



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 277**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99933896 .5**

86 Fecha de presentación : **12.07.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1117423**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2001**

54

Título: **Línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados.**

30

Prioridad: **13.07.1998 US 114557**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73

Titular/es:
WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
614 North Walnut Street
Madison, Wisconsin 53705, US

72

Inventor/es: **Allen-Hoffmann, Lynn;**
Schlosser, Sandra, J. y
Pickart, Michael, A.

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 267 277 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

Línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados.

5 **Antecedentes de la invención***Queratinocitos humanos*

Los queratinocitos humanos aislados a partir de epitelios escamosos estratificados se pueden cultivar fácilmente *in vitro* (revisado por Leigh, y col., 1994). Los queratinocitos cultivados se replican fácilmente durante los pases iniciales y pueden generar un alto número de células que muestran ciertas características de diferenciación escamosa *in vivo*. Cuando los queratinocitos humanos normales, cultivados se trasplantan a ratones, la estructura del tejido epidérmico se regenera con el tiempo de forma ordenada (Breitkreutz, y col., 1997). La comodidad del cultivo y del trasplante de los queratinocitos humanos, junto con la accesibilidad de la piel para el proceso de trasplante y la posterior vigilancia, hacen que este tipo celular somático sea atractivo para la entrega de genes terapéuticos. Sin embargo, debido al inicio de la diferenciación terminal, la expresión transgénica en los queratinocitos se pierde sistemáticamente, independientemente de la estrategia empleada para la expresión génica. Diversos informes han mostrado que los queratinocitos humanos modificados por ingeniería genética pueden reproducir una epidermis de espesor completo, demostrando de este modo que células con propiedades similares a las células pluripotenciales, estaban presentes en la población de células trasplantadas (Choate y Khavari, 1997; Choate y col., 1996; Gerrard y col., 1993; Garlick, y col., 1991; Greenhalgh y col., 1994; Vogel, 1993, Fenjves, 1994).

25 *Ensayos de cultivo de tejidos in vitro empleando células humanas obtenidas a partir de epitelios escamosos estratificados*

Ensayos *in vitro* que empleen cultivos monocapas de células adherentes que mantengan el entorno del tejido normal *in vivo*, no existen para los tejidos humanos. Los modelos animales tienen la capacidad de imitar algunos de los procesos implicados en la respuesta de las terapias en tejidos humanos. Sin embargo, los sistemas animales sólo se prestan ellos mismos para puntuar de forma cualitativa y subjetiva la repoblación tumoral. Históricamente, los ensayos aislados de crecimiento *in vitro* han empleado cultivos monocapas de líneas celulares de roedor o humanas sobre placas de plástico para el cultivo de tejidos. El tamaño de las colonias o el número de células se determinan para estimar el grado de supervivencia y de repoblación de las células cancerígenas, después de un tratamiento con radiación. Un inconveniente principal de este planteamiento es que no tiene en cuenta ninguna señal de los factores de crecimiento adhesivo o paracrino en el entorno de la célula tumoral. Por esta razón, los estudios del crecimiento de células tumorales en ausencia de un tejido normal que las envuelva, no pueden reflejar de forma precisa las características del crecimiento *in vivo* en células tumorales.

Por ejemplo, los tumores de cabeza y cuello humanos (H&N, del inglés "head and neck") se diagnostican cada año en 43.000 pacientes en los Estados Unidos y en más de 750.000 pacientes en el mundo entero. Aunque la reaparición de los tumores cerca del sitio del tumor primario es la causa predominante de un fallo del tratamiento y de la muerte de estos pacientes, se conoce poco acerca de los acontecimientos moleculares que contribuyen al crecimiento de nuevo de los tumores después del tratamiento. Evidencias clínicas y radiobiológicas sugieren que las tasas de proliferación tumoral se pueden incrementar realmente después de las lesiones debidas a la exposición a la radiación (Hall, EJ, 1988; Pretereit, DG, y col., 1995). Se ha sugerido que el entorno de la herida proporciona señales potentes para el crecimiento tumoral (Haddow, A., 1972). Por ejemplo, la glicoproteína de la matriz extracelular (ECM) presente en el lecho de la herida, proporciona y/o secuestra estímulos potentes de crecimiento, que son necesarios para la regeneración del tejido normal. A través de estas observaciones queda claro que el entorno del tejido en el que un tumor se desarrolla inicialmente y/o crece de nuevo, después de un tratamiento fallido anulado, puede tener un impacto significativo sobre el crecimiento tumoral.

50 Boukamp y col., J. Cell Biology, 1988, vol. 106, págs. 761-771, describen la queratinización normal en una línea celular de queratinocitos humanos aneuploides.

55 Allen-Hoffmann y col., Int. J. Oncology, 1993, vol. 3, págs. 619-625, describen el uso de queratinocitos humanos inmortalizados RHEK-1 para la detección de una mutación inducida.

En la técnica de la biología celular se necesita una línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados de forma espontánea con un complemento cromosómico casi normal y un método para emplear esta línea celular inmortalizada en un ensayo con en tejidos *in vitro*.

60 **Sumario de la invención**

En una realización, la presente invención es una línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados, en donde la línea celular es ATCC CRL 12191 y comprende un complemento cromosómico normal de 46 con la excepción de un isocromosoma extra en el brazo largo del cromosoma 8.

En otra realización, la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados, se transfecta con un gen heterólogo. Este gen puede ser un gen marcador, lo más preferentemente una proteína verde fluorescente (GFP).

La presente invención también proporciona un método para someter a ensayo el efecto del ensayo de un agente de modulación de células tumorales, que comprende las etapas de obtener un cultivo de células epiteliales escamosas estratificadas y humanas, en donde el cultivo comprende células epiteliales escamosas malignas, preferentemente células humanas de carcinoma escamoso (SCC) y queratinocitos humanos inmortalizados de forma espontánea y en donde este cultivo forma una epidermis reconstruida, tratando la epidermis con un agente terapéutico de células tumorales del ensayo y evaluando las células malignas en la epidermis.

La invención proporciona adicionalmente un cultivo organotípico que comprende una combinación de queratinocitos humanos inmortalizados, depositados como ATCC CRL 12191 y de células de carcinomas de células escamosas humanas (SCC).

La invención se refiere adicionalmente a un método para evaluar los compuestos del ensayo en cuanto a su toxicidad en humanos, que comprende las etapas de:

- (a) exponer el compuesto del ensayo a la línea celular de la invención; y
- (b) evaluar el efecto del compuesto sobre la línea celular.

La invención se refiere adicionalmente al uso *in vitro* de una línea celular de la invención en el desarrollo o el ensayo de un agente en un producto epidérmico terapéutico, cosmético-farmacéutico o cosmético.

La invención proporciona aún más adicionalmente el uso de una línea celular de la invención en la preparación de un medicamento para uso en la reparación o el mantenimiento de tejidos epiteliales.

Una ventaja de la presente invención es que se proporciona una línea celular de queratinocitos inmortalizados.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes después del estudio de la memoria descriptiva, las reivindicaciones y los dibujos.

Breve descripción de diversos aspectos de los dibujos

La Fig. 1 es un análisis cromosómico de las células BC-1-Ep/SL. El análisis cariotípico se realizó en células BC-1-Ep/SL en el pase 31. Las células contenían 47 cromosomas debido a un isocromosoma extra del brazo largo del cromosoma 8. El cromosoma extra, i(8q), no se observa en los queratinocitos parentales (pase 3 de BC-1-Ep) que mostraba un cariotipo de macho normal.

La Fig. 2 muestra la necesidad de factor de crecimiento epidérmico (EGF) para los pases en serie de las células BC-1-Ep/SL. Las células BC-1-Ep/SL se sometieron a pases en serie en medios convencionales +/- 10 ng/ml de EGF. Las células sobrevivían sin EGF pero crecían de forma insatisfactoria.

La Fig. 3 muestra que el factor de crecimiento transformante β -1 (TGF- β 1) inhibe el crecimiento de los queratinocitos BC-1-Ep/SL. Las células parentales, BC-1-Ep (6^o) y BC-1-Ep/SL (28^o) se extendieron en placas en medios convencionales sin EGF o una capa alimentadora 3T3. Las células se trataron con +/- 5 ng/ml de TGF- β 1 cuando las células eran ~20% confluentes en medios convencionales sin EGF. Se hizo un recuento de las células 3-5 días más tarde. El efecto del tratamiento con TGF- β 1 se muestra como un porcentaje de testigos.

La Fig. 4 muestra los requerimientos de factores de crecimiento para las células BC-1-Ep/SL. Las células BC-1-Ep/SL en el pase 31, se dejaron crecer en 2,5% de FCS + 3 F12:1 DME + 10 ng/ml de EGF suplementado con ausencia de factores de crecimiento adicionales (-GF), 0,4 μ g/ml de hidrocortisona (HC), 8,4 ng/ml de toxina colérica (CT), 24 μ g/ml de adenina (Ade), 5 μ g/ml de insulina (Ins) o todos los factores de crecimiento (+GF). El crecimiento celular se incrementaba en presencia de cada factor de crecimiento por separado, sin embargo, se consiguió un crecimiento óptimo en presencia de todos los factores de crecimiento.

La Fig. 5 muestra que la confluencia celular incrementada reduce la eficacia de la transfección transitoria en células BC-1-Ep/SL. Células BC-1-Ep/SL se transfectaron con el plásmido que contenía GFP, pGreenLantern (Gibco) y pcDNA3 neo (Invitrogen), empleando GeneFECTOR (VennNova Inc.). Se empleó un intervalo de 15-20 μ g de pGreenLantern linealizado y 5-6,7 μ g de pcDNA3neo. Los números de células se obtuvieron por tripsinización y el recuento de queratinocitos mediante el uso de un hemocitómetro. La densidad baja se definió como 6-7,5 x 10⁵ células/placa de 100 mm. La densidad alta se definió como 3-4 x 10⁶ células/placa de 100 mm. La eficacia de la transfección se obtuvo empleando citofluorímetros (FACS). Cada barra del gráfico representa un experimento aislado.

La Fig. 6 es un esquema de una sección de la piel y un cultivo organotípico de SCC13y^{GFP+}/ BC-1-Ep/SL. La Fig. 6A es un esquema de las diversas capas presentes en la piel. La Fig. 6B es un esquema de un modelo de tejido tumoral/normal que consiste en primer lugar en tres componentes, tal y como se muestra. La capa base es un equivalente dérmico que consiste en colágeno y fibroblastos. Por encima de esta capa, está la epidermis reconstruida, formada por diferenciación de células epiteliales BC-1-Ep/SL (sombreadas). Dentro de este equivalente epidérmico hay unos focos tumorales de SCC13y^{GFP+} (no sombreados).

Breve descripción de la invención*A. Línea Celular de Queratinocitos Humanos Inmortalizados*

5 Los queratinocitos humanos con propiedades similares a las células pluripotenciales, son el objetivo óptimo para una transfección estable de genes exógenos. Los transfectantes estables se producen cuando el ADN exógeno se introduce en una célula y se integra en los cromosomas del hospedador. Las células hijas subsiguientes expresan el producto génico del transgen y son estables si la expresión se propaga de forma indefinida a través de generaciones posteriores. Para aplicaciones en terapia génica, es esencial el uso de queratinocitos similares a células pluripotenciales que tengan la capacidad de regenerar la epidermis con su espesor completo, para los ciclos múltiples de renovación del tejido, mientras que se mantiene la expresión del gen de interés transducido.

15 En una realización, la presente invención es una línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados de forma espontánea, BC-1-Ep/SL que mantiene los requerimientos para el crecimiento específico del tipo celular, que expresa los marcadores de diferenciación y que se puede transfectar de forma estable. BC-1-Ep/SL se depositó el 20 de septiembre de 1996 en la "American Type Culture Collection", en 10801, University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, EE.UU., con el número de orden CRL-12191, bajo los términos y condiciones del Tratado de Budapest.

20 Los queratinocitos BC-1-Ep/SL no son tumorigénicos y sufren una diferenciación escamosa en cultivo organotípico. Los cultivos organotípicos son cultivos en los que los queratinocitos crecen sobre un sustrato que se parece a la dermis y se exponen a la interfaz de aire-medio (Leigh y Watt, 1994).

25 Esperamos que esta línea celular de queratinocitos humanos sirva como una fuente de células progenitoras epidérmicas de vida prolongada, capaces de mantener una eficacia elevada y una expresión transgénica epidérmica a largo plazo. Los queratinocitos BC-1-Ep/SL representan un nuevo reactivo celular importante para el estudio del crecimiento y la diferenciación en epitelios escamosos estratificados.

30 En otra realización, la presente invención es una línea celular de queratinocitos humanos e inmortalizados, preferentemente BC-1-Ep/SL, preferentemente ATCC CRL-12191, que comprende al menos un transgen. Los ejemplos siguientes muestran un método preferido para crear una línea celular transgénica. Muchos otros métodos serán evidentes para los expertos en la técnica de biología molecular. Hemos desarrollado un método según el cual los queratinocitos BC-1-Ep/SL transfectados se identifican basándose en la expresión de GFP y se seleccionan basándose en la morfología y en el grado de expresión de GFP, y de este modo conservan el mayor nivel de las propiedades del estado natural de las células antes de la transfección. Esta técnica evita las presiones potenciales que alteran el carácter debido a una selección que se basa en un marcador dominante seleccionable, con agentes químicos convencionales, tales como F418, metotrexato, higromicina-B, aminopterina, ácido micofenólico y zeocina.

35 Esperamos que la línea celular de queratinocitos inmortalizados y humanos se pueda emplear de diversas formas, tales como para la formación de un cultivo organotípico en cultivo celular monocapa, de un producto de ingeniería genética de tejido humano adecuado para injertos a corto y/o a largo plazo en seres humanos o en animales de investigación, y como un componente de biopelículas, p. ej., como una parte de un dispositivo que produce productos génicos que se van a administrar de forma continua a un paciente, por vía intravenosa.

B. Uso de BC-1-Ep/SL como un Sistema Modelo Organotípico

45 Tal y como se ha descrito anteriormente, la línea celular de la presente invención tiene la ventaja sustancial de reproducir la estructura tisular de los epitelios escamosos estratificados y humanos normales. Este modelo es adecuado como un ensayo de la repoblación tumoral humana. Al reconstruir totalmente el crecimiento de células epiteliales humanas malignas, dentro de un entorno similar al tejido, se pueden vigilar las características del crecimiento de las células tumorales en un ámbito fisiológicamente adecuado.

55 Además, los criterios de valoración cuantitativos se pueden vigilar ya que cada célula tumoral individual se podía someter a ingeniería genética para expresar una proteína marcadora, tal como la proteína verde fluorescente (GFP). (Los ejemplos siguientes muestran un método preferido para transfectar BC-1-Ep/SL con un gen marcador). Este sistema modelo representa un avance tecnológico para examinar fármacos o agentes empleados en el tratamiento de cánceres de epitelios escamosos estratificados. Los cánceres ilustrativos incluyen cánceres de cabeza y cuello, de piel, de la mucosa oral, del cuello uterino y de la tráquea.

60 Por tanto, la presente invención es un sistema de modelo epitelial escamoso estratificado y humano, diseñado para medir la tasa de crecimiento de células tumorales y la repoblación (véase la Fig. 6 en los Ejemplos para un esquema).

65 En una realización, el sistema modelo consiste en un cocultivo organotípico de células humanas de carcinoma de células escamosas (SCC), marcadas genéticamente y de queratinocitos humanos inmortalizados de forma espontánea sin marcar, BC-1-Ep/SL. La línea de queratinocitos BC-1-Ep/SL es un componente decisivo en el sistema modelo debido a que las células proporcionan un entorno reproducible en el que se comparan las características del crecimiento de las células SCC. La línea celular inmortalizada, BC-1-Ep/SL es muy ventajosa porque conserva todas las características de un queratinocito normal, es decir, la diferenciación terminal, la apoptosis y las características no tumorigénicas permanecen.

Los ejemplos siguientes describen un método preferido para crear una epidermis reconstruida. Resumiendo, las células BC-1-Ep/SL y SCC se siembran sobre una base de colágeno que contiene fibroblastos humanos normales. El cocultivo se siembra con diversas diluciones de SCCs marcadas con un número convencional de queratinocitos BC-1-Ep/SL.

