



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 780**

51 Int. Cl.:
C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03756966 .2**

96 Fecha de presentación : **05.06.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1509597**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.03.2005**

54 Título: **Procedimiento para el aislamiento de células madre mesenquimáticas del folículo piloso.**

30 Prioridad: **05.06.2002 DE 102 24 982**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.05.2010

73 Titular/es: **TrichoScience Innovations Inc.**
Suite 400, 455 Granville Street
Vancouver BC, CA

72 Inventor/es: **Hoffmann, Rolf y**
McElwee, Kevin J.,

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 338 780 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

Procedimiento para el aislamiento de células madre mesenquimáticas del folículo piloso.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento de células madre mesenquimáticas del folículo piloso.

Dejando de lado la mucosa, las palmas de las manos y las plantas de los pies, se encuentran folículos pilosos en todo el integumento del ser humano, que representan una unidad funcional compleja autocontenida, un órgano en miniatura. Se diferencian de modo topográfico-anatómico cuatro porciones: a) infundíbulo: sección entre el ostio del folículo piloso y la desembocadura de las glándulas sebáceas en el canal piloso; b) istmo: sección entre la desembocadura de las glándulas sebáceas y el punto de inserción del músculo erector del pelo; c) infrainfundíbulo (parte suprabulbar) sección entre el punto de inserción del músculo erector del pelo hasta el bulbo y d) bulbo piloso incluyendo las papilas. Se estima que una cabeza con pelo alberga aproximadamente 100.000 folículos pilosos que se distribuyen por el cuero cabelludo en grupos de 3-5 folículos pilosos, las denominadas unidades foliculares. Estas unidades foliculares están rodeadas por una trama de fibras de colágeno finas y están separadas entre sí por fibras de colágeno más anchas.

El bulbo piloso en forma de cebolla forma el extremo proximal del folículo piloso en crecimiento y, en los cabellos terminales, llega hasta el tejido graso subcutáneo (Figura 2a. recuadro). Las células de matriz pilosa situadas en el bulbo piloso se diferencian y forman así el tallo. Las células de la matriz son las denominadas “células amplificadoras transitorias”, es decir, una población de células que mueren después de una fase de crecimiento proliferativo elevado. En el bulbo piloso proximal la papila pilosa dérmica (Fig. 2b y c), que está alimentada por una fina trama de nervios y vasos, se curva hacia dentro como una cebolla. La papila pilosa dérmica se diferencia de la dermis a ese respecto en que está embebida en una matriz extracelular que es igual en su composición a una membrana basal. Durante la fase de crecimiento del folículo piloso (denominada anagenia) pueden por tanto entrar en contacto directo los fibroblastos individuales de las papilas pilosas dérmicas mediante extensiones celulares con queratinocitos de matriz. En la cabeza de la papila dérmica se asientan melanocitos que, dependiendo del ciclo capilar, presentan actividad de melanogénesis desde el estado de anagenia IV hasta el inicio de la catagenia (fase de regresión). Mediante las células papilares pilosas especializadas, se regula la actividad de los queratinocitos de matriz mediante señales morfogénicas y mitogénicas. Si aparecen disfunciones en este segmento capilar, termina la fase de crecimiento (anagenia) y el folículo entra en la fase de regresión, la catagenia. Así, se observa claramente que los procesos que destruyen los queratinocitos de matriz y la región protuberante suprayacente (zona protuberante) conducen a una pérdida capilar irreversible, mientras que los agentes nocivos que afectan únicamente a la función de las células papilares, determinan el tamaño de las papilas y el grosor de los tallos pilosos para formar. Por tanto, las papilas pilosas mayores se encuentran en pelos de la barba y cada vez más pequeñas en el caso de una alopecia androgénica.

La vaina radicular capilar de tejido conjuntivo (DS= vaina dérmica en inglés), el denominado folículo piloso, está compuesta por dos capas de fibras de colágeno, en las que la interna está dispuesta circularmente alrededor del tallo piloso. La parte externa más gruesa de la vaina radicular mesenquimática contiene fibras elásticas y de colágeno que discurren paralelas al tallo piloso. Adicionalmente, se encuentran como señal de la función táctil del pelo tramas circulares de fibras nerviosas que penetran hasta la membrana cristalina. Las vainas de raíz capilar mesenquimáticas se continúan en el extremo proximal en los denominados acolchamientos papilares.

El tallo piloso está rodeado por vainas radiculares epiteliales encajadas telescópicamente en forma de envoltura. A la altura de la formación y pigmentación del tallo piloso intrafolicular pueden delimitarse fácilmente, en sección transversal, una vaina radicular interna (VRI) y una vaina radicular externa (VRE). La VRI se forma a partir de la capa de Henle externa mayoritariamente doble, la capa de Huxley media multicapa, así como la cutícula. Las tres capas se generan a partir de las células de matriz situadas en el borde exterior del bulbo. Mientras que la vaina radicular externa se continúa directamente en la capa de células basales de la epidermis, la VRI termina aproximadamente a la altura del infundíbulo. Por tanto, la zona distal de paso al recubrimiento epidérmico del ostio folicular piloso presenta un cornificación epidérmica. Directamente por debajo de la desembocadura de las glándulas sebáceas, la VRE limita con la VRI. Un lugar importante de la VRE es el punto de inserción del músculo erector del pelo, la denominada protuberancia. En esta región, así como en posición proximal a ella, se supone el sitio de las células madre epiteliales del folículo piloso. Mediante un corte horizontal a la altura del istmo, se reconocen los cabellos terminales por su tallo piloso más grueso en comparación con la VRI y las vellosidades por sus tallos pilosos finos que son más finos que la VRI.

