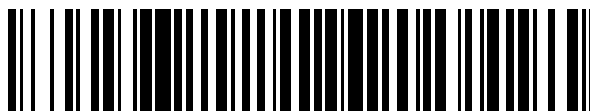


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 419 232**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

A61L 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2007** **E 07768103 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013** **EP 2034011**

54 Título: **Agregado de células que comprende diversas clases de células derivadas del soma con capacidad para formar una estructura de tipo órgano primitivo**

30 Prioridad:

27.06.2006 JP 2006176763

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

20.08.2013

73 Titular/es:

SHISEIDO COMPANY, LIMITED (100.0%)
5-5, Ginza 7-chome Chuo-ku
Tokyo 104-8010 , JP

72 Inventor/es:

FUJIWARA, SHIGEYOSHI;
KISHIMOTO, JIRO y
SOMA, TSUTOMU

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 419 232 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agregado de células que comprende diversas clases de células derivadas del soma con capacidad para formar una estructura de tipo órgano primitivo

Campo Técnico

- 5 La presente invención se refiere a un método para producir una masa celular capaz de servir como estructura de tipo órgano primitivo formada por diversos tipos de células de origen somático.

Técnica Anterior

- 10 Gracias a los notables avances que se han hecho en el campo de la medicina en los últimos años, las oportunidades de salvar vidas han seguido aumentando eliminando las causas de las enfermedades mediante, por ejemplo, las técnicas terapéuticas sistemáticas en forma de la extirpación quirúrgica del cáncer o las técnicas de trasplante de donantes vivos para tejidos y órganos. Sin embargo, hay casos en los que los pacientes sufren una considerable disminución en la QOL (Quality Of Life: calidad de vida) que acompaña a la escisión del área afectada. Además, existen limitaciones en el tratamiento que dependen de trasplantes de donantes vivos debido a factores tales como la escasez de donantes para trasplante y la aparición de rechazo. Si fuera posible regenerar un tejido o un órgano
- 15 que se ha perdido debido a un tratamiento quirúrgico o a un accidente imprevisto, entonces sería posible mejorar considerablemente la calidad de vida de los pacientes. Además, la medicina regenerativa hace posible también resolver los problemas que afrontan los trasplantes de donantes vivos. Desde este punto de vista, el grado de las expectativas puestas en la medicina regenerativa es elevado.

- 20 Las tecnologías en las que la medicina regenerativa ha obtenido éxito están relacionadas principalmente con tejido comparativamente simple en términos de morfología o función a la manera de la piel artificial, hueso artificial y dientes artificiales. La piel artificial y el hueso artificial reconstruidos se incorporan en células que permiten que se proporcionen las señales que se requieren para la construcción de tejidos. Sin embargo, ha habido limitaciones en el repertorio de la diferenciación de la piel artificial y hueso artificial por técnicas de medicina regenerativa. Por ejemplo, aunque los queratinocitos alogénicos o fibroblastos de la piel y similares se diferencian en estructuras en forma de
- 25 epidermis, son incorporados por los órganos circundantes para tener eventualmente una capa córnea o capa basal que tiene propiedades de barrera, se ha publicado que no hay derivación de derivados secundarios tales como folículos pilosos, glándulas sebáceas o glándulas sudoríparas.

- 30 El tejido corporal contiene normalmente tanto células que son capaces de auto-replicarse y que tienen propiedades de células madre para mantener la homeostasis del tejido enviando señales a las células diferenciadas o suministrar células diferenciadas, como células que tienen propiedades de células somáticas que ya se han diferenciado que reciben diferentes señales u órdenes a partir de tales células, y es capaz de funcionar a través de la interacción entre ambos tipos de células. En el caso de los vertebrados, por ejemplo, la interacción entre las células mesenquimales y las células epiteliales es esencial para la formación de casi todos los tejidos y órganos. En el caso de los folículos pilosos, las células mesenquimales en forma de células de la papila capilar son responsables de las
- 35 propiedades del tipo de las de las células madre, mientras que las células epiteliales en forma de queratinocitos son equivalentes a las células que tienen propiedades similares a las de las células somáticas en el sentido de que se diferencian en cabellos (el propio pelo).

- 40 La dificultad que se encuentra cuando se forman órganos mediante la medicina regenerativa estriba en alcanzar un estado de coexistencia entre las células que tienen propiedades similares a las de las células madre mantenidas en un estado no diferenciado y las células que ya se han diferenciado como en el tejido corporal real. En la técnica anterior, incluso si las células epiteliales y las células mesenquimales pudieron ser cultivadas en común, o terminaron la diferenciación o bien ambas mantuvieron un estado no diferenciado, evitando de esta manera la reproducción de la coexistencia de células no diferenciadas y células diferenciadas para imitar tejido corporal real.

Descripción De La Invención

- 45 Un objeto de la presente invención es proporcionar una masa celular capaz de servir como estructura de tipo órgano primitivo combinando y cultivando una diversidad de tipos de células somáticas diferenciadas.

La presente solicitud incluye las siguientes invenciones:

- (1) Un método para preparar una masa celular capaz de servir como estructura de tipo de órgano primitivo compuesta de combinaciones de queratinocitos (células somáticas epiteliales) y células de la papila capilar (células somáticas mesenquimales), que comprende:
- 50

preparar cultivos que contienen queratinocitos y células de la papila capilar;

mezclar dichos cultivos de queratinocitos y de células de la papila capilar y a continuación añadir un activador de la señal de Wnt que muestra una actividad inhibidora sobre la glucógeno-sintasa-quinasa-3 (GSK-3) para el cultivo mixto de células;

someter el cultivo que contiene dicho activador de la señal de Wnt al método de la gota colgante o método de formación de esferoides durante un período de tiempo predeterminado; y

reemplazar el medio de cultivo cultivado por el método de la gota colgante o método de formación de esferoides con medio que no contiene activador de la señal de Wnt y seguir cultivando durante un periodo de tiempo predeterminado; en donde,

al menos un tipo de los queratinocitos y las células de papila capilar se mantiene en un estado no diferenciado;

(2) el método de (1), en el que el activador de la señal de Wnt que muestra una actividad inhibitora sobre GSK-3 se elige a partir del compuesto bis-indolo (indirubina), (BIO) ((2'Z, 3'E)-6-bromoindirubin-3'-oxima), su análogo acetoxima, BIO-acetoxima (2'Z, 3'E)-6-bromoindirubin-3'-acetoxima), análogo de tiadiazolidina (TDZD) (4-bencil-2-etil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona) y el análogo de oxotiadiazolidina-3-tiona (2,4-dibencil-5-oxotiazolidin-3-tiona), un compuesto de α -clorometil tienil cetona (2-cloro-1-(4,4-dibromo-tiofen-2-il)-etanona), un compuesto de fenil α -bromometil cetona (α -4-dibromoacetofenona), un compuesto de urea que contiene tiazol (N-4-metoxibencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il-urea) e inhibidores de péptidos GSK-3 β tales como H-KEAPPAPPQSpP-NH₂;

(3) El método de cualquiera de los apartados (1) y (2), en el que los folículos pilosos que tienen una función inductora de folículo capilar se forman a partir de la masa celular;

(4) El método de cualquiera de los apartados (1) a (3), en el que el activador de la señal de Wnt es 6-bromoindirubin-3'-oxima (BIO).

Breve Descripción De Los Dibujos

La FIG. 1 es un diagrama de inmunotinción (1) de una masa celular producida de acuerdo con el método de la presente invención, que muestra la tinción de células DP y células NHEK;

La FIG. 2 es un diagrama de inmunotinción (2) de una masa celular producida de acuerdo con el método de la presente invención, que muestra la localización de las células de la papila capilar en la masa celular;

La FIG. 3 es un diagrama de inmunotinción (3) de una masa celular producida de acuerdo con el método de la presente invención, que muestra la proliferación de las células en la masa celular;

La FIG. 4 es un diagrama de inmunotinción (4) de una masa celular producida de acuerdo con el método de la presente invención, que muestra la tinción de β -catequina y células NHEK;

La FIG. 5 es un diagrama de inmunotinción (5) de una masa celular producida de acuerdo con el método de la presente invención que muestra la expresión de la queratina capilar en la masa celular;

La FIG. 6 es un diagrama de inmunotinción (6) de una masa celular producida de acuerdo con el método de la presente invención que muestra la expresión de yemas capilares en la masa celular;

La FIG. 7 muestra la expresión de diversos genes en ARN que se originan en una masa celular de la presente invención (1);

La FIG. 8 muestra la expresión del gen Wnt3A en ARN que se originan en una masa celular de la presente invención;

La FIG. 9 muestra la expresión del gen Wnt10b en ARN que se origina en una masa celular de la presente invención; y

La FIG. 10 muestra la expresión de diversos genes en ARN que se originan en una masa celular de la presente invención (2).

Modo Mejor De Llevar A Cabo La Invención

De acuerdo con la presente invención, puede proporcionarse una masa celular que es capaz de servir como estructura de órgano primitivo formada por una diversidad de tipos de células somáticas.

Las células somáticas a las que se hace alusión en la presente invención se refieren a células que han alcanzado la diferenciación en células que componen los diversos órganos del cuerpo, y se refieren a células que son lo contrario de las células madre no diferenciadas. La presente invención se caracteriza por el uso de dos o más células somáticas, y preferiblemente consiste en varias combinaciones de las mismas, que comprenden una combinación de una línea de células epiteliales y células mesenquimales.

No hay limitaciones particulares en cuanto a los órganos que pueden ser formados por la masa celular como la que se obtiene por la presente invención, cuyos ejemplos incluyen varios órganos tales como el folículo capilar, el pulmón, el riñón, el hígado, el páncreas, el bazo, el corazón, la vesícula biliar, el intestino delgado, el colon, el

intestino grueso, las articulaciones, los huesos, los dientes, los vasos sanguíneos, el conducto linfático, la córnea, el cartílago, el órgano olfativo o el órgano auditivo.

Por ejemplo, en caso de que se desee formar un folículo capilar, se utilizan los queratinocitos de la región de la cabeza para la línea de células epiteliales, mientras que las células de la papila capilar se utilizan para las células mesenquimales. Las "células epiteliales" mencionadas en el presente texto se refieren a las células que componen la mayoría de la epidermis o epitelio de la piel, y surgen de una capa única de células basales en contacto con la dermis. Las células epiteliales pueden ser células epiteliales que se originan en los recién nacidos (o en los fetos), células que se originan en la piel madura tales como la epidermis de la piel latente o la epidermis de la piel en crecimiento, o un cultivo de células que tienen la morfología de los queratinocitos. Tales células pueden prepararse a partir de la piel del animal donante que se desee de acuerdo con métodos conocidos entre los profesionales con experiencia normal en la técnica. "Células de la papila capilar" se refiere a células situadas en la parte inferior de los folículos pilosos como células mesenquimales que desempeñan el papel de lo que se denomina torre de control mediante el envío de señales de activación a las células madre epiteliales del folículo capilar para la auto-regeneración de los folículos pilosos. Las "células de la papila capilar" se pueden preparar, por ejemplo, preparando una suspensión de células mediante el tratamiento de una fracción de tejido dérmico, obtenido mediante la eliminación de tejido epidérmico a partir del tejido de la piel, con colágeno, y después poniendo la suspensión de células en almacenamiento congelado para destruir las células epiteliales del folículo capilar.

