

(11) Número de Publicação: **PT 1390754 E**

(51) Classificação Internacional:

G01N 33/567 (2006.01) **C12N 5/08** (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) **A61K 31/74** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2002.04.24**

(30) Prioridade(s): **2001.04.24 US 286169 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.02.25**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.08.01**
109/2007

(73) Titular(es):

WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
614 WALNUT STREET, P.O. BOX 7365
MADISON, WI 53707-7365 **US**

(72) Inventor(es):

B. LYNN ALLEN-HOFFMANN **US**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODO E COMPOSIÇÃO PARA EXERTOS DE PELE**

(57) Resumo:

RESUMO

"Método e composição para enxertos de pele"

É revelada uma pele quimérica compreendendo células de queratinócitos humanos imortalizados co-cultivados com queratinócitos de doador.

DESCRIÇÃO

"Método e composição para enxertos de pele"

Antecedentes do invento

A pele é o maior órgão no corpo humano e funciona como uma barreira protectora contra os agentes no ambiente externo, tais como agentes infecciosos, e como uma barreira à prova de água que mantém a homeostase de fluido e impede a evaporação de humidade dos tecidos. A pele intacta impede a infecção local da derme ou doutros tecidos subjacentes por microrganismos. Se não forem controladas, estas infecções locais podem-se tornar invasivas e podem resultar em sepsia ou infecção sistémica.

A perda temporária de pele resulta frequentemente em mortalidade ou morbidade. A perda generalizada de integridade da pele está muito frequentemente associada com queimaduras graves. A importância da função de barreira da pele é demonstrada pelo facto de, para uma dada idade, a mortalidade estar directamente relacionada com o tamanho da queimadura. Os padrões actuais de cuidados recomendam o recobrimento do paciente tão rápido quanto possível para restaurar a homeostase de fluidos e a função de barreira.

Os pacientes queimados são muito frequentemente recobertos com enxertos de pele autólogos. As técnicas de enxertos de pele autólogos são amplamente utilizadas, mas falham frequentemente. Por exemplo, um paciente com queimaduras extensas pode não ter pele doadora suficiente disponível para cobrir o local receptor.

Estão actualmente disponíveis duas técnicas alternativas principais de salvamento do paciente. Uma é excisar completamente todo o tecido queimado e cobrir o paciente com uma epiderme temporária. A INTEGRA (Johnson and Johnson, New Brunswick, New Jersey) é uma bicamada de neoderme possuindo uma camada interior de colagénio de bovino e sulfato de condroitina-6 e uma camada exterior de silicone. Após angiogénese neodérmica 14 a 21 dias mais tarde, a camada exterior de silicone é removida cirurgicamente e o paciente é recoberto com autoenxertos finos, largamente expandidos. Os autoenxertos finos oferecem a vantagem distinta de permitir a

cicatrização de locais doadores limitados e de serem colhidos em série. Ainda que a comunidade de queimados tenha adoptado a INTEGRA, a susceptibilidade a infecções tem limitado a sua utilização em pacientes com lesões de queimaduras sujas ou infectadas (1). O outro factor limitante principal tem sido a disponibilidade de sítios doadores. Pacientes com lesões de queimaduras catastróficas podem não ter sítios doadores disponíveis suficientes, apesar da vantagem óbvia de requererem autoenxertos muito mais finos.

A segunda técnica habitualmente utilizada é excisar a lesão queimada e proporcionar uma cobertura dérmica/epidérmica temporária de pele de cadáver para restaurar a função de barreira da pele. Queratinócitos autólogos são colhidos e colocados em cultura. O EPICEL (Genzyme Corporation, Cambridge, Massachusetts), o único substituto de pele permanente disponível comercialmente, forma camadas de queratinócitos de 2 a 6 células de espessura ligadas a uma gaze de malha fina. Estes autoenxertos estão disponíveis em 3 a 4 semanas a partir do momento da biopsia. No caso de grandes queimaduras, este calendário coincide muitas vezes com o desenvolvimento de sepsia das lesões de queimaduras. A contaminação bacteriana e outros factores causam taxas elevadas de falência do EPICEL que não são observadas com enxertos de pele de meia espessura tradicionais (2).

Outros avanços no cuidado de lesões de queimaduras podem ter origem no enquadramento da engenharia de tecidos. Uma proposta tem sido restaurar a função de barreira com culturas quiméricas de queratinócitos autólogos misturados com culturas de células alogénicas estabelecidas (3, 4). Isto podia permitir uma cobertura antecipada da lesão diminuindo significativamente o tempo requerido para formação da cultura definitiva. Um recobrimento permanente mais lento da pele ocorreria com queratinócitos autólogos à medida que as células alogénicas são rejeitadas. Um obstáculo importante é a necessidade de uma linha de queratinócitos alogénicos estabelecida, cultivada e testada. Isto tem sido até agora impraticável uma vez que os queratinócitos envelhecem em cultura e teriam de ser continuamente estabelecidas e testadas novas linhas de queratinócitos.

A pele é composta de duas camadas, a derme e a epiderme. A derme é um tecido conjuntivo contendo fibroblastos embebidos numa matriz de colagénio e de fibras elásticas. A epiderme, em contraste, consiste principalmente de células como pouco tecido conjuntivo.

Os queratinócitos são o principal componente celular da epiderme e constituem cerca de 80% das células na pele de um humano adulto. São o componente epidérmico responsável por proporcionar as propriedades de barreira, reparadoras e regenerativas, da pele. O seu nome deriva do seu componente citoesquelético predominante, as queratinas. As queratinas são as subunidades de filamentos de queratina e estão divididas em dois tipos: queratinas do tipo I (ácidas) e queratinas do tipo II (básicas ou neutras). Todos os epitélios exprimem queratinas do tipo I e do tipo II, que variam em peso molecular de 40 kDa a 70 kDa. Tecidos epiteliais diferentes exprimem pares específicos de queratinas. Heterodímeros de queratinas do tipo I e II formam filamentos intermediários que conferem resistência à tracção e suporte estrutural às células e ao tecido epitelial resultante.

A epiderme consiste de quatro camadas morfológica e bioquimicamente distintas. A camada basal de queratinócitos está em contacto com a membrana de base, que separa a epiderme da derme. As células basais são os únicos queratinócitos na pele intacta capazes de mitose e, como tal, são a fonte de todos os outros queratinócitos na epiderme. Ligam-se ao substrato através de hemidesmossomas e a células adjacentes através de desmossomas e junções aderentes (revisto em Jensen e Wheelock, 1996). As células da camada basal são de forma colunar e produzem queratinas K5 e K14.

A primeira camada de queratinócitos suprabasal é o *stratum spinosum*, assim denominado pelo aspecto "espinhoso" dos muitos contactos de desmossoma entre células adjacentes. Os queratinócitos nesta camada já não produzem K5 e K14 mas, em vez disso, sintetizam queratinas K1 e K10 específicas de diferenciação. As células começam a produzir involucrina e transglutaminases específicas de epiderme no *stratum spinosum* superior. Morfológica e bioquimicamente, as células espinhosas são maiores e mais achatadas do que as células basais (revisto em Holbrook, 1994).

A expressão de involucrina está localizada para o citoplasma de células suprabasais e granulares (Mansbridge e Knapp, 1987; Murphy et al., 1984) de pele normal. Foi também mostrado que a involucrina se localiza pericelularmente nestas camadas, mas tecidos utilizados para estas experiências de imuno-histoquímica não foram fixados, e colocou-se a hipótese de a proteína se difundir para as fronteiras celulares durante ou após o processo de seccionamento (Smola et al., 1993; Watt, 1983).

As transglutaminases são uma família de enzimas dependente de cálcio que catalisa a reticulação covalente de proteínas umas às outras ou a poliaminas (revisto em Rice et al., 1994). A isozima transglutaminase de queratinócito, TG_K, está ligada à membrana na epiderme suprabasal e catalisa a reticulação de involucrina e de pelo menos seis outras proteína membranosas para formar o invólucro cornificado (CE, "cornified envelope") (revisto em Rice et al., 1994). O CE é uma estrutura de proteína insolúvel altamente estável formada por baixo da membrana plasmática que é resistente a detergentes e a agentes redutores e que confere resistência e rigidez às células diferenciadas terminalmente da camada epidérmica mais elevada. Muitos componentes do CE, incluindo TG_K, são sintetizados no *stratum spinosum* ainda que o invólucro não se forme antes da transição das células do *stratum granulosum* para o *stratum corneum*. A TG_K é também encontrada em todas as camadas subsequentes da epiderme (Michel et al., 1997; Mansbridge et al., 1987; Asselineau et al., 1989). A enzima é inactiva até que, na etapa final de diferenciação, uma perda de integridade da membrana resulta num influxo de cálcio para dentro da célula (Aeschlimann e Paulsson, 1994).

À medida que os queratinócitos se diferenciam ainda mais, formam o *stratum granulosum*. As células desta camada são caracterizadas por grânulos de querato-hialina distintos, densos ao microscópio electrónico, contendo profilagrina, o precursor de proteína da filagrina (revisto em Dale et al., 1994). As células granulares contêm também grânulos cheios com lípido que, durante a zona de transição entre o *stratum granulosum* e o *stratum corneum*, se fundem com a membrana plasmática e libertam o seu conteúdo para o espaço extracelular, conferindo hidrofobia à superfície epidérmica.

À medida que se dá a transição dos queratinócitos em diferenciação da camada granular para a camada cornificada, a profilagrina é clivada para produzir filagrina, que está envolvida no alinhamento e agregação, através de ligações dissulfureto, de feixes de queratina denominados macrofibrilas (revisto em Holbrook, 1994). As macrofibrilas são a unidade estrutural básica do invólucro cornificado. Em secções de pele normal, a filagrina está localizada na camada granular, com alguma coloração continuada desmaiada nas folhas cornificadas (Michel et al., 1997; Asselineau et al., 1989; Mansbridge et al., 1987). Será de notar que os anticorpos contra a filagrina detectam a profilagrina bem como os seus produtos de clivagem, o que contribui para o padrão de coloração pontilhado, forte, dos grânulos de querato-hialina do *stratum granulosum*.

A camada de epiderme mais elevada é o *stratum corneum*. Tendo completado o processo de diferenciação, as células desta camada perderam o seu núcleo e todas as funções metabólicas. Consistem essencialmente de filamentos de queratina revestidos pelo CE agora completo e pela membrana plasmática de revestimento. As células corneais estão ligadas em conjunto por desmossomas modificados e por fim desprendem-se a partir da superfície da pele.

Os queratinócitos produzem também moléculas de adesão de caderina. As caderinas clássicas, caderina-N, caderina-E e caderina-P, são uma subfamília de caderinas que se localizam nas junções aderentes e que medeiam a adesão célula-célula através de interacções homotípicas. Estas glicoproteínas transmembrana dependentes de cálcio desempenham papéis reguladores importantes na formação de tecido e facilitam interacções intercelulares. Pensa-se que complexos de caderina participam também na transdução de sinais intracelulares através da sua associação com o citoesqueleto de actina (Knudsen et al., 1998). Os queratinócitos produzem ambas as caderinas E e P. A caderina-E é encontrada em todas as camadas vivas da epiderme (revisto em Jensen e Wheelock, 1996) enquanto que a caderina-P é encontrada no *stratum basale* e nas células suprabasais imediatas.