El folículo piloso está compuesto por dos tipos de células primarias. Un tipo de células se incorpora al inicio de la morfogénesis del folículo piloso a partir del ectodermo embrionario/epidermis, y el otro a partir de la porción mesodérmica. Aunque las células madre epiteliales del folículo piloso se encuentran significativamente dentro de la región denominada “protuberante” (inserción del músculo del folículo piloso) del folículo piloso, era la doctrina aceptada que las células madre mesenquimáticas residían en la papila dérmica. A este respecto, investigaciones anteriores han mostrado que pueden implantarse papilas dérmicas preparadas en segmentos de piel sin pelo y que esto induce la formación de nuevos folículos pilosos (Oliver 1970, Jahoda *et al.* 1984, Reynolds *et al.* 1999). Así, el lugar de extracción de las células papilares determina el tipo de cabellos formados (por ejemplo, papilas de pelo de bigote forman de nuevo pelos de bigote en una oreja de ratón). Pueden ponerse también papilas dérmicas (DP en inglés) en los medios de cultivo para elevar el recuento celular. Estas células de DP cultivadas pueden implantarse en zonas de piel sin pelo

(por ejemplo, las palmas de las manos) y son capaces incluso aquí de inducir la formación de nuevos folículos pilosos (Messenger 1984). Las células de DP son ciertamente capaces de inducir cabellos, pero no repueblan la región de DSC o DS. DSC significa “copa de vaina dérmica” y reproduce la situación de las células. Además, los cabellos formados mediante las células de DP tienen sólo una corta vida útil.

En el documento WO 99/03505, se muestra que están presentes células madre mesenquimáticas en el bulbo piloso. El documento WO 99/03505 no enseña sin embargo que las células madre mesenquimáticas del bulbo piloso presenten una actividad de fosfatasa alcalina.

La pérdida de cabello es por una parte una etapa del proceso de envejecimiento (alopecia senil), el resultado de mecanismos patológicos activos como en alopecia androgénica, alopecia areata y alopecias cicatrizante/traumática, o la consecuencia de una quimioterapia. La pérdida de cabello se contempla en general en la sociedad bajo una óptica negativa. La gran demanda de terapias para evitar la pérdida de cabello o para reemplazar cabellos ha conducido al desarrollo de una pluralidad de distintos medicamentos, productos y técnicas. En la investigación biológica del cabello, se ha identificado a las papilas dérmicas dentro de la unidad del folículo piloso como una estructura clave que determina el desarrollo y diferenciación del folículo piloso en la embriogénesis y que controla tanto el crecimiento de las fibras pilosas como el ciclo del folículo piloso. En muchas enfermedades de pérdida de cabello, incluyendo la alopecia más conocida, la androgénica, afectan a la papila dérmica factores externos que conducen a que la papila dérmica no pueda mantener erguida la unidad del folículo piloso. Parece ser atribuible en parte a una reducción del tamaño y a la pérdida de células de la papila dérmica. El tamaño reducido de la papila dérmica está en relación directa con el tamaño reducido de los folículos pilosos.

Pueden definirse de manera simplificada las enfermedades del cabello como de “demasiado pelo” (hipertricosis/hirsutismo) o de “poco pelo” (todas las formas de alopecia como alopecia areata, alopecia androgénica, pseudopelada de Brocq, alopecias por liquen planopilaris, lupus eritematoso, hipotricosis hereditaria y atriquias (atriquia papular entre otras), pérdida difusa del cabello en el marco de una enfermedad metabólica como, por ejemplo, una disfunción de la glándula tiroidea, alopecias después de quemadura o traumas, alopecias después de quimioterapia y otras). Para estas distintas alopecias, están a disposición únicamente para la alopecia androgénica dos principios activos admitidos (finasterida, minoxidilo). Ningún principio activo afecta a las células madre y ningún principio activo puede garantizar un crecimiento de cabello cosméticamente aceptable en todos los casos. El tratamiento de hipertricosis se realiza esencialmente de forma física, es decir, destrucción del folículo piloso mediante terapia de láser. También aquí sería efectiva la inhibición de la función de células madre.

Existe por tanto una necesidad justificada de agentes para tratar un crecimiento insuficiente del cabello.

Se consigue el objetivo de la presente invención mediante el objeto descrito en las reivindicaciones.

Las siguientes figuras ilustran la invención.

La Figura 1 es una representación esquemática de un folículo piloso terminal.

La Figura 2A muestra en corte histológico un cabello anagénico. El recuadro reproduce la sección representada en las Figuras 2B y C. DSC significa “copa de la vaina dérmica” y reproduce la posición de las células. Las células de DSC se definen claramente de modo anatómico-topográfico por su posición en el folículo piloso y se encuentran en el polo inferior del bulbo piloso en una posición acetabular que rodea al bulbo piloso. DP significa “papila dérmica”. DS significa “vaina dérmica”.

Las Figuras 3 (a) a (i) ilustran las etapas individuales de un esquema de disección para la obtención de células acetabulares pilosas (DSC). Se preparan cabellos anagénicos intactos (a) bajo el estereomicroscopio. La vista aumentada en (b) muestra el nivel de disección: se realiza un corte transversal del cabello en el polo superior de la zona pigmentada; el bulbo piloso dispuesto de forma acetabular (DSC) puede retirarse con la papila pilosa dérmica (c). Se evierte este trozo de tejido (d) y se separa la papila dérmica (e) del bulbo piloso (f); permanecen las porciones epiteliales (h) del folículo piloso y la cubierta de tejido conjuntivo (i) = vaina dérmica = DS.

Las Figuras 4 (a) a (c) muestran en una representación el resultado de un implante de células de DSC en la oreja de un ratón. Se multiplicaron tejidos de DSC aislados en el cultivo celular y se implantaron células en una oreja de ratón inicialmente sin pelo. Después del implante de células de DSC de pelo de bigote en la oreja derecha, crecieron pelos de bigote en esta oreja de ratón. La oreja izquierda no tratada no mostró crecimiento capilar de pelos de bigote. Las Fig. 4b y 4c muestran los respectivos aumentos.

Las Figuras 5 (a) a (f) muestran en histogramas la actividad de fosfatasa alcalina. Esas figuras muestran la alta expresión de la fosfatasa alcalina en la papila pilosa dérmica, mientras que las células de DSC presentan sólo una baja expresión. La expresión termina bruscamente en la transición de DSC a DS (Fig. 3b y c, Fig. 5a-c). *In vitro*, las células cultivadas de DP (Fig. 5f) y DSC (Fig. 5e) muestran un patrón de crecimiento idéntico que tiende a la formación de las denominadas pseudopapilas. Las células de DS tienden a un patrón de crecimiento con células muy alargadas, en una disposición en forma de haces musculares de los peces (Fig. 5d). Las células de DP (Fig. 5f) muestran una actividad de fosfatasa alcalina alta, las de DSC (Fig. 5e) baja y las de DS (Fig. 5d) nula.

