

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 532**

51 Int. Cl.:

A61L 27/24	(2006.01)
A61L 27/38	(2006.01)
A61L 27/60	(2006.01)
C12N 5/071	(2010.01)
A61F 2/10	(2006.01)
A61K 35/36	(2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2011 PCT/US2011/040937**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011 WO11160055**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2011 E 11796538 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2582791**

54 Título: **Neogénesis del folículo piloso**

30 Prioridad:

18.06.2010 US 344258 P

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

11.05.2018

73 Titular/es:

**THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR
THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE,
INC. (100.0%)
6720A Rockledge Drive, Suite 100
Bethesda, MD 20817, US**

72 Inventor/es:

**THANGAPAZHAM, RAJESH;
DARLING, THOMAS N. y
LI, SHAOWEI**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 667 532 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

Neogénesis del folículo piloso

Declaración de interés del gobierno

5 Esta invención se realizó en parte con el apoyo del gobierno de los EE. UU. En consecuencia, el Gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a sustitutos de la piel capaces de inducir folículos de cabello humano completamente formados. La presente invención también se refiere a métodos y composiciones para inducir neogénesis de folículos capilares humanos. En algunas realizaciones, la presente invención se puede usar para el tratamiento de pérdida de piel de espesor total o parcial, heridas, quemaduras, cicatrices y pérdida total o parcial del cabello.

Antecedentes de la invención

15 Los estudios de cabello y piel continúan estando a la vanguardia de la medicina regenerativa. Los sustitutos de la piel se encontraban entre los primeros productos que se desarrollaron utilizando los principios de la ingeniería de tejidos, y el éxito de estos emprendimientos es evidente en el uso clínico de varios productos disponibles comercialmente. Además, la restauración capilar es una de las áreas de más rápido crecimiento en terapias cosméticas tanto para hombres como para mujeres.

20 El "estándar de oro" clínico actual para el tratamiento de lesiones importantes de la piel implica el uso de autoinjertos de piel de espesor dividido, que consiste en trasplantar la epidermis con una porción de la dermis de un lugar a otro del paciente. Sin embargo, en casos donde no hay suficiente piel del donante para cubrir las heridas, se pueden usar sustitutos de la piel. Los sustitutos de piel disponibles en la actualidad tienen composiciones variadas, pero generalmente comprenden una matriz de colágeno no viva y diferentes combinaciones de queratinocitos y fibroblastos. Por ejemplo, APLIGRAF® (Organogenesis, Inc., Canton, MA), que según se informa es el sustituto de piel compuesta clínicamente más exitoso actualmente disponible, está compuesto de fibroblastos neonatales alogénicos en colágeno bovino de tipo I superpuestos con queratinocitos alogénicos neonatales.

25 Sin embargo, los sustitutos de la piel actualmente disponibles no pueden realizar todas las funciones de la piel normal. Por ejemplo, la neogénesis del folículo piloso no se observa con ningún sustituto de piel actualmente disponible, lo que limita su uso en pacientes. Los folículos pilosos y sus glándulas sebáceas asociadas son importantes para la apariencia, la hidratación de la piel, la formación de barrera y la protección contra los patógenos. Además, los folículos pilosos almacenan células madre epidérmicas que se pueden utilizar durante la curación de heridas. Por lo tanto, la piel con folículos pilosos se cura más rápidamente que la piel sin folículos pilosos. Además, cualquier célula madre que pueda existir en la piel que carece de folículos pilosos se encuentra en capas superficiales de la epidermis, lo que hace que las células sean susceptibles a la pérdida a través de un trauma menor y daños a través de la luz ultravioleta. Por lo tanto, los tratamientos que implican la neogénesis de folículos pilosos normales encontrarían una aplicación mucho más amplia para restaurar la función y el aspecto de la piel normal.

35 Hay disponible una variedad de opciones medicinales y quirúrgicas para restaurar el crecimiento normal del cabello en la piel. Las opciones medicinales generalmente implican el uso de agentes farmacéuticos, como minoxidil o finasteride, para estimular los folículos quiescentes existentes. Las opciones quirúrgicas generalmente implican la recolección de tejido que comprende folículos pilosos de una parte del cuerpo y el trasplante de los folículos a un sitio donde se ha perdido el cabello. Sin embargo, ninguno de los enfoques desencadena la neogénesis del folículo piloso. En cambio, ambos enfoques requieren folículos pilosos existentes en la piel, lo que limita su aplicabilidad en ciertos pacientes.

45 Los métodos actuales de neogénesis del folículo piloso implican injertar tejido que contiene células de papila dérmica (DP) inductiva o vaina dérmica (DS) de un donante en la epidermis de un receptor. Por ejemplo, se han aislado células DS y DP de ratones y ratas, combinadas con células epiteliales, y se injertaron o inyectaron en animales para inducir la neogénesis del folículo piloso. Sin embargo, las células humanas han demostrado ser mucho menos robustas que las células de roedores para inducir folículos capilares, y se han ideado sistemas experimentales complicados para facilitar la formación del folículo capilar humano. Estos sistemas incluyen ensayos de cámara, ensayos de inyección subcutánea y ensayos de sándwich e injerto de colgajo. (Véase Ohyama et al., Exp. Dermatol., 19: 89-99 (2010)). Se formaron estructuras similares a folículos pilosos usando construcciones quiméricas de células mesenquimales murinas y células epidérmicas humanas en un ensayo de cámara (véase Ehama et al., J. Invest. Dermatol., 127: 2106-15 (2007)), y se demostró que las células DP del cuero cabelludo humano adulto inducen folículos pilosos en la epidermis embrionaria de ratón usando un modelo de injerto de colgajo (véase Qiao et al., Regen. Med., 4: 667-76 (2009)). Una comparación reciente del ensayo de cámara y el ensayo en sándwich mostró la misma utilidad para el cribado de las capacidades inductoras del folículo capilar de las células DP humanas. (Véase Inoue et al., Cells Tissues Organs, 190: 120-10 (2009)).

Sin embargo, aunque estos sistemas son muy valiosos como herramientas de investigación, carecen de utilidad clínica porque los folículos capilares producidos por estos métodos no son construcciones completamente humanas (sino construcciones quiméricas de roedores/humanos), no están completamente desarrollados, contienen cabello los ejes en la ubicación anatómica incorrecta, no exhiben supervivencia del injerto a largo plazo y ciclos normales del folículo piloso, y/o no forman folículos pilosos que contengan glándulas sebáceas. Además, los folículos pilosos producidos por tales métodos tienden a crecer en direcciones variables e incontrolables, lo que resulta en un cabello que no se ve natural. Por lo tanto, los folículos producidos por tales métodos no son útiles para la neogénesis del folículo capilar humano en la piel que carece de folículos capilares. Además, aunque se ha informado sobre la capacidad de los queratinocitos del prepucio humano para formar folículos pilosos (Ehama et al.), no ha sido posible generar folículos pilosos humanos utilizando fibroblastos humanos adultos cultivados, incluso cuando las células papilares/vainas dérmicas (que son especializado para la inducción del cabello).

Por lo tanto, existe una necesidad de métodos y composiciones capaces de generar folículos de cabello humano completamente desarrollados y morfológicamente correctos. Tales métodos y composiciones serían útiles para tratar afecciones tales como pérdida de piel de grosor completo o parcial, heridas, quemaduras, cicatrices y pérdida de cabello. La presente invención satisface estas necesidades proporcionando composiciones celulares capaces de regeneración y neogénesis capilar.

Resumen de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones. La invención proporciona un sustituto de piel que comprende células epiteliales y células mesenquimales modificadas, en el que las células mesenquimales modificadas tienen una función TSC1/TSC2 disminuida, una función de mTORC1 aumentada y/o una función de mTORC2 disminuida en comparación con las células mesenquimales de tipo salvaje.

La invención también proporciona el sustituto de piel definido para uso en el trasplante a células de un paciente capaces de inducir folículos capilares humanos.

La invención proporciona además células mesenquimales modificadas para uso en el tratamiento de una afección que requiere el crecimiento de folículos pilosos, glándulas eccrinas y/o glándulas sebáceas, en donde las células mesenquimales modificadas y su uso se definen adicionalmente, como se establece en las reivindicaciones.

En los párrafos [012] a [024], el uso del término "realización", en la medida en que se aplica a un método de tratamiento médico, debe interpretarse como que se refiere a la "realización descrita en el presente documento".

También se describe aquí un método para transplantar células capaces de inducir folículos capilares humanos. En una realización descrita en este documento, el método comprende la administración subdérmica o intradérmica a células mesenquimales modificadas por el paciente que tienen una función TSC1/TSC2 disminuida, una función mTORC1 aumentada, y/o una función mTORC2 disminuida en comparación con células mesenquimales de tipo salvaje. En otra realización, el método comprende además administrar células epiteliales al paciente. En otra realización más, el método comprende injertar a un paciente un sustituto de piel de la invención.

En una realización, el paciente tiene pérdida de piel de espesor parcial, pérdida de piel de espesor total, una herida, una quemadura, una cicatriz o pérdida de cabello. En otra realización, el método induce la formación de glándulas eccrinas. En otra realización más, el método induce la formación de glándulas sebáceas.

En una realización, la función TSC1/TSC2 se ha disminuido, directa o indirectamente porque la función de al menos un regulador negativo de TSC1/TSC2 se ha incrementado (por ejemplo, regulando positivamente una proteína que inhibe la función TSC1/TSC2), y/o se ha disminuido la función de al menos un regulador positivo de TSC1/TSC2 (por ejemplo, regulando negativamente una proteína que estimula la función de TSC1/TSC2) en comparación con las células mesenquimales de tipo salvaje. En otra realización, se ha aumentado la función de mTORC1, se ha disminuido la función de mTORC2, o ambas, a través de miméticos de función de TSC1/TSC2 disminuida.

En una realización, la función de TSC1/TSC2 disminuye, la función de mTORC1 aumenta y/o la función de mTORC2 disminuye al regular negativamente TSC1 o TSC2; regulación positiva de una proteína inhibidora que inhibe la función de TSC1/TSC2 o actúa como un mimético de la función de TSC1/TSC2 disminuida; o subregulación de una proteína estimulante que estimula la función TSC1/TSC2 o que actúa como un mimético del aumento de la función TSC1/TSC2. En una realización, la proteína estimuladora se elige entre al menos uno de TSC1, TSC2, CYLD, LKB1, FLCN, MEN1, NF1, PTEN, PRAS40, 4E-BP1, GSK3 y Deptor. En otra realización, la proteína inhibidora se elige entre al menos uno de Ras, Raf, Mek, Erk, Rsk1, PI3K, Akt1, Akt2, Akt3, Rheb, mTOR, Raptor, Rictor, mLST8, S6K1, proteína ribosómica S6, SKAR, SREBP1, eIF4e, IKKbeta, Myc, Runx1 y p27. En una realización, TSC2 está subregulado. En otra realización, FLCN está subregulado. En otra realización más, tanto TSC2 como FLCN están subregulados.

En una realización, las células mesenquimales modificadas son de tumores anexiales benignos. En otra realización más, las células mesenquimales modificadas son de angiofibromas, fibrofolliculomas, pápulas fibrosas, placas de la frente, nevos del folículo piloso, infundibulomas, isquicomomas, fibromas perifoliculares, nevos sebáceos, nevos organoides, siringomas, parches de piel de sábana, tricodiscomas, tricoepiteliomas, tricoblastomas, triquilomas, tricoadenomas, poromas o fibromas unguales. En otra realización más, las células mesenquimales modificadas son

de tumores asociados con el síndrome de Birt-Hogg-Dube, síndrome de Brooke-Spiegler, síndrome de Cowden, neoplasia endocrina múltiple tipo 1, neurofibromatosis o complejo de esclerosis tuberosa.

5 En una realización, las células mesenquimales modificadas son células mesenquimales de tipo salvaje que se modifican para disminuir la función de TSC1/TSC2, aumentar la función de mTORC1 y/o disminuir la función de mTORC2. En otra realización, las células mesenquimales de tipo salvaje son fibroblastos dérmicos, células de papila dérmica, células de vaina dérmica, células madre pluripotentes inducidas o células madre mesenquimales. En otra realización más, las células mesenquimales de tipo salvaje son fibroblastos dérmicos.

10 En una realización, las células mesenquimales de tipo salvaje se modifican para disminuir la función TSC1/TSC2 aumentando la función de al menos un regulador negativo de TSC1/TSC2 y/o la función decreciente de al menos un regulador positivo de TSC1/TSC2. En otra realización, en las células mesenquimales de tipo salvaje, se ha aumentado la función de mTORC1, se ha disminuido la función de mTORC2, o ambas, a través de miméticos de función de TSC1/TSC2 disminuida.

15 En una realización, en las células mesenquimales de tipo salvaje, la función TSC1/TSC2 disminuye, la función de mTORC1 aumenta y/o la función de mTORC2 disminuye disminuyendo la expresión de TSC1 o TSC2; regulación positiva de una proteína inhibidora que inhibe la función de TSC1/TSC2 o actúa como un mimético de la función de TSC1/TSC2 disminuida; o subregulación de una proteína estimulante que estimula la función TSC1/TSC2 o que actúa como un mimético del aumento de la función TSC1/TSC2.

20 En una realización, la modificación implica silenciar un gen que codifica un regulador positivo de TSC1/TSC2 o un mimético de la función incrementada de TSC1/TSC2. En una realización, el silenciamiento génico puede lograrse tratando las células mesenquimales de tipo salvaje con ARNip, ARNhc o ARNi dirigidos contra el gen diana. En otra realización más, la modificación implica sobreexpresar un gen que codifica un regulador negativo de TSC1/TSC2 o un mimético de la función TSC1/TSC2 disminuida. En una realización, la sobreexpresión se puede lograr transfectando de forma estable las células mesenquimales de tipo salvaje con un vector de expresión que comprende el gen bajo el control de un promotor constitutivamente activo.

25 En otra realización, las células mesenquimales pueden transfectarse con genes del factor de crecimiento o tratarse con factores de crecimiento que disminuyen la función TSC1/TSC2 o actúan como un mimético de la función disminuida de TSC1/TSC2, tales como insulina, EGF, HGF, IGF y KGF. En otra realización más, las células mesenquimales pueden tratarse con proteínas recombinantes que disminuyen la función de TSC1/TSC2 o que actúan como un mimético de la función de TSC1/TSC2 disminuida. Las células pueden tratarse con fármacos que aumentan la expresión de factores de transcripción tales como tiazolidinedionas (que incluyen rosiglitazona y pioglitazona), que son agonistas del factor de transcripción PPAR γ (receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma).

30 En una realización, las células mesenquimales se incorporan en una microesfera. En otra realización, la microesfera se forma mezclando aproximadamente 30.000 células de fibroblastos de prepucio neonatal y queratinocitos de prepucio neonatal en una mezcla 1:1 de medio de papila dérmica y medio libre de suero de queratinocitos, e incubando los grupos durante aproximadamente cuatro semanas. En otra realización, las células mesenquimales están provistas de una matriz. En otra realización más, la matriz es una matriz de colágeno o una matriz de sustancia base. En otra realización más, la matriz es una matriz de colágeno tipo I. En otra realización más, la matriz es una matriz de colágeno de tipo I de rata, una matriz de colágeno de tipo I bovina, o una matriz de colágeno de tipo I humana.

40 En una realización, las células epiteliales comprenden una o más células epiteliales de diferentes fuentes. En otra realización, las células epiteliales son queratinocitos o células de tipo queratinocítico. En otra realización más, los queratinocitos son queratinocitos de prepucio neonatal.

45 En una realización, las células mesenquimales y las células epiteliales se derivan del mismo donante. En otra realización, el donante es el paciente. En otra realización más, las células mesenquimales y las células epiteliales se derivan de diferentes donantes. En otra realización más, el donante de las células mesenquimales o epiteliales es el paciente.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran varias realizaciones no limitativas de la invención y junto con la descripción sirven para explicar los principios de la invención.

50 La Figura 1. A) es una fotografía de una placa fibrosa en la frente de un paciente. B) es una sección histológicamente teñida de un sustituto de piel de la invención que comprende células similares a fibroblastos de un hamartoma de piel nulo TSC2 recubierto por queratinocitos de prepucio neonatal. C) es una fotografía de un ratón injertado con un sustituto de piel de la invención que comprende células similares a fibroblastos de un hamartoma de piel nulo de TSC2 recubierto por queratinocitos de prepucio neonatal. D) es un esquema de la microanatomía del folículo piloso que se desarrolla en un sustituto de piel de la invención que comprende células similares a fibroblastos de un hamartoma de piel nulo de TSC2 recubierto por queratinocitos de prepucio neonatal.

55 La Figura 2 es una representación esquemática de la red mTOR (diana de mamífero de la rapamicina).

Figura 3. A) es una sección teñida histológicamente de piel normal de un paciente con TSC. B) es una sección teñida histológicamente de una placa de frente de un paciente TSC. C) es una sección inmunohistológica teñida con anti-fosfo-S6 de la piel normal de un paciente con TSC. D) es una sección inmunohistológica teñida con anti-fosfo-S6 de una placa de la frente de un paciente con TSC. E) es una sección inmunohistológica teñida con anti-Ki-67 de piel normal de un paciente con TSC. F) es una sección inmunohistoquímica anti-Ki-67 teñida de una placa de la frente de un paciente con TSC. G) es una sección inmunohistológica teñida con anti-CD68 de piel normal de un paciente con TSC. H) es una sección inmunohistológica teñida con anti-CD68 de una placa de la frente de un paciente con TSC. I) es una sección inmunohistológica teñida con anti-CD31 de piel normal de un paciente con TSC. J) es una sección inmunohistológica teñida con anti-CD31 de una placa de la frente de un paciente con TSC.

Figura 4. Tinciones histológicas de piel normal (A) y hamartomas TSC cutáneos de una placa de la frente (B), un angiofibroma (C) y un fibroma periungueal (D).

La Figura 5. A) es un análisis de secuencia de parte del gen TSC2 en células similares a fibroblastos sin CTS2. B) es un análisis de los polimorfismos de repetición de nucleótidos de microsatélites (D16S291, D16S521 y D16S663) de células normales y células similares a fibroblastos sin CTS2. Los pares de cebadores para D16S291 son cebador directo, 5'GCAGCCTCAGTTGTGTTTCGTAATC3' y cebador inverso, 5'AGTGCTGGGATTACAGGCATGAACC3'. Los pares de cebadores para D16S521 son cebador directo, 5'AGCGAGACTCCGTCTAAAAA3' y cebador inverso, 5'TACAACCAAATGCCTTACG3'. Los pares de cebadores para D16S663 son cebador directo, 5'GTCTTTGTAGGAATGAAATCAT3' y cebador inverso, 5'ATTGCAGCAAGACTCCATCT3'. C) es una microdissección de una vaina dérmica de xenoinjerto tumoral que abarca la porción inferior del epitelio folicular. D) es un gel de 10% TBE que muestra los resultados de una digestión con enzima de restricción BsmA1 de Exon 10 de TSC2 amplificado de fibroblastos normales TSC ("normal"), células de fibroblastos similares a TSC2 nulo ("tumor") y regiones del epitelio folicular microdisseccionado por láser ("FE") o vaina dérmica ("DS") de xenoinjertos tumorales.

La Figura 6. A) es una inmunotransferencia Western de lisados celulares de células normales y placas de frente de pacientes con TSC. La transferencia muestra niveles de expresión de actina (control), S6K1 fosforilada (pS6K1), S6K1 no fosforilada, proteína ribosómica fosforilada S6 (pS6) y S6 como una función del tratamiento con rapamicina. B) es un gráfico de barras que presenta datos de proliferación celular para células normales y células de placa frontal de pacientes con TSC en función del tratamiento con rapamicina.

La Figura 7 es una inmunotransferencia Western de lisados celulares de células normales, placas de la frente y angiofibromas de pacientes con TSC. La transferencia muestra niveles de expresión para actina (control), TSC2 (tuberina), S6 fosforilado (pS6) y S6 no fosforilado.

La Figura 8. A) es una tinción histológica de injertos fabricados con fibroblastos normales de TSC y queratinocitos de prepucio neonatal humano. B) es una tinción histológica de injertos que comprende células sin CTS2 de hamartomas de piel TSC y queratinocitos de prepucio neonatal humano.

Figura 9. A) es una tinción histológica de un folículo piloso anágeno con una glándula sebácea y un tallo del cabello de un sustituto de piel que comprende células TSC2 nulas de hamartomas cutáneos TSC 17 semanas después del injerto (barra de escala = 130 µm). B) es una tinción histológica de una sección longitudinal de un folículo piloso con cabello humano procedente de un sustituto de piel que comprende células sin CTS2 de hamartomas cutáneos TSC 17 semanas después del injerto (barra de escala = 130 µm). C) es una tinción histológica de una sección transversal de un folículo piloso anágeno que muestra una vaina radicular externa, vaina radicular interna, alopecia y glándula sebácea de un sustituto de piel que comprende células TSC2-nulas de hamartomas de piel TSC 17 semanas después del injerto (barra de escala = 35 µm). D) es una tinción histológica de un bulbo piloso con papila dérmica, vaina dérmica inferior, matriz con figura mitótica y vaina radicular interna y externa de un sustituto de piel que comprende células TSC2 nulas de hamartomas cutáneos TSC 17 semanas después del injerto (barra de escala = 35 µm). E) y F) son células epiteliales inmunohistológicas teñidas con anticuerpo anti-COX IV y células dérmicas de un sustituto de piel que comprende células TSC2 nulas de hamartomas cutáneos TSC 17 semanas después del injerto (barras de escala: Figura 9E = 130 µm, Figura 9F = 35 µm). G) y H) son una hibridación in situ de células epidérmicas incluyendo epitelio de folículo piloso de un sustituto de piel que comprende células nulas de TSC2 de hamartomas de piel TSC 17 semanas después del injerto que muestra una sonda fluorescente para el cromosoma Y humano (rojo) hibridado con núcleos (azul) (barras de escala: Figura 9G = 130 µm, Figura 9H = 20 µm). I) y J) son secciones inmunohistológicas teñidas con anticuerpo anti-nestina. Las células teñidas son de la papila dérmica y la región dérmica inferior de la envoltura de un sustituto de piel que comprende células sin CTS2 de hamartomas cutáneos TSC 17 semanas después del injerto (barras de escala: Figura 8I = 65 µm, Figura 8J = 35 µm). K) es una sección inmunohistológica anti-versicolor teñida con anticuerpos. Las células teñidas son de la papila dérmica y la región de la vaina dérmica inferior de un folículo anágeno del cabello a partir de un sustituto de piel que comprende células sin CTS2 de hamartomas cutáneos TSC 17 semanas después del injerto (barra de escala = 65 µm). L) es una sección teñida con fosfatasa alcalina que muestra actividad enzimática desde la papila dérmica y la región de la vaina inferior del folículo capilar desde un sustituto de piel que comprende células sin CTS2 de hamartomas cutáneos TSC 17 semanas después del injerto (barra de escala = 65 µm). M) es una sección inmunohistológica teñida con anticuerpo anti-Ki-67. Las células teñidas provienen de la capa basal de la epidermis y la matriz del folículo piloso a partir de un sustituto de piel que comprende células TSC2 nulas de hamartomas cutáneos TSC 17 semanas después del injerto (barra de escala = 65 µm). N) y O) son secciones inmunohistológicas teñidas con anticuerpo de queratina 15. Las células teñidas son la capa basal de la

vaina de la raíz externa por debajo del infundíbulo folicular a partir de un sustituto de piel que comprende células TSC2 nulas de hamartomas cutáneos TSC 17 semanas después del injerto (barra de escala = 65 μm). P) es una sección inmunohistológica teñida con anticuerpo anti-queratina 75. Las células teñidas son la capa complementaria del folículo piloso de un sustituto de piel que comprende células nulas de TSC2 de hamartomas cutáneos TSC 17 semanas después del injerto (barra de escala = 65 μm).

La Figura 10. A) es una sección inmunohistológica teñida con anticuerpo anti-HLA. Las células teñidas son la dermis, la epidermis y los folículos pilosos de un sustituto de piel que comprende células de fibroblastos nulas en TSC2 de un angiofibroma y queratinocitos de prepucio neonatal (barra de escala = 65 μm). B) es una hibridación in situ de una sonda fluorescente al cromosoma Y humano que se hibrida con los núcleos de la epidermis y el epitelio folicular cuando se agrega a una sección congelada de un injerto que comprende queratinocitos de prepucio neonatal y células de fibroblastos TSC2 nulas de un angiofibroma (barra de escala = 65 μm).

La Figura 11. A) es una sección inmunohistoquímica del anticuerpo anti-COX IV teñida de un xenoinjerto que contiene fibroblastos normales de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con vehículo (barra de escala = 35 μm). B) es una sección inmunohistoquímica del anticuerpo anti-COX IV teñida de un xenoinjerto que contiene fibroblastos normales de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con rapamicina (barra de escala = 35 μm). C) es una sección inmunohistoquímica del anticuerpo anti-COX IV teñida de un xenoinjerto que contiene fibroblastos sin CTS2 de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con vehículo (barra de escala = 35 μm). D) es una sección inmunohistoquímica del anticuerpo anti-COX IV teñida de un xenoinjerto que contiene fibroblastos TSC2-nulos de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con rapamicina (barra de escala = 35 μm). E) es una sección teñida con anticuerpo inmunohistoquímico anti-pS6 de un xenoinjerto que contiene fibroblastos normales de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con vehículo (barra de escala = 35 μm). F) es una sección teñida con anticuerpo anti-pS6 inmunohistoquímico de un xenoinjerto que contiene fibroblastos normales de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con rapamicina (barra de escala = 35 μm). G) es una sección teñida con anticuerpo inmunohistoquímico anti-pS6 de un xenoinjerto que contiene fibroblastos sin CTS-TSC2 de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con vehículo (barra de escala = 35 μm). H) es una sección teñida con anticuerpo inmunohistoquímico anti-pS6 de un xenoinjerto que contiene fibroblastos sin CTS-TSC2 de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con rapamicina (barra de escala = 35 μm). I) es una sección inmunohistoquímica del anticuerpo anti-Ki-67 teñida de un xenoinjerto que contiene fibroblastos normales de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con vehículo (barra de escala = 35 μm). J) es una sección inmunohistoquímica del anticuerpo anti-Ki-67 teñida de un xenoinjerto que contiene fibroblastos normales de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con rapamicina (barra de escala = 35 μm). K) es una sección inmunohistoquímica del anticuerpo anti-Ki-67 teñida de un xenoinjerto que contiene fibroblastos TSC2-nulos de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con vehículo (barra de escala = 35 μm). L) es una sección inmunohistoquímica del anticuerpo anti-Ki-67 teñida de un xenoinjerto que contiene fibroblastos sin CTS2 de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con rapamicina (barra de escala = 35 μm). M) es una sección inmunohistoquímica de anticuerpo anti-F480 teñida de un xenoinjerto que contiene fibroblastos normales de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con vehículo (barra de escala = 35 μm). N) es una sección inmunohistoquímica de anticuerpo anti-F480 teñida de un xenoinjerto que contiene fibroblastos normales de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con rapamicina (barra de escala = 35 μm). O) es una sección inmunohistoquímica de anticuerpo anti-F480 teñida de un xenoinjerto que contiene fibroblastos sin CTS2 de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con vehículo (barra de escala = 35 μm). P) es una sección inmunohistoquímica del anticuerpo anti-F480 teñida con un xenoinjerto que contiene fibroblastos sin CTS2 de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con rapamicina (barra de escala = 35 μm). Q) es una sección inmunohistoquímica de anticuerpo anti-CD31 teñida de un xenoinjerto que contiene fibroblastos normales de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con vehículo (barra de escala = 35 μm). R) es una sección inmunohistoquímica del anticuerpo anti-CD31 teñida de un xenoinjerto que contiene fibroblastos normales de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con rapamicina (barra de escala = 35 μm). S) es una sección teñida con anticuerpo anti-CD31 inmunohistoquímico de un xenoinjerto que contiene fibroblastos sin CTS-TSC2 de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con vehículo (barra de escala = 35 μm). T) es una sección inmunohistoquímica anti-CD31 teñida de un xenoinjerto que contiene fibroblastos sin CTS2 de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con rapamicina (barra de escala = 35 μm).

La Figura 12. A) es un gráfico de barras que muestra el número promedio de células dérmicas reactivas con anticuerpo anti-COX-IV específico humano con respecto al área dérmica total de xenoinjertos que contienen fibroblastos sin CTS o normales de un paciente con TSC. Los xenoinjertos se tomaron de ratones tratados con o sin rapamicina, como se indica. Los resultados son medias \pm SE (**= $p < 0.01$). B) es un gráfico de barras que muestra el número promedio de células dérmicas reactivas con anticuerpo anti-pS6 en relación con el área dérmica total de xenoinjertos que contienen fibroblastos nulos en TSC2 o normales de un paciente con TSC. Los xenoinjertos se tomaron de cada grupo de ratones tratados con o sin rapamicina, como se indica. Los resultados son medias \pm SE (**= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$). C) es un gráfico de barras que muestra la intensidad promedio de la tinción positiva para el anticuerpo anti-pS6 en la epidermis cuantificada como intensidad de fluorescencia con respecto al área epidérmica total de xenoinjertos que contienen fibroblastos nulos en TSC2 o normales de un paciente con TSC. Los xenoinjertos se tomaron de ratones tratados con o sin rapamicina, como se indica. Los resultados son medias \pm SE (**= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$). D) es un gráfico de

barras que muestra el número promedio de células epidérmicas no foliculares reactivas con anticuerpo anti-Ki-67 con respecto a la longitud epidérmica de xenoinjertos que contienen fibroblastos nulos o sin CTS2 de un paciente con TSC. Los xenoinjertos se tomaron de ratones tratados con o sin rapamicina, como se indica. Los resultados son medias \pm SE (*= $p < 0.05$). E) es un gráfico de barras que muestra el número promedio de células dérmicas reactivas con anticuerpo anti-F4/80 en relación con el área dérmica de xenoinjertos que contienen fibroblastos nulos en TSC2 o normales de un paciente con TSC. Los xenoinjertos se tomaron de ratones tratados con o sin rapamicina, como se indica. Los resultados son medias \pm SE (***= $p < 0.001$). F) es un gráfico de barras que muestra el número promedio y el área de vasos sanguíneos positivos anti-CD31 expresados como el número de vasos por unidad de área dérmica de xenoinjertos que contienen fibroblastos nulos en TSC2 o normales de un paciente con TSC. Los xenoinjertos se tomaron de ratones tratados con o sin rapamicina, como se indica. Los resultados son medias \pm SE (**= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$). G) es un gráfico de barras que muestra el número promedio y el área de los vasos sanguíneos positivos anti-CD31 expresados como el área de sección transversal promedio de cada vaso de xenoinjertos que contienen fibroblastos nulos en TSC2 o normales de un paciente con TSC. Los xenoinjertos se tomaron de ratones tratados con o sin rapamicina, como se indica. Los resultados son medias \pm SE (***= $p < 0.001$). H) es un gráfico de barras que muestra el número promedio y el área de vasos sanguíneos positivos anti-CD31 expresados como la relación del área del vaso al área dérmica dentro de xenoinjertos que contienen fibroblastos nulos en TSC2 o normales de un paciente con TSC. Los xenoinjertos se tomaron de ratones tratados con o sin rapamicina, como se indica. Los resultados son medias \pm SE (***= $p < 0.001$).

Figura 13. A) es una sección con tinción inmunohistoquímica de HLA de un xenoinjerto que contiene fibroblastos normales de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con vehículo. B) es una sección con tinción inmunohistoquímica HLA de un xenoinjerto que contiene fibroblastos normales de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con rapamicina. C) es una sección con tinción inmunohistoquímica HLA de un xenoinjerto que contiene fibroblastos sin CTS2 de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con vehículo. D) es una sección con tinción inmunohistoquímica de HLA de un xenoinjerto que contiene fibroblastos sin CTS2 de un paciente con TSC. El xenoinjerto se tomó de un ratón tratado con rapamicina.

La Figura 14 es un gráfico de barras que cuantifica la positividad de HLA como un parámetro de intensidad de fluorescencia en la dermis de xenoinjertos con respecto al área dérmica para xenoinjertos que comprenden fibroblastos normales o fibroblastos sin CTS2 de un paciente con TSC. Los xenoinjertos se tomaron de ratones tratados con o sin rapamicina, como se indicó (**= $p < 0,01$).

La Figura 15 es una hibridación in situ de un sustituto de piel que comprende células nulas en TSC2 de hamartomas de piel TSC 17 semanas después del injerto. La tinción con DAPI muestra núcleos de células en azul. Cy3 es una sonda centromérica específica para humanos en rojo con células marcadas con Cy3 de la vaina dérmica inferior marcadas con una flecha horizontal y fibroblastos dérmicos con sello Cy3 adyacente marcados con flechas verticales. FITC es una sonda centromérica específica de ratón en verde con células endoteliales marcadas con FITC marcadas con una punta de flecha. Merge es la combinación de estas tres imágenes.

La Figura 16 muestra imágenes microscópicas de fluorescencia (paneles a la izquierda) e imágenes microscópicas de contraste de fase (paneles a la derecha) de fibroblastos de prepucio neonatal transducidos de forma estable con vectores ARNsh. Las células se transdujeron con control GAPDHsh, control de ARNsh no objetivo (Non Silencing sh) o vector de inactivación TSC2 (TSC2sh1, TSC2sh2, TSC2sh3).

La Figura 17 es una inmunotransferencia Western de lisados celulares de células de fibroblastos de prepucio transducidas con control de ARNsh no objetivo (shNT) o vector de inactivación de TSC2 (shTSC2) que muestra los niveles de TSC2 (TSC2, banda superior), proteína ribosómica fosforilada S6 (pS6), proteína ribosómica total S6 (S6) y control de carga de tubulina.

Figura 18. A) es una tinción (azul) con actividad de fosfatasa alcalina (AP) en cultivos monocapa de células TSC2 nulas de un tumor de piel de paciente TSC en el pasaje 4 (P=4) y fibroblastos normales (P=4). B) es una tinción de actividad AP (azul) en cultivos monocapa de células de papila dérmicas humanas normales y células mesenquimales modificadas (fibroblastos de prepucio neonatal transducidos con shTSC2) en el pasaje temprano (P=4) y pasaje tardío (P=7). DP = células papilares dérmicas humanas normales; shNT = fibroblastos de prepucio transducidos con ARNsh de control; shTSC2 = fibroblastos de prepucio transducidos con ARNhc de TSC2.

La Figura 19 es una tinción de actividad AP (azul) en cultivos monocapa de células de papila dérmica (DP) o fibroblastos de prepucio neonatal (NFF) transducidos de forma estable con partículas lentivirales con inactivación de TSC2 (shTSC2) en comparación con control sin plantilla (NT). NT = control de ARNhc; shTSC2 = ARNc de TSC2; DP = células papilares dérmicas; NFF = células de fibroblastos de prepucio neonatal; 4X y 10X indican niveles de aumento.