A pele regenera-se a cada 28 dias (revisto em Sams, 1996). À medida que os queratinócitos basais perdem contacto com a membrana de base, produzem células filhas que se

diferenciam terminalmente à medida que se movem no sentido ascendente através das camadas suprabasais para a superfície da pele. A diferenciação terminal envolve uma série de alterações bioquímicas e morfológicas que resultam numa camada de escamas achatadas, mortas, que comporta as funções de barreira e de protecção da pele. Estas células cornificadas são regularmente desprendidas e substituídas por células recentemente diferenciadas, mantendo-se o equilíbrio controlado entre proliferação e diferenciação envolvidas na homeostase de tecido.

Cultura de queratinócitos

Células cultivadas isoladas a partir de pele humana desagregada têm sido utilizadas desde há duas décadas para estudar o crescimento e a diferenciação de queratinócitos (revisto em Leigh *et al.*, 1994). Queratinócitos de prepúcio humano cultivados na presença de uma camada alimentadora de fibroblastos de embrião de ratinho 3T3 ou em formulações de meio isento de soro exibem um crescimento retardado durante aproximadamente 80 duplicações de população antes da senescência (revisto em Leigh e Watt, 1994). Queratinócitos humanos cultivados sob estas condições podem exprimir proteínas específicas da diferenciação, tais como involucrina e queratinas K1 e K10, de um modo específico da posição (revisto em Fuchs e Weber, 1994).

Ainda que se observem consistentemente características de diferenciação escamosa e estratificação limitada em monocamadas de queratinócitos cultivados, a arquitectura de tecido normal não é evidente. A constatação de que células epidérmicas em culturas submersas tradicionais crescem optimamente, quando plaqueadas por cima de fibroblastos não proliferantes, foi uma contribuição significativa para o estudo da biologia celular dos queratinócitos (Rheinwald, 1980; revisto em Fuchs, 1993). A utilização deste sistema de cultura permitiu aos investigadores cultivar queratinócitos em série para uma vasta gama de propósitos. Infelizmente, o sistema de cultura submersa permite uma estratificação aberrante, limitada, consistindo de apenas algumas camadas de queratinócitos, a que faltam as características bioquímicas e morfológicas específicas de um verdadeiro epitélio estratificado. Por exemplo, vários marcadores de diferenciação epidérmica normal não são produzidos em cultura

submersa, tais como as queratinas 1 e 10 e o marcador de fase tardia, filagrina (revisto em Fuchs, 1993). Vários factores limitam este sistema *in vitro*. Em primeiro lugar, *in vivo* a epiderme situa-se por cima da derme e recebe os seus nutrientes e sinais de crescimento por difusão a partir da derme através da membrana de base para as células basais sobrejacentes. Isto confere uma polaridade ao tecido que não pode ser conseguida em culturas de células submersas tradicionais que são alimentadas através de todas as superfícies superiores para o meio de banho. Em segundo lugar, células epiteliais cultivadas deste modo não produzem uma membrana de base e não têm exposição aos seus estímulos mesenquimais para diferenciação e crescimento normais (revisto em Fusenig, 1994). Em terceiro lugar, enquanto a camada "alimentadora" de fibroblastos promove a proliferação de queratinócitos, a cultura de células deste modo resulta nas mesmas características de diferenciação aberrante ou ausente conforme observado em culturas desenvolvidas sobre um substrato de plástico. Isto mostra que os queratinócitos requerem um mesenquima mais complexo de fibroblastos e proteínas de matriz extracelular para produzir uma epiderme funcional. Por conseguinte, o sistema de cultura submersa tradicional é apenas apropriado para estudos relativamente simplistas.

Vários sistemas desenvolvidos e testados ao longo dos últimos 20 anos estão desenhados para desenvolverem condições de cultura de queratinócitos mais do tipo *in vivo*. Em 1979, os géis de colagénio foram primeiro utilizados como "jangadas" fisiológicas sobre as quais se cultivavam os queratinócitos na interface ar-meio (Bell *et al.*, 1979; revisto em Fusenig, 1994; Parenteau *et al.*, 1992). Isto permitia aos nutrientes e factores de crescimento a partir do meio difundirem-se através do colagénio até à camada basal de queratinócitos e expor as camadas mais elevadas de queratinócitos ao ar. Estas condições acrescidas do tipo *in vivo* melhoraram a arquitectura histológica da epiderme cultivada. A completa estratificação e diferenciação histológica podem ser conseguidas utilizando estes métodos de cultura "organotípicos" tridimensional, que têm sido continuamente modificados para reproduzirem mais de perto o ambiente de crescimento *in vivo*.

Em sistemas organotípicos posteriores, incorporaram-se fibroblastos vivos em géis de colagénio, colocaram-se queratinócitos por cima de "jangadas" de colagénio contraídas, e a jangada inteira foi elevada para a interface ar-meio (revisto em Fusenig, 1994) para emular a pele intacta, onde células dérmicas residentes tais como fibroblastos dérmicos estão envolvidos na sinalização de queratinócitos para produzirem uma membrana de base e um epitélio com um programa de diferenciação significativamente melhorado (revisto em Watt e Hertle, 1994). Os fibroblastos viáveis proporcionam valiosos sinais e a produção promovida por queratinócitos cultivados de proteínas de membrana de base.

Diferenciação de queratinócitos

Tanto em pele intacta como em cultura organotípica, os queratinócitos em diferenciação produzem proteínas únicas de etapas de diferenciação particulares. A presença e a localização destes marcadores de proteína podem ser detectadas, utilizando métodos bioquímicos e imunohistoquímicos, e utilizadas para determinar se um tecido epitelial está ou não a diferenciar-se (a estratificar-se) normalmente. Apresentam-se a seguir os perfis de expressão de várias destas proteínas.

As proteínas mais bem estudadas para determinar a diferenciação epidérmica são as queratinas, muito especialmente K5/14 e K1/10, que constituem a rede de filamentos intermédios em queratinócitos epidérmicos. Esta rede proporciona uma estrutura celular que se prolonga desde o núcleo até junções de adesão específicas denominadas desmossomas e hemidesmossomas (revisto em Fuchs e Cleveland, 1998). Estas interações célula-célula e célula-substrato, quando ligadas a filamentos de queratina, são responsáveis pela ancoragem de queratinócitos uns aos outros e à membrana de base subjacente. O par K5/K14 de filamentos de queratina é expresso nas células basais de epitélios escamosos estratificados (revisto em Fuchs, 1993). Conforme esperado, o ARNm de K14 está presente apenas na camada basal de epiderme humana normal (Stoler *et al.*, 1988). As células basais da epiderme começam a diferenciar-se, subregulam a sua expressão de K5/14 e começam a produzir queratinas específicas da diferenciação. O par K1/K10 de filamentos de queratina é expresso nas camadas suprabasais da epiderme (revisto em

Fuchs, 1993). K1 e K10 são marcadores precoces de diferenciação terminal uma vez que são produzidos por queratinócitos ao deixar a camada basal. Em amostras de pele humana intacta, existe K1 desde a primeira camada suprabasal até à superfície do tecido (Stoler et al., 1988; Stark et al., 1999; Asselineau et al., 1989; Boukamp et al., 1990).

Em culturas organotípicas de queratinócitos primários humanos, a iniciação da síntese de proteína K1 está atrasada em relação à pele intacta. A localização de proteína inicia-se 5-8 camadas de células acima da membrana de base em oposição a 1-2 camadas em amostras de pele normal. A indução da produção de K1 normaliza após transplantação das culturas organotípicas para ratinhos nus (Smola et al., 1993; Stark et al., 1999). Estes estudos não examinaram a expressão de ARNm de K1.

A involucrina está localizada até às membranas de células suprabasais em culturas organotípicas de queratinócitos primários, mesmo em tecido fixado (Boukamp et al., 1990; Smola et al., 1993; Stark et al., 1999; Watt et al., 1987), e vários grupos constataram também que o padrão membranoso permaneceu após transplantação para ratinhos nus (Breitkreutz et al., 1997; Watt et al., 1987).

A expressão de TG_K parece variar em culturas organotípicas de queratinócitos humanos normais, surgindo primeiro quer no *stratum spinosum* quer no *stratum granulosum* e continuando para cima através do *stratum corneum* (Michel et al., 1997; Stark et al., 1999).

Culturas organotípicas de queratinócitos humanos normais exibem também localização de filagrina nos grânulos dos estratos mais elevados ou no tecido epidérmico (Boukamp et al., 1990; Michel et al., 1997; Stark et al., 1999).

Para além dos marcadores de diferenciação, pode-se também avaliar a integridade estrutural e funcional de um tecido epitelial por monitorização quanto à presença e localização de proteínas de adesão.

Até à data, nenhuma das caderinas E ou P foi examinada em cultura organotípica de queratinócitos primários, ainda que a caderina-E tenha sido detectada imuno-histoquimicamente em normal pele (Haftek et al., 1996).

Smola e colaboradores (Smola *et al.*, 1998) mostraram com clareza que culturas organotípicas compostas de queratinócitos e de fibroblastos dérmicos normais desenvolvem uma zona de membrana de base capaz de suportar estruturas de adesão específicas do tipo de célula tais como hemidesmossomas.

Em WO 99/43787 refere-se um substituto de pele quimérica viva.

Breve sumário do invento

O presente invento resume-se ao facto de uma co-cultura de células de queratinócitos imortalizados de humano e de células de doador humano ser vantajosamente utilizada como uma pele quimérica para utilização em enxertos de pele e noutros métodos de cirurgia plástica.

Por conseguinte, o invento proporciona uma pele quimérica compreendendo células de queratinócitos humanos imortalizados em co-cultura com queratinócitos de doador onde a pele compreende uma arquitectura de tecido normal e marcadores de diferenciação de epitélios escamosos estratificados e onde a expressão e a localização de marcadores de diferenciação de fase tardia são típicas de pele humana intacta.

O invento proporciona também um método de criação de uma pele quimérica, compreendendo co-cultivar células de queratinócitos humanos imortalizados e queratinócitos obtidos a partir de um paciente, de modo a formar uma pele quimérica, onde a pele compreende uma arquitectura de tecido normal e marcadores de diferenciação de epitélios escamosos estratificados e onde a expressão e a localização de marcadores de diferenciação de fase tardia são típicas de pele humana intacta.

O invento proporciona também uma co-cultura organotípica compreendendo queratinócitos humanos imortalizados e queratinócitos de doador onde a pele compreende uma arquitectura de tecido normal e marcadores de diferenciação de epitélios escamosos estratificados e onde a expressão e a localização de marcadores de diferenciação de fase tardia são típicas de pele humana intacta.

O invento proporciona também a utilização de uma pele, uma monocamada ou uma co-cultura organotípica do invento na fabricação de um medicamento para utilização num método de tratamento de um paciente por enxerto de pele.

Objectivos, características e vantagens do invento tornar-se-ão evidentes tendo em consideração a descrição seguinte tomada em conjunto com os desenhos apensos.