La Figura 6 muestra papilas pilosas dérmicas inducidas y repobladas después del implante de células de DSC. Se cultivaron como se ha descrito células de DSC fluorescentes de ratones TgN-GFPX y se implantaron en orejas de ratones SCID. Después de 6 meses, se mostró claramente un nuevo crecimiento capilar (Fig. 4). En microscopio láser confocal, se encontraron después del implante células fluorescentes tanto en las papilas pilosas dérmicas como en la región de DSC y en parte en la vaina dérmica (a, b). Aunque todas las células de las papilas recién formadas presentan en parte fluorescencia, se muestran otras células fluorescentes individualizadas (c, d) como señal de que las células de DSC pueden repoblar una papila preexistente para formar así un cabello más grueso.

La Figura 7 muestra el resultado de una transferencia Western para proteína MSP: Se separaron por cromatografía (PAGE-SDS: 12% de poliacrilamida) extractos de proteína MSP de células cultivadas de papila dérmica pilosa (citól = carril 1, unida a membrana = carril 4); células acetabulares dérmicas (citól = carril 2, unida a membrana = carril 5) y fibroblastos foliculares (citól = carril 3, unido a membrana = carril 6) y se transfirieron a una membrana de nailon (Hybond ECL, Amersham Biosciences GmbH, Friburgo, Alemania). Se bloquearon las membranas con leche desnatada en polvo al 5% y se lavaron con Tween 20 al 0,5% (Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Alemania) en PBS. Se empleó un anticuerpo policlonal de cabra anti-MSP humana contra MSP (HGFL (N-19), sc-6088, Santa Cruz) en un sistema de detección por ECL (Amersham) según los datos del fabricante. Se reconoce claramente una banda fuerte a 56 kDa, particularmente en las células de papilas dérmica.

Las células madre mesenquimáticas adultas del folículo piloso (DSC) tienen la propiedad de formar un folículo piloso completamente nuevo, migrar a una papila pilosa existente, formar una parte de la cubierta de tejido conjuntivo y tener menor actividad de fosfatasa alcalina que las células de papila dérmica. Preferiblemente, las células de DSC proceden de un mamífero, particularmente de un ratón, rata, conejo, conejillo de Indias, cabra, cerdo, vaca o ser humano. Las células de DSC son capaces o poseen la propiedad, a diferencia de las células de la cubierta de tejido conjuntivo folicular (DS) y de papila dérmica (DP), de formar un folículo piloso completamente nuevo o de migrar a una papila pilosa existente para producir así un cabello mayor o más grueso. Además, estas células son capaces o poseen la propiedad de formar una parte de la cubierta de tejido conjuntivo dérmico. Estas dos características no se dan en células de DS ni en células de DP. Las células madre mesenquimáticas adultas del folículo piloso, citadas en adelante también como células madre de DSC o células de DSC, se encuentran en una disposición de forma acetabular alrededor del polo inferior del bulbo piloso, y se citan por tanto como células acetabulares del bulbo piloso (en inglés “copa de la vaina dérmica” = DSC). El término “adulto” aquí usado en relación con células madre mesenquimáticas significa que en el caso de las células madre mesenquimáticas no se trata de células madre embrionarias, sino de células madre mesenquimáticas aisladas de organismos adultos.

Las células de DSC pueden caracterizarse bioquímicamente. Para ello, se aprovechó su expresión de fosfatasa alcalina. En contraposición con las células de DP, las células de DSC muestran sólo una baja actividad de fosfatasa alcalina. Las células de DP se caracterizan por que en el marco del ciclo capilar completo muestran una pronunciada actividad de fosfatasa alcalina. La actividad de la fosfatasa alcalina en las células de DSC es significativamente menos pronunciada. Las células de DS no muestran actividad de fosfatasa alcalina. En el marco de la invención, una baja actividad de fosfatasa alcalina significa que la actividad de las células de DSC frente a las células de DP es hasta aproximadamente un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% ó 50% menor. Además, una baja actividad de fosfatasa alcalina significa que la actividad de las células de DSC es al menos aproximadamente un 10% menor, preferiblemente al menos aproximadamente un 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% ó 50% menor que la actividad pronunciada de la fosfatasa alcalina en DP.

La presente invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento de células madre mesenquimáticas del folículo piloso que comprende las siguientes etapas:

- a) preparación de cabellos vitales;
- b) escisión del cabello preparado en la etapa a);
- c) aislamiento del bulbo piloso unido de forma acetabular junto con la papila pilosa dérmica;
- d) separación de la papila pilosa dérmica del bulbo piloso;
- e) cultivo del bulbo piloso obtenido en la etapa d);
- f) agrupamiento de las células confluentes.

Preferiblemente, los folículos pilosos proceden de un mamífero, particularmente de un ratón, rata, conejo, conejillo de Indias, cabra, cerdo, vaca o ser humano. La presente invención se refiere además a células madre mesenquimáticas del folículo piloso, que pueden obtenerse según el procedimiento según la invención.

Las células de DSC pueden aislarse con ayuda del siguiente procedimiento. Se separa en primer lugar mediante microdissección un folículo piloso en sus porciones del modo siguiente. Se preparan cabellos vitales, por ejemplo cabellos anagénicos intactos, bajo un microscopio de disección. En cabellos pigmentados, se hace un corte transversal del cabello en el polo superior de la zona pigmentada (Fig. 3b, flechas) y se retira el bulbo piloso unido de forma acetabular (DSC) junto con la papila pilosa dérmica (DP) (Fig. 3c). Se evierte este trozo de tejido (Fig. 3d) y se

separa la papila pilosa dérmica (Fig. 3e) del bulbo piloso (Fig. 3f). Este procedimiento puede aplicarse no sólo para la preparación de células madre mesenquimáticas del folículo piloso, sino también para la preparación de células madre mesenquimáticas de células de uñas y sistema dental. El procedimiento puede aplicarse a todos los organismos eucarióticos, por ejemplo a mamíferos, particularmente a seres humanos.