La Figura 20 es una tinción de actividad AP (azul) en cultivos en monocapa (P=3) de fibroblastos de prepucio neonatal transducidos de forma estable con partículas lentivirales con una secuencia no direccional (NT) como control y tres secuencias diferentes (FLCN1, FLCN2 y FLCN3) dirigido a silenciar el gen FLCN. NT = control de ARNhc; shFLCN1, shFLCN2 y scFLCN3 = tres diferentes ARNsh FLCN; shFLCN123 = combinación de las tres secuencias silenciadoras FLCN.

La Figura 21 muestra los resultados de un ensayo de folículo capilar de cultivo colgante in vitro A) es un grupo compuesto por fibroblastos de prepucio neonatal transducidos con vector de precipitación TSC2 (shTSC2) y queratinocitos de prepucio neonatal (NFK) en una relación 1:1, teñidos con hematoxilina y eosina (H&E). B) es un grupo compuesto por fibroblastos de prepucio neonatal transducidos con vector de control no dirigido (NT) y NFK en una relación 1:1, teñidos con H&E. C) es un grupo compuesto por fibroblastos de prepucio neonatal transducidos con el vector de inactivación de TSC2 (shTSC2) y NFK en una relación 1:1, teñidos con anticuerpo anti pan citoqueratina. D) es un grupo compuesto por fibroblastos de prepucio neonatal transducidos con vector de control no dirigido (NT) y NFK en una relación 1:1, teñidos con anticuerpo anti panicoqueratina. E) es un grupo compuesto por fibroblastos de prepucio neonatal transducidos con el vector de precipitación TSC2 (shTSC2) y NFK en una proporción de 1:1, teñidos con anticuerpo anti-pan-citoqueratina y visualizados mediante microscopía de fluorescencia. La autofluorescencia de una estructura similar a la fibra capilar está marcada con una flecha.

La Figura 22 muestra la formación de cabello in vitro de estructuras similares a los folículos capilares en compuestos dérmico-epidérmicos (sustitutos de la piel). A) muestra el análisis de hematoxilina y eosina (H&E) de los equivalentes de la piel cuatro días después de llevar el compuesto a la interfaz aire-líquido. Se compone de fibroblastos de prepucio neonatal transducidos y que expresan de manera estable el vector inactivado TSC2 (1 mg/mL de colágeno de cola de rata tipo 1 en 10% FBS/DMEM, y superpuestos con 1×10^6 queratinocitos. Se tomó una imagen con un objetivo 10X. B) es un sustituto de piel teñido con H&E ocho días después de llevar el compuesto a la interfaz aire-líquido. La imagen fue tomada con un objetivo de 10X. C) es un sustituto de piel teñido con anticuerpo anti-pan-citoqueratina cuatro días después de llevar el compuesto a la interfaz aire-líquido. La imagen fue tomada con un objetivo de 10X. D) es un sustituto de piel teñido con anticuerpo anti panicoqueratina ocho días después de llevar el compuesto a la interfaz aire-líquido. La imagen fue tomada con un objetivo de 10X. E) es un sustituto de piel teñido con anticuerpo anti-pan-citoqueratina cuatro días después de llevar el compuesto a la interfaz aire-líquido. La imagen fue tomada con un objetivo 4X.

La Figura 23 muestra secciones teñidas con hematoxilina y eosina de compuestos dérmico-epidérmicos, muestreados 10 semanas después del injerto. Los compuestos se componen de células de la papila dérmica transducidas con ARNsh a TSC2, colágeno tipo I y queratinocitos de prepucio neonatal normales. A) es una imagen de baja potencia (40x) del injerto que contiene múltiples folículos capilares. B) es una imagen de potencia media (100X) de un infundíbulo del folículo piloso (lado derecho) y folículo piloso proximal (suprabulbar) (lado izquierdo). C) es una imagen de mayor poder (400x) del folículo capilar proximal, que muestra las vainas radicales externas e internas y la corteza pigmentada del tallo piloso. D) es una imagen de alta potencia de un infundíbulo del folículo piloso con desarrollo temprano de glándulas sebáceas y fibra capilar pigmentada.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un" "una" y "el/la" pretenden incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, en la medida en que los términos "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con" o variantes de los mismos se usan en la descripción detallada y/o en las reivindicaciones, dichos términos están destinados a ser inclusivos de una manera similar al término "que comprende".

Como se usa en el presente documento, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" significan dentro de un rango de error aceptable para el valor particular determinado por un experto habitual en la técnica, que dependerá en parte de cómo se mida o determine el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar de 1 a 1.5 desviaciones estándar o de 1 a 2 desviaciones estándar, según la práctica en la técnica. Alternativamente, "aproximadamente" puede significar un rango de hasta e incluyendo 20%, 10%, 5% o 1% de un valor dado. Alternativamente, particularmente con respecto a sistemas o procesos biológicos, el término puede significar hasta e incluyendo un orden de magnitud, hasta e incluyendo 5 veces, e incluso hasta 2 veces, de un valor. Cuando se describen valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, debe suponerse el significado de "aproximadamente" dentro de un margen de error aceptable para el valor particular.

Como se usa en este documento, el término "glándula apocrina" se refiere a glándulas en la piel que tienen una porción excretora tubular enrollada con lumen ampliamente dilatado, revestido por células epiteliales cuboidales con citoplasma eosinófilo y hocios apicales, y una capa discontinua externa de células mioepiteliales que descansan sobre una membrana basal prominente.

Como se usa en el presente documento, el término "composición" se refiere a una mezcla que contiene un componente o componentes terapéuticamente activos y un vehículo, tal como un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable que es convencional en la técnica y que es adecuado para administración a un sujeto con fines terapéuticos. El componente terapéuticamente activo puede incluir las células mesenquimales de la invención. En otras realizaciones, el término "composición" se refiere a los sustitutos de la piel de la invención, que se describen con más detalle a continuación. Las composiciones de la invención pueden comprender además una matriz, que se define a continuación.

Como se usa en el presente documento, el término "papila dérmica" se refiere a la papila dérmica folicular, es decir, a la condensación de células mesenquimales en la base del folículo piloso.

5 Como se usa en el presente documento, el término "función TSC1/TSC2 disminuida" se refiere a una subregulación en el nivel, función, actividad y/o efecto del complejo TSC1/TSC2 y puede producirse por subregulación de TSC1 o TSC2, o por cambios en la función de los reguladores en sentido ascendente de TSC1 o TSC2.

10 Además, la función del complejo TSC1/TSC2 puede imitarse por otras proteínas que afectan a sus dianas corriente abajo, mTORC1 y mTORC2. Por lo tanto, la regulación positiva de una proteína que actúa como mimética de la función disminuida TSC1/TSC2 y/o subregulación de una proteína que actúa como un mimético del aumento de la función TSC1/TSC2 aumentará la función mTORC1, disminuirá la función mTORC2 o ambas y se compararán dichos cambios a las células mesenquimales de tipo salvaje que se desean en una realización de esta invención.

15 La disminución de la función TSC1/TSC2, el aumento de la función mTORC1 y/o la disminución de la función mTORC2 pueden ocurrir por: (1) subregulación de TSC1 y/o TSC2; (2) regulación positiva de una proteína inhibidora que inhibe la función TSC1/TSC2 o que actúa como un mimético de la función disminuida de TSC1/TSC2; o (3) subregulación de una proteína estimulante que estimula la función TSC1/TSC2 o que actúa como un mimético del aumento de la función TSC1/TSC2. Los miméticos de la función aumentada o disminuida incluyen otras moléculas que afectan la actividad mTORC1 o mTORC2 que están corriente abajo de TSC1/TSC2 en la red de señalización mTOR.

20 Una realización de esta invención incluye la función decreciente de al menos una proteína estimulante (por ejemplo, LKB1, NF1, PTEN, CYLD, FLCN, PRAS40, 4E-BP1, GSK3 y MEN1) y/o función creciente de al menos una proteína inhibitoria (por ejemplo, Ras, Raf, Mek, Erk, Rsk1, PI3K, Akt1, Akt2, Akt3, Rheb, mTOR, Raptor, Rictor, mLST8, S6K1, proteína ribosómica S6, SKAR, SREBP1, eIF4e, IKKbeta, Myc, Runx1 y p27). Todas estas modificaciones están abarcadas por el término "disminución de la función de TSC1/TSC2, aumento de la función de mTORC1 y/o disminución de la función de mTORC2".

25 Como se usa en este documento, el término "glándulas ecrinas" se refiere a glándulas sudoríparas en la piel. Las glándulas ecrinas constan de dos porciones anatómicas: (1) la espiral secretora, ubicada en la dermis profunda en la unión con el tejido subcutáneo y compuesta por células piramidales claras y células teñidas de oscuro, rodeadas por una única capa externa discontinua de células mioepiteliales que descansan en una membrana basal bien definida; y (2) la parte excretora compuesta de una porción intradérmica recta y una porción espiral intraepidérmica (acrosiringio), y una doble capa de pequeñas células cuboidales sin capa mioepitelial subyacente.

30 Como se usa en el presente documento, el término "célula endotelial" se refiere a las células especializadas que recubren las paredes internas de los vasos sanguíneos.

Como se usa en el presente documento, el término "célula epidérmica" se refiere a células derivadas de la epidermis de la piel. Las células epidérmicas son un tipo de células epiteliales. Ejemplos de células epidérmicas incluyen, pero sin limitación, queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel.

35 Como se usa en el presente documento, el término "célula epitelial" se refiere a células que recubren el exterior (piel), las membranas mucosas y las cavidades internas y lúmenes del cuerpo. En realizaciones particulares, el término "célula epitelial" se refiere a células epiteliales escamosas estratificadas. La mayoría de las células epiteliales exhiben una polarización apical-basal de los componentes celulares. Las células epiteliales se clasifican típicamente por forma y por su especialización. Por ejemplo, las células epiteliales escamosas son delgadas y tienen una forma aplanada irregular definida principalmente por el núcleo. Las células escamosas generalmente recubren las superficies de las cavidades corporales, como el esófago. Los vasos sanguíneos del epitelio escamoso especializado (células endoteliales) y el corazón (células mesoteliales). Las células epiteliales cuboideas tienen forma de cubo y generalmente tienen su núcleo en el centro. Las células epiteliales cuboideas se encuentran típicamente en tejido secreto o absorbente, por ejemplo, túbulos renales, conductos glandulares y la glándula exocrina pancreática. Las células epiteliales columnares son más largas que anchas y el núcleo alargado suele estar cerca de la base de la célula. Estas células también tienen pequeñas proyecciones, llamadas microvellosidades, que aumentan el área de superficie de las células. Las células epiteliales columnar típicamente forman el revestimiento del estómago y los intestinos, así como también de los órganos sensoriales.

40 Como se usa en el presente documento, el término "gen" se refiere a secuencias codificantes de ácidos nucleicos necesarias para la producción de un polipéptido o precursor. El polipéptido puede codificarse mediante una secuencia codificante de longitud completa o mediante cualquier porción de la secuencia codificante, siempre que se retengan las propiedades funcionales deseadas (por ejemplo, actividad enzimática, unión del ligando, transducción de señal, etc.) del polipéptido. El término también abarca la región codificante de un gen estructural y las secuencias situadas adyacentes a la región codificante en los extremos 5' y 3' para una distancia de aproximadamente 1 kb en cada extremo, de modo que el término "gen" corresponde a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias que están ubicadas en 5' de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias 5' no traducidas. Las secuencias que están ubicadas 3' o corriente abajo de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas. Estas secuencias se denominan secuencias o regiones "flanqueantes". La región flanqueante 5' puede contener secuencias reguladoras tales como promotores y

potenciadores que controlan o influyen en la transcripción del gen. La región flanqueante 3' puede contener secuencias que dirigen la terminación de la transcripción, la escisión postranscripcional y la poliadenilación.

5 El término "gen" abarca tanto las formas de ADNc como genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen puede contener la región codificante interrumpida con secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones intermedias" o "secuencias intermedias". Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en ARN nuclear (hnRNA) y pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se eliminan o "cortan" del transcrito nuclear o primario y, por lo tanto, están ausentes en el transcrito de ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia o el orden de los aminoácidos en un polipéptido naciente.

10 Como se usa en el presente documento, los términos "eliminación de genes" y "silenciamiento de genes" se refieren a cualquier técnica mediante la cual se reduce la expresión de uno o más genes. Dichas técnicas de eliminación de genes incluyen, pero no se limitan a, ADN genómico mutante para reducir o eliminar la transcripción o traducción génica, la creación de roturas de doble cadena dirigidas usando una nucleasa de dedo de zinc y tratar el ADN genómico con un reactivo, como un oligonucleótido antisentido. Como se usa en el presente documento, el término "nucleótido antisentido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es sustancialmente idéntica (o sustancialmente complementaria) a una porción de un ARN o ADN diana. Los nucleótidos antisentido incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos de ARN bicatenarios cortos complementarios (ARNds) tales como ARN interferente pequeño (ARNip), ARN de horquilla interferente corta (ARNhc), ARN micro (miARN) o ARN interferente (ARNi). Como se usa en el presente documento, el término "cantidad suficiente para inhibir la expresión" se refiere a una concentración o cantidad del oligonucleótido antisentido que es suficiente para reducir los niveles o la estabilidad del ARNm o proteína producida a partir de un gen diana. Como se usa en el presente documento, "inhibir la expresión" se refiere a la ausencia o disminución observable en el nivel de proteína y/o producto de ARNm de un gen diana. La inhibición puede ser transitoria o permanente, según la aplicación. La reducción puede ser de al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% de reducción.

25 La invención abarca variaciones en oligonucleótidos antisentido. Como se usa en este documento, y teniendo en cuenta la sustitución de uracilo por timina cuando se comparan secuencias de ARN y ADN, los términos "sustancialmente idéntico" y "sustancialmente complementario" aplicados a oligonucleótidos antisentido significan que la secuencia de nucleótidos de una cadena del oligonucleótido antisentido es al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticos a 20 o más nucleótidos contiguos del gen diana, y que hibridan con el gen diana bajo condiciones rigurosas (definidas a continuación). Sin embargo, no se requiere una identidad de secuencia del 100% entre el oligonucleótido antisentido y el gen objetivo para practicar la presente invención; la invención puede tolerar variaciones de secuencia que podrían esperarse debido a la manipulación o síntesis de genes, la mutación genética, el polimorfismo de la cepa o la divergencia evolutiva. Por lo tanto, los oligonucleótidos antisentido pueden comprender una falta de coincidencia con el gen diana de al menos 1, 2 o más nucleótidos. El término "20 o más nucleótidos" significa una parte del gen diana que es al menos aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 1500 o 2000 bases consecutivas, hasta la secuencia codificante del gen diana o la longitud completa del gen diana.

35 Los términos "eliminación de genes" y "silenciamiento de genes" también se refieren a cualquier técnica mediante la cual se reduce la función de una proteína expresada por uno o más genes. Dichas técnicas de eliminación de genes incluyen, pero no se limitan a, ADN genómico mutante para reducir o eliminar la función de la proteína, y tratar las células con un reactivo que interfiere o inhibe la función de la proteína. Como se usa en el presente documento, el término "cantidad suficiente para inhibir la función" se refiere a una concentración o cantidad de reactivo que es suficiente para reducir los niveles de función de proteína en una célula. Como se usa en este documento, "función inhibidora" se refiere a la ausencia o disminución observable en el nivel de función proteica en una célula.

45 Como se usa en el presente documento, el término "folículo piloso" se refiere a un plegamiento tubular de la epidermis a partir del cual puede crecer un cabello. Un folículo piloso puede contener un tallo del cabello en la ubicación anatómica correcta, exhibir supervivencia del injerto a largo plazo, ciclo normal del folículo piloso y glándulas sebáceas.

50 Como se usa en el presente documento, el término "regeneración capilar" se refiere a la estimulación de folículos capilares quiescentes existentes para entrar en la fase anágena del crecimiento del cabello. El término también se refiere a la estimulación de la formación del cabello a partir de folículos pilosos o componentes de folículos pilosos (por ejemplo, implantación de papilas dérmicas microdisecadas y epitelio folicular, o crecimiento del cabello después del desprendimiento), en lugar de comenzar con folículos pilosos quiescentes intactos.

Como se usa en el presente documento, el término "neogénesis del cabello" se refiere a la estimulación del crecimiento del folículo piloso de novo donde previamente no existía folículo capilar en la piel sin folículos pilosos preexistentes, o en piel con menos cantidad del número deseado de folículos capilares.

55 Como se usa en este documento, el término "queratinocito" se refiere a células epiteliales en la epidermis de la piel (incluyendo células en el epitelio folicular) que experimentan división celular y estratificación a partir de células basales en contacto con la membrana basal epidérmica en células escamosas. Los queratinocitos expresan queratina.

Como se usa en el presente documento, el término "célula de tipo queratinocito" se refiere a células que expresan queratina y tienen la capacidad de formar un epitelio escamoso estratificado o epitelio folicular. Las células similares a los queratinocitos pueden derivarse de células de la piel u otros órganos como la médula ósea o la tráquea, o de células con características de células madre (incluidas las células madre embrionarias) o que inducen células madre pluripotentes.

Como se usa en el presente documento, los términos "matriz" y "sustancia de base" se refieren a cualquier composición similar a la matriz extracelular natural o sintética capaz de formar un soporte celular hidratado similar a un gel. Las células pueden depositarse dentro o sobre matrices y sustancias molidas. Las matrices y las sustancias molidas pueden comprender una o más proteínas fibrosas que tienen funciones estructurales y adhesivas. Dichas proteínas incluyen, pero no se limitan a, elastina, fibronectina, laminina y colágenos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX X, XI y XII. Alternativamente, o además, las matrices y las sustancias molidas pueden comprender moléculas de proteoglicanos que comprenden cadenas de polisacáridos unidas covalentemente a proteínas. Tales proteoglicanos incluyen, pero no se limitan a, proteínas unidas a hialuronano, sulfato de heparina, condroitina, sulfato de queratina y sulfato de dermatina.

Como se usa en el presente documento, el término "célula mesenquimal" se refiere a células multipotentes con capacidad o capacidad potencial para inducir la formación del folículo piloso similar a las células de la papila dérmica y la envoltura de tejido conectivo de los folículos capilares. Las células mesenquimales generalmente se consideran células del tejido conjuntivo mesodérmicas que expresan vimentina, pero las células con los atributos deseados también pueden derivarse de la cresta neural. Las células mesenquimales se pueden aislar a partir de una o más de las siguientes fuentes: piel del paciente o mucosa para células autólogas; piel del donante o mucosa para células alogénicas; piel o mucosa normal; piel con un tumor anexial; y otros tejidos (por ejemplo, grasa, médula ósea). Las células mesenquimales incluyen, pero no se limitan a, fibroblastos, células de papila dérmica, células de vaina dérmica, onicomofibroblastos (fibroblastos de la unidad ungueal), células pulpares dentales, células del ligamento periodontal, células de la cresta neural, células tumorales anexiales, células madre pluripotentes inducidas y células madre mesenquimales de la médula ósea, la sangre del cordón umbilical, el cordón umbilical, la grasa y otros órganos.

Como se usa en el presente documento, los términos "morfológicamente correcto" y "completamente desarrollado" se refieren a folículos pilosos que tienen una configuración normal con un filamento epitelial que sale del extremo distal del folículo y papila dérmica que se encuentra en la base del folículo. Los folículos también tienen células que proliferan en la base del folículo y tienen capas concéntricas de vaina radicular externa e interna, cutícula y corteza. Los folículos exhiben una diferenciación normal de la vaina de la raíz externa, y tienen vellos de cabello y glándulas sebáceas. Los cabellos pasan por ciclos normales y contienen un componente de células madre epiteliales.

Como se usa en este documento, el término "mutación" se refiere a cualquier cambio en la secuencia codificante de un gen. Las mutaciones incluyen mutaciones de sentido erróneo, mutaciones de desplazamiento de marco (es decir, inserciones y eliminaciones), mutaciones de sitio de corte y empalme, mutaciones sin sentido (es decir, codones de terminación prematura) y eliminación del gen mismo.

Como se usa en este documento, la expresión "secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico" o variaciones de la misma como "codificación génica" significa una secuencia de ácido nucleico que comprende la región codificante de un gen o la secuencia de ácido nucleico que codifica un producto génico (es decir, un polipéptido). La región codificante puede estar presente en forma de ADNc, ADN genómico o ARN. Cuando está presente en una forma de ADN, la secuencia de nucleótidos puede ser monocatenaria (es decir, la cadena con sentido) o bicatenaria. Los elementos de control adecuados tales como potenciadores/promotores, uniones de empalme, señales de poliadenilación, etc. pueden situarse próximos a la región codificante del gen si es necesario para permitir la iniciación apropiada de la transcripción y/o el procesamiento correcto del transcrito de ARN primario. Alternativamente, la región codificante puede contener potenciadores/promotores endógenos, uniones de corte y empalme, secuencias intermedias, señales de poliadenilación, etc. o una combinación de elementos de control tanto endógenos como exógenos.

Como se usa en el presente documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una carga, diluyentes, material de encapsulación, adyuvante de formulación o excipiente sólidos, semisólidos o líquidos no tóxicos de cualquier tipo convencional. Un vehículo farmacéuticamente aceptable no es tóxico para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, y es compatible con otros ingredientes de la formulación.

Como se usa en este documento, los términos "polinucleótido", "nucleótido", "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "secuencia de ácido nucleico", "secuencia de polinucleótido" y "secuencia de nucleótidos" se usan indistintamente para referirse a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud. Los polinucleótidos pueden comprender desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, formas anoméricas sustituidas y alfa, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), fosforotioato, metilfosfonato y/o análogos de origen natural y no naturales o derivados de los mismos. Los términos también incluyen variantes naturales y no naturales de secuencias de tipo salvaje. Las variantes pueden incluir inserciones, adiciones, eliminaciones o sustituciones que son al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a una secuencia de tipo salvaje. En algunas realizaciones, menos del 10% de los residuos de aminoácidos están alterados en los productos proteicos de las variantes. En otras realizaciones, menos del 5% de los residuos de

aminoácidos están alterados. Las variantes de inserción y eliminación incluyen polinucleótidos que son 90%, 95%, 105% o 110% de la longitud de la secuencia de tipo salvaje correspondiente.

5 Como se usa en el presente documento, el término "glándula sebácea" se refiere a las glándulas dependientes del folículo piloso que se originan como una gemación del primordio de las glándulas sebáceas. Las glándulas sebáceas consisten en múltiples lóbulos de células redondeadas (sebocitos), llenas de vacuolas que contienen lípidos y bordeadas por una sola capa de células germinativas pequeñas y oscuras. Los lóbulos convergen en un conducto corto, que vacía el contenido de lípidos de los sebocitos degenerados en el folículo piloso.

10 Como se usa en el presente documento, los términos "sustituto de piel", "equivalente de piel", "compuesto dérmico-epidérmico" e "injerto de piel" se refieren a cualquier producto utilizado para el reemplazo de piel dañada, total o parcialmente, temporalmente o permanentemente, y que posee algunas similitudes con la piel humana, tanto anatómica como funcionalmente. En el contexto de la presente invención, estos términos se refieren a un cultivo derivado in vitro de células mesenquimales que tienen una red TSC1/TSC2 regulada positivamente en combinación con un cultivo derivado in vitro de células epiteliales. Los sustitutos de piel incluyen, entre otros, equivalentes de piel biodiseñados, piel modificada, construcciones cutáneas diseñadas con tejidos, sustitutos biológicos de piel, sustitutos de piel biodiseñados, bioconstrucciones sustitutivas de piel, reemplazos cutáneos vivos, compuestos dermoepidérmicos y tejidos alternativos creados por bioingeniería.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones de hibridación restrictivas" se refiere a las condiciones en las que un polinucleótido se hibridará a una secuencia diana, pero a un número mínimo de otras secuencias. En general, las condiciones de hibridación restrictivas incluyen bajas concentraciones (<0.15M) de sales con cationes inorgánicas tales como Na^{2+} o K^{2+} (es decir, baja fuerza iónica), temperaturas superiores a 20 °C-25 °C por debajo de la T_m del complejo hibridado (es decir, la temperatura a la que el 50% de los oligonucleótidos complementarios a la secuencia diana hibrida con la secuencia diana en equilibrio), y la presencia de desnaturalizantes tales como formamida, dimetilformamida, dimetilsulfóxido o el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS). El valor de T_m puede calcularse mediante la ecuación: $T_m = 81.5 + 0.41 (\% \text{ G+C})$, cuando un ácido nucleico está en solución acuosa a NaCl 1 M (Véase, por ejemplo, Anderson and Young, Quantitative Filter Hybridization, in Nucleic Acid Hybridization [1985]). Las condiciones de hibridación restrictivas de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, hibridación en 4 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 65-70°C, hibridación en 4 x SSC más formamida al 50% a aproximadamente 42-50°C seguido por uno o más lavados en 1 x SSC a aproximadamente 65-70 °C, hibridación en 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA, 60 °C hibridación durante 12-16 horas seguido de lavado a 60 °C con 0.1% SDS y 0.1% SSC durante aproximadamente 15-60 minutos, e hibridación a 42 °C en una solución que consiste en 5 x SSPE (43.8 g/l NaCl, 6.9 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2$ y 1.85 g/l EDTA, pH ajustado a 7.4 con NaOH), 0.5% de SDS, 5 x reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado seguido de lavado en una solución que comprende 0.1 x SSPE, 1.0% de SDS a 42°C.

35 Como se usa en el presente documento, el término "transfección" se refiere a la introducción de ADN extraño en células eucariotas. La transfección se puede realizar mediante una variedad de medios conocidos en la técnica que incluyen coprecipitación de fosfato-ADN de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por polibreno, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, infección retroviral y biolística. La transfección también incluye la introducción de ADN extraño realizado por vectores retrovirales incompetentes a la replicación, que también se pueden denominar transducción o transducción viral. El término "transfección estable" o "transfectado de manera estable" se refiere a la introducción e integración de ADN extraño en el genoma de la célula transfectada. El término "transfección transitoria" o "transfectado transitoriamente" se refiere a la introducción de ADN extraño en una célula en la que el ADN extraño no se integra en el genoma de la célula transfectada. El ADN extraño persiste en el núcleo de la célula transfectada transitoriamente durante varios días. Durante este tiempo, el ADN extraño está sujeto a los controles reguladores que rigen la expresión de genes endógenos en los cromosomas.

45 Como se usa en este documento, el término "tratamiento" se refiere a cualquier administración o aplicación de remedios para una afección en un mamífero, que incluye un ser humano, para obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. Los tratamientos incluyen inhibir la afección, detener su desarrollo o aliviar la afección, por ejemplo, restableciendo o reparando una función perdida, ausente o defectuosa, o estimulando un proceso ineficiente.

50 Como se usa en este documento, el término "tricogénico" se refiere a la capacidad de una célula para inducir un folículo capilar y/o para promover la morfogénesis del folículo piloso, es decir, foliculogénesis.

55 Como se usa en el presente documento, los términos "tipo salvaje" y "normal" se refieren a un gen, producto génico o red de señalización que tiene las características de ese gen, producto génico o red de señalización en una fuente natural. Un gen, producto génico o red de señalización de tipo salvaje es el que se observa con más frecuencia en una población y, por lo tanto, se diseña de forma arbitraria la forma "normal" o "salvaje". Por el contrario, los términos "modificado", "mutante" y "variante" se refieren a un gen, producto génico o red de señalización que muestra modificaciones en la secuencia y/o propiedades funcionales (es decir, características alteradas) en comparación con el tipo de versión. Se observa que los mutantes de origen natural se pueden aislar a partir de una fuente que se produce de forma natural, y se identifican por el hecho de que tienen características alteradas cuando se comparan con el gen de tipo salvaje correspondiente, el producto del gen o la red de señalización.

60

II. Sustitutos de piel de la invención

Sorprendentemente, se ha descubierto que las células recogidas de tumores anexiales benignos son tricogénicas. Específicamente, las células mesenquimales que exhiben una red de señalización sobrerregulada mTORC1/TSC1/TSC2 son capaces de inducir folículos pilosos. Dichos folículos se completan de acuerdo con los criterios propuestos por Chuong et al., " Defining hair follicles in the age of stem cell bioengineering," J. Invest. Dermatol., 127: 2098-100 (2007). Los folículos tienen una configuración normal con un filamento epitelial que sale del extremo distal del folículo y la papila dérmica se sienta en la base del folículo. Los folículos tienen células que proliferan en la base del folículo y tienen capas concéntricas de vaina radicular externa e interna, cutícula y corteza. Los folículos exhiben una diferenciación normal de la vaina de la raíz externa, y tienen vellos de cabello y glándulas sebáceas. Los cabellos pasan por ciclos normales y contienen un componente de células madre epiteliales.

En una realización, la invención proporciona un sustituto de piel que comprende células epiteliales y células mesenquimales modificadas, en el que las células mesenquimales modificadas tienen una función TSC1/TSC2 disminuida, función de mTORC1 aumentada y/o función de mTORC2 disminuida en comparación con células mesenquimales de tipo salvaje. Otra realización de la invención proporciona células mesenquimales modificadas, en las que las células mesenquimales modificadas tienen una función TSC1/TSC2 disminuida, función de mTORC1 aumentada y/o función mTORC2 disminuida en comparación con células de tipo salvaje y las células mesenquimales modificadas son capaces de interactuar con las células epiteliales del propio paciente.

En una realización, las composiciones comprenden células mesenquimales tricogénicas aisladas de tumores anexiales benignos, que pueden considerarse "modificadas" con respecto a las células de tipo silvestre. Alternativamente, las células tricogénicas se pueden crear artificialmente disminuyendo la función de TSC1/TSC2, aumentando la función de mTORC1 y/o disminuyendo la función de mTORC2 en células mesenquimales normales o de tipo salvaje. En las células mesenquimales de la invención, la función de TSC1/TSC2 puede disminuir, la función de mTORC1 aumentó, y/o la función de mTORC2 disminuyó por: subregulación de TSC1 o TSC2; regulación positiva de una proteína inhibidora que inhibe la función de TSC1/TSC2 o actúa como un mimético de la función de TSC1/TSC2 disminuida; o subregulación de una proteína estimuladora que estimula la función TSC1/TSC2 o que actúa como un mimético del aumento de la función TSC1/TSC2 en comparación con las células normales.

A. Características generales de la piel de los mamíferos

La piel de mamífero contiene dos capas principales: una capa externa llamada epidermis y una capa interna llamada dermis. La epidermis contiene principalmente queratinocitos que se forman en las capas más profundas de la epidermis por mitosis y luego migran a la superficie, donde finalmente se desprenden. La dermis contiene una variedad de estructuras que incluyen folículos pilosos, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas, glándulas apocrinas, nervios, vasos linfáticos y vasos sanguíneos.

La morfogénesis del folículo piloso tiene lugar principalmente en el útero durante la embriogénesis. La formación del folículo piloso comienza con la aparición de pliegues epidérmicos, que marcan la ubicación del nuevo folículo piloso. Las células mesenquimales (es decir, las células inductivas multipotentes) luego comienzan a agregarse en la dermis por debajo de las placas de epidermis. Los agregados mesenquimales señalan a los queratinocitos en las placodas superpuestas, que luego comienzan a crecer hacia abajo en la dermis. Cuando los queratinocitos epidérmicos alcanzan los agregados mesenquimales, las células se someten a una serie de procesos de diferenciación y proliferación, formando finalmente un folículo piloso maduro.

Los folículos pilosos maduros contienen cuatro partes principales: la papila dérmica (DP), la vaina dérmica (DS), el epitelio folicular y el tallo capilar (Figura 1D). La DP se encuentra en la base o bulbo del folículo piloso adyacente a la matriz capilar que produce el tallo capilar. La DS está compuesta de tejido conectivo y envuelve el folículo piloso. El epitelio folicular incluye la vaina de la raíz externa y la vaina de la raíz interna. El tallo capilar es una estructura proteinácea que se extiende desde la base del folículo a través de la epidermis hasta el exterior de la piel.

El folículo piloso es un miniórgano dinámico que se recicla repetidamente a través de periodos de crecimiento (anágeno), regresión (catágeno) y quiescencia (telógeno). La porción inferior del folículo capilar regresa o vuelve a crecer, se regenera en cada ciclo a través de interacciones complicadas entre las células mesenquimales dérmicas y las células epidérmicas. La parte permanente del folículo piloso inferior sobre la parte continuamente remodelada se conoce como "bulto" porque sobresale ligeramente del folículo. El bulto contiene células multipotentes capaces de formar el folículo, la glándula sebácea y la epidermis. A medida que los individuos envejecen, las fases anágena y catágena del ciclo del folículo piloso se acortan, y los folículos capilares experimentan un cambio más rápido hacia la fase telógena. Como resultado, los vellos normales se reemplazan gradualmente por vellos finos y, en algunos individuos, las células pueden perder por completo sus propiedades tricogénicas.

B. Células de piel para uso en la invención

Los sustitutos de la piel de la invención comprenden (1) células mesenquimales modificadas, o (2) células mesenquimales modificadas y células epiteliales. En las realizaciones en las que los sustitutos de la piel comprenden células mesenquimales modificadas y sin células epiteliales, las células mesenquimales interactúan con las células epiteliales del paciente para producir un folículo piloso. En las realizaciones en las que el sustituto de piel comprende

células mesenquimales modificadas y células epiteliales, las células mesenquimales y epiteliales modificadas suministradas en el sustituto de piel interactúan, con o sin las células epiteliales del paciente, para producir un folículo piloso.

1. Células mesenquimales

5 En general, cualquier fuente de células mesenquimales (es decir, células multipotentes inductivas) es útil en la presente invención. Por consiguiente, la presente invención no se limita al uso de cualquier fuente particular de células con la capacidad o capacidad potencial de inducir la formación del folículo piloso. De hecho, la presente invención contempla el uso de una variedad de líneas celulares y fuentes que pueden inducir folículos capilares. Las células mesenquimales generalmente se consideran células de tejido conjuntivo mesodérmicas que expresan vimentina, pero
10 las células que expresan vimentina con estos atributos también pueden derivarse de la cresta neural. Las fuentes de células incluyen las células inductivas multipotentes de la papila dérmica y la envoltura del tejido conectivo de los folículos capilares. Las células mesenquimales se pueden aislar a partir de una o más de las siguientes fuentes: piel del paciente o mucosa para células autólogas; piel del donante o mucosa para células alogénicas; piel normal; piel con un tumor aneural; y otros tejidos (por ejemplo, grasa, médula ósea, etc.). Ejemplos de células mesenquimales
15 incluyen fibroblastos, células papilares dérmicas, células dérmicas, oncofibroblastos (fibroblastos de la unidad ungueal), células pulpares dentales, células del ligamento periodontal, células de la cresta neural, células tumorales aneurales, células madre pluripotentes inducidas y células madre mesenquimales del hueso médula, sangre del cordón umbilical, cordón umbilical, grasa y otros órganos.