Además, la preparación puede llevarse a cabo de la manera que sigue para la reconstrucción de un órgano olfativo, por ejemplo. En primer lugar, se corta un sitio del tejido en el que está presente un grupo de células epiteliales olfativas de un mamífero tal como un ratón. El tejido se digiere después mediante un tratamiento con collagenasa y se separa por centrifugación para preparar un grupo de células precipitadas. Entonces, la suspensión celular se pone en una placa de cultivo de células recubierta con colágeno 1 o 4, y la suspensión se aspira rápidamente en aproximadamente 5 minutos para permitir que se adhieran preferentemente las células epiteliales olfativas altamente adhesivas. Las células epiteliales que quedan en el mismo disco se pueden transferir a un cultivo de células. Además, la mayoría de las células que quedan son células epiteliales. Aunque las células mesenquimales están presentes en la suspensión aspirada que queda, poniendo la suspensión en una placa de cultivo recubierta con fibronectina o gelatina y dejándola reposar sin perturbar durante 4 horas o más en una atmósfera adecuada, tal como a 37 °C y 95% de CO₂, las células mesenquimales pueden ser aplicadas al cultivo de células. Las células epiteliales y mesenquimales preparadas como se ha descrito anteriormente pueden ser utilizadas para reconstruir un nuevo órgano olfativo usando un procedimiento similar al que se usa para reconstruir los órganos del folículo capilar.

Además, la preparación puede llevarse a cabo de la manera que sigue para la reconstrucción, por ejemplo, de un glomérulo renal. En primer lugar, se corta un sitio en el que está presente tejido en el riñón de un mamífero tal como un ratón. El tejido se digiere mediante el tratamiento con collagenasa y se separa por centrifugación seguida por la eliminación de la materia gruesa con un filtro de 100 µm de malla. Después se recoge el glomérulo en la malla con un filtro de 40 µm de malla y se obtiene una suspensión de células mediante tratamiento con tripsina. La suspensión de células se pone en una placa de cultivo de células recubierta con colágeno 1 o 4 para adherir preferentemente las células epiteliales. Como resultado de este tratamiento, la mayoría de las células son células epiteliales que se originan en el glomérulo.

Por otra parte, en el caso del riñón, las células mesenquimales presentes en el momento de la organogénesis son destruidas en el organismo. Así pues, en la presente invención, puede ser empleado el procedimiento que sigue para reinducir la interacción epitelial-mesenquimal requerida para la reconstrucción del tejido. Las células renales descritas anteriormente se usan para las células epiteliales. Además, las células de la papila capilar o las células mesenquimales de la médula ósea de la misma categoría se usan como sustituto para las células mesenquimales perdidas. Las células epiteliales y mesenquimales como se describen anteriormente se pueden utilizar para construir un nuevo órgano renal usando una técnica similar a la usada para reconstruir órganos del folículo capilar.

Se pueden usar sin limitación diversos mamíferos como origen de las células, como se reivindica en la presente invención en correspondencia con la finalidad de la misma, entre cuyos ejemplos se incluyen chimpancés, otros primates, animales domésticos tales como perros o gatos, animales de granja, tales como vacas, cerdos, caballos, ovejas o cabras, animales de laboratorio, tales como conejos, ratas, ratones o cobayas, y más preferiblemente ratones atímicos ("desnudos"), ratones SCID o ratas atímicas. Además, aunque sus combinaciones pueden ser combinaciones homogéneas o combinaciones heterogéneas, son preferibles las combinaciones homogéneas.

No hay limitaciones particulares en los medios de cultivo efectivos para cultivar las células somáticas como se reivindica en la presente invención, y se pueden utilizar los medios utilizados comúnmente para el cultivo de células. Por ejemplo, en caso de cultivar células mesenquimales, se puede utilizar preferentemente medios que contienen suero, tales como DMEM, MEM, F12 o medio de Chang. En este caso, la concentración en suero es de 0 a 30% y preferiblemente 10%, y como factores esenciales se añaden factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y L-glutamina 2 mM.

En el caso de las células epiteliales, es preferible un medio libre de suero optimizado para los queratinocitos, tal como Epilife (marca comercial registrada) y HuMedica (marca comercial registrada) (ambos disponibles de Kurabo) o Invitrogen SFM (disponible de Invitrogen). Aunque los queratinocitos se pueden preparar usando el método de

Green dependiendo del caso (Cell 1975 Nov. 6 (13): 331-43, Serial cultivation of strain of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells (cultivo en serie de la cepa de queratinocitos epidérmicos humanos: la formación de colonias queratinizantes a partir de células individuales), Rheinwalf J. G., Green H.), en este caso puede ser utilizado para su cultivo medio que contiene suero usado en el sistema de células mesenquimales descrito anteriormente. Además, los ejemplos de antibióticos que se pueden utilizar para el cultivo tanto de células epiteliales como de células mesenquimales incluyen penicilina G, kanamicina, estreptomycin y anfotericina B.

La presente invención se caracteriza por la adición de un activador de la señal de Wnt a una mezcla de la diversidad de células somáticas que se describió anteriormente seguida por el cultivo de las mismas. La señalización de Wnt se refiere a una serie de acciones que demuestran la función de factores de transcripción promoviendo la migración nuclear de β -catequina. Estas señales se originan de la interacción celular que incluye, por ejemplo, una serie de procesos en los que una proteína denominada Wnt3A segregada a partir de ciertas células sigue actuando sobre otras células que causan la migración nuclear de β catequina intracelular que actúa como factor de transcripción. Esta serie de procesos dan lugar al fenómeno inicial de la construcción de órganos en el ejemplo de la interacción epitelial-mesenquimal. Se sabe que la señalización de Wnt controla la proliferación y la diferenciación de las células, la formación de órganos y diversas funciones celulares tales como la migración celular durante el desarrollo inicial. Aunque la señalización de Wnt se usa cuando se cultivan células ES con el fin de inhibir la diferenciación debida a su función de mantener un estado no diferenciado (véase, por ejemplo, Noboru Sato et al., Nature Medicine, vol. 10, N° 1, enero 2004), su utilización y sus efectos durante el cultivo de las células somáticas son totalmente desconocidos.

No hay limitaciones concretas sobre el activador de la señal de Wnt, y se puede utilizar cualquier activador siempre y cuando demuestre actividad inhibidora sobre la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3), los ejemplos de los cuales incluyen un compuesto de bis-indolo (indirrubina), (BIO) ((2'Z, 3'E)-6-bromoindirrubin-3'-oxima), su análogo acetoxima, BIO-acetoxima (2'Z, 3'E)-6-bromoindirrubin-3'-acetoxima), análogo de tiadiazolidina (TDZD) (4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona) y análogo de oxotiadiazolidina-3-tiona (2,4-dibencil-5-oxotiadiazolidin-3-tiona), un compuesto tienil α -clorometil cetona (2-cloro-1-(4,4-dibromo-tiofen-2-il)-etanona), un compuesto α -bromometil fenil cetona (α -4-dibromoacetofenona), compuesto de urea que contiene tiazol (N-4-metoxibencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) urea) e inhibidores de péptidos GSK-3 β tales como H-KEAPPAPPQSpP-NH₂.

No hay limitaciones particulares acerca de la cantidad de activador de señales de Wnt añadido, y se requiere que la cantidad añadida sea una cantidad para la cual se demuestre la activación de la señal de Wnt, o, en otras palabras, la inhibición de GSK-3, y no se interrumpe la proliferación celular, es dependiente del tipo de células a desarrollar, y es determinada adecuadamente por un profesional con una experiencia normal en la técnica. Por ejemplo, en el caso de usarse BIO para la activador de la señal de Wnt en células de la papila capilar, aunque es adecuada una cantidad añadida de, por ejemplo, aproximadamente 0,1 a 10 μ M, la cantidad añadida no se limita naturalmente a ella.

Otra característica de la presente invención es el tema de la mezcla de la diversidad de células somáticas, a las cuales se ha añadido el activador de la señal de Wnt, a cultivo sin contacto de placa. El cultivo sin contacto de placa se refiere a un método de cultivo de células sobre una interfase que tiene una superficie esférica de forma que no permite la adhesión de las células que se adhieren a la placa. Un ejemplo de cultivo sin contacto de placa es el método de la gota colgante (Keller, G. M. et al., Curr. Opin. Cell Biol., 7, 862-869 (1995)). El método de la gota colgante se refiere a la adhesión de una gota (típicamente de aproximadamente 25 a 35 μ L) de medio de cultivo que contiene células cultivadas en el interior de la tapa superior de una placa de cultivo, cerrando cuidadosamente la tapa para que el medio de cultivo no caiga o resbale, y el cultivo de células en el medio de cultivo para ser cultivadas en forma de una gota invertida debido a la tensión superficial. Como resultado de esta manera de cultivo, el efecto sobre las células atribuible al contacto con una superficie plana como en el caso de cultivo de la placa puede ser reducido al mínimo. Otros ejemplos de métodos de cultivo sin contacto con la placa incluyen un método de formación que utiliza una placa de cultivo celular semi-esférica que ha sido tratada de antemano en superficie para evitar la adhesión celular (por ejemplo, "Spheroid" disponible comercialmente de Sumitomo Bakelite) (denominado método de formación de esferoides), y un método de suspensión en el que las células son agregadas en estado de suspensión mediante el cultivo en un medio de nitrocelulosa.

Aunque la temperatura y la duración del cultivo sin contacto con la placa varía dependiendo del tipo de células que se manipulen y del número de veces que han sido subcultivadas, el cultivo se lleva a cabo, por ejemplo, a 37 °C durante 1 a 10 días y preferiblemente durante 3 a 7 días, y el medio se reemplaza adecuadamente con el mismo medio según se necesite.

Por último, las células se someten además a cultivo sin contacto con la placa en ausencia de señalización de Wnt reemplazando el medio anterior con medio de cultivo que no contiene activador de la señal de Wnt. También en este caso, aunque la temperatura y la duración del cultivo varían dependiendo del tipo de células manipuladas y del número de veces que han sido subcultivadas, el cultivo se lleva a cabo, por ejemplo, a 37 °C durante 1 a 10 días y preferiblemente durante 3 a 7 días, y el medio se reemplaza adecuadamente con el mismo medio si es necesario.