Breve descrição das várias vistas dos desenhos

A Fig. 1 é um fluxograma de preparação de uma cultura organotípica.

As Figs. 2A-H são um conjunto de secções transversais do tecido co-cultivado. As Figs 2A e B são células NIKS^{GFP}. As Figs. 2C e D são queratinócitos LAW-1. As Figs. 2E e F são uma proporção 1:1 de queratinócitos NIKS^{GFP} e LAW-1-EP. As Figs. 2G e H são uma proporção 3:1. As Figs 2A, C, E e G são coradas com hematoxilina e eosina. As Figs. 2B, D, F e H são coradas com Hoescht para visualizar os núcleos das células.

A Fig. 3 é um gráfico de barras de uma velocidade de crescimento de cultura de monocamada.

A Fig 4. é um gráfico de barras de uma velocidade de crescimento normalizada em cultura de monocamada.

As Figs. 5A-J são um conjunto de secções transversais descrevendo a análise imuno-histoquímica de marcadores de diferenciação e moléculas de adesão. As Figs. 5A e B mostram queratina-1. As Figs. 5C e D mostram transglutaminase-1. As Figs. 5E e F mostram filagrina. As Figs. 5G e H mostram caderina-E. As Figs. 5I e J mostram caderina-P. As Figs. 5A, C, E, G e I estão coradas com hematoxilina e eosina para visualização da histologia do tecido. As Figs. 5B, D, F, H e J são visualizadas utilizando uma técnica de imunofluorescência indirecta.

A Fig. 6 é um gráfico da área média de contracção da lesão.

As Figs. 7A-C são um conjunto de visualizações de secções de biopsia. A Fig. 7A é o aspecto *in vivo*. A Fig. 7B

é com hematoxilina e eosina para visualizar a histologia. A Fig. 7C é expressão de GFP.

As Figs. 8A e B são um conjunto de visualizações de secções de biopsia 28 dias após enxerto. A Fig. 8A é histologia. A Fig. 8B é expressão de GFP.

As Figs. 9A, B e C são um conjunto de visualizações analisando o centrómero x/y. A Fig. 9A é o gráfico quimérico no dia 28. A Fig. 9B e C são a análise do centrómero x/y.

Descrição do invento

O presente invento envolve a utilização de uma combinação de queratinócitos humanos de suporte imortais condicionalmente cultivados *in vitro* e queratinócitos derivados de paciente doador para formar enxertos de pele. Revelamos aqui que estes queratinócitos de suporte obtidos a partir de fontes de culturas de células *in vitro* podem ser co-cultivados com queratinócitos de paciente doador utilizando métodos de cultura organotípica ou de monocamada para produzir uma pele quimérica de engenharia adequada para enxerto. Queratinócitos imortais condicionalmente são queratinócitos que são imortais sob condições de crescimento definidas. Um queratinócito é considerado imortal se puder ser cultivado sob as condições de crescimento definidas durante mais de 20 passagens, preferivelmente mais do que 30 passagens, ainda mais preferivelmente mais do que 40 passagens, e ainda mais preferivelmente durante mais do que 50 passagens. Neste pedido de patente, os termos "condicionalmente imortal" e "imortal" são utilizados intermutavelmente. Os queratinócitos humanos de suporte imortais condicionalmente cultivados *in vitro* são alogénicos para o receptor do enxerto. Os queratinócitos de doador ou derivados de paciente são preferivelmente autólogos para o receptor do enxerto.

Nalgumas concretizações preferidas, utiliza-se a linha de células NIKS ("**N**ear-Diploid **I**mmortalized **K**eratinocyte**S**") imortalizada espontaneamente como a fonte de queratinócitos de suporte. As células NIKS (ATCC CRL-12191) não foram expostas a agentes mutagénicos, possuem genes p53 e Rb do tipo selvagem, mantêm propriedades de diferenciação e requisitos de crescimento específicos do tipo de célula, são

não tumorigênicas em ratinhos nus e SCID, estão isentas de vírus e reproduzem a arquitetura da pele completa em cultura organotípica e de monocamada, e respondem a factores de crescimento que regulam o crescimento de queratinócitos, tais como EGF e TGF- β 1. Isto está em contraste com células HaCaT (Boelsma *et al.*, 1999; Schoop *et al.*, 1999) que em passagens tardias exibem crescimento independente da ancoragem, têm elevada eficiência na formação de colónias, atingem elevadas densidades de saturação, e não requerem condições de cultura específicas do tipo de células para cultura em série (Fusenig e Boukamp, 1998).

Ao contrário de outras linhas de células de queratinócito imortalizadas espontaneamente, tais como HaCaT, os queratinócitos NIKS diferenciam-se na mesma extensão e à mesma velocidade que os queratinócitos BC-1-Ep parentais em cultura organotípica com fibroblastos dérmicos para formar um epitélio estratificado que é histologicamente idêntico ao das células BC-1-Ep parentais e doutras estirpes de queratinócitos normais. O epitélio queratinizante multicamada é altamente organizado e exhibe características típicas de pele intacta tal como hemidesmossomas, desmossomas, monofilamentos de queratina e grânulos de querato-hialina. Os queratinócitos parentais e NIKS produzem ambos hemidesmossomas em cultura organotípica sugerindo que ocorreu a síntese, deposição e montagem de glicoproteínas de matriz extracelular.

Em co-cultura organotípica ou de monocamada padrão, as células NIKS não crescem por cima dos queratinócitos humanos, não exibem padrões aberrantes de expressão de proteínas de diferenciação (entre as testadas), e obedecem a fronteiras de compartimentação de tecidos, nem caíndo para baixo da membrana de base nem actuando como uma célula de tumor. As células NIKS não causam replicação aberrante de fibroblastos dérmicos no gel de colagénio.

As NIKS foram cultivadas originalmente a partir de prepúcio neonatal e desenvolveram subseqüentemente uma adição genética estável espontânea do braço longo do cromossoma 8 que permite a estas células terem uma vantagem de sobrevivência significativa em cultura. As Patentes U.S. 5989837 e 6214567 revelam a criação e a utilização de células NIKS. Ver também, Allen-Hoffmann, B.L., *et al.*, "Normal Growth and Differentiation in a Spontaneously Imortalized

Near-Diploid Human Keratinocyte Cell Line, NIKS," *J. Invest. Dermatol.* 114:444-455,2000, que descreve condições adequadas para cultura organotípica e de monocamada para manutenção condicionalmente imortal das células NIKS.

Estas culturas de células organotípicas e de monocamada quiméricas de engenharia e/ou enxertos de tecido equivalente de pele quimérica de engenharia teriam as características únicas de proporcionar uma cobertura imediata da lesão e também de proporcionar células autólogas para fecho formal posterior da lesão. O novo tecido equivalente de pele pode ser utilizado, for exemplo, como um substituto de pele utilizando um enxerto autólogo (NIKS + células de paciente), alogénico (NIKS + células não relacionadas num paciente) ou xenogénico (NIKS + células de porco ou células de primata) para, e.g., fecho de lesões (úlceras diabéticas, queimaduras de pele, doença de pele necrotizante, etc.) ou para fins cosméticos (cirurgia plástica facial, outros procedimentos de cirurgia plástica). O tecido equivalente de pele quimérica do invento pode ser fornecido em tamanhos e espessuras adequados, para utilização em métodos de enxerto e noutros métodos do modo em que o praticante especialista nestes métodos utilizaria enxertos e tecidos existentes.

No entanto, o presente invento não está limitado à utilização de células NIKS na co-cultura quimérica. De facto, o presente invento contempla a utilização de uma variedade de outras linhas de células e células de suporte não tumorigénicas, imortalizadas condicionalmente, que formam invólucros cornificados quando induzidas a diferenciarem-se e que sofrem diferenciação escamosa normal e mantêm requisitos de crescimento específicos do tipo de célula. Outras fontes destas células podem incluir queratinócitos e fibroblastos dérmicos obtidos por biopsia a partir de humanos e de doadores cadáveres (Auger *et al.*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Animal* 36:96-103; Patentes U.S. 5968546 e 5693321), prepúcios neonatais (Asbill *et al.*, *Pharm. Research* 17(9): 1092-97 (2000); Meana *et al.*, *Burns* 24:621-30 (1998); Patentes U.S. 4485096; 6039760; e 5536656), e linhas de células de queratinócitos imortalizados tais como células NM1 (Baden, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 23(3):205-213 (1987)) e células HaCaT (Boucamp *et al.*, *J. Cell. Biol.* 106:761-771 (1988)). Cada uma destas linhas de células pode ser cultivada ou modificada geneticamente conforme descrito a seguir em mais detalhe. O

âmbito do invento estende-se também à utilização de células e de linhas de células obtidas, directamente ou indirectamente, a partir dos tipos de células adequados acima mencionados, incluindo derivados de células NIKS, onde estas células e linhas de células mantêm a capacidade para funcionar no método do invento.

Em geral, o método do presente invento é caracterizado pelos passos seguintes: Obtém-se uma cultura de queratinócitos de suporte *in vitro*, preferivelmente uma cultura organotípica de queratinócitos imortalizados tais como células NIKS. Pode-se desejar manipular geneticamente os queratinócitos. Por exemplo, as células podem ser modificadas por engenharia para exprimirem ou para melhorar a expressão de uma proteína ou de outro produto génico, ou para suprimir uma proteína ou produto génico. Outras manipulações podem incluir a introdução (*knockin*) ou a ablação (*knockout*) de um gene ou a mutação de um gene ou produto génico existentes. Por exemplo, nalgumas concretizações preferidas, quer as células de queratinócitos de suporte quer as células obtidas a partir de paciente são transfectadas ou transformadas com um gene de interesse (por exemplo, o gene codificando o factor 4 do tipo Kruppel (GKLF) de humano). Noutras concretizações preferidas, o gene de interesse está ligado operavelmente a um promotor num vector apropriado. Nalgumas concretizações preferidas, utilizam-se promotores específicos de tecido tais como os promotores de involucrina ou de transglutaminase 3. Noutras concretizações preferidas, a expressão de GKLF é conduzida pelo sistema de promotor induzível do plasmídeo pTetOn (Clontech, Palo Alto, CA). Ainda noutras concretizações, pode-se utilizar um promotor constitutivo. Está contemplado que outros vectores de expressão de mamífero são adequados para utilização no presente invento, incluindo, mas não limitados a, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, PXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Pode-se utilizar qualquer outro plasmídeo ou vector desde que este se possa replicar e permaneça viável no hospedeiro. Nalgumas concretizações preferidas do presente invento, os vectores de expressão de mamífero compreendem uma origem de replicação, um promotor e um intensificador adequados, e quaisquer sítios de ligação a ribossomas, sítios de poliadenilação, sítios aceitadores e doadores *splice*, sequências de terminação da transcrição, e sequências não transcritas de flanqueamento 5'. Noutras concretizações,

podem-se utilizar sequências de ADN obtidas a partir do *splice* de SV40 e sítios de poliadenilação para proporcionar os elementos genéticos não transcritos requeridos. Adicionalmente, o gene KLF 4 pode ser inserido através de um vector retroviral. A transfecção pode ser realizada por qualquer método conhecido na especialidade, incluindo mas não limitada a co-precipitação de fosfato de cálcio, electroporação, bombardeamento de micropartículas, transfecção mediada por lipossomas ou infecção retroviral.