5 El bulbo piloso obtenido se multiplica en el cultivo celular en condiciones estándar. Por ejemplo, puede cultivarse del modo siguiente. Como medio se usa el medio basal AmnioMax C 100 (Gibco) y el suplemento AmnioMax C100. En este medio, se cultivan en condiciones estériles los DSC en primer lugar en placas de cultivo de 24 pocillos (Falcon, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) en condiciones estándar (37°C, 5% de CO₂, 500 µl de medio). Al cabo de pocos días,
10 crecen espontáneamente células y, después de alcanzar un cultivo confluyente, se desprenden con 200 µl/pocillo de tripsina-EDTA (detención de la tripsinación con 260 µl de medio Amniomax/pocillo después del desprendimiento de todas las células) y se transfieren a matraces de cultivo de 25 ml (Greiner, Frickenhausen). Para ello, se combinan las células, se centrifugan durante 10 minutos a 1.000 rpm, se desecha el sobrenadante y se recoge en 5 ml de Amniomax. Se cambia el medio cada 3 días. Como confirmación de que las células obtenidas son las células madre mesenquimáticas según la invención, puede llevarse a cabo una detección de fosfatasa alcalina. Para ello, pueden cultivarse
15 las células en cubreobjetos de vidrio estériles, fijarse con acetona y analizarse como se describe en los ejemplos. El tiempo de incubación de la detección *in vitro* correspondiente a los ejemplos descritos es en condiciones estándar de aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 1,5 horas, preferiblemente aproximadamente 1 hora.

20 Con el mismo procedimiento, pueden aislarse y multiplicarse tanto las células madre mesenquimáticas de uñas como del sistema dental.

Las células de DSC pueden propagarse mediante cultivo celular y los cultivos celulares pueden cultivarse durante varios pases. Las células de DSC muestran propiedades tanto morfológicas como bioquímicas que pueden diferenciarse claramente entre sí. Los fibroblastos de la cubierta de tejido conjuntivo dérmico (DS) muestran morfológicamente un patrón de crecimiento típico que recuerda a un patrón similar a haces musculares de los peces. Las células de DSC crecen más compactas, no forman estas estructuras similares a haces musculares de los peces y muestran una tendencia a la formación de las denominadas pseudopapilas, es decir, en las placas de cultivo celular forman colonias celulares pequeñas que recuerdan morfológicamente a una papila pilosa dérmica. Como ya se ha mencionado anteriormente,
30 los fibroblastos de cubierta de tejido conjuntivo folicular (DS) no expresan fosfatasa alcalina, las células de DSC sólo una actividad muy baja, mientras que las células de DP *in vitro* e *in vivo* presentan en cambio una actividad alta de la fosfatasa alcalina.

Las células de tejido conjuntivo en el polo inferior de la vaina de tejido conjuntivo, las denominadas células de bulbo piloso= DSC, pueden regenerar todas las estructuras relevantes de la unidad de folículo piloso generadas por la dermis. Mediante esta propiedad, posibilitan la formación de nuevo crecimiento de cabello, o mediante la repoblación de una papila pilosa pequeña, la formación de un cabello más grueso. La vida útil del cabello recién formado no está así limitada en el tiempo, sino que puede ser en principio de por vida. Dicha capacidad regenerativa de por vida no se ha descrito en cambio después del implante de células de DP. Todos los ensayos con células de DP son sólo de naturaleza temporal, mientras que, mediante el implante de células madre genuinas de células de DSC, se aporta una
40 posibilidad de proliferación de por vida a la piel.

Las células madre mesenquimáticas del folículo piloso referidas pueden usarse como agente para terapia y profilaxis, así como para tratamientos cosméticos. Las células madre de DSC pueden usarse para la preparación de un agente
45 para la terapia o la profilaxis de alopecia o para terapia génica.

Las células obtenibles con el procedimiento según la invención pueden usarse para el tratamiento de una alopecia, particularmente alopecia areata, alopecia androgénica, pseudopelada de Brocq, alopecia por liquen planopilaris, lupus eritematoso, hipotricosis hereditaria y atriquias, pérdida difusa del cabello en el marco de una enfermedad metabólica, alopecia después de quemadura o traumas o alopecia después de quimioterapia, así como para terapia génica. La administración puede realizarse, por ejemplo, mediante inyección de las células en solución (por ejemplo, solución fisiológica de sal común) o implante, es decir, embebidas en una matriz (por ejemplo colágeno) o empaquetadas en liposomas. Si no es suficiente una sola inyección o implante, son posibles tratamientos posteriores. Si se prefieren determinados modos de administración para zonas de la piel individuales, pueden administrarse correspondientemente
55 las células de DSC.

Las correspondientes células madre mesenquimáticas de uñas y sistema dental poseen propiedades correspondientes (Chuong *et al.*, 2001, Thesleff, 2000). Una causa de ello podría consistir en que tienen orígenes ontogénicos comunes, y puesto que durante la embriogénesis se repiten todas las estructuras morfológicas esenciales comunes, se reproduce la posición de las células madre mesenquimáticas del folículo piloso también en uñas y dientes. Por tanto, también los dientes se pueden regenerar con células cultivadas del sistema dental peribulbar. Mediante el aprovechamiento de las propiedades morfogénicas, puede inducirse análogamente al cabello una uña o diente nuevo o más grueso.
60

65 Con la capacidad de las células de DSC de producir nuevos folículos pilosos, o de sustituir los folículos pilosos dérmicos ya presentes en la piel, es por tanto posible tratar todas las formas de pérdida de cabello y miniaturización pilosa. A esto se añaden la prolongada capacidad de supervivencia de las células de DSC y su capacidad de poder implantarse sin más y permanecer así totalmente funcionales. Las células de DSC del folículo piloso, uñas o el sistema dental

pueden encontrar igualmente uso en la terapia génica, en la que es necesaria la producción de sustancias secretoras. Estas células podrían modificarse genéticamente de modo que fueran capaces, por ejemplo después de transfección de las células, de secretar el producto deseado. A través de la piel, el producto podría distribuirse sistémicamente por la sangre. Como ejemplo, se cita aquí la transfección de células de DSC con un gen de insulina. Después del implante de estas células ahora productoras de insulina, sería posible el tratamiento de diabetes sacarina. Son conocidos muchos otros ejemplos de falta de un producto de secreción (hormonas, proteínas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, mediadores lipídicos).