5

El modelo de tejido tumoral/normal *in vitro* de la presente invención, también contribuirá en la experimentación de los mecanismos moleculares responsables de la progresión tumoral y de la repoblación. Este mismo modelo también se puede utilizar para identificar agentes citostáticos potenciales que pueden acelerar el crecimiento de nuevo de tumores y agentes quimiopreventivos con una selectividad tumoral específica. Por ejemplo, los cultivos organotípicos reconstituidos se pueden tratar con una variedad de agentes de modulación de células tumorales, tales como agentes físicos (p. ej., rayos X) o agentes químicos/biológicos (es decir, agentes quimioterapéuticos, fármacos citostáticos) y los cultivos vigilados, preferentemente empleando la marcación con GFP, para cuantificar el grado o la carencia de crecimiento (de nuevo) de las células SCC. De este modo, el sistema modelo BC-1-Ep/SL contribuirá a la identificación y al desarrollo de agentes antiproliferativos para pacientes con cáncer que reciben terapias curativas para el cáncer de cabeza y cuello, de piel, de la mucosa oral, del cuello uterino, de la tráquea y de otros epitelios o nuevas estrategias anticancerígenas novedosas en general.

10

El crecimiento de células tumorales se puede vigilar del modo más conveniente de la siguiente manera: el número total de células tumorales y la relación con el número de células BC-1-Ep/SL se puede vigilar del modo más conveniente, empleando técnicas de citometría de flujo que se basan en la fluorescencia de GFP. El volumen de las células tumorales y la localización se vigilan lo más convenientemente, mediante microscopía confocal. Las interacciones célula-célula se vigilan del modo más conveniente en secciones histológicas, empleando técnicas de inmunotinción y de hibridación *in situ*.

20

La introducción de la GFP en células de mamíferos se utiliza de forma extendida en sistemas *in vitro* y en modelos animales. Hasta la fecha, no existen informaciones que describan características alteradas del crecimiento celular en mamíferos debido a la expresión de GFP. El hecho de que estos modelos se comporten tal y como se esperaba, sugiere que la expresión de GFP es inofensiva y que, por tanto, es una proteína marcadora ideal. Las observaciones en este estudio han confirmado también que la introducción de GFP en la línea celular de carcinoma de células escamosas humanas, SCC13y, no tiene efecto sobre los criterios de valoración biológicos adecuados. Los resultados observados en estos experimentos apoyan estudios previos, lo que sugiere que la expresión de GFP no interfiere con las características del crecimiento y de la diferenciación de los tipos celulares estudiados. La estabilidad de la expresión de GFP es otra variable que es decisiva para el éxito de los modelos que emplean GFP como un marcador a lo largo del tiempo. Nuestras observaciones experimentales sugieren que la expresión de GFP es estable en al menos una línea de células malignas, SCC13y. Otros métodos de marcación genética, p. ej., la actividad enzimática y/o los dispositivos de cultivo se están considerando para poder realizar el ensayo repetido de la misma muestra del cultivo.

25

30

35

El cocultivo de queratinocitos humanos anormales y normales ha sido descrito recientemente por A. Javaherian y sus colaboradores (Javaherian, A. y *col.*, 1998). En este estudio, las células de queratinocitos (HaCat) que se habían inmortalizado empleando ingeniería genética, se hacen crecer en cultivo organotípico. Aunque son inmortales, estas células no son tumorígenas, es decir, capaces de formar tumores malignos en ratones sin timo, y por tanto no son representativas de células malignas en general. Puesto que la línea celular SCC13y^{GFP+} se obtiene a partir de tumor de un paciente real y es tumorígena, será más adecuada para estudios destinados a la erradicación de tumores malignos.

40

El modelo de cocultivo organotípico puede ser útil para por lo menos tres problemas decisivos, de cara a las industrias farmacéutica y biotecnológica: (1) cómo escrutar nuevos inhibidores citostáticos de la repoblación tumoral, (2) cómo determinar las respuestas específicas del paciente frente a la quimioterapia o la radioterapia antes del tratamiento, y (3) cómo desarrollar nuevos agentes terapéuticos biológicos. Al contrario de los agentes citotóxicos tradicionales que se dirigen directamente a la célula tumoral, los inhibidores citostáticos del crecimiento tumoral se pueden dirigir al tumor individual o a su microentorno. Esta diferencia surge predominantemente debido a que el objetivo primario de un agente citotóxico es matar la célula tumoral; mientras que los agentes citostáticos producen la ralentización o la detención de la expansión proliferativa tumoral pero no matan necesariamente a las células. En teoría, esto se puede conseguir por interferencia directa con la proliferación celular (p. ej., inhibidores del ciclo celular) o por alteraciones indirectas en el tejido normal que rodea, lo que le vuelve menos protector del crecimiento tumoral (p. ej., la inhibición de las señales regenerativas de heridas).

45

50

55

Las nuevas estrategias antitumorales se pueden identificar empleando el cocultivo de tejido normal/tumoral organotípico porque la función *in vitro* de las respuestas del tejido tumoral y normal se pueden someter a ensayo directamente en tejidos humanos reconstruidos. Los ensayos actuales *in vitro* que se basan en el crecimiento de cultivos monocapas de células tumorales humanas, fracasan al respecto porque no requieren una función normal del tejido ni justifican la influencia del microentorno de las células malignas. El conocimiento del microentorno tumoral puede tener una importancia particular en la identificación de agentes quimiopreventivos que se concentran en evitar la iniciación de un tumor cuando ya se han desarrollado características malignas agresivas. También puede ser importante para la prevención del crecimiento de nuevo de células malignas que sobreviven a las terapias convencionales citotóxicas o quirúrgicas. Adicionalmente, los agentes citostáticos con cocultivo de tejido tumoral/normal organotípico, también pueden ser útiles para el uso simultáneo en radioterapia clínica. En este caso, la capacidad de los agentes citostáticos para ralentizar el crecimiento tumoral durante el tratamiento, puede ser decisivo para eliminar el tumor y puede atenuar las complicaciones producidas por la inflamación que acompaña a las terapias convencionales.

60

65

La vigilancia del crecimiento de nuevo de un tumor en un modelo de cocultivo de tejido tumoral/normal organotípico, también puede ser útil para proporcionar una información específica del paciente, antes del tratamiento, en relación con la sensibilidad a la terapia y el índice terapéutico. Los ensayos actuales han mostrado sólo una débil correlación entre el crecimiento *in vitro* de tumores humanos en cultivo monocapa y la respuesta tumoral real del paciente. Unas correlaciones más fuertes se pueden conseguir incluyendo el entorno del tejido normal en los modelos *in vitro*.

Otras aplicaciones pueden proporcionar materiales adicionales de pronóstico y/o biológicos con un potencial para dirigir el tratamiento de impacto del paciente. Por ejemplo, células procedentes de biopsias tumorales se podían cultivar con células BC-1-Ep/SL marcadas con GFP, definido en esta memoria como "cultivo inverso". Un modelo de cultivo inverso podía proporcionar un entorno del cultivo reproducible que imite estrechamente el microentorno tumoral *in situ* y podía permitir ensayos de células tumorales individuales del paciente. Los tratamientos específicos se podrían someter entonces a ensayo con la muestra tumoral de la biopsia en cultivo, antes de que comience el tratamiento real del paciente. De este modo, los tratamientos se pueden ajustar individualmente a cada paciente, basándose en las respuestas a los ensayos.

Una propiedad importante de un modelo de cocultivo "inverso" de tejido tumoral/normal organotípico es que puede imitar estrechamente el microentorno tumoral específico de ese paciente. Esto puede ser muy ventajoso para el desarrollo de algunas formas nuevas de tratamiento biológico, tales como la terapia inmune. La finalidad de la terapia inmune es cebar *in vitro* las células inmunes efectoras que pertenecen a los pacientes, tales como linfocitos B, linfocitos T coadyuvantes, linfocitos T citolíticos (CTLs) o linfocitos citolíticos naturales (NK), y a continuación devolver estas células activadas al paciente para dirigir las al tumor y erradicarlo. Los cultivos *in vitro* convencionales no pueden ser tan eficaces como los cultivos organotípicos para cebar las células inmunes efectoras. Una razón potencial de la carencia de activación de las células inmunes efectoras es la presentación ineficaz y/o infructuosa de los antígenos adecuados, específicos del tumor (TSAs). Un modelo de cocultivo "inverso" de tejido tumoral/normal organotípico, podría eliminar este problema. Debido a que reconstruyen de forma fiable el microentorno del tumor *in situ*, los TSAs pueden ser más adecuados para que se expresen en cultivo organotípico; y, por tanto, pueden tener una mayor probabilidad de ser presentados a las células inmunes efectoras.

C. Otras Realizaciones

1. Uso como tipo celular epidérmico donante universal en productos de tejido vivo para la reparación y/o el mantenimiento de tejidos epiteliales adecuados. Un ejemplo de una aplicación es en las úlceras de las venas de la pierna que afectan aproximadamente a 1 millón de personas en los Estados Unidos y a 3 millones en el mundo entero, y otros estados de úlceras tales como las úlceras por diabetes y las úlceras por presión (úlceras por decúbito) que afectan aproximadamente a 10 millones de la población mundial. La línea celular de queratinocitos BC-1-Ep/SL también se podría emplear en una amplia gama de aplicaciones clínicas, por ejemplo, cubrir quemaduras agudas, heridas dermatológicas por cirugía, heridas de la zona donante (para cubrir después de que se recoja la piel para emplearla en otro lugar).

2. El uso incluye el desarrollo y el someter a ensayo agentes empleados en la formulación de productos dermatológicos terapéuticos, cosmético-farmacéuticos y cosméticos, aplicados en forma de crema, loción, líquido y vaporizador. Las células proporcionan una fuente compatible de queratinocitos humanos para someter a ensayo la toxicidad, la potencia y la eficacia de tales agentes. Las células se podrían utilizar en cultivo monocapa para estos ensayos o en cultivos organotípicos. Los cultivos organotípicos se podían utilizar para desarrollar y someter a ensayo los efectos de los agentes sobre la estructura del tejido, la diferenciación, la replicación y el crecimiento celular, la función de barrera y la resistencia del tejido.

3. El uso incluye una célula receptora para el cultivo de agentes biológicos, tales como el papilomavirus humano, de modo que se puedan producir vacunas contra los virus. La línea celular también se podría utilizar para desarrollar y someter a ensayo fármacos y agentes antivíricos. Más de 60 tipos diferentes de papilomavirus humano producen verrugas en humanos, incluyendo las verrugas genitales y las lesiones víricas que están íntimamente asociadas con el desarrollo del cáncer de cuello de útero en las mujeres y del cáncer peneal en los hombres. Los papilomavirus humanos son virus pequeños de ADN bicatenario que están extendidos en la población humana. Son estrictamente epiteliotrópicos e infectan sólo el epitelio cutáneo y mucoso de una variedad de sitios anatómicos. Los papilomavirus humanos se replican sólo en células epiteliales humanas que se han diferenciado.

Ejemplos

1. *Crecimiento y Diferenciación Normales en una Línea Celular de Queratinocitos Humanos Cercanos a Diploides, Inmortalizados de Forma Espontánea, BC-1-Ep/SL*

A. Materiales y Métodos

Cultivo Celular

Los queratinocitos normales (BC-1-Ep) se aislaron a partir de prepucio humano de recién nacido. Los cultivos de queratinocitos se establecieron extendiendo en placas partes alícuotas de una suspensión celular aislada, en presencia de fibroblastos 3T3 de ratón Swiss, tratados con mitomicina C, tal y como describen Allen-Hoffmann y Rheinwald

(1984). El medio de cultivo convencional de los queratinocitos estaba compuesto por una mezcla de medio Ham F12: medio de Eagle modificado con Dulbecco (DME), (3:1, calcio 0,66 mM) suplementado con 2,5% de suero de ternera fetal (FCS), 0,4 $\mu\text{g/ml}$ de hidrocortisona (HC), 8,4 ng/ml de toxina del cólera (CT), 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina (Ins), 24 $\mu\text{g/ml}$ de adenina (Ade), 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 100 unidades de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin (P/S). Las células se sometieron a pases a intervalos semanales, con 3×10^5 células sobre una placa de cultivo de tejidos de 100 mm² con alimentadores. Las células transformadas, BC-1-Ep/SL (línea espontánea), aparecían en el pase 16. Las células BC-1-Ep/SL en el pase 55 eran negativas para el ensayo con micoplasma (Wisconsin State Laboratory of Hygiene, Madison, WI). El EGF humano recombinante se obtuvo gracias a R + D Systems. El factor de crecimiento beta transformante (TGF-(1)) se purificó a partir de plaquetas humanas.

Análisis Cromosómico

Las células en fase de crecimiento logarítmico se detuvieron en metafase con 50 ng/ml de colcemida, a continuación se tripsinizaron y se pipetearon fuera del frasco para centrifugar. Después de retirar los medios y la tripsina, las células se suspendieron en una solución hipotónica de KCl 75 mM, durante 20 minutos, se fijaron con metanol/ácido acético 3:1 tres veces y se gotearon sobre portaobjetos de vidrio. Los portaobjetos maduraron dos semanas, se tripsinizaron ligeramente y se tiñeron con Giemsa (Seabright, 1971). En cada muestra se determinaron mediante análisis fotográfico las identidades cromosómicas y las aberraciones en las metafases con bandas G bien extendidas, y el corte de al menos dos cariotipos para la comparación de banda con banda de homólogos cromosómicos.

Huella Genética del ADN

El ADN se aisló a partir de los queratinocitos empleando el equipo de reactivos de Qiagen QIAamp Blood Kit (Qiagen, Inc., Santa Clarita, CA). El análisis de la huella genética del ADN empleaba el sistema de GenePrint (Fluorescent STR System) de acuerdo con los protocolos recomendados por el fabricante. Las doce parejas de cebadores se dividen en tres cuádruplexos (CTTv, FFFL y GammaSTR). Cada cuádruplexo se amplificaba en reacciones separadas empleando 25 ng de ADN como molde. La amplificación se realizó en un ciclador térmico Perkin-Elmer 9700 (Perkin-Elmer, Corp., Norwalk, CT). Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis sobre geles de poliácridamida de 42 cm x 33 cm x 0,4 mm en un aparato de secuenciación de BRL (Life Technologies, Inc, Gaithersburg, MD). Los geles se escanearon a continuación en un escáner fluorescente FMBIO II de Hitachi.

Crecimiento de las Células BC-1-Ep/SL en Ratones sin Timo

Las células BC-1-Ep/SL se inyectaron en ratones atímicos sin pelo para determinar si podían formar tumores. Una suspensión de 5×10^6 células en 100 μl de Ham F12, se inyectó por vía subcutánea en los costados de seis ratones atímicos. Como testigo negativo, se inyectaron células BC-1-Ep 6° parentales, a 3×10^6 células/100 μl de F12. Como testigo positivo, se inyectaron células SCC4 a 3×10^6 /100 μl de F12. Los ratones se pesaron y los tumores se midieron 26 días después.

Suspensión en Medios Semi-sólidos

Para los estudios de la suspensión, se retiraron cultivos preconfluentes de las placas de cultivo con EDTA 0,5 mM, tripsina al 0,1% y se lavaron en medio que contenía suero para inactivar cualquier tripsina residual. Después de centrifugar brevemente (440 x g durante 3 minutos), las células se resuspendieron en 1×10^6 células/ml en 3 partes de Ham F12 más 1 parte de DME hecho semisólido con 1,68% de metilcelulosa (4.000 centipoises, Fisher Scientific, Fairlawn, NJ), tal y como describen Sadek y Allen-Hoffmann, 1994 (Sadek, C.M. y B.L. Allen-Hoffmann, 1994). Las células se recuperaron de la suspensión mediante dilución repetida con medio exento de suero y centrifugación (440 x g durante 10 minutos). Después de un aclarado con solución salina tamponada con fosfato (NaCl 0,137 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM; KH₂PO₄ 1,4 mM; pH 7,2) (PBS), las células se resuspendieron en PBS (pH 7,2) para someter a ensayo la formación de CE o se lisaron en tampón SLS (Tris 50 mM; EDTA 10 mM, pH 8,0; 0,5% (p/v) de lauroil-sarcosina sódica) para determinar la fragmentación del ADN. Los testigos de control consistían en queratinocitos adherentes tratados durante un tiempo similar en 3 partes de Ham F-12 más 1 parte de DME.