Ainda noutras concretizações, o enxerto é modificado por engenharia para fornecer um agente terapêutico a um sujeito. O presente invento não está limitado à entrega de qualquer agente terapêutico particular. De facto, está contemplado que possam ser entregues ao sujeito uma variedade de agentes terapêuticos incluindo, mas não limitados a, enzimas, péptidos, hormonas de péptido, outras proteínas, ARN ribossómico, ribozimas e ARN anti-sentido. Estes agentes terapêuticos podem ser entregues para uma variedade de propósitos, incluindo mas não limitados ao propósito de corrigir defeitos genéticos. Nalgumas concretizações preferidas particulares, o agente terapêutico é entregue com o propósito de desintoxicar um paciente com um erro de metabolismo congénito hereditário (e.g., aminoacidopatia) em que o enxerto serve como tecido do tipo selvagem. Está contemplado que a entrega do agente terapêutico corrige o defeito. Nalgumas concretizações, os queratinócitos utilizados para formar o equivalente de pele incluem um polinucleótido que codifica um agente terapêutico (e.g., insulina, factor de coagulação IX, eritropoietina, etc.) e o equivalente de pele é enxertado no sujeito. O agente terapêutico é depois entregue à corrente sanguínea ou a outros tecidos do paciente a partir do enxerto. Em concretizações preferidas, o polinucleótido que codifica o agente terapêutico está ligado operavelmente a um promotor adequado. O presente invento não está limitado à utilização de qualquer promotor particular. De facto, está contemplada uma variedade de promotores, incluindo, mas não limitados a, promotores induzíveis, constitutivos, específicos de tecido e específicos de queratinócito. Nalgumas concretizações, o ácido nucleico codificando o agente terapêutico é introduzido directamente nos queratinócitos (i.e., por co-precipitação de fosfato de cálcio ou via transfecção de lipossomas). Noutras concretizações preferidas, o ácido nucleico codificando o

agente terapêutico é fornecido como um vector e o vector é introduzido nos queratinócitos por métodos conhecidos na especialidade. Nalgumas concretizações, o vector é um vector episomal tal como um plasmídeo. Noutras concretizações, o vector integra-se no genoma dos queratinócitos. Exemplos de vectores de integração incluem, mas não estão limitados a, vectores retrovirais, vectores de vírus adeno-associados e vectores de transposição.

Ainda noutras concretizações, podem-se utilizar técnicas tais como recombinação homóloga para *knockin* ou *knockout* de genes. Em concretizações particularmente preferidas, os genes para a macroglobulina α -2 ou os genes para o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) são apagados ou inactivados. Técnicas e reagentes para recombinação homóloga estão descritos nas Patentes U.S. n.ºs 5416260; 5965977; e 5981214.

Em seguida, identifica-se um paciente e isolam-se as células para co-cultura. Para cultivar queratinócitos humanos em cultura de monocamada, obtém-se uma amostra de tecido. Isolam-se os queratinócitos a partir de pele humana ou de outros epitélios escamosos estratificados. As culturas de queratinócitos são estabelecidas plaqueando alíquotas de uma suspensão de células individuais na presença de fibroblastos 3T3 de ratinho suíço tratado com mitomicina C como anteriormente descrito (Allen-Hoffmann e Rheinwald, 1984). O meio padrão de cultura de queratinócitos é composto de uma mistura de meio F-12 de Ham:meio de Eagle modificado por Dulbecco (DME) (3:1, concentração final de cálcio 0,66 mM) suplementada com 2,5% de soro fetal de vitelo (FCS), 0,4 μ g/ml de hidrocortisona (HC), 8,4 ng/ml de toxina da cólera (CT), 5 μ g/ml de insulina (Ins), 24 μ g/ml de adenina (Ade), 10 ng/ml de factor de crescimento epidérmico (EGF), 100 unidades de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomina (P/S). As células são habitualmente subcultivadas em intervalos semanais com 3×10^5 células por placa de cultura de tecidos de 100 mm (aproximadamente uma divisão de 1:25) com uma camada alimentadora tratada com mitomicina C. O EGF humano recombinante e o factor de crescimento transformante β 1 (TGF- β 1) são obtidos na R & D Systems (Minneapolis, MN).

Para produzir uma cultura quimérica de queratinócitos de doador e de queratinócitos de suporte, preferivelmente

queratinócitos NIKS, utiliza-se a proporção desejada de queratinócitos de doador e de queratinócitos de suporte no momento da subcultura ou em qualquer outro momento durante o processo de cultura. Por exemplo, podem-se adicionar células NIKS a uma cultura de queratinócitos de doador aderentes, podem-se adicionar queratinócitos de doador a um cultura de monocamada de NIKS aderentes, ou as células de suporte e os queratinócitos de doador podem ser misturados em conjunto no momento da subcultura.

Nalgumas concretizações preferidas para cultura das células de queratinócitos de suporte (e.g., células NIKS) e de queratinócitos de paciente em cultura organotípica, forma-se uma base de colagénio por mistura de fibroblastos humanos normais com colagénio do Tipo I em meio F12 de Ham contendo 10% de FCS e P/S. Deixa-se a base de colagénio contrair durante 5 dias para formar jangadas de colagénio contraído. Os queratinócitos de paciente e os queratinócitos NIKS são plaqueados sobre as jangadas de colagénio contraído com $3,5 \times 10^5$ células em 50 μ l de uma mistura de F-12 de Ham:DME (3:1, concentração final de cálcio 1,88 mM) suplementada com 0,2% de FCS, 0,4 μ g/ml de HC, 8,4 ng/ml de CT, 5 μ g/ml de Ins, 24 μ g/ml de Ade e P/S. Deixam-se as células ligar-se durante 2 horas antes de inundar a câmara de cultura com meios (dia 0). Nos dias 1 e 2 as células são realimentadas. No dia 4, as células são elevadas para a interface com o ar com almofadas de algodão e mudadas para meio de cornificação contendo F-12 de Ham:DME (3:1, concentração final de cálcio 1,88 mM) suplementado com 2% de FCS, 0,4 μ g/ml de HC, 8,4 ng/ml de CT, 5 μ g/ml de Ins, 24 μ g/ml de Ade e P/S. As células são alimentadas com meio de cornificação de 3 em 3 dias até se conseguir uma estratificação completa (aproximadamente 15 dias). Pode-se identificar uma cultura em monocamada bem sucedida pela presença visual de queratinócitos na placa de cultura. Uma cultura organotípica bem sucedida é identificada observando as proporções de queratinócitos derivados de paciente para queratinócitos de suporte.

Não se pretende que as proporções de queratinócitos derivados de paciente para queratinócitos de suporte aqui exemplificadas sejam limitantes. De facto, com base nas linhas de orientação aqui fornecidas, é óbvio que se pode utilizar no presente invento uma variedade de proporções. Consequentemente, nalgumas concretizações, uma proporção

adequada de queratinócitos derivados de paciente para queratinócitos de suporte está na gama de cerca de 0,5%:99,5% a cerca de 80%:20%, preferivelmente de cerca de 10%:90% a cerca de 60%:40%; e muito preferivelmente uma proporção de cerca de 20%:80%.

Um enxerto de pele do presente invento terá a arquitectura de tecido e os marcadores de diferenciação e adesão de pele normal. Vantajosamente, um enxerto de pele do presente invento pode ser desenvolvido mais rapidamente do que os enxertos de pele preparados a partir de pele derivada de paciente.

Co-culturas quiméricas organotípicas de queratinócitos de doador e de suporte, e os enxertos de pele resultantes do presente invento, exibem uma arquitectura de tecido que se assemelha em muito à arquitectura de pele normal e de culturas organotípicas de queratinócitos humanos substancialmente como descrito em Antecedentes do invento, *supra* e como se mostra na Fig. 5, tendo em consideração as variações típicas observadas em culturas organotípicas. Por exemplo, co-culturas quiméricas organotípicas de queratinócitos humanos primários e de células NIKS foram embebidas em parafina, seccionadas e coradas com hematoxilina e eosina para exame histológico. As co-culturas exibem um *stratum basale* discreto consistindo de células basais colunares. O *stratum spinosum* sobrejacente é composto de várias camadas de células maiores, progressivamente achatadas. As camadas superiores exibem uma camada granular possuindo grânulos de querato-hialina corados com hematoxilina.

As culturas exibem uma distribuição normal de proteínas específicas do tipo de célula associadas às várias etapas de diferenciação escamosa. A localização de marcadores de diferenciação foi visualizada utilizando imunofluorescência indirecta. O marcador de diferenciação de fase precoce queratina 1 aparece como coloração citoplásmica difusa em todas as culturas, sendo a expressão iniciada na primeira ou na segunda camada de células suprabasais e continuando no sentido ascendente através do *stratum*.

A coloração imunofluorescente mostra uma localização de proteína citoplásmica difusa de involucrina iniciando-se nas

primeiras várias camadas de células suprabasais. As culturas de NIKS exibem idêntica localização espacial de involucrina aos dias 8, 11 e 13 dias bem como aos 21 dias (Loertscher et al., 2000). Análises anteriores de amostras de pele humana normal intacta têm demonstrado a localização citoplásmica esperada de involucrina (Mansbridge e Knapp, 1987; Murphy et al., 1984). Os nossos resultados mostram a proteína involucrina localizada no compartimento citoplásmico, como esperado. Esta constatação apoia a nossa reivindicação da diferenciação normal, tipo *in vivo*, de culturas organotípicas quiméricas de queratinócitos humanos e queratinócitos NIKS.

O marcador de diferenciação intermédio TG_K exibe intensidade e padrões de localização idênticos, em culturas organotípicas quiméricas de queratinócitos humanos e NIKS (Figura 5). O seu aspecto distinto do tipo colmeia reflecte a localização da enzima TG_K ligada a membrana.

O marcador de diferenciação de fase tardia filagrina está localizado até aos grânulos de querato-hialina nas células do *stratum granulosum* de jangadas de queratinócitos primários e NIKS, conforme indicado pelo seu padrão de coloração pontilhado (Figura 5). Culturas organotípicas quiméricas de queratinócitos humanos e queratinócitos NIKS exibiram uma localização espacial normal de filagrina (Figura 5) aos 15 dias.

Utilizou-se também imuno-histoquímica para determinar a presença e a localização de caderina-P e caderina-E. Nas co-culturas do invento, a caderina-E aparece nas regiões de contacto célula-célula em todas as culturas, com a expressão começando na camada suprabasal imediata e continuando no sentido ascendente através dos estratos vivos (Figura 5). O padrão de expressão de caderina-P é também similar em todas as culturas, mas inicia-se no *stratum basale* e continua apenas através das primeiras várias camadas suprabasais (Figura 5). Estas concretizações espelham as observadas em pele intacta e demonstram que culturas organotípicas quiméricas de queratinócitos humanos e de queratinócitos NIKS produzem um padrão apropriado de moléculas de caderina em comparação com culturas organotípicas de queratinócitos humanos sozinhos e/ou com pele humana intacta.