Microdissección: mediante microdissección se separaron primero las partes de un folículo piloso de pelo de bigote de un ratón. Como resulta evidente por la Figura 3a, se prepararon en primer lugar cabellos anagénicos intactos bajo un microscopio de disección. En cabellos pigmentados, se hizo un corte transversal del cabello en el polo superior de la zona pigmentada (Fig. 3b, flechas) y se retiró el bulbo piloso unido de forma acetabular (DSC) junto con la papila pilosa dérmica (Fig. 3c). Se evirtió este trozo de tejido (Fig. 3d) y se separó la papila pilosa dérmica (Fig. 3e) del bulbo piloso (Fig. 3f). Después de la disección, permanecieron la vaina radical epitelial (Fig. 3h) y la cubierta de tejido conjuntivo (Fig. 3i).

Cultivo celular: Se multiplicó después el bulbo piloso diseccionado en el cultivo celular. Como medio se usó medio basal AmnioMax C 100 (Gibco) AmnioMax C 100 (Gibco) y suplemento AmnioMax C100. En este medio, se cultivaron en condiciones estériles los DSC en primer lugar en placas de cultivo de 24 pocillos (Falcon, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) en condiciones estándar (37°C, 5% de CO₂, 500 µl de medio). Al cabo de pocos días, crecieron espontáneamente células y, después de alcanzar un cultivo confluyente, se desprendieron con 200 µl/pocillo de tripsina-EDTA (detención de la tripsinación con 260 µl de medio Amniomax/pocillo después del desprendimiento de las células) y se transfirieron a matraces de cultivo de 25 ml (Greiner, Frickenhausen). Para ello, se combinaron las células, se centrifugaron durante 10 minutos a 1.000 rpm, se desechó el sobrenadante y se recogió en 5 ml de Amniomax. Se cambió el medio cada 3 días. Como medio se usó medio basal AmnioMax C 100 (Gibco) y suplemento AmnioMax C100. En este medio, se cultivaron en condiciones estériles los DSC en primer lugar en placas de cultivo de 24 pocillos (Falcon, Franklin Lakes, EE.UU.). Al cabo de pocos días, crecieron espontáneamente células, se multiplicaron y pudieron subcultivarse con procedimientos estándar en matraces de cultivo de 25 ml (Greiner, Frickenhausen).

Detección de fosfatasa alcalina: Para análisis *in vivo*, se liofilizaron tejidos, se embebieron en reactivo OCT (Tissue tec, Sakura, Zoeterwoude, Holanda) y se prepararon cortes congelados de 6 µm de grosor. Se detectó la fosfatasa alcalina con solución de sustrato de fosfatasa alcalina "fast red TR" (compañía Pierce, Rockford, IL, EE.UU.: 10 mg de "fast red TR" como se suministra, 10 ml de tampón de sustrato, 1,5 ml de concentrado de fosfato Naphthol AS-MX como se suministra) pH 8,1 según los datos del fabricante. Se desarrolló durante 30 minutos en ausencia de levamisol. Para la detección de la fosfatasa alcalina *in vitro*, se cultivaron las células en cubreobjetos de vidrio estériles, se fijaron con acetona y se usó el reactivo para la medida de la fosfatasa alcalina como se ha descrito. El tiempo de incubación ascendió a 1 hora.

Inducción del crecimiento capilar: Después de pocos pases celulares, las células eran todavía capaces de inducir un nuevo cabello. Después de una pequeña herida (rasguño), se inyectaron en una oreja de ratón 3-5 x 10⁶ células en 0,1 ml de PBS en la dermis con una cánula de calibre 16 aproximadamente a 2 mm de la herida. Para estos experimentos, se anestesió el animal con 1,66 ml de clorhidrato de xilazina (Rompun, Bayer Vital Leverkusen, Alemania) en 10 ml de clorhidrato de ketamina (Hexal, Holzkirchen, Alemania). Después, se observó en el transcurso de varias semanas si se mostraba nuevo crecimiento capilar. Después de 2 meses, se observó crecimiento capilar después del implante de DP y DSC, pero no después del implante de células de DS. El crecimiento capilar continuó durante el intervalo de 6 meses, lo que indica que estas observaciones clínicas no son un fenómeno temporal. Además, pudo observarse que los cabellos ya presentes se volvían más gruesos después del implante (Fig. 6).

Microscopia láser confocal: Además de la propiedad biológica de inducción del crecimiento capilar por células de DSC, se observó la migración de las distintas células después del implante. Para ello, se prepararon tejidos de las tres zonas capilares morfológicas descritas (DP, DS, DSC) de ratones (STOCK TgN(GFPX)4Nagy). Se eligieron estos ratones ya que todas las células nucleadas de estos ratones portan proteína fluorescente verde. Se cultivaron a partir de estos tejidos células y se sometieron a pases durante un intervalo de 6 semanas. Se inyectaron los tres distintos tipos de células en la oreja de ratones inmunoincompetentes CbySmm.CB17-Pi-kdc^{scid}/J. Adicionalmente, se inyectaron células de ratones GFP STOCK TgN(GFPX)4Nagy, C3H/HeJ no fluorescentes y ratas PVG/OlaHsd de igual modo. Se observó si se mostraba nuevo crecimiento capilar o un engrosamiento de cabellos ya existentes. Después de 2-6 meses, se sacrificaron los animales y se embebieron las orejas. Para ello, se fijaron los tejidos en paraformaldehído al 4% (Sigma, Deisenhofen) en PBS^{-/-} durante 2 horas, después se aclararon varias veces con PBS^{-/-}. Se embebió el tejido en "Tissue Tek" a temperatura ambiente y se dispuso durante 24 horas en la oscuridad a +4°C. A continuación, se liofilizaron lentamente a -70°C los tejidos en una caja de Styropor acolchada con celulosa (la denominada "técnica de congelación lenta"). Se calentó el bloque de tejido al inicio durante 30 minutos a -20°C. Se prepararon entonces en criostatos cortes de entre 20 y 40 µm, que se montaron en portaobjetos pretratados con poli-L-lisina al 1% (Sigma, Deisenhofen, Alemania). Se realizó el secado a temperatura ambiente. Después, se aclararon los cortes 1 x con PBS^{-/-}, antes de recubrir los cortes con PBS^{-/-} o medio de recubrimiento que contiene agua, por ejemplo glicerol. Se grabaron los tejidos con un microscopio láser de la compañía Zeiss (Götting, Alemania), de tipo LSM 410, a longitudes de onda de 488 nm de excitación y 500-520 nm de emisión, eje Z, a intervalos de 2 µm con láser de argón-criptón.