Análisis Northern

Las células crecieron en medio de cultivo convencional de queratinocitos sobre una capa alimentadora 3T3. La capa alimentadora se retiró 24 horas antes de aislar el ARN con EDTA al 0,02% en PBS. El ARN poli A⁺ se aisló a partir de células en crecimiento logarítmico, tal y como se ha descrito previamente (Sadek y Allen-Hoffmann, 1994). El ARN poli A⁺ se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,2% que contenía formaldehído y se electrotransfirió a una membrana de Zeta-Probe (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). La membrana se prehibridó y a continuación se hibridó en presencia de una sonda de ADNc marcada con [³²P]-dCTP de cebador aleatorio, tal y como recomienda el fabricante. Las sondas de ADNc empleadas para la detección incluyen gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de rata, pGPDN5 (Fort, y col., 1985), TGF- β 1 de mono (Sharples y col., 1987), receptor de EGF (Xu y col., 1984), queratina 14 de ratón (regalo de Dennis Roop), TGF- α (Kudlow, y col., 1988) y un fragmento 5' de 830 pb de c-myc humano (Miyamoto, y col., 1989).

ES 2 267 277 T3

Formación del Estrato Córneo (CE)

Los queratinocitos se retiraron de las placas de cultivo y se recuperaron de la suspensión tal y como se ha descrito anteriormente. Se hizo un recuento de las células de cada tratamiento y se resuspendieron por triplicado 10^6 células/ml en PBS (pH 7,2) que contenía 1% de SDS y ditiotreitól 20 mM. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos en un baño de agua y se enfriaron hasta temperatura ambiente. Se añadió ADNasa ($0,5 \mu\text{g/ml}$) y se hizo un recuento del CE empleando un hemocitómetro. La formación de CE se calculó como el porcentaje de células de entrada.

Análisis de la Fragmentación del ADN Nucleosómico

El ADN se aisló y se marcó tal y como se ha descrito previamente (Sachsenmeier y Allen-Hoffmann, 1996). Brevemente, se lisaron $2,5 \times 10^6$ células en $500 \mu\text{l}$ de Tris 50 mM, EDTA 10 mM pH 8,0 y 0,5% (p/v) de lauroil-sarcosina sódica. El material lisado se extrajo con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v:v:v) y se precipitó con etanol. El ADN se disolvió en $20 \mu\text{l}$ de tampón TE, pH 8,0 y se cuantificó por absorción a 260 nm. El ADN intacto y fragmentado se marcó en el extremo 3' con [$\alpha^{32}\text{P}$]-ddATP empleando la didesoxi-nucleotidil-exotransferasa terminal, tal y como han descrito Tilly y Hsueh (1993). La mitad de cada muestra marcada se cargó en un gel de agarosa al 1,5% y se sometió a electroforesis. Los geles se secaron con calor empleando un Easy Breeze SE 1200 (Hoefler Scientific, San Francisco, CA) y se expusieron a una película Biomax MR de Kodak.

Formación de Cultivos Organotípicos

Los cultivos organotípicos se dejaron crecer tal y como se ha descrito previamente (N. Parenteau, 1994). Se formó una balsa de colágeno mezclando los fibroblastos neonatales humanos normales, CI-1-F, con el colágeno de tipo I en 10% de FCS + F12 + penicilina/estreptomina. Las balsas se dejaron contraer durante 5 días. Las células parentales, BC-1-Ep (5°) y las células BC-1-Ep/SL (38°) se extendieron en placas sobre las balsas con $3,5 \times 10^5$ células en $50 \mu\text{l}$ de 0,2% de FCS + 3 F12:1 DME + HC + Ade + Ins +CT +P/S que contenía calcio 1,88 mM. Se permitió que las células se fijaran durante 2 horas antes de añadir 13 ml de medios (Día 0). Los Días 1 y 2, las células se realimentaron. El Día 4, las células se alzaron a la interfaz de aire con almohadillas de algodón y se cambiaron al medio de queratinización (2% de FCS + 3 F12:1 DME + HC + Ade + Ins + CT + P/S que contenía calcio 1,88 mM). Las células se alimentaron en el medio de queratinización cada 3 días. El Día 15, se fijaron las balsas con fijador de Karnovsky modificado de nuevo aporte, que constaba de 3% de glutaraldehído y 1% de paraformaldehído en tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,4, a temperatura ambiente durante 3 horas. Antes de eliminar los medios de cultivo, se añadió suavemente a las células el fijador en la parte superior de la balsa para evitar que las capas córneas se alejaran flotando. Posteriormente, se aspiraron los medios de cultivo y los pocillos del cultivo se llenaron con fijador. La balsa se cortó por la mitad, procesando una mitad para microscopía óptica y la otra mitad para microscopía electrónica.

Corte del Tejido

Las ratas fijadas se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones y se tiñeron con hematoxilina y eosina en "Surgical Pathology", University Hospital, Madison, WI. Las secciones teñidas se visualizaron y se fotografiaron empleando un microscopio Olympus IX-70, equipado con una cámara de 35 mm.

Microscopía Electrónica

Los cultivos fijados se lavaron 3 veces con tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,4. Bajo un microscopio de disección, se empleó un escalpelo para separar la malla de poliéster que sujetaba el cultivo de la balsa, del inserto de plástico. La balsa se cortó con un escalpelo en trozos de aproximadamente 2 mm x 4 mm que se almacenaron durante una noche en tampón. Después de la fijación posterior con tetróxido de osmio al 1% a 4°C , se lavaron 4 veces los queratinocitos, 15 minutos cada uno con ácido maleico 0,1 M, pH 6,5, antes de la tinción en bloque con acetato de uranilo acuoso al 2%, durante 1 hora. Después de lavar con agua destilada, los queratinocitos se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol, 100% de óxido de propileno y se infiltraron con 1:1 de óxido de propileno:eponato, durante una noche. Las balsas se incluyeron en eponato de nuevo aporte en moldes planos para inclusión y se orientaron de modo que se pudieran cortar perpendicularmente sobre un ultramicrotomo de Reichert Ultracut E3, equipado con una cuchilla de diamante. Las secciones finas se tiñeron con citrato de plomo y se examinaron en un microscopio electrónico de Hitachi H-7000 (Hitachi, San José, CA) que funcionaba a 75 kV.

Transfección del Cultivo Celular

Para los experimentos de transfección, se extendieron en placas las células BC-1-Ep/SL, con una densidad de 3×10^5 células, sobre fibroblastos 3T3 de ratón Swiss tratados con mitomicina-C, en placas de 100 mm. Se permitió que las células se adhirieran durante 48 horas, y a continuación se retiró la capa de 3T3 con EDTA 0,5 mM. Las células se lavaron dos veces con DME y se añadieron medios que contenían suero. Las células se transfectaron 24 horas más tarde.

ADN Plasmídico

El ADN plasmídico se preparó con el equipo de reactivos de Endotoxin Free Maxiprep Kit (Qiagen). pGreen-Lantern se linealizó empleando XmnI. pcDNA3 neo y pTracer-SV40 (Invitrogen) se linealizaron empleando BgIII

(Promega). La expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) está dirigida por un promotor de CMV constitutivamente activo en ambos plásmidos, pGreenLantern y pTracer-SV40.

Determinación de las Condiciones Óptimas para la Transfección de las Células BC-1-Ep/SL

5

Los pases 30^o-40^o de las células BC-1-Ep/SL se transfectaron empleando el lípido policationico GeneFECTOR (VennNova). La mezcla de la transfección se realiza añadiendo 20-33 μg de ADN plasmídico linealizado, a 500 μl de agua Milli-Q esterilizada por cada placa de 100 mm. Se añadieron diferentes cantidades de GeneFECTOR, dependiendo de la relación de ADN total con GeneFECTOR, que variaba desde 1:2 hasta 1:4. La mezcla de la transfección se dio vueltas suavemente y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se retiraron los medios de las células BC-1-Ep/SL, las placas se lavaron dos veces con DME y se alimentaron de nuevo con 5 ml de DME. La mezcla de la transfección se añadió a cada placa mediante goteo, y las células se incubaron durante 5 horas a 37°C, con CO₂ al 5%. El medio se retiró y las células se lavaron dos veces con DME y se alimentaron de nuevo con medios que contenían suero. Las células se observaron 24 horas después de la transfección con un microscopio fluorescente invertido IX-70 (Olympus) equipado con un filtro de banda corta para GFP, para comprobar el éxito de la transfección antes de realizar el análisis o la citometría de flujo (FACS).

Eficacia Óptima de la Transfección Transitoria

20

Los pases 30^o-40^o de las células BC-1-Ep/SL se transfectaron empleando el lípido policationico de GeneFECTOR (VennNova). La mezcla de la transfección se preparó añadiendo 15 μg de pGreenLantern linealizado y 5 μg de pcDNA3neo (20 μg de ADN total) a 500 μl de agua estéril MilliQ, para cada placa de 100 mm de células. A continuación se añadió GeneFECTOR en una cantidad tres veces mayor que la del ADN total (relación 1:3 del ADN con GeneFECTOR). La mezcla de la transfección se dio vueltas suavemente y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los medios se retiraron de las células BC-1-Ep/SL, las placas se lavaron dos veces con DME y se alimentaron de nuevo con 5 ml de DME. La mezcla de la transfección se añadió a cada placa mediante goteo y las células se incubaron durante 5 horas a 37°C con CO₂ al 5%. El medio se retiró y las células se lavaron dos veces con DME y se alimentaron de nuevo con medios de queratinocitos. Las células se observaron tal y como se ha descrito previamente.

30

Citometría de Flujo

35

Veinticuatro horas después de la transfección, las células BC-1-Ep/SL se retiraron del cultivo con EDTA 0,5 mM y 0,1% de tripsina. Después de centrifugar brevemente (440 x g durante 5 minutos), las células se suspendieron de nuevo en medio que contenía suero con 2×10^6 células /ml, 500 μl de esta suspensión celular se filtraron a través de una malla de 42 μm (Tetko, Inc.) y se tiñeron con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de yoduro de propidio (PI), inmediatamente antes del análisis. Las células BC-1-Ep/SL transfectadas se analizaron en un FACScan o en un citómetro de flujo FACSCalibur (ambos de Becton Dickinson) equipado con un láser ajustado a 488 nm. Se adquirieron diez mil sucesos y se analizaron empleando el programa CellQuest (Becton Dickinson) y el análisis se restringió sólo a sucesos vivos, basándose en la tinción PI. Se obtuvieron datos de la viabilidad celular y de la eficacia de la transfección transitoria.

40

Separación de Células

45

Empleamos el siguiente protocolo para obtener células BC-1-Ep/SL estables que expresaban GFP. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se retiraron empleando EDTA 0,5 mM y 0,1% de tripsina. Después de centrifugar brevemente (440 x g durante 5 minutos), las células se resuspendieron en medio que contenía suero, con una densidad de $5-7 \times 10^6$ células/ml. Esta suspensión se filtró a continuación a través de una malla estéril de 42 μm (Tetko, Inc.). Inmediatamente antes de separar, las células se tiñeron con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de yoduro de propidio. Las células BC-1-Ep/SL transfectadas se separaron en un FACStar Plus (Becton Dickinson) equipado con un láser de argón coherente, ajustado a 488 nm. Los datos de la eficacia de la transfección se obtuvieron con el programa CellQuest (Becton Dickinson). Las células se separaron con una tasa de 2000/segundo y las muestras se recogieron después de la separación para comprobar la viabilidad y la expresión de GFP.

50

Eficacia de la Formación de Colonias

55

Las eficacias de la formación de colonias (EFC) se obtuvieron extendiendo en placas 1000 sucesos sobre placas de 60 mm por duplicado, en presencia de fibroblastos 3T3 de ratón Swiss, tratados con mitomicina C. Después de una semana, las placas se fijaron durante 10 minutos en formalina al 10%, se lavaron con agua corriente y se tiñeron durante una noche con azul de metileno. Las colonias se contaron y se dividieron por el número de sucesos extendidos en las placas, para obtener la EFC final. Basándose en la EFC calculada, el número total de colonias formadas se obtuvo multiplicando el número de sucesos por la EFC. Las colonias que expresaban GFP se contaron 10-12 días después de la separación, empleando un microscopio fluorescente invertido IX-70 con un filtro del paso de banda corta de GFP. El número de colonias que expresaban GFP se dividió por el número total de colonias formadas, para obtener una eficacia de la formación de colonias que expresan GFP de forma estable.

65

ES 2 267 277 T3

Aislamiento e Identificación de Células BC-1-Ep/SL Transfectadas de forma estable con pGreenLantern

Las células BC-1-Ep/SL se transfectaron con pGreenLantern tal y como se ha descrito anteriormente, y se separaron basándose en la fluorescencia. Inmediatamente después de la separación, las células BC-1-Ep/SL positivas para GFP se reiniciaron en el cultivo. Las células se extendieron en placas con baja densidad, desde $2-3 \times 10^4$ células por placa de 100 mm sobre fibroblastos 3T3 de ratón Swiss, tratados con mitomicina C. Las células se vigilaron cada día empleando un microscopio fluorescente invertido IX-70 (Olympus) con un filtro de paso de banda corta de GFP. Las colonias que no expresaban GFP se retiraron raspando, y las colonias estables que expresaban GFP se dejaron expandir. Cuando las colonias que expresaban GFP habían crecido hasta una densidad estimada de 1000 células o más, se aislaron mediante clonación en anillo y se extendieron de nuevo en placas de 60 mm con 3T3s tratados con mitomicina C en el anillo y se expandieron.

Aislamiento e Identificación de Células BC-1-Ep/SL Transfectadas de forma estable con pTracer-SV40

Las células BC-1-Ep/SL se transfectaron empleando $20 \mu\text{g}$ de pTracer-SV40 y una relación de 1:4 de ADN frente a GeneFECTOR (VennNova). Veinticuatro horas después de la transfección, se retiraron las células con EDTA 0,5 mM, tripsina al 0,1% y se resuspendieron con una densidad de 2×10^6 células/ml en medio que contenía suero. Tres $\times 10^6$ células se volvieron a extender en placas de 100 mm con fibroblastos 3T3 de ratón Swiss, tratados con mitomicina C. Cuarenta y ocho horas después del pase, las células positivas para GFP, se seleccionaron durante 5 días con $250 \mu\text{g/ml}$ de zeocina (Invitrogen). Las células BC-1-Ep/SL estables que expresaban GFP se purificaron empleando una separación estéril de las células y se expandieron tal y como se ha descrito previamente.

Análisis Histológico de Cultivos Organotípicos Transfectados

Las células BC-1-Ep/SL que expresan GFP en el pase 43^o, se extendieron en placas con una densidad de 3×10^5 células/balsa de colágeno y se dejaron crecer en un cultivo organotípico durante 16 días. Los cultivos en balsa se fijaron durante al menos una hora en paraformaldehído al 4% antes de la inclusión en parafina. Se cortaron secciones de $5 \mu\text{m}$ y secciones alternas se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) en "Surgical Pathology", UW-Madison. Las secciones sin H&E se rehidrataron, se tiñeron con $5 \mu\text{g/ml}$ de colorante Hoechst (33258) durante 15 minutos, se deshidrataron y se montaron empleando medios para montar de Cytoseal (Stephens Scientific). Las secciones se observaron y se fotografiaron empleando un microscopio fluorescente invertido IX-70 (Olympus) equipado con un filtro doble de FITC-Hoechst.

Análisis de la Expresión de GFP mediante Microscopía Confocal

Las células BC-1-Ep/SL que expresan GFP en el pase 43^o, se extendieron en placas con una densidad de 3×10^5 células/balsa de colágeno y se dejaron crecer en un cultivo organotípico durante 16 días. Los cultivos de las balsas se fijaron durante una noche en paraformaldehído-PBS al 4% y se lavaron durante una hora en una solución de glicina-PBS 0,1 M a 4°C. Se montaron las balsas completas, se puso un cubre empleando medios para montar de Vectashield (Vector labs) y se selló con adhesivo de caucho. La expresión de GFP se analizó empleando un microscopio confocal láser de barrido (Nikon Diaphot 200) con excitación a 488 nm y detección con un filtro de paso de banda de 500-530 nm. Las imágenes se tomaron a intervalos de $10 \mu\text{m}$, comenzando en la capa queratinizada superior. El microscopio se encuentra en el laboratorio de formación de imágenes neurales W. M. Keck, Universidad de Wisconsin-Madison.