O presente invento será mais plenamente compreendido tendo em consideração os Exemplos não limitantes seguintes.

Exemplos

Métodos

Métodos de cultura de células:

Isolaram-se queratinócitos de doador (GS-1-EP, LAW-1-EP) a partir de prepúcios de humanos recém-nascidos. As amostras foram obtidas após circuncisão sob aprovação do Institutional Biosafety Committee e do Human Subjects Committee do hospital. As culturas de queratinócitos GS-1-EP, LAW-1-EP e NIKS foram estabelecidas plaqueando alíquotas de uma suspensão de células individuais na presença de fibroblastos 3T3 de ratinho suíço tratados com mitomicina C (mito-3T3) como anteriormente descrito (6). O meio padrão de cultura de queratinócitos era composto de uma mistura de meio F12 de Ham:meio de Eagle modificado por Dulbecco (DME) (3:1, concentração final de cálcio 0,66 mM) suplementada com 2,5% de soro fetal de vitelo (FCS), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (HC), 8,4 ng/ml de toxina de cólera (CT), 5 µg/ml de insulina (Ins), 24 µg/ml de adenina (Ade), 10 ng/ml de factor de crescimento epidérmico (EGF), 100 unidades de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (P/S). As células foram subcultivadas em intervalos semanais com 3×10^5 células por placa de cultura de tecidos de 100 mm (aproximadamente uma divisão de 1:25) com uma camada alimentadora de mito-3T3.

Geração de NIKS exprimindo proteína fluorescente verde (NIKS^{GFP}):

Preparou-se ADN de plasmídeo utilizando o *kit* Maxiprep isento de endotoxina (Qiagen, Valencia, CA). pGreenLantern (Gibco-BRL, Rockville, MD) e pcDNA3neo (Invitrogen, Carlsbad, CA) foram linearizados utilizando as enzimas de restrição *XmnI* e *BglIII* (Promega, Madison, WI) respectivamente. Utilizou-se um total de 20 µg de ADN (15 µg de pGreenLantern e 5 µg de pcDNA3neo) para a transfecção de células NIKS numa proporção de 3:1 de pGreenLantern para pcDNA3neo. Os NIKS foram plaqueados com uma densidade de 3×10^5 células sobre uma camada alimentadora de mito-3T3 em placas de 100 mm. Deixaram-se as células aderir durante 48 horas, período após

o qual se removeu a camada de mito-3T3 com EDTA 0,5 mM. As células NIKS na passagem 30-40 foram transfectadas utilizando o lípido polycatiónico GeneFECTOR (VennNova, Miami, FL). A mistura de transfecção foi preparada por adição de ADN de plasmídeo linearizado e GeneFECTOR até um volume final de 500 µl com água milli-Q estéril para cada placa de 100 mm. A mistura de transfecção foi rodada suavemente e incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente. As células NIKS foram enxaguadas duas vezes com DME e realimentadas com 5 ml de DME. Adicionaram-se 500 µl de mistura de transfecção a cada placa de 100 mm gota a gota e incubaram-se as células durante 5 horas a 37°C sob 5% de CO₂. Removeram-se os meios e enxaguaram-se as células duas vezes com DME e realimentaram-se com meios contendo soro. Visualizaram-se as células 24 horas pós-transfecção com um microscópio de fluorescência invertido IX-70 (Olympus, Melville, NY) equipado com um filtro de passagem de banda curta de GFP para observar a expressão de GFP antes da análise por *Flow-Activated Cell Sorting* (FACS).

Avaliação de culturas quiméricas quanto a velocidades de crescimento de queratinócitos:

NIKS^{GFP}, LAW-1-EP e GS-1-EP foram plaqueados separadamente e misturados numa proporção de 1:1, 1:10 e 1:100 (NIKS^{GFP}:GS-1-EP ou LAW-1-EP). As células foram plaqueadas numa concentração final de 10⁵ células/placa de 60 mm em triplicado sobre uma camada alimentadora de 3T3 e contadas quatro dias mais tarde. Repetiram-se as experiências duas vezes com NIKS^{GFP} e GS-1-EP e uma vez com LAW-1-EP. Os resultados foram também normalizados em relação às diferenças de eficiência de plaqueamento entre diferentes estirpes de queratinócitos.

Métodos de cultura organotípica:

As culturas organotípicas foram desenvolvidas como anteriormente descrito (7) em câmaras de cultura Transwell com as alterações seguintes: formou-se uma base de colagénio misturando fibroblastos neonatais humanos normais, estirpe CI-1-F, com colagénio de tendão caudal de rato do Tipo I em meio F12 de Ham contendo 10% de FCS e P/S. Deixou-se a base de colagénio contrair durante 4 a 7 dias. Plaquearam-se separadamente LAW-1-EP, GS-1-EP e NIKS^{GFP} (passagem 47) e nas

proporções seguintes: (90% de NIKS^{GFP}, 10% de LAW-1-EP), (87,5% de NIKS^{GFP}, 12,5% de LAW-1-EP), (75% de NIKS^{GFP}, 25% de LAW-1-EP), (50% de NIKS^{GFP}, 50% de LAW-1-EP). Um total de $3,5 \times 10^5$ células foram plaqueadas sobre a base de colagénio contraído em 50 µl de uma mistura de F-12 de Ham:DME (3:1, concentração final de cálcio 1,88 mM) suplementada com 0,2% de FCS, 0,4 µg/ml de HC, 8,4 ng/ml de CT, 5 µg/ml de Ins, 24 µg/ml de Ade e P/S. Deixaram-se as células ligarem-se durante 2 horas antes de se inundar a câmara de cultura com meios (dia 0). No dia 2 realimentaram-se as células. No dia 4, elevaram-se as células até uma interface ar/meios com almofadas de algodão e mudaram-se para meio de cornificação contendo F-12 de Ham:DME (3:1, concentração final de cálcio 1,88 mM) suplementado com 2% de FCS, 0,4 µg/ml de HC, 8,4 ng/ml de CT, 5 µg/ml de Ins, 24 µg/ml de Ade e P/S. Alimentaram-se as células com meio de cornificação de 3 em 3 dias e colheram-se no Dia 16 (Figura 1).

Métodos de histologia e imuno-histoquímica:

Os espécimes foram fixados durante 2 horas com 1% de paraformaldeído. Na preparação para congelação, submergiram-se as culturas em 20% de sacarose/PBS, de um dia para o outro a 4°C, antes de serem congeladas em OCT num banho de isopentano arrefecido em azoto líquido. Biopsias de enxertos e culturas criopreservadas foram seccionadas em série (5 µm), montadas em lâminas de vidro, coradas com hematoxilina e eosina, e visualizadas com um microscópio invertido Olympus IX-70. As imagens foram adquiridas com uma câmara DEI-750 (Optronics Engineering) e software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Para análise imuno-histoquímica de marcadores de diferenciação, tecidos criopreservados foram seccionados em série (5 µm), montados sobre lâminas de vidro, e fixados com brevidade em acetona a -20°C. Lavaram-se as secções com PBS, bloquearam-se com 3% de soro de cabra normal (Sigma, St. Louis, MO) e incubaram-se com anticorpo primário durante 1 hora. Os anticorpos primários incluem: anti-transglutaminase de queratinócito (diluição 1:100) (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA), anti-filagrina (diluição 1:250) (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA), anti-queratina-1 (diluição 1:50) (Novo Castra, Newcastle upon Tyne, UK), anti-caderina-E (diluição 1:80) (Transduction Laboratories, Lexington, KY), anti-caderina-P (diluição 1:20) (Transduction Laboratories,

Lexington, KY) e anti-involucrina (diluição 1:5000) (Sheibani, 1994). Incubaram-se depois as secções com imunoglobulina-G conjugada com Alexa 594 (diluição 1:1000) (Molecular Probes, Eugene OR) e contrastaram-se com Hoechst 33258 (1 µg/ml). Todas as incubações ocorreram à temperatura ambiente com excepção da incubação do anticorpo primário anti-caderina-P, que ocorreu a 37°C. As secções foram visualizadas com um microscópio invertido Olympus IX-70 equipado com filtros de passagem de banda de FITC e Hoechst. As imagens foram adquiridas com uma câmara DEI-750 (Optronics Engineering) e *software* Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Enxerto de culturas organotípicas quiméricas:

Realizaram-se experiências com animais utilizando ratinhos Nu/Nu atímicos (5 semanas de idade) obtidos na Harlan Sprague Dawley, de acordo com as regras de investigação com animais da University of Wisconsin e aprovadas pelo Animal Care and Use Committee. Os ratinhos foram anestesiados utilizando 3% de isoflurano para indução de anestesia e foram depois mantidos com 1,5%-2,5% de isoflurano durante o procedimento. Beliscaram-se os polegares dos ratinhos para avaliar o nível de anestesia antes do início do procedimento de enxerto. A gestão da dor pós-operação foi aliviada com buprenorfina (0,05 µg/kg subcutaneamente). Colocaram-se antibióticos (sulfametoxazol e trimetoprim 200 mg/40 mg por 5 ml) na água de beber (10 ml/250 ml de H₂O) durante os primeiros três dias pós-operatórios. Limpavam-se os ratinhos com gluconato de clorexidina a 4% (Zeneca Pharmaceuticals, Wilmington DE) e lavavam-se com solução salina estéril antes da incisão. Efectuaram-se defeitos de pele sobre o dorso dos ratinhos. Os enxertos cultivados organotipicamente foram colocados com o lado dérmico para baixo e fixados com suturas de *nylon*. Sobre os enxertos, agraçou-se gaze Aquaphor (Beiersdorf-Jobst Inc, Rutherford College, NC) impregnada com pomada de bacitracina zinco (500 unidades) e sulfato de polimixina B (10000 unidades) (E. Fougera, Melville, NY). Por cima do enxerto, agraçou-se gaze Xeroform (3% de tribromofenato de bismuto) (Sherwood Medical, St. Louis MO). Agraçou-se sobre o local uma camada adicional de tecido Spandex para evitar que os ratinhos removessem as ligaduras. Os ratinhos foram observados diariamente durante uma semana pós-operação,

momento após o qual os ratinhos foram de novo anestesiados como anteriormente descrito e se removeram as ligaduras. Obtiveram-se biopsias dos enxertos com intervalos de 7, 14 e 28 dias após eutanásia numa câmara de CO₂.

Resultados

Geração de NIKS exprimindo proteína fluorescente verde (NIKS^{GFP}):

Transformaram-se por engenharia genética células NIKS para exprimirem o gene exógeno da proteína fluorescente verde (GFP). Colocaram-se estas células em subcultura em intervalos semanais com 3×10^5 células por placa de cultura de tecidos de 100 mm com uma camada alimentadora de mito-3T3. As NIKS^{GFP} foram um reagente celular importante para muitas facetas deste projecto e permitiram a visualização sob o microscópio fluorescente (Figura 2). As NIKS^{GFP} possuem características de crescimento e diferenciação idênticas às das células NIKS não transfectadas.