Acto seguido, se prepararon cortes en serie (20-40 μ m) y se analizó en microscopio láser confocal la presencia de células que expresaran GFP (= proteína fluorescente verde). Con estos ensayos, pudieron confirmarse investigaciones previas de que era posible un nuevo crecimiento capilar mediante el implante de células de DP y que sólo las células implantadas forman el nuevo cabello, mientras que las células DS implantadas no conducían a la formación de cabello, aunque mediante microscopio confocal eran visibles de forma difusa en la dermis en forma de una población de células que expresaban GFP. Las células de DP implantadas conducían sólo a la formación de una nueva papila pilosa dérmica, pero no a la formación de una cubierta de tejido conjuntivo folicular. Las células de DSC en cambio formaban tanto una nueva papila pilosa dérmica como parte de la cubierta de tejido conjuntivo folicular. Debido a que las células de bulbo piloso pueden regenerar todas las estructuras capilares dérmicas, mientras que las células de las papilas dérmicas capilares ya no pueden, se deduce que las DSC son algo más indiferenciadas y más pluripotentes que las células de la papila dérmica capilar. Por tanto, las células de DSC son células madre mesenquimáticas adultas del folículo piloso. En la Fig. 4, se ilustra la propiedad inductiva de las células de DSC. En resumen, ha podido observarse como resultado que las DSC son las células madre putativas a partir de las que se forman las papilas dérmicas y las vainas de tejido conectivo folicular.

Ha podido mostrarse que, después del implante de DSC, se forma nuevo cabello y que las células de DSC implantadas forman tanto una nueva papila dérmica como una nueva cubierta de tejido conectivo. Esto era visible con microscopio confocal mediante fluorescencia verde tanto en la zona acetabular capilar como en la papila dérmica y la cubierta de tejido conjuntivo. A partir de los análisis, que se hicieron 6 meses después de la inyección de las células, resultó que las células que expresaban GFP en las estructuras de folículo piloso relevantes seguían estando presentes. Las células inyectadas tienen un ciclo celular muy lento típico de células madre y presentan capacidad regenerativa. No hubo agrupamiento de células dérmicas que no expresaran GFP por parte del hospedador. Además, no pudieron observarse células fluorescentes verdes individuales en cabellos preexistentes, señal de que las células de DSC implantadas colonizan las papilas dérmicas capilares existentes y conducen así a un cabello más grueso.

Bibliografía

Chuong CM, Hou L, Chen PJ, Wu P, Patel N, Chen Y (2001) "Dinosaur's feather and chicken tooth? Tissue engineering of the integument". *Eur. J. Dermatol.* 11: 286-292.

Hutchinson PE, Thompson JR (1997) "The cross-sectional size and shape of human terminal scalp hair". *Br. J. Dermatol.* 136: 159-165

Hutchinson PE, Thompson JR (1999) "The size and form of the medulla of human scalp hair is regulated by the hair cycle and cross-sectional size of the hair shaft". *Br. J. Dermatol.* 140: 438-445

Jahoda CA, Horne KA, Oliver RF. "Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells". *Nature*. 11-17 de octubre de 1984; 311 (5986): 560-2.

Kligman A (1959) "The human hair cycle". *J. Invest. Dermatol.* 31: 307-316

Messenger AG. "The culture of dermal papilla cells from human hair follicles". *Br. J. Dermatol.* junio de 1984; 110 (6): 685-9.

Oliver RF. "The induction of hair follicle formation in the adult hooded rat by vibrissa dermal papillae". *J. Embryol. Exp. Morphol.* febrero de 1970; 23(1): 219-36.

Paus R, Cotsarelis G (1999) "The biology of hair follicles". *N. Engl. J. Med.* 341: 491-497

Reynolds AJ, Lawrence C, Cserhalmi-Friedman PB, Christiano AM, Jahoda CA. "Trans-gender induction of hair follicles". *Nature*. 4 de noviembre de 1999; 402 (6757): 33-4.

Sperling LC (1991) "Hair anatomy for the clinician". *J. Am. Acad. Dermatol.* 25: 1-17

Thesleff I (2000) "Genetic basis of tooth development and dental defects". *Acta Odontol. Scand.* 58: 191-194.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el aislamiento de células madre mesenquimáticas del folículo piloso, que comprende las siguientes etapas:

- a) escisión de un cabello previamente preparado;
- b) aislamiento del bulbo piloso unido de forma acetabular junto con la papila pilosa dérmica;
- c) separación de la papila pilosa dérmica y del bulbo piloso;
- d) cultivo del bulbo piloso obtenido en la etapa c) para producir células madre mesenquimáticas, presentando las células madre mesenquimáticas una actividad de fosfatasa alcalina;
- e) agrupamiento de las células confluentes.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el folículo piloso procede de un mamífero.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el mamífero es un ratón, rata, conejo, conejillo de Indias, cabra, cerdo, vaca o ser humano.

