona del crecimiento (GH)		
65	<400> 8		
	gatgacgctc tgctcaaaa		19

ES 2 339 911 A1

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar un fragmento del RNA del gen Ret
10
<400> 9
 cggcacacct ctgctcatat g 21

15
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar un fragmento del RNA del gen Ret
25
<400> 10
 ctggaggaag acggtgagca 20

30
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo para amplificar un fragmento del RNA del gen Pit1
40
<400> 11
 ttccagacca caccctgagt 20

45
<210> 12
<211> 20
<212> DNA
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar un fragmento del RNA del gen Pit1
55
<400> 12
 actttccgc ctgagttcct 20

60
<210> 13
<211> 18
<212> DNA
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 339 911 A1

<220>
<223> Cebador directo para amplificar un fragmento del RNA del gen Hprt

5 <400> 13
cagtcccagc gtegtatt 18

10 <210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador inverso para amplificar un fragmento del RNA del gen Hprt

20 <400> 14
agcaagtctt tcagtcctgt c 21

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 339 911

② Nº de solicitud: 200803351

③ Fecha de presentación de la solicitud: 25.11.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GLEIBERMAN, A.S., et al. Genetic approaches identify adult pituitary stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 29.04.2008. Vol. 105, nº 17, páginas 6332-6337. ISSN 1091-6490 (Electronic). Todo el documento.	1-65
A	WO 2008024832 A2 (CEDARS SINAI MEDICAL CENTER) 28.02.2008, todo el documento.	1-65
A	FAUQUIER, T., et al. SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 26.02.2008. Vol. 105, nº 8, páginas 2907-2912. ISSN 1091-6490 (Electronic). Todo el documento.	1-65

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

11.02.2010

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 5/074 (2010.01)

A61K 35/55 (2006.01)

A61P 5/06 (2006.01)

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

C12N, A61K , A61P

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

EPODOC, WPI, TXTE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.02.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-65	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-65	SÍ
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Gleiberman, A.S., et al.	29-04-2008
D02	WO 2008/024832 A2	28-02-2008
D03	FAUQUIER, T., et al.	26-02-2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe y reivindica un método de aislamiento de células hipofisarias multipotentes positivas para el receptor GFRa2 empleando anticuerpos específicos que reconocen dicho receptor. Reivindica también las células aisladas con este procedimiento, así como el método de identificación de las mismas en muestras de adenohipófisis, y los métodos de expansión in vitro de las células aisladas y de su diferenciación a células productoras de hormonas hipofisarias y a células con fenotipo de neuronas. Por último, la solicitud reivindica el uso de las células de la invención para producir hormonas hipofisarias, para el estudio de trastornos de la hipófisis (como el hipopituitarismo o el quiste de la hendidura de Rathke), y para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de estos trastornos.

No se ha encontrado ningún documento del estado de la técnica que divulgue la existencia en la adenohipófisis de células multipotentes positivas para el receptor GFRa2, por lo que la invención se considera nueva y con actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes.

A continuación se resumen algunos documentos del estado de la técnica que se refieren al aislamiento o estudio de células madre de la hipófisis.

El documento D01 es un estudio sobre la presencia de células madre adultas en muestras hipofisarias de ratón. Como en la solicitud, desarrollan un método (diferente al de la solicitud) para el aislamiento y cultivo de estas células a partir de adenohipófisis de organismos adultos, y consiguen diferenciarlas a células productoras de hormonas. Sin embargo, en D01 no se hace referencia al receptor GFRa2, y, además, las células identificadas en este documento expresan el marcador nestina, a diferencia de las células de la solicitud, que son negativas para ese marcador, lo que indica que se trataría de linajes celulares diferentes, por lo que este documento no afecta la novedad ni la actividad inventiva de la presente solicitud.

El documento D02 también divulga el aislamiento de células madre hipofisarias, y su uso para la producción de hormonas y para la identificación de fármacos útiles para el tratamiento de trastornos de la hipófisis. Tampoco este documento afecta las condiciones de patentabilidad de la solicitud, ya que en D02 las células se aíslan de muestras de adenoma o carcinoma pituitario, y, además, los marcadores que caracterizan las células aisladas son diferentes a los de las células reivindicadas en la solicitud.

En el documento D03 encontramos nuevamente un método para el aislamiento de células progenitoras multipotentes a partir de hipófisis de ratones adultos, que, como en la solicitud, son capaces de diferenciarse a células productoras de hormonas. Aunque uno de los marcadores estudiados (Sox2) se expresa tanto en las células aisladas en este documento como en las de la solicitud, los demás marcadores estudiados no coinciden en los dos estudios (por ejemplo, las células de D03 son negativas para Sox9, y las de la solicitud sí lo expresan, y en D03 no se incluye el marcador GFRa2). Por tanto, este documento no anticiparía la solicitud, y ésta se considera nueva e inventiva.