B. Resultados

Aislamiento de la Línea Celular BC-1-Ep/SL

Las células se desagregaron del prepucio de neonato mediante tripsinización. Los queratinocitos se iniciaron en el cultivo extendiendo en placas una parte alícuota de la suspensión celular sobre una capa alimentadora de 3T3 de ratón Swiss tratados con mitomicina C, en un medio de crecimiento convencional de queratinocitos, que contenía calcio 0,66 mM. Los fibroblastos se iniciaron en el cultivo extendiendo en placas una parte alícuota de la suspensión celular sobre una placa de cultivo de tejido que contenía medio Ham F-12 suplementado con suero de ternera fetal al 10%.

Después de aproximadamente 9 días, los cultivos primarios de la cepa BC-1-Ep diseñada a partir de queratinocitos, se crioconservaron y se subcultivaron sobre una capa alimentadora. Los cultivos de fibroblastos se dejaron crecer hasta casi confluencia y también se crioconservaron. En los pases iniciales, las células BC-1-Ep no mostraban características morfológicas o de crecimiento que fueran atípicas de los queratinocitos humanos normales, cultivados. Las células BC-1-Ep cultivadas mostraban estratificación, así como las características de muerte celular programada.

Para determinar la extensión de la vida replicativa, las células BC-1-Ep se cultivaron en serie hasta senescencia en medio de crecimiento convencional para queratinocitos, con una densidad de 3×10^5 células por placa de 100 mm. En el pase 15, la mayoría de los queratinocitos en la población parecían senescentes, tal y como se podía observar por la presencia de numerosas colonias infructíferas que mostraban células largas y planas.

Sin embargo, en el pase 16, los queratinocitos que mostraban un menor tamaño celular eran evidentes. En el pase 17, sólo los queratinocitos de menor tamaño estaban presentes en el cultivo y no se observaban queratinocitos grandes ni senescentes. La población resultante de queratinocitos pequeños que habían sobrevivido a la crisis, parecían morfo-

lógicamente uniformes y producían colonias de queratinocitos que mostraban características típicas de queratinocitos, incluyendo la adhesión célula-célula y la producción real de escamas.

Los queratinocitos que sobrevivían a la senescencia se cultivaron en serie con una densidad de 3×10^5 por placa de 100 mm, durante 59 pases, mostrando que las células habían adquirido la inmortalidad. Los queratinocitos que surgían de la población original senescente, se denominaron línea BC-1-Ep/espontánea (BC-1-Ep/SL).

Análisis Citogenético y Huella de ADN

El análisis cromosómico se realizó en las células parentales BC-1-Ep, en el pase 3 y en las células BC-1-Ep/SL en los pases 31 y 54. Las células BC-1-Ep parentales tienen un complemento cromosómico normal de 46, XY. En el pase 31, todas las células BC-1-Ep/SL contenían 47 cromosomas, debido a un isocromosoma extra del brazo largo del cromosoma 8 (Fig. 1). No se detectaron otras anomalías cromosómicas a groso modo o cromosomas marcadores. En el pase 54, todas las células contenían el isocromosoma 8, sin embargo, en una pequeña fracción de la población estaba presente un isocromosoma adicional del brazo largo del cromosoma 1 y un cromosoma marcador (Tabla 1 en el Apéndice 1). Las células BC-1-Ep/SL se escrutaron en busca de la presencia de secuencias de ADN de VIH provírico y se encontró que eran negativas. Las regiones del provirus VIH se amplificaron enzimáticamente, se hibridaron con sondas radiomarcadas de ADN específicas de VIH-1 y el ADN amplificado se separó por tamaño y se visualizó empleando electroforesis en gel de agarosa y se autorradiografió. Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa se compararon por el tamaño y la especificidad en reconocer testigos positivos y negativos de VIH-1. Se determinó la presencia de HPV16 y de 31 secuencias víricas, por análisis de tipo Southern y no se detectó ninguna.

Las huellas de ADN para la línea celular de BC-1-Ep/SL y para los queratinocitos BC-1-Ep eran idénticas en los doce loci. Las probabilidades de que la línea celular BC-1-Ep/SL tenga la huella de ADN de BC-1-Ep parental por probabilidad al azar es 4×10^{-16} . Las huellas genéticas de ED-1-Ep, SCC4 y SCC13y son diferentes de las del patrón BC-1-Ep. Los datos de nuestro análisis de huella de ADN de la línea celular BC-1-Ep/SL muestra que se obtiene de las células parentales BC-1-Ep. Estos datos también muestran que los queratinocitos aislados a partir de otros humanos, ED-1-Ep, SCC4 y SCC13y, no están relacionados con las células BC-1-Ep o entre sí. Los datos de la huella de ADN de BC-1-Ep/SL proporcionan una vía inequívoca para identificar la línea celular BC-1-Ep/SL.

Los Queratinocitos BC-1-Ep/SL no son Tumorigenos en Ratones Atímicos sin Pelo

Para determinar la tumorigenicidad de los queratinocitos BC-1-Ep parentales y de la línea celular de queratinocitos BC-1-Ep/SL inmortal, se inyectaron células en los costados de ratones sin pelo atímicos. La línea celular de carcinoma de células escamosas humanas, SCC 4, se empleó como un testigo positivo para la producción de tumores en ratones sin pelo. La inyección de muestras se diseñó de modo que cada animal recibía una inyección de células SCC 4 en un costado y los queratinocitos BC-1-Ep parentales o las células BC-1-Ep/SL en el costado opuesto. Esta estrategia con inyecciones eliminaba la variación de un animal a otro en la producción de tumores y confirmaba que los ratones mantendrían un fuerte crecimiento de las células tumorigenas. Ni los queratinocitos BC-1-Ep parentales (pase 6) ni los queratinocitos BC-1-Ep/SL (pase 35) producían tumores en los ratones sin pelo. Los resultados del ensayo de la tumorigenicidad se muestran en la Tabla 2, en el Apéndice 1.

Características del Crecimiento in vitro

Los queratinocitos BC-1-Ep/SL no son tumorigenos y muestran características morfológicas de los queratinocitos humanos normales cuando se cultivan en un medio de crecimiento convencional para queratinocitos, en presencia de células de alimentación 3T3 tratadas con mitomicina C. Para evaluar adicionalmente las características del crecimiento de las células BC-1-Ep/SL, examinamos los niveles de ARNm en estado estacionario, de reguladores autocrinos conocidos del crecimiento de queratinocitos. El análisis de tipo Northern de los ARNm procedentes de la línea celular BC-1-Ep/SL, revelaba que la expresión de los factores de crecimiento autocrinos, tales como el factor α de crecimiento transformante (TGF- α) y el factor β de crecimiento transformante (TGF- β), así como los niveles del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y c-myc, eran similares, si no eran idénticos con los queratinocitos BC-1-Ep parentales.

A continuación, determinamos qué constituyentes del medio de crecimiento convencional de queratinocitos son necesarios para un crecimiento óptimo de las células BC-1-Ep/SL. El cultivo en serie, en ausencia de factor de crecimiento epidérmico (EGF) daba como resultado una reducción del 60 al 90% del número de células en cada pase, en comparación con cultivos testigos que contenían EGF (Fig. 1). La dependencia de EGF para el crecimiento de las células BC-1-Ep/SL, parece ser una característica estable. Las células BC-1-Ep/SL en el pase 50 continúan mostrando una dependencia de EGF para un crecimiento óptimo.

Otro factor de crecimiento polipeptídico que tiene un papel importante en la homeostasis epidérmica es el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). *In vitro*, TGF- $\beta 1$ es un inhibidor del crecimiento en queratinocitos humanos normales cultivados (Pientenpol y col., 1990), sin embargo, la transformación maligna de los queratinocitos da frecuentemente como resultado una atenuación de la inhibición del crecimiento inducida por TGF- $\beta 1$ (Bascom y col., 1989; Parkinson y col., 1983; Pientenpol y col., 1990; Rice y col., 1992). De forma similar a los queratinocitos BC-1-Ep parentales normales, TGF- $\beta 1$ inhibe el crecimiento de la línea celular BC-1-Ep/SL (Fig.3). La inhibición del crecimiento inducida con TGF- $\beta 1$ es reversible en los queratinocitos parentales y en los BC-1-Ep/SL.

Para caracterizar adicionalmente los requerimientos para obtener un crecimiento óptimo *in vitro* de los queratinocitos BC-1-Ep/SL, se realizaron cultivos en medio suplementado con suero de ternera fetal al 2,5%, EGF y constituyentes individuales del medio de crecimiento convencional. La Fig. 4 muestra que la adición de insulina de forma aislada, favorece un incremento del número de células en 15 veces. Sin embargo, la adición de todos los constituyentes del medio de crecimiento convencional de queratinocitos favorece un incremento del número de células BC-1-Ep/SL en 30 veces. Estos descubrimientos muestran que la línea celular BC-1-Ep/SL ha mantenido los requerimientos específicos del tipo celular para el crecimiento *in vitro*.

Características de la Diferenciación in vitro

A continuación, investigamos si las células BC-1-Ep/SL tenían una diferenciación normal en cultivo en superficie y en cultivo organotípico. Vigilamos un marcador de la diferenciación escamosa, la formación de estratos córneos (CE). En los queratinocitos humanos cultivados, los estados iniciales del ensamblaje del CE dan como resultado la formación de un estrato córneo inmaduro, compuesto por involucrina, cistatina-a y otras proteínas que representan el tercio más profundo del estrato córneo maduro. Examinamos la formación del CE en las células parentales y en los queratinocitos BC-1-Ep/SL maduros (Tabla 3, Apéndice 1). Menos del dos por ciento de los queratinocitos procedentes de las células parentales adherentes o de la línea celular BC-1-Ep/SL, producían CE. Este hallazgo es compatible con nuestros estudios previos, mostrando que los queratinocitos subconfluentes con crecimiento activo, producen menos del cinco por ciento de CE (Hines y Allen-Hoffmann, 1996). Para determinar si la línea celular BC-1-Ep/SL es capaz de producir CE cuando se induce la diferenciación, se retiraron las células del cultivo en superficie y se colocan en suspensión durante 24 horas, en medio hecho semisólido con metilcelulosa. Muchos aspectos de la diferenciación terminal, incluyendo la expresión diferencial de queratinas (Drozdoff y Pledger, 1993) y la formación del CE (Green, 1977), se pueden activar *in vitro* por la pérdida *in vitro* de la adhesión célula-célula y célula-sustrato de los queratinocitos. Encontramos que los queratinocitos BC-1-Ep/SL producían generalmente más CE que los queratinocitos parentales (Tabla 3 en Apéndice 1). Estos resultados muestran que los queratinocitos BC-1-Ep/SL no son defectuosos en su capacidad para producir esta estructura de la diferenciación, específica del tipo celular.

Las Células BC-1-Ep/SL sufren Apoptosis después de la Pérdida de Adhesión

A continuación, determinamos si los queratinocitos BC-1-Ep/SL sufren apoptosis, sometiendo a ensayo el corte nucleosómico del ADN. El corte específico del ADN en fragmentos oligonucleosómicos es una característica distintiva de la apoptosis (Arends y col., 1990; Wyllie, 1980). Los queratinocitos procedentes de todas las especies estudiadas hasta la fecha, pueden sufrir apoptosis tanto *in vivo* como *in vitro*. Los queratinocitos epidérmicos están predeterminados para eliminar el núcleo y para perder la actividad metabólica como parte de su trayectoria de diferenciación. Existen muchos paralelismos entre la diferenciación terminal de los queratinocitos y la apoptosis. Determinamos la capacidad de los queratinocitos parentales y BC-1-Ep/SL para sufrir el corte del nucleosoma después de la suspensión. Los queratinocitos humanos cultivados normales mostraban características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis, cuando se privaban del contacto célula-célula y célula-sustrato, mediante la suspensión en un medio semisólido. Los queratinocitos adherentes y preconfluentes parentales o de la línea celular BC-1-Ep/SL que crecían en medio exento de suero y de aditivos durante 24 horas, no mostraban una fragmentación detectable del ADN. De forma similar, las células adherentes tratadas durante un periodo de tiempo idéntico con medio semisólido, exento de suero y de aditivos, no mostraban fragmentación del nucleosoma. Cuando se suspendían en medio semisólido, los queratinocitos parentales y los BC-1-Ep/SL mostraban fragmentación del ADN. Estos hallazgos son compatibles con estudios previos de nuestro laboratorio, mostrando que los queratinocitos humanos normales en los que se induce la diferenciación mediante la pérdida de la adhesión, fragmentarán su ADN (Hines y Allen-Hoffmann, 1996a, b; Sachsenmeier y col., 1996). Todos estos datos muestran que los queratinocitos BC-1-Ep/SL son capaces de diferenciarse y de responder normalmente a las señales específicas del tipo celular, para sufrir apoptosis.

Cultivos Organotípicos de Células BC-1-Ep/SL que muestran Diferenciación Escamosa Normal

Para confirmar que los queratinocitos BC-1-Ep/SL pueden sufrir una diferenciación escamosa normal, se cultivaron las células en cultivo organotípico. La diferenciación de los queratinocitos cultivados sobre un sustrato de plástico bajo un medio, favorece el crecimiento y la diferenciación limitada. Específicamente, los queratinocitos humanos se vuelven confluentes, se estratifican y producen una lámina multicapa que es similar al epitelio estratificado. Sin embargo, con microscopía óptica y electrónica se observan grandes diferencias entre la estructura de las láminas multicapas formadas en cultivo de tejidos y en la piel humana intacta. El cultivo organotípico es una técnica para cultivar queratinocitos en condiciones similares a las de *in vivo*. Específicamente, las células se adhieren a un sustrato fisiológico, se incluyen en colágeno fibrilar con fibroblastos dérmicos y se alzan a la interfaz aire-medio, de modo que las células puedan crecer con sus láminas superiores expuestas al aire y con las células basales proliferativas próximas al gradiente de nutrientes proporcionado por difusión a través del gel de colágeno. Con estas condiciones se forma una estructura de tejido correcto.

Comparamos las células parentales BC-1-Ep 5° y la línea celular BC-1-Ep/SL 38°, que habían crecido en cultivo organotípico. Diversas características de una epidermis con diferenciación normal eran evidentes. En las células parentales y en la línea celular BC-1-Ep/SL permanece una capa aislada de células basales cúbicas, en la unión de la epidermis y el equivalente dérmico. La morfología redondeada y la alta proporción de núcleos frente a citoplasmas, es indicativa de una población de queratinocitos que se divide activamente. En la epidermis humana normal, cuando las células basales se dividen, proporcionan células hijas que migran hacia arriba en las capas de diferenciación del tejido.

Las células hijas incrementan su tamaño y se vuelven aplanadas y escamosas. Eventualmente, estas células pierden el núcleo y forman estructuras córneas y queratinizadas. Este proceso normal de diferenciación es evidente en las capas superiores de las células parentales BC-1-Ep y de las células BC-1-Ep/SL. La aparición de células aplanadas y escamosas es evidente en las capas superiores de los queratinocitos localizados por encima de la capa basal y muestra que ha tenido lugar la estratificación. En la parte superior del tejido (A y B), las escamas sin núcleo se exfolian en la parte superior del cultivo. Hasta la fecha, no hemos observado a nivel de microscopio óptico, ninguna diferencia histológica en la diferenciación entre los queratinocitos BC-1-Ep parentales y la línea celular de queratinocitos BC-1-Ep/SL que ha crecido en cultivo organotípico.

Para confirmar nuestras observaciones histológicas, analizamos BC-1-Ep 6° y BC-1-Ep/SL 38°, empleando microscopía electrónica. Un aumento superior nos permitía observar con mayor detalle las estructuras características de la diferenciación normal en los cultivos de balsas. El examen de micrografías nos convenció de que las células BC-1-Ep/SL sufren una estratificación normal en cultivo organotípico. Esto era similar a lo que se había observado con las células BC-1-Ep parentales (datos no mostrados). También observamos la formación de hemidesmosomas en la capa basal, lo que sugiere que la línea celular es capaz de formar estructuras que se encuentran en la epidermis humana normal. Los hemidesmosomas son estructuras especializadas que incrementan la adhesión de los queratinocitos con la lámina basal y que ayudan a mantener la integridad y la resistencia del tejido. Los datos de la microscopía óptica y electrónica muestran que la línea celular BC-1-Ep/SL se puede estratificar y diferenciar de forma normal en cultivo organotípico.