Avaliação da cultura quimérica quanto às velocidades de crescimento de queratinócitos:

Técnicas de cultura de monocamada documentaram a formação de folhas epiteliais quiméricas contíguas de células NIKS exprimindo GFP e de queratinócitos humanos de doador. A co-cultura de células NIKS^{GFP} com outras estirpes de queratinócitos não afectou a velocidade de crescimento de qualquer das estirpes de queratinócitos em cultura de monocamada. As subculturas de NIKS^{GFP} atingiram 90% de confluência a uma velocidade mais lenta do que LAW-1-EP ou GS-1-EP, *i.e.* têm uma velocidade de crescimento mais lenta em cultura de monocamada (Figura 3). Os resultados normalizados não mostram qualquer efeito da cultura quimérica para proporções de 1:1, 1:10 e 1:100 nas velocidades de crescimento em cultura de monocamada (Figura 4).

Histologia e análise imuno-histoquímica de culturas organotípicas:

Culturas organotípicas *in vitro* de NIKS^{GFP}/LAW-1-EP quimérico demonstram crescimento e arquitectura normais para proporções de 1:1 e 3:1 (Figura 2). Culturas organotípicas de

NIKS^{GFP} e GS-1-EP demonstraram também arquitectura normal por coloração com hematoxilina e eosina para proporções de 1:1, 10:1 e 100:1. Na Figura 5 mostra-se a análise imuno-histoquímica de marcadores de diferenciação e de moléculas de adesão. Numa posição suprabasal, encontraram-se queratina 1 e o marcador de diferenciação associado à membrana, transglutaminase-1. A transglutaminase-1 é claramente observada em anéis associados com a membrana celular. A coloração de filagrina está apropriadamente limitada à camada granular. A análise de moléculas de adesão mostra que a expressão de caderina-P está apropriadamente limitada à camada basal e que a expressão de caderina-E está localizada por toda a parte da epiderme.

Enxerto de culturas organotípicas quiméricas:

A capacidade de trabalho dos enxertos cultivados era digna de nota. Estes foram facilmente manipulados e facilmente transferidos para um local de lesão. Os enxertos não rasgaram com a sutura ou com o agrafe e foram expandidos com sucesso em proporções de 2:1 com um expansor (*mesher*) não esmagador (Brennan Medical, St. Paul, MN). Ocorreu uma contracção inicial significativa do enxerto com estabilização no tamanho do enxerto ao dia 20 (Figura 6). As biopsias do enxerto demonstraram arquitectura de tecido normal e expressão de GFP aos dias 7 e 28 (Figuras 7, 8). A análise do centrómero X-Y confirmou a presença de células humanas (Figura 9).

Discussão

Pacientes com lesões por queimaduras catastróficas têm locais doadores insuficientes disponíveis para cobertura do local receptor. As técnicas actuais disponíveis para recobrimento da pele podem salvar vidas de pacientes queimados, ainda que subsistam problemas significativos. O principal obstáculo à utilização de queratinócitos cultivados autólogos é o prazo requerido para expansão clonal. Muitas vezes, os pacientes desenvolvem sepsia não controlada antes dos enxertos cultivados estarem disponíveis, e assim uma redução no tempo de cultura requerido para a criação de enxertos de pele autólogos seria uma melhoria importante nos cuidados ao paciente.

Os inventores demonstraram aqui que células NIKS podem ser co-cultivadas com queratinócitos humanos de doador numa cultura organotípica e utilizados como um tecido de engenharia adequado para enxerto de pele. O crescimento organotípico rápido utilizando 90% de células alogénicas entremeadas com 10% de queratinócitos autólogos permitiria uma cobertura antecipada da lesão. O recobrimento permanente da pele mais lento ocorreria com os queratinócitos autólogos à medida que as células alogénicas são rejeitadas. Estes enxertos teriam as características únicas de proporcionar uma cobertura imediata da lesão e também de proporcionar células para o fecho formal posterior da lesão.

A exequibilidade desta abordagem única foi anteriormente demonstrada em modelos animais. Queratinócitos cultivados quiméricamente a partir de diferentes estirpes de ratinho (BALB/c e C3H/He) enxertados em qualquer das estirpes de ratinho experimental resultaram em sobrevivência no longo prazo de queratinócitos singénicos e na rejeição dos queratinócitos alogénicos (3). Isto foi também demonstrado utilizando culturas quiméricas de queratinócitos contendo 98% de células alogénicas e apenas 2% de células singénicas (8). Adicionalmente, queratinócitos cultivados quiméricos singénicos-xenogénicos (ratinho-humano) enxertados em ratinhos resultaram em recobrimento completo da pele com células singénicas à medida que as células xenogénicas eram eliminadas (4).

Um obstáculo importante ao avanço clínico desta técnica tem sido a indisponibilidade de uma linha estabelecida de queratinócitos alogénicos. A vantagem de sobrevivência significativa associada à linha de células NIKS faz desta uma linha de células alogénicas bem adaptada para cultura quimérica com queratinócitos autólogos de um paciente. Queratinócitos autólogos com passagens a uma confluência inferior e adicionados a NIKS em cultura permitiriam a ocorrência de economias em tempo significativas. A cultura quimérica de NIKS com queratinócitos autólogos de um paciente conduziria a uma cobertura da lesão antecipada com um tecido de engenharia que proporciona células autólogas para fecho formal posterior da lesão.

Mostrámos que, quando co-cultivados com queratinócitos de doador de um modo quimérico, não existe qualquer

crescimento excessivo de um tipo de célula em relação ao outro. Mostrámos ainda que a expressão e a localização dos marcadores de diferenciação de fase tardia, queratina 1, transglutaminase 1 e filagrina, e das moléculas de adesão, caderina-E e caderina-P, são idênticas às da pele intacta. A NIKS é uma linha de células preferida para ser utilizada como uma linha de queratinócitos doadores alogénicos permanentes.

Até à data, a linha de células NIKS não foi caracterizada quanto à expressão de antigénios de complexo de histocompatibilidade principal (MHC), e as suas características de rejeição são desconhecidas. Ao contrário dos enxertos de pele, as culturas organotípicas não contêm elementos epiteliais ou endoteliais vasculares altamente antigénicos, tais como células de Langerhans e capilares. É possível que as NIKS não sejam rejeitadas quando colocadas em humanos. Enxertos de pele cultivada quimérica num modelo animal imunocompetente avaliariam a rejeição de xenotransplante, mas não definiriam em definitivo se as células NIKS seriam ou não rejeitadas numa situação clínica. Se as NIKS fossem passivamente eliminadas por rejeição, o recobrimento ocorreria com células autólogas. Se as NIKS não fossem rejeitadas, a linha de células poderia funcionar potencialmente como uma pele de doador universal. Num mínimo, as NIKS cultivadas quiméricamente actuariam como uma cobertura biológica temporária e como um veículo de entrega para queratinócitos autólogos.

A falta de um plexo capilar é também significativa, uma vez que a revascularização da pele cultivada não é conseguida por inosculação a capilares preexistentes, mas sim por angiogénese. O atraso na revascularização pode ser responsável pela rápida redução precoce no tamanho do enxerto observada neste estudo, ainda que uma explicação alternativa seria que a rápida contracção da lesão é característica de ratinhos atímicos. Têm sido utilizadas técnicas de engenharia genética para lidar com o atraso na revascularização inerente em pele cultivada.

As NIKS são prontamente receptivas a técnicas de genética molecular para a criação de linhas de células estáveis como evidenciado pela criação bem sucedida de NIKS^{GFP}. Uma vez que as células NIKS podem ser modificadas por engenharia genética, é exequível incorporar queratinócitos

NIKS modificados por engenharia genética em culturas quiméricas para promover as características de cicatrização de lesões de enxertos quiméricos. Adicionalmente, podem-se criar linhas de células NIKS com perfis genéticos específicos, tais como expressão de factores de crescimento. Como resultado, podem ser gerados à medida uma ampla variedade de produtos de tecido baseados em NIKS.

Não se pretende que o presente invento esteja limitado pela revelação precedente mas que, pelo contrário, abranja todas as modificações e variações decorrentes do âmbito das reivindicações apensas.

Referências

1. Boyce, S.T., et al., "Cultured skin substitutes combined with Integra Artificial Skin® to replace native skin autograft and allograft for the closure of excised full-thickness burns", J. Burn Care Rehabil. 20:453-461, 1999.
2. Cairns, B.A., et al., "The biotechnological quest for optimal wound closure", Arch. Surg. 128:1246-1252, 1993.
3. Suzuki, T., Ui, K., Shioya, N. e Ihara, S., "Mixed cultures compromising syngeneic and allogeneic mouse keratinocytes as a graftable skin substitute", Transplantation 59:1236-1241, 1995.
4. Rouabhia, M., "Permanent skin replacement using chimeric epithelial cultured sheets comprising xenogeneic and syngeneic keratinocytes", Transplantation 61:1290-1300, 1996.
5. Allen-Hoffmann, B.L., et al., "Normal growth and differentiation in a spontaneously immortalized near-diploid human keratinocyte cell line, NIKS", J. Invest. Dermatol. 114:444-455, 2000.
6. Allen-Hoffmann, B.L. e Rheinwald, J.G., "Polycyclic aromatic hydrocarbon mutagenesis of human epidermal keratinocytes in culture", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7802-7806, 1984.
7. Parenteau, N.L., et al., "The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function", Cytotechnology 9:163-171, 1992.
8. Larochele, F., Ross, G. e Rouabhia, M., "Permanent skin replacement using engineered epidermis containing fewer than 5% syngeneic keratinocytes", Lab. Invest. 78:1089-1099, 1998.

9. Vogt, P.M., et al., "Genetically modified keratinocytes transplanted to wounds reconstitute the epidermis", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:9307-9311, 1994.
10. Supp, D.M., Supp, A.P., Bell, S.M. e Boyce, S.T., "Enhanced vascularization of cultured skin substitutes genetically modified to overexpress vascular endothelial growth factor", J. Invest. Dermatol. 114:5-13, 2000.
11. Supp, D.M. e Boyce, S.T., "Overexpression of vascular endothelial growth factor accelerates early vascularization and improves healing of genetically modified cultured skin substitutes", J. Burn Care Rehabil. 23:10-20, 2002.

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Pele quimérica que compreende células de queratinócitos humanos imortalizados em co-cultura com queratinócitos de doador, em que a pele compreende uma arquitectura de tecido normal e marcadores de diferenciação de epitélios escamosos estratificados e em que a expressão e a localização de marcadores de diferenciação de fase tardia são típicas de pele humana intacta.

2. Pele de acordo com a reivindicação 1, em que os queratinócitos imortalizados estão modificados geneticamente.

3. Método de criação de uma pele quimérica, que compreende co-cultivar células de queratinócitos humanos imortalizados e queratinócitos obtidos a partir de um paciente, de modo a formar uma pele quimérica, em que a pele compreende uma arquitectura de tecido normal e marcadores de diferenciação de epitélios escamosos estratificados e em que a expressão e a localização de marcadores de diferenciação de fase tardia são típicas de pele humana intacta.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, que compreende o passo de modificar geneticamente pelo menos um dos queratinócitos imortalizados e dos queratinócitos de doador.