De acuerdo con el método de la presente invención, una masa celular útil, por ejemplo, para el trasplante de folículo capilar, varios trasplantes de órganos y los trasplantes parciales de microórganos que comprenden órganos si bien no los propios órganos completos, tales como córnea, glomérulo renal, tejido epitelial olfativo o un sitio cartilaginoso, puede ser producida de forma eficiente y artificial. Además, usando una masa celular producida artificialmente para evaluaciones de fármacos, se puede evaluar con mayor precisión la acción de un fármaco sobre los órganos del cuerpo. Además, el trasplante de la masa celular en animales inmunodeprimidos, tales como ratones atímicos o ratones SCID hace posible producir tejido similar al órgano más completo, y, produciendo ectópicamente folículo capilar humano o de riñón de ratón, por ejemplo, se pueden preparar modelos animales que permiten la evaluación de nuevos medicamentos y la evaluación de la función génica. En particular, insertando o alterando un gen en las células cuando se produce la masa celular, se pueden producir fácilmente órganos reconstruidos que tienen un gen informador, haciéndose posible determinar con precisión e investigar el comportamiento molecular en el cuerpo en los niveles de tejido y órgano.

En la masa celular obtenida por el método de acuerdo con la presente invención, las células epiteliales son queratinocitos y las células mesenquimales son células de la papila capilar, y en el caso de la formación de folículos capilares que tienen una función de inducción del folículo capilar, se puede usar la masa celular para evaluar fármacos que muestran un efecto de crecimiento del pelo, y se puede usar, por ejemplo, mediante el cribado de tales fármacos. Por ejemplo, en el caso de la aplicación de un fármaco candidato de fármaco para el crecimiento del pelo a esta masa celular y el crecimiento de la masa celular es notable en comparación con un testigo, puede ser evaluado el fármaco para que tenga un efecto de crecimiento del pelo, o puede ser evaluado en cuanto a la presencia o la ausencia de un efecto de crecimiento del pelo usando el aumento de expresión de un gen que promueve el crecimiento del pelo, tal como c-myc, como indicador o usando la inhibición de la expresión de un gen que inhibe el crecimiento del pelo, tal como BMP4 o IGFBP3, como indicador.

Ejemplos

Células de la papila capilar.

Se prepararon células de la papila capilar humana a partir de tejido del cuero cabelludo proporcionado por un donante. Después de retirar el tejido dérmico, fueron recogidos los sitios del folículo capilar presentes en el tejido graso usando pinzas y tijeras oftalmológicas bajo observación al microscopio estereoscópico. Los folículos capilares recogidos se pasaron a un medio de cultivo que contiene antibióticos, y los sitios de células de la papila capilar se aislaron visualmente y se recogieron bajo el mismo microscopio. Las células de la papila capilar aisladas se cultivaron en el medio durante una semana o más a 37 °C y 95% de CO₂ en una placa redonda de 10 cm (TRP), después de lo cual fueron enviadas para uso experimental. El medio usado comprendía DMEM avanzado (Invitrogen), 15% de suero bovino fetal, 20 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de EGF, L-glutamina 2 mM, una mezcla de penicilina, estreptomycin y anfotericina (a una dilución de 100 veces), y 3,5 µl/50 ml de β-mercaptoetanol. Las células fueron subcultivadas adecuadamente bajo las mismas condiciones. Durante el subcultivo, las células se separaron con solución de 0,5% tripsina/EDTA, se pasaron a una placa fresca y luego se subcultivaron en medio fresco de la misma composición.

En el caso de la adición de BIO (Calbiochem), la BIO fue disuelta hasta 10 mM con dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadió a una concentración de 0,1 a 5 mM.

Queratinocitos.

Se prepararon los queratinocitos de prepucio neonatal humano normal de la manera descrita a continuación. El tejido prepucial extraído de un donante se trató durante la noche a 4 °C en PBS (-) en presencia de la enzima dispasa. Sólo la epidermis se pudo recoger en forma de lámina como resultado de este tratamiento, y esta fue digerida con la enzima tripsina al 0,25% usando el mismo método que durante el subcultivo, después de lo cual el tejido y el medio se pasaron a una placa de cultivo tratada con colágeno y se cultivaron. Se utilizó para el medio Humedia KG2 (Kurabo). Las células fueron subcultivadas adecuadamente en las mismas condiciones. Durante el subcultivo, las células fueron separadas con solución de tripsina al 0,5%/EDTA, se transfirieron a una placa fresca y luego se subcultivaron en un medio fresco de la misma composición. Las células recolectadas y cultivadas en la forma descrita anteriormente se usaron en la posterior experimentación.

En el caso de la adición de BIO (Calbiochem), la BIO se disolvió hasta 10 mM con dimetil sulfóxido (DMSO) y se añadió a una concentración de 0,1 a 5 µM.

Cultivo en gota colgante.

Composición del medio:

30% de DMEM avanzado (Invitrogen), L-glutamina 2 mM, una mezcla de penicilina y estreptomycin (Invitrogen, dilución 100 veces) y 3,5 µl/50 ml de β-mercaptoetanol se mezclaron con Humedia KG-2 (Kurabo) en una relación de 1:1.

En el caso de la adición de BIO (Calbiochem), la BIO se disolvió a 10 mM con dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadió a una concentración de 0,1 a 5 μ M.

Método de preparación:

- 5 Se prepararon células de la papila capilar a P3 o más (indicando P1 una ronda de subcultivo) en presencia o ausencia de carga de BIO, mientras que los queratinocitos se prepararon a e incluyendo P3.

Cada una de las células se diluyó con cada medio después del tratamiento con tripsina para obtener 1×10^5 células.

En el caso de la adición de BIO (Calbiochem), la BIO se disolvió a 10 mM con dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadió a una concentración de 0,1 a 5 μ M.

- 10 Se dispensaron de 25 a 35 μ L de cada medio de cultivo en el interior de la tapa superior de una placa de cultivo cuadrada de 10 cm de lado y se mezclaron para preparar gotículas en forma de cúpula de un tamaño adecuado.

Después de cerrar la tapa con cuidado, las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera con 95% de CO₂ asegurándose de que no gotea el medio de cultivo.

Tres días más tarde, el medio se reemplazó con el mismo medio que se utilizó anteriormente.

- 15 Después de cultivar durante cuatro días más, una porción del medio se sometió a análisis de RT-PCR (1) como se describe más adelante. Todo el medio restante se reemplazó con medio bajo condiciones de ausencia de BIO.

El medio se reemplazó de la misma forma al tercer día, y las masas celulares que se formaron el día 7 se recogieron y se sometieron a inmunotinción como se describe a continuación.

Tinción inmunohistofluorescente:

- 20 Cada una de las masas celulares obtenidas con el método de la gota colgante se fijaron durante 5 minutos con paraformaldehído al 0,1% y se sometieron a tinción. Además, una porción de las masas celulares se incorporó en solución de OCT sin fijar y se preparó en secciones congeladas con un criostato, seguido por inmunohistotinción.

El bloqueo se llevó a cabo durante 6 horas con PBS (-) que contiene albúmina de suero bovino (BSA) al 13%.

- 25 Cada uno de los anticuerpos primarios indicados en la tabla que sigue fue diluido a 1/200 con el PBS (-) mencionado que contiene 13% de albúmina de suero bovino (BSA), se añadieron a cada muestra y se dejaron reaccionar durante 4 horas a 4 °C.

Las células se lavaron tres veces con PBS (-) que contiene 0,02% de Tween 20.

El anticuerpo secundario fluorescente (véase el archivo Excel) diluido en 1/200 con el PBS (-) mencionado que contiene 13% de albúmina de suero bovino (BSA) fue añadido a cada muestra. Además, los núcleos de las células se tiñeron de azul con DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol).

- 30 Las células se observaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus).

Tabla 1

	Proteína objetivo	Fabricante	Descripción
Anticuerpo primario	CD49f	Serotec	anti-humano de rata/CD49f de ratón
	Vimentina	YLEM	Monoclonal
	β -catequina	Becton Dickinson	Monoclonal
	Nombre	Fabricante	Descripción
Anticuerpo secundario	conjugado de IgG anti-rata de cabra TEXAX-RED	Jackson ImmunoResearch	Rojo
	IgG anti-ratón de conejo ALEXAFLUOR 488	Invotrogen	Amarillo

Aquí, dado que el anticuerpo monoclonal contra la vimentina tiñe específicamente las células de la papila capilar y el anticuerpo policlonal Cd49f tiñe específicamente las células epidérmicas, la aplicación de los anticuerpos vimentina y

CD49f a la inmunocitotinción hace posible evaluar los atributos de las células presentes dentro de las masas celulares formadas en este sistema experimental.

La FIG. 1 muestra fotografías en blanco y negro de los resultados de las observaciones microscópicas descritas anteriormente. En la versión en color de este diagrama, se puede distinguir la coloración verde por el anticuerpo vimentina y la coloración roja por el anticuerpo CD49f, y se pudo determinar que cada una eran células de la papila capilar y queratinocitos, respectivamente. Además, como se muestra en la FIG. 2, se confirmó que las células de la papila capilar se agregan en la porción central de la masa celular. Como resultado de estos diagramas, se observó que las células estaban dispuestas regularmente después de haberse agregado, y se determinó que las células epiteliales y las células mesenquimales estaban dispuestas de una manera ordenada por este sistema experimental. Después de que las masas celulares formadas después de la adición de BIO, se determinó que los queratinocitos que tiñen de rojo crecían de una manera regular en forma de ramas dentro de masas celulares cultivadas en ausencia de BIO. Por otra parte, como se muestra en la FIG. 3, en el caso de la formación de masa celular añadiendo BIO, se encontró que una porción central en la que se había agregado papila capilar y una porción final de la masa celular que se extendía en forma de rama eran positivas para el marcador de proliferación, KI67. Sobre la base de estos resultados, aunque las células somáticas agregadas normales entran usualmente en un estado de latencia sin crecimiento, inesperadamente se encontró que ocurrió la proliferación de las células en las masas celulares debido a la adición de BIO.

Además, se utilizó el anticuerpo monoclonal β -catequina para marcar las propiedades similares a las células madre. Dado que la β -catequina está presente en pequeñas cantidades cerca de la membrana celular de las células somáticas normales, solamente puede ser detectada ligeramente mediante inmunotinción fluorescente ordinaria. Sin embargo, en las células que tienen propiedades similares a las células madre, la β -catequina actúa como factor de transcripción dentro del núcleo y está presente en cantidades mayores. Además, como la β -catequina se acumula en el núcleo, puede confirmarse que está fuertemente localizada incluso por inmunotinción fluorescente. En este experimento, también, dado que la β -catequina fue intensamente teñida en algunos sitios específicos de la masa celular y se confirmó que se acumulaba en esos sitios, se puede decir que la tinción con anticuerpo β -catequina es adecuada para la detección de células que tienen propiedades similares a las células madre en la masa celular.