2. Células epiteliales

20 En general, cualquier fuente de células epiteliales o líneas celulares que puedan estratificarse en epitelios escamosos es útil en la presente invención. Por consiguiente, la presente invención no se limita al uso de cualquier fuente particular de células que sean capaces de diferenciarse en epitelios escamosos. De hecho, se contempla el uso de una variedad de líneas celulares y fuentes que pueden diferenciarse en epitelio escamoso estratificado. Las fuentes de células incluyen queratinocitos primarios e inmortalizados, células similares a queratinocitos y células con la capacidad de
25 diferenciarse en células similares a queratinocitos, obtenidas de humanos y donantes cadavéricos (Auger et al., *In Vitro Cell. Dev. Biol.* -- *Animal* 36: 96-103 y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,968,546 y 5,693,332), prepucio neonatal (Asbill et al., *Pharm. Research* 17(9): 1092-97 (2000)); Meana et al., *Burns* 24: 621-30 (1998) y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,485,096, 6,039,760 y 5,536,656) y líneas celulares de queratinocitos inmortalizados tales como células NM1 (Baden, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 23(3): 205-213 (1987)), células HaCaT (Boucamp et al., *J. cell. Boil.* 106: 761-771 (1988)); y células NIKS (Línea celular BC-1-Ep/SL; Patente de los Estados Unidos No. 5,989,837; ATCC CRL-12191).

Las células epiteliales también pueden obtenerse de: piel o mucosa del paciente (autélogas), piel o mucosa del donante (alógenas), líneas celulares epidérmicas, células epidérmicas derivadas de células madre, células epidérmicas primarias o pasantes, tráquea y células derivadas de células madre, células mononucleares sanguíneas
35 o células madre circulantes. También se pueden usar subpoblaciones de células epiteliales a partir de estas fuentes, por ejemplo, enriqueciendo el número de células con propiedades de células madre. Las células epiteliales expresan queratina o se las puede inducir para que expresen queratina, y tienen la capacidad de formar un epitelio escamoso estratificado y/o epitelio folicular.

En algunas realizaciones, las células epiteliales son de dos fuentes diferentes. Por ejemplo, la invención puede practicarse usando queratinocitos inmortalizados junto con queratinocitos autólogos. La proporción relativa de células autólogas a células inmortalizadas puede ser 1:99, 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, o 90:10. De esta manera, se puede reducir el número de queratinocitos autólogos. Los queratinocitos inmortalizados pueden potenciarse para promover la curación de la piel, por ejemplo modificando genéticamente las células para
45 expresar factores de crecimiento o factores angiogénicos. Los queratinocitos inmortalizados pueden modificarse para que puedan ser eliminados en cualquier momento después del injerto. Específicamente, en una realización descrita y/o reivindicada en el presente documento, se pueden utilizar los denominados "genes suicidas" y las células pueden modificarse genéticamente para que mueran en respuesta a un tratamiento con fármaco. (Véase Vogler et al., *Vector for Efficient Purification and In Vivo Depletion of Gene-Modified T Cells for Adoptive Immunotherapy.*, *Mol Ther* Doi: 10.1038 (11 de mayo de 2010) (publicación en línea avanzada); y Scaife et al., *Novel Application of Lentiviral Vectors Towards Treatment of Graft-Versus-Host Disease*, *Expert Opin Biol Ther.* 2009 Jun; 9 (6): 749-61).

3. Aislamiento de células

Las células mesenquimales y epiteliales se pueden aislar de muestras de piel o mucosa o tumores de piel usando cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, las células mesenquimales pueden aislarse por migración de células de explantes de tejido. Un ejemplo de tal método se describe con más detalle en el Ejemplo 3. Alternativamente, las
55 células pueden disociarse de muestras de piel o mucosa o tumores de piel para aislar células mesenquimales y epiteliales. Ejemplos de dicho método se describen con más detalle en el Ejemplo 3. Además, las células epiteliales pueden aislarse induciendo células madre multipotentes para que se diferencien en células epiteliales. Un ejemplo de tal método se describe con más detalle en el Ejemplo 7.

Se pueden hacer crecer células aisladas en cualquier medio adecuado conocido por los expertos en la técnica. Los medios ilustrativos se discuten en detalle en el Ejemplo 6. Las muestras pueden enriquecerse para células inductivas para el cabello basándose en cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden seleccionarse basándose en la presencia de marcadores celulares adecuados, tales como CD133, CD10 o nestina, como se analiza en mayor detalle en el Ejemplo 5. Alternativamente, factores de crecimiento tales como BMP2, 4, 5 o 6, Wnt -3a, Wnt-10b, insulina, FGF2, KGF, etc. pueden ser añadidos para mantener y enriquecer las células inductivas del cabello, incluyendo las células de la papila dérmica, como se analiza con mayor detalle en el Ejemplo 5. Las células también pueden enriquecerse por su capacidad para diferenciarse en folículos pilosos utilizando los métodos de adhesión celular y clasificación de células discutidos con mayor detalle en el Ejemplo 8.

10 C. La red de señalización TSC1/TSC2 y mTOR

Las células mesenquimales modificadas utilizadas en los sustitutos de la piel de la invención tienen modificaciones naturales en la red de señalización TSC1/TSC2 y mTOR, o están diseñadas para crear una modificación de la red de señalización TSC1/TSC2 y mTOR. Por lo tanto, el término "modificado" abarca cambios tanto naturales como modificados genéticamente en esta red en comparación con las células de tipo salvaje.

15 Los genes TSC1 y TSC2 son genes supresores de tumores. TSC1 se encuentra en el cromosoma 9q34 y codifica una proteína de 140 kDa llamada hamartina, mientras que TSC2 se encuentra en el cromosoma 16p13.3 y codifica una proteína de 200 kDa llamada tuberina. La hamartina (también llamada TSC1) y la tuberina (también llamada TSC2) se asocian para formar un complejo de proteína heterodimérico llamado complejo TSC1/TSC2. El complejo TSC1/TSC2 actúa como un núcleo central, que une una red de redes de señalización en lo que se denomina en este documento la red de señalización TSC1/TSC2 y mTOR.

Se cree que el complejo TSC1/TSC2 ejerce su efecto en la invención al inhibir la función de mTORC1, que es parte de la red mTOR (diana de mamífero de la rapamicina). También se cree que estimula la función de mTORC2. La red mTOR está involucrada de manera central en la regulación del crecimiento y el control de la proliferación. La Figura 2 presenta una descripción esquemática de la red mTOR. mTOR es un miembro de la familia de quinasas relacionadas con la fosfoinositida-3-quinasa (relacionada con PI3K). Se han identificado dos complejos que contienen mTOR estructural y funcionalmente distintos en células de mamífero: mTORC1 y mTORC2.

El complejo de proteína TSC1/TSC2 funciona corriente arriba tanto de mTORC1 como de mTORC2. El complejo TSC1/TSC2 exhibe una función de proteína activadora de GTPasa (GAP) a través de la proteína TSC2, que inactiva la pequeña proteína G Rheb (homólogo de Ras enriquecido en el cerebro), regulando negativamente mTORC1. Por el contrario, el complejo TSC1/TSC2 regula positivamente mTORC2.

El complejo TSC1/TSC2 y las proteínas TSC1 y TSC2 individuales también interactúan con una serie de otras redes de señalización. Por ejemplo, el complejo TSC1/TSC2 interactúa con los componentes de la señalización InR (receptor similar a la insulina), que incluyen InR, PTEN (homólogo de fosfato y tensina eliminado en el cromosoma 10), Akt (proteína quinasa B) y S6K1 (proteína ribosómica de 70 kDa S6 quinasa). Además, TSC1 interactúa con las proteínas DOCK7, ezrin/radixin/moesin, FIP200, IKKbeta, Melted, Merlin, NADE(p75NTR), NF-L, PIK1 y TBC7. TSC2 interactúa con 14-3-3 (isoformas beta, epsilon, gamma, eta, sigma, tau y zeta), Akt, AMPK, CaM, CRB3/PATJ, ciclina A, ciclinas D1, D2, D3, Dsh, ERalpha, Erk, FoxO1, HERC1, HPV16 E6, HSCP-70, HSP70-1, MK2, NEK1, p27KIP1, Pam, PC1, PP2Ac, Rabaptin-5, Rheb, Ralpha/VDR y SMAD2/3. Se ha demostrado que las proteínas axina, Cdk1, ciclina B1, GADD34, GSK3, mTOR y RSK1 coinmunoprecipitan tanto con TSC1 como con TSC2. Las quinasas Cdk1 e IKKbeta fosforilan hamartina; Erk, Akt, MK2, AMPK y RSK1 fosforilan TSC2; y GSK3 fosforila tanto TSC1 como TSC2. En consecuencia, estas diversas proteínas y sus redes de señalización asociadas se consideran parte de la red de señalización TSC1/TSC2 y mTOR.

De estos, TSC1, TSC2, FLCN, MEN1 y PTEN se comparten entre los diferentes síndromes discutidos a continuación que tienen una predisposición heredada a los tumores anexiales de la piel.

45 1. Métodos para disminuir la función de tsc1/tsc2 y subregular los miméticos de la función tsc1/tsc2 disminuida

La función de TSC1/TSC2 puede disminuirse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, ya que puede aumentarse la función de mTORC1 y/o puede disminuirse la función de mTORC2. Esto se puede llevar a cabo regulando negativamente directamente TSC1 o TSC2 y/o regulando negativamente una proteína estimulante que estimula la función TSC1/TSC2 o actúa como un mimético del aumento de la función TSC1/TSC2 (por ejemplo, CYLD, LKB1, FLCN, MEN1, NF1, PTEN, PRAS40, 4E-BP1, GSK3 o Deptor).

Por ejemplo, las células se pueden tratar con oligonucleótidos de ARN de doble cadena complementarios cortos (ARNds) tales como ARN interferente pequeño (ARNip), ARN de horquilla interferente corta (ARNhc), ARN micro (miARN) o ARN interferente (ARNi) dirigido a el gen que codifica la proteína estimuladora. Un experto en la técnica puede usar cualquier procedimiento estándar para inactivar la expresión génica en células mesenquimales normales. Por ejemplo, las partículas lentivirales se pueden usar para administrar ARN de horquilla corta clonado personalizado (ARNhc) a las células mesenquimales. Una descripción detallada de tal método se proporciona en los Ejemplos 2 y 4.

Alternativamente, o además, los métodos basados en terapia génica se pueden usar para regular negativamente las proteínas TSC1, TSC2 y/o estimuladoras que estimulan la función TSC1/TSC2. Por ejemplo, las proteínas con dedos de zinc tales como las nucleasas con dedos de zinc pueden usarse para generar roturas de doble cadena dirigidas en los genes TSC1 o TSC2, o en los genes que codifican proteínas estimulantes que estimulan la función TSC1/TSC2.

5 A través del proceso de unión final no homóloga, tales roturas de doble cadena crean una inactivación funcional del gen(es) diana.

La función de las proteínas estimuladoras TSC1, TSC2 y/o TSC1/TSC2 también se puede inhibir mutando el gen que codifica estas proteínas para eliminar la función proteica. La función de TSC1 o TSC2 también puede regularse indirectamente al disminuir la expresión de ciertas proteínas que interactúan. Por ejemplo, inactivar la expresión de policistina-1, una proteína que reprime mTORC1 al proteger el TSC2 de la fosforilación de Akt (Dere R. et al., " Carboxy terminal tail of polycystin-1 regulates localization of TSC2 to repress mTOR," PLoS One, 5(2): e9239 (2010)), se espera que disminuya la función de TSC2. Otro enfoque es inactivar la expresión de proteínas que regulan las proteínas que interactúan aguas arriba o corriente abajo. Por ejemplo, la pérdida de la función TSC1/TSC2 da como resultado la activación de mTORC1, y se espera que el Deptor de inactivación aumente la función de mTORC1.

10 Alternativamente, las células pueden tratarse con productos químicos o moléculas que disminuyen la función de la proteína estimulante. Por ejemplo, la AMPK activa el TSC2 y los fármacos que inhiben la AMPK, como el compuesto C o sunitinib (Laderoute K.R. et al., " SU11248 (sunitinib) directly inhibits the activity of mammalian 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK)," Cancer Biol Ther., 10(1) (2010)) puede disminuir la función de TSC2.

2. Métodos para sobrerregular una proteína inhibidora que inhibe la función TSC1/TSC2 o actúa como un mimético de la función TSC1/TSC2 disminuida

20 La función de proteínas que inhiben la función TSC1/TSC2 o que actúan como miméticos de la función TSC1/TSC2 disminuida puede aumentarse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, ya que puede aumentarse la función de mTORC1 y/o la función de mTORC2 disminuirse. (Véase, por ejemplo, Ortiz-Urda, S. et al., Injection of Genetically Engineered Fibroblasts Corrects Regenerated Human Epidermolysis Bullosa Skin Tissue, The Journal of Clinical Investigation 111(2): 251-255 (2003)). Por ejemplo, la función de las proteínas inhibidoras puede aumentarse mediante la activación de promotores fuertes para dirigir la expresión de los genes que codifican las proteínas inhibidoras. Se proporciona una descripción detallada de dicho método en el Ejemplo 4.

25 Alternativamente, las células pueden tratarse con dsRNA dirigido a genes cuyos productos suprimen la expresión o función de las proteínas inhibidoras. La función de las proteínas inhibidoras también se puede aumentar al mutar los genes que codifican las proteínas inhibidoras para hacer que la proteína sea constitutivamente activa. Alternativamente, la proteína inhibidora puede administrarse directamente a las células, como se describe en detalle en el Ejemplo 4.

3. Tumores anexiales benignos

35 Como se discutió anteriormente, las modificaciones a la red de señalización TSC1/TSC2 y mTOR pueden ser naturales. Estas modificaciones naturales pueden estar presentes en un tumor anexial benigno. Por lo tanto, se cree que cualquier tumor anexial benigno proporciona una fuente adecuada para células mesenquimales modificadas de acuerdo con la invención.

40 Los tumores anexiales benignos son neoplasmas cutáneos no malignos que exhiben diferenciación morfológica hacia uno de los diferentes tipos de epitelio anexial presente en la piel normal: (1) la unidad pilosebácea (es decir, el tallo piloso, el folículo piloso y la glándula sebácea); (2) las glándulas sudoríparas ecrinas; y (3) las glándulas sudoríparas apocrinas. Los tumores anexiales benignos suelen ser multilobulados, tienen bordes simétricos y lisos, y tienen colecciones uniformes de células epiteliales, generalmente sin necrosis ni ulceración tumoral. Generalmente no hay atipia (es decir, anormalidades celulares) y la actividad mitótica generalmente es mínima. La reacción estromal fibrótica densa ocurre con frecuencia en estos tumores.

45 Los ejemplos de tumores anexiales benignos incluyen, entre otros, angiofibromas, nevo apocrino/ecrino, proliferaciones epidérmicas basaloideas, hamartoma folicular basaloide, siringoma condroide, cilindromas, triquilemoma desmoplásico, tricoepitelioma desmoplásico, fibrofoliculoma, pápulas fibrosas, hamartoma quístico foliculosebácea, placas de la frente (Figura 1A), nevos del folículo piloso, hidroacantoma simple, hidradenoma, hidradenoma papilífero, hidrocistoma, infundibulomas, poroma intraepidérmico, isquémomas, nevos sebáceo de Jadassohn, hidradenoma nodular, nevos organoides que cubren lesiones mesenquimales dérmicas, adenoma ecrino papilar, fibromas perifoliculares, tumor pilar, acantoma de la vaina pilar, pilomatricoma, poroma, pilomatricoma proliferativo, quiste triquilemal proliferante, hiperplasia sebácea, sebaceoma, adenoma sebáceo, epiteloma sebáceo, hiperplasia sebácea, nevos sebáceo, tricofoliculoma sebáceo, tumores sebáceos, parches shagreen, espiradenoma, esteato cistoma, hidrosadenoma del tubo stubulopapilar, siringocibradenoma papilífero, siringofibradenoma, siringofibroadenoma, siringoma, quiste triquilemico, triquilemoma, tricoadenoma, tricoblastoma, fibroma tricoblástico, tricodiscoma, tricoepiteliomas, tricofoliculoma, adenoma apocrino tubular, hidrosadenoma tubulopapilar y fibromas inguinales.

55

De estas afecciones, los angiofibromas, las placas fibrosas de la frente, el fibrofolículo, el tricodiscoma y el fibroma perifolicular son los más similares entre sí. Estos comparten características histológicas e inmunohistológicas. Además, el fibroma ungual y el parche de Shagreen comparten anomalías TSC1/TSC2.

5 Los tumores anexiales benignos también incluyen, entre otros, los tumores asociados con el síndrome de Birt-Hogg-Dubé, síndrome de Brooke-Spiegler, síndrome de Cowden (CS), síndrome de hamartoma folicular basaloide familiar, neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (MEN1), neurofibromatosis (NF1), síndrome de Peutz-Jeghers (PJS) y complejo de esclerosis tuberosa (TSC).

10 Los tumores anexiales benignos consisten en múltiples tipos de células y muestran un crecimiento celular desorganizado y excesivo con una tendencia a acentuar una estructura de la piel. Por ejemplo, los tumores observados en CS, que se denominan triquilemoma, exhiben un epitelio engrosado que se asemeja a la vaina externa del folículo piloso. Los tumores encontrados en TSC, que se llaman angiofibromas, parecen ser hiperplasias de la dermis papilar y/o perianexial. Los tumores encontrados en NF1, que se llaman neurofibromas, muestran cantidades exageradas de tejido neural y fibroso. Finalmente, los tumores encontrados en PJS, que se llaman lentigos, muestran hiperplasia melanocítica.

15 La mayoría de los síndromes tumorales anexiales benignos son provocados por mutaciones en genes que señalan a través del complejo TSC1/TSC2. Por ejemplo, las mutaciones en TSC1 o TSC2 causan esclerosis tuberosa (TSC), un trastorno autosómico dominante multisistémico. El análisis de ligamiento sugiere que para el TSC familiar, aproximadamente la mitad de las mutaciones que causan el trastorno ocurren en TSC1, mientras que la otra mitad ocurre en TSC2. En contraste, para el TSC esporádico, las mutaciones en TSC2 son aproximadamente cinco veces
20 más comunes que las mutaciones en TSC1. Los pacientes con mutaciones TSC2 parecen ser más severamente afectados que los pacientes con mutaciones en el gen TSC1. Los espectros de mutación de los genes TSC son muy heterogéneos, y no se han encontrado puntos calientes de mutaciones.

25 El TSC afecta a aproximadamente 1 de cada 6000 nacidos vivos y se caracteriza por convulsiones, disfunción cognitiva y el desarrollo de crecimientos similares a tumores en los riñones, el corazón, la piel, los pulmones y el cerebro. Las lesiones cutáneas se desarrollan en la primera infancia en casi todos los pacientes e incluyen angiofibromas, fibromas periungueales, hamartomas retinianos calcificados, tubérculos corticales, angiomiolipomas renales, máculas hipomelanóticas, placas fibrosas de la frente, angiofibromas faciales y parches de sábana verde. La gravedad del TSC y su impacto en la calidad de vida es extremadamente variable. La mayor fuente de morbilidad son los tumores cerebrales (tubérculos corticales), que causan convulsiones en 80-90% de las personas afectadas y anomalías de
30 comportamiento (principalmente autismo) en más de la mitad de las personas afectadas.

35 El complejo TSC1/TSC2 también juega un papel en los síndromes tumorales anexiales benignos causados por mutaciones en otros genes. Por ejemplo, el síndrome de Peutz-Jeghers (PJS) es causado por una mutación en el gen supresor tumoral LKB1 y se caracteriza por pólipos de hamartoma en el intestino y máculas hiperpigmentadas en los labios y la mucosa oral. La proteína LKB1 es una serina/treonina quinasa que fosforila y activa la proteína quinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK), que a su vez fosforila y activa el TSC2. PJS afecta aproximadamente a 1 en 120.000 nacimientos.

40 De manera similar, el síndrome de Cowden (CS), el síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (BRRS), el síndrome de Proteus (PS) y la enfermedad de Lhermitte-Duclos (LDD) son todos síndromes de hamartoma autosómicos dominantes y todos implican mutaciones en el gen supresor tumoral PTEN. La pérdida de actividad de PTEN aumenta la actividad de Akt, que regula negativamente el TSC2. CS ocurre en aproximadamente 1 en 200.000 personas. El BRRS es un síndrome de sobrecrecimiento raro que se manifiesta como poliposis hamartomatosa. La PS afecta a alrededor de 100-200 personas en todo el mundo y causa un crecimiento excesivo de la piel y un desarrollo óseo atípico acompañado de tumores en más de la mitad del cuerpo. Finalmente, LDD afecta aproximadamente a 200 personas en todo el mundo y se manifiesta como hamartomas en el cerebelo.

45 Además, la neurofibromatosis tipo 1 (NF1) es causada por mutaciones en el gen NF1, y se caracteriza por el desarrollo de neurofibromas benignos y tumores malignos de la vaina del nervio periférico. NF1 codifica la neurofibromina, que funciona como una proteína activadora de Ras-GTPasa. La Ras tiene muchas funciones en la célula, una de las cuales es inhibir el complejo TSC1/TSC2. La NF1 ocurre en aproximadamente 1 de cada 3000 pacientes, y las personas afectadas pueden exhibir déficits cognitivos, deformaciones óseas y lesiones hamartomatosas del iris. Los
50 neurofibrosarcomas (schwannomas malignos) se desarrollan en 3 a 15% de las personas afectadas, la mayoría de las veces asociadas con neurofibromas profundos.

55 Como ejemplo adicional, el 90% de la enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ADPKD) es causada por mutaciones en el gen PKD1. TSC1 es necesario para la localización de PC1, y se cree que juega un papel sinérgico en ADPKD. La ADPKD se caracteriza por la presencia de múltiples quistes en ambos riñones, y ocurre en aproximadamente 1 de cada 400 a 1 en cada 1.000 personas en todo el mundo. ADPKD también se asocia con enfermedad renal en etapa terminal.

Por lo tanto, la red de señalización mTORC1/TSC1/TSC2 proporciona un enlace común entre varios diferentes síndromes tumorales anexiales benignos.

III. Métodos para hacer composiciones de la invención

Las composiciones descritas y/o reivindicadas en la presente incluyen tanto sustitutos de la piel como preparaciones para inyección.

A. Sustitutos de la piel

5 Los sustitutos de la piel de la invención contienen diferentes tipos de células que los sustitutos de la piel de la técnica anterior, aunque se pueden preparar mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica (Figura 1B). Por ejemplo, Greenberg S et al., " In vivo transplantation of engineered human skin ", *Methods Mol Biol.*, 289: 425-30 (2005), describe métodos para crear sustitutos de piel in vitro. Además, Shevchenko RV et al., " A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction ", *JR Soc Interface*, 7(43): 229-58 (2010) proporciona una revisión de varios enfoques que pueden usarse para preparando sustitutos de la piel. Ejemplos de métodos también se proporcionan en el Ejemplo 9.

15 En una realización, las composiciones que comprenden células tricogénicas se proporcionan en forma de un sustituto de piel. En algunas realizaciones, los sustitutos de la piel se forman combinando las células tricogénicas (o células tricogénicas con fibroblastos, células endoteliales, y/u otras células mesenquimales de apoyo) con una sustancia de base o matriz, y luego superponiendo el constructo con las células epiteliales. Antes del injerto, las células epiteliales pueden inducirse a formar parcial o totalmente un epitelio escamoso estratificado y una capa cornificada al exponer la superficie del sustituto al aire.

20 En otra realización, las células tricogénicas pueden cultivarse antes de combinarse con una matriz. En otra realización, la mezcla de matriz celular se cultiva antes de combinarse con las células epiteliales. En otra realización, las células tricogénicas se cultivan sobre o debajo, en lugar de incorporarse a, la sustancia o matriz fundamental, y esta se recubre con células epiteliales.

25 En otra realización, las células tricogénicas se preparan primero en microesferas antes de ser incorporadas o insertadas en, o depositadas sobre, la sustancia base/matriz/andamiaje, y esto está superpuesto con células epiteliales. Las microesferas pueden estar compuestas de células tricogénicas con o sin células epiteliales y con o sin matriz. Si la microesfera tiene una matriz, puede ser la misma o diferente en composición que la del esqueleto dérmico. La sustancia base/matriz/armazón en el que se colocan las microesferas puede ser con o sin fibroblastos, células endoteliales y/u otras células mesenquimales de soporte añadidos. El espaciamiento de las microesferas puede ser aleatorio o a intervalos que replican el espaciamiento de los folículos capilares en la piel humana normal.

30 En otra realización descrita y/o reivindicada en el presente documento, las células tricogénicas (o células tricogénicas con fibroblastos u otras células mesenquimales de soporte) se usan en una construcción dérmica que se fabrica por separado de la construcción epidérmica, y las dos se injertan secuencialmente al paciente. Como alternativa al uso de una construcción epidérmica, las células epiteliales se pueden asperjar sobre la construcción dérmica injertada, usando un aerosol de células en medio o en goma de fibrina.

35 Los compuestos que pueden usarse para la sustancia base/matriz/armazón incluyen colágenos, elastina, laminina, fibrina, hialuronano o ácido hialurónico, fibronectina, quitosano, celulosa, fibroína de seda y alginatos. Estos compuestos pueden ser humanos, de rata, porcinos o bovinos; de crustáceos u hongos (quitosano) o plantas o algas (celulosa); o proteínas expresadas como formas recombinantes en bacterias u otros organismos. Estos compuestos también pueden ser modificados o combinados, como la queratina del cabello, la esponja de colágeno, hialuronano acoplado con dominios funcionales de fibronectina, membrana nanofibrosa híbrida de poli(ácido láctico-co-glicólico)/quitosano, membrana nanofibrosa de colágeno de policaprolactona (PCL), fibroína de seda y alginato, alcohol polivinílico/quitosano/fibroína mezclada, tegaderm-nanofibra, celulosa bacteriana, ICX-SKN reemplazo de injerto de piel (InterCytex, Cambridge, Inglaterra), colágeno-glicosaminoglicano-quitosano, compuesto nano-titanio óxido-quitosano, Collatamp® (EUSAPharma, Langhorne, PA), quitina desacetilada o membranas de transferencia de celulosa vegetal. El armazón también puede ser dermis acelular, tendón o submucosa humana, porcina o bovina, que puede liofilizarse, entrecruzarse, engranarse o combinarse con cualquiera de los compuestos anteriores. Puede ser mezclas complejas tales como Matrigel™ (BD Biosciences) o matriz extracelular derivada de fibroblastos u otras células. La matriz, sustancia de base o armazón también puede consistir o incorporar materiales sintéticos, incluyendo silicona, polisiloxano, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, nylon, matriz PolyActive™ (OctoPlus, Cambridge, MA) (tereftalato de polietileno y tereftalato de polibutileno), y microfibras de poliuretano biodegradables.

50 El sustituto de piel se puede suministrar sellado en una bolsa de polietileno de calibre grueso con una atmósfera de 10% de CO₂/aire y medio nutriente de agarosa, listo para un solo uso. El sustituto de piel puede mantenerse en la bolsa sellada a 68°F-73°F (20°C-23°C) hasta su uso. El sustituto de piel se puede suministrar como un disco circular, por ejemplo, de aproximadamente 75 mm de diámetro y 0.75 mm de grosor. El medio de suministro de agarosa puede contener agarosa, L-glutamina, hidrocortisona, insulina recombinante humana, etanolamina, O-fosforiletanolamina, adenina, ácido selenioso, polvo de DMEM, polvo de HAM F-12, bicarbonato de sodio, cloruro de calcio y agua para inyección. El sustituto de piel puede almacenarse opcionalmente en una bandeja de plástico o en una placa de cultivo celular dentro de la bolsa. El sustituto de piel puede estar empaquetado con una capa epidérmica (acabado opaco, mate) hacia arriba y una capa dérmica (brillante) hacia abajo, descansando sobre una membrana de policarbonato.

B. Preparaciones para inyección o implantación

Se divulgan o reivindican en el presente documento preparaciones para inyección o implantación. Estas preparaciones se pueden preparar mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Ejemplos de métodos se proporcionan en el Ejemplo 9. En una realización, las células mesenquimales se presentan en un regulador adecuado para inyección, tal como una solución salina estéril, solución salina tamponada con fosfato de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), solución salina equilibrada de Hank, Plasmalyte A o RPMI. En una realización, las células mesenquimales se incorporan en microesferas. En otra realización, las células mesenquimales están provistas de una matriz o sustancia de base. La matriz puede ser polímeros naturales tales como metilcelulosa, colágeno, quitosano, ácido hialurónico, gelatina, alginato, fibrina, fibronectina o agarosa. La matriz puede ser mezclas complejas tales como Matrigel™ o polímeros sintéticos. En otra realización descrita y/o reivindicada en el presente documento, las células mesenquimales se combinan con células epiteliales con o sin matriz o sustancia de base antes de su uso en el método de inyección o implantación.

Las composiciones que comprenden células tricogénicas pueden inyectarse o implantarse por vía subdérmica o intradérmica en un sitio donde se desea el crecimiento del cabello sin cultivo adicional. Las células preparadas por métodos de disociación como se describe en el Ejemplo 3B pueden resuspenderse en regulador e inyectarse directamente o incorporarse primero en microesferas antes de la inyección o implantación. Las células en medio de cultivo pueden almacenarse en hielo durante 24 horas o más o congelarse en nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo. Para la criopreservación, las células se colocan en una solución de DMSO al 10%, DMEM al 70% y suero bovino fetal al 20%. Las células se colocan en crioviales a una concentración de 0.1-10 millones de células por ml y se congelan en un congelador de control y se almacenan a -180 °C hasta el día de la inyección o implantación. Se puede verificar que la viabilidad de todas las células descongeladas sea superior al 85% antes de su uso.

Las composiciones que comprenden células tricogénicas se pueden inyectar o implantar en la piel o herida del receptor. Las composiciones también pueden inyectarse o implantarse en injertos (injertos de espesor dividido o sustitutos de la piel que incluyen compuestos dérmicos-epidérmicos y construcciones dérmicas combinadas con construcciones epidérmicas o pulverización celular) antes de la aplicación al paciente o después del injerto. Las composiciones que comprenden células tricogénicas se pueden cultivar antes de la inyección o implantación.

IV. Métodos de administración de los sustitutos de la piel de la invención

Aquí se describen al menos dos modos de administración de los sustitutos de la piel de la invención. Los sustitutos de la piel de la invención se pueden injertar en un paciente (Figura 1C) o se pueden inyectar en un paciente. Como tal, la invención proporciona sustitutos de la piel y/o células mesenquimales modificadas para uso en un método para trasplantar células a un paciente que son capaces de inducir folículos capilares humanos en el paciente.

A. Pacientes que se benefician del tratamiento con la invención

Las composiciones descritas y/o reivindicadas en este documento son útiles para tratar pacientes con pérdida de piel de grosor completo o parcial, piel desvitalizada, heridas, úlceras, quemaduras químicas o térmicas, cicatrices y pérdidas o anomalías totales o parciales del cabello, glándulas sebáceas o glándulas ecrinas que pueden ser congénitas o adquiridas. Las lesiones cutáneas se agrupan en tres categorías: epidérmica, de espesor parcial y de espesor total. Las lesiones epidérmicas no requieren un tratamiento quirúrgico específico, ya que solo la epidermis se ve afectada y esto se regenera rápidamente sin dejar cicatrices. Las heridas de espesor parcial afectan la epidermis y la dermis. Tales heridas generalmente sanan por epitelización desde los márgenes de la herida, donde los queratinocitos basales del borde de la herida, el folículo piloso o las glándulas sudoríparas migran para cubrir el área dañada. Las lesiones de espesor completo se caracterizan por la destrucción completa de los elementos regenerativos epiteliales. Este tipo de lesión sana por contracción, con epitelialización solo desde el borde de la herida. Las lesiones de espesor parcial y las lesiones de espesor completo a menudo requieren injertos de piel.

Las composiciones descritas y/o reivindicadas en el presente documento también pueden usarse para tratar heridas quirúrgicas. Por ejemplo, la extirpación de lesiones grandes de la piel, como nevos gigantes (lunares), deja heridas que no pueden sanar por sí mismas, y son demasiado grandes para injertos de piel de espesor parcial autólogos. Las composiciones descritas y/o reivindicadas en este documento serán útiles para tratar tales lesiones.

La forma más común de pérdida de cabello es una condición progresiva de adelgazamiento del cabello llamada alopecia androgénica. La caída del cabello puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo y puede deberse a varios factores. Por ejemplo, la alopecia por tracción se encuentra más comúnmente en personas que tiran de su cabello con demasiada fuerza en colas de caballo o trenzas. La alopecia areata es un trastorno autoinmune que puede causar la pérdida de cabello en una sola ubicación (alopecia areata monocularis) o puede causar la pérdida de cada cabello en todo el cuerpo (alopecia areata universalis). El hipotiroidismo, los tumores y las excrecencias de la piel (como los quistes) también inducen calvicie localizada. La pérdida de cabello también puede ser causada por quimioterapia, radioterapia, parto, cirugía mayor, envenenamiento, infecciones micóticas y estrés severo. Además, la deficiencia de hierro es una causa común de adelgazamiento del cabello. En muchos casos de pérdida de cabello, los folículos

capilares han dejado de reciclarse y han entrado en una etapa inactiva. En otros casos, los folículos pilosos se pierden por completo, o nunca se formaron en primer lugar.

5 Las composiciones y métodos divulgados y/o reivindicados en la presente son útiles para tratar cualquier condición que requiera el crecimiento de folículos pilosos. El método también puede inducir glándulas ecrinas. El método puede inducir más a las glándulas sebáceas.

B. Administración de sustitutos de la piel

El método puede comprender injertar en un paciente el sustituto de piel de la invención. Los sustitutos de la piel de la invención se pueden administrar mediante cualquier técnica adecuada conocida por los expertos en la técnica.

1. Preparación del sitio del injerto

10 El sitio del injerto se puede preparar mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica. Se proporciona una técnica de ejemplo en el Ejemplo 12. El sitio del injerto puede ser piel lesionada (por ejemplo, quemaduras químicas o térmicas de espesor parcial o completo, piel denudada o piel desvitalizada), un lecho de la herida con ausencia parcial o completa de la piel (por ejemplo, un sitio donde la piel fue avulsionada o ulcerada), una herida quirúrgica (por ejemplo, después de la extirpación de crecimientos cutáneos benignos o malignos) o piel con cualquier
15 congénita (por ejemplo, aplasia cutánea congénita) o adquirida (por ejemplo, piel marcada por cualquier causa) reducción, anomalía o ausencia de folículos capilares, glándulas sebáceas y/o glándulas ecrinas. El sitio del injerto se puede lavar con agua, un lavado con antibióticos o una solución de alcohol (como un algodón con alcohol). Se puede dibujar un patrón deseado de cabello en el sitio del injerto con un marcador quirúrgico. Se puede administrar un anestésico local al paciente. En los casos que requieren más anestésicos, se puede administrar al paciente un anestésico gaseoso, intravenoso o de bloqueo nervioso.
20

El tejido de la piel existente, el tejido desvitalizado, la escara, los bordes de la herida o la úlcera, o el tejido cicatricial se pueden eliminar usando técnicas estándar en el arte. Cuando sea posible, cualquier infección de la piel o condiciones de deterioro se deben resolver antes de la aplicación del injerto. Los agentes antimicrobianos, antifúngicos y antivirales, administrados por vía tópica o sistémica, se pueden usar durante un período de tiempo (como una
25 semana) antes y después de la administración del sustituto de piel para reducir el riesgo de infección.

Los sustitutos de la piel se pueden aplicar a una superficie limpia y desbridada de la piel después de irrigar completamente la herida con una solución no citotóxica. El desbridamiento puede extenderse a un tejido sano, viable y sangrante. Antes de la aplicación, se puede lograr la hemostasia. Antes del desbridamiento, la herida se puede limpiar a fondo con solución salina estéril para eliminar los restos sueltos y el tejido necrótico. Usando pinzas para
30 tejido, una cuchilla cureta quirúrgica o, el tejido hiperqueratósico y/o necrótico y los desechos pueden ser removidos de la superficie de la herida. Los bordes de la úlcera se pueden desbridar para tener un efecto de platillo. Después del desbridamiento, la herida puede limpiarse completamente con solución salina estéril y secarse suavemente con gasa. La exudación o sangrado resultante del desbridamiento o la revisión de los bordes de la herida se pueden detener mediante el uso de presión suave o, si es necesario, la ligadura de vasos, electrocauterio, cauterio químico o láser. La exudación intensa puede desplazar a un sustituto de piel y reducir la adherencia. La exudación se puede minimizar con un tratamiento clínico apropiado. Por ejemplo, se puede soplar aire estéril a temperatura ambiente o hasta 42°C sobre la herida hasta que la herida esté pegajosa. Si la exudación persiste, el sustituto de piel puede hacerse permeable al exudado perforando el sustituto de piel para permitir el drenaje.
35

2. Aplicación del sustituto de piel

40 Se puede usar una variedad de técnicas clínicas para aplicar el sustituto de piel al paciente. Los sustitutos de la piel se pueden aplicar en la clínica a pacientes ambulatorios o en un quirófano según el tamaño del defecto reparado, el nivel de dolor y la necesidad de anestesia general. Las técnicas de ejemplo se describen en los Ejemplos 11 y 12. Antes de aplicar el sustituto de piel, el médico puede revisar la fecha de caducidad del sustituto de piel, verificar el pH y observar y oler el sustituto de piel para asegurarse de que no haya contaminantes, tales como contaminantes bacterianos o material en partículas. El sustituto de piel puede almacenarse en una bolsa de polietileno a una
45 temperatura controlada de 68 °F-73 °F (20 °C a 23 °C) hasta inmediatamente antes de su uso.

El médico puede abrir la bolsa de polietileno sellada, y si el sustituto de piel se proporciona en una placa de cultivo celular o bandeja de plástico, se puede transferir al campo estéril con una técnica aséptica. Si está presente, se puede levantar una bandeja o una tapa de una placa de cultivo celular, y el médico puede observar la orientación de la capa epidérmica y dérmica del sustituto de piel. Utilizando un instrumento atraumático estéril, un médico puede desalojar suavemente aproximadamente 12.7 mm (0.5 pulgadas) del sustituto de piel de la pared de la bandeja o placa de cultivo celular. Al levantar el sustituto de piel, un médico puede tener cuidado de no perforar o levantar ninguna membrana debajo del sustituto de piel, que, si está presente, debe permanecer en la bandeja.
50

Con manos enguantadas estériles, un facultativo puede insertar un dedo índice debajo de la sección liberada del sustituto de piel y usar el otro dedo índice para agarrar el sustituto de piel en una segunda mancha a lo largo del borde del dispositivo. Sosteniendo el sustituto de piel en dos lugares, el médico puede levantar todo el sustituto de piel de la bandeja o de la placa de cultivo celular con un movimiento suave y uniforme. Si se produce un plegamiento excesivo,
55

el sustituto de piel puede hacerse flotar (superficie epidérmica hacia arriba) sobre una solución salina estéril caliente en una bandeja estéril.

El sustituto de piel puede colocarse de modo que la capa dérmica (la capa brillante más cercana al medio) esté en contacto directo con el sitio para el sustituto de piel.

- 5 Utilizando un aplicador de algodón humedecido con solución salina, el médico puede alisar el sustituto de piel en el sitio para que no haya burbujas de aire o bordes arrugados. Si el sustituto de piel es más grande que el sitio para la aplicación, el exceso de sustituto de piel se puede recortar para evitar que se adhiera al vendaje. Si el sustituto de piel es más pequeño que el sitio para la aplicación, se pueden aplicar múltiples sustitutos de piel adyacentes hasta que se llene el defecto.
- 10 El sustituto de piel puede asegurarse con cualquier apósito clínico apropiado. No se requieren suturas o muestras, pero se pueden usar en algunos casos para anclar el injerto al lecho del injerto. Se pueden usar apósitos para asegurar el contacto del sustituto de piel con el sitio para su aplicación y para evitar el movimiento. La compresión terapéutica se puede aplicar al sitio del injerto. En algunos casos, puede ser necesario inmovilizar la extremidad injertada para minimizar las fuerzas de cizallamiento entre el sustituto de piel y el sitio de aplicación. Los apósitos se pueden cambiar una vez a la semana o más frecuentemente si es necesario.

15 Aplicaciones adicionales de sustitutos de la piel pueden ser necesarias en ciertos casos. Antes de aplicaciones adicionales, los restos no adherentes de un injerto de piel o un sustituto de piel anterior deben eliminarse con cuidado. Los tejidos curativos o los sustitutos de la piel adherente pueden dejarse en su lugar. El sitio puede limpiarse con una solución no citotóxica antes de aplicaciones adicionales de un sustituto de piel. Se puede aplicar un sustituto de piel adicional a las áreas donde el sustituto de piel anterior no es adherente.

20 C. Inyección de células tricogénicas

Las células tricogénicas de la invención se pueden inyectar mediante cualquier método adecuado conocido por los expertos en la técnica. Un método de ejemplo se describe en el Ejemplo 11. En una realización descrita en el presente documento, el método comprende la administración subdérmica o intradérmica a células mesenquimales modificadas por paciente que tienen una función TSC1/TSC2 disminuida, función de mTORC1 aumentada y/o función mTORC2 disminuida en comparación con células mesenquimales naturales. En otra realización descrita aquí, el método comprende además administrar células epiteliales al paciente. Las células pueden administrarse como una suspensión o como microesferas. Al inyectar una suspensión, cada sitio de inyección puede administrar 50-2000 células. Cuando se inyectan microesferas, cada sitio de inyección puede liberar una o más microesferas.

30 1. Preparación del sitio del injerto

El sitio del injerto se puede lavar con agua, un lavado con antibiótico o una solución de alcohol (como un algodón con alcohol). Se puede dibujar un patrón deseado de cabello en el sitio del injerto con un marcador quirúrgico, ya sea en forma de contorno o de forma pixelada mostrando cada sitio de inyección. También se pueden aplicar plantillas de papel o plantillas de otro material al sitio de inyección que muestre el patrón de inyección, o las inyecciones se pueden administrar con el espaciado correcto mediante el uso de robótica o un dispositivo con múltiples puertos de inyección en una rejilla. Se puede administrar un anestésico local al paciente. En los casos que requieren más anestésico, se puede administrar un anestésico gaseoso, intravenoso o de bloqueo nervioso al paciente.

35 2. Métodos de inyección, dosificación y frecuencia de administración

Las inyecciones se pueden administrar de acuerdo con técnicas conocidas en el arte para inyecciones subdérmicas o intradérmicas. Se puede usar una concentración de 1,000 a 20,000 células/ml en la inyección. Se puede inyectar un volumen de 0.05 a 0.1 ml en cada sitio de inyección utilizando una jeringa de 1-3 ml con una aguja de calibre 14-30. En tales realizaciones, la piel se estira tensa, y la aguja se inserta en bisel a un ángulo de 5° a 30° con la piel. Las células se inyectan lentamente con una presión suave, se retira la aguja y se aplica una presión suave para evitar fugas y promover la absorción.

45 Las inyecciones pueden repetirse durante un período de tiempo, ya sea para la comodidad del paciente o debido a que pueden producirse folículos capilares adicionales después de la administración repetida. En tal caso, las administraciones pueden espaciarse con una semana de diferencia, dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses o seis meses de diferencia.

50 Varias de las realizaciones anteriores se ilustran en los ejemplos no limitativos expuestos a continuación. Sin embargo, otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la especificación y la práctica de la invención descrita en este documento. Se pretende que la especificación y los ejemplos se consideren solo a manera de ejemplo.

V. Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación y evaluación del sustituto de piel de pacientes con TSC

Los hamartomas cutáneos TSC, que incluyen placas fibrosas de la frente, angiofibromas y fibromas periungueales, contienen células similares a fibroblastos dérmicas y/o perifoliculares y cambios variables en el epitelio. Los pacientes diagnosticados con TSC se inscribieron en un protocolo aprobado por la Institutional Review Board, 00-H-0051 en el National Heart, Lung, and Blood Institute, NIH. Se obtuvieron muestras de angiofibromas, fibromas periungueales, placas fibrosas y piel de aspecto normal de pacientes con TSC, y se dividieron en dos, una parte utilizada para la patología de rutina y la otra para secciones congeladas o cultivo celular.

A. Comparación histológica e inmunohistoquímica de muestras de tejido normal y muestras de tejido tumoral

Las diferencias histológicas (Figuras 3A y 3B) e inmunohistoquímicas entre muestras de pacientes normales y tumorales se caracterizaron como una referencia para la comparación. En resumen, las secciones de parafina de las muestras se desparafinaron y se trataron para la recuperación de antígeno en ebullición en regulador de citrato de sodio 10 mM (pH 6.0) durante 20 minutos. Las secciones congeladas se fijaron en acetona a -20 °C durante 10 minutos. Las secciones se tiñeron para marcadores celulares usando anticuerpos específicos y el kit VECTASTAIN ABC con Vector® Red o sustrato DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA) según los procedimientos del fabricante (excepto la tinción Ki-67, que utilizó tinción de ABC peroxidasa de rábano picante con DAB sustrato marrón peroxidasa). La intensidad relativa de la tinción positiva se cuantificó utilizando un microscopio óptico Olympus BX40 (Olympus, Melville, NY) y el software Openlab 4.0 (Improvision, Lexington, MA).

Los vasos en muestras de pacientes incrustados en parafina se tiñeron con un anticuerpo policlonal de conejo para CD31 (Abcam Inc, Cambridge, MA). El número y el área de vasos positivos se midieron y normalizaron por área total. La proliferación celular en las muestras se detectó mediante inmunotinción usando un anticuerpo monoclonal de conejo contra Ki-67 (Thermo Scientific, Fermont, CA). Las células Ki-67 positivas se contaron usando un microscopio óptico Olympus BX40 (Olympus, Melville, NY) y se normalizaron por la longitud de la epidermis. Los macrófagos asociados a tumores se detectaron en las muestras mediante tinción inmunohistoquímica con anticuerpo de rata anti-ratón F4/80 (Abcam). El contenido de macrófagos en la dermis se midió usando un objetivo de 20X al contar tres campos aleatorios de cada sección y normalizar por área. Los fagocitos mononucleares positivos para CD68 se identificaron por tinción inmunohistoquímica usando un kit ABC (vector) y un anticuerpo anti-CD68 (M0814, DakoCytomation). Finalmente, se determinó la función de mTORC1 elevada mediante inmunotinción para la proteína ribosómica fosforilada S6 (anti-pS6, 2211, Cell Signaling).

Las placas fibrosas mostraron células más grandes, estructura de colágeno alterada y vasos incrementados en comparación con la piel normal (Figuras 3A y 3B). Células similares a fibroblastos de placas fibrosas TSC, como angiofibromas y fibromas unguales, también mostraron inmunorreactividad incrementada para proteína ribosómica fosforilada S6 en comparación con fibroblastos normales (Figuras 3C y 3D), lo que indica que las placas fibrosas exhiben una función mTOR aumentada en comparación con la piel normal. La epidermis de las placas fibrosas también exhibió una mayor inmunorreactividad para pS6 (Figuras 3C y 3D), así como una mayor proliferación (Figuras 3E y 3F) que la piel normal. Esto puede ser causado por factores paracrinos liberados por las células TSC2 nulas. Estos cambios en células parecidas a fibroblastos de hamartoma y células epidérmicas estuvieron acompañados por incrementos dramáticos en dos constituyentes celulares adicionales: fagocitos mononucleares CD68-positivos (Figuras 3G y 3H) y vasos sanguíneos CD31-positivos (Figuras 3I y 3J). Los estudios se realizaron con muestras de tejido.

Tomados en conjunto, estos experimentos revelaron que las placas de la frente, como angiofibromas y fibromas unguales, contienen una mayor función mTORC1, vasos CD31 positivos, fagocitos mononucleares CD68 positivos y células epidérmicas proliferativas (es decir, Ki-67 positivas) en comparación con el TSC piel de apariencia normal.

B. Análisis de folículos pilosos en muestras de tejido tumoral y muestras de tejido normal

En comparación con los de la piel normal, los folículos pilosos en placas fibrosas y angiofibromas aparecían agrandados de forma variable, alargados o en mayor número, mientras que los fibromas periungueales tenían una epidermis engrosada pero no folículos pilosos (Figuras 4A-4D). Esta observación se basa en secciones de tejido teñidas con hematoxilina y eosina. Los folículos pilosos en los angiofibromas fueron hipertrofiados de forma variable, alargados o inmaduros. Los fibromas inguinales no tenían estructuras foliculares.

C. Análisis de la función TSC2 y mTORC1 en células tumorales

Se aislaron fibroblastos de los angiofibromas, fibromas periungueales, placas de la frente y biopsias de piel de apariencia normal cortando las biopsias en pequeños trozos y sembrándolas en placas de cultivo de 35 mm en 1 ml de DMEM con FBS al 10%, penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina (100 µg/ml) para cubrir el tejido. El medio se cambió dos veces por semana hasta que las células migraron para cubrir las placas. Las células se recogieron luego para el subcultivo.

Las células aisladas se analizaron para expresión de TSC2 por PCR, digestión de restricción y verificación de secuencia. En resumen, el ADN aislado de las células cultivadas se usó para la amplificación del exón 10 de TSC2 usando la ADN polimerasa de oro AmpliTaq (Applied Biosystems) en un regulador que contiene magnesio suministrado por el fabricante. El termociclado se realizó de la siguiente manera: desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 59 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto, seguido de ciclado 34 veces y

una extensión final a 72°C durante 1 minuto. Los productos de ADN amplificados por PCR se separaron por electroforesis y se purificaron mediante el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN). El ADN purificado se secuenció por USU BIC Genomic Division-DNA Sequencing Service usando un analizador genético 3130xl con ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

5 Los cebadores de PCR para la secuenciación fueron: 5'TGGTGTCCATGAGATCGTCC3' y 5'AGGAGCCGTTTCGATGTT3'. La secuenciación de células nulas en TSC2 desde placas fibrosas en la frente reveló una mutación sin sentido en el gen TSC2. Específicamente, una G en la posición 1074 en el exón 10 mutó a una A, que convirtió el codón UGG normal para triptófano en el codón de detención UGA (Figura 5A). Las células también mostraron una pérdida de heterocigosidad en tres marcadores de microsatélites que flanquean el gen TSC2 (Figura 10 5B), haciendo que las células sean homo- o hemicigotas para la mutación puntual en el exón 10. La mutación puntual introdujo un nuevo sitio de restricción para la escisión de BsmA1 de PCR-amplificado ADN tumoral (figura 5C). Los fibroblastos normales del paciente no contenían la mutación (Figura 5D).

Los productos de ADN amplificados por PCR también se analizaron mediante digestión con enzimas de restricción. Los cebadores de PCR se usaron para amplificar el exón 10 para el análisis de digestión enzimática fueron: 15 5'AAGCAGCTCTGACCCTGTGT3' y 5'GGCCCAAGGTACCATCTTCT3'. Para confirmar la presencia de la mutación del punto G → A que introduce el sitio de restricción BsmA1, se mezclaron 2 µl de ADN amplificado por PCR con 10X Buffer 4 (NEB), 2 µl de BsmA1 (NEB) y 12 µl de agua. Las mezclas se incubaron a 55°C durante la noche y las muestras de productos de PCR digeridos y no digeridos se separaron por electroforesis a 100 voltios en geles de TBE al 10%. La escisión se determinó en base a los patrones de migración de las bandas en el gel.

20 Las células también se analizaron para la hiperfosforilación de la proteína ribosómica S6 en condiciones de privación de suero. Las células (5 x 10⁵ células en DMEM con 10% de SFB) se siembran en placas de 60 mm. Al día siguiente, el medio fue reemplazado por DMEM libre de suero. Después de la incubación a 37°C durante otras 24 horas, las células se lisaron en regulador de extracción de proteínas (Tris 20 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 1%, NaF 20 mM, Na₂P₄O₇ 2.5 mM, β-glicerofosfato 1 mM, 1 benzamidina mM, p-nitrofenilfosfato 10 mM, fluoruro de 25 fenilmetilsulfonilo 1 mM). Las muestras que comprenden cantidades equivalentes de proteína total se separaron en geles de poliacrilamida al 10% (p/v) y se transfirieron a membranas Invitrolon™ PVDF de 0.45 µm (Invitrogen Corporation) antes de la inmunotransferencia usando proteína ribosómica anti-fosfo-S6 (Ser 235/236) o anticuerpos primarios de proteína ribosómica anti-S6 (Cell Signaling), anticuerpos secundarios anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare, RU), y kit de detección de quimioluminiscencia Super Pignal West Pico (Pierce Chemical, Rockford, IL). La intensidad de la banda se midió usando el sistema de obtención de imágenes 30 Kodak Capture DC 290 (Eastman Kodak Co, Rochester, NY).

Las células también se trataron con rapamicina, que inhibe mTORC1. Específicamente, se sembraron células tumorales de piel TSC o fibroblastos de apariencia normal en una placa de 96 pozos (2000 células por pozo) en DMEM 35 que contenía 10% de FBS. El día siguiente, el medio se cambió a 10% de FBS/DMEM con o sin rapamicina a 0.2 nM, 2 nM o 20 nM durante 3 días. Los números de células se evaluaron luego usando un kit de ensayo de proliferación celular MTT (CELLTITER® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI)). Estos experimentos revelaron que la rapamicina bloqueaba la activación de mTORC1 (Figura 6A), (la activación de mTORC1 se midió por fosforilación de la molécula corriente abajo, S6, como se describió anteriormente) y disminuyó la proliferación in vitro de fibroblastos sin CTS2 en mayor medida que muestras pareadas de fibroblastos de la piel de apariencia normal del 40 paciente (Figura 6B). Como la rapamicina es un inhibidor específico de mTORC1, estos resultados confirman que la fosforilación de S6 se debe a la activación de mTORC1 en las células sin CTS2.

En resumen, estos resultados mostraron que algunas muestras exhibían una expresión de TSC2 dramáticamente 45 disminuida y la activación constitutiva correspondiente de mTORC1. En células similares a fibroblastos desarrolladas a partir de 3 de 4 placas fibrosas, 3 de 65 angiofibromas y 8 de 41 fibromas periungueales, la expresión de la proteína TSC2 era indetectable o apenas detectable, y mTORC1 era constitutivamente activa (Figura 7). Para obtener muestras que eran puras o altamente enriquecidas para células sin CTS2, se cribaron células similares a fibroblastos cultivadas para detectar la pérdida de expresión de TSC2 y la activación de mTORC1. Estas células se usaron en los xenoinjertos que se describen a continuación.

D. Modelos de xenoinjerto para hamartomas TSC de piel

50 Se adaptó un sistema extensamente usado de compuestos dermoepidérmicos construidos in vitro para injerto. Los queratinocitos con melanocitos acompañantes se aislaron de prepucios de recién nacidos normales no identificados tratando con dispasa (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA) a 4°C durante la noche. La lámina epidérmica se separó de láminas dérmicas y posteriormente se digirió con tripsina al 0.05%-EDTA 0.53 mM (Invitrogen, Gaithersburg, MD) a 37°C durante 20 minutos. Las células se recogieron y sembraron en placas de cultivo de tejidos en medios 55 libres de suero de queratinocitos (Invitrogen) suplementado con extracto de hipófisis bovina y factor de crecimiento epidérmico recombinante.

Los sustitutos de la piel se crearon mezclando células tumorales de piel TSC2 nulas o fibroblastos normales de TSC2 recogidos de pacientes femeninos con 1 mg/ml de colágeno de cola de rata tipo 1 (BD Biosciences, Bedford, MA) en 10% de FBS/DMEM. La mezcla se colocó en placas Transpoco de 6 pozos (Corning Inc., Corning, NY) a una densidad

de 0.5×10^6 células por pozo. La mezcla de células se cultivó durante 3 días, y luego los queratinocitos cultivados se añadieron a una densidad de 1×10^6 células por pozo. Las construcciones se sumergieron a continuación en una mezcla 3:1 de DMEM y Ham F12 (GIBCO/Invitrogen, Grand Island, NY) que contenía FBS al 0.1% y se cultivaron durante 2 días. Después del cultivo, los queratinocitos se llevaron a la interfase aire-líquido, eliminando algo del líquido, y se cultivaron en DMEM y Ham F12 (1:1) que contenía FBS al 1% durante otros 2 días antes del injerto.

Se injertaron ratones en una sala de cirugía usando ratones Cr: NIH(S)-nu/nu hembra 6-8 semanas de edad (FCRDC, Frederick, MD). Los ratones se anestesiaron usando anestesia inhalatoria con una mezcla de O₂ e isoflurano (2-4%). Se estimó el área de injerto en la parte posterior del ratón, y se eliminó la piel usando tijeras curvadas después del lavado con povidina y etanol al 70%. Los sustitutos de la piel se colocaron en el lecho del injerto en la orientación anatómica correcta, se cubrieron con gasa de vaselina estéril y se fijaron con vendas. Los ratones fueron luego transferidos a jaulas estériles después de despertarlos nuevamente. Los vendajes se cambiaron en la semana 2 y se quitaron después de 4 semanas.

En ratones sacrificados de 8 a 17 semanas después del injerto, los injertos que contenían fibroblastos normales de TSC formaban piel sin folículos pilosos (Figura 8A). Los injertos que contenían células TSC2 nulas de ciertos tumores de piel TSC formaron folículos pilosos (Figura 8B, Tabla 1), lo que sugiere que las células tumorales de piel TSC indujeron neogénesis folicular en los queratinocitos del prepucio.

Tabla 1. Formación de folículos en injertos tumorales usando células de diferentes pacientes e injertos tumorales en ratones tratados con rapamicina o sin esta

i. Injertos tumorales					
Paciente #	Edad del paciente (años)	Tumor	Ubicación	Duración del injerto (semanas)	Injertos con folículos capilares/injertos HLA positivos totales
1	38	placa fibrosa	frente izquierda	17	0/4
1	38	angiofibroma	surco alar izquierdo	17	0/4
2	51	fibroma periungueal	cuarto dedo derecho del pie	17	0/3
3	31	placa fibrosa	derecho supraclavicular	17	1/5
4	20	placa fibrosa	frente central	8	3/5
4	20	placa fibrosa	frente central	17	2/3
5	31	angiofibroma	surco alar derecho	17	3/5
ii. Ratones injertados tratados con o sin rapamicina					
Muestra	Tratamiento	Injertos con folículos capilares/injertos HLA positivos totales	Densidad folicular (folículos/mm)	Área folicular/área dérmica (%)	Diámetro de folículo capilar (µm)
Placa fibrosa del paciente 4	Rapamicina	7/15	2.35 ± 0.09	9.3 ± 0.3	99.8 ± 6.0

i. Injertos tumorales					
Paciente #	Edad del paciente (años)	Tumor	Ubicación	Duración del injerto (semanas)	Injertos con folículos capilares/injertos HLA positivos totales
	Vehículo	7/12	2.16 ± 0.36	11.7 ± 2.5	116 ± 14

5 Los folículos pilosos en los injertos estaban apropiadamente espaciados y anatómicamente completos. Un tallo del cabello, glándulas sebáceas, capas concéntricas de la vaina de la raíz interna y externa rodeada por una vaina dérmica, y bulbo piloso con papila dérmica, matriz capilar y corteza estaban todos presentes (Figuras 9A-9D). Los folículos capilares imitaban la región de la que se obtuvieron. Por ejemplo, como en la piel facial, más folículos estaban en catágena (regresión) y telógena (en reposo) que anágena (en crecimiento), que es más típico de los folículos del cuero cabelludo (Figura 8B). Además, los haces de cabello no eran visibles desde la superficie de la piel de los injertos de células recogidas de la frente o la nariz (Figura 1C). Estos resultados sugieren que la invención puede producir resultados óptimos si la fuente de las células mesenquimales refleja su destino final (es decir, las células mesenquimales del cuero cabelludo se utilizan para tratar el cuero cabelludo, mientras que las células mesenquimales del brazo se usan para tratar una quemadura en el brazo).

15 Los tallos del cabello carecían de bolsas de aire espaciadas regularmente de cabello murino, en consonancia con su origen humano. Se realizó inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-COX IV humano para confirmar la especie de origen de los folículos. En resumen, las secciones de parafina de los xenoinjertos se desparafinaron y se trataron para la recuperación de antígeno como se discutió anteriormente para las muestras de tejido del paciente. A continuación, las secciones se tiñeron según las instrucciones del fabricante con un anticuerpo anti-COX-IV 3E11 (Cell Signaling technology, Danvers, MA), que no reconoce la COX IV de ratón. Se observó inmunorreactividad en los folículos, el epitelio y la dermis de xenoinjertos (Figuras 9E y 9F), pero no en la piel del ratón (datos no mostrados). Se obtuvieron resultados similares usando un anticuerpo monoclonal HLA clase I pan-humano (Figura 10A), que tiñó la epidermis interfolicular más intensamente que el epitelio folicular, como se esperaba en la piel normal.

25 Se realizó hibridación con fluorescencia in situ usando una sonda para el cromosoma Y humano para distinguir entre los queratinocitos del prepucio humano (que son de origen masculino) y las células nulas para TSC2 de pacientes femeninas. En resumen, el FISH del cromosoma Y se llevó a cabo usando la sonda naranja del espectro cromosómico CEP Y (DY21) (Vysis, Downers IL60515) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La sonda se hibridó con núcleos en la epidermis y el epitelio folicular, pero no en los núcleos de las células dérmicas (Figuras 9G y 9H) o flanqueando la piel normal del ratón (no se muestra). Estos resultados muestran que los queratinocitos del prepucio se indujeron para diferenciarse en varios de los componentes celulares que componen los folículos pilosos normales, confirmando la inducción de nuevo del folículo capilar.

30 La normalidad de los folículos capilares inducidos se confirmó adicionalmente por inmunohistoquímica usando marcadores de compartimentos específicos de folículos de cabello humano completamente desarrollados. En resumen, las secciones en parafina de los xenoinjertos se desparafinaron y trataron para la recuperación de antígeno como se discutió anteriormente. Las secciones se tiñeron con anticuerpos anti-nestina humana (AB5922, Millipore), anticuerpos anti-humanos versicolor (PA1-1748A, Thermo Scientific, Rockford, IL), anticuerpos anti-Ki-67 (RM-9106, Thermo Scientific), anti-anticuerpos humanos de queratina 15 (PCK-153P, Covance) y anticuerpos anti-citoqueratina 75 (GP-K6hf, Progen Biotechnik GmbH).

40 Las células en la región de la papila dérmica y la vaina dérmica inferior mostraron tinción normal para nestina (Figuras 9I y 9J) y versicano (Figura 9K). La inmunorreactividad para Ki-67 se concentró en la región de la matriz capilar (Figura 9M), típica de la proliferación de la fase anágena activa con una robusta formación de cabello. La queratina 15, un marcador para las células madre del folículo piloso localizadas en la región abultada, se localizó en la capa basal de la vaina radicular externa (Figuras 9N y 9O), como se observó en angiofibromas humanos. Finalmente, la inmunorreactividad para la queratina 75, un marcador para la capa acompañante, estaba presente en una sola capa de células entre las vainas radiculares interna y externa (Figura 9P), como se observa en el cabello humano normal. Por lo tanto, tanto por criterios morfológicos como inmunohistoquímicos, el cabello humano completamente desarrollado estaba presente en la piel xenoinjertada.

45 Las secciones también se analizaron para actividad de fosfatasa alcalina. En resumen, las secciones congeladas se fijaron en acetona durante 10 minutos, luego se lavaron en 1X PBS con Tween 20 al 0.1%. Las secciones se incubaron durante 15 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente con el regulador de preequilibrio (NaCl 100 mM, NgCl_2 50 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 9.5, Tween-20 al 0.1%). La solución en desarrollo (sustrato BM Purple AP, Roche, Indianapolis, IN) se aplicó al tejido durante 2 horas en una cámara húmeda oscura. La reacción se detuvo luego con

20 mM de EDTA en PBS, y las secciones se montaron con medio de montaje acuoso VectaMount™ AQ (Vector). Las células en la región de la papila dérmica y la vaina dérmica inferior mostraron actividad de fosfatasa alcalina normal (Figura 9I). Esto indica que las células injertadas de TSC2-nulo exhiben actividad de fosfatasa alcalina en la ubicación apropiada como se espera para las células de la vaina dérmica/papila dérmica.

- 5 Se investigó la identidad genética de las células en los xenoinjertos para determinar la presencia de células nulas en TSC2 en las regiones de papila dérmica/vaina dérmica inferior de los folículos inducidos. En resumen, las secciones de xenoinjertos se microdisecionaron y se extrajeron con ADN para el análisis de enzimas de restricción, como se discutió anteriormente. Estos estudios revelaron ADN mutante en células de la región de la papila dérmica/vaina dérmica inferior, pero no en el epitelio folicular (Figuras 5C y 5D). La presencia de células nulas en TSC2 en esta
10 región y en la dermis interfolicular (datos no mostrados) indicó que las células de tipo fibroblástico tumoral TSC son células progenitoras multipotentes que pueden exhibir características de fibroblastos dérmicos o células de vaina dérmica de papila/dérmica.

15 El modelo de xenoinjerto también se usó para determinar si las células nulas en TSC2 podían inducir las alteraciones citológicas y bioquímicas observadas anteriormente para las muestras de tejido tumoral. En resumen, los ratones injertados con células tumorales TSC (n=27) o fibroblastos normales TSC (n=27) recibieron rapamicina (2 mg/kg) (n=29) o un volumen igual de vehículo (0.9% NaCl, 5% polietilén glicol y 5% de Tween-80) (n=25) por inyección intraperitoneal en días alternos durante 12 semanas a partir de la semana 5 después del injerto. Los ratones se sacrificaron 24 horas después de la última inyección, los injertos se recogieron, y la mitad de cada injerto se preparó para la inclusión en parafina, mientras que la otra mitad se preparó para las secciones congeladas. Las secciones de
20 parafina se tiñeron para vasos sanguíneos (CD31) (Figuras 11Q-11T), fosforilación de la proteína ribosómica S6 (pS6) (Figuras 11E-11H) y persistencia de células humanas (COX-IV) (Figuras 11A-11D). Las secciones congeladas se tiñeron para proliferación celular (Ki-67) (Figuras 11I-11L) y macrófagos asociados a tumor (F4/80) (Figuras 11M-11P).

25 No hubo grandes diferencias en el tamaño o la apariencia entre el tumor y los injertos normales en ratones tratados con o sin rapamicina. Para los ratones tratados con vehículo, los números de células positivas para COX IV en la dermis de los injertos tumorales fueron similares a los de los injertos normales (Figuras 11A, 11C y 12A). Sin embargo, los injertos tumorales tratados con vehículo contenían un mayor número de células dérmicas y epidérmicas inmunorreactivas para pS6 que los injertos normales (Figuras 11E, 11G, 12B y 12C). Además, la epidermis de los injertos tumorales tratados con vehículo tenía un mayor número de células Ki-67-positivas que los injertos normales (Figuras 11I, 11K y 12D). Los injertos tumorales tratados con vehículo también contenían números aumentados de
30 fagocitos mononucleares positivos para CD68 y un aumento de la densidad, el tamaño y el área total del vaso (figuras 11Q y 11S) de los vasos CD31 positivos en comparación con los injertos normales. Se observaron cambios cualitativamente similares utilizando las células sin CTS2 de las otras placas fibrosas del paciente, angiofibromas y fibroma periungueal, en comparación con injertos normales construidos a partir de fibroblastos normales de TSC. Debido a que tanto los injertos tumorales como los injertos normales se generaron utilizando los mismos queratinocitos
35 del prepucio neonatal, estos resultados muestran que las células sin CTS2 son suficientes para inducir las características hamartomatosas de los tumores cutáneos TSC.

40 El tratamiento con rapamicina disminuyó el número de células dérmicas humanas en xenoinjertos tumorales, según se determina por tinción con anticuerpos anti-HLA clase I humanos (Figura 13C, D) o COX-IV (Figura 11C, D), pero las células tumorales persistieron durante tratamiento. La rapamicina no tuvo efectos significativos sobre el número de células en xenoinjertos normales (Figuras 13 y 14). La persistencia de células nulas en TSC2 al final del tratamiento se confirmó por la presencia de ADN mutante tanto en la dermis microdisecada de xenoinjertos tumorales como en fibroblastos cultivados a partir de xenoinjertos tumorales después de la recolección (datos no mostrados). Las células nulas en TSC2 persistieron a pesar de la penetración in vivo de rapamicina, como se muestra por la pérdida de inmunorreactividad de pS6 en células dérmicas y epidérmicas (Figuras 11E y 11G). El tratamiento con rapamicina
45 disminuyó el número de células epidérmicas Ki-67 positivas, fagocitos mononucleares y densidad, tamaño y área total del vaso en los injertos tumorales (Figuras 11 y 12). Estos resultados sugieren que la disminución del enrojecimiento y el tamaño de las lesiones cutáneas TSC observadas en pacientes que toman rapamicina pueden ser el resultado tanto de los efectos de las células antitumorales como de los efectos antiangiogénicos. Los efectos antiangiogénicos de la rapamicina pueden deberse a la inhibición directa del endotelio vascular y/o a los efectos indirectos, como la
50 disminución de la liberación de factores angiogénicos por células sin CTS2 o la disminución del reclutamiento de células mononucleares proangiogénicas. La rapamicina no influyó en el porcentaje de injertos con folículos pilosos, densidad del folículo piloso o diámetro del folículo piloso (Tabla 1). La falta de efecto sobre los parámetros del folículo piloso puede indicar que la inducción de folículos es independiente de mTORC1, o que la rapamicina fue ineficaz después de que comenzó la neogénesis folicular.

55 Se realizó hibridación con fluorescencia in situ utilizando sondas específicas para ADN humano o de ratón para distinguir células humanas de las de ratón en los xenoinjertos que utilizan células sin CTS2 y queratinocitos humanos (Figura 15). Cuatro µg de secciones congeladas se secaron al aire antes de incubarlas en 2X regulador SSC a 37°C durante 20 min. Después de la deshidratación secuencial en etanol, las secciones se trataron con HCl 10 mM más pepsina al 0.006% a 37°C durante 2.5 minutos y se lavaron dos veces en PBS antes de deshidratar y secar al aire.
60 Las secciones se desnaturalizaron en formamida al 70%, 2X SSC a 70°C durante 2 min y se deshidrataron antes de hibridarse durante la noche con la mezcla de sonda (10.5 µL de regulador de hibridación y 2 µL de sonda) a 37°C. La muestra se lavó dos veces a 37°C con 2X SSC/formamida al 50% y se contratiñó aplicando 10 µL de DAPI (Vector

Laboratories) en cada área objetivo. Las sondas utilizadas fueron Conc. Pan Centromeric Paint 1695-Cy3-02 humana (cat # SFP3339) y Conc. Mouse Pan Centromeric Paint-FITC 1697-MF-02 (cat # MF-02) (Openbiosystem). La tinción con DAPI mostró núcleos de células que comprendían el bulbo del folículo piloso, que incluía el epitelio folicular y las células de la vaina dérmica de papila/vaina y, en la esquina inferior izquierda, las células endoteliales vasculares. La sonda centromérica específica de humanos Cy3 marcó las células en el bulbo del folículo piloso, incluidas las células de la vaina dérmica inferior (flecha horizontal) y los fibroblastos dérmicos adyacentes (flechas verticales). La sonda centromérica específica de ratón FITC etiquetó células endoteliales (punta de flecha). Una imagen fusionada mostró que las células del epitelio folicular, la cubierta dérmica y la papila dérmica eran de origen humano (flechas). Estos resultados demuestran que los folículos capilares eran de origen humano, tanto para los componentes epidérmicos como dérmicos (papila dérmica y vaina dérmica).

E. Resumen y conclusiones

Este ejemplo describe sustitutos de piel capaces de neogénesis folicular. Este ejemplo también describe el desarrollo de un modelo de xenoinjerto para hamartomas cutáneos en el complejo de esclerosis tuberosa (TSC). Las células TSC2 nulas similares a fibroblastos cultivadas a partir de hamartomas de piel TSC humanos, pero no fibroblastos de piel de aspecto normal del paciente, estimularon cambios histológicos que imitaban hamartomas TSC e indujeron queratinocitos de prepucio humano normales para formar folículos capilares. Los folículos se espaciaron periódicamente, se orientaron correctamente y se completaron con glándulas sebáceas, tallos capilares, vainas radiculares internas y externas y marcadores expresados de la capa acompañante y la región protuberante de las células madre. Las células nulas TSC2 que rodean la porción inferior del folículo piloso (es decir, el bulbo piloso) expresan marcadores de la vaina dérmica y la papila dérmica, incluido el marcador de células madre nestina. Los xenoinjertos tumorales recapitulaban las características de los hamartomas cutáneos TSC, incluida la función mTORC1 aumentada, la angiogénesis y la proliferación de las células epidérmicas suprayacentes. El tratamiento con rapamicina, un inhibidor de mTORC1, normalizó estos parámetros y redujo el número de células tumorales, pero no alteró el tamaño o la densidad del folículo piloso.

Estos estudios indican que la arquitectura del tejido desordenado de los hamartomas resulta de células con capacidades inductivas que normalmente se encuentran durante el desarrollo del tejido fetal. Por lo tanto, este ejemplo muestra que las células similares a fibroblastos de TSC2 nulo son las células inductoras de los hamartomas cutáneos TSC, simulando la angiogénesis, y son capaces de inducir neogénesis folicular. La expresión de marcadores de células madre y la preservación de la capacidad inductora del cabello por estas células sugieren que la pérdida de la función TSC2 altera la diferenciación de una célula progenitora multipotente en la dermis. En ratones, la pérdida de TSC2 en la glía radial aumenta el grupo de progenitores y disminuye las neuronas, mientras que la eliminación de TSC1 en células madre hematopoyéticas aumenta los progenitores de granulocitos-monocitos y disminuye los progenitores de megacariocitos-eritrocitos. Las células TSC2 nulas de los angiofibromas y las placas fibrosas son herramientas para explorar la morfogénesis folicular y la regeneración. El hecho de que los tumores cutáneos TSC usualmente surgen postnatalmente sugiere la posibilidad de crear o potenciar células inductoras de folículos mediante el uso de agentes que impactan en la red TSC1/TSC2 y/o redes de señalización involucradas en la génesis de otros hamartomas foliculares. Este estudio de hamartomas proporciona información sobre la organización y maduración de los tejidos.

Ejemplo 2: Estudios de inactivación de TSC2 y FLCN

Para imitar la pérdida de expresión de TSC2 observada en células con capacidades probadas tricogénicas, se usó ARNsh para desactivar la expresión de TSC2 en fibroblastos cultivados y células de papila dérmica. Además, dado que los pacientes con síndrome Birt-Hogg Dube tienen una pérdida de la función FLCN que conduce a la formación de hamartomas cutáneos similares a hamartomas cutáneos TSC, también se usó ARNhc para desactivar la expresión de FLCN en fibroblastos cultivados y células papilares dérmicas. Como se verá más adelante, las desactivaciones de TSC2 y FLCN mejoraron las propiedades tricogénicas de las células.

A. Inactivación de genes

Las células mesenquimales de tipo salvaje (es decir, fibroblastos dérmicos y células de la papila dérmica) se modificaron para disminuir la función de TSC1/TSC2 y aumentar la función de mTORC1 mediante la reducción de la expresión de TSC2 usando ARNhc a TSC2. Además, las células mesenquimales de tipo salvaje se modificaron para imitar la pérdida de la función TSC1/TSC2 al disminuir la expresión de FLCN usando ARNsh a FLCN. Se usaron partículas lentivirales comercialmente disponibles que portaban el vector pGIPZ-lentiviral ARNshmir que contenía una secuencia en horquilla dirigida al TSC2 (Open Biosystems) para inactivar la expresión de TSC2. Se usaron partículas lentivirales disponibles en el mercado que portaban el vector pGIPZ-lentiviral ARNshmir que contenía una secuencia de horquilla dirigida a FLCN (Open Biosystems) para inactivar la expresión de FLCN. Fibroblastos de prepucio neonatal o células de papila dérmica humana fueron transducidos por las partículas lentivirales, seguido de la selección con puomicina (2 µg/ml) comenzando 48 horas después de la transducción. Las células que expresan de manera estable ARNsh (como se determina por la expresión de GFP) se combinaron y mantuvieron en puomicina. Se usó un lentivirus pGIPZ que contenía un control de ARNsh no dirigido (shNT, NT) sin homología con genes de mamíferos conocidos como el control negativo para los experimentos de inactivación.

La Figura 16 muestra la expresión exitosa de GFP en todos los fibroblastos de prepucio transfectados de forma estable a partir de un experimento de inactivación de TSC2. Todas las células permanecieron transducidas permanentemente durante al menos 11 pases. El análisis de inmunotransferencia Western confirmó que las transducciones dieron como resultado una inactivación de más del 90% de TSC2 (Figura 17, banda superior). Se observaron los mismos resultados en células de papila dérmica transducidas con vectores de inactivación de TSC2 (datos no mostrados). Además, las partículas anuladas de FLCN transdujeron el 100% de los fibroblastos (datos no mostrados). Por lo tanto, prácticamente todas las células se transdujeron con los vectores utilizados para desactivar los genes de interés, y la expresión de los genes diana se redujo sustancialmente.

B. Efecto de la inactivación de TSC2 en la señalización mTORC1

Se realizó un análisis de inmunotransferencia Western sobre los fibroblastos de prepucio reducidos de TSC2 de manera estable transfectados para determinar si la expresión de TSC2 se había reducido lo suficiente como para observar la activación de la señalización a través de mTORC1. La Figura 17 ilustra que la inactivación de TSC2 se acompañó de una señalización de mTORC1 hiperactiva, como lo indica la hiperfosforilación de la proteína ribosómica S6 (pS6) en condiciones de privación de suero. El S6 total no se modificó, y un control de tubulina confirmó que se habían cargado cantidades comparables de proteína en los diferentes carriles. Se obtuvieron resultados similares en transducciones duplicadas (datos no mostrados). Por lo tanto, la expresión de TSC2 fue inactivada con éxito de una manera que activó la señalización a través de mTORC1.

Estos resultados demuestran que las células mesenquimales de tipo salvaje pueden modificarse para disminuir la función de TSC1/TSC2 y aumentar la función de mTORC1 disminuyendo la expresión de TSC2 o disminuyendo la expresión de una función mimética de TSC1/TSC2.

C. Análisis de tricogenesis

Las células que inducen la formación de folículos pilosos (células tricogénicas) expresan fosfatasa alcalina. La fosfatasa alcalina es un marcador para las células de la papila dérmica, y las células de la papila dérmica con mayor actividad de fosfatasa alcalina tienen una mayor capacidad para inducir folículos capilares in vivo. Por consiguiente, se midió la actividad de la fosfatasa alcalina en las células transducidas cultivadas para determinar si la disminución de la expresión de TSC2 o FLCN daba como resultado un mayor número de células tricogénicas. Como se muestra en la Figura 18, las células de la papila dérmica humana tienen alta actividad de fosfatasa alcalina durante el paso temprano, que disminuye rápidamente con el paso posterior. Por el contrario, la transducción de fibroblastos humanos normales con shTSC2, pero no con el vector no objetivo (shNT), aumentó la actividad de la fosfatasa alcalina y este aumento se mantuvo durante varios pasajes. En general, la actividad de la fosfatasa alcalina fue mayor en las células sin CTS2 que en los fibroblastos normales del TSC, lo que indica actividad tricogénica en las células con inactivación de TSC2. Se obtuvieron resultados similares cuando TSC2 se inactivó en células de papila dérmica humana (Figura 19) y cuando se inactivó FLCN en fibroblastos dérmicos (Figura 20). Por lo tanto, las células con inactivación de TSC2 o FLCN mostraron una actividad celular incrementada de fosfatasa alcalina, un marcador para células de papila dérmica tricogénicas.

D. Análisis de la neogénesis del folículo piloso en un ensayo de bola colgante

Se usó un ensayo de folículo piloso in vitro para determinar el efecto de la inactivación del TSC2 sobre la organización del folículo piloso y la formación de la estructura en cultivos de células colgantes. En resumen, se realizaron cultivos colgantes de 30.000 células a partir de células mesenquimales modificadas (fibroblastos de prepucio neonatal (NFF) con inactivación de control de TSC2 (shTSC2) o no plantilla (NT)) con queratinocitos de prepucio neonatal (NFK) (30.000 células cada uno por grupo) en 10 µl de una mezcla 1:1 de medio de papila dérmica y medio libre de suero queratinocito. Los aglomerados se incubaron durante 4 semanas como gotas colgantes en una incubadora. Los cultivos de gota colgante se analizaron con hematoxilina y eosina, y se realizó inmunohistoquímica con anticuerpo anti-pan-citoqueratina para identificar selectivamente queratinocitos.

La Figura 21 compara las estructuras formadas en cultivos de gotas colgantes usando queratinocitos y fibroblastos transducidos con control de ARNsh en inactivación de TSC2 o no plantilla (NT). Los aglomerados con células inactivadas TSC2 tienden a mostrar una mayor organización, con queratinocitos que rodean a los fibroblastos (Figuras 21A y 21C), mientras que los controles NT tienden a permanecer desorganizados (Figuras 21B y 21D). Se observaron estructuras parecidas a fibra capilar en cultivos de inactivación de TSC2. En estos grupos, se formaron estructuras similares a fibras refráctiles que autofluorescen con el mismo color verde que el cabello humano normal (Figura 21E). Estos grupos con células de inactivación de TSC2 pueden implantarse en la piel o incorporarse en injertos para la formación de folículos pilosos, como se describe a continuación.

E. Análisis de la neogénesis del folículo piloso en injertos compuestos dérmico-epidérmicos

Se generaron compuestos dérmicos-epidérmicos utilizando fibroblastos de prepucio neonatal (NFF) o células de papila dérmica transducidas y que expresan de manera estable el vector de inactivación de TSC2. Las células se mezclaron con 1 mg/ml de colágeno de cola de rata tipo 1 en 10% de FBS/DMEM, y se añadieron a placas transpozo de 6 pozos a una densidad de 0.5×10^6 células por pozo. Las construcciones dérmicas se hicieron crecer en 10% de FBS/DMEM durante 3 días. Cinco microesferas de caída colgantes de 30.000 células de NFF transducidas con shTSC2 se

colocaron suavemente sobre los constructos dérmicos y se recubrieron con 1×10^6 queratinocitos. Los compuestos dérmico-epidérmicos se incubaron durante 4 días sumergidos en una mezcla de DMEM y Ham F12 (3:1) que contenía FBS al 0.1%, después de lo cual los materiales compuestos se llevaron a la interfase aire-líquido y los equivalentes de la piel se fijaron en 10% formalina después de crecer durante 4 u 8 días en DMEM y Ham F12 (1:1) que contenía 1% de FBS. Los equivalentes de piel fueron luego analizados por hematoxilina y eosina (H&E), y la inmunohistoquímica se realizó con anticuerpo anti-pan-citoqueratina.

Como se muestra en la Figura 22, los compuestos dérmico-epidérmicos compuestos de queratinocitos humanos normales y fibroblastos en un gel de colágeno formaron un epitelio escamoso estratificado que recubre el equivalente dérmico, y la unión epidérmica dérmica era bastante recta sin invaginaciones de queratinocitos. Sin embargo, utilizando fibroblastos con inactivación de TSC2, se formaron invaginaciones tubulares de queratinocitos durante 4 días (Figura 22A), y tras 8 días estas invaginaciones se habían agrandado en tubos multicelulares con un borde periférico de queratinocitos aplastantes (Figura 22B), similares en apariencia a un folículo piloso en desarrollo. La inmunohistoquímica reveló que estas estructuras se invaginaban en el equivalente dérmico (Figuras 21C-E), demostrando que eran células epiteliales. Por lo tanto, la inactivación de TSC2 promueve la formación in vitro de estructuras similares a folículos pilosos en compuestos dérmico-epidérmicos.

F. Análisis de la neogénesis de folículo piloso en ratones injertados con compuestos dermoepidérmicos

Se realizaron experimentos de injerto de ratón para determinar si la inactivación de TSC2 promueve la formación de folículos capilares in vivo. En resumen, se transdujeron fibroblastos de prepucio neonatal y papila dérmica y se seleccionaron para vector de precipitación de TSC2 o vector no diana como se discutió anteriormente. Las células se mezclaron con 1 mg/ml de colágeno de cola de rata tipo 1 (BD Biosciences, Bedford, MA) en 10% de FBS/DMEM, y se añadieron a placas transpoco de 6 pozos (Corning Incorporated, Corning, NY) a una densidad de 0.5×10^6 células por pozo. Las construcciones dérmicas se cultivaron en 10% de FBS/DMEM durante 3 días y se recubrieron con 1×10^6 queratinocitos. Los compuestos dérmico-epidérmicos se incubaron durante 2 días sumergidos en una mezcla de DMEM y Ham F12 (3:1) (GIBCO/Invitrogen, Grand Island, NY) que contenía 0.1% de FBS, después de lo cual los compuestos se llevaron a la interfase aire-líquido y se cultivaron durante otros 2 días en DMEM y Ham F12 (1:1) que contenía 1% de SFB antes del injerto.

Se anestesiaron ratones Cr:NIH(S)-nu/nu de 6-8 semanas de edad (FCRDC, Frederick, MD) con una mezcla de O_2 e isoflurano (2-4%). El área de injerto en la parte posterior del ratón se estimó cuidadosamente, y se retiró piel con unas tijeras curvas. Los compuestos se colocaron en el lecho del injerto en la orientación anatómica correcta, se cubrieron con gasa de vaselina estéril y se fijaron con vendas. Las vendas se cambiaron a las 2 semanas y se retiraron después de 4 semanas. En total, se injertaron 39 ratones (6 ratones-fibroblastos de prepucio neonatal con ARNsh de control no dirigido; 14 ratones-fibroblastos de prepucio neonatal con ARNsh TSC2; 6 ratones-papila dérmica con ARNsh de control no dirigido y 13 ratones-papila dérmica con TSC2 ARNsh). En 6 ratones muestreados 10 semanas después del injerto, los fibroblastos shTSC2 indujeron estructuras similares a folículos pilosos en uno de los tres ratones muestreados, y las células de papila dérmica shTSC2 indujeron folículos capilares en uno de los tres ratones muestreados (Figura 23). Los resultados están pendientes para los demás ratones en el momento de la presentación.

G. Conclusiones

Los resultados presentados en este Ejemplo que usa la transducción lentiviral de ARNsh proporcionan una prueba de concepto de que la pérdida de TSC2 o FLCN potencia las capacidades tricogénicas de los fibroblastos.

Ejemplo 3: Aislamiento de células mesenquimales de tumores anexiales o piel humana normal

Las células mesenquimales se pueden aislar de una o más de las siguientes fuentes: piel o mucosa del paciente para células autólogas; piel o mucosa del donante para células alogénicas; piel o mucosa normal; piel con un tumor anexial; y otros tejidos (por ejemplo, grasa, médula ósea, etc.). Los fibroblastos se pueden aislar por digestión enzimática si el tamaño de muestra es suficientemente grande (es decir, mayor que o igual a 1 cm^3).

A. Método de migración celular

Las células se pueden aislar a partir de muestras de piel o tumores de piel usando un método de migración celular. Para aislar células mesenquimales por migración celular de explantes, las muestras de piel se cortan en trozos pequeños y se transfieren a placas estériles de 35 o 100 mm que contienen 1 o 5 ml de FBS al 10%/DMEM o medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM; Lonza Group Ltd, Suiza). Las placas se incuban en una incubadora de CO_2 al 5% a $37^\circ C$. El medio se cambia dos veces por semana hasta que se observa un número sustancial de células mesenquimales. Las células que migran desde los fragmentos de tejido se monitorizan regularmente usando un microscopio invertido. Las células mesenquimales se subcultivan cuando ocupan la mayor parte de la superficie del plato entre los explantes (aproximadamente 2-3 semanas después del inicio del cultivo). Las células se recogen para el subcultivo y las piezas pequeñas de tejido se transfieren a placas nuevas para aislar más células, repitiendo la transferencia de explantes más de 10 veces hasta que las células ya no migran del tejido. Las células de cada transferencia se almacenan en nitrógeno líquido en el paso temprano.

B. Dos métodos alternativos de disociación celular

La disociación celular de muestras de piel o tumores de piel se puede usar para aislar células mesenquimales. De acuerdo con este método, la muestra de piel (1 X 1 cm) se trata durante la noche en placas de 60 mm con 3 ml de dispasa a 4°C. Alternativamente, las muestras se pueden tratar con tripsina al 0.25% durante 30 minutos a temperatura ambiente. La dermis se separa de la lámina epidérmica y se corta en trozos pequeños. La muestra se incuba en un tubo de centrifuga de 50 ml con 10 ml de solución enzimática (HEPES que contiene medio de insulina MEM mejorado de Richter (RPMI), suplementado con piruvato sódico 1 mM, colagenasa bacteriana 2.75 mg/mL, hialuronidasa 1.25 mg/mL y 0.1 mg/mL DNasa I) a temperatura ambiente durante 3 h. Después de la incubación, el tejido se disocia mecánicamente pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces. La suspensión celular se filtra a través de una malla de nylon estéril para eliminar los fragmentos de tejido y se centrifuga a 400 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descarta, y el sedimento celular se resuspende en 10 ml de medio (tal como medio de cultivo de células madre mesenquimales o DMEM más 10% de SFB) y se transfiere a una placa de cultivo de 75 cm². Las células se cultivan en una incubadora de CO₂ al 5% a 37°C, y el medio se cambia 24 h más tarde para eliminar el material no adherente.

Un enfoque alternativo para la disociación celular de muestras de piel o tumores de piel es lavar la dermis tres veces en PBS, picar en pedazos pequeños (2-3 mm³) y digerir en solución de PBS (calcio y magnesio) que contiene colagenasa de extracto de *Clostridium histolyticum* (CHC) (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ) en 4 ml/g de tejido a 37°C en condiciones de agitación suave (50-55 rpm). Después de la incubación, la digestión se filtra a través de una cámara de filtro abierta (NPBI, Emmer-Compascuum, Países Bajos), y el filtro se enjuaga dos veces con 10 ml de medio de cultivo. El peso del tejido húmedo se mide antes y después de la digestión para calcular la eficiencia de digestión del tejido. La suspensión celular se centrifuga a 250 x g durante 10 minutos, el sobrenadante se aspira y las células se resuspenden en medio de cultivo celular. Usando una cámara de recuento, la concentración de células se determina tres veces en tres muestras tomadas independientemente (rendimiento de células de aislamiento), y la viabilidad se evalúa por exclusión con azul tripán (Sigma). Las células se siembran en cultivo a una densidad de 500 células/mm² o 1000 células/mm² (5 x 10⁴ o 10 x 10⁴ células/cm²) en tres matraces separados. Después de 24 horas, el porcentaje de células adheridas se evalúa usando un microscopio invertido conectado a una cámara de video con una impresora de imágenes capturadora de fotogramas.

C. Aislamiento de células mesenquimales de papila dérmica (DP)/vaina dérmica (DS)

Las células papilares dérmicas se pueden aislar a partir de muestras de cuero cabelludo humano mediante microdissección, seguido de tratamiento con colagenasa durante 30 minutos con agitación suave a 37°C. El enriquecimiento de las células papilares dérmicas se puede confirmar usando tinción con azul de toluidina, o examinando las células en busca de células intranucleares. Las células pueden cultivarse en una mezcla 1:1 de medio Chang y medio acondicionado con queratinocitos, cambiados cada 2-3 días.

Las células de vaina dérmica se pueden aislar de la piel humana adulta normal cortando en cuadritos muestras de piel humana y luego disociando enzimáticamente las muestras con colagenasa. La disociación enzimática produce más células en un período de tiempo más corto que el uso de explantes de piel. Además, la viabilidad celular y la proliferación son suficientes para poblar equivalentes dérmicos para injertos autólogos. Las células de vaina dérmica se pueden identificar incubando las células con anticuerpo anti-CD10 marcado con FITC durante 30 minutos a 4°C, seguido de clasificación celular.

Las células DP y DS también se pueden aislar enjuagando el tejido del cuero cabelludo humano normal (1 X 1 cm) en regulador de Hanks tres veces, cada una durante 10 minutos, cortando en tiras de aproximadamente 0.3 a 0.5 cm de ancho, y cortando en el interfaz de la dermis y la grasa subcutánea. El tejido subcutáneo se incuba con 3-5 ml de dispasa al 0.5% (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) a 4°C durante 16-18 h. Los folículos capilares se extraen de la grasa cutánea. Los epitelios se extraen de las vainas dérmicas aplicando una presión suave con la punta de un par de microforcepiones. A continuación, las vainas dérmicas se incuban en 0.2% de colagenasa D (Boehringer Mannheim, Alemania) en medio esencial mínimo de Engle (MEM) (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH, Estados Unidos) que contiene 10% de SFB a 37°C durante 6-8 horas hasta que el tallo de la papila dérmica se digiera bajo el control del microscopio. Cuando las vainas fibrosas se digieren por completo y la papila apenas comienza a digerirse, la digestión de la enzima se detiene. Se agrega Hanks y la suspensión se centrifuga durante 5 minutos a 2000 rpm, que se repite tres veces. El sedimento se resuspende y se centrifuga a baja velocidad a 200 rpm durante 5 minutos y se repite tres veces dejando las células DS en el sobrenadante para cultivo. Las papilas dérmicas están completamente aisladas de los residuos con centrifugación a baja velocidad. El sedimento de papila dérmica final se resuspende sin células aisladas, y se transfiere a un matraz de 25 ml que contiene medio para cultivo de explante en medio MEM con 10% de SFB. Los cultivos se incuban durante 5 días y el medio se cambia dos veces por semana.

Las células dérmicas de la papila y de la vaina dérmica aisladas se pueden incubar a continuación en cualquier medio adecuado para probar la inducción o el mantenimiento de los marcadores de la papila dérmica y de la vaina dérmica.

D. Aislamiento de células mesenquimales usando métodos para obtener precursores derivados de la piel o células de la cresta neural de la piel

Las células mesenquimales humanas se aíslan usando métodos similares a los precursores derivados de la piel. (Isolation of skin-derived precursors (SKPs) and differentiation and enrichment of their Schwann cell progeny, Nature

5 protocols 1(6): 2803-2812 (2006)). En resumen, muestras de piel humana o tumores de piel se lavan en HBSS, se cortan en trozos pequeños que miden 3-5 mm² y se digieren en placas de cultivo de tejidos, de plástico, de 100 mm (10 cm) llenas con 25 ml de solución de Blendzyme (Roche) durante 24-48 horas a 4°C. La epidermis se separa por pelado de la dermis subyacente con unas pinzas finas, y el tejido dérmico aislado se corta en trozos pequeños de 1-2 mm² utilizando una cuchilla de afeitar. Estos pequeños trozos de dermis humana se recogen en tubos cónicos de 15 ml que contienen 5-10 ml de solución de Blendzyme fresca. También se puede agregar DNaseI (una alícuota de 400 µl) a la suspensión para reducir la agregación de las células. Para la digestión más eficiente del tejido, la muestra puede agitarse suavemente durante 1-2 horas a 37°C. Una vez completada la digestión, se añaden 20 ml de medio de lavado más 10% de FBS para inactivar la Blendzyme. Las muestras de tejido se centrifugan a 1.200 r.p.m. durante 6-8 minutos para sedimentar todas las células y piezas de piel. El sobrenadante, que contiene el medio más enzima, se descarta. Se agrega medio de lavado fresco (3-5 ml) y el gránulo se disocia usando una pipeta de plástico desechable de 10 ml. La suspensión se centrifuga durante 20 segundos para sedimentar grandes trozos de piel a 1.200 r.p.m. El sobrenadante se recoge en un tubo de recolección de 50 ml y se mantiene en hielo. El gránulo de tejido se disocia en medio nuevo para repetir la etapa de trituración hasta que las piezas de tejido se vuelven delgadas y las células ya no se pueden liberar. La suspensión celular disociada se pasa a través de un filtro de células de 70 µl en un tubo cónico de 50 ml y se centrifuga a 1.200 rpm. durante 7 min. El sedimento celular se resuspende en medio de lavado más 2% de suplemento B27 (Invitrogen). Los volúmenes de resuspensión varían de 5 a 20 ml de medio dependiendo del tamaño del sedimento, y se pueden ajustar para simplificar la cuantificación del rendimiento celular. Las células dérmicas disociadas se diluyen en 30 ml de medio de proliferación (DMEM/F12 (3:1) que contiene 0.1% de penicilina/estreptomina, 40 µg/ml de fungizona, 40 ng/ml de FGF2, 20 ng/ml de EGF, 2% de suplemento B27) para un matraz de 75 cm² y 10 ml para un matraz de 25 cm². Las células se cultivan durante 7-14 días sin pases para la formación de colonias esféricas, y el medio se cambia cada 4-5 días.

Ejemplo 4: Generación de células mesenquimales modificadas

A. Inactivación de genes

25 Para inactivar la expresión génica, por ejemplo, de TSC1, TSC2, CYLD, LKB1, FLCN, MEN1, NF1, PTEN, PRAS40, 4E-BP1, GSK3 o Deptor, pueden usarse partículas lentivirales del ARN de horquilla corta, clonado personalizado (ARNsh) o ARNsh de control no diana en el vector pLKO.1-puro-CMV-tGFP (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para un experimento piloto, las células se sembraron en placas de 6 pozos (2 x 10⁵ células/pozo) y se cultivaron en 10% de FBS/DMEM durante 24 horas. El medio se reemplaza por 2 ml de 10% de FBS/DMEM que contiene ARNsh para el gen indicado o partículas lentivirales ARNsh de control (0, 1, 2, 5, 10 o 20 MOI) más 8 µg/ml de bromuro de hexadimetrina y se incuba durante la noche. Se elimina el medio que contiene las partículas virales, y las células se cultivan en medio completo fresco durante 24 horas antes de seleccionar con puromicina durante 10-14 días (la titulación puede realizarse antes de su uso tratando 1 x 10⁴ células en placas de 96 pozos con 0.5-10 µg/ml de puromicina). El medio con puromicina se reemplaza cada 3 días. Las colonias celulares resistentes a la puromicina se recogen y se cultivan para un análisis posterior. La expresión génica se mide por qRT-PCR o inmunoprecipitación Western. Para evaluar las células después de la eliminación de genes, las células transducidas se agrupan después de la selección con puromicina. Los niveles de proteína diana en las células transducidas se miden por inmunotransferencia de tipo Western y se comparan con las células de shARN de control en los pasajes 1, 10, 20, 30 y 40.

40 Alternativamente, o además, los métodos de terapia génica pueden usarse para inactivar la expresión génica. Por ejemplo, las nucleasas con dedos de zinc pueden usarse para generar roturas de doble cadena dirigidas en los genes TSC1 o TSC2, o en los genes que codifican proteínas que estimulan la función TSC1/TSC2. (Véase, por ejemplo, Lee et al., *Genome Res.*, 20: 81-89 (2010); Händel et al., *Curr. Gene Ther.*, 11: 28-37 (2011); Holt et al., *Nat. Biotechnol.*, 28: 839-47 (2010) y Ledford, *Nature*, 471: 16 (2011)). En resumen, las células aisladas pueden tratarse con nucleasas de dedos de zinc (ZFN) de CompoZr[®] (Sigma Aldrich) (u otras nucleasas adecuadas) que normalmente se dirigen a los primeros 2/3 de la región de codificación del gen de interés. Los ZFN se diseñan in silico y se prueban en un ensayo celular para identificar ZFN que rompen el sitio objetivo, y se selecciona un par de ZFN para su uso. Los ZFN se pueden administrar a las células usando nucleofección, electroporación o transfección basada en lípidos de plásmidos ZFN o transcritos de ARNm. Los ZFN también se pueden administrar usando un vector viral como el lentivirus. Para la nucleofección, se tripsinizan 5x10⁶ a 10x10⁶ células a aproximadamente 80% de confluencia y se transfectan con aproximadamente 5 µg de cada plásmido que codifica ZFN usando kits Nucleofector (Amaxa Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la transfección, las células se mantienen en medios tales como DMEM con 10% de SFB. Un ensayo de escisión específico de no coincidencia (tal como el ensayo de endonucleasa Surveyor (Cel-1; Transgenomics) en el que Cel-1 escinde heterodúplex de cadenas de ADN de tipo salvaje y mutado después de la desnaturalización-renaturalización) puede usarse para determinar la proporción de células con el golpe de gracia. Para obtener poblaciones de células puras o enriquecidas con la inactivación, las células pueden clonarse. Alternativamente, un gen tal como GFP o un plásmido de puromicina se puede insertar mediante recombinación homóloga en el momento de la inactivación de TSC1 o TSC2 con ZFN, permitiendo que las células se clasifiquen usando FACS o se enriquezcan usando selección de antibiótico. Los niveles de proteína diana en las células tratadas se pueden medir mediante inmunotransferencia Western y se pueden comparar con células control no tratadas.

Las células transducidas también pueden analizarse para determinar el efecto de la inactivación sobre la señalización de mTORC1. Esto se puede lograr midiendo la expresión de fosfo-S6 en las células transducidas por

inmunoprecipitación Western y comparando para controlar las células ARNsh en el pasaje 1, 10, 20, 30 y 40. Como la señalización Wnt está activa durante la morfogénesis capilar, también se puede evaluar el efecto de las desactivaciones en la señalización de Wnt. Esto se puede hacer midiendo el nivel de beta-catenina y GSK3 por inmunoprecipitación Western con anticuerpos específicos (Cell Signaling Technology, Inc). La red WNT está activa en la placoda epidérmica durante el desarrollo, y se cree que las proteínas WNT son parte de la señal que desencadena la formación del condensado dérmico. (Kishimoto, J. et al., *Wnt Signaling Maintains the Hair-Inducing Activity of the Dermal Papilla*, *Genes & Development* 14 (10):1181-1185 (2000); Shimizu, H. et al., *Wnt Signaling Through the Beta-Catenin Pathway is Sufficient to Maintain, but Not Restore, Anagen-Phase Characteristics of Dermal Papilla Cells*, *The Journal of Investigative Dermatology* 122 (2):239-245 (2004).

10 B. Inducción de genes

Las células mesenquimales humanas pueden transfectarse para la expresión estable de genes relacionados con la activación de la cadena mTOR o del folículo piloso (por ejemplo, Ras, Raf, Mek, Erk, Rsk1, PI3K, Akt1, Akt2, Akt3, Rheb, mTOR, Raptor, Rictor, mLST8, S6K1, proteína ribosómica S6, SKAR, SREBP1, eIF4e, IKKbeta, Myc, Runx1 o p27) bajo el control de un promotor constitutivamente activo usando procedimientos estándar. (Ortiz-Urda, S. et al., *Injection of Genetically Engineered Fibroblasts Corrects Regenerated Human Epidermolysis Bullosa Skin Tissue*, *The Journal of Clinical Investigation* 111(2): 251-255 (2003).) En pocas palabras, los genes pueden introducirse en *Streptomyces* fago ϕ C31 integrada asistida por integración estable de plásmido con CMV IE promotor mediante la inserción de 285-bp ϕ C31 attB secuencia como un fragmento BglII en los sitios BglII del vector de la cadena principal pADNc3.1/zeo creando el plásmido pADNcattB. Las secuencias de resistencia a IRES y blastocidina se pueden eliminar de un vector pWZL Blast como un fragmento SnaBI-NheI romo, que se inserta en los sitios EcoRV/XbaI de pADNcattB, creando el plásmido pADNcattB-IB. Posteriormente, uno de los genes indicados se amplifica y se clona con un gen lacZ como fragmentos EcoRI, HindIII/EcoRI y EcoRI (romo)/BamHI en los sitios EcoRI, HindIII/EcoRI, y HindIII (romo)/BamHI, respectivamente. de pADNcattB-IB. Este procedimiento crea los plásmidos de transferencia que comprenden el gen de interés attB y placZ-attB. Los vectores construidos luego se cotransfectaron con un plásmido que codifica integrasa ϕ C31 en células mesenquimales humanas. En resumen, las células mesenquimales humanas se transfectan con plnt y el gen de interés -attB y placZ-attB usando un choque de polibreno modificado. Las células mesenquimales humanas primarias se cultivan en placas de 35 mm hasta una confluencia del 70-80% y luego se transfectan mediante choque de polibreno modificado. Para la transfección de polibreno, se mezclan 760 ml de medio de crecimiento con el plásmido que se va a transfectar y esta mezcla se agita en vórtex vigorosamente. Se añaden 3,8 ml de bromuro de hexadiméterina 1 mg/ml (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) en HBSS y se somete a vórtex otra vez. Esta mezcla se superpone a las células durante 6 horas. Se aplica un 28% de DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en una mezcla de medios de crecimiento a las células después de que se ha aspirado el medio. Las células se incuban durante 90 segundos antes de aspirar el DMSO y se reemplazan con PBS que contiene 10% de suero de ternera bovino. Las placas se enjuagan dos veces y las células se incuban con medio de crecimiento fresco durante la noche a 37°C. Para la selección, 3 días después de la transfección, las células se someten a 10 días de blastocidina (4 μ g/ml) en medio de cultivo. La eficiencia de la transferencia génica se verifica mediante microscopía de inmunofluorescencia y análisis de inmunotransferencia. Después de 10 días de selección, las colonias de células mesenquimales se tripsinizan y se subclonan a una dilución limitante para obtener clones altamente proliferativos.

C. Suministro de proteína a células in vitro

Las proteínas relacionadas con la activación de la red mTOR o relacionadas con el folículo piloso pueden administrarse en células mesenquimales humanas usando los métodos descritos. (Weill, C.O. et al., *Un enfoque práctico para la administración de proteínas intracelulares*, *Cytotechnology* 56(1), 41-48 (2008). Las células se siembran para alcanzar aproximadamente el 70-80% de confluencia el día de la administración de la proteína. Para un pozo de una placa de 24 pozos, se diluyen 0.5-8 μ g de proteína purificada en 100 μ l de regulador Hepes (20 mM, pH 7.4) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, en condiciones estériles. En cada tubo, se añaden 1-8 μ l de reactivo de suministro de proteínas PULSin™ (Illkirch, Francia) a la solución de proteínas. Después de una breve homogeneización con un vórtice, la mezcla proteína/reactivo se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos. Las células se lavan con 1 ml de PBS y se añaden 900 μ l de medio de cultivo sin suero a cada pozo. Después de la adición de los complejos en cada pozo, la placa se mezcla suavemente y se incuba a 37°C. Después de 4 horas, se retira el medio de incubación y se reemplaza con 1 ml de medio completo nuevo (que contiene suero). La administración de proteínas se analiza inmediatamente o en puntos temporales posteriores mediante inmunocitoquímica.

Ejemplo 5: Enriquecimiento de células con propiedades inductivas capilares

A. Separación basada en marcadores celulares

El tejido de piel se prepara como se describe en cualquiera de los protocolos en el Ejemplo 3B. Las células se recogen después de 7 días utilizando una solución que contiene 0.25% de tripsina y EDTA 5 mM (Sigma) y se enriquecen para las células inductivas del cabello en base al marcador celular, CD-10. El anticuerpo anti-CD-10 marcado con FITC (eBioscience) se incuba con fibroblastos durante 30 minutos a 4°C. Las células se clasifican usando BD Biosciences FACSAria Cell Sorter después de lavar las células con PBS con BSA al 0.1%.

Alternativamente, las células se marcan con anticuerpo anti-CD10/RPE (10 ml para 1×10^6 células, DAKO, Glostrup, Dinamarca, clon SS2/36) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células marcadas se lavan con PBS, seroalbúmina bovina al 2%, se incuban con microperlas anti-PE (10 ml/ 10^6 células, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) durante 30 minutos a temperatura ambiente y se separan mediante columnas MACS colocadas en un MiniMACS Separator (Miltenyi Biotec) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

B. Separación basada en la mejora del crecimiento de células deseadas o restricción/muerte de células indeseables

Se pueden añadir factores de crecimiento tales como BMP2, 4, 5 o 6, Wnt-3a, Wnt-10b, FGF2, KGF u otros al medio de crecimiento para mantener y enriquecer las células inductivas del cabello, incluidas las células de la papila dérmica. Las células papilares dérmicas se cultivan en presencia de un nivel aumentado de proteína WNT o un agente que imita los efectos de la transducción de señal promovida por WNT. Este método se basa en el descubrimiento, discutido anteriormente, de que la señalización de WNT es activa durante la morfogénesis del cabello. (Kishimoto, J. et al., Wnt Signaling Maintains the Hair-Inducing Activity of the Dermal Papilla, *Genes & Development* 14 (10):1181-1185 (2000); Shimizu, H. et al., Wnt Signaling Through the Beta-Catenin Pathway is Sufficient to Maintain, but Not Restore, Anagen-Phase Characteristics of Dermal Papilla Cells, *The Journal of Investigative Dermatology* 122 (2):239-245 (2004).

Una metodología alternativa es preparar un medio acondicionado que contiene proteína Wnt-3a humana. Las células L de ratón se cultivan en una mezcla 1:1 de medio DMEM y HAM F12 suplementado con FCS al 10% y antibióticos a 37°C. Para el establecimiento de células L transfectadas con ADNc de Wnt-3a, se puede construir pGKWnt-3a insertando el ADNc de Wnt-3a humano, cuya expresión es dirigida por un promotor del gen de fosfogliceroquinasa de rata (promotor PGK) y terminada en una secuencia terminadora transcripcional del gen de la hormona de crecimiento bovina, en pGKneo, que contiene el gen de neomicina fosfotransferasa (neo) dirigido por el promotor PGK. El pGKWnt-3a se introduce mediante el método del fosfato de calcio en células L, que se cultivan en placas de cultivo de 60 mm a una densidad de 1.5×10^6 células/placa 1 día antes de la adición de ADN. A estos cultivos, se agregan 400 mg/ml de G418 2 días después de la transfección. A continuación, se seleccionan clones transfectados de manera estable y se subcultivan. Para recoger el medio acondicionado (CM) de cultivos de células L productoras de Wnt-3a, estas células se siembran a una densidad de 1×10^6 células en un plato de 100 mm que contiene una mezcla 1:1 de DMEM y HAM F12 suplementado con 10% FCS, y cultivado durante 4 días. El medio acondicionado se recolecta, se centrifuga a 1000 g durante 10 minutos y se filtra a través de una membrana de nitrocelulosa. Como control, el medio condicionado se puede preparar a partir de células L transfectadas solo con pGKneo y cultivadas en las mismas condiciones anteriores. El medio acondicionado puede usarse para obtener células inductivas capilares potenciadas con Wnt. En resumen, 100-1000 células mesenquimales de la piel se siembran en placas de 100 mm en DMEM más 10% de FBS y se cultivan durante 24 horas. Al día siguiente, el medio se reemplaza por medio acondicionado de células L que contiene proteína Wnt2a y se cultiva durante 2 semanas con cambios de medio cada 3 días. Después de 2 semanas, los clones celulares se recogen para un análisis o inyección posterior a la piel humana.

Ejemplo 6: Mantenimiento de las propiedades inductivas del cabello durante la propagación utilizando medios o factores de crecimiento especializados

El potencial inductivo del folículo piloso de las células DP humanas se puede mantener en uno de los siguientes medios:

Medio de Chang (Chang H.C. et al., " Human amniotic fluid cells grown in a hormone-supplemented medium: suitability for prenatal diagnosis ", *Proc Natl Acad Sci USA* 79(15): 4795-9 (1982)): En resumen, la base medio de cultivo [medio sin suero (SF)] es una mezcla 1:1 de medio Eagle modificado por Dulbecco-Vogt (medio DVME) y medio F12 de Ham (medio F12) suplementado con Hepes 15 mM y 1.2 g de NaHCO₃, 40 mg de penicilina, 8 mg de ampicilina y 90 mg de estreptomocina por litro. El medio SF más 10 factores promotores del crecimiento se denomina medio H (medio suplementado). Los factores promotores de crecimiento agregados son: transferrina (5 µg/ml), selenio (20 nM), insulina (10 µg/ml), triyodotironina (0.1 nM), glucagón (1 µg/ml), factor de crecimiento de fibroblastos (10 ng/ml), hidrocortisona (1 nM), testosterona (1 nM), estradiol (1 nM) y progesterona (1 nM).

Medio acondicionado con queratinocitos (KCM): Para recoger KCM del cultivo de queratinocitos, 10^6 de las células se siembran en placa de 100 mm y se cultivan durante 3-5 días en 10 ml de medio (50% de DMEM más 50% de KSFM en la ausencia de FBS o suplementos de crecimiento). El medio acondicionado se recoge y se utiliza para el cultivo de células mesenquimales de la piel durante 2-4 semanas antes de la inyección a la piel humana.

Aplicación de medio o factores de crecimiento disponibles en el mercado: se usa medio de células madre mesenquimales (Invitrogen), o medio de crecimiento de células DP de folículo humano (PromoCell) para el cultivo de células DP humanas. Se pueden usar otros factores de crecimiento, tales como BMP6 (10 ng/ml), FGF-2 (10 ng/ml, BioVision) o leptina (0, 10, o 100 ng/ml, Sigma-Aldrich) para el cultivo de células DP.

Uso de inhibidores de molécula pequeña: para mantener las células mesenquimales inductivas del cabello, se añade el inhibidor de GSK-3, BIO (Calbiochem, La Jolla, CA) al medio de cultivo a 1.5 µM en 100 mm de placa. Las células se subcultivan y se someten a pases durante más de 2 semanas antes de un posterior análisis o inyección a la piel humana.

Ejemplo 7: Aislamiento de células epidérmicas

Las células epidérmicas se pueden aislar de las siguientes fuentes: piel o mucosa del paciente (autóloga), piel o mucosa del donante (allogénico), líneas celulares epidérmicas, células epidérmicas derivadas de células madre, y células epidérmicas primarias o sometidas a pasas.

5 Para aislar los queratinocitos, el prepucio neonatal humano o los tejidos cutáneos adultos se tratan con dispasa a 4°C durante la noche. La lámina epidérmica se separa de la lámina dérmica y posteriormente se digiere con tripsina al 0.05%, EDTA 0.53 mM a 37°C durante 20 minutos. Las células se recogen y se siembran en placas de cultivo de tejidos en medios libres de suero de queratinocitos complementados con extracto de hipófisis bovina y factor de crecimiento epidérmico recombinante. Este método es paralelo al método de disociación celular discutido anteriormente para las células mesenquimales (es decir, la sección dérmica se usa para las células mesenquimales, y la sección epitelial se usa para las células epidérmicas).

15 Alternativamente, las células madre pueden usarse para generar células epidérmicas al inducir a las células madre a diferenciarse en células epidérmicas usando el siguiente protocolo. Estudios previos indicaron que cuando las células madre se colocan en placas revestidas con BM, dan lugar a láminas epiteliales que son capaces de diferenciarse en células positivas a la queratina 14 (K14). Estos estudios también sugirieron que dichos cultivos contienen células progenitoras epidérmicas que se mantienen en cultivos secundarios llamados células progenitoras epiteliales (CPE). Cuando se cultivan a alta densidad, las EPC avanzan a lo largo de la ruta de diferenciación del folículo piloso para expresar las queratinas del cabello, tal como se determina mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos. Para inducir a las células madre a diferenciarse en células epidérmicas, las células madre que crecen en placas de cultivo de tejidos de 35 mm se recubren con Matrigel (1 ml/placa de 35 mm, aproximadamente 0.1 mg) durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se reemplaza suavemente Matrigel con 15% de DMEM. El día 4, las células se tratan con 0.25% de tripsina-EDTA durante 2 a 3 minutos en la incubadora. Las células se transfieren a un tubo Falcon de 15 ml y se extrae una alícuota para contar el total de células disponibles. Las células se centrifugan a 700 x g durante 2 a 3 min para la formación de gránulos. Mientras gira, las células se cuentan usando un contador Coulter. El sedimento se resuspende con 15% de DMEM y se diluye de manera apropiada para depositar 10⁶ células/placa de 35 mm. Para la inmunofluorescencia, las células se pueden colocar sobre cubreobjetos de vidrio de 22 x 22 mm.

Ejemplo 8: Enriquecimiento de células epidérmicas con capacidad de diferenciarse en folículos capilares

A. Adhesión celular

Las poblaciones de células madre de la piel humana neonatal o adulta pueden enriquecerse mediante una rápida adherencia de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. En resumen, placas de plástico bacteriológicas de 100 mm se recubren durante la noche con 100 µg/ml de colágeno tipo IV, se incuban con BSA desnaturalizada por calor a 0.5 mg/ml a 37°C durante 1 hora y se lavan en medio libre de suero. Los queratinocitos se resuspenden en un medio sin suero a una densidad de 1-5 X 10³ células/ml. Se añaden diez ml de suspensión celular a placas recubiertas de colágeno tipo IV, y las placas se devuelven a la incubadora para 5 minutos. Las células rápidamente adherentes se recolectan y se vuelven a cultivar en placa en 1 x 10⁵ células para cultivo adicional en FAD (DMEM/F12 3:1, v/v, Gibco) suplementado con 0.4 mg/ml de hidrocortisona (Sigma), 5 mg/ml de transferrina (Sigma), 5 mg/ml de insulina (Sigma), 100 UI/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina, 10% de FCS, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Sigma) y 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (Gibco). Las placas se colocan en una incubadora a 37°C, 100% de humedad y 5% de CO₂, y el medio se cambia cada 2-3 días. Las células madre epidérmicas que son más adherentes a la placa de cultivo recubierta con matriz extracelular tienen más capacidad potencial para formarse en los folículos pilosos.

B. Clasificación de células

45 Las células protuberantes pueden aislarse con sistemas de perlas magnéticas. Dos sistemas de perlas magnéticas se combinan para aislar las células ORS protuberantes de la suspensión del folículo medio. Primero, las células del folículo piloso se tiñen con el cóctel de anticuerpos CD24, CD34, CD71 y CD146 antihumanos conjugados con PE (BNC) durante 20 minutos a 4°C. Después del lavado, las células foliculares se incuban con microperlas anti-PE (Miltenyi Biotec) durante 25 minutos a 4°C. Luego, las células PE no positivas se eliminan con las separaciones magnéticas usando columnas mini-MACS MS (Miltenyi Biotec). Los procedimientos de extracción se repiten entre 3 y 5 veces para garantizar el agotamiento máximo. A continuación, las células del folículo medio se incuban con mAb de ratón CD200 antihumano purificado a 4°C durante 20 minutos, se lavan y se incuban con perlas magnéticas de IgG anti-ratón de oveja Dynabeads M-450 (DynaL Biotech) a 4°C durante 30 minutos con inclinación. Luego, la selección positiva se realiza con un concentrador de partículas magnéticas MPC-L (DynaL Biotech) para obtener células CD200-positivas. Las células CD59-positivas se pueden recoger de forma similar como un control de selección positivo. Se espera que las preparaciones de células epidérmicas que se enriquecen para las células protuberantes tengan una mayor capacidad para formar folículos capilares.

55 Ejemplo 9: Preparación de células para injertar

A. Sustitutos de la piel

Se preparan constructos in vitro tridimensionales para injertar usando métodos establecidos modificados como se describe en este documento. En resumen, las células mesenquimales se mezclan con 1 mg/ml de colágeno tipo I (de

rata o bovino, como se describe a continuación) en 10% de FBS/DMEM, y se añaden a placas transpoco de 6 pozos (Corning Incorporated, Corning, NY) a una densidad de 15×10^6 células por mm^2 (1.5×10^5 células por cm^2). Los equivalentes dérmicos se cultivan en 10% de FBS/DMEM durante 4 días antes de tomar alícuotas de 1×10^6 queratinocitos en la parte superior. Los constructos se cultivan sumergidos durante 2 días en una mezcla de DMEM y Ham F12 (3:1) (GIBCO/Invitrogen, Grand Island, NY) que contiene 0.1% de FBS, después de lo cual los queratinocitos se llevan a la interfaz aire-líquido y se cultivan en una mezcla de DMEM y Ham F12 (3:1) que contiene 1% de FBS durante otros 2 días antes del injerto.

B. Aglomerados de células

Se pueden formar agregados celulares para inyección usando el método de gota colgante. (Qiao J. et al., " Hair follicle neogenesis induced by cultured human scalp dermal papilla cells ", *Regen Med* 4(5): 667-76 (2009)). En resumen, una mezcla de células mesenquimales humanas y queratinocitos (10:1, 5:1, 1:1, 1:5 o 1:10) se suspende en medio Chang que contiene 0.24% de metilcelulosa. Las células se aplican en gotas de 20 μl (cada gota contiene 4×10^4 células) en el fondo de una placa de Petri de 100 mm. La placa de Petri está invertida de modo que las gotitas cuelgan boca abajo. Las gotitas suspendidas se incuban en una incubadora de CO_2 a 37°C y 5% de CO_2 . La formación del agregado se completa dentro de las 18-20 h. Tras la formación, los agregados se transfieren individualmente a los pozos de una placa de ensayo de 96 pozos de fondo redondo que contiene 150 μl de medio Chang. Los pozos se prerrecubrieron con medio de metilcelulosa al 0.24% para evitar la adherencia de los protocabellos. El medio de cultivo se cambia cada 2-3 días.

C. Microesferas

Las microesferas biodegradables para inyección se fabrican a partir de 75:25 PLGA (peso molecular = 100.000 Da, Birmingham Polymers, Birmingham, AL) usando una emulsión de aceite/agua convencional y un método de evaporación/extracción de disolvente. En resumen, 600 mg de PLGA se disuelven en 12 ml de cloruro de metileno, se agregan a 400 ml de solución acuosa de alcohol polivinílico al 0.5% (p/v) (peso molecular = 30.000-70.000 Da, Sigma) y se agita vigorosamente a temperatura ambiente durante la noche. Las microesferas se recogen por centrifugación, se lavan tres veces con agua destilada y se filtran a un tamaño de 50-200 μm de diámetro. Las microesferas se liofilizan y se esterilizan con luz ultravioleta durante 6 horas. Se colocan células mesenquimales humanas (2.5×10^7 células) y queratinocitos (6×10^6 células) con microesferas de PLGA (1 μg de microesferas/ 10^5 células) en un matraz giratorio (Bellco Glass Inc., Vineland, NJ) que contiene 30 ml de suero KGM libre que contiene 10 ng/ml de EGF para queratinocitos, o DMEM/F12 que contiene 10% (v/v) de FBS para células mesenquimales, y se cultivan a 50 rpm durante 2 semanas. El medio se intercambia cada dos días. Se dejan sedimentar los agregados celulares, se recogen 16 ml del sobrenadante del cultivo y se centrifugan, se eliminan 15 ml del sobrenadante y se añaden 15 ml de medio nuevo a las células centrifugadas en 1 ml del sobrenadante restante. Las células en medio fresco se transfieren a los matraces giratorios. Alternativamente, se pueden formar agrupaciones de células suspendiendo las células en alginato de sodio y formando luego gotas esféricas usando un generador de gotitas eléctricas de alto voltaje como se describe en Lin C.M. et al., " Microencapsulated human hair dermal papilla cells: a substitute for dermal papilla?", *Arch Dermatol Res.* 300 (9): 531-5 (2008).

Ejemplo 10: Evaluación de sustitutos de la piel de la invención en cuanto a propiedades biomecánicas, cicatrización de heridas y regeneración de folículos capilares a largo plazo

Los sustitutos de la piel de la invención pueden ensayarse para determinar propiedades biomecánicas, cicatrización de heridas y regeneración de folículos capilares a largo plazo.

Las propiedades biomecánicas incluyen la función de barrera de la piel, la secreción de sebo, la resistencia a la tracción de la piel, la pérdida de agua transepidérmica y la capacitancia eléctrica de la piel. La capacitancia de la piel se puede medir usando un Corneometer CM 825 PC (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Colonia, Alemania). La pérdida de agua transepidérmica puede medirse con un Tewaeter TM 300 (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Colonia, Alemania). Para evaluar la actividad de las glándulas sebáceas, se puede medir la expresión de proteínas y lípidos sebáceos humanos utilizando tinción con aceite rojo O y PCR en tiempo real de material microdisecionado con láser. El ARN total puede aislarse a partir de glándulas sebáceas microdisecionadas por láser y el ARNm se transcribe de forma inversa. Para medir la resistencia a la tracción de la piel, una pequeña tira de injerto obtenida después de sacrificar el animal puede colocarse en un tensiómetro (tensiómetro Instron 5542, Instron, Canton, MA) y medir la fuerza de rotura máxima. En resumen, una pequeña porción de la tira de tejido (aproximadamente 0.5 cm de incisión) es orientada en las mandíbulas del tensiómetro perpendicular a la línea de la incisión. Las fuerzas de ruptura máxima se miden y se convierten en valores de resistencia a la tracción (kilogramo de fuerza por centímetro cuadrado) dividiendo la fuerza de ruptura por el área de la sección transversal del tejido que se rompió. El mismo procedimiento se puede usar para medir la resistencia a la tracción de los cabellos arrancados.

Para evaluar la cicatrización de heridas, se pueden crear heridas en los injertos de cuatro a seis semanas después del injerto. La herida puede estar vendada, y la tasa de curación de la herida se determina por fotografía en serie cada 1-2 días con una escala para medir la contracción de la herida y la reepitelización. Las secciones de los injertos se pueden recolección y teñir con el tricoma de Masson y evaluar histológicamente el área de la herida y la cicatriz, el grosor dérmico y el grosor epidérmico seccionando a través del centro de la herida. Se pueden realizar medidas

histomorfométricas de las heridas y se pueden realizar evaluaciones cualitativas del infiltrado de células inflamatorias, la proliferación de fibroblastos, la formación de colágeno y la angiogénesis. La inmunohistoquímica puede usarse para identificar células humanas, proliferación celular (Ki-67) y números de miofibroblastos.

5 El ciclado del cabello puede documentarse mediante observaciones repetidas a lo largo del ciclo del cabello. Sin embargo, dado que el ciclo del cabello tarda aproximadamente 100 días para la piel que no es del cuero cabelludo y hasta unos pocos años para el cuero cabelludo, el progreso experimental puede acelerarse mediante el desprendimiento del cabello (por ejemplo, usando cera). El desprendimiento del cabello es un método bien probado para inducir a los cabellos a volver a entrar en el anágeno. El ensayo de desprendimiento se puede combinar con una evaluación del compartimento de células madre epidérmicas para detectar la presencia de células que retienen el marcador en la epidermis y la región abultada del folículo piloso. Puede inyectarse BrdU intraperitonealmente dos veces al día durante 6 días comenzando al finalizar la neogénesis folicular. A las 10-14 semanas, los cabellos de la mitad del injerto pueden desprenderse. Estos estudios permitirán la determinación de la presencia y ubicación de células madre epidérmicas que retienen la etiqueta y su respuesta al desprendimiento de la piel con o sin folículos pilosos.

15 Ejemplo 11: Proceso de injerto

A. Colocación de material compuesto

Se injertan ratones en una campana de flujo laminar horizontal usando ratones Cr:NIH(S)-nu/nu de 6 a 8 semanas de edad (FCRDC, Frederick, MD) anestesiados usando anestesia inhalatoria con una mezcla de O₂ e isoflurano (2-4%). El área de injerto en la parte posterior del ratón se estima cuidadosamente, y se retira piel con tijeras curvas después de lavado con povidina y etanol al 70%. Los constructos se colocan en el lecho del injerto en la orientación anatómica correcta, se cubren con gasa de vaselina estéril y se aseguran con vendajes. Los ratones se transfieren de vuelta a las jaulas estériles después de volver a despertar. Los vendajes se cambian a las 2 semanas y se quitan después de 4 semanas. Los ratones se sacrifican de 4 a 18 semanas después del injerto.

B. Inyección de células

25 Las células se inyectan directamente en la piel humana usando una técnica similar a la descrita en Ortiz-Urda et al. (antes citada). Para la inyección de células mesenquimales humanas en la piel de ratón, se inyectan ratones Cr:NIH(S)-nu/nu hembras 6-8 semanas de edad por vía intradérmica con 10⁶ células resuspendidas en 100 µl de PBS usando una aguja de calibre 30. La inyección se realiza perforando primero la piel, luego dirigiendo la aguja hacia arriba hacia la superficie e inyectando las células lo más superficialmente posible. Esto lleva a la formación de una pápula bien delimitada en el centro del área inyectada. De ocho a 16 semanas después de la inyección, se realizan biopsias y análisis en la piel del ratón.

C. Implantación de células

Después de anestesiar, se hacen pequeñas incisiones de aproximadamente 0.5-1.0 mm de ancho y longitud usando una aguja de calibre 27. Se inserta un solo agregado cultivado (protocabello) en una posición poco profunda dentro de cada incisión. Después de la inserción, las incisiones se dejan sanar.

Después de anestesiar al animal o al paciente, se crean heridas de la piel de grosor completo (1.5 × 1.5 cm² de forma rectangular) en el área del trasplante. Para minimizar la migración de las células de la piel del huésped de los márgenes de la herida y la contracción espontánea de la herida, la piel en los márgenes de la herida se quema con cauterio y se fija a las capas musculares adyacentes con suturas de nylon 5-0 no reabsorbibles (AILEE Co., Pusan, Corea). Las células mesenquimales (aproximadamente 10⁸ células/herida) y queratinocitos (aproximadamente 7.5 × 10⁶ células/herida) cultivadas en microesferas de PLGA se trasplantan a las heridas usando una jeringa de 1 mL sin aguja. Después del trasplante, las heridas se revisten con vendajes, Tegaderm (3M Health Care, St. Paul, MN) y gasa de algodón estéril, y se fijan firmemente con Coban, una venda autoadhesiva (3M Health Care). Para los ratones, un antibiótico (Cefazolin, 0.1 mg/ratón, Yuhan Co., Seúl, Corea) y un analgésico (Buprenorfina, 0.1 mg/kg, Hanlim Pharm Co., Seúl, Corea) se administran por vía intramuscular y subcutánea, respectivamente, durante 5 días después del trasplante. Los ratones se alojan individualmente después de la cirugía y reciben atención humana de acuerdo con las pautas para el cuidado y uso de animales de laboratorio de NIH.

Ejemplo 12: Aplicación de sustituto de piel a una herida de paciente

50 Los pacientes que presentan pérdida de piel de espesor total o parcial, heridas, quemaduras, cicatrices y pérdida total o parcial del cabello reciben una evaluación preoperatoria estándar para determinar el riesgo quirúrgico. El sitio para la aplicación del sustituto de piel debe tener un buen suministro de sangre, como dermis, fascia, músculo, tejido de granulación, periostio, pericondrio, peritenón y perineuro, pero no cartílago, tendón o nervio. La herida debe estar libre de tejido necrótico. La herida debe estar relativamente no contaminada por bacterias, con recuentos bacterianos de menos de 100.000 por centímetro cuadrado. Un lecho de herida adecuado puede requerir desbridamiento, cambios de apósitos y antibióticos sistémicos o tópicos. Se pueden usar agentes antimicrobianos, antifúngicos y antivirales, administrados por vía tópica o sistémica, durante un período de tiempo (por ejemplo, una semana) antes y después de la administración del sustituto de piel para reducir el riesgo de infección. El cierre de la herida asistido por vacío se

puede usar para mejorar las características del lecho de la herida antes del injerto, y también se puede usar después del injerto.

5 El paciente se anestesia usando anestesia local, regional o general, y el sitio del injerto se lava con agua, un lavado con antibiótico o una solución de alcohol (tal como un hisopo de alcohol). El tejido de piel existente, el tejido desvitalizado, la escara, los bordes de la herida o la úlcera, o el tejido cicatricial se eliminan usando técnicas estándar en el arte. El desbridamiento puede extenderse a un tejido sano, viable y sangrante. Antes del desbridamiento, limpie bien la herida con solución salina estéril para eliminar la suciedad suelta y el tejido necrótico. Usando pinzas para el tejido, una cuchilla quirúrgica o una cureta se eliminan el tejido y la suciedad hiperqueratósica y/o necrótica de la superficie de la herida. Los márgenes de la úlcera se pueden desbridar para tener un efecto de platillo. Después del desbridamiento, limpie la herida a fondo con solución salina estéril y seque suavemente con una gasa. El exudado o sangrado resultante del desbridamiento o la revisión de los bordes de la herida pueden detenerse mediante el uso de una presión suave. Otras opciones incluyen ligadura de vasos, electrocauterio, cauterio químico o cauterio láser, pero estos métodos pueden producir tejido desvitalizado y su uso debe minimizarse. La exudación intensa puede desplazar a un sustituto de piel y reducir la adherencia. La exudación se puede minimizar con un tratamiento clínico apropiado. Por ejemplo, se puede soplar aire estéril a temperatura ambiente o hasta 42 °C sobre la herida hasta que la herida esté pegajosa. Si la exudación persiste, el sustituto de piel puede hacerse permeable al exudado perforando el sustituto de piel para permitir el drenaje.

20 Los sustitutos de la piel se pueden aplicar a una superficie limpia y desbridada de la piel después de irrigar completamente la herida con una solución no citotóxica. Antes de aplicar el sustituto de piel, el médico puede revisar la fecha de vencimiento del sustituto de piel, controlar el pH y observar visualmente y oler el sustituto de piel para garantizar que no haya contaminantes, como contaminantes bacterianos o partículas. El sustituto de piel puede almacenarse en una bolsa de polietileno a una temperatura controlada de 68 °F-73 °F (20 °C-23 °C) hasta inmediatamente antes de su uso. El médico puede abrir la bolsa de polietileno sellada, y si el sustituto de piel se proporciona en una placa de cultivo celular o en una bandeja de plástico, se puede transferir al campo estéril con una técnica aséptica. Si está presente, se puede levantar una bandeja o una tapa de una placa de cultivo celular, y el médico puede observar la orientación de la capa epidérmica y dérmica del sustituto de piel. Utilizando un instrumento atraumático estéril, un médico puede desalojar suavemente aproximadamente 0.5 pulgadas del sustituto de piel de la pared de la bandeja o placa de cultivo celular. Al levantar el sustituto de piel, un médico puede tener cuidado de no perforar o levantar ninguna membrana debajo del sustituto de piel, que, si está presente, debe permanecer en la bandeja. Con las manos enguantadas estériles, un practicante puede insertar un dedo índice debajo de la sección liberada del sustituto de piel y usar el otro dedo índice para agarrar el sustituto de piel en un segundo punto a lo largo del borde del dispositivo. Sosteniendo el sustituto de piel en dos lugares, el médico puede levantar todo el sustituto de piel de la bandeja o de la placa de cultivo celular con un movimiento suave y uniforme. Si se produce un plegamiento excesivo, el sustituto de piel puede flotar (superficie epidérmica hacia arriba) sobre una solución salina estéril caliente en una bandeja estéril. El sustituto de piel puede colocarse de modo que la capa dérmica (la capa brillante más cercana al medio) esté en contacto directo con el sitio para el sustituto de piel. Usando un aplicador de algodón humedecido con solución salina, el médico puede suavizar el sustituto de piel en el sitio para que no haya burbujas de aire o bordes arrugados. Si el sustituto de piel es más grande que el sitio para la aplicación, el exceso de sustituto de piel se puede recortar para evitar que se adhiera al vendaje. Si el sustituto de piel es más pequeño que el sitio para la aplicación, se pueden aplicar múltiples sustitutos de piel adyacentes hasta que se llene el defecto.

45 El sustituto de piel puede asegurarse con cualquier apósito clínico apropiado. Es preferible usar un apósito absorbente no adherente, semioclusivo. Debe proporcionar una presión uniforme sobre toda el área injertada. No se requieren suturas o grapas, pero se pueden usar en algunos casos para anclar el injerto al lecho del injerto (suturas de grapas). Las suturas absorbibles, tal como la de tripa de absorción rápida de 5-0, son preferibles porque no requieren eliminación. Se pueden usar apósitos para asegurar el contacto del sustituto de piel con el sitio para su aplicación y para evitar el movimiento. Se puede aplicar compresión terapéutica al sitio del injerto. En algunos casos, puede ser necesario inmovilizar la extremidad injertada para minimizar las fuerzas de cizallamiento entre el sustituto de piel y el sitio de aplicación. Los vendajes reforzados son útiles en áreas donde el movimiento es difícil de evitar y en heridas con contornos irregulares. Los apósitos se pueden cambiar una vez a la semana o más frecuentemente si es necesario. El dolor, el olor, el flujo u otros signos de complicaciones son indicaciones para retirar el vendaje e inspeccionar el sitio de aplicación.

55 Pueden ser necesarias aplicaciones adicionales de sustitutos de la piel en ciertos casos. Antes de las aplicaciones adicionales, los restos no adherentes de un injerto de piel o un sustituto de piel anterior deben eliminarse con cuidado. Los tejidos curativos o los sustitutos de la piel adherente pueden dejarse en su lugar. El sitio puede limpiarse con una solución no citotóxica antes de aplicaciones adicionales de un sustituto de piel. En una realización, se puede aplicar un sustituto de piel adicional a las áreas donde el sustituto de piel anterior no es adherente.

REIVINDICACIONES

1. Un sustituto de piel que comprende células epiteliales y células mesenquimales modificadas, en el que, en comparación con células mesenquimales de tipo salvaje, las células mesenquimales modificadas tienen:
- (a) un nivel, función y/o actividad disminuidos de un complejo TSC1/TSC2; y/o
- 5 (b) una función de mTORC1 aumentada, una función de mTORC2 disminuida, o ambas.
2. El sustituto de piel de la reivindicación 1, en el que las células mesenquimales modificadas comprenden:
- (a) un TSC1 subregulado;
- (b) sobrerregulación de al menos uno de Ras, Raf, Mek, Erk, Rsk1, PI3K, Akt1, Akt2, Akt3, Rheb, mTOR, Raptor, Rictor, mLST8, S6K1, proteína ribosómica S6, SKAR, SREBP1, eIF4e, IKKbeta, Myc, Runx1 o p27;
- 10 (c) subregulación de al menos uno de TSC1, TSC2, un complejo TSC1/TSC2, CYLD, LKB1, FLCN, MEN1, NF1, PTEN, PRAS40, 4E-BP1, GSK3 o Deptor;
- (d) un gen de factor de crecimiento transfectado, en el que el factor de crecimiento se selecciona de insulina, EGF, HGF, IGF y KGF;
- (e) un TSC2 subregulado;
- 15 (f) una FLCN subregulada; o
- (g) TSC2 y FLCN subregulados.
3. El sustituto de piel de la reivindicación 2, en el que la subregulación de al menos uno de TSC1, TSC2, el complejo TSC1/TSC2, CYLD, LKB1, FLCN, MEN1, NF1, PTEN, PRAS40, 4E-BP1, GSK3 o Deptor es logrado mediante el tratamiento de células mesenquimales de tipo salvaje con un siRNA, ARNsh o RNAi.
- 20 4. El sustituto de piel de la reivindicación 1, en el que
- (a) las células mesenquimales modificadas provienen de tumores asociados con el síndrome de Birt-Hogg-Dube, síndrome de Brooke-Spiegler, síndrome de Cowden, neoplasia endocrina múltiple tipo 1, neurofibromatosis o complejo de esclerosis tuberosa;
- (b) las células mesenquimales modificadas son de angiofibromas, fibrofolliculomas, pápulas fibrosas, placas de la frente, nevos del folículo piloso, infundibulomas, isquicomias, fibromas perifoliculares, nevos sebáceos, nevos organoides, siringomas, parches verdosos, tricodiscomas, tricoepiteliomas, tricoblastomas, triquilemomas, tricoadenomas, poromas o fibromas unguales; o
- 25 (c) las células mesenquimales de tipo salvaje son fibroblastos dérmicos, células de papila dérmica, células de vaina dérmica, células madre pluripotentes inducidas o células madre mesenquimales.
- 30 5. El sustituto de piel de la reivindicación 1, en el que las células mesenquimales modificadas son células de tipo salvaje mesenquimales que comprenden un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que inhibe TSC1, TSC2, o el complejo TSC1/TSC2 bajo el control de un promotor constitutivo;
- opcionalmente en el que las células mesenquimales de tipo salvaje son fibroblastos dérmicos, células de papila dérmica, células de vaina dérmica, células madre pluripotentes inducidas o células madre mesenquimales.
- 35 6. El sustituto de piel de la reivindicación 1, en el que las células mesenquimales modificadas están provistas de una matriz, opcionalmente en el que la matriz es una matriz de colágeno, una matriz de sustancia de base o una matriz de colágeno de tipo I.
7. El sustituto de piel de la reivindicación 1, en el que
- las células epiteliales son de dos fuentes diferentes; o
- 40 las células epiteliales son queratinocitos o células similares a queratinocitos, opcionalmente en el que los queratinocitos son queratinocitos de prepucio neonatal.
8. El sustituto de piel de la reivindicación 1, para uso en trasplante a células de un paciente capaces de inducir folículos pilosos humanos, opcionalmente en el que el paciente tiene pérdida de piel de espesor parcial, pérdida de piel de espesor total, una herida, una quemadura, una cicatriz o pérdida de cabello.

9. El sustituto de piel para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que al menos una de las células epiteliales y las células mesenquimales modificadas se deriva del paciente; o tanto las células epiteliales como las células mesenquimales modificadas se derivan del paciente.
- 5 10. El sustituto de piel para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el sustituto de piel induce glándulas ecrinas, o el sustituto de piel induce glándulas sebáceas.
11. Células mesenquimales modificadas, para uso en el tratamiento de una afección que requiere crecimiento de folículos pilosos, glándulas ecrinas y/o glándulas sebáceas, en donde el uso comprende administrar por vía subdérmica o intradérmica a un paciente las células mesenquimales modificadas, en las que, en comparación con las células mesenquimales de tipo salvaje, las células mesenquimales modificadas tienen:
- 10 (a) un nivel, función y/o actividad disminuidos de un complejo TSC1/TSC2; y/o
- (b) una función de mTORC1 aumentada, una función de mTORC2 disminuida, o ambas.
12. Las células mesenquimales modificadas para uso según la reivindicación 11, en las que las células mesenquimales modificadas comprenden
- (a) un TSC1 subregulado;
- 15 (b) subregulación de al menos uno de TSC1, TSC2, un complejo TSC1/TSC2, CYLD, LKB1, FLCN, MEN1, NF1, PTEN, PRAS40, 4E-BP1, GSK3 o Deptor;
- (c) sobrerregulación de al menos uno de Ras, Raf, Mek, Erk, Rsk1, PI3K, Akt1, Akt2, Akt3, Rheb, mTOR, Raptor, Rictor, mLST8, S6K1, proteína ribosómica S6, SKAR, SREBP1, eIF4e, IKKbeta, Myc, Runx1 o p27;
- 20 (d) un gen de factor de crecimiento transfectado, en el que el factor de crecimiento se selecciona de insulina, EGF, HGF, IGF y KGF;
- (e) un TSC2 subregulado;
- (f) una FLCN subregulada; o
- (g) TSC2 y FLCN subregulados.
13. Las células mesenquimales modificadas para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en las que
- 25 las células mesenquimales modificadas se administran en una microesfera, opcionalmente en las que la microesfera se forma mezclando aproximadamente 30000 células de cada uno de fibroblastos de prepucio neonatal y queratinocitos de prepucio neonatal en una mezcla 1:1 de medio de papila dérmica y medio libre de suero de queratinocitos, e incubando los aglomerados durante aproximadamente cuatro semanas; o
- 30 las células mesenquimales modificadas se administran con una matriz, opcionalmente en las que la matriz es una matriz de colágeno o una matriz de sustancia base, opcionalmente en las que la matriz es una matriz de colágeno tipo I.
14. Las células mesenquimales modificadas para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en las que la subregulación de al menos uno de TSC1, TSC2, un complejo TSC1/TSC2, CYLD, LKB1, FLCN, MEN1, NF1, PTEN, PRAS40, 4E-BP1, GSK3, o Deptor se logra tratando células mesenquimales de tipo salvaje con un ARNip, ARNhc o ARNi.
- 35 15. Las células mesenquimales modificadas para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en las que
- las células mesenquimales modificadas se administran con células epiteliales;
- las células epiteliales son queratinocitos o células similares a los queratinocitos, opcionalmente en las que los queratinocitos son queratinocitos de prepucio neonatal; o
- 40 las células epiteliales son de dos fuentes diferentes; opcionalmente
- en las que las células epiteliales y las células mesenquimales modificadas se derivan del mismo donante, opcionalmente en las que el donante es el paciente; o
- en las que las células epiteliales y las células mesenquimales modificadas se derivan de diferentes donantes, opcionalmente en las que al menos un donante es el paciente.
- 45 16. Las células mesenquimales modificadas para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en las que

- (a) las células mesenquimales modificadas son de tumores asociados con el síndrome Birt-Hogg-Dube, síndrome de Brooke-Spiegler, síndrome de Cowden, neoplasia endocrina múltiple tipo 1, neurofibromatosis o complejo de esclerosis tuberosa;
- 5 (b) las células mesenquimales modificadas son de angiofibromas, fibrofoliculomas, pápulas fibrosas, placas de la frente, nevos del folículo piloso, infundibulomas, isquicomias, fibromas perifoliculares, nevos sebáceos, nevos organoides, siringomas, parches verdosos, tricodiscomas, tricoepiteliomas, tricoblastomas, triquilemomas, tricoadenomas, poromas o fibromas unguales; o
- (c) las células mesenquimales de tipo salvaje son fibroblastos dérmicos, células de papila dérmica, células de vaina dérmica, células madre pluripotentes inducidas o células madre mesenquimales.
- 10 17. Las células mesenquimales modificadas para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en las que las células mesenquimales modificadas son células mesenquimales de tipo salvaje que comprenden un vector de expresión que comprende un gen que codifica una proteína que inhibe TSC1, TSC2 o el complejo TSC1/TSC2 bajo el control de un promotor constitutivo;
- 15 opcionalmente en el que las células mesenquimales de tipo salvaje son fibroblastos dérmicos, células de papila dérmica, células de vaina dérmica, células madre pluripotentes inducidas, o células madre mesenquimales, opcionalmente en las que las células mesenquimales de tipo salvaje son fibroblastos dérmicos.
18. Las células mesenquimales modificadas para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en las que el paciente tiene pérdida de piel de espesor parcial, pérdida de piel de espesor total, una herida, una quemadura, una cicatriz o pérdida de cabello;
- 20 la composición induce glándulas ecrinas o la composición induce glándulas sebáceas; o las células mesenquimales se derivan del paciente.

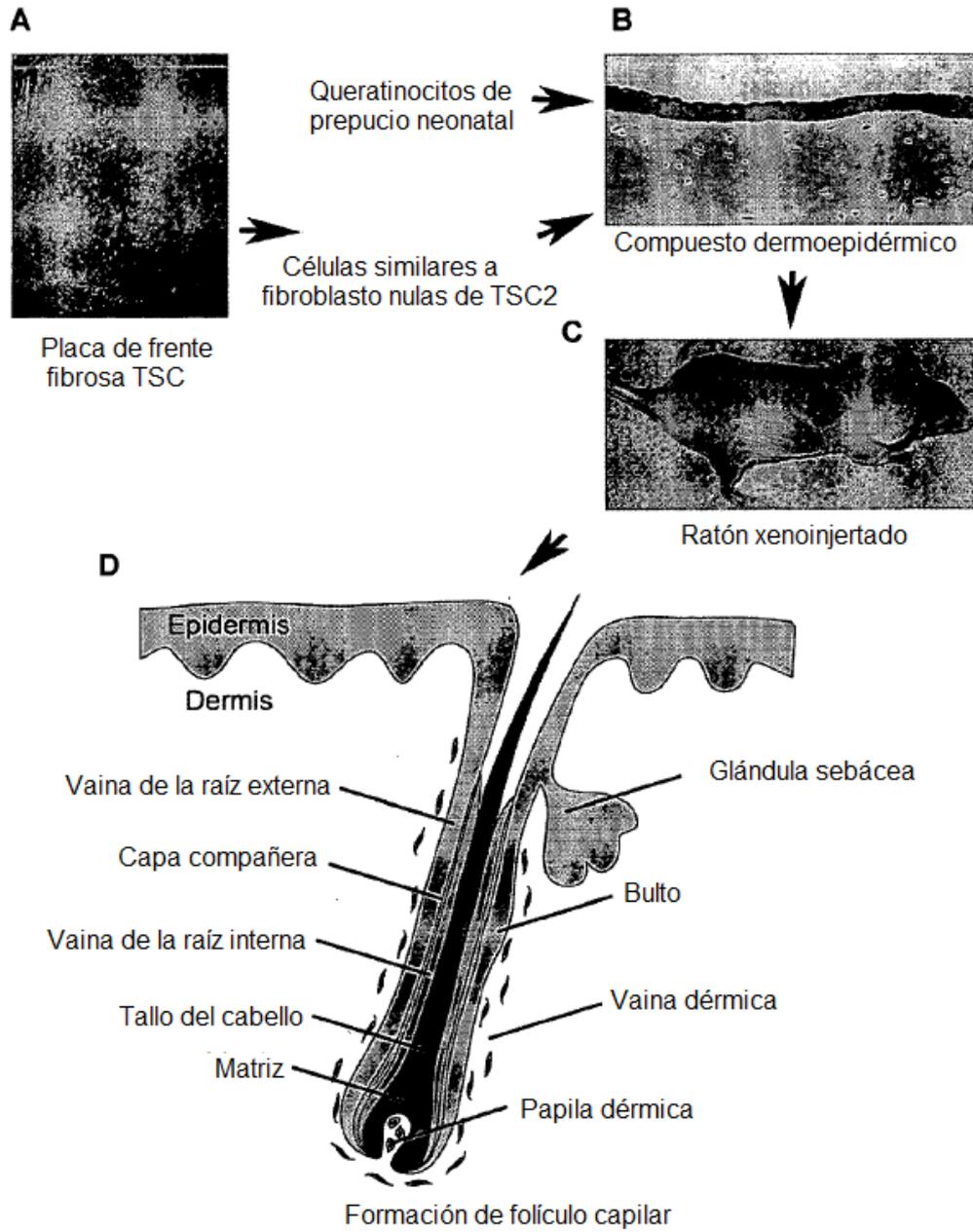
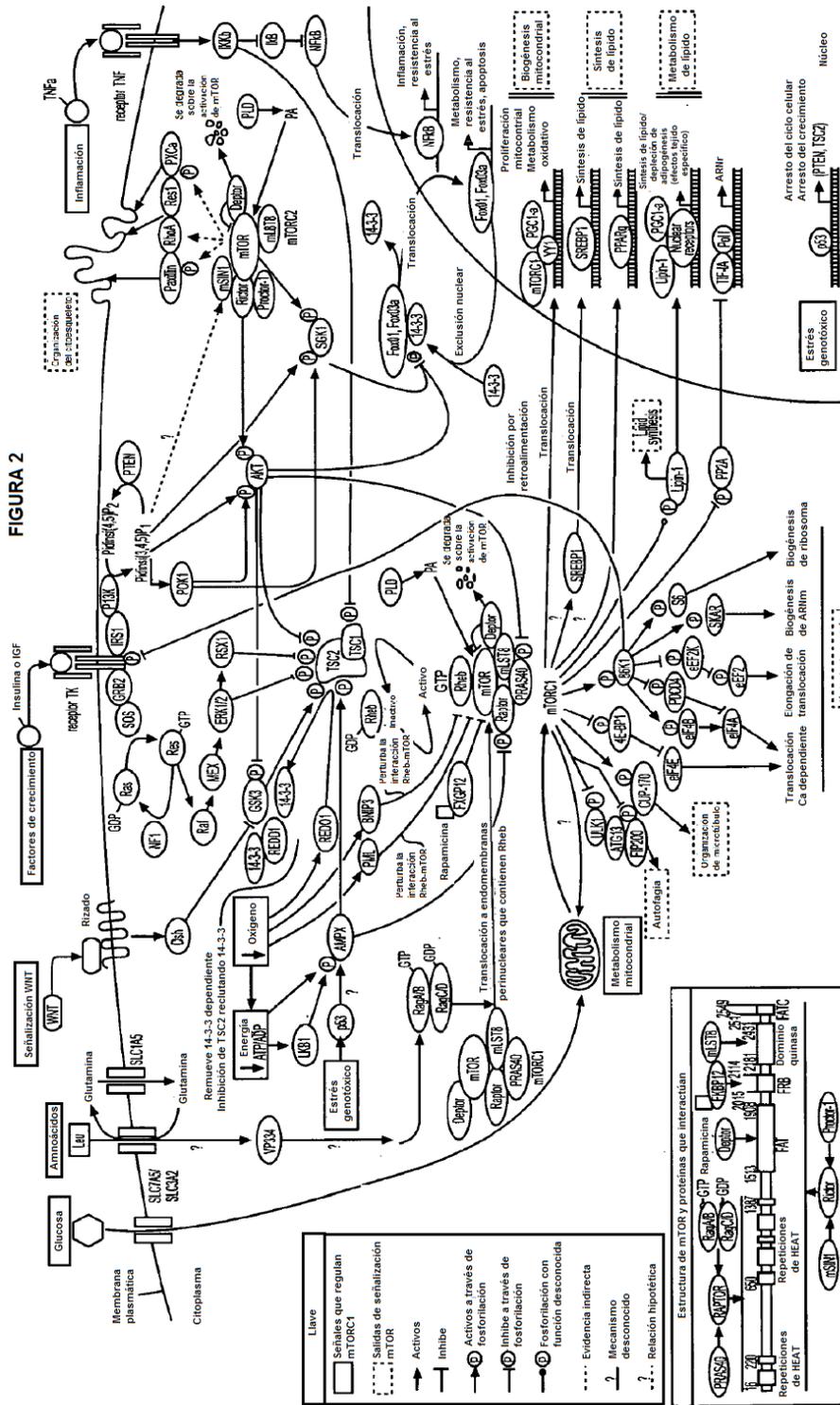