5. Co-cultura organotípica que compreende queratinócitos humanos imortalizados e queratinócitos de doador onde a pele compreende uma arquitectura de tecido normal e marcadores de diferenciação de epitélios escamosos estratificados e onde a expressão e a localização de marcadores de diferenciação de fase tardia são típicas de pele humana intacta.

6. Pele de acordo com a reivindicação 1 ou 2, método de acordo com a reivindicação 3 ou 4, ou co-cultura organotípica de acordo com a reivindicação 5, em que os queratinócitos de doador são de origem humana.

7. Pele de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 e 6, método de acordo com qualquer uma das reivindicações 3, 4 e 6, ou co-cultura organotípica de acordo com a reivindicação 5 ou 6, em que os queratinócitos imortalizados são queratinócitos imortalizados espontaneamente.

8. Pele de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 6 e 7, método de acordo com qualquer uma das reivindicações 3, 4, 6 e 7, ou co-cultura organotípica de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 7, em que os queratinócitos imortalizados são ATCC CRL-12191.

9. Pele de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 e 6 a 8, método de qualquer uma das reivindicações 3, 4 e 6 a 8, ou co-cultura organotípica de qualquer uma das reivindicações 5 a 8, em que os queratinócitos imortalizados estão modificados geneticamente.

10. Pele, método ou co-cultura organotípica de acordo com a reivindicação 9, em que pelo menos um gene ou produto génico é expresso ou cuja expressão é melhorada como resultado da modificação genética.

11. Pele, método ou co-cultura organotípica de acordo com a reivindicação 9 ou 10 onde a expressão de pelo menos um gene ou produto génico é suprimida como resultado da modificação genética.

12. Utilização de pele de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 6 a 11, ou de co-cultura organotípica de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 11, na fabricação de um medicamento para utilização num método de tratamento de um paciente por enxerto de pele.

13. Utilização de acordo com a reivindicação 12, em que o enxerto de pele é para fecho de lesão.

14. Utilização de acordo com a reivindicação 13, em que o fecho de lesão é para tratamento de úlceras diabéticas, de queimaduras de pele e/ou de uma doença de pele necrotizante.

Lisboa,

Preparação de culturas organotípicas

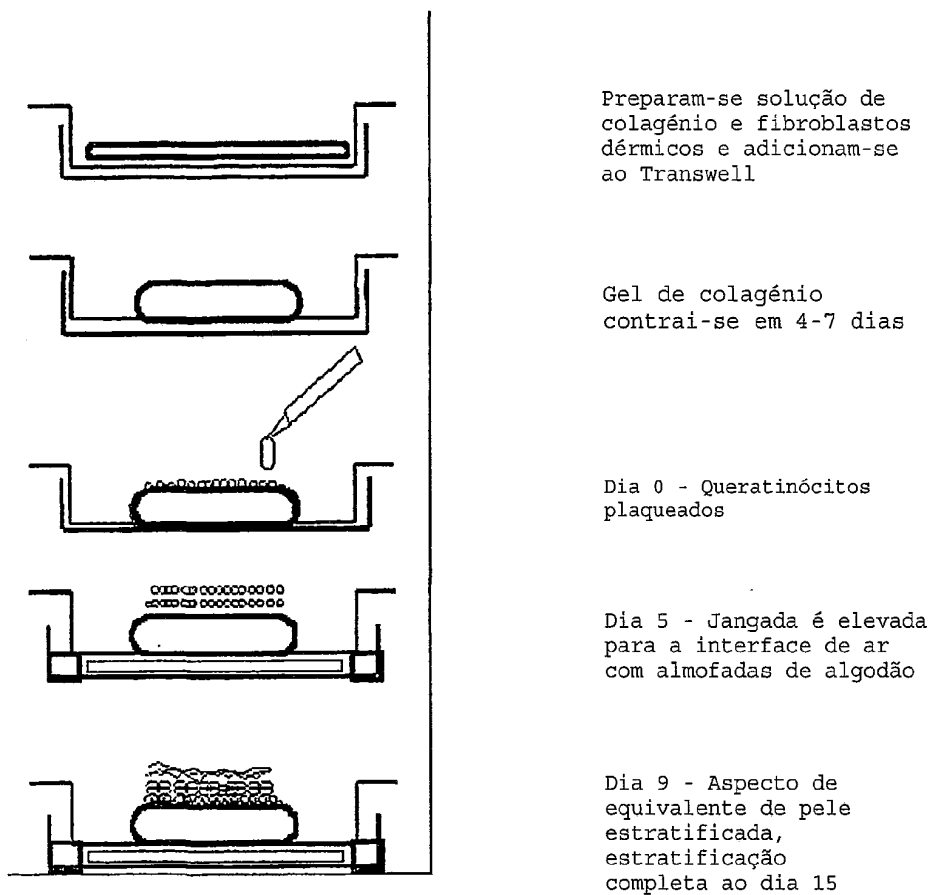
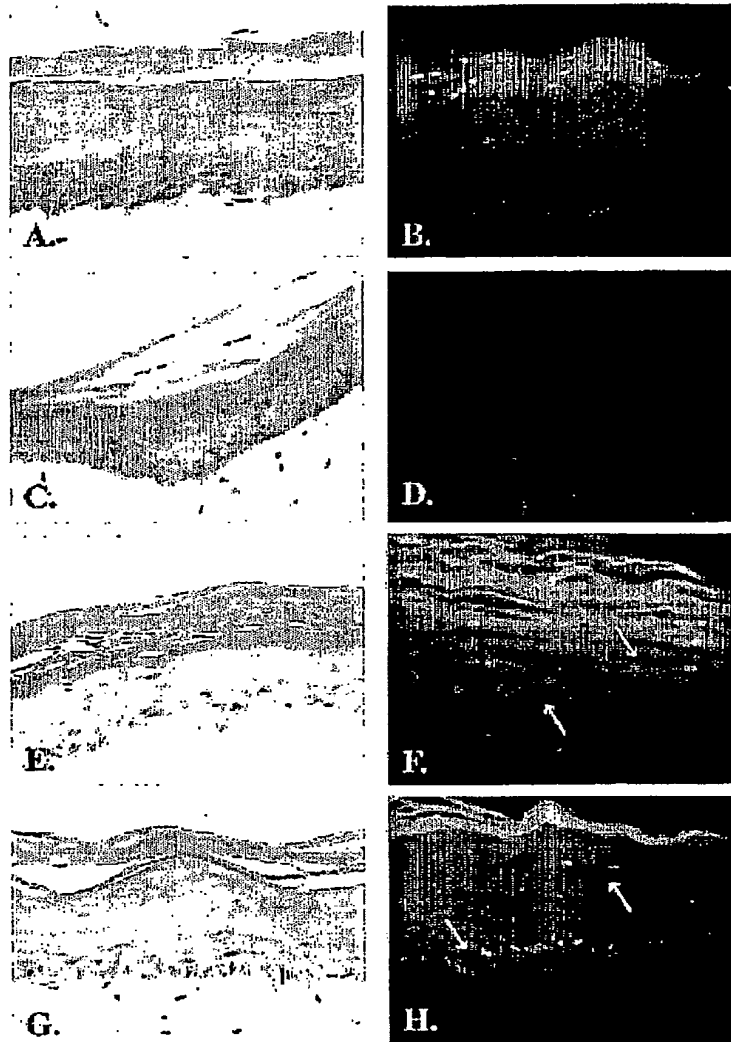


Figura 1

Histologia e expressão de GFP em culturas organotípicas in vitro após colheita (dia 16)

Histologia (hematoxilina/eosina) Expressão de GFP (coloração de núcleos Hoescht)



A e B: apenas NIKSGFP

C e D: LAW-1-EP sozinho, note-se a ausência de expressão de GFP

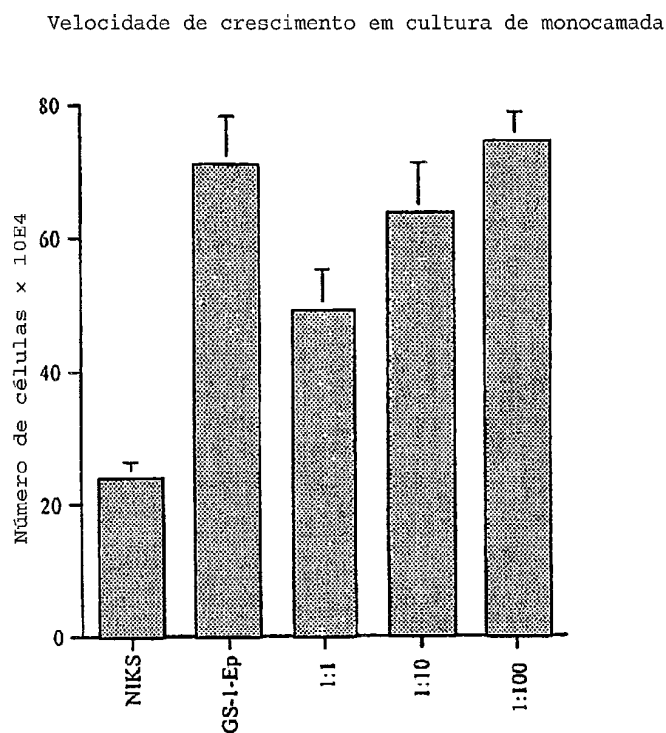
E e F: proporção 1 para 1 de NIKS e LAW-1-EP em cultura quimérica

G e H: proporção 3 para 1 de NIKS e LAW-1-EP em cultura quimérica

Expressão de GFP contrastada com Hoescht para detectar núcleos

Ampliação de 400x, setas a branco indicam células LAW-1-EP e células NIKSGFP

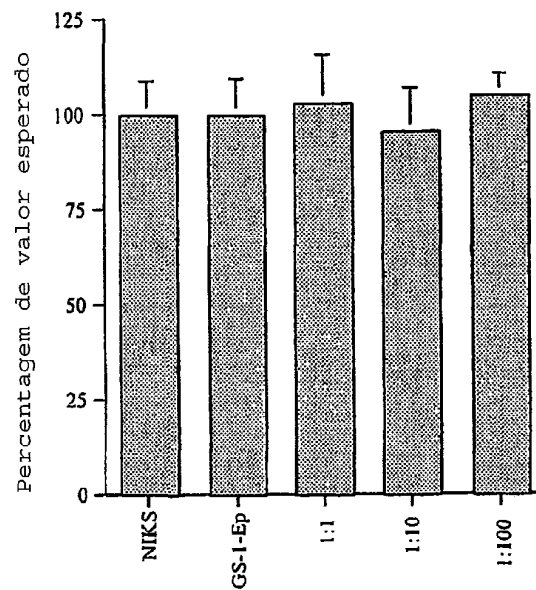
Figura 2



NIKSGFP e GS-1-EP foram plaqueados separadamente e misturados em proporções de 1:1, 1:10 e 1:100. As células foram plaqueadas até uma concentração final de 105 células/placa de 60 mm em triplicado sobre uma camada de células alimentadoras 3T3 tratadas com mito-c e contadas 4 dias mais tarde.