La FIG. 4 es una fotografía en blanco y negro que muestra los resultados de la observación microscópica usando la tinción con anticuerpo monoclonal β -catequina anteriormente mencionada. En la versión en color de este diagrama, los sitios teñidos con anticuerpo β -catequina se muestran en verde, mientras que los queratinocitos se muestran en rojo. Se observaron células positivas para β -catequina en sitios que emiten una intensa luz verde, indicando que las células tienen propiedades similares a células madre. Lo que hay que tener en cuenta aquí es la presencia de porciones en las que se observa una intensa luz amarilla en los centros de sitios esféricos de la masa celular. Estos sitios indican queratinocitos positivos para β -catequina. Se puede decir que las células positivas para β -catequina son células que tienen propiedades similares a las células madre como se describió anteriormente. Por otra parte, no hay sitios amarillos en sitios en los queratinocitos que se extienden desde la masa celular en forma de ramas. Dicho de otra forma, puede observarse que las células que tienen propiedades similares a las células madre y las células que tienen propiedades similares a las células somáticas normales (queratinocitos) están ambas presentes. Este estado no puede ser observado durante el cultivo ordinario, y la interacción epitelial-mesenquimal se reproduce como si estuviese presente in vivo, indicando así que los grupos de células indiferenciadas y diferenciadas están creciendo formando autónomamente una masa celular.

Los queratinocitos no diferenciados a los que se hace referencia en el presente texto indican células que tienen una capacidad similar a las células madre para crear constantemente queratinocitos que forman el cabello a la manera de las células de la matriz del cabello. Por otra parte, los queratinocitos diferenciados son limitados en cuanto al número de veces que proliferan, e indican las llamadas células para las que está determinado su destino celular a medida que se convierten en cabello. Al mismo tiempo, aunque se cree que las células que circundan esferas verdes en la versión en color de la FIG. 4 son células de la papila capilar, es importante el hecho de que las células de la papila capilar en el entorno de esta masa celular son células positivas para la β -catequina, de la misma manera que la señalización de Wnt es importante durante la formación del folículo y en el comienzo del crecimiento in vivo.

El anticuerpo contra la citoqueratina 14 (K14) expresado en los queratinocitos epidérmicos y células de la vaina externa de la raíz se usa con el fin de confirmar que estas células no se han diferenciado en raíces pilosas (rojo). Dado que el anticuerpo monoclonal AE13, que reacciona específicamente contra la queratina del cabello (Lynch et al., J. Cell Biol., 103, 2593, 1986), reconoce el dímero de queratina ácida del pelo 44K/46K, se utiliza para marcar la diferenciación en raíces del pelo (verde). La queratina del cabello es una proteína estructural específica del folículo capilar que está esencialmente ausente en los queratinocitos epidérmicos normales. La FIG. 5 es una fotografía en blanco y negro que muestra los resultados de su observación microscópica. En la versión en color de este diagrama, aunque los sitios teñidos por el anticuerpo AE13 no se observan en masas celulares producidas con células de la papila capilar y queratinocitos epidérmicos, cuando se estimulan con BIO, se observó tinción en algunas masas celulares. En masas celulares preparadas con células de la papila capilar y células de la vaina externa de la raíz, los sitios teñidos mediante anticuerpo AE13 se pueden confirmar en los casos de ausencia de estimulación BIO, y la tinción por anticuerpo AE13 se potencia considerablemente por la estimulación con BIO. Por otra parte, dado que no se observan sitios teñidos tanto por anticuerpo K14 (rojo) como por anticuerpo AE13 (verde) (sitios amarillos) en

ninguna de las masas celulares, se cree que se ha producido un cambio de células no diferenciadas que expresan citoqueratina 14 a células que producen queratina capilar.

El anticuerpo Ber-EP4 contra el antígeno epitelial humano expresado específicamente en las yemas del cabello durante la etapa de crecimiento del cabello (Ogawa, et al., Exp. Dermatol. 13, 401, 2004) se usa para marcar las yemas del cabello durante el crecimiento del mismo (verde). La Fig. 6 es una fotografía en blanco y negro que muestra los resultados de su observación microscópica. En la versión en color de este diagrama, la inmunotinción (verde) mediante anticuerpo Ber-EP4 se observa claramente en el caso de haber estimulado masas celulares preparadas con células de la papila capilar y células de la vaina externa de la raíz con BIO. Dado que no se observan sitios (amarillo) teñidos tanto por anticuerpo K14 (rojo) como por anticuerpo Ber-EP4 (verde), se cree que se ha producido un cambio de células no diferenciadas que expresan citoqueratina 14 a las células diferenciadas a yemas del cabello que expresan Ber-EP4.

Análisis de RT-PCR (1)

Se extrajo ARN de cada muestra usando Trizol (Invitrogen). Un equivalente de 200 ng de cada ARN se sometió a transcripción inversa a cDNA con un sistema de reacción que consiste en 50 µl de RevTraACE (Toyobo). Se aplicó 1 µl de las muestras resultantes a una reacción de PCR en un sistema de 50 µl usando los cebadores enumerados más adelante. Se usó KOD-DASH (Toyobo) para la enzima, y el protocolo de reacción consistió en 60 segundos a 95 °C, 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 15 segundos a 63 °C y 30 segundos a 72 °C, seguido por 60 segundos a 72 °C.

Se sometieron 10 µl de la solución de reacción a electroforesis a 100 V en gel de agarosa al 2% (CosmoBio)/tampón TAE. Se usó un marcador ladder de 100 pb (Toyobo) para el marcador de tamaño de ADN.

Los cebadores utilizados se enumeran en la tabla siguiente, y los resultados de la PCR se muestran en la FIG. 7.

Tabla 2

	Cebador de sentido (cadena directa)	Cebador anti sentido (cadena inversa)
Lef-1	gctatcaaccagattcttggcagaagg (SEQ ID N° 1)	cagctgtcattcttggacctgtacctg (SEQ ID N° 2)
SHH	ctacgagtccaaggcacatatccactg (SEC ID N° 3)	tccaggaaagtgaggaagtcgctgtag (SEC ID N° 4)
STAT-3	aagaccggcgtccagttcactactaaag (SEC ID N° 5)	ggtaagtgttgaattctgcagagagg (SEQ ID N° 6)
Versicano	tccaagtattgtgtgcactttgtqag (SEQ ID N° 7)	tcaaacatctgtcattgaggcctatcc (SEC ID N° 8)
TWIST-1	ggccagggtacatcgacttctctac (SEQ ID N° 9)	tctcttctctggaacaatgacatc (SEQ ID N° 10)
β-actina	cgcgagaagatgaccagatcatg (SEQ ID N° 11)	ccacaggactccatgccacg (SEQ ID N° 12)

Se usó β-actina como testigo para todo el experimento.

Lef-1 es un gen secuencia abajo de la señalización de Wnt y, como se muestra en la FIG. 7, fue detectado en este sistema experimental, tanto en presencia como en ausencia de BIO. La observación de la expresión del gen Lef-1 indica que las señales de Wnt están actuando en las células. Así pues, se pueden entender que la señalización de Wnt está funcionando mediante la adición de BIO en este sistema experimental.

SHH (Sonic Hedge Hog) es un gen que participa durante la formación de tejido y, como se muestra en la FIG. 7, no fue detectado en este sistema experimental, bien sea en presencia o bien en ausencia de BIO. El SHH es un gen que se transcribe y se expresa en respuesta a las señales de Wnt y Lef-1. La expresión de este gen indica que la señalización de Wnt está actuando en las células y que está ocurriendo la expresión del gen relacionado, tal como la que se produce in vivo. Al mismo tiempo, SHH es una proteína responsable de la señalización intercelular epitelial-mesenquimal, y al mismo tiempo sugiere la aparición de interacción epitelial-mesenquimal.

STAT-3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3: transductor de señales y activador de la transcripción 3) es un gen relacionado con la inducción de los folículos capilares y, como se muestra en la FIG. 7, fue detectado principalmente en presencia de BIO, en comparación con la ausencia del mismo. STAT-3 es una denominada proteína de transducción de señal intracelular implicada en la auto-proliferación de las células madre. La aceleración de este gen es un factor esencial para la auto-proliferación y el mantenimiento de la universalidad en las células madre embrionarias, y es uno de los marcadores usados para indicar propiedades similares a células madre de las mismas. Al mismo tiempo, como se describe en la publicación de Sano, S. et al. (Nature Med. 11: 43-49, 2005, "Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model"), dado que este es también un gen extraordinariamente importante para la transición a la etapa de crecimiento del cabello, se sugiere que la aceleración de la transcripción de STAT-3 en este sistema experimental es

una etapa normal durante el subsiguiente crecimiento en los folículos capilares. Al mismo tiempo, la propia señal de STAT-3 no está directamente afectada por BIO (Sato, N. et al, Nat. Med. enero 2004; 10 (1): 55-63, Epub 21 de dic. de 2003, "Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3 specific inhibitor"). En otras palabras, la aceleración de STAT-3 durante la adición de BIO indica que se crea un sistema de mantenimiento de células madre dentro de las células por la interacción epitelial-mesenquimal.

TWIST-1 es el marcador para células madre mesenquimales embrionarias, y sugiere que las células de la papila capilar tienen propiedades similares a las células madre muy elevadas. Dado que la expresión de TWIST-1 en las células somáticas está limitada a un tipo muy raro de células que contienen células madre mesenquimales de médula ósea, puede decirse que las células de la papila capilar son células que tienen un alto grado de propiedades similares a las células madre, a pesar de que son células somáticas. En el experimento de RT-PCR de la FIG. 7, la RT-PCR se lleva a cabo usando cantidades iguales de ARN entero para las plantillas. La razón para que la expresión parezca disminuir en presencia de BIO es debida a una disminución relativa del número de células de la papila capilar entre el número total de células, como puede observarse en la FIG. 1 y en la FIG. 2. En conclusión, incluso cuando se consideran las variaciones en las cantidades expresadas, la presencia continuada de células que expresan el gen TWIST-1 sugiere que las células de la papila capilar que pueden tener capacidades similares a las células madre siguen estando presentes en este sistema experimental.