Eficacia de la Transfección Transitoria Óptima de la Línea Celular BC-1-Ep/SL

Escogimos el uso del plásmido pGreenLantern, que contiene el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador de la transfección. La GFP es una proteína no tóxica de la medusa, fluorescente de forma natural que se observa fácilmente cuando se expone a la luz UV. Además, algunos experimentos incluían la cotransfección de pGreenLantern con otro plásmido, pcDNA3neo, que contiene un gen para la resistencia a la neomicina, permitiendo que las células crecieran en presencia de G418. Sin embargo, el uso de G418 como método de selección, puede ser extremadamente tóxico para los queratinocitos y puede matar de forma inadvertida las células transfectadas positivamente. Creemos que la separación de las células de forma estéril, basándose en la expresión de GFP, proporcionará una vía rápida para seleccionar los transfectantes positivos y es el método de selección menos tóxico disponible actualmente.

Se tienen que considerar muchos parámetros para perfeccionar la transfección en este sistema. Los hemos limitado a los tres más esenciales para obtener la máxima eficacia en la transfección. Estos parámetros incluyen la confluencia celular, la cantidad total de ADN (concentración) y la relación del ADN con el reactivo de la transfección (GeneFECTOR). Las transfecciones se completan empleando grupos de parámetros y las células se analizan al día siguiente con un microscopio fluorescente invertido, para estudiar la presencia de expresión de GFP. Además, la citometría de flujo se emplea para obtener información sobre la viabilidad y el número de células positivas para GFP.

La confluencia celular parece ser decisiva para obtener la máxima eficacia en la transfección. Las células BC-1-Ep/SL con niveles variados de confluencia, se transfectaron con un intervalo de 20-25 μg de ADN y se analizaron 24 horas después por citometría de flujo. Las eficacias de la transfección transitoria de diversos experimentos sugieren que una confluencia baja de $5-7 \times 10^5$ células/placa de 100 mm (~30% de confluencia) producirá la mayor eficacia en la transfección en el intervalo de 10-19,5%. Las transfecciones completadas con una confluencia alta, $2-4 \times 10^6$ células/placa de 100 mm (~70% de confluencia), producían eficacias en la transfección mucho menores (Fig. 5).

La concentración óptima de ADN también se sometió a ensayo, empleando cantidades totales de pGreenLantern y pcDNA3neo en el intervalo de 20-33 μg . Todos los otros parámetros se mantuvieron constantes. Encontramos que niveles más elevados de ADN total no producían una mejor eficacia en la transfección. Nuestros datos sugerían que un total de 20 μg de ADN es óptimo para la transfección de las células BC-1-Ep/SL, dando como resultado un intervalo de transfección transitoria de 3,79-13,64% (Tabla 4, en Apéndice 1) (La confluencia celular se incluye en esta tabla para justificar la variabilidad en la eficacia de la transfección entre los experimentos). Observamos que mayores cantidades de ADN provocaban una toxicidad incrementada en las células (citometría de flujo, datos no mostrados).

El tercer parámetro examinado para mejorar la eficacia en la transfección de las células BC-1-Ep/SL, era la relación de ADN con el reactivo de la transfección. Se investigaron diferentes relaciones del ADN con GeneFECTOR, estas incluían 1:2, 1:3, y 1:4. Las eficacias de la transfección transitoria recogidas a partir de experimentos por triplicado, indican que una relación de una parte de ADN por tres partes de GeneFECTOR (1:3) es óptima, con eficacias en la transfección en el intervalo de 10-19,5% (Tabla 5, en Apéndice 1) (La confluencia celular se incluye para justificar la variabilidad en la eficacia de la transfección entre los experimentos). Deducimos que una confluencia celular del 30% ($5-7 \times 10^5$ células/placa de 100 mm), un total de 20 μg de ADN y una relación de 1:3 del ADN con GeneFECTOR son las condiciones para una eficacia óptima en la transfección transitoria de la línea celular BC-1-Ep/SL.

Identificación y Aislamiento de Células Estables BC-1-Ep/SL Transfectadas con GFP

Empleando las condiciones mejoradas para la eficacia en la transfección transitoria, hemos aislado con éxito y obtenido células BC-1-Ep/SL que expresan GFP de forma estable. La expresión estable se define por la integración del gen de GFP en los cromosomas de las células hospedadoras. En observaciones anteriores de células positivas

para GFP transfectadas de forma transitoria, se hacía referencia a que las células más brillantes, las que tenían una mayor expresión de GFP, se podían diferenciar también para mantener la capacidad formadora de colonias cuando se extendían de nuevo en placas en cultivo en superficie. Para someter esto a ensayo, las células se transfectaron y se clasificaron de forma estéril, basándose en la intensidad fluorescente de la expresión de GFP, desde la más oscura a la más brillante. Las células positivas para GFP obtenidas a partir de la clasificación de células, se extendieron en placas y se detectaron las colonias estables y se contaron 10-12 días después de la clasificación. Se observó una variabilidad en la expresión de GFP en estas colonias. Las células más diferenciadas parecen tener una expresión de GFP más brillante. La eficacia de la formación de colonias (EFC) positivas para GFP y estables, se calculó tal y como se ha descrito previamente. Tres experimentos separados de clasificación de células se completaron y se calculó el porcentaje de células positivas estables para GFP que era 3,2%, 4,7% y 5,64%. Se muestra una tabla con las muestras que representa uno de estos experimentos (Tabla 6, en el Apéndice 1). Los datos obtenidos en experimentos por triplicado sugieren que las células con la mayor fluorescencia de GFP parecen tener una eficacia formadora de colonias menor que las células menos fluorescentes con GFP. La EFC positiva para GFP nos permitirá estimar el número de células positivas para GFP que son necesarias para extender en placas para obtener un número razonable de colonias transfectadas de forma estable.

Como resultado de las clasificaciones estériles, fuimos capaces de aislar y expandir diversas líneas de clones, de células BC-1-Ep/SL que expresaban GFP de forma estable. En las líneas que expresan GFP procedentes de los vectores pTracer-SV40 y pGreenLantern se han realizado pases en serie que no muestran cambios visibles en la morfología celular o una disminución de la expresión de GFP.

Transfectantes Estables de Queratinocitos BC-1-Ep/SL que expresan la Proteína Verde Fluorescente muestran una Estratificación Normal en Cultivo Organotípico

Para someter a ensayo la capacidad de las células BC-1-Ep/SL positivas para GFP transfectadas de forma estable para regenerar la estructura de un tejido normal, extendimos en placas estas células en cultivo organotípico. Este tipo de cultivo permite que las células muestren todas las características posibles de la piel intacta en un microentorno tridimensional. Este procedimiento se ha repetido por triplicado y el tejido resultante se ha analizado histológicamente por microscopía fluorescente, así como con microscopía confocal (datos no mostrados). Parece que las células transfectadas de forma estable se diferencian de forma similar a un testigo BC-1-Ep/SL no transfectado. Ambos cultivos muestran una estratificación celular comparable, sin diferencias histológicas identificables a nivel de microscopía óptica. Es interesante que la apariencia de GFP es más intensa en las capas superiores diferenciadas del cultivo. Hemos observado este patrón de expresión con microscopía fluorescente y confocal. Las diferencias en la intensidad de GFP pueden ser el resultado de las variaciones de la cantidad de proteína acumulada en las capas celulares. Alternativamente, el promotor CMV que dirige la expresión de GFP puede que no se vuelva activo hasta que la célula alcance un estado más diferenciado.

2. *Uso de los queratinocitos BC-1-Ep/SL humanos, inmortalizados de forma espontánea en un sistema de cultivo organotípico para un crecimiento modelo de carcinoma de células escamosas humanas*

A. *Materiales y Métodos*

Descripción de los Componentes Celulares

La línea celular BC-1-Ep/SL es una línea celular de queratinocitos humanos, inmortalizados de forma espontánea que mantiene el crecimiento normal de los queratinocitos y las características de la diferenciación. Se aisló empleando métodos convencionales para el crecimiento de queratinocitos primarios, procedentes de muestras de prepucio de neonatos humanos. Los cultivos de queratinocitos se establecieron extendiendo en placas partes alícuotas de una suspensión celular aislada, en presencia de fibroblastos 3T3 de ratón Swiss, tratados con mitomicina C, tal y como describen Allen-Hoffmann y Rheinwald (Rheinwald, J. G. y col., 1981).

Los fibroblastos MW-1-F se aislaron a partir de un neonato humano normal y se cultivaron siguiendo métodos convencionales para la disgregación con tripsina del prepucio de neonato. El cultivo se inició extendiendo en placas una parte alícuota de la suspensión celular disgregada, sobre una placa de cultivo de tejidos que contenía medio Ham F-12 suplementado con suero de ternera fetal al 10%. El segundo pase y los siguientes pases de los cultivos de fibroblastos se emplean como parte del componente no epidérmico del modelo de cultivo organotípico, tal y como se describe a continuación.

La línea celular SCC13y sirve como prototipo de línea celular maligna H&N, para el desarrollo del modelo de cocultivo organotípico. SCC13y se subcultivo a partir de la línea celular SCC13. SCC13 se obtiene a partir de un tumor de la epidermis facial que había vuelto a aparecer después de la radioterapia (Rheinwald, J. G. y col., 1981). Un protocolo de disgregación con colagenasa se empleó para producir una suspensión celular aislada procedente de una biopsia quirúrgica del tumor. La suspensión celular se extendió en placas sobre una capa alimentadora de fibroblastos 3T3 con mitomicina C, para permitir el aislamiento y la expansión del cultivo primario. La línea celular SCC13 se estableció mediante pases continuos en el cultivo y se mantuvo el cariotipo aneuploide del tumor a partir del cual se había obtenido. SCC13y mantiene una capacidad limitada para diferenciarse después de una suspensión en metilcelulosa, una técnica que favorece la expresión de ciertos marcadores de la diferenciación y de estructuras en los queratinocitos normales. Sin embargo, SCC13y es tumorigena en ratones sin pelo (atímicos).

Cultivo Celular

Las células BC-1-Ep/SL se hicieron crecer en medios de crecimiento convencionales para queratinocitos. El medio de cultivo convencional para queratinocitos es una mezcla de Ham F12:medio Eagle modificado con Dulbecco (DME), (3:1, calcio 0,66 mM) suplementado con 2,5% del clon II fetal (FCII es un sustituto del suero de ternera fetal de Hyclone), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (HC), 8,4 ng/ml de toxina del cólera (CT), 5 µg/ml de insulina (Ins), 24 µg/ml de adenina (Ade), 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 100 unidades de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (1% de P/S). Se realizaron pases con las células a intervalos semanales, con 3 x 10⁵ células sobre una placa de cultivo de tejido de 100 mm², con una capa alimentadora de fibroblastos 3T3 de ratón Swiss con la mitomicina C inactivada.

Se mantuvieron cantidades de fibroblastos MW-1-F en DME suplementado con 10% de suero de ternera y se realizaron pases semanales sobre placas de cultivo de tejido de 100 mm².

Se mantuvieron cantidades de la línea celular SCC13y en medio SCC (DME suplementado con 5% de FCII, 0,4 µg/ml de HC y 1% de P/S). Se realizaron pases semanales con las células sobre una placa de cultivo de tejidos de 100 mm², con una capa alimentadora de fibroblastos 3T3 de ratón Swiss con la mitomicina C inactivada.

Formación de Cultivos Organotípicos

Los cultivos organotípicos se dejaron crecer tal y como se ha descrito previamente (Parenteau, N., 1994). Este procedimiento se modificó para permitir el crecimiento de focos tumorales dentro de un equivalente reconstruido de la piel epidérmica/dérmica (Fig. 2). Se formó una base de colágeno mezclando fibroblastos neonatales humanos normales, MW-1-F (5%), con colágeno de tipo I en 10% de FCII+F-12+penicilina/estreptomina. Se dejaron contraer las bases de colágeno durante 5 días. Las células BC-1-Ep/SL (31^o) se extendieron en placas sobre la base de colágeno con 3,5 x 10⁵ células en 50 µl de 0,2% de FCS + 3 F12:1 DME que contenía calcio 1,88 mM + HC + Ade + Ins + CT + P/S. Para los cocultivos de queratinocitos estratificantes y las células malignas, las células SCC13y^{GFP+} se mezclaron con las células BC-1-Ep/SL, con las proporciones de 500, 5000 y 100.000 células SCC13y^{GFP+} frente a 3 x 10⁵ células BC-1-Ep/SL, antes de extender en placas (Fig. 1). Se permitió la fijación de las células durante 2 horas, antes de añadir 13 ml adicionales de medio (Día 0). Los Días 1 y 2 las células se alimentaron de nuevo. El Día 4, se alzaron las células a la interfaz de aire con almohadillas de algodón y se trasladaron a medio de queratinización (2% de FCS + 3 F12:1 DME + HC + Ade + Ins + CT + P/S que contenía calcio 1,88 mM). Las células se alimentaron en el medio de queratinización cada tres días. El día 15, se retiraron los medios y los cultivos organotípicos se fijaron durante una noche con 4% de paraformaldehído y se almacenaron en PBS con glicina 0,1 M.

Vector de Expresión de GFP y Transfección de SCC13y

Un vector de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) humanizado, disponible comercialmente, pGreen-Lantern (Life Technologies, Gaithersburg, Md.) se empleó para marcar genéticamente la línea celular SCC13y. La expresión de GFP está controlada con un promotor de citomegalovirus humano constitutivamente activo, que permite acumular GFP en las células SCC13y transfectadas de forma estable. El plásmido de ADN se preparó a partir de material bacteriano transformado con el vector, empleando un equipo de reactivos de Maxiprep exento de endotoxina (Qiagen).

Para los experimentos de transfección, se extendieron en placas las células SCC13y (pase 60), con una densidad de 1 x 10⁵ células sobre una capa alimentadora de fibroblastos 3T3 de ratón Swiss tratados con mitomicina C, en placas de 6 pocillos. Las células SCC13y se dejaron adherir durante 24 horas y a continuación se retiró la capa de 3T3 con EDTA 0,5 mM. Las células SCC13y se lavaron dos veces con DME y se añadió medio que contenía suero. Las células se transfectaron 24 horas después.

Las células SCC13y (60) se transfectaron empleando el lípido policatiónico GeneFECTOR (VennNova). Las células transfectadas con GFP se denominan en esta memoria SCC13y^{GFP+}. El pase 10, es el primer pase después de la transfección. La mezcla de la transfección se realizó añadiendo 10 mg de pGreenLantern a 200 µl de DME no suplementado en cada pocillo de la placa de 6 pocillos. Se añadieron 30 µg de GeneFECTOR a la solución de ADN hasta tener una relación final de 1:3 de ADN frente a GeneFECTOR y un volumen total de 400 µl. La mezcla de la transfección se agitó suavemente y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se retiraron los medios del cultivo de SCC13y, las placas se lavaron dos veces con DME exento de fosfato y se alimentaron de nuevo con 2 ml de DME no suplementado, exento de fosfato. La mezcla de la transfección se añadió a cada placa por goteo y las células se incubaron durante 3 horas a 37°C en un incubador con 5% de CO₂, agitando cada 30 minutos. El medio se retiró y las células se lavaron dos veces con DME y se alimentaron de nuevo con medio SCC (sin antibióticos). Veinticuatro horas después, se reemplazó el medio por medio SCC suplementado con antibióticos.

Detección con Citometría de Flujo y Cuantificación de la Expresión de GFP

Las células SCC13y se retiraron del cultivo con EDTA 0,5 mM y 0,1% de tripsina, 24 horas después de la transfección. Las células se recogieron por centrifugación (440 x g durante 5 minutos) y se resuspendieron en medio que contenía suero, con una densidad celular de 2 x 10⁶ células/ml y se tiñeron con 5 mg/ml de yoduro de propidio (PI). Se filtraron 500 µl de esta suspensión celular a través de una malla de 42 µm (Tetko, Inc.), inmediatamente antes de

ES 2 267 277 T3

analizar para eliminar los racimos. Las células SCC13y transfectadas se analizaron con un citómetro de flujo FACScan o FACSCalibur (ambos de Becton Dickinson) equipado con un láser de 488 nm. Se adquirieron diez mil eventos y se analizaron empleando el programa CellQuest (Becton Dickinson). Las células no viables, teñidas con PI se excluyeron del análisis. La eficacia de la transfección transitoria o el porcentaje de SCC13y^{GFP+} se calculó como el porcentaje de células SCC13y^{GFP+} viables del número total de células viables. En los experimentos en los que se determina la estabilidad de la expresión de GFP a lo largo del tiempo en poblaciones SCC13y^{GFP+}, se determinó el porcentaje de células que expresan GFP a intervalos de 4 semanas.