FIG. 1

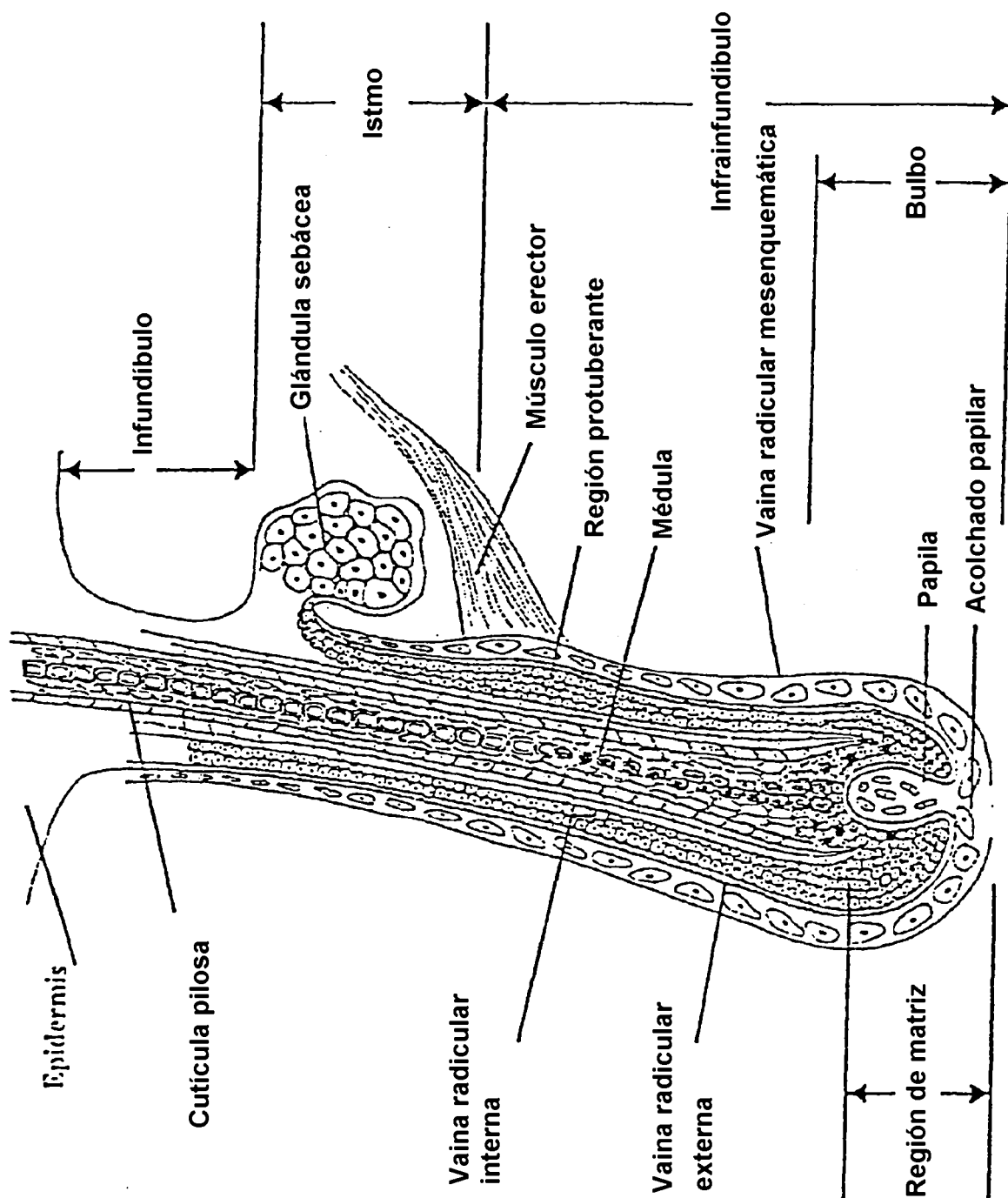


FIG. 2

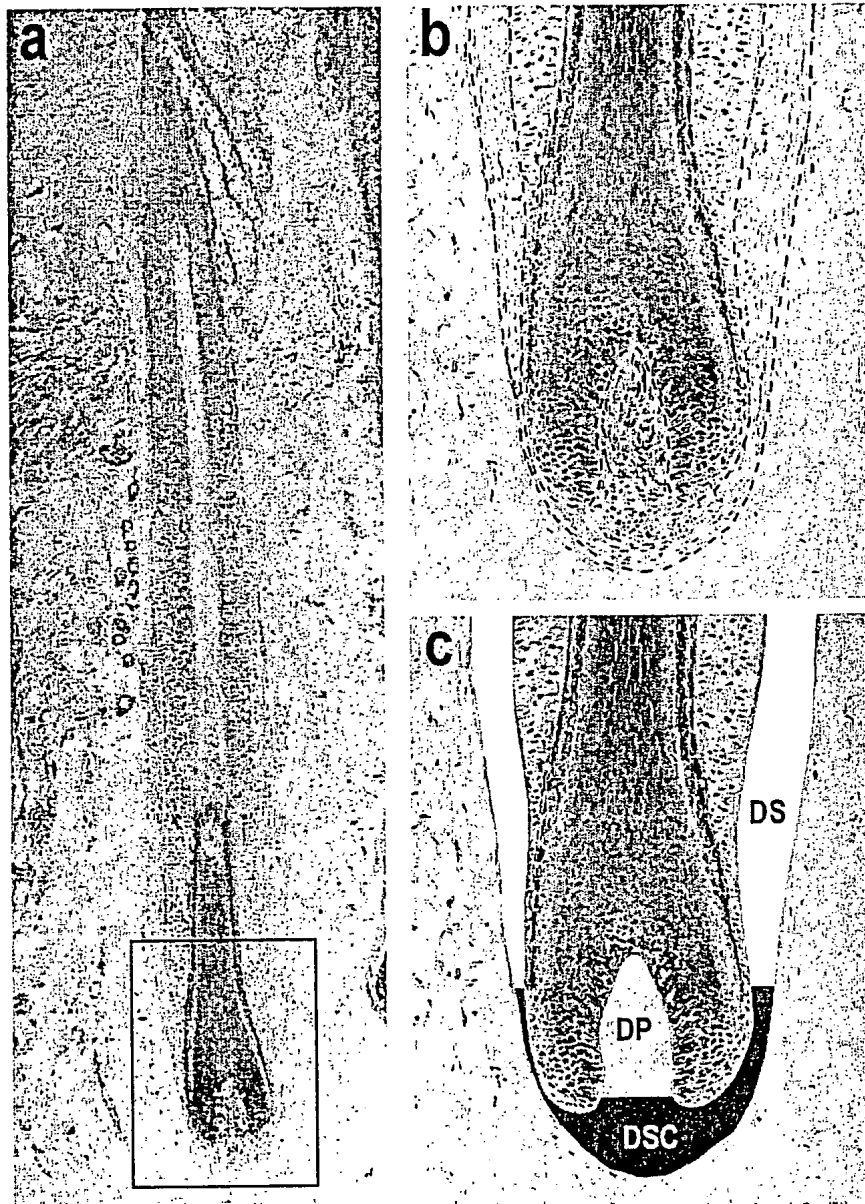


FIG. 3

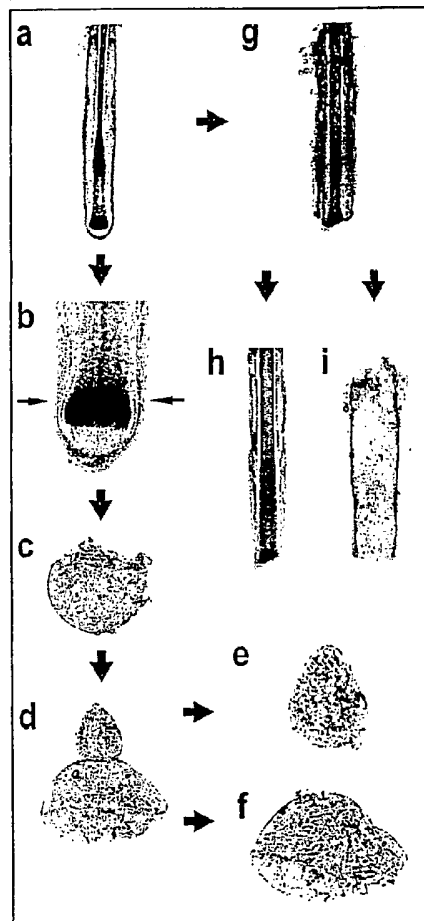