El gen del versicano es un marcador del crecimiento del cabello que se sabe que se expresa intensamente en células de la papila capilar durante la inducción del crecimiento del pelo (Kishimoto, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1999), p. 7336 a 7341). En el experimento de RT-PCR de la FIG. 7, la razón de que la expresión que aparece disminuya en presencia de BIO estriba en una disminución relativa del número de células de la papila capilar entre el número total de células, como puede observarse en la FIG. 1 y en la FIG. 2. En conclusión, incluso cuando se consideran variaciones en las cantidades expresadas, la presencia continuada de células que expresan el gen de versicano sugiere que las células de la papila capilar capaces de inducir el crecimiento del cabello siguen estando presentes en este sistema experimental.

Basándose en los cambios en los niveles de expresión de cada gen, la indiferenciación de las células epiteliales y mesenquimales se mantiene debido a los efectos directos de BIO dentro de la masa celular, y se puede decir que ha ocurrido una acción que imita la acción epitelial-mesenquimal inducida por la señalización de Wnt. Además, dado que se observa la aparición de propiedades similares a las células madre no relacionadas con la señalización de Wnt como con STAT-3, el efecto de BIO contribuye a la creación de una masa celular que tiene la interacción celular autónoma y la capacidad de proliferar.

RT-PCR de Wnt3A.

Se prepararon células de la papila capilar a P3 (indicando P1 una ronda de subcultivo) en la presencia de carga de BIO, mientras que los queratinocitos se prepararon hasta e incluyendo P3.

Cada una de las células se diluyó con cada uno de los medios después del tratamiento con tripsina para obtener 3×10^3 células.

Se disolvió BIO (Calbiochem) a 10 mM con dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadió a una concentración de 0,1 a 5 μ M.

Se dispensaron 25 a 35 μ l de cada medio de cultivo en el interior de la tapa superior de una placa de cultivo cuadrada de 10 cm de lado y se mezclaron para preparar gotículas en forma de cúpula de un tamaño adecuado.

Después de cerrar la tapa con cuidado, las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera con 95% de CO₂ al tiempo que se asegura que no gotea el medio de cultivo.

Tres días más tarde, el medio fue reemplazado con el mismo medio que se utilizó anteriormente. Las muestras se recogieron en el día 7º y se sometieron a análisis de RT-PCR (2) como se describe más adelante ("0 días" en la FIG. 8). El medio usado para las mismas células restantes fue reemplazado con medio bajo condiciones de ausencia de BIO para inducir la diferenciación, después de lo cual las muestras recogidas en el día 3º se sometieron a análisis de RT-PCR (2) como se describe a continuación ("3 días" en la FIG. 8).

Análisis de RT-PCR (2)

Se extrajo ARN de las muestras usando Trizol (Invitrogen). Un equivalente de 200 ng de cada ARN fue sometido a transcripción inversa a cDNA con un sistema de reacción que consiste en 50 μ l de RevTraACE (Toyobo). Se aplicó 1 μ l de las muestras resultantes a una reacción de PCR en un sistema de 50 μ l usando los cebadores enumerados más adelante. Se utilizó KOD-DASH (Toyobo) para la enzima, y el protocolo de reacción consistió en 2 minutos a 94 °C, 32 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 10 segundos a 63 °C y 30 segundos a 72 °C, seguido por 2 minutos a 72 °C.

Cebador de sentido (cadena directa):

caggaactacgtggagatcatg (SEC ID NO. 13)

Cebador antisentido (cadena inversa):

ccatcccacaaaactcgatgtc (SEC ID NO. 14)

Se sometieron a electroforesis 10 µl de la solución de reacción a 100 V en gel de agarosa al 2% (CosmoBio)/tampón TAE. Se detectaron bandas diana después de la visualización con bromuro de etidio.

- 5 Los resultados se muestran en la FIG. 8. La flecha en el dibujo indica una banda de Wnt3A. La propia expresión de Wnt3A es rara, se expresa principalmente por células epiteliales, y se sabe que es un gen implicado en la organogénesis y la interacción de células epiteliales - células mesenquimales. Como se muestra en el dibujo, al contrario que con la expresión de Wnt3A que no se observa en absoluto en células en las que se activó la señalización de Wnt cultivando en presencia de BIO, se observó la expresión de Wnt3A en células en las que la diferenciación celular fue inducida subsiguientemente mediante la eliminación de BIO. En consecuencia, en este sistema experimental, se determinó claramente que la diferenciación de queratinocitos, y lo que es más, la organogénesis autónoma son inducidas por el cultivo en presencia de BIO seguido de cultivo después de la eliminación de BIO.

RT-PCR de Wnt10b

- 15 Se prepararon células de la papila capilar a P3 (indicando P1 una ronda de subcultivo) en ausencia de carga de BIO, mientras que las células de la vaina externa de la raíz se prepararon hasta e incluyendo P3.

Cada una de las células se diluyó con cada medio después del tratamiento con tripsina con el fin de obtener 3×10^3 células.

Se disolvió BIO (Calbiochem) a 10 mM con dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadió a una concentración de 0,1 a 5 µM.

- 20 Se dispensaron 25 a 35 µl de cada medio de cultivo en el interior de la tapa superior de una placa de cultivo cuadrada de 10 cm de lado y se mezclaron para preparar gotas en forma de cúpula de un tamaño adecuado.

Después de cerrar la tapa con cuidado, las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera con 95% de CO₂ al tiempo que se asegura que no gotea el medio de cultivo.

- 25 Tres días más tarde, el medio fue reemplazado con el mismo medio que se utilizó anteriormente. Las muestras se recogieron en el séptimo día y se sometieron a análisis de RT-PCR (3), como se describe más adelante ("día 7" en la FIG. 9). El medio usado para las mismas células restantes se reemplazó con medio sin BIO para inducir la diferenciación, después de lo cual las muestras recogidas después de 10 y 14 días se sometieron a análisis de RT-PCR (3) como se describe más adelante ("día 10" y "día 14" en la FIG. 9).

Análisis de RT-PCR (3)

- 30 Se extrajo ARN de cada muestra usando Trizol (Invitrogen). Un equivalente de 200 ng de cada ARN se sometió a transcripción inversa a cDNA con un sistema de reacción que consiste en 50 µl de RevTraACE (Toyobo). Se aplicaron 4 µl de las muestras resultantes a un sistema de PCR cuantitativa (LightCycler System, Roche) en un sistema de 20 µl usando los cebadores enumerados a continuación. Se usó el protocolo de reacción de LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green (Roche) (consistente en 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C, 10 segundos a 63 °C y 15 segundos a 72 °C).

Cebador de sentido (cadena directa):

gaagttctctcgggatttcttgatcc (SEC ID NO. 15)

Cebador antisentido (cadena inversa):

cggttgtgggtatcaatgaagatgg (SEC ID NO. 16)

- 40 Los resultados se muestran en la FIG. 9. Todos los datos fueron expresados como la cantidad relativa expresada basándose en la cantidad expresada después de 3 días en el caso de no cargar la masa celular con BIO. Wnt10b se expresa principalmente por células epiteliales durante las etapas de morfogénesis del folículo capilar y el crecimiento del cabello, y se sabe que es un gen implicado en una interacción célula epitelial - célula mesenquimal. Como se muestra en el dibujo, al contrario que con la expresión de Wnt10b que sólo se observa que se expresa a aproximadamente el mismo nivel que el de un testigo cultivado en ausencia de BIO en células en las que la señalización de Wnt fue activada cultivando en presencia de BIO siempre y cuando las células fuesen cultivadas en presencia de BIO, la expresión de Wnt10b aumentó a lo largo del tiempo en las células en las que la diferenciación celular fue subsiguientemente inducida eliminando la BIO. En consecuencia, en este sistema experimental, se determinó claramente que la diferenciación de las células epiteliales foliculares (células de la vaina externa de la raíz), y lo que es más, la organogénesis autónoma son inducidas cultivando en presencia de BIO seguido de cultivo después de la eliminación de BIO.

Reactividad de la masa celular ante el estimulador del crecimiento del cabello, ciclosporina A.

Se sabe que la hipertrichosis es un efecto secundario del inmunosupresor ciclosporina A (Lutz, et al., *Skin Pharmacol.* 7, 101, 1994), y se ha determinado claramente que la ciclosporina A muestra una acción de crecimiento del cabello (Paus, et al., *Lab. Invest.* 60, 365, 1989) y una acción de promoción del crecimiento del cabello (Taylor, et al., *J. Invest. Dermatol.*, 100, 237, 1993).

Se prepararon células de la papila capilar a P3 (indicando P1 una ronda de subcultivo) en ausencia de carga de BIO, mientras que se prepararon células de la vaina externa de la raíz hasta e incluyendo P3.

Cada una de las células se diluyó con cada medio después del tratamiento con tripsina para obtener 3×10^3 células.

Se dispensaron 25 a 35 μ l de cada medio de cultivo se dispensó en el interior de la tapa superior de una placa de cultivo cuadrada de 10 cm de lado y se mezclaron para preparar gotas en forma de cúpula de un tamaño adecuado.

Después de cerrar la tapa con cuidado, las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera con 95% de CO₂ asegurando al mismo tiempo que el no gotea el medio de cultivo.

Tres días más tarde, el medio fue reemplazado con el mismo medio que se utilizó anteriormente, que contiene ciclosporina A. La ciclosporina A se disolvió a 10 mM con etanol y se añadió a una concentración de 0.1 a 10 μ M.

Las muestras se recogieron tres días después de la adición de ciclosporina A y sometieron a análisis mediante RT-PCR (4) como se describe a continuación.

Análisis de RT-PCR (4)

Se extrajo ARN de las muestras usando el *kit* RNeasy (Qiagen). Un equivalente de 200 ng de cada ARN se sometió a transcripción inversa a cDNA con un sistema de reacción que consiste en 20 µl de Superscript II (Invitrogen). Se aplicó 1 µl de las muestras resultantes a un sistema de PCR cuantitativa (LightCycler System, Roche) en un sistema de 20 µl usando los cebadores enumerados más adelante. Se usó el protocolo de reacción de LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green (Roche) (consistente en 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C, 10 segundos a 58 °C y 15 segundos a 72 °C).