Aislamiento e Identificación de Células SCC13y^{GFP+} estables

Después de la transfección, las células SCC13y transfectadas de forma estable se sometieron a pases en serie sobre una placa de cultivo de tejidos de 100 mm². Después de una semana de expansión, estas células se sometieron de nuevo a pases sobre una placa de cultivo de tejidos de 150 mm² y se dejaron crecer durante una semana más. Esto permite la expansión de transfectantes estables, así como la pérdida de la expresión de GFP en los transfectantes transitorios. Las células se retiraron empleando EDTA 0,5 mM y 0,1% de tripsina. Después de centrifugar (440 x g durante 5 minutos), las células se resuspendieron en medio que contenía suero, con una densidad de 5 x 10⁶ células/ml con 5 mg/ml de PI. Esta suspensión se filtró a continuación a través de una malla estéril de 42 µm (Tetko, Inc.) inmediatamente antes de clasificar. Las células SCC13y transfectadas se clasificaron en un FACStar Plus (Becton Dickinson) equipado con un láser de 488 nm de argón coherente. Las células se clasificaron con una tasa de 2000/segundo y las muestras se recogieron después de la clasificación para comprobar la viabilidad y la expresión de GFP. Las células no viables no se recogieron.

Inmediatamente después de la clasificación de las células, las células SCC13y^{GFP+} se reiniciaron en el cultivo. Todas las células obtenidas (típicamente 1-3 x 10⁴) se extendieron sobre placas de 100 mm² con capas alimentadoras de fibroblastos 3T3 de ratón Swiss, tratados con mitomicina C. Las células se vigilaron cada día empleando un microscopio fluorescente invertido IX-70 (Olympus) con un filtro de paso de banda corta de GFP. Las colonias que no expresaban GFP se retiraron raspando las colonias de la placa. La colonia que expresaban GFP de forma estable, crecían hasta una densidad estimada de 1000 células o superior, las células se extendieron de nuevo en placas de 100 mm² con capas alimentadoras 3T3 tratadas con mitomicina C y se expandieron. El porcentaje base de las células SCC13y^{GFP+} en la población se estableció por citometría de flujo, tal y como se ha descrito anteriormente.

Estabilidad de SCC13y^{GFP+} con Cultivo en Serie

Las células SCC13y^{GFP+} se dejaron crecer en medios SCC convencionales bajo las siguientes condiciones. Todas las células crecían por triplicado en 3 pocillos de una placa de 6 pocillos con capas alimentadoras 3T3 con la mitomicina C inactivada. Cada 6º día, se recolectó cada cultivo con tripsina al 0,1% y 1 x 10⁵ células se pasaron a un nuevo pocillo de una placa de 6 pocillos con capas alimentadoras. Los medios se cambiaron dos veces a la semana. Con intervalos de 4 semanas, las muestras se suspendieron en 2 x 10⁶ células/ml y se analizó la expresión de GFP mediante citometría de flujo, tal y como se ha descrito anteriormente.

Crecimiento in vitro de SCC13y^{GFP+}

Los perfiles de crecimiento se determinaron extendiendo 1 x 10⁵ células en pocillos de replicación de placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos, sin capas alimentadoras 3T3 de ratón tratadas con mitomicina C. Los pocillos de replicación para cada muestra se recolectaron diariamente y se determinó el número total de células mediante recuento con un hemocitómetro. Las cantidades promedio de células se sometieron a ensayo para estudiar las diferencias entre el testigo SCC13y (no transfectado) y SCC13y^{GFP+}, empleando un análisis estadístico de ANOVA.

Crecimiento de Células SCC13y^{GFP+} en Ratones Atímicos

La capacidad de las células SCC13y que expresan GFP para crecer como xenoinjertos tumorales, se determinó por inyección de 5-10 x 10⁶ células/100 µl de DME no suplementado en ratones hembras (Harlan-Sprague-Dawley), de 3-4 semanas de edad, atímicos y sin pelo (nu/nu). Cada animal fue inoculado con 1 inyección subcutánea dorsal y 1 ventral, cada una de SCC13y no transfectada y de SCC13y^{GFP+}, respectivamente. El tipo de célula inyectada en cada posición se alternó en ratones alternos. Se examinó un total de 8 ratones, con 1 ensayo de cada línea celular en cada uno. Todos los ratones estaban alojados en instalaciones de investigación acreditadas para animales y las técnicas y los protocolos experimentales habían sido revisados y aprobados por el Comité para el Cuidado de Animales de Ciencias de la Salud de la Universidad de Wisconsin-Madison.

Supervivencia Clonogénica de SCC13y^{GFP+}

La eficacia en la formación de colonias (EFC) se determinó extendiendo en placas una gama de densidades celulares procedentes de cultivos con crecimiento exponencial, en placas de replicación de 6 pocillos que contenían capas alimentadoras 3T3 de ratón, tratadas con mitomicina C. Después de aproximadamente dos semanas de crecimiento en placas de SCC convencionales, las placas se fijaron durante 10 minutos en formalina al 10%, se lavaron con agua corriente y se tiñeron durante una noche con azul de metileno. Las colonias de aproximadamente 50 células se contaron. La EFC se calculó como [(número de colonias contadas)/(número de células sembradas)] x 100%. La EFC media

ES 2 267 277 T3

se determinó para los replicados y se sometieron a ensayo las diferencias entre el testigo SCC13y no transfectado y SCC13y^{GFP+}, empleando el análisis estadístico de ANOVA.

Supervivencia a la Radiación de SCC13y^{GFP+}

5 La supervivencia a la radiación de las células SCC13y y SCC13y^{GFP+} se determinó irradiando cultivos replicados con crecimiento exponencial, con dosis de 0, 1, 3, 6 y 10 Gy. Los cultivos se mantuvieron en un frasco de cultivo de tejido de 25 mm² y que tenía un número total de células de 1-2 x 10⁶ células por frasco cuando se irradiaba con una caja caliente de ¹³⁷Cs, con una tasa de dosis normal de 5,86 Gy/min. Después de la radiación, las células se tripsinizaron, se contaron, se diluyeron y se extendieron en 3-5 placas de 60 mm² sobre capas alimentadoras 3T3 tratadas con mitomicina C, en un intervalo de densidades celulares para permitir la detección del crecimiento de colonias. La eficacia de la formación de colonias se determinó tal y como se ha descrito anteriormente. La EFC media se determinó para los replicados y se sometieron a ensayo las diferencias entre SCC13y no transfectadas y SCC13y^{GFP+} empleando el análisis estadístico de ANOVA.

Análisis Histológico de los Cultivos Organotípicos Transfectados

15 Las células SCC13y^{GFP+} en el pase 9 se extendieron en placas con una densidad de 500, 5000, 100.000 células/colágeno base y se dejaron crecer en un cocultivo organotípico durante 16 días. Los cultivos organotípicos se fijaron durante una noche en paraformaldehído al 4% antes de la inclusión en parafina. Se cortaron secciones (5 μm) y secciones alternas se montaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) en "Surgical Pathology", UW-Madison Hospital, Madison, WI. Las secciones sin H&E, se rehidrataron, se tiñeron con 5 mg/ml de colorante de Hoechst (33258) durante 15 minutos, se deshidrataron y se montaron empleando medios de montaje de Cytoseal (Stephens Scientific). Las secciones se observaron empleando un microscopio fluorescente invertido IX-70 (Olympus) equipado con un filtro doble FITC-Hoechst (470 nm ± 20 y 525 nm ± paso de banda).

Análisis de la Expresión de GFP mediante Microscopía Confocal

30 Las células SCC13y que expresan GFP en el pase 9, se extendieron en placas con una densidad de 500 células/balsa de colágeno y se dejaron crecer en un cultivo organotípico durante 16 días, tal y como se ha descrito anteriormente. Los cultivos organotípicos se fijaron durante una noche en paraformaldehído-PBS al 4% y se lavaron durante >1 hora en una solución de glicina-PBS 0,1 M a 4°C. Los cultivos se montaron, se cubrieron empleando medios de montaje de Vectashield (Vector labs) y se sellaron con adhesivo de caucho. La expresión de GFP se analizó empleando microscopía de barrido confocal con láser (Nikon Diaphot 200) con una longitud de onda de excitación de 488 nm y la detección con un filtro de paso de banda de 500-530 nm. Las imágenes se tomaron a intervalos de aproximadamente 1 μm, comenzando en la capa superior cornificada (Laboratorio de formación de imágenes neurales de W. M. Keck, Universidad de Wisconsin-Madison).

B. Resultados

Eficacia de la Transfección de SCC13y

40 Un objetivo de este conjunto de experimentos era mejorar la eficacia de la transfección de SCC13y. La transfección transitoria se define como la expresión positiva de la estructura artificial transfectada que tiene lugar 48 horas después de la transfección. Había predominantemente tres variables que se examinaron para estudiar un efecto sobre la eficacia de la transfección: la concentración del ADN, la concentración de GeneFECTOR y la densidad celular. La Tabla 7, en el Apéndice 1 resume los porcentajes observados de células GFP⁺ después de la transfección, tal y como se determina por citometría de flujo. La eficacia óptima de la transfección de SCC13y de 21,4% se observó con 10 μg de ADN introducido, empleando una relación de 1:2 de ADN:GeneFECTOR. La densidad celular óptima para la transfección se observó cuando las células estaban en fase de crecimiento exponencial, pero antes de que los cultivos alcanzaran la confluencia. Aunque las células no viables pueden ser transfectantes positivos, estas células se excluyeron del análisis, sacando esta población con el programa de citometría de flujo. En todos los experimentos, el número total de células muertas observadas era bajo en relación con el número total de células analizadas (<8%).

Aislamiento de Poblaciones SCC13y^{GFP+}

55 Empleando las condiciones óptimas de la transfección transitoria, descritas anteriormente, se transfectaron células SCC13y que crecían exponencialmente con el plásmido GFP pGreenLantern y se aislaron las células SCC13y^{GFP+} estables. La transfección estable se define como la expresión positiva para GFP durante un periodo inferior a 4 semanas de cultivo en serie. La expresión de GFP de las células transfectadas de forma transitoria variaba en un intervalo de aproximadamente 2 logaritmos en el histograma de la citometría de flujo y representaba aproximadamente 4% de la población total de células transfectadas. Después de la extensión en placas de las células clasificadas, se observó que colonias individuales de SCC13y^{GFP+} tenían niveles variables de expresión dentro (y entre) las colonias, sin embargo, las colonias mezcladas de GFP⁺/GFP⁻ se observaban raramente. En el tercer pase, un control posterior a la clasificación de las colonias, después de la clasificación de la población SCC13y^{GFP+}, mostraba que aproximadamente el 85% de las células expresaba GFP.

ES 2 267 277 T3

Expresión Estable de GFP en Transfectantes SCC13y^{GFP+}

Las poblaciones reunidas de SCC13y^{GFP+} en el pase 7, muestran un nivel base de expresión de GFP de aproximadamente 1 log más que el ruido de fondo autofluorescente detectado en SCC13y que no expresa GFP.

El porcentaje de las células SCC13y^{GFP+} en la población se encontró que era del 90% empleando el programa de análisis por FACS. Esto se coteja bien con el porcentaje de células GFP⁺ encontradas después de la clasificación en los pases anteriores, descritos más arriba (85%). Las células SCC13y^{GFP+} se definieron como todos los sucesos con una señal de GFP superior a la señal de GFP más alta detectada en células SCC13y no transfectadas y viables. La observación visual empleando microscopía fluorescente confirma que en esta población están presentes pocas o ninguna célula SCC13y que no exprese GFP.

Otro grupo de experimentos ha mostrado que la expresión de GFP en SCC13y es estable durante largos periodos de tiempo. Los histogramas de la expresión de GFP determinados 12 pases después del aislamiento de SCC13y^{GFP+} estables, muestran poco cambio en el porcentaje de GFP⁺ (85%) y la señal de GFP permanece 1 log superior a los testigos que no expresan GFP. La microscopía fluorescente confirmaba que visualmente, 100% de las células son verdes.

El Crecimiento de SCC13y in vitro no está Afectado por la Expresión de GFP

El crecimiento *in vitro* de las células SCC13y^{GFP+} se examinó a continuación para determinar si la expresión de GFP afectaba al crecimiento de SCC13y. Las células SCC13y^{GFP+} y las SCC13y no transfectadas crecían con tasas de crecimiento casi idénticas y alcanzaban un número total de células similar, después de 6 días de crecimiento *in vitro*. Además, ambas líneas celulares mostraban una fase inicial típica de retardo del crecimiento lento, seguido de una fase de crecimiento rápido exponencial.

SCC13y^{GFP+} Permanece Tumorígena

La línea celular SCC13y es maligna y forma tumores en ratones sin pelo. Las células SCC13y^{GFP+} se observaron para determinar si la expresión exógena de GFP altera la capacidad de las células SCC13y para formar xenoinjertos tumorígenos. De los 8 ratones inyectados con ambas líneas celulares, todos los ratones producían un tumor observable en la primera semana después de la inyección. Además, no había ningún tumor que fuera regresivo (vigilado hasta las 8 semanas). Estos experimentos continúan incrementando todos los tumores su tamaño sobre una base semanal, aunque cada tumor no crece necesariamente a la misma velocidad.

Respuesta no Alterada a la Radiación de SCC13y^{GFP+}

La respuesta a la radiación de la línea celular SCC13y está bien caracterizada (Petereit, D. G. y col., 1994). Una dosis de radiación de 6 Gy mata aproximadamente el 99% (2 logs) y 10 Gy mata aproximadamente el 99,9% (3 logs) de las células en crecimiento exponencial. Experimentos similares con células SCC13y que expresan GFP, sobre el mismo intervalo de dosis producían resultados casi idénticos. También, la morfología de las colonias SCC13y^{GFP+} sometidas a este ensayo de supervivencia clonogénico, parece ser similar a la de las células SCC13y no transfectadas. Las colonias no mostraban ninguna diferencia en el tamaño de la colonia o en la densidad celular durante las 2 semanas del periodo de ensayo. Estas observaciones confirman la carencia de un efecto de la expresión de GFP sobre la sensibilidad a la radiación de SCC13y.

El Cocultivo de SCC13y^{GFP+} no altera la Estratificación Normal de los Queratinocitos BC-1-Ep/SL

Las células BC-1-Ep/SL han mostrado previamente que forman una piel totalmente diferenciada en cultivo organotípico⁷. La introducción de un tipo celular maligno en este tejido funcionalmente normal, no parece alterar la capacidad de BC-1-Ep/SL para mostrar una diferenciación escamosa normal. Observaciones del crecimiento de cocultivos de BC-1-Ep/SL y de células SCC13y^{GFP+} identifican una lámina multicapa que es similar al epitelio estratificado. Las células BC-1-Ep/SL continúan mostrando diversas características de la epidermis con diferenciación normal. Se observó que las células basales forman una capa aislada de células cúbicas que permanecen en la unión de la epidermis y el equivalente dérmico. La morfología redondeada y la alta relación de núcleos con citoplasmas indican una población de queratinocitos que se divide activamente. La diferenciación normal es evidente en células que se mueven hacia la superficie de la piel, ya que son aplanadas y se vuelven escamosas y pierden el núcleo en las capas superiores del tejido.