FIG. 4

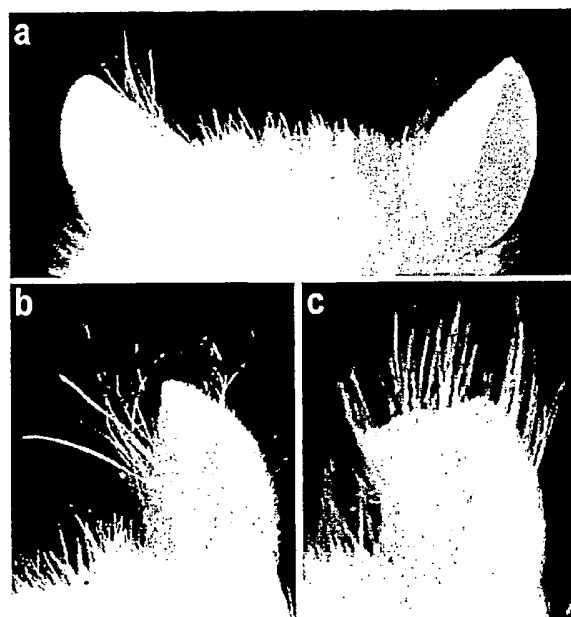


FIG. 5

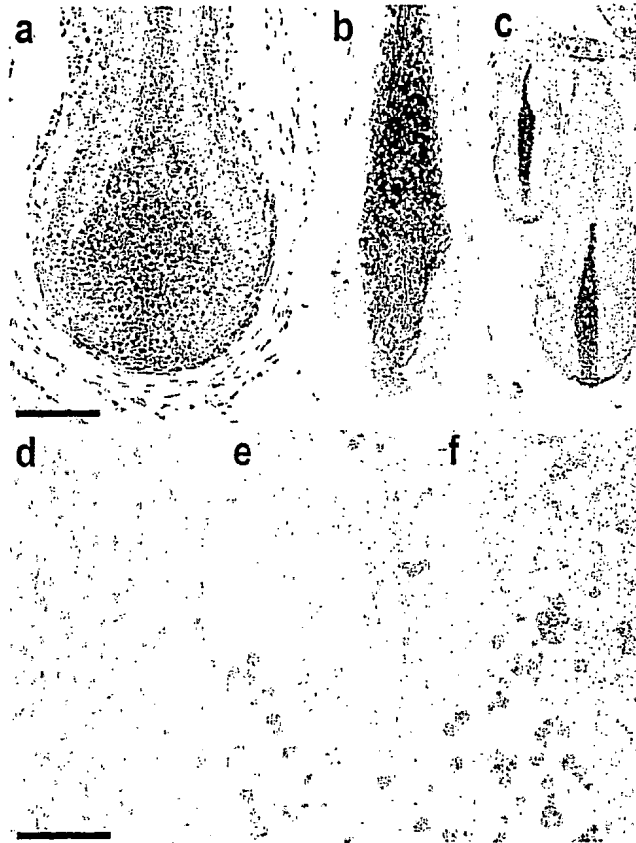


FIG. 6

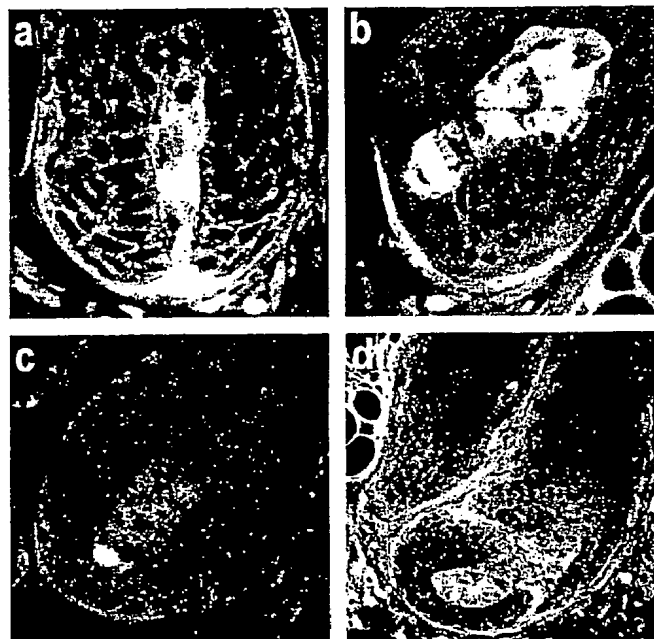


FIG. 7