BMP4:

Cebador de sentido (cadena directa):

qqgcacctcatcacqact (SEC ID NO. 17)

Cebador antisentido (cadena inversa):

ggcccaattcccactccctt (SEC ID N ° 18)

c-myc:

Cebador de sentido (cadena directa):

ttctctccgtcctcgggaattctctg (SEC ID NO. 19)

Cebador antisentido (cadena inversa):

cagcagaaggtgatccagactctgac (SEC ID N ° 20)

IGFBP3:

Cebador de sentido (cadena directa):

acaqccaqcqctacaaaqtt (SEC ID NO. 21)

Cebador antisentido (cadena inversa):

tagcagtgcacgtcctcctt (SEC ID NO. 22)

Los resultados se muestran en la FIG. 10. Todos los datos se expresaron como cantidad relativa expresada basándose en el caso de la no adición de ciclosporina A. Se sabe que BMP4 es un gen que es expresado principalmente por células de la papila capilar durante las etapas de la morfogénesis del folículo capilar y de crecimiento del pelo y actúa para inhibir la interacción de las células epiteliales y de las células mesenquimales (Hens, et al., Development 134, 1221, 2007). Como se muestra en el dibujo, la cantidad expresada de BMP4 disminuyó significativamente hasta aproximadamente el 60%. Además, se sabe que c-myc es un gen que se expresa fuertemente en la región de la protuberancia durante la etapa de desarrollo del pelo y en las células de la

matriz del pelo durante la etapa de crecimiento, y actúa positivamente sobre la proliferación de las células epiteliales foliculares (Bull, J. J. et al., Invest. Dermatol. 116, 617, 2001). Como se muestra en el dibujo, la expresión de c-myc aumentó hasta aproximadamente 1,5 veces la del testigo. Además, se sabe que IGFBP3 es el factor que inhibe el crecimiento del cabello (Weger, et al., J. Invest. Dermatol. 125, 847, 2005), y se ha demostrado claramente que su expresión aumenta durante la fase de latencia (Schlake, et al., Gene Expr. Patterns 4, 141, 2004). Como se muestra en el dibujo, la expresión de IGFBP3 disminuyó significativamente hasta aproximadamente el 60%. En consecuencia, se determinó que los genes implicados en el desarrollo del cabello y el crecimiento del cabello usados en este sistema experimental son alterados por la ciclosporina A, demostrándose así que este sistema experimental puede ser usado para evaluar los efectos de fármacos sobre el desarrollo del cabello y el crecimiento del cabello.

10

Lista de Secuencias

<110> SHISEIDO CO. LTD

<120> **Masa celular capaz de constituir una estructura del tipo de órgano primitivo que comprende más de una línea de células somáticas**

<130> T765

<150> JP2006-176763

<151> 2006-06-27

<160> 22

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador de sentido

<400> 1

gctatcaacc agattcttgg cagaagg

27

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador antisentido

<400> 2
cagctgtcat tcttggacct gtacctg 27

<210> 3
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de sentido

<400> 3
ctacgagtcc aaggcacata tccactg 27

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador antisentido

<400> 4
tccaggaaag tgaggaagtc gctgtag 27

<210> 5
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de sentido

<400> 5
aagaccggcg tccagttcac tactaaag 28

<210> 6
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador antisentido

<400> 6
ggtcaagtgt ttgaattctg cagagagg 28

<210> 7
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de sentido

<400> 7
tccaagttat gttggtgcac tttgtgag 28

<210> 8
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador antisentido

<400> 8
tcaaacatct tgcattgag gcctatcc 28

<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de sentido

<400> 9
ggccaggtac atcgacttcc tctac 25

<210> 10
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador antisentido

<400> 10
tctccttctc tggaaacaat gacatc 26

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de sentido

<400> 11
cgcgagaaga tgacccagat catg 24

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador antisentido

<400> 12
ccacaggact ccatgcccac g 21

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de sentido

<400> 13
caggaactac gtggagatca tg 22

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador antisentido

<400> 14
ccatcccacc aaaactcgat gtc 23

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de sentido

<400> 15
gaagttctct cgggatttct tggatcc 27

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador antisentido

<400> 16
cggttgtggg tatcaatgaa gatgg 25

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de sentido

<400> 17
gggcacctca tcacacgact 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador antisentido

<400> 18
ggcccaattc ccactccctt 20

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador de sentido

<400> 19
ttctctccgt cctcggattc tctg 24

<210> 20
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador antisentido

<400> 20	
cagcagaagg tgatccagac tctgac	26
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Cebador de sentido	
<400> 21	
acagccagcg ctacaaagtt	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Cebador antisentido	
<400> 22	
tagcagtgca cgtcctcctt	20

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una masa celular capaz de servir como estructura de tipo de órgano primitivo compuesta de combinaciones de queratinocitos (células somáticas epiteliales) y células de la papila capilar (células somáticas mesenquimales), que comprende:
 - 5 preparar cultivos que contienen queratinocitos y células de la papila capilar;
mezclar dichos cultivos de queratinocitos y de células de la papila capilar y a continuación añadir un activador de la señal de Wnt que demuestra una actividad inhibidora sobre la glucógeno-sintasa-quinasa-3 (GSK-3) para el cultivo mixto de células;
 - 10 someter el cultivo que contiene dicho activador de la señal de Wnt al método de la gota colgante o método de formación de esferoides durante un período de tiempo predeterminado; y
reemplazar el medio del cultivo cultivado por el método de la gota colgante o método de formación de esferoides con medio que no contiene activador de la señal de Wnt y seguir cultivando durante un periodo de tiempo predeterminado; en donde,
al menos un tipo de los queratinocitos y las células de papila capilar se mantiene en un estado no diferenciado.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en el que el activador de la señal de Wnt que demuestra una actividad inhibidora sobre GSK-3 se elige a partir del compuesto bis-indolo (indirrubina), (BIO) ((2'Z, 3'E)-6-bromoindirrubin-3'-oxima), su análogo acetoxima, BIO-acetoxima (2'Z, 3'E)-6-bromoindirrubin-3'-acetoxima, análogo de tiadiazolidina (TDZD) (4-bencil-2-etil-1,2,4-tiadiazolidina-3,5-diona) y el análogo de oxotiadiazolidina-3-tiona (2,4-dibencil-5-oxotiazolidina-3-tiona), un compuesto de tienil α -clorometil cetona (2-cloro-1-(4,4-dibromo-tiofen-2-il)-etanona), un
20 compuesto de fenil α -bromometil cetona (α -4-dibromoacetofenona), un compuesto de urea que contiene tiazol (N-4-metoxibencil)-N'-(5 -nitro-1,3-tiazol2-il-urea) e inhibidores de péptido GSK-3 β tales como H-KEAPPAPPQSpP-NH₂.
3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que los folículos capilares que tienen una función inductora del folículo capilar se forman a partir de la masa celular.
- 25 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el activador de la señal de Wnt es 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO).

Fig.1

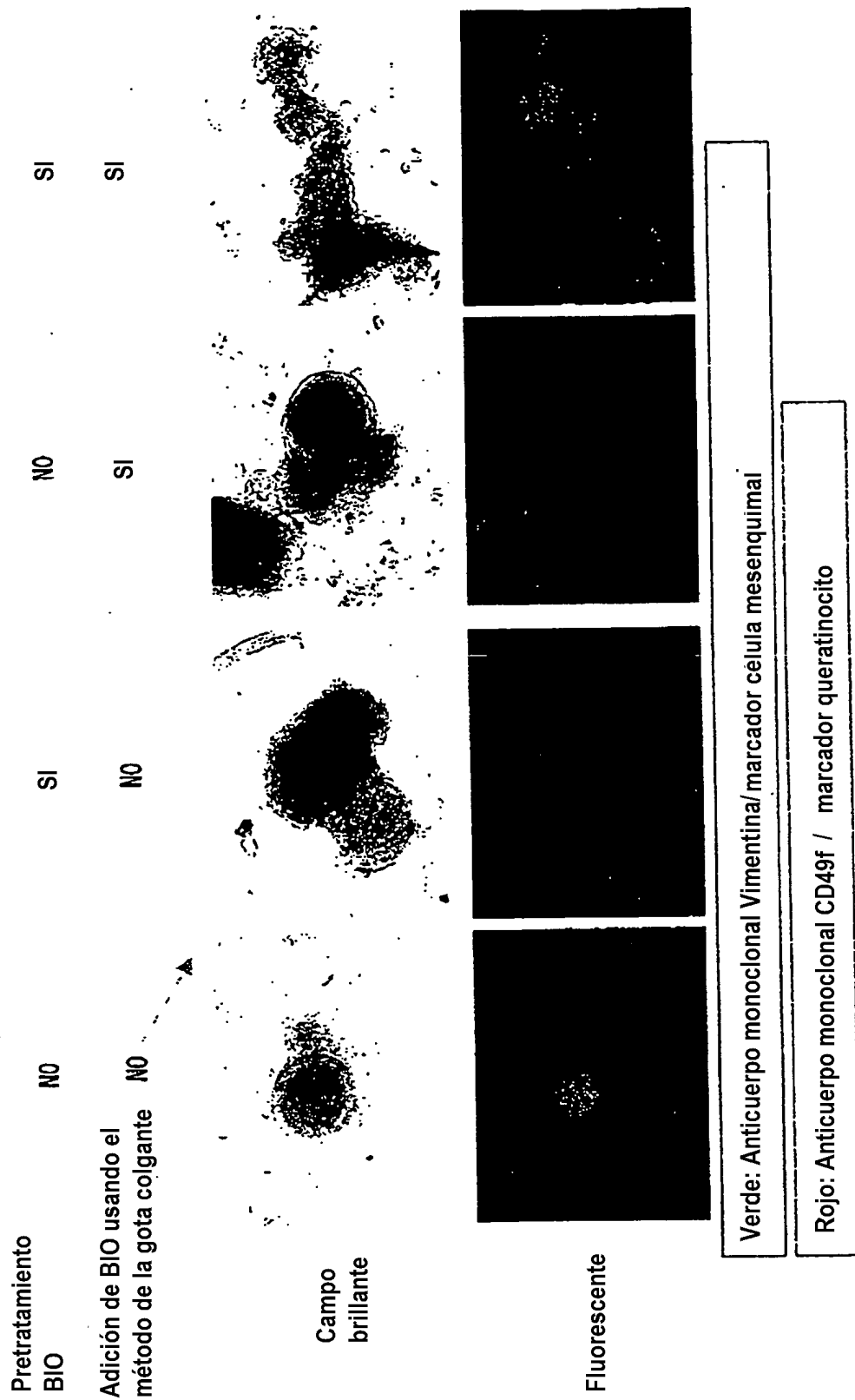
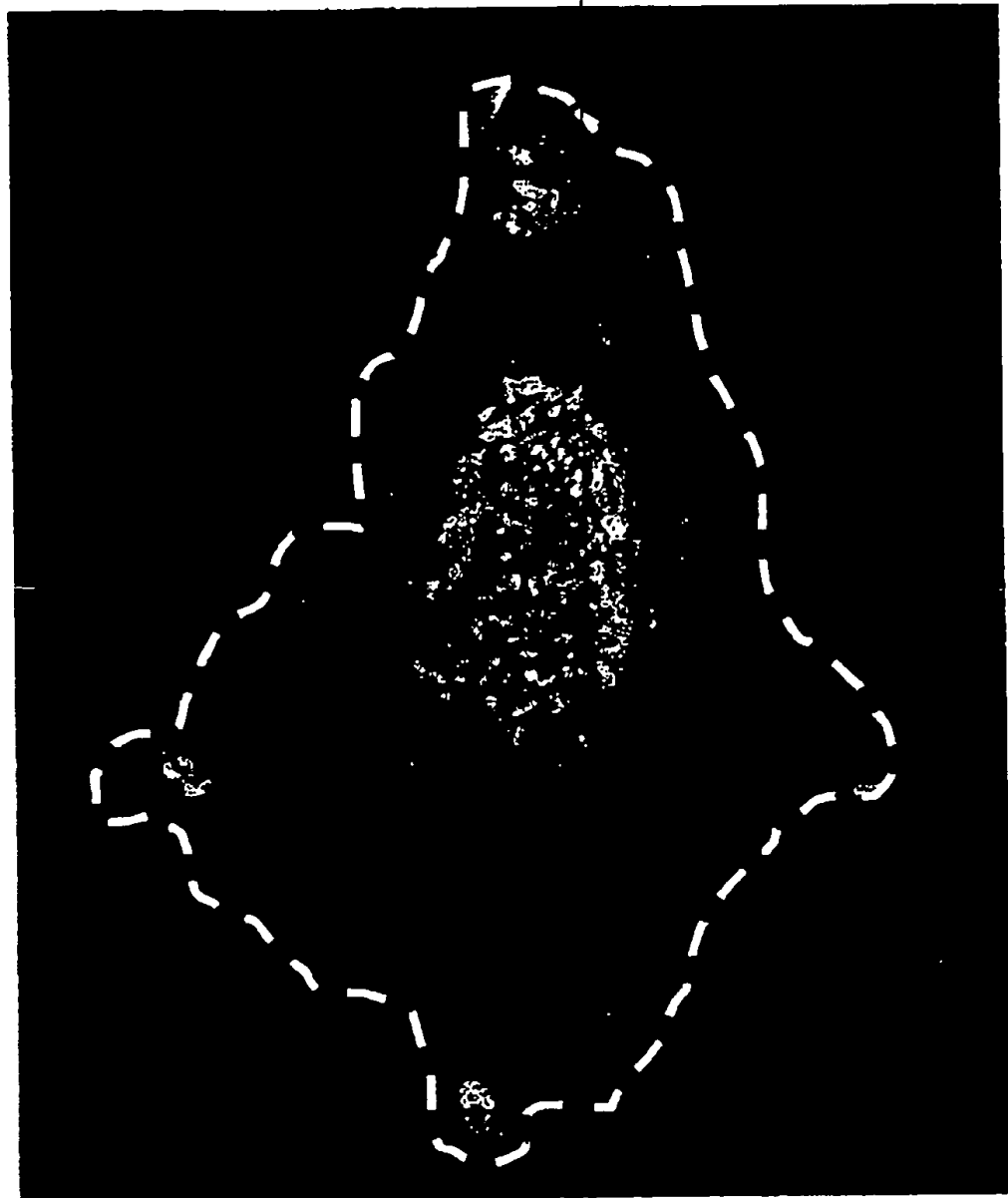


Fig.2



▶ : Célula de la papila capilar

Fig.3



Fig.4

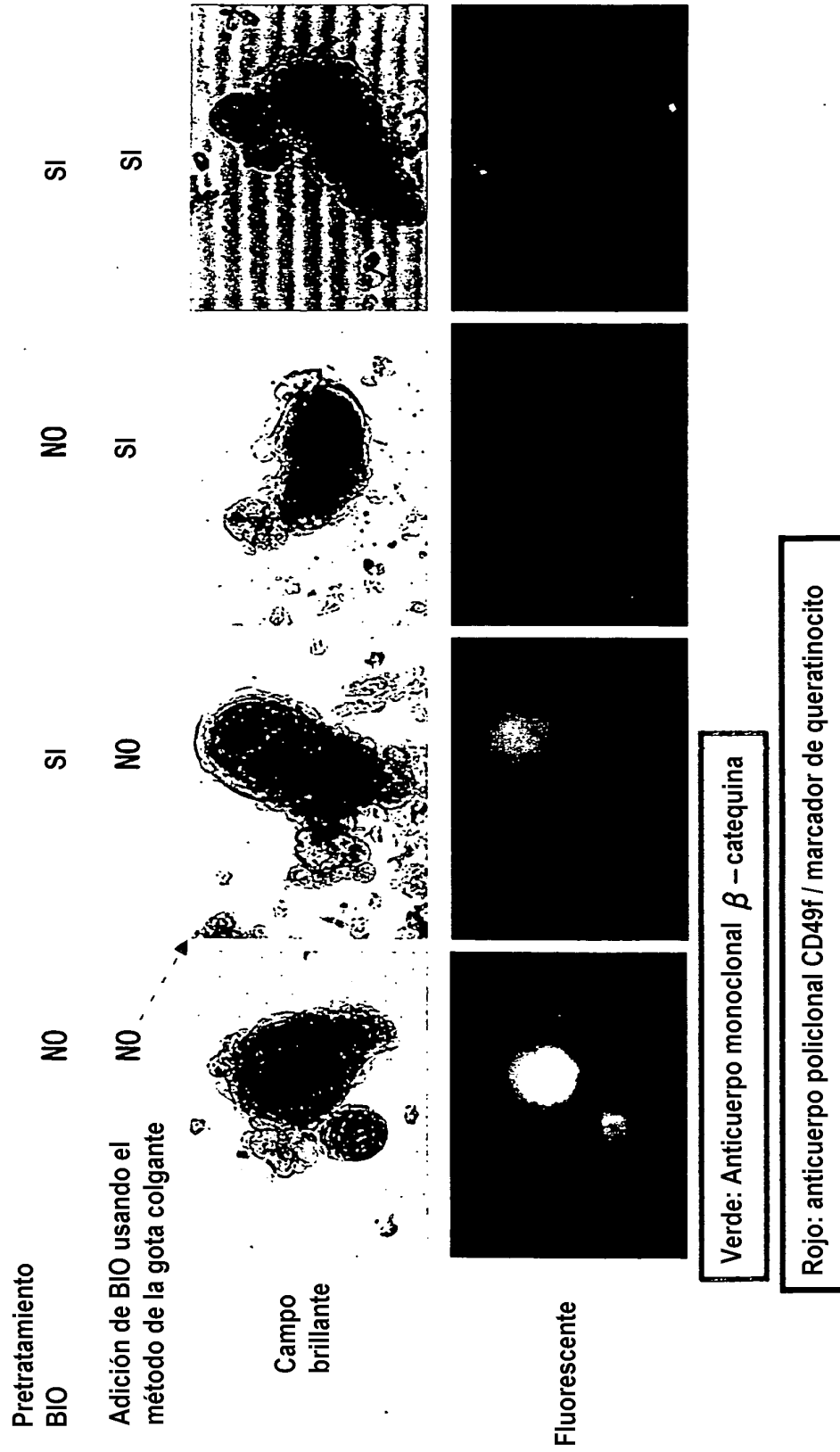
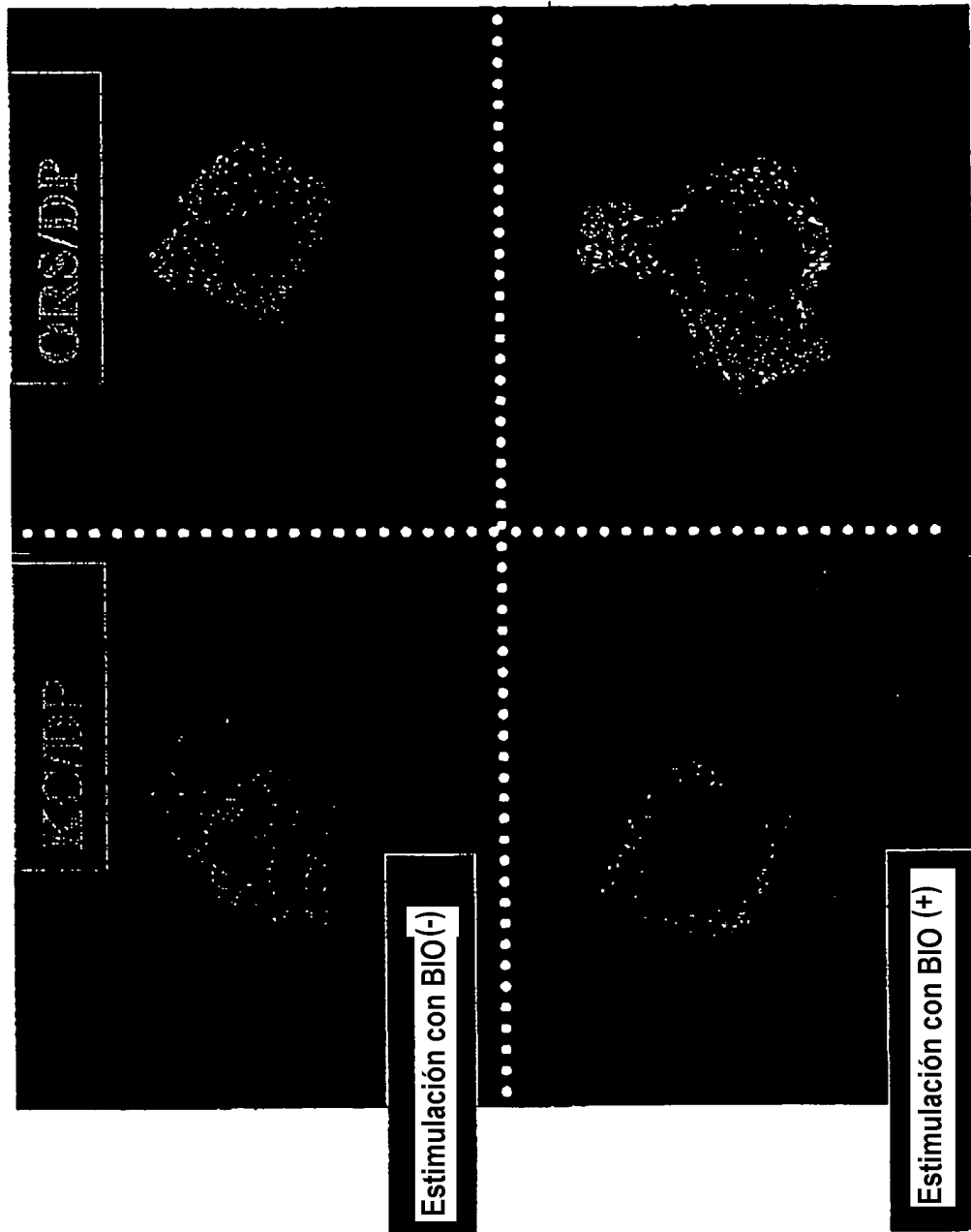


Fig.5



K14 AE13

Fig.6

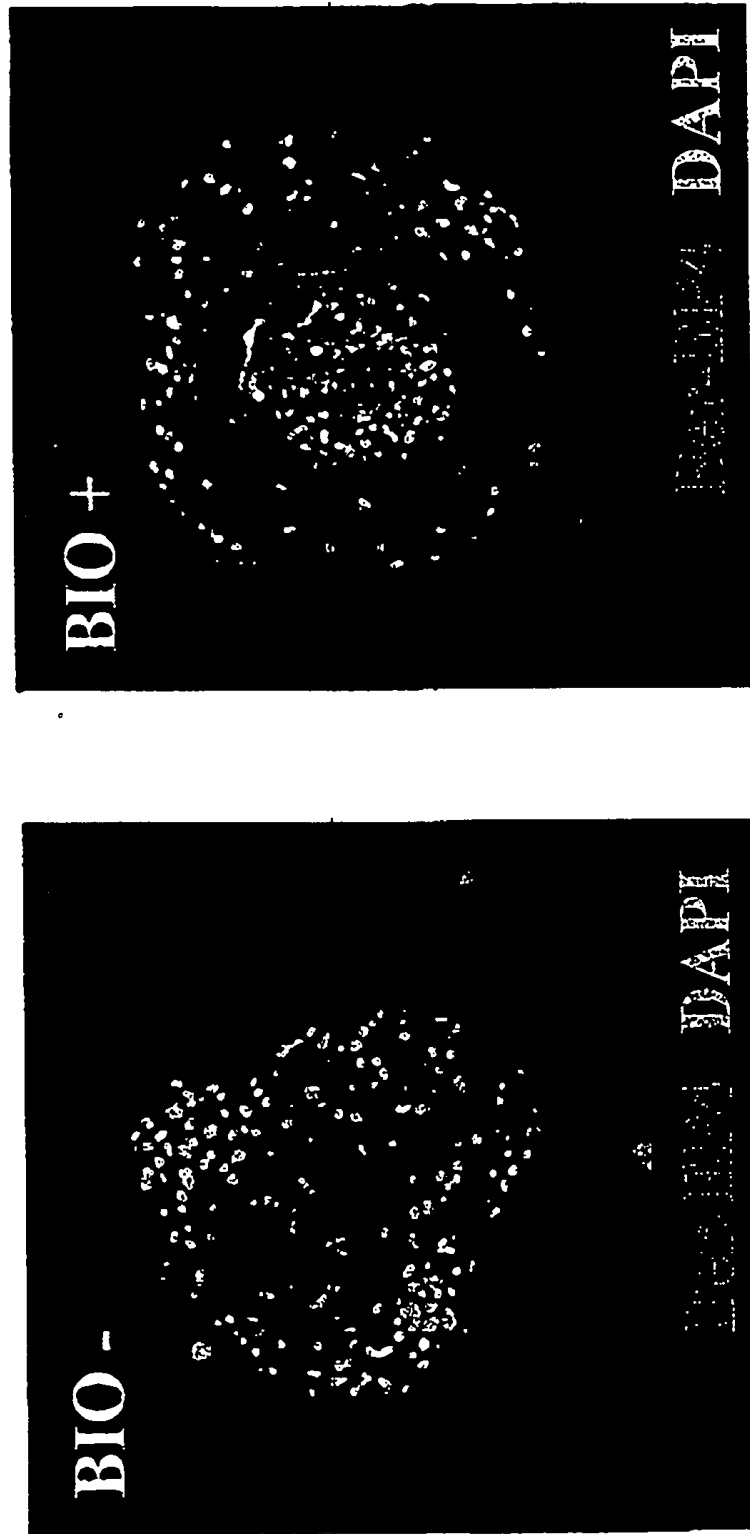
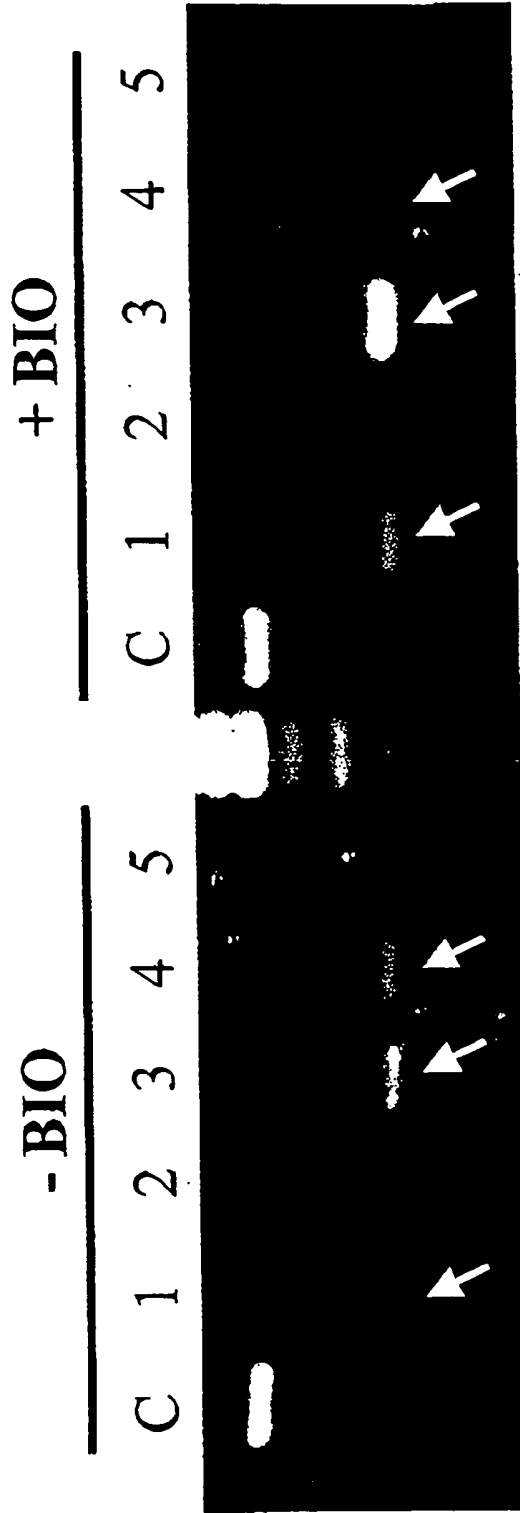


Fig.7

RT-PCR



C. bActina

1. Lef-1: gen secuencia abajo de señalización de Wnt

2. SHH: Gen implicado durante la formación de tejido

3. STAT-3: relacionado con la inducción de folículos capilares

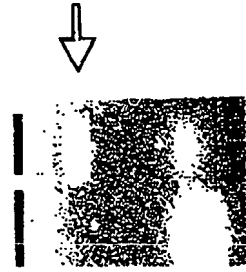
4. Twist-1: marcador de células mesenquimales + marcador de conexión de diferenciación

5. Versican: gen expresado durante la inducción del folículo capilar

Fig.8

Producción de masa celular por el método de la gota colgante BIO (+) 1 semana

BIO (-) (Comienzo de la diferenciación) 0 días 3 días



Wnt3a / RT-PCR

Wnt3a es un gen expresado raramente implicado en organogénesis e interacción epitelial-mesenquimal (EMI)

BIO (+) > mantenimiento de estado indiferenciado > formación de masa celular



BIO (-) > Comienzo de la diferenciación > promoción de la interacción intracelular similar a EMI

Fig.9

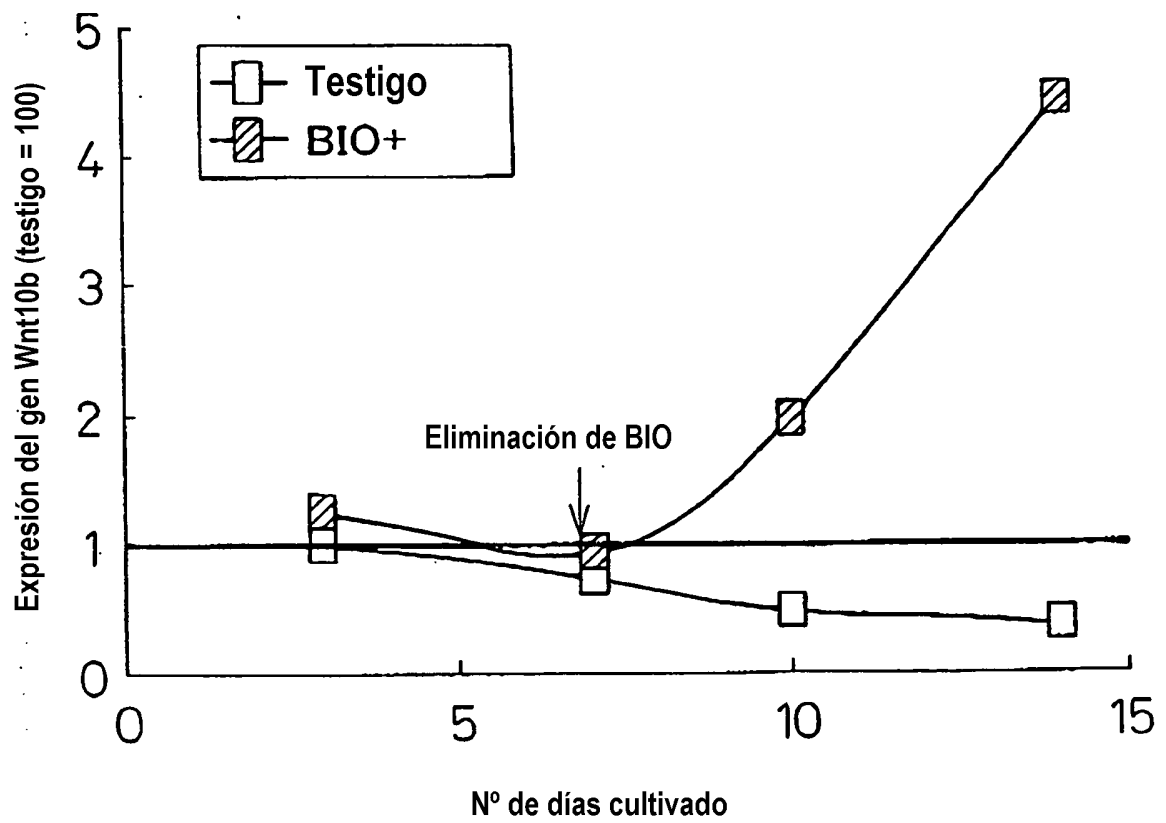


Fig.10