Identificación de Focos 3-D de Tumores en Cultivo Organotípico de Epitelios Estratificantes de SCC13y^{GFP+} y de BC-1-Ep/SL

Para determinar si la línea celular SCC13y^{GFP+} maligna era capaz de formar focos tumorales en un cultivo de queratinocitos predominantemente no malignos, se sembraron cantidades variadas de células SCC13y^{GFP+} sobre un cultivo de queratinocitos BC-1-Ep/SL. Las células SCC13y^{GFP+} se extendieron en placas con 500, 5000 y 100.000 células para 300.000 células BC-1-Ep/SL al inicio del experimento. Después de dos semanas en cultivo, todos los grupos experimentales formaban focos de tumores en crecimiento de células GFP⁺. La mayor concentración de células SCC13y^{GFP+} (100.000 SCC13y^{GFP+} para 300.000 células BC-1-Ep/SL) producía una capa continua de células GFP⁺

que inundaban el crecimiento de las células BC-1-Ep/SL. La microscopía confocal que permite el estudio de los cultivos organotípicos en tres dimensiones, confirmaba la formación de una cantidad de focos tumorales individuales de SCC13y^{GFP+} que crecían en la estructura similar al tejido normal formada por el cultivo organotípico de células BC-1-Ep/SL. Los focos de SCC13y^{GFP+} crecían predominantemente en masas con forma de esfera y contenían no menos de 50 células por foco. De forma interesante, parecía que los focos de células SCC13y^{GFP+} crecían sin estar interrumpidos por las células cocultivadas BC-1-Ep/SL (no verdes), es decir, todas las células SCC13y^{GFP+} de un foco crecían unas contiguas a las otras. Estas observaciones confirman que las células SCC13y malignas se pueden cocultivar con un tejido humano tramado y que la expresión de GFP es un método eficaz de marcación que se puede utilizar para identificar y visualizar incluso los focos tumorales humanos muy pequeños.

Referencias

1. **Allen-Hoffmann**, B. L. y J. G. **Rheinwald**, "Polycyclic aromatic hydrocarbon mutagenesis of human epidermal keratinocytes in culture", *PNAS USA* 81:7802-7806, 1984.

2. **Allen-Hoffmann**, B. L. y S. **Schlosser**, "Normal Growth and Differentiation in a Spontaneously Immortalized Near-Diploid Human Keratinocyte Cell Line", BC-1-Ep/SL, 1998.

3. **Breitkruetz**, D. y col., "Integrin and basement membrane normalization in mouse grafts of human keratinocytes-implications for epidermal homeostasis", *Differentiation* 61(3):195-209, 1997.

4. **Choate**, K. A. y col., "Corrective gene transfer in the human skin disorder lamellar ichthyosis", *Nature Medicine* 2(11):1263-1267, 1996.

5. **Choate**, K. A. y P. A. **Khavari**, "Sustainability of keratinocyte gene transfer and cell survival *in vivo*", *Human Gene Therapy* 8:895-901, 1997.

6. **Drosdoff**, V. y W. J. **Pledger**, *J. Cell. Biol.* 123:909-919, 1993.

7. **Fenjves**, E. S. y col., "Systemic delivery of secreted protein by grafts of epidermal keratinocytes: Prospects for keratinocyte gene therapy", *Human Gene Therapy* 5:1241-1248, 1994.

8. **Fenjves**, E. S., "Approaches to gene transfer in keratinocytes", *J. Invest. Dermatol.* 103(5):70S-75S.

9. **Fort**, P. y col., *Nucl. Acids Res.* 13:1431-1442, 1985.

10. **Garlick**, J. A. y col., "Retrovirus-mediated transduction of cultured epidermal keratinocytes", *J. Invest. Dermatol.* 97:824-829, 1991.

11. **Gerrard**, A. J. y col., "Towards gene therapy for haemophilia B using primary human keratinocytes", *Nature Genetics* 3:180-183, 1993.

12. **Green**, H., *Cell* 11:405-416, 1977.

13. **Greenhalgh**, D. A. y col., "Epidermis: An attractive target tissue for gene therapy", *J. Invest. Dermatol.* 103S:63S-69S, 1994.

14. **Haddow**, A., "Molecular repair, wound healing, and carcinogenesis: tumor production a possible overhealing?", *Adv. Cancer Res.* 16:181-234, 1972.

15. **Hall**, E. J., "Time, Dose, and Fractionation in Radiotherapy", In *Radiobiology for the Radiologist* (Tercera Edición), págs. 239-260, Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1988.

16. **Hines**, M. D. y col., "Keratinocyte growth factor inhibits cornified envelope formation and nucleosomal fragmentation in cultured human keratinocytes", *J. Biol. Chem.* 271:6245-6251, 1996.

17. **Javaherian**, A. y col., "Normal keratinocytes suppress early stages of neoplastic progression in stratified epithelium", *Cancer Res.* 58:2200-2208, 1998.

18. **Kudlow**, J. E. y col., "Transforming growth factor-.alpha. in the mammalian brain", *J. Biol. Chem.* 264:3880-3883, 1989.

19. **Leigh**, I. M. y F. M. **Watt**, "The culture of human epidermal keratinocytes", En (compilado por I. M., B. Lane, F. M. Watt) *The Keratinocyte Handbook*, Cambridge University Press (Cambridge, Gran Bretaña), 1994.

20. **Miyamoto**, C. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7232-7236, 1985.

21. **Parenteau**, N., "Skin Equivalents", En *Keratinocyte Methods*, 1994.

ES 2 267 277 T3

22. **Petereit, D. G. y col.**, “Combining polyamine depletion with radiation therapy for rapidly dividing head and neck tumors: strategies for improved locoregional control”, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 28:891-898, 1994.

23. **Petereit, D. G. y col.**, “The adverse effect of treatment prolongation in cervical carcinoma”, *Int. J. Rad. Biol. Phys.* 32:1301-1307, 1995.

24. **Pietenpol, J. A. y col.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3758-3762, 1990.

25. **Rheinwald, J. G. y col.**, “Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinoma”, *Cancer Res.* 41:1657-1663, 1981.

26. **Sachsenmeier, K. F. y col.**, “Transforming growth factor.β.1 inhibits nucleosomal fragmentation in human keratinocytes following loss of adhesion”, *J. Biol. Chem.* 271:5-8, 1996.

27. **Sadek, C. M. y B. L. Allen-Hoffmann**, “Cytochrome P450IA1 is rapidly induced in normal human keratinocytes in the absence of xenobiotics: A novel suspension-mediated mechanism for CYP1A1 expression”, *J. Biol. Chem.* 269:16067-16074, 1994.

28. **Sharples, K. y col.**, *DNA* 6:239-244, 1987.

29. **Vogel, J.**, “Keratinocyte gene therapy”, *Arch. Dermatol.* 129(11):1478-1483, 1993.

30. **Xu, Y. y col.**, “Human epidermal growth factor receptor cDNA is homologous to a variety of RNAs overproduced in A431 carcinoma cells”, *Nature* 309:806-810, 1984.

Apéndice I

TABLA 1

Aberraciones cromosómicas con pases

El análisis cromosómico se realizó en 20 campos de células BC-1-Ep en el pase 3 y de células BC-1-Ep/SL en los pases 31 y 54.

| Pase nº | Campos | 46, XY | 47, XY + i(8q) | 48, XY + i(1q) + i(8q) | 48, XY + i(8q) + mar | 49, XY + i(1q) + i(8q) + mar |
|---------|--------|--------|----------------|------------------------|----------------------|------------------------------|
| 3 | 20 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 31 | 20 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 |
| 54 | 20 | 0 | 17 | 1 | 1 | 1 |

TABLA 2

Tumorigenicidad de las células BC-1-Ep/SL en ratones sin pelo

Para determinar si las células BC-1-Ep/SL formaban tumores, se inyectaron las células por vía subcutánea en los costados de seis ratones sin pelo, a 5×10^6 células/100 μ l de F12. Como testigo negativo, se inyectaron células BC-1-Ep/SL del 6º pase en los costados de seis ratones sin pelo, a 3×10^6 células/100 μ l de F12. Como un testigo positivo, se inyectaron células SCC4y del pase 20º en los costados de cuatro ratones sin timo. Los ratones se pesaron y los tumores se midieron 26 días después.

La estrategia de las inyecciones se muestra a continuación.

| Animal nº | Situación | Peso corporal (g) | Área del tumor (mm ³) |
|-----------|--|-------------------|-----------------------------------|
| 1 | Costado izquierdo = 6º BC-1-Ep derecho = 35º BC-1-Ep/SL | 22 | - - |
| 2 | izquierdo = 6º BC-1-Ep derecho = 35º BC-1-Ep/SL | 24 | - - |
| 3 | izquierdo = 20º SCC4y derecho = 35º BC-1-Ep/SL | 21 | 105,2 |

ES 2 267 277 T3

TABLA 2 (continuación)

| Animal nº | Situación | Peso corporal (g) | Área del tumor (mm ³) |
|-----------|--|-------------------|-----------------------------------|
| 4 | izquierdo = 6° BC-1-Ep derecho = 20° SCC4y | 25 | - 1183,6 |
| 5 | izquierdo = 6° BC-1-Ep derecho = 35° BC-1-Ep/SL | 23 | - |
| 6 | izquierdo = 6° BC-1-Ep derecho = 35° BC-1-Ep/SL | 22 | |
| 7 | izquierdo = 20° SCC4y derecho = 35° BC-1-Ep/SL | 22 | 51,3 |
| 8 | izquierdo = 6° BC-1-Ep derecho = 20° SCC4y | 19 | - 463,3 |

TABLA 3

Formación de estratos córneos en células BC-1-Ep/SL

Se dejaron crecer las células BC-1-Ep/SL en presencia de una capa alimentadora 3T3. Los alimentadores se retiraron y 2-3* días después, las células se suspendieron durante 24 h en ~ 10⁶/ml en 3 F12:1 DME + penicilina/estreptomicina que se había vuelto semisólido con 1,68% de metilcelulosa. Las células adherentes se lavaron y se incubaron durante 24 h en 3 F12:1 DME + penicilina/estreptomicina. Los estratos se aislaron hirviendo las células durante 5 minutos en PBS que contenía 1% de SDS y DTT 20 mM, y se hizo un recuento empleando un hemocitómetro.

| | Tratamiento | Adherente | Suspendido |
|---------------|------------------------------------|----------------|----------------|
| Experimento 1 | Parental (*4°) BC-1-Ep/SL (31°) | 1,51% 1,32% | 43,3% 69,8% |
| Experimento 2 | Parental (6°) BC-1-Ep/SL (33°) | 1,79% 1,05% | 32,8% 73,7% |

TABLA 4

Impactos de la concentración de ADN sobre la eficacia de la transfección transitoria en células BC-1-Ep/SL

Las células BC-1-Ep/SL se transfectaron con el plásmido pGreenLantern (Gibco) que contenía GFP y con pcDNA3neo (Invitrogen) con diversas cantidades del ADN descrito a continuación. La relación de ADN con el GENELECTOR se mantuvo constante en 1:4. La eficacia de la transfección se obtuvo empleando FACS. El número de células se determinó por tripsinización y el recuento de los queratinocitos empleando un hemocitómetro.

| Concentración de ADN | 8/26/97% de GFP + Células | 12/16/97% de GFP + Células | 12/22/97% de GFP + Células |
|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 15 µg de pGL + 5 µg de pcDNA3 | 3,79% | 13,64% | 9,88% |
| 20 µg de pGL + 6,7 µg de pcDNA3 | 3,2% | 5,25% | 8,85% |
| 25 µg de pGL + 8,3 µg de pcDNA3 | 1,98% | 12,49% | 3,33% |
| Confluencia celular | 70% | 35-40% | 35-40% |

ES 2 267 277 T3

TABLA 5

La relación del ADN frente a GeneFECTOR afecta a la eficacia de la transfección transitoria

5 Las células BC-1-Ep/SL se transfectaron con relaciones variantes de ADN plasmídico (pGL + pcDNA3neo) frente al reactivo de la transfección (GeneFECTOR). La concentración de ADN se mantuvo constante en 15 µg de pGreen-Lantern y 5 µg de pcDNA3neo. La eficacia de la transfección se obtuvo empleando FACS. El número de células se determinó mediante tripsinización celular y recuento con hemocitómetro.

| | | | | |
|----|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 10 | Relación del ADN frente a GeneFECTOR | 1/30/98% de GFP + Células | 2/20/98% de GFP + Células | 2/20/98% de GFP + Células |
| | 1:2 | 4,74% | 15,2% | 6,94% |
| 15 | 1:3 | 7,23% | 17,54% | 19,36% |
| | 1:4 | 3,3% | 7,95% | 16,99% |
| 20 | Confluencia celular | 50% | 30% | 30% |

TABLA 6

Transfección estable de las células BC-1-EP/SL empleando pGreenLantern

25 Las células BC-1-Ep/SL se transfectaron con pGreenLantern y pcDNA3 empleando parámetros óptimos de la transfección transitoria. Veinticuatro horas después de la transfección, se suspendieron los queratinocitos con una densidad de 4-6 x 10⁶/ml y se tiñeron con 5 mg/ml de yoduro de propidio. Las células BC-1-Ep/SL se clasifican de forma estéril en cuatro categorías que se basan en la intensidad de la fluorescencia de GFP. La eficacia de la formación de colonias se calculó haciendo el recuento del número de colonias formadas a partir de mil células extendidas en placas por p60. Las colonias positivas para GFP se contaron empleando un microscopio fluorescente invertido con un filtro de banda corta de GFP. Esta tabla representa un experimento de clasificación de las células.

| | | | | | | |
|----|---------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|----------------|-----------------------------------|
| 35 | Intensidad de la fluorescencia de GFP | Acontecimientos clasificados | Eficacia de la formación de colonias | Total de colonias formadas | GFP + colonias | % de GFP + formadores de colonias |
| 40 | Más brillante | 63,375 | 0,13% | 83 | 0 | 0,0% |
| | Brillante | 54,802 | 0,38% | 208 | 4 | 1,9% |
| | Oscura | 37,161 | 0,86% | 319 | 6 | 1,9% |
| 45 | Más oscura | 62,432 | 0,34% | 212 | 2 | 0,9% |
| | | | | | Total | 4,7% |

TABLA 7

Porcentaje de transfección

| | | | | | |
|----|--------------|---------------------------------------|------|------|-------|
| 55 | [GeneFECTOR] | Porcentaje de confluencia en la placa | | | [ADN] |
| | | 60% | 75% | 100% | |
| 60 | 1 µg | 1,6 | 1,9 | 1,4 | 1 µg |
| | 2 µg | 4,6 | 4,4 | 2,7 | 1 µg |
| | 10 µg | 9,9 | 9,7 | 8,0 | 10 µg |
| | 20 µg | 10,4 | 21,4 | 13,3 | 10 µg |

65

REIVINDICACIONES

1. Una línea celular humana inmortalizada de queratinocitos, en donde la línea celular es ATCC CRL 12191 y que comprende un complemento cromosómico normal de 46 con la excepción de un isocromosoma extra en el brazo largo del cromosoma 8.
2. La célula humana inmortalizada de queratinocito de la reivindicación 1, transfectada con un gen heterólogo.
3. La línea celular de la reivindicación 2, en donde el transgen es un gen marcador.
4. La línea celular de la reivindicación 3, en donde el gen marcador codifica la proteína verde fluorescente.
5. La línea celular de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las células están en un cultivo monocapa.
6. Las líneas celulares de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las células están en un cultivo organotípico.
7. Un método para evaluar compuestos del ensayo en cuanto a su toxicidad en humanos que comprende las etapas de:
- (a) exponer el compuesto del ensayo a la línea celular de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes; y
 - (b) evaluar el efecto del compuesto sobre la línea celular.
8. Uso *in vitro* de una línea celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para el desarrollo o el ensayo de un agente en un producto terapéutico, cosmético-farmacéutico o cosmético para la piel.
9. Un método para someter a ensayo el efecto de un agente modulador de las células tumorales del ensayo que comprende las etapas de:
- (a) obtener un cultivo de células epiteliales estratificadas humanas, en donde el cultivo comprende células epiteliales escamosas malignas y queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente de una línea celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y en donde este cultivo forma una epidermis reconstruida;
 - (b) tratar la epidermis con un agente terapéutico de células tumorales del ensayo; y
 - (c) evaluar las células malignas en la epidermis.
10. El método de la reivindicación 9, en donde las células malignas están marcadas genéticamente.
11. El método de la reivindicación 10, en donde el marcador genético es una proteína verde fluorescente.
12. El método de la reivindicación 11, en donde la medición del crecimiento de las células malignas es por citometría de flujo.
13. El método de la reivindicación 9, en donde los queratinocitos humanos están marcados genéticamente.
14. El método de la reivindicación 13, en donde el marcador es una proteína verde fluorescente.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en donde la etapa de evaluación (c) es la del crecimiento celular.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en donde la etapa de evaluación (c) es la del tamaño o la forma celular.
17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16, en donde las células malignas se aíslan a partir de tejidos de pacientes individuales.
18. Un cultivo organotípico que comprende una combinación de queratinocitos humanos inmortalizados depositados con el número de orden ATCC CRL 12191 y de células de carcinomas de células escamosas (SCC) humanas.
19. El cultivo de la reivindicación 18, en donde las células SCC se transfectan con un gen que codifica una proteína verde fluorescente.
20. El cultivo de la reivindicación 18 o 19, en donde las células SCC se han aislado a partir de tejidos de pacientes individuales.