Figura 3

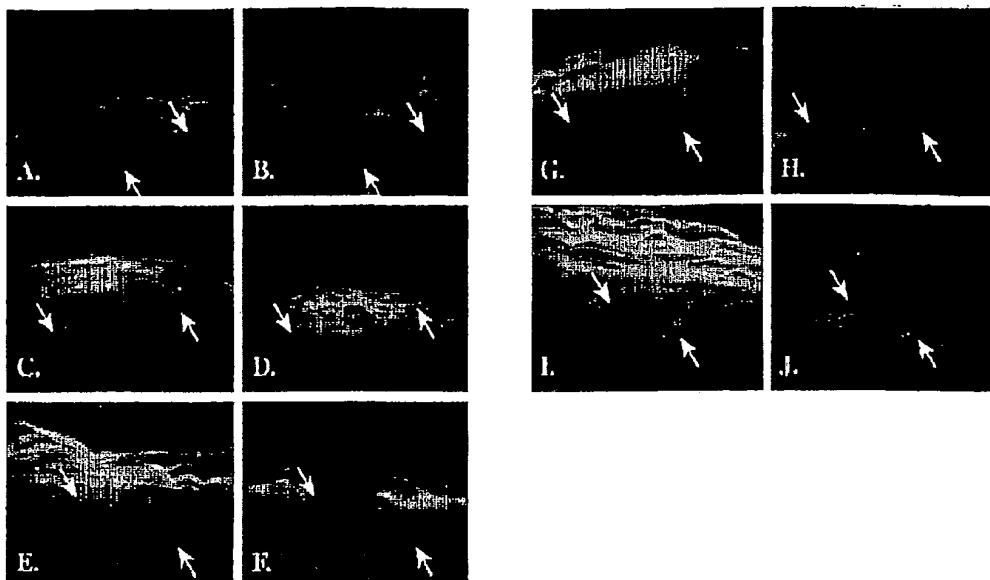
Velocidade de crescimento normalizada em cultura de monocamada



NIKSGFP e GS-1-EP foram plaqueados separadamente e misturados em proporções de 1:1, 1:10 e 1:100. As células foram plaqueadas até uma concentração final de 105 células/placa de 60 mm em triplicado sobre uma camada de células alimentadoras 3T3 tratadas com mitomicina C e contadas 4 dias mais tarde. Os resultados são apresentados como percentagem de valor esperado para correcção das diferenças em eficiência de plaqueamento entre as duas estirpes de queratinócitos.

Figura 4

Análise imuno-histoquímica de marcadores de diferenciação e de moléculas de adesão



Detecção imuno-histoquímica de marcadores de diferenciação e de marcadores de adesão em cultura organotípica quimérica consistindo de 50% de NIKSGFP e 50% de LAW-1-EP. Todas as secções contrastadas com Hoechst para detectar núcleos mostradas com uma ampliação de 400x.

Setas a branco indicam células LAW-1-EP e células NIKSGFP.

A e B: Queratina 1

C e D: Transglutaminase 1

E e F: Filagrina

G e H: Caderina-E

I e J: Caderina-P

Figura 5

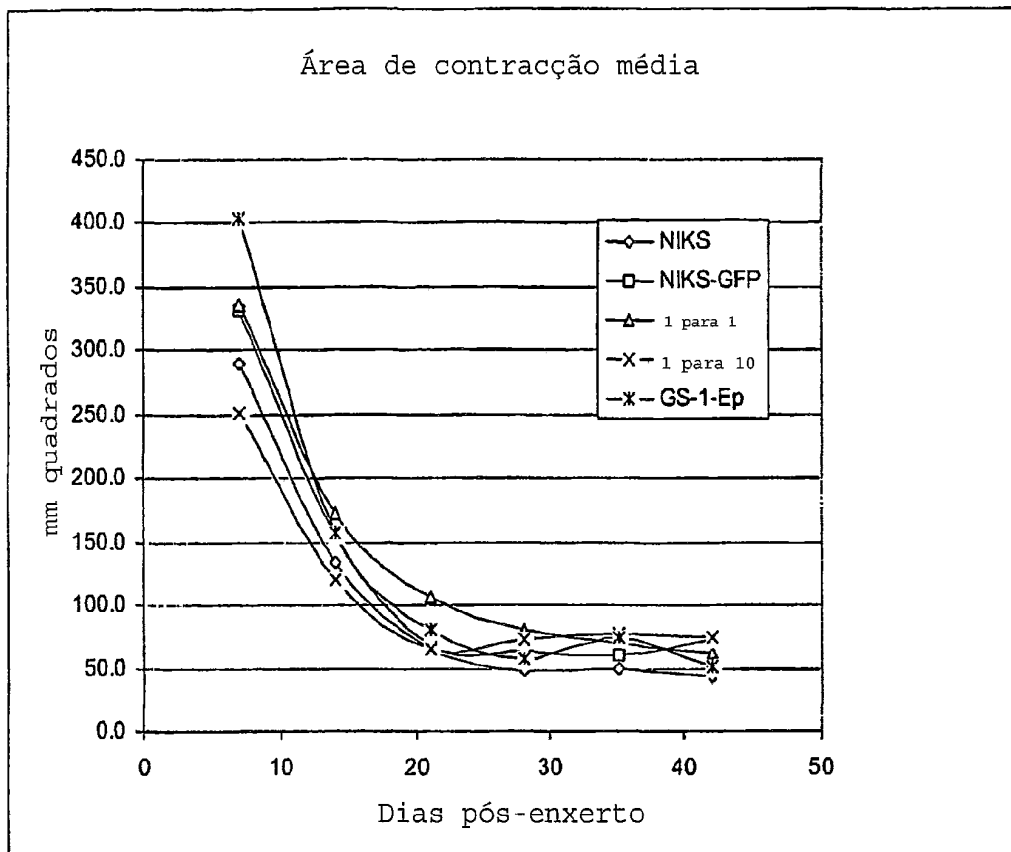


Figura 6

Biopsia 7 dias após enxerto em ratinhos Nu/Nu atímicos (NIKSGFP)

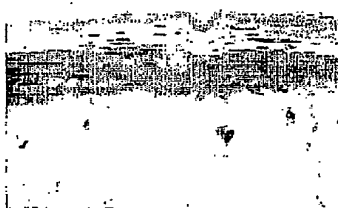
Aspecto in vivo

a.



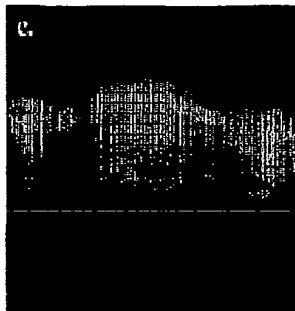
Histologia (H/E)

b.



Expressão de GFP

c.



GFP: proteína fluorescente verde

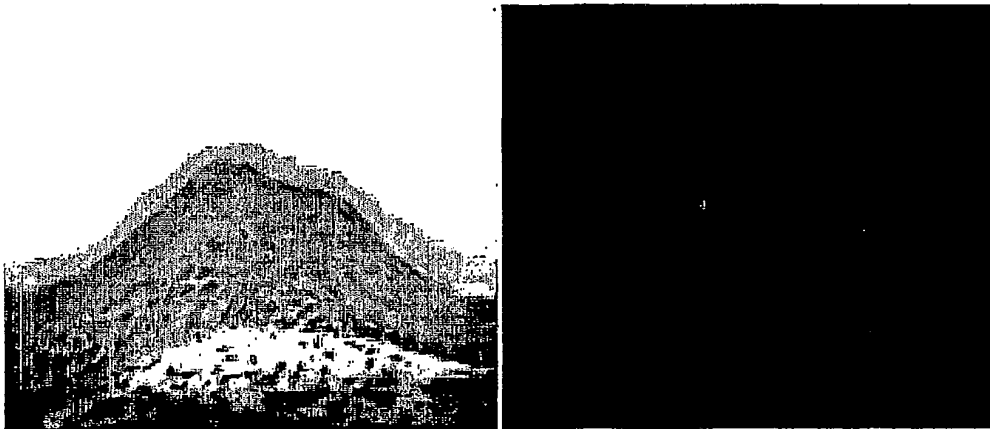
H/E: coloração de hematoxilina e eosina

Figura 7

Biopsia 28 dias após enxerto em ratinhos Nu/Nu atímicos (1:1 NIKSGFP:GS-1-EP)

Histologia (H/E)

Expressão de GFP



GFP: proteína fluorescente verde

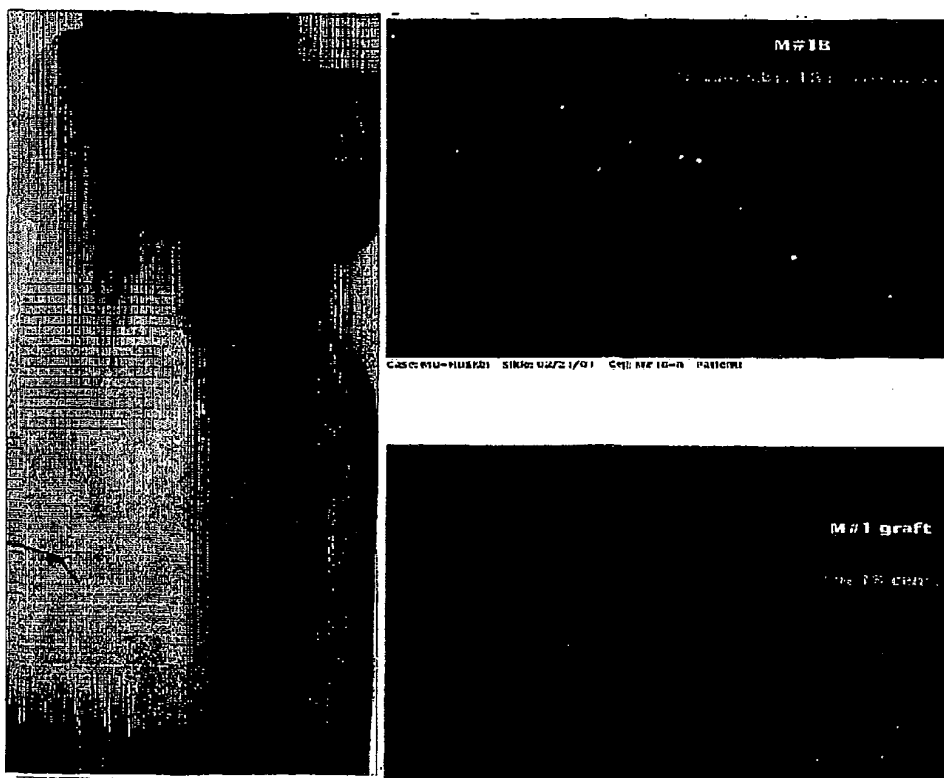
H/E: coloração de hematoxilina e eosina

Figura 8

Análise de centrómero X/Y

Enxerto quimérico dia 28

Análise de centrómero X/Y



M#1B: espécime a partir da área enxertada, coloração vermelha significa células humanas.

Enxerto M#1: coloração de controlo a partir de pele de ratinho normal, coloração verde significa células de ratinho.

Chr: cromossoma, Mu: murino, Hu: humano, Cent: centrómero

Figura 9