FIGURA 1

FIGURA 2



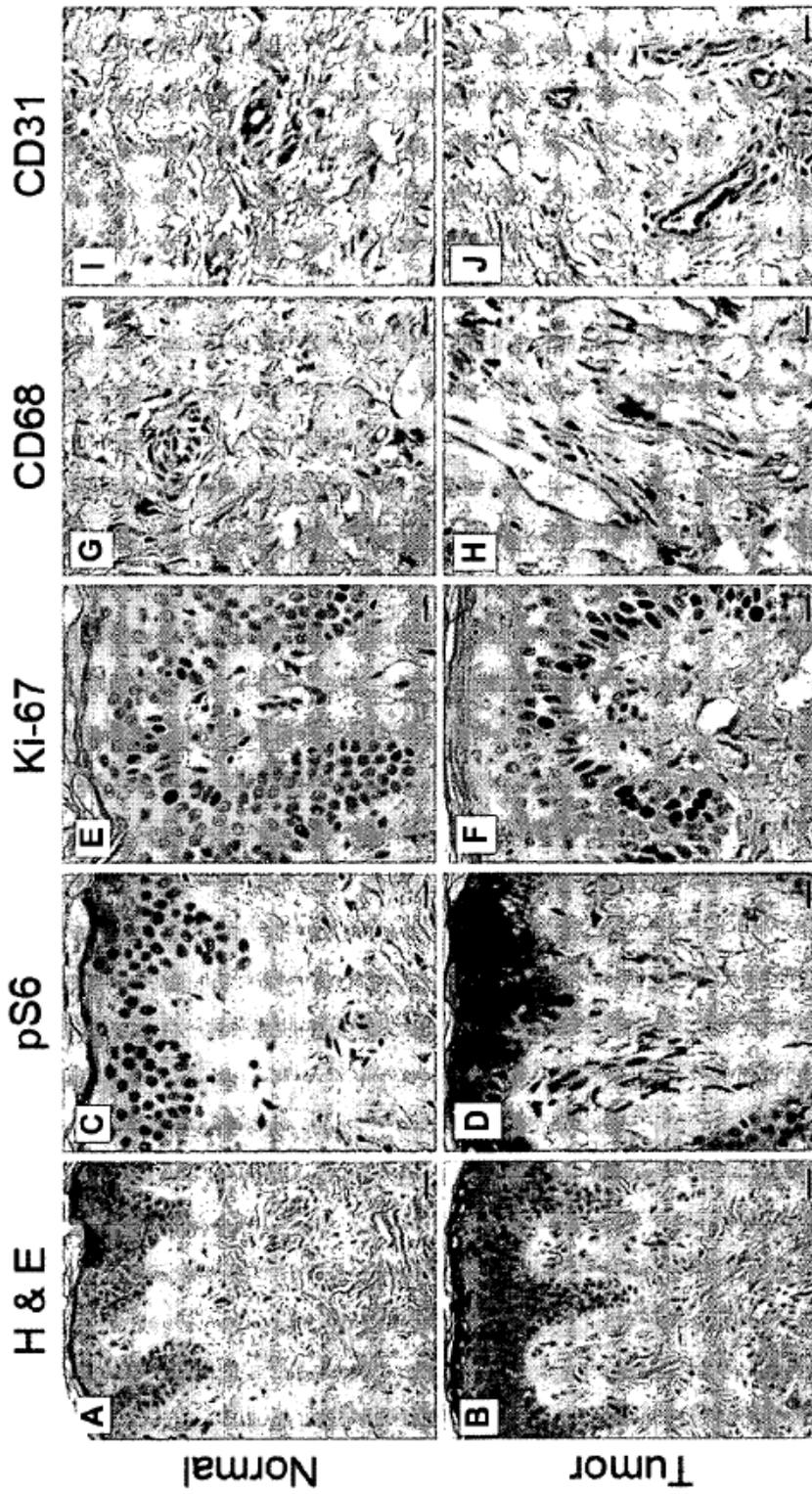


FIGURA 3

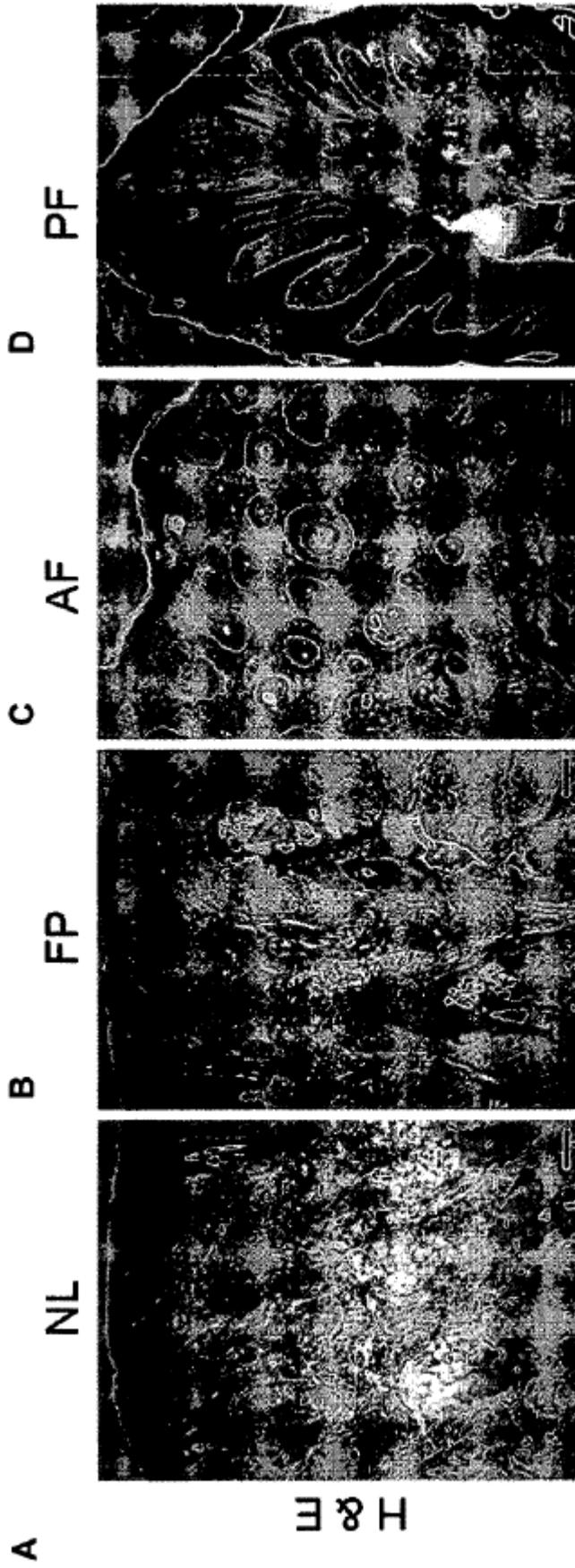


FIGURA 4

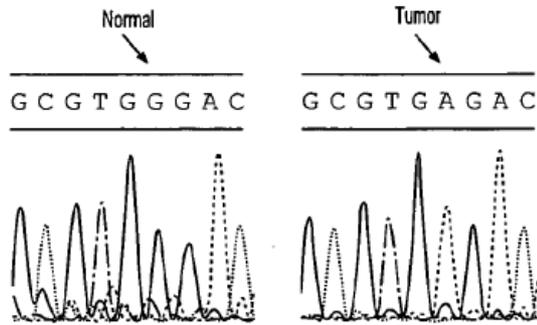


FIGURA 5A

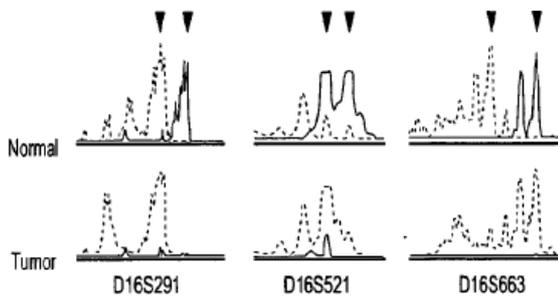


FIGURA 5B

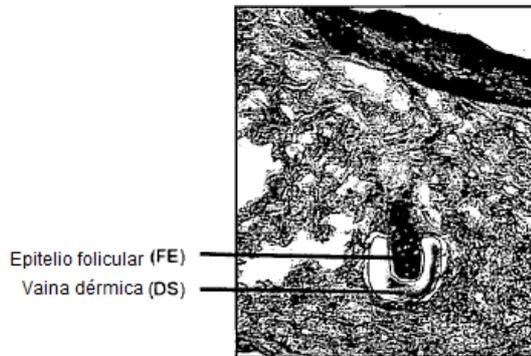


FIGURA 5C



FIGURA 5D

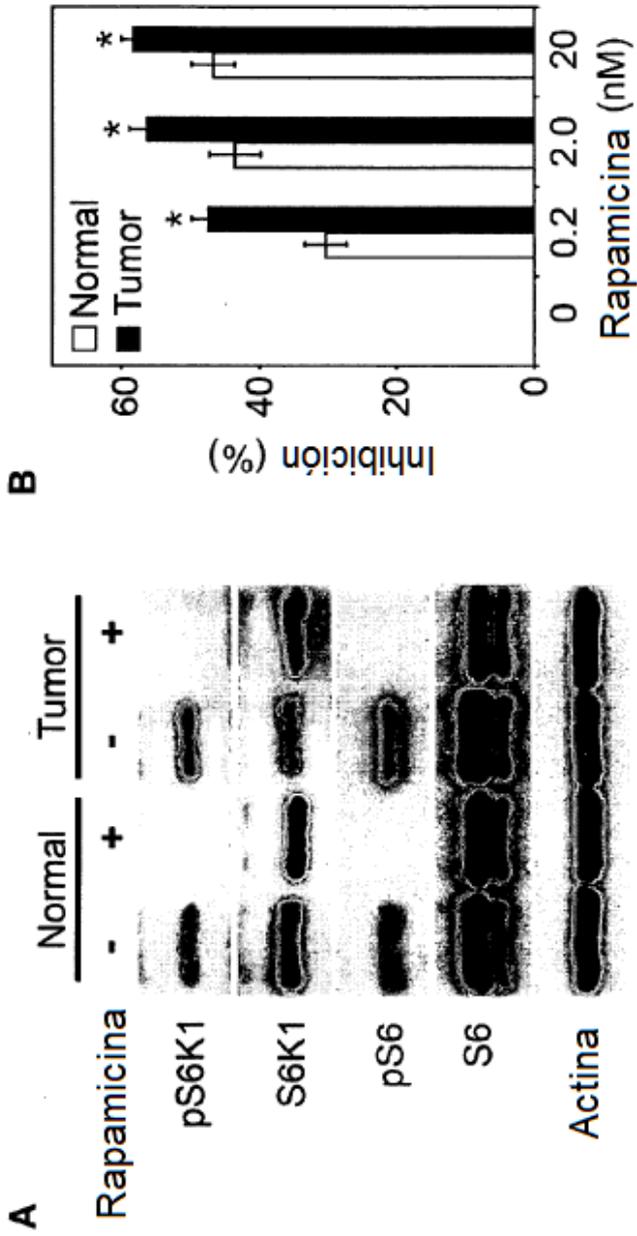


FIGURA 6

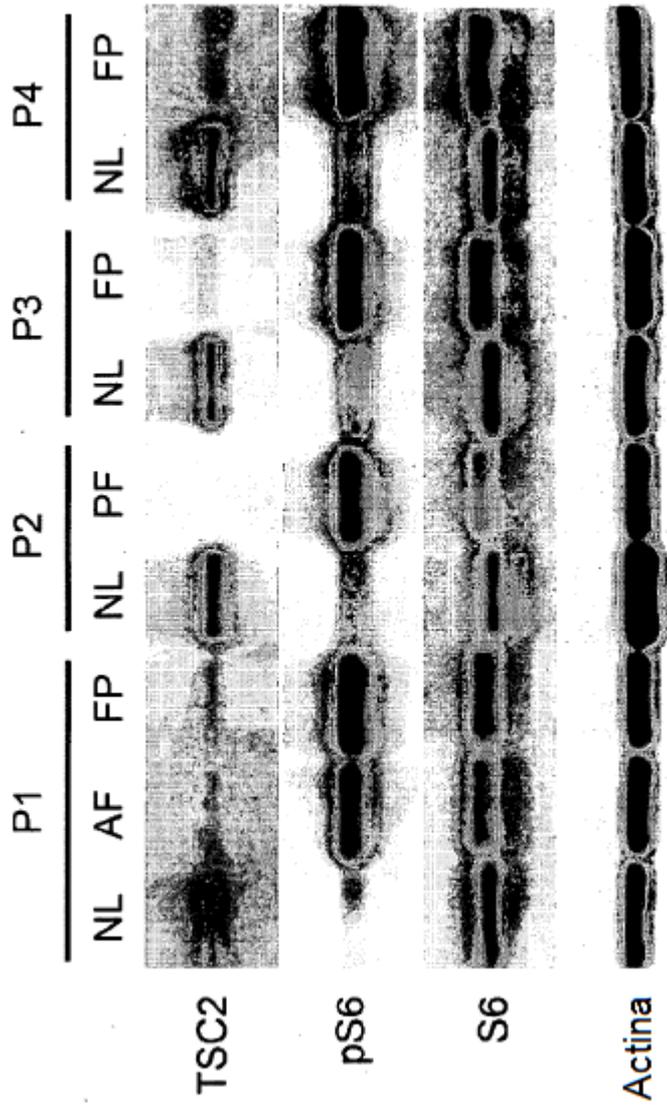


FIGURA 7

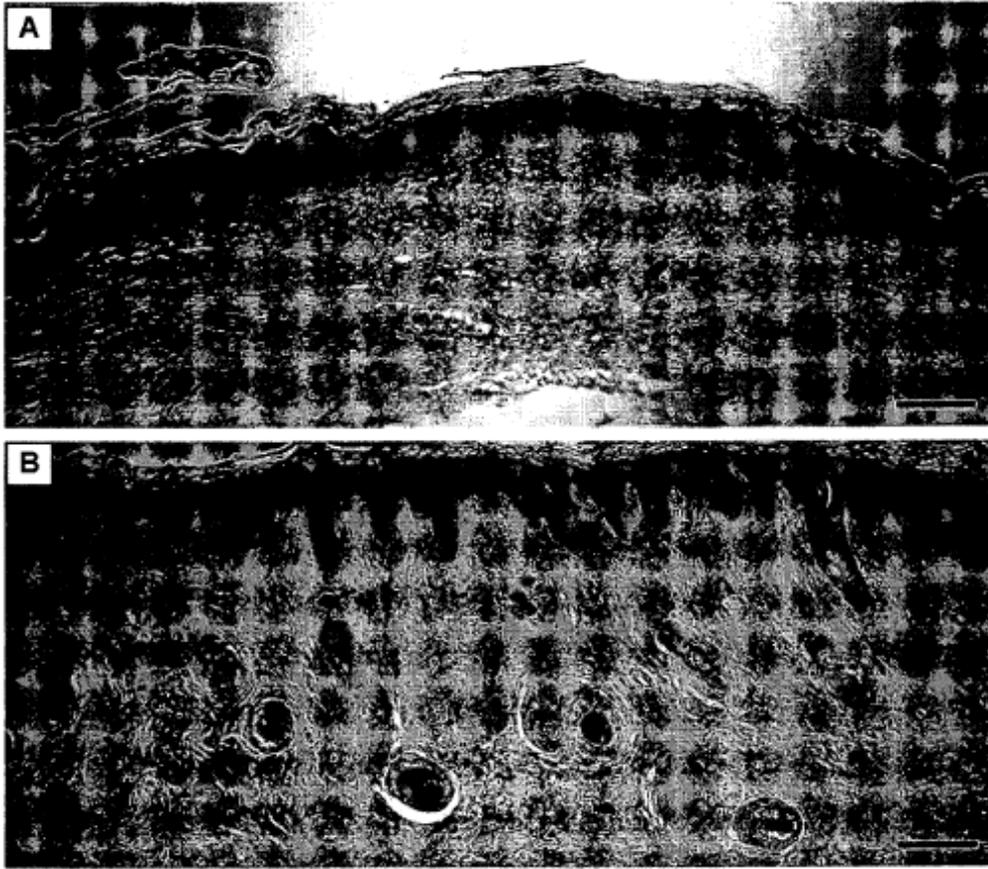


FIGURA 8

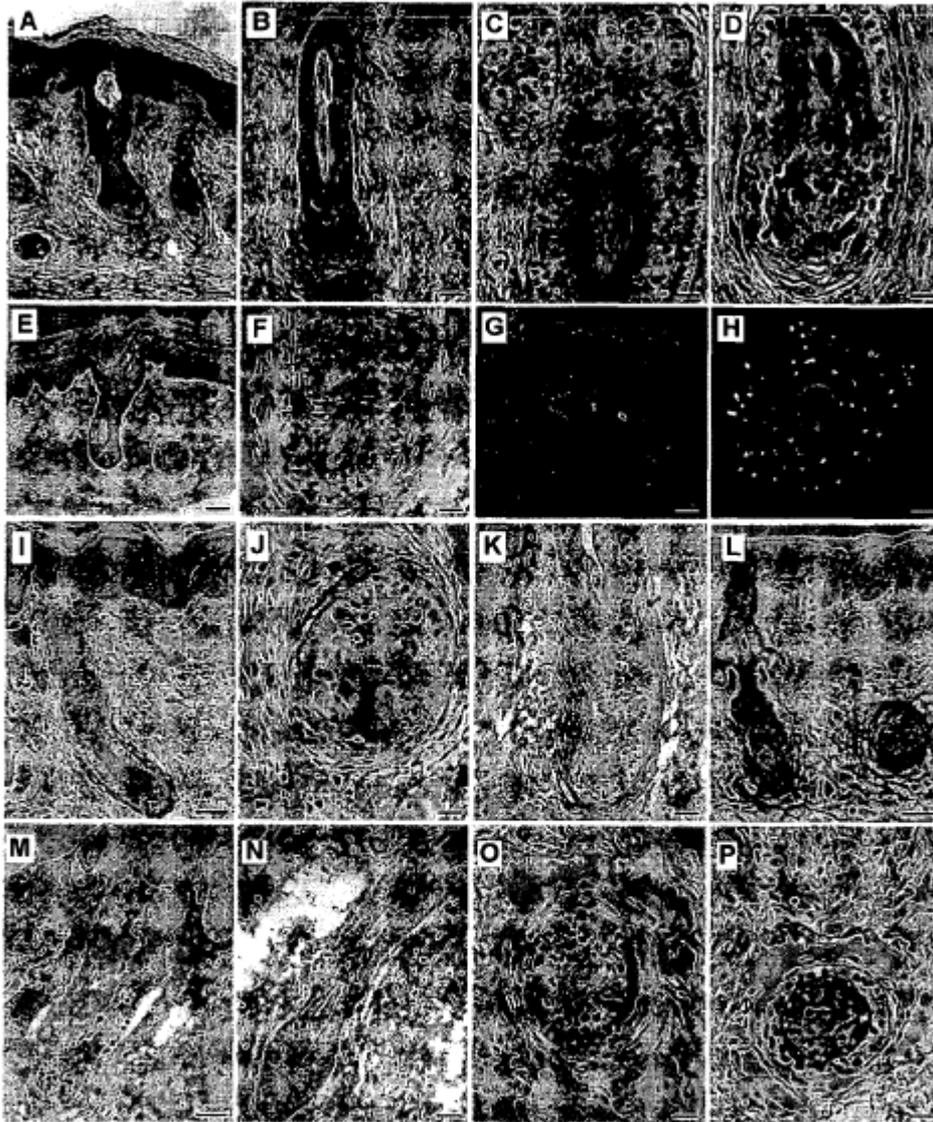


FIGURA 9

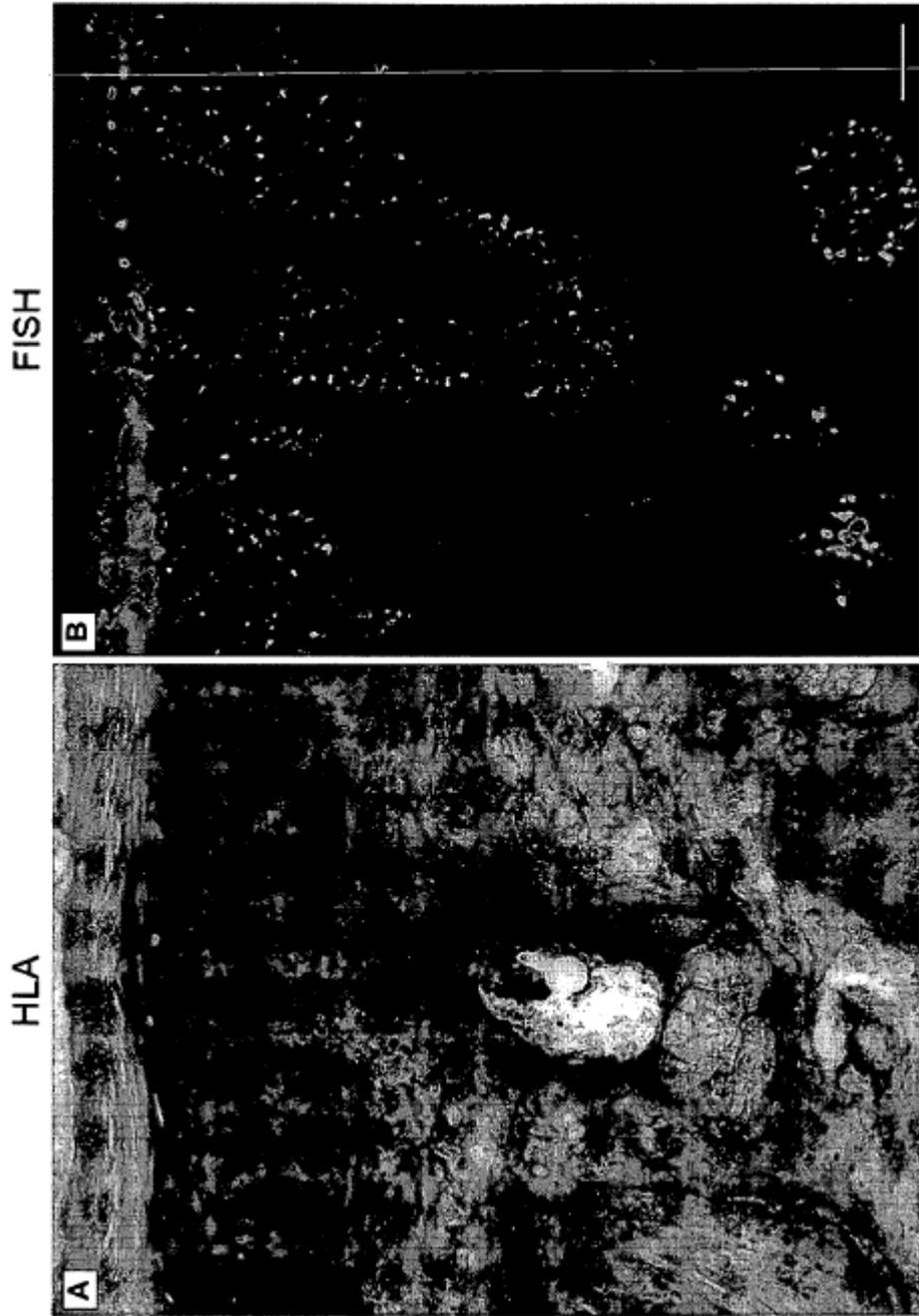


FIGURA 10

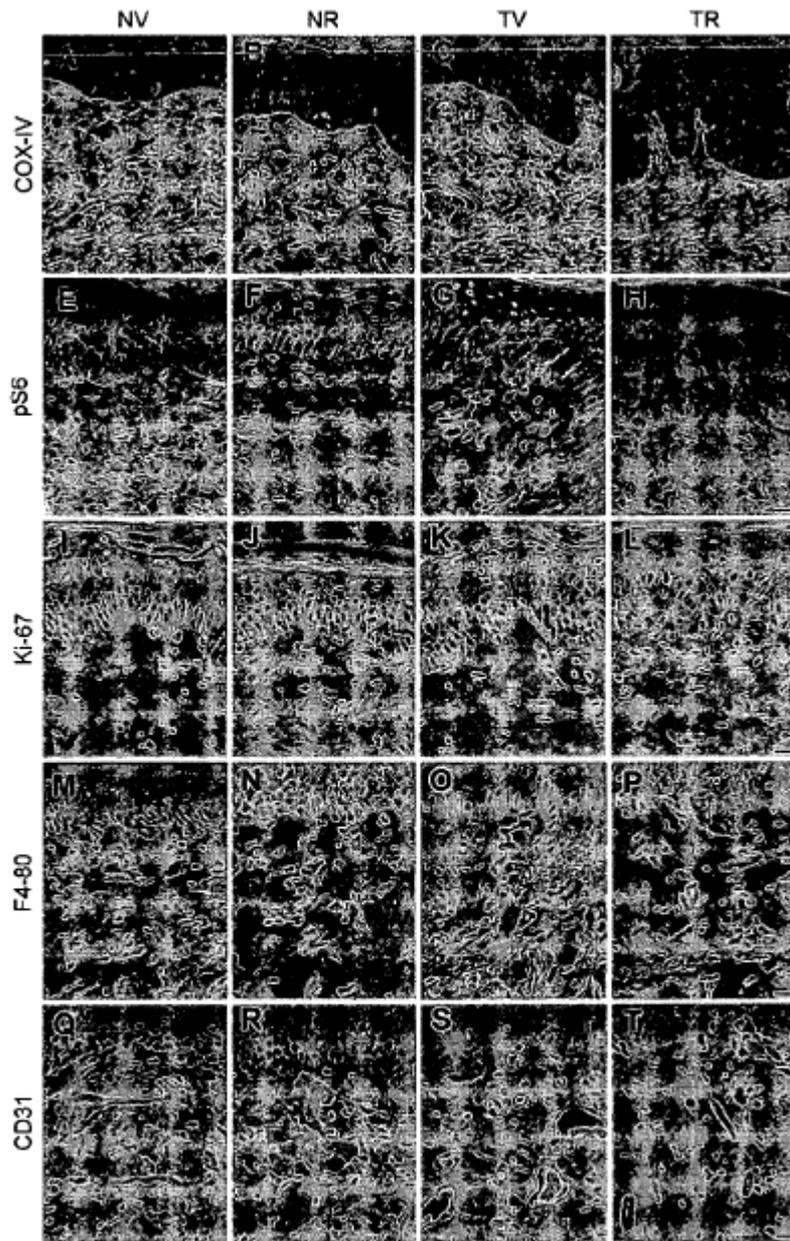


FIGURA 11

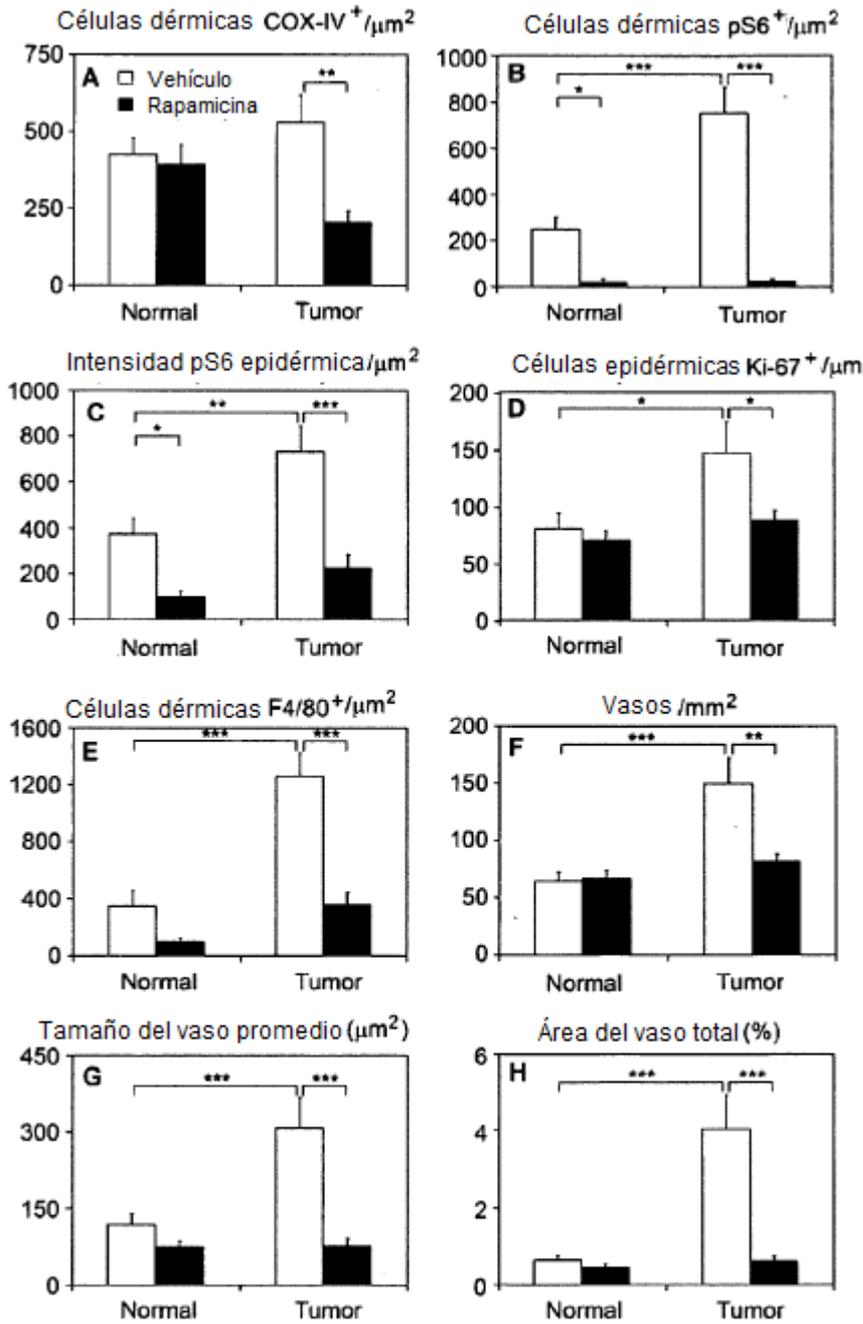


FIGURA 12

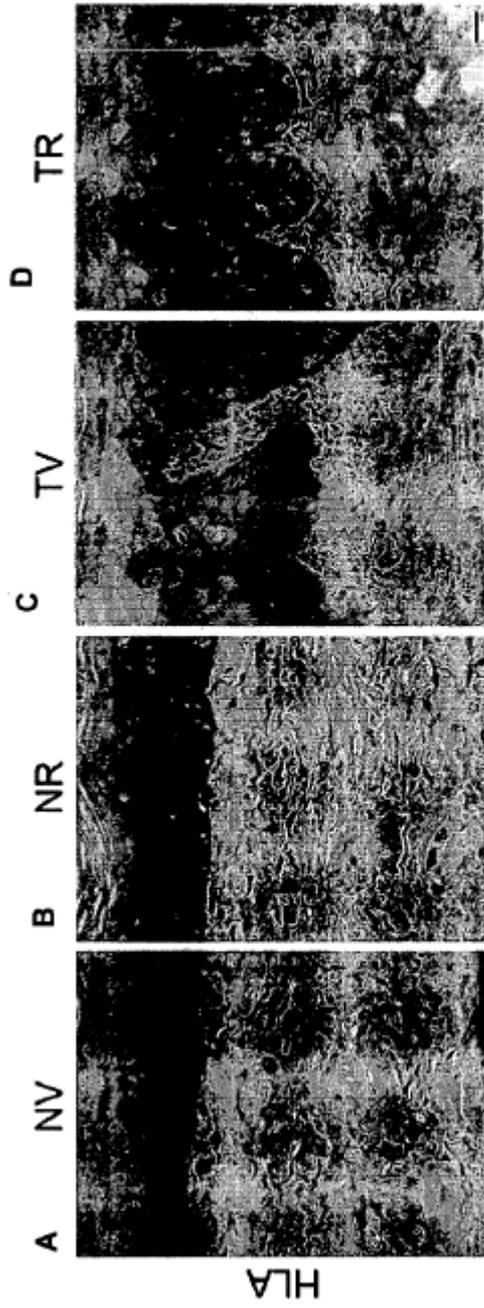


FIGURA 13

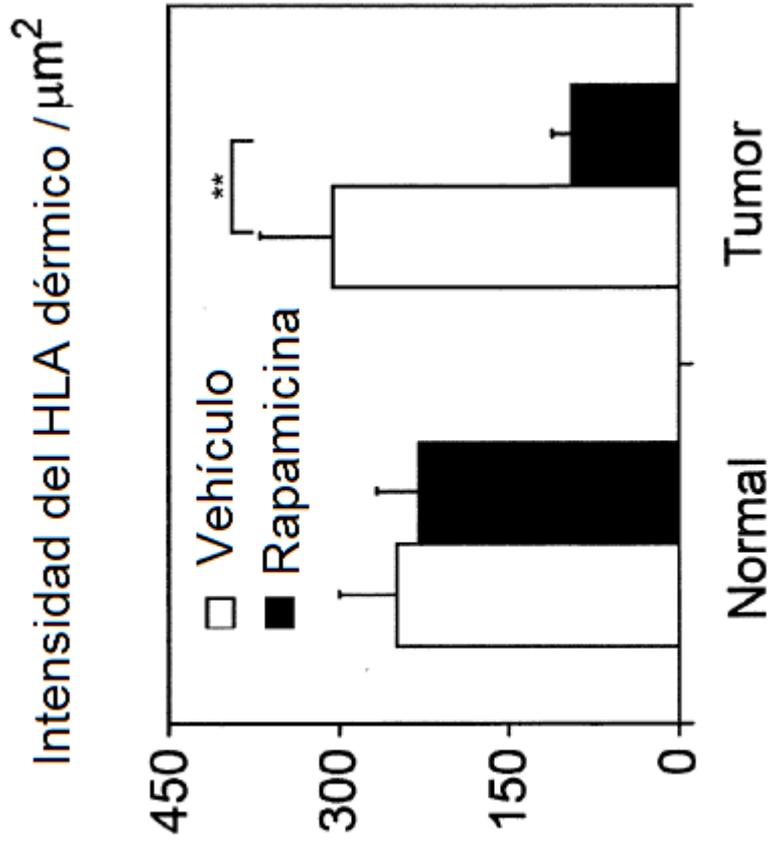


FIGURA 14

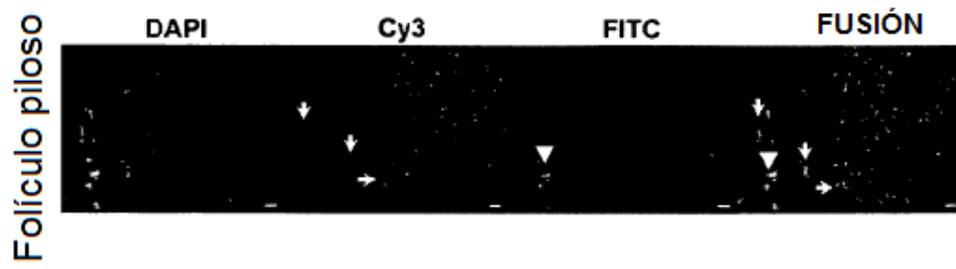


FIGURA 15

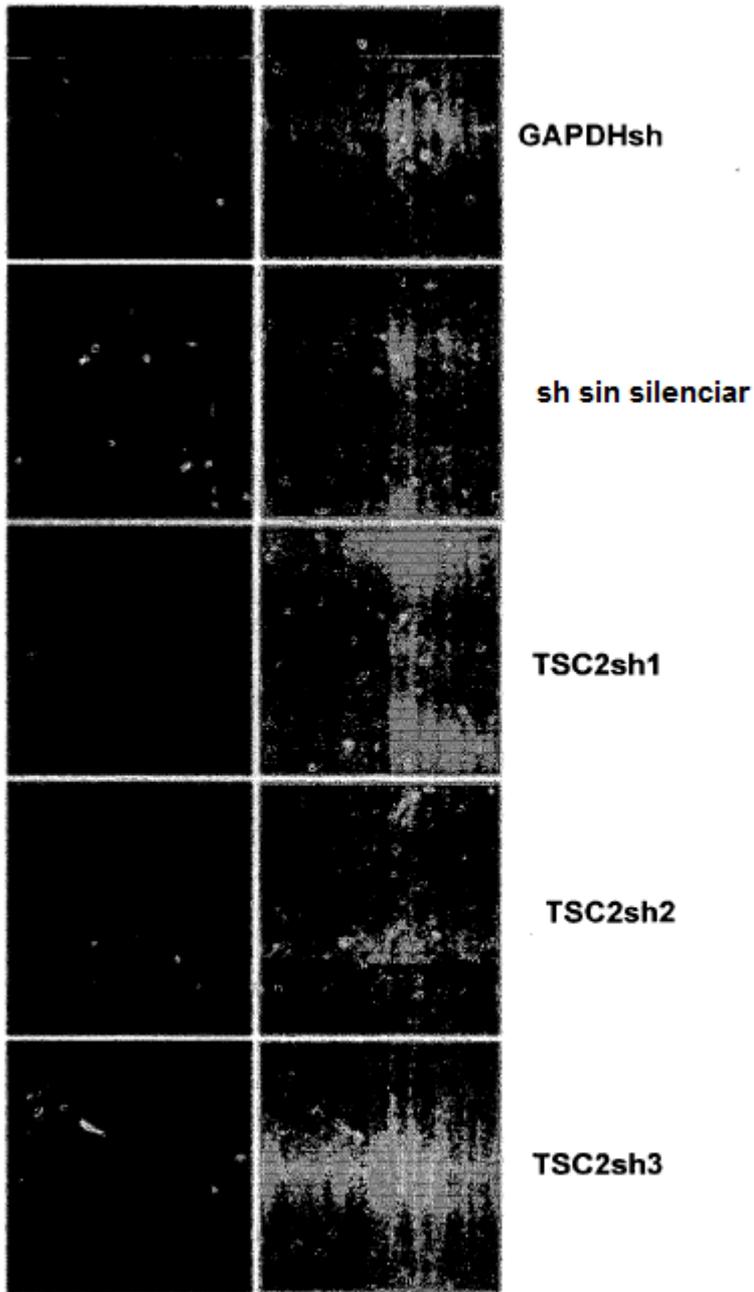


FIGURA 16

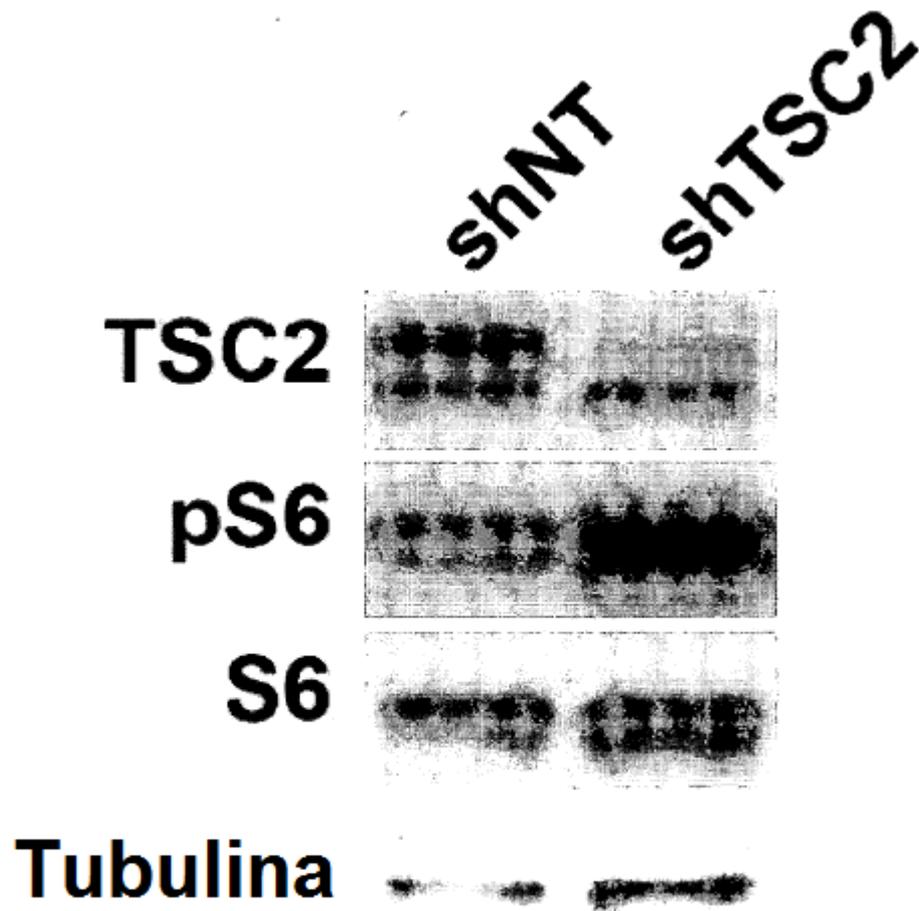


FIGURA 17

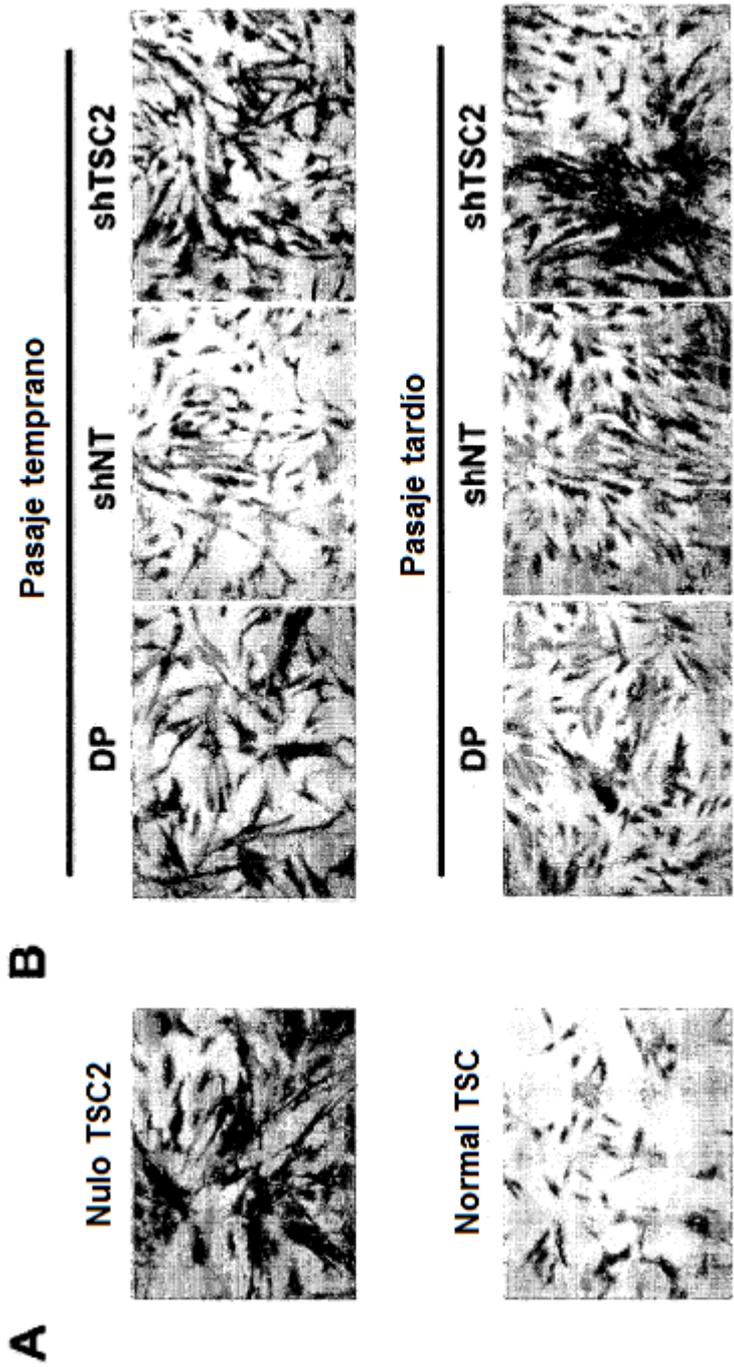


FIGURA 18

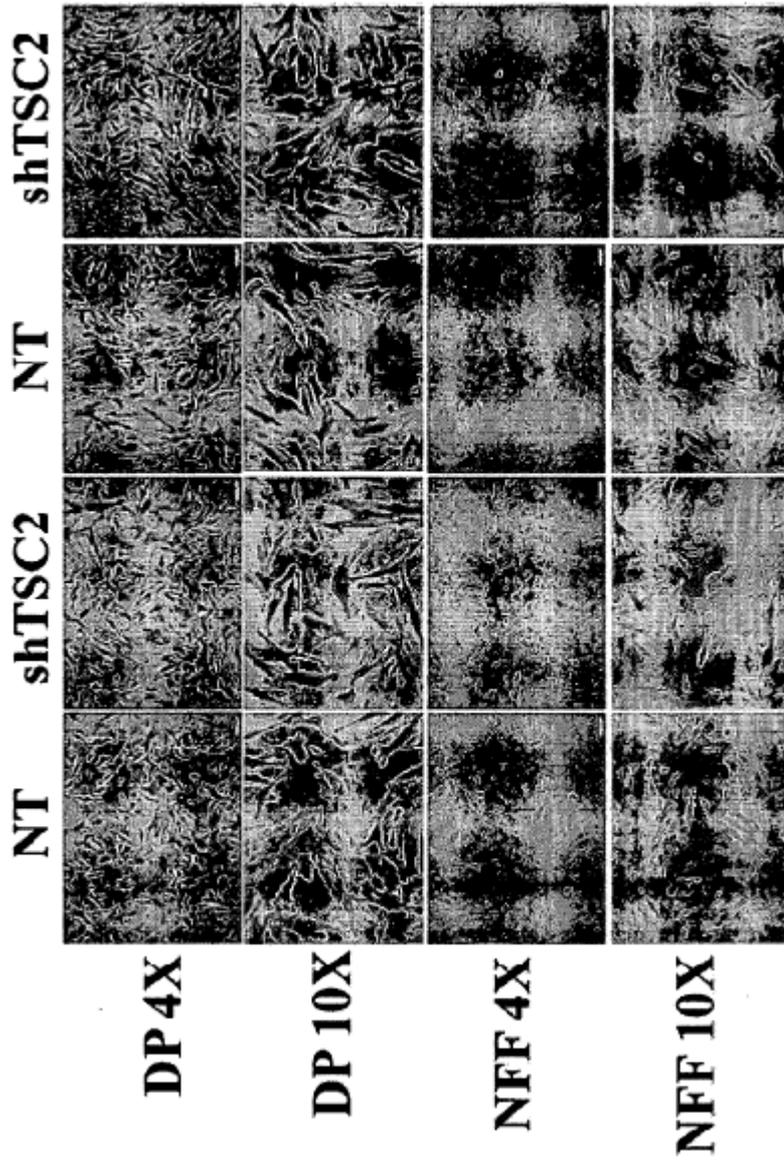


FIGURA 19



FIGURA 20

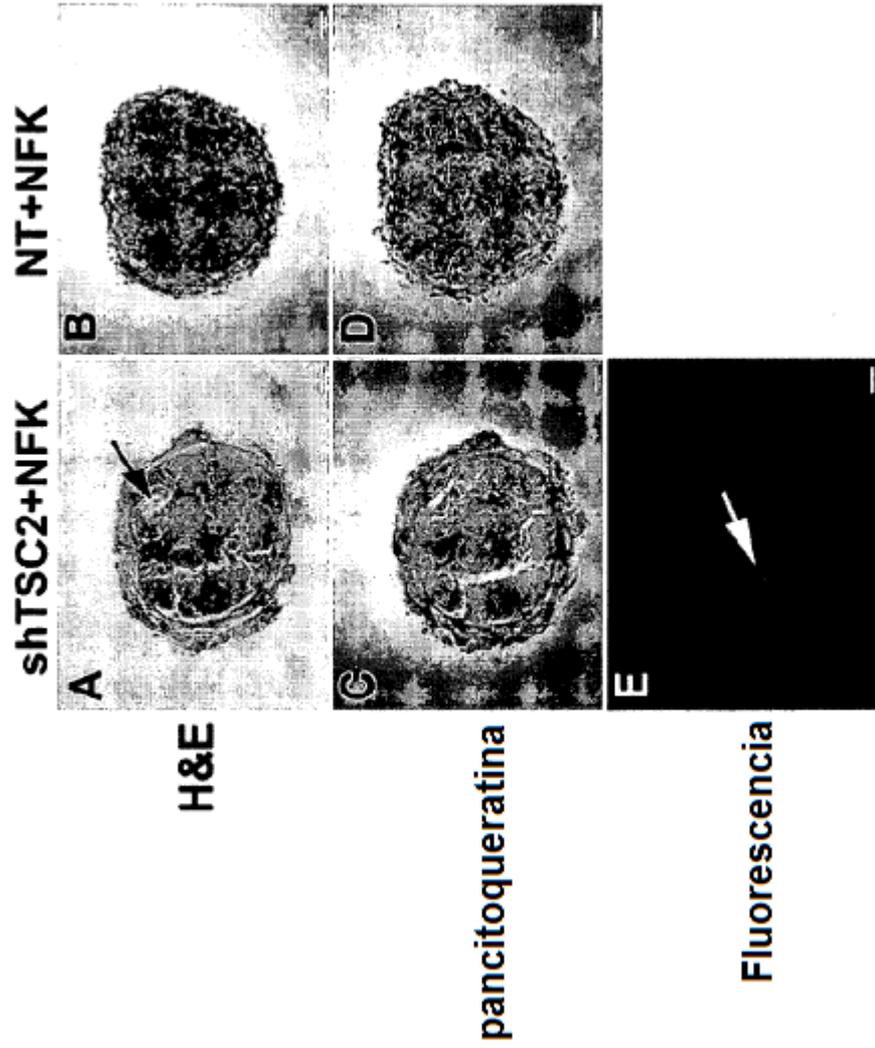


FIGURA 21

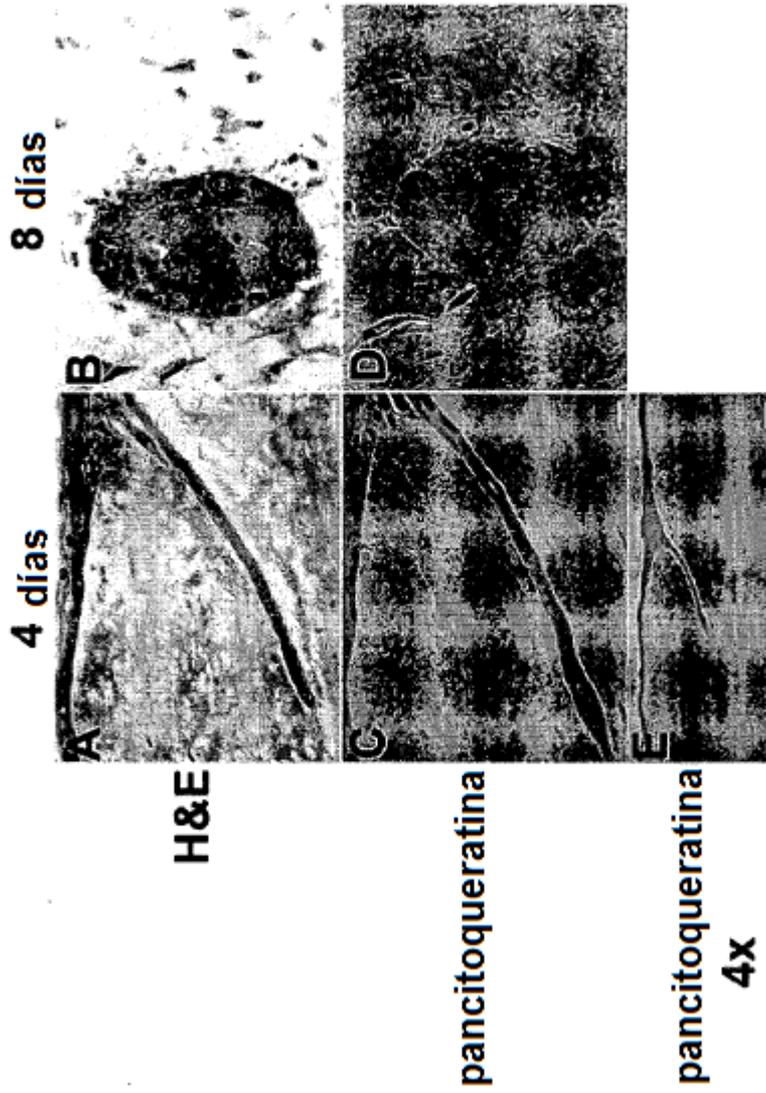


FIGURA 22

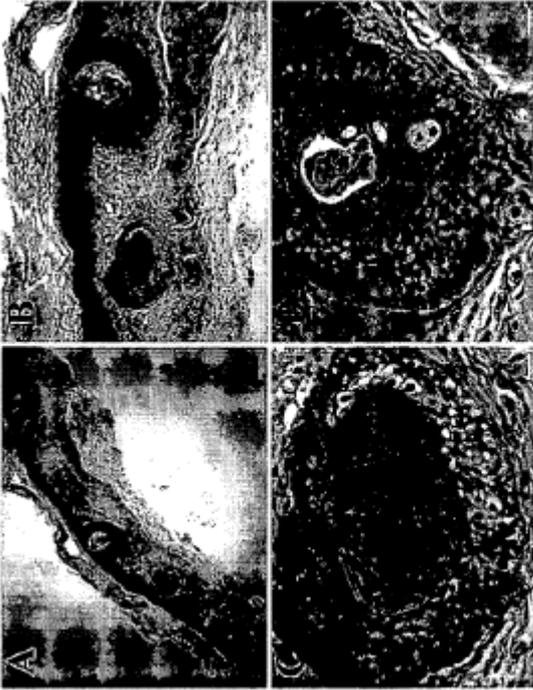


FIGURA 23