ES 2 267 277 T3

21. El cultivo de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, que comprende adicionalmente una capa basal de colágeno y fibroblastos.

5 22. Uso de una línea celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la fabricación de un medicamento para uso en la reparación o el mantenimiento de tejidos epiteliales.

23. Uso según la reivindicación 22, para emplear en el tratamiento de úlceras, para cubrir quemaduras agudas, heridas dermatológicas por cirugía, heridas de la zona donante.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

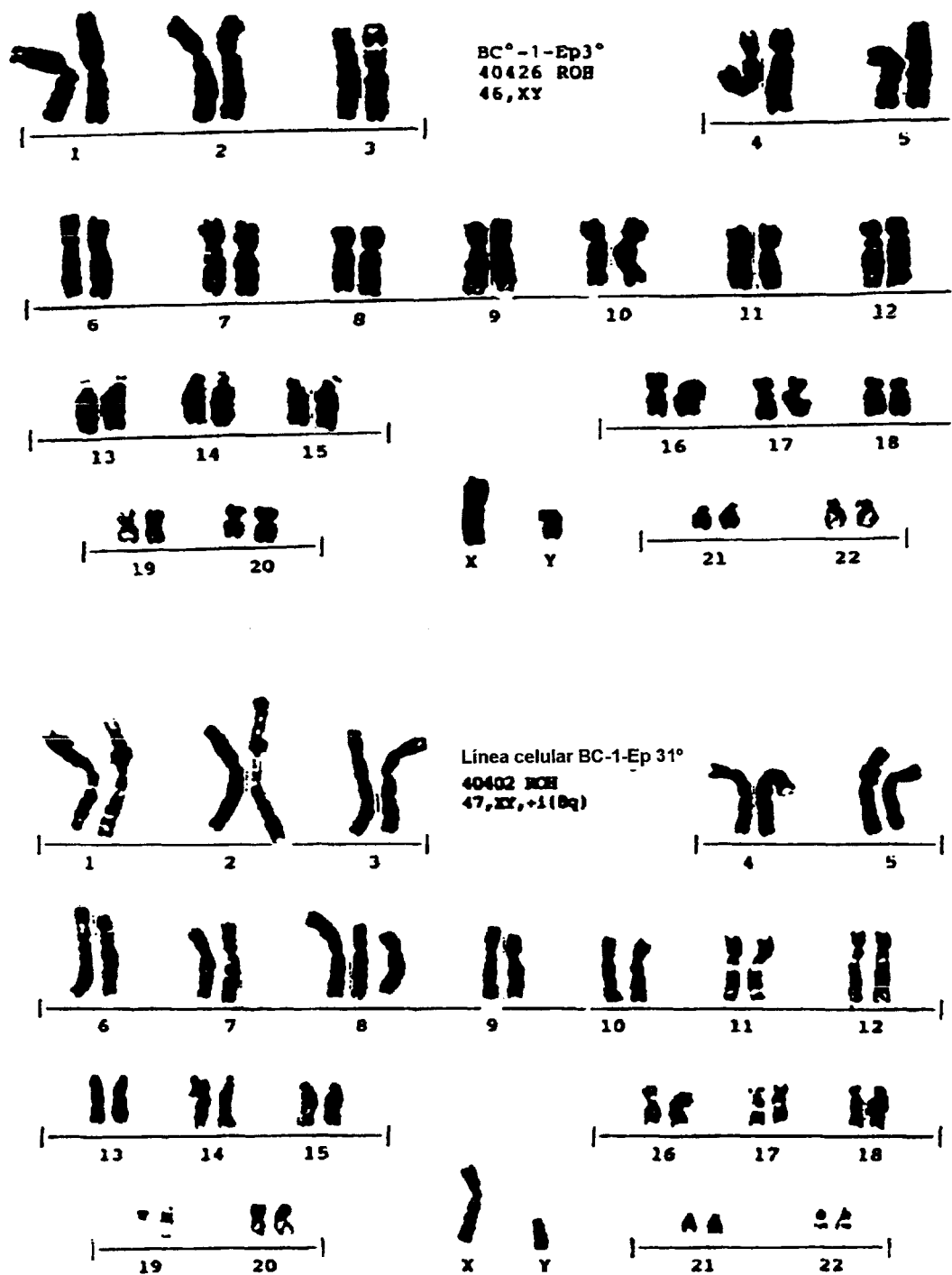


FIG. 1

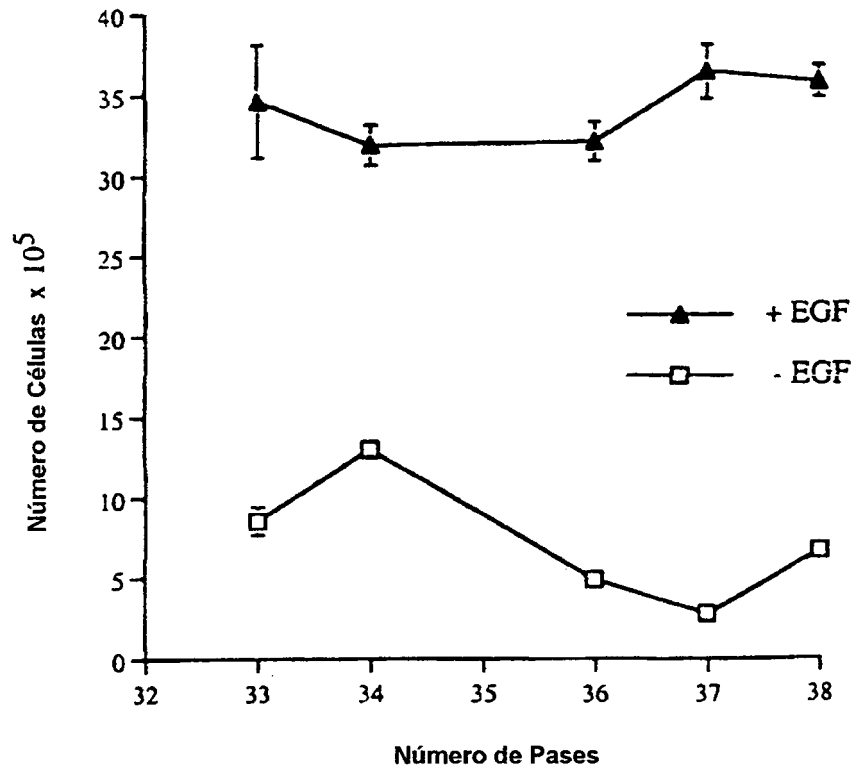


FIG. 2

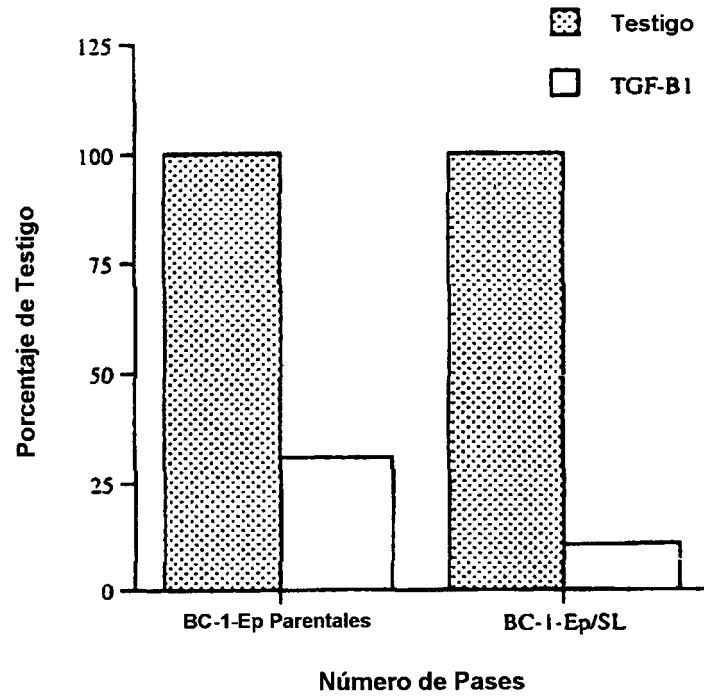


FIG. 3

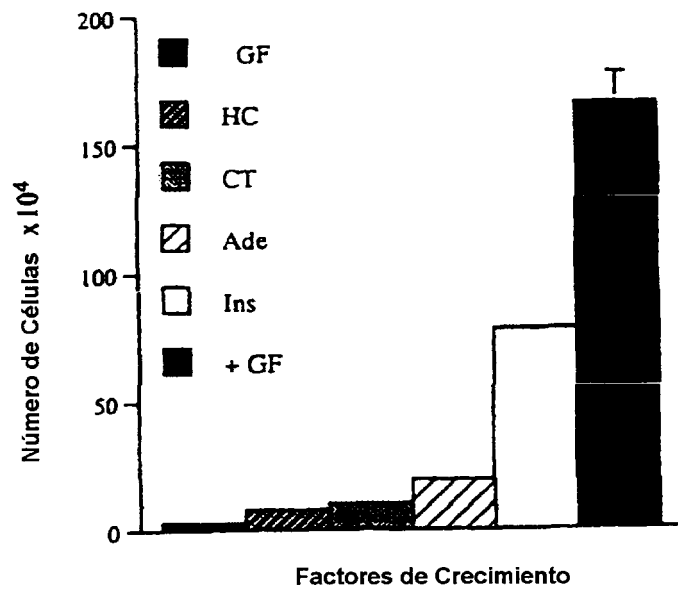


FIG. 4

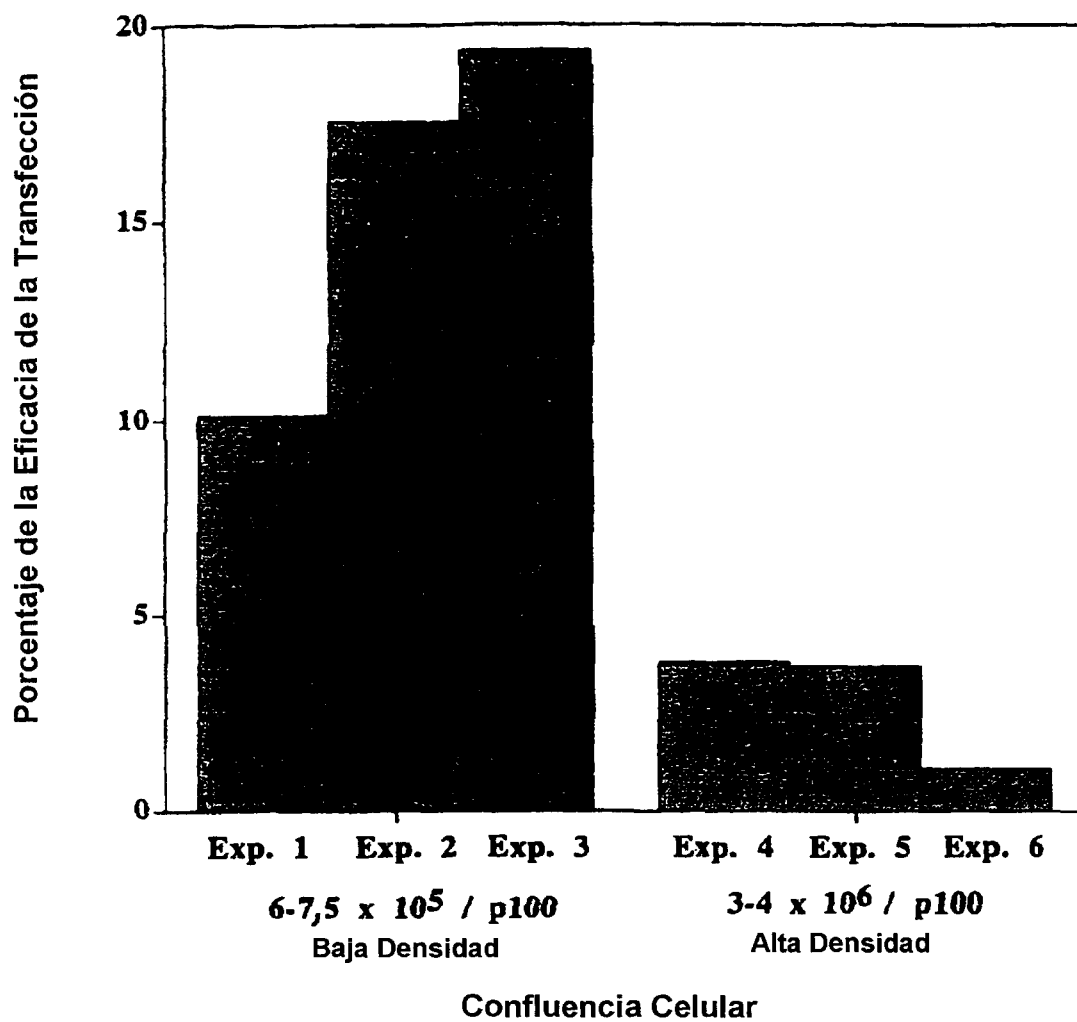


FIG. 5

A: Esquema de la Piel Humana

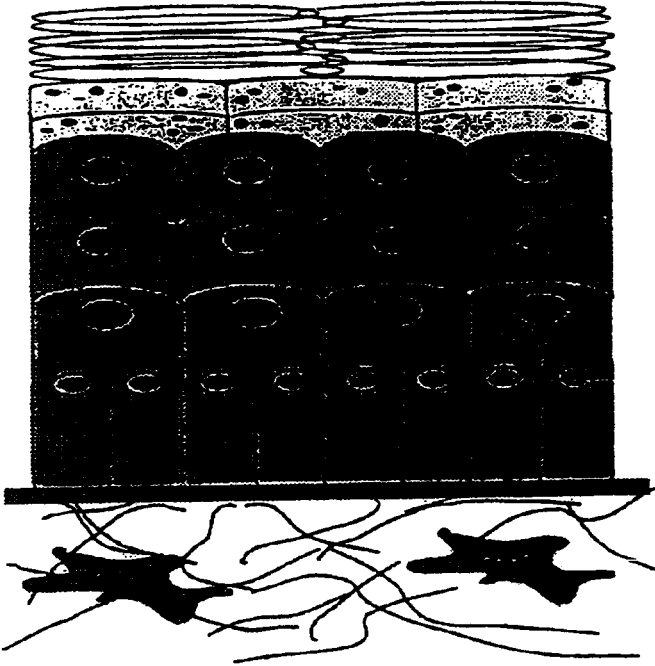
Epidermis

CÓRNEO

ESPINOSO

BASAL

Dermis



B: Cultivo Organotípico

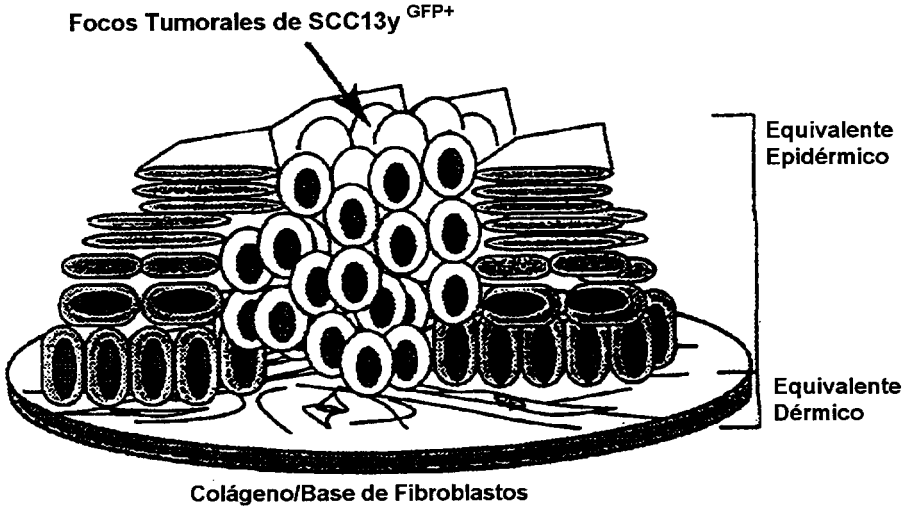


FIG